

**Identifikation von Stressresistenzgenen in
hämatologischen Neoplasien in *Mus musculus*
(Linnaeus, 1758)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) am
Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dipl. Biol. Afra Engelmann
geboren in Iserlohn

Hamburg, September 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. W. DEPPERT
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W: SCHÄFER
Tag der Disputation: 01. Dezember 2006

Hamburg, den 12. November 2006




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2003 bis September 2006 in der Abteilung Molekulare Pathologie am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in der Arbeitsgruppe von Frau Carol Stocking, PhD.

Teile dieser Arbeit werden in Kürze veröffentlicht:

Engelmann A, Speidel D, Deppert W, Stocking C. Gadd45 β is a pro-survival factor associated with stress resistant hematopoietic tumors. Manuskript in Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	1
II Einleitung	2
1. Apoptose.....	2
1.1 Rezeptor vermittelte Apoptose	4
1.2 Mitochondrial vermittelte Apoptose	4
1.3 Einfluss von p53 auf die Apoptose	5
2. Nicht-apoptotischer Zelltod	6
2.1 Autophagie	6
2.2 Nekrose	6
3. Retrovirale Insertionsmutagenese	7
3.1 Retrovirale Integration	7
3.2 Retrovirale Integration und ihr Einfluss auf die Genexpression	9
3.3 Anwendungen der retroviralen Insertionsmutagenese	12
III Fragestellung	13
IV Material und Methoden	14
IV.1 Material	14
IV.1.1 Enzyme	14
IV.1.2 Kits	14
IV.1.3 Mausstämme.....	14
IV.1.4 Bakterienstämme	15
IV.1.5 Zelllinien	15
IV.1.5.1 Primäre Zellen.....	15
IV.1.5.2 Murine Zelllinien.....	15
IV.1.6 Medien	15
IV.1.6.1 Bakterienkulturmedien	15
IV.1.6.2 Zellkulturmedien und -lösungen	16
IV.1.7 Puffer.....	17
IV.1.8 Antikörper.....	17
IV.1.8.1 Primäre Antikörper	17
IV.1.8.2 Sekundäre Antikörper	17
IV.1.8.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie	17

IV.1.9	Plasmide	18
IV.1.9.1	Plasmide für die Klonierung	18
IV.1.9.2	Klonierte Sonden	18
IV.1.9.3	Helferplasmide für die Virusproduktion	19
IV.1.9.4	Retrovirale Konstrukte	19
IV.1.10	Oligonukleotide	20
IV.1.11	DNA-Sonden	21
IV.1.12	Geräte	21
IV.2	Methoden	22
IV.2.1	Mausmodell	22
IV.2.1.1	Infektion von neonatalen Mäusen	22
IV.2.1.2	Identifikation transgener Mäuse	22
IV.2.1.3	Transplantation und Bestrahlung von Tumorzellen	22
IV.2.1.4	Analyse erkrankter Tiere	23
IV.2.2	Nukleinsäure-analytische Methoden	25
IV.2.2.1	Standardmethoden	25
IV.2.2.2	Isolation und Aufreinigung von DNA	25
IV.2.2.3	Isolation genomischer DNA aus Organen	25
IV.2.2.4	Isolation von RNA	26
IV.2.2.5	Reverse Transkription	26
IV.2.2.6	PCR und Sequenzierung	27
IV.2.2.7	Klonierung von DNA	29
IV.2.2.8	Herstellung radioaktiv markierter Sonden und Größenstandards	31
IV.2.2.9	Nachweis von RNA und DNA im Blotverfahren	32
IV.2.2.10	Real Time PCR	34
IV.2.3	Zellkultur	35
IV.2.3.1	Kultivierung von adhärennten Zellen	35
IV.2.3.2	Kultivierung von Suspensionszellen	35
IV.2.3.3	Kultivierung von Tumorzellen	35
IV.2.3.4	Auftauen und Einfrieren von Zellen	35
IV.2.3.5	Herstellung infektiöser Viruspartikel	35
IV.2.3.6	Titerbestimmung	36

IV.2.3.7	Analyse von Zellen im Durchflusszytometer (FACS-Analyse).....	37
IV.2.3.8	Sortieren von Zellen.....	37
IV.2.3.9	Infektion von Zellen.....	37
IV.2.3.10	Bestrahlung von Zellen.....	38
IV.2.3.11	Serumentzug	39
IV.2.3.12	Vorbereitung von NIH3T3 Zellen für die Transplantation	39
IV.2.3.13	Herstellung von Zellsedimenten für Western-Blot-Analysen	39
IV.2.3.14	Zellzyklusanalysen	40
IV.2.3.15	DNA-Fragmentierungsanalysen	41
IV.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	41
IV.2.4.1	Western-Blot-Analysen	41
V	Ergebnisse	44
1.	Infektion von Mäusen mit dem <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> (MoMLV) beschleunigt die Tumorgenese.....	44
2.	Tumorzellen sind sensitiv gegenüber γ -Strahlung.....	49
3.	Evaluation von Integrationsstellen nach Bestrahlung	52
3.1	Die Transplantation von bestrahlten Tumorzellen infizierter Wildtypmäuse führt nicht zum Auswachsen von Klonen mit bestrahlungsspezifischen Integrationen	52
3.2	Die Transplantation von bestrahlten Tumorzellen infizierter E λ -MYC Mäuse führt zum Auswachsen von Klonen mit bestrahlungsspezifischen Integrationen.....	54
4.	Sekundärtumore, die sich aus bestrahlten Primärtumorzellen entwickelt haben, sind resistent gegen Bestrahlung.....	55
5.	Identifikation von Integrationsstellen.....	57
6.	Analyse des <i>Bcl2/1</i> Locus	60
6.1	Insertion im <i>Bcl2/1</i> Locus in Tumoren mit Wildtyp p53.....	60
6.2	Expression von Bcl-x _L	61
7.	Integration im <i>Gadd45β</i> Locus in Tumoren mit Wildtyp p53.....	63
8.	Funktionelle Analyse von Gadd45 β	67
8.1	<i>Gadd45β</i> ist ein Onkogen.....	67
8.2	Bcl-x _L , aber nicht Gadd45 β , inhibiert Apoptose nach Bestrahlung.....	69
8.3	Gadd45 β vermittelt einen Überlebensvorteil bei Serumentzug.....	71
VI	Diskussion	73
1.	Etablierung des Modellsystems	73

2. Selektion von Subklonen nach Bestrahlung	74
3. Identifikation von Integrationsstellen	74
4. Validierung des Modells durch Integration im <i>Bcl2/1</i> Locus	75
5. Integration in den <i>Gadd45β</i> Locus	76
6. Funktionelle Analysen von Gadd45 β	77
7. Protektiver Effekt von Gadd45 β nach Serumentzug	81
VII Abkürzungsverzeichnis	85
VIII Anhang	87
IX Literatur	90

I Zusammenfassung

Zahlreiche Lymphome sprechen gut auf Chemo- oder Strahlentherapien an. Dies korreliert mit der Tatsache, dass die Tumore meist Wildtyp p53 exprimieren, einen der wichtigsten Mediatoren des apoptotischen Zelltods. Trotzdem führt das Auswachsen von therapieresistenten Rezidiven immer wieder zum Tod der betroffenen Patienten. Dabei ist die Resistenz nur zu einem geringen Teil auf den Verlust der Wildtyp p53 Expression zurückzuführen. Ziel dieser Arbeit ist es, Hinweise auf molekulare Mechanismen zu erhalten, die das Überleben von Tumorzellen nach Induktion von Stress fördern und damit zu einer Therapieresistenz beitragen können.

Um kritische Mutationen zu definieren, die für das Überleben von Tumorzellen nach Stress verantwortlich sind, wurde die Methode der retroviralen Insertionsmutagenese erfolgreich angewendet und erweitert. Im etablierten Modell wurden durch Infektion mit dem *Moloney Murine Leukemia Virus* Tumore induziert und durch die Behandlung eines Teils der Tumorzellen mit γ -Strahlung die Bedingungen einer Strahlentherapie modelliert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Tumorzellen nach Bestrahlung durch Apoptose eliminiert wurde. Dennoch wurden stressresistente Zellen mit einer Häufigkeit von $<10^{-4}$ beobachtet, die nach der Transplantation zu Sekundärtumoren auswuchsen. Die Transplantation der Tumorzellen in mehrere Rezipienten ermöglichte den Vergleich zwischen Sekundärtumoren, die aus bestrahlten und unbestrahlten Tumorzellen erwachsen waren. Die zugrunde liegende Hypothese, dass Tumorsubklone mit einer Integrationsstelle, die durch Dysregulation eines zellulären Gens kausal für eine Stressresistenz verantwortlich ist, durch die Bestrahlung selektioniert werden und diese Integrationsstelle in unabhängigen Experimenten mehrfach nach Bestrahlung identifiziert werden kann, wurde belegt. Mit dem neu etablierten Mausmodell wurden zahlreiche Integrationsstellen identifiziert, darunter auch bekannte *common integration sites*. Die Identifikation dieser Integrationsstellen in Primärtumoren sowie in bestrahlungsresistenten und -sensitiven Sekundärtumoren belegt ihre Rolle bei der Tumorgenese, argumentiert aber gegen eine Selektion durch die Bestrahlung. Eine Integration im *Bcl2/1* Locus wurde in einem Tumorsatz ausschließlich nach Bestrahlung detektiert und korrelierte mit einer verstärkten Expression des Gens *Bcl2/1*, welches für das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L codiert. Durch Überexpression des Proteins konnte belegt werden, dass Bcl-x_L nach Bestrahlung die Apoptose verhindert. Damit wurde bewiesen, dass das etablierte System zur Identifikation von Stressresistenzgenen geeignet ist. Ein weiterer Integrationsort, der in mehreren Sekundärtumoren nach Bestrahlung identifiziert wurde, war der *Gadd45 β* Locus. Analysen der stressresistenten Tumore mit dieser Integration zeigten erhöhte *Gadd45 β* Expression und deuteten auf eine Rolle von *Gadd45 β* bei der Ausbildung einer Stressresistenz hin. Es konnte gezeigt werden, dass *Gadd45 β* ein Onkogen ist, da Fibroblasten, die das Protein überexprimierten, in der Lage waren, Tumore *in vivo* zu bilden. Zwar konnte *Gadd45 β* die Apoptose nach Bestrahlung nicht verhindern, dennoch war das Protein in der Lage, den Zelltod nach Serumentzug zu inhibieren. Damit konnte gezeigt werden, dass das Protein durch Inhibition des nicht-apoptotischen Zelltods zu einer Stressresistenz von Tumorzellen beitragen kann.

II Einleitung

Tumorzellen unterscheiden sich in vielfacher Weise von normalen Körperzellen. Weinberg und Hanahan postulierten im Jahr 2000 (Hanahan und Weinberg, 2000) sechs Charakteristika von Tumoren: (1) Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, (2) Resistenz gegen wachstumshemmende Signale, (3) eingeschränkte Fähigkeit zum kontrollierten Zelltod (Apoptose), (4) unbegrenztes replikatives Potential, (5) Fähigkeit zur Angiogenese und (6) die Fähigkeit zur Metastasierung. Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren Schlüsselproteine und ihre Signalwege identifiziert, die bei der Bildung von Tumoren von besonderer Bedeutung sind und diese Charakteristika vermitteln (Vogelstein und Kinzler, 2004).

Obwohl einige Tumorarten vor allem wegen ihrer eingeschränkten Fähigkeit zu Apoptose nur schlecht therapierbar sind, lassen sich bestimmte hämatologische Neoplasien sehr gut behandeln. Im Idealfall sollten dabei neoplastische Zellen spezifisch eliminiert werden, mit geringstmöglicher Schädigung der normalen Körperzellen. Dennoch können auch bei Tumoren, die gut auf die initiale Behandlung ansprechen, häufig Rückfälle beobachtet werden, wobei die Rezidive dann oftmals resistent gegen weitere Therapien sind. Bei dieser Therapieresistenz ist vielfach die Dysregulation oder Mutation von Genen in den zum Zelltod führenden Signalwegen verantwortlich. Diese Resistenz ist ein fundamentales Problem bei der Therapie von malignen Erkrankungen, das trotz intensiver Forschungsbemühungen auf molekularer Ebene nur ansatzweise verstanden ist.

Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Faktoren, die in der Lage sind, den Zelltod nach Stress zu verhindern und so zu einer Therapieresistenz beitragen können. Dabei stand die Etablierung eines geeigneten Modellsystems zur Entdeckung von Stressresistenzgenen sowie die funktionelle Analyse identifizierter Gene im Vordergrund.

1. Apoptose

Ein Ziel chemo- und strahlentherapeutischer Behandlungen ist die systematische Induktion von Apoptose (Johnstone *et al.*, 2002). Der Prozess der Apoptose ist durch eine Reihe morphologisch sichtbarer Schritte gekennzeichnet (Kerr *et al.*, 1972). Die Zelle verliert an Volumen, wobei Kern und Cytoplasma kondensieren und die Cytoplasmamembran Ausstülpungen zeigt (*membrane blebbing*). Anschließend werden Zellkern und DNA fragmentiert und die Zelle zerfällt in apoptotische Vesikel, die von umliegenden Zellen und Makrophagen phagozytiert werden. Für die morphologischen Veränderungen ist eine Gruppe von Proteasen verantwortlich, die sogenannten Caspasen. Diese spalten eine Vielzahl von Substraten, darunter essentielle Proteine für die Zellstruktur (Cytoskelettproteine und Komponenten der Kernlamina) und solche, die an DNA-Reparatur und Replikation beteiligt sind (Lavrik *et al.*, 2005; Thornberry und Lazebnik, 1998). Außerdem aktivieren Caspasen die apoptosespezifische Endonuklease CAD (*caspase-activated endonuclease*) durch den proteolytischen Abbau ihres Inhibitors ICAD (Enari *et al.*, 1998). CAD schneidet die DNA internukleosomal und erzeugt Fragmente von 180 bp oder einem

Vielfachen davon und trägt dadurch zur Fragmentierung der DNA bei (Nagata *et al.*, 2003).

Die extreme Konsequenz einer Caspaseaktivierung macht deutlich, dass dieser Prozess einer strikten Kontrolle unterliegen muss. Wie zahlreiche andere Proteasen werden Caspasen als Proenzyme synthetisiert und proteolytisch aktiviert. Die bisher bekannten Caspasen lassen sich in drei Gruppen einteilen: inflammatorische Caspasen (Caspase 1, 4, 5, 13, 14), Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9, 10) und Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7), wobei nur die letzten beiden eine Rolle bei apoptotischen Prozessen spielen (Lavrik *et al.*, 2005). Während die Initiatorcaspasen für die proteolytische Aktivierung der Effektorcaspasen verantwortlich sind, leiten die Effektorcaspasen die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen ein und führen letztendlich zur Zerstörung der Zellen.

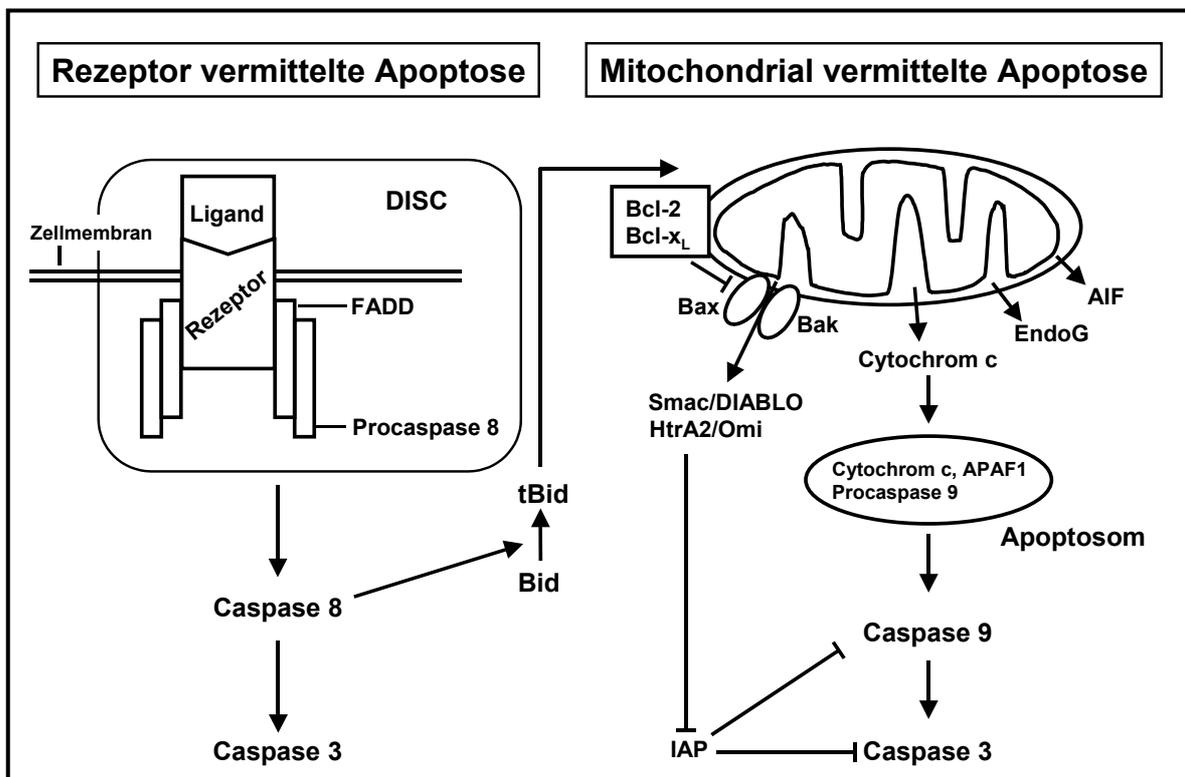


Abbildung 1 Apoptosesignalwege. Abgebildet sind der Rezeptor vermittelte Signalweg und der mitochondrial vermittelte Signalweg. Der Rezeptor vermittelte Signalweg wird durch die Bindung eines extrazellulären Liganden an den Todesrezeptor initiiert, was zur Bildung des DISC (*death-inducing signaling complex*) führt. Die Initiatorcaspase Procaspase 8 wird durch FADD (*FAS-associated death domain protein*) rekrutiert und autokatalytisch aktiviert. Die Caspase 8 aktiviert ihrerseits in einigen Zellen direkt durch proteolytische Spaltung die Effektorcaspase 3, welche durch Spaltung von zahlreichen Proteinen für die Zerstörung der Zelle verantwortlich ist. In anderen Zellen spaltet Caspase 8 das Protein Bid, dessen Spaltprodukt tBid den mitochondrialen Signalweg initiiert. Der mitochondriale Signalweg wird durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran initiiert und durch Proteine der Bcl-2 Familie (u.a. Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-x_L) kontrolliert. Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt zum Austritt verschiedener mitochondrialer Proteine in das Cytoplasma. Dort bindet Cytochrom c den Faktor APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und Procaspase 9 und bildet mit ihnen das sogenannte Apoptosom, in dem Caspase 9 aktiviert wird, die für die Aktivierung der Effektorcaspase Caspase 3 verantwortlich ist. Die mitochondrialen Proteine Smac/DIABLO und HtrA2/Omi unterstützen nach Austritt ins Cytosol die Apoptose durch Inhibition der IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), während andere Faktoren (AIF und EndoG) im Zellkern zur Fragmentierung des Chromatins beitragen.

Initiiert wird der apoptotische Zelltod durch zwei verschiedene Signalwege (Orrenius *et al.*, 2003), die durch sich gegenseitig aktivierende Faktoren miteinander verbunden sind (Abbildung 1).

1.1 Rezeptor vermittelte Apoptose

Die rezeptor vermittelte Apoptose wird auch als extrinsischer Signalweg bezeichnet, der durch die Bindung extrazellulärer Liganden an Oberflächenrezeptoren initiiert wird. Die Rezeptoren gehören zur Familie der Tumornekrose-Faktor (TNF) Rezeptoren und zeichnen sich durch eine intrazelluläre Todesdomäne (*death domain*) aus (Krammer, 1999). Durch die Bindung des Liganden kann das Adaptermolekül FADD (*Fas-associated death domain protein*) an die *death domain* binden, über welches dann die Initiatorcaspase Procaspase 8 rekrutiert wird. In dem als DISC (*death-inducing signaling complex*) bezeichneten Komplex (Kischkel *et al.*, 1995) wird die Initiatorcaspase 8 autokatalytisch aktiviert. Abhängig vom Zelltyp erfolgt dann entweder die direkte Aktivierung der Effektorcaspase 3 durch Caspase 8 (Typ-1 Zellen) oder es kommt zunächst zu einer Spaltung des cytosolischen Proteins Bid (Typ-2 Zellen) durch Caspase 8 (Scaffidi *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1999). In Typ-2 Zellen aktiviert verkürztes Bid (tBid) dann den intrinsischen Signalweg (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998).

1.2 Mitochondrial vermittelte Apoptose

Die mitochondrial vermittelte Apoptose wird auch als intrinsischer Signalweg bezeichnet, der durch die Freisetzung von Cytochrom c und anderen apoptogenen Molekülen aus den Mitochondrien in das Cytoplasma initiiert wird. Cytoplasmatisches Cytochrom c bildet zusammen mit APAF1 (*apoptotic protease activating factor*), ATP und Procaspase 9 das Apoptosom. In diesem Komplex wird Caspase 9 autokatalytisch aktiviert und spaltet dann ihrerseits die Effektorcaspase 3 (Li *et al.*, 1997). Auch andere aus den Mitochondrien entlassene Proteine haben eine wichtige Funktion bei der Apoptose. Die Proteine HtrA2/Omi und Smac/DIABLO binden und inhibieren die sogenannten IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) und unterstützen so die Caspaseaktivierung (Du *et al.*, 2000; Hegde *et al.*, 2002). Die Faktoren AIF (*apoptosis inducing factor*) und Endonuklease G wirken unabhängig von Caspase im Zellkern und beeinflussen die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung (Li *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 1999).

Der intrinsische Signalweg wird durch die Bcl-2 Proteinfamilie gesteuert, die direkt die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran kontrolliert (Chipuk und Green, 2006). Diese Proteinfamilie wird in anti-apoptotische und pro-apoptotische Faktoren eingeteilt. Zu den anti-apoptotischen Molekülen gehören unter anderem Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl1. Die Gruppe der pro-apoptotischen Moleküle lässt sich weiter untergliedern. Eine Untergruppe bilden Proteine mit mehreren Bcl-2-Homologiedomänen (BH123 Proteine), zu dieser Gruppe gehören Bax und Bak. Die zweite Untergruppe besteht aus Proteinen mit nur einer Bcl-2-Homologiedomäne (BH3-*only* Proteine), zu dieser Gruppe gehören unter anderem Bid, Bim, Puma und Noxa (Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003). Die Proteine der Bcl-2 Familie sind teilweise Bestandteil der äußeren Mitochondrienmembran bzw. können dorthin rekrutiert werden. Die Permeabilisierung der Membran erfolgt durch die pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder Bax und Bak, die in der Lage sind, durch

Oligomerisierung und/oder andere Mechanismen Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran zu bilden. Diese Kanäle führen zu einer Veränderung des Membranpotentials und der Freisetzung oben beschriebener Signalproteine (Degli Esposti und Dive, 2003). Die Aktivität der Mitglieder der Bcl-2 Familie wird vor allem durch das Mengenverhältnis pro- und anti-apoptotischer Faktoren, ihre intrazelluläre Lokalisation, Modifikationen, proteolytische Spaltung und die Bildung von Homo- und Heterodimeren beeinflusst (Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003; Willis und Adams, 2005).

1.3 Einfluss von p53 auf die Apoptose

Der Tumorsuppressor p53 nimmt einen kritischen Knotenpunkt im zellulären Netzwerk ein, welches die Integrität des Genoms nach genotoxischen und nicht-genotoxischen Stimuli überwacht (Vogelstein *et al.*, 2000). Neben einer wichtigen Funktion in der Regulation des Zellzyklus ist p53 ein wesentlicher Modulator des apoptotischen Zelltods. Dabei ist vor allem die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor detailliert untersucht, der eine große Anzahl von Zielgenen aktiviert, die für pro-apoptotische Moleküle codieren (Vousden und Lu, 2002). Zu den aktivierten Genen gehören unter anderem *Bax*, *Noxa*, *Puma*, *Fas/APO1* und *KILLER/DR5*. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Transaktivierung dieser Gene der einzige Mechanismus ist, durch den p53 zur Apoptose beiträgt. In letzter Zeit sind aber auch transkriptionsunabhängige Aktivitäten von p53 bei der Induktion der Apoptose bekannt geworden (Chipuk *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2005; Speidel *et al.*, 2006). Zellen, die einer Überexpression von Onkogenen, DNA-Schäden oder anderen Formen von Stress ausgesetzt sind, stabilisieren und aktivieren p53 (Vogelstein *et al.*, 2000; Xu, 2003). Aktiviertes p53 leitet nach schweren Schäden über die Regulation der Transkription sowie transkriptionsunabhängige Mechanismen die Apoptose durch Aktivierung von pro-apoptotischen Molekülen ein.

Die p53 Menge in der Zelle wird hauptsächlich dadurch bestimmt, wie schnell das Protein deaktiviert wird (Vogelstein *et al.*, 2000). Diese Deaktivierung erfolgt im Wesentlichen durch den proteasomalen Abbau des Proteins und wird entscheidend von Mdm2 gesteuert (Haupt *et al.*, 1997). Mdm2 wirkt dabei als E3 Ubiquitin-Ligase, die in der Lage ist, p53 zu ubiquitinylieren und dadurch für den Abbau zu kennzeichnen. Außerdem unterstützt Mdm2 den Export von p53 aus dem Zellkern und beeinträchtigt dadurch dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor (Ryan *et al.*, 2001). Da auch *Mdm2* zur Gruppe der durch p53 aktivierten Gene gehört (Barak *et al.*, 1993) unterliegt das Verhältnis von p53 und Mdm2 einem autoregulatorischen *feedback-loop* (Picksley und Lane, 1993; Wu *et al.*, 1993). Die Interaktion der beiden Proteine wird maßgeblich von Modifikationen beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte Phosphorylierungen die Interaktion von p53 und Mdm2 verhindern und dadurch die Apoptose fördern (Chehab *et al.*, 2000; Shieh *et al.*, 2000).

2. Nicht-apoptotischer Zelltod

Während die oben beschriebene Apoptose die am besten untersuchte Art des Zelltods ist, können Zellen aber auch durch andere Mechanismen eliminiert werden. Diese sind bislang deutlich weniger gut verstanden und oft nur aufgrund morphologischer Merkmale von der Apoptose zu unterscheiden. Definierte biochemische Merkmale sind häufig unbekannt. Dieselben Stimuli können verschiedene Wege des Zelltods initiieren und oft hängt der beschrittene Weg zum Beispiel lediglich vom Zellkontext und dem ATP-Gehalt der Zelle ab (Nicotera und Melino, 2004). Zudem scheinen die Regulatoren des apoptotischen Zelltods auch in anderen Wegen eine Rolle zu spielen.

2.1 Autophagie

Als Autophagie („Selbstverdau“) wird ein Prozess bezeichnet, der durch Autophagosomen charakterisiert ist (Kroemer *et al.*, 2005). Dies sind Vakuolen, die von einer Doppelmembran umgeben sind und degenerierende cytoplasmatische Organellen oder Cytosol enthalten. Der Prozess der Autophagosomen-Formierung wird durch eine Serie evolutionär konservierter Proteine gesteuert, den Produkten der Autophagie-spezifischen ATG Gene (Yorimitsu und Klionsky, 2005). Autophagosomen fusionieren im Laufe des Prozesses mit Lysosomen, in denen dann die zellulären Komponenten verdaut werden. Etliche Stimuli, die diesen Prozess initiieren, sind bekannt. Zu diesen gehören Nährstoffdefizienz, hypoxische Bedingungen und hohe Temperaturen (Codogno und Meijer, 2005; Tsujimoto und Shimizu, 2005). Grundsätzlich dient Autophagie dazu, das Überleben von Zellen in diesen Situationen zu verlängern. Dennoch kann kontinuierliche Autophagie zum Tod von Zellen führen. Der autophagische Zelltod ist hauptsächlich eine morphologische Definition und determiniert durch das Vorkommen von Autophagosomen und das Fehlen von Chromatinkondensation. Beide Merkmale können elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Bis heute ist unbekannt, ob ein spezifischer Mechanismus mit definierten Signalmolekülen für diesen Weg des Zelltods existiert (Tsujimoto und Shimizu, 2005). Es gibt jedoch Hinweise, dass verschiedene zelluläre Signalwege und Proteine eine Rolle bei der Induktion des Zelltods durch Autophagie spielen (Codogno und Meijer, 2005). Neuere Studien belegen, dass Zelltod durch Autophagie nach cytotoxischen Stimuli in Zellen stattfindet, die vor Apoptose geschützt sind (Shimizu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004) und somit als Alternative zur Apoptose dienen kann.

2.2 Nekrose

Als Nekrose wird ein Prozess definiert, der keine Zeichen von Apoptose oder Autophagie zeigt, was *de facto* eine Negativdefinition ist (Kroemer *et al.*, 2005). Morphologisch zeigen nekrotische Zellen Chromatinkondensation sowie Anschwellung der Zellorganellen und der gesamten Zelle. Schließlich kommt es zum Zerreißen der Cytoplasmamembran, was dazu führt, dass die Inhaltsstoffe der Zelle in das umliegende Gewebe gelangen. Die intrazellulären Bestandteile rufen häufig eine Entzündungsreaktion im Organismus hervor (Okada und Mak, 2004). Obwohl lange die Meinung vorherrschte, dass Nekrose ein passiver Prozess ist, belegen neuere Studien, dass Zellen Nekrose regulieren können. Hier scheinen Ca^{2+} und ROS (*reactive oxygen species*) sowie zwei Proteasenfamilien, die Calpaine und die Cathepsine, eine wichtige Rolle zu spielen (Zong und Thompson, 2006).

Neuere Studien belegen zudem auch, dass Nekrose nach einigen cytotoxischen Stimuli, genau wie Autophagie, als Alternative zur Apoptose dienen kann, wenn die Zellen vor Apoptose geschützt sind (Lindsten *et al.*, 2003).

3. Retrovirale Insertionsmutagenese

Die Evaluierung der Überlebensmechanismen von Tumorzellen stellt einen wichtigen Schritt bei der Findung neuartiger Therapieansätze dar. Trotz zahlreicher *ex vivo* Techniken stellen nur *in vivo* Systeme die komplexen Vorgänge im Körper naturgetreu nach und sind daher der beste Weg diese Überlebensmechanismen von Tumorzellen zu charakterisieren. In dieser Arbeit soll dazu die Methode der retroviralen Insertionsmutagenese im Mausmodell angewendet und erweitert werden.

Basierend auf der Art der Tumorinduktion können Retroviren in zwei Klassen eingeteilt werden. Akut transformierende Viren induzieren Tumore mit kurzer Latenzzeit. Die Transformation der Zellen wird hauptsächlich durch die Expression viraler Onkogene ausgelöst. Zu dieser Gruppe gehört zum Beispiel das Rous Sarkom Virus (Rous, 1911), welches das Onkogen *v-src* trägt, das für eine Tyrosin-Kinase codiert (Collett *et al.*, 1980; Hunter und Sefton, 1980) und Sarkome in Hühnern verursacht. Dagegen induzieren langsam transformierende Retroviren Tumore erst nach 3-12 Monaten. Die Transformation von Zellen ist hier ein direktes Resultat der Integration des viralen Genoms und der dadurch bedingten Aktivierung oder Inaktivierung von zellulären Genen. Zu den langsam transformierenden Retroviren gehört auch das hier verwendete *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV), ein murines Leukämievirus (MLV), daher liegt der Fokus der Einleitung auf dieser Virusgruppe.

3.1 Retrovirale Integration

Für den Eintritt in die Zelle bindet der Viruspartikel an den Rezeptor der Wirtszelle. Die ökotropen (diese Viren infizieren nur Mauszellen) MLVs benutzen dazu den kationischen Aminosäuretransporter CAT-1 (Albritton *et al.*, 1989). Das Virion, welches nach der Fusion von Zell- und Virusmembran in die Wirtszelle eintritt, enthält zwei identische, einzelsträngige genomische (+)-RNA-Stränge, Strukturproteine, reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und spezifische tRNAs. Nach dem Eintritt in die Zelle werden die genomischen RNA-Stränge von der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben (Abbildung 2). Das entstehende DNA-Molekül zeichnet sich durch zwei identische *long terminal repeat* (LTR)-Bereiche an beiden Enden aus. Die virale DNA gelangt in einem Präintegrationskomplex, der virale Strukturproteine, Integrase und zelluläre Proteine beinhaltet, zum Zellkern. Wegen der Größe dieses Komplexes erfolgt der Transfer in den Zellkern während der Mitose, wenn die Membran des Nukleus abgebaut ist (Coffin *et al.*, 1997).

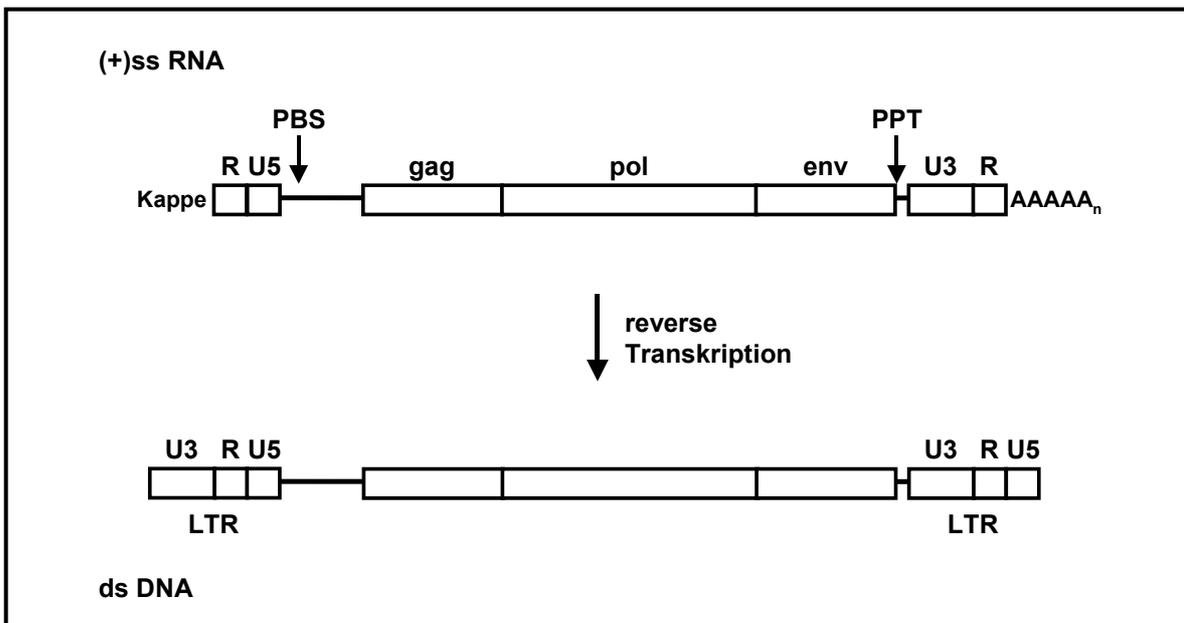


Abbildung 2 Reverse Transkription des MLV-Genoms. Während der reversen Transkription wird die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Dabei werden die U3 und U5 Sequenzen verdoppelt, so dass zwei terminale Wiederholungen mit U3-R-U5 entstehen (LTR). Die virale RNA trägt eine Kappen-Struktur und ist polyadenyliert. Die *gag*-Region codiert für die Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteine, die *pol*-Region codiert für die viralen Enzyme (reverse Transkriptase, Integrase und Protease) und die *env*-Region codiert für die viralen Hüllproteine. R: Repeat-Region, U5: unique 5, U3: unique 3, PBS: Primerbindestelle, PPT: Polypurin-Bereich.

Die virale Integrase vermittelt die Integration der proviralen DNA in das Genom der Wirtszelle (Abbildung 3). Dazu werden schon im Präintegrationskomplex die beiden terminalen Basen von den 3'-Enden durch die virale Integrase entfernt. Die Integrase katalysiert auch die Reaktion, bei der die 3'-OH-Gruppen der viralen DNA die Phosphodiesterbindungen der Wirts-DNA in einem Abstand von 4 bis 6 Basen (abhängig vom Retrovirus) angreifen. Dabei werden die 3'-Enden der viralen DNA mit der Wirts-DNA verbunden. An den 5'-Termini werden nicht-komplementäre Basen entfernt und die entstandenen Lücken an den 5'-P-Enden der viralen DNA über ein Reparatursystem gefüllt. Bis heute ist unklar, ob diese Funktion von der viralen Integrase selbst oder durch ein zelluläres System ausgeführt wird. Die integrierten Proviren werden wegen der stabilen Integration in das zelluläre Genom weitervererbt.

Die Integration in das Genom der Wirtszelle erfolgt zufällig, allerdings scheinen aktiv transkribierte Bereiche etwas bevorzugt zu werden (Mooslehner *et al.*, 1990; Rohdewohld *et al.*, 1987; Scherdin *et al.*, 1990; Vijaya *et al.*, 1986). Neuere Studien zeigen zudem schwache Präferenzen von bestimmten Retroviren bei der Integration. Während das Avian Leukosis-Sarcoma Virus (ALV) eine leichte Präferenz für die Integration in Gene zeigt (Mitchell *et al.*, 2004; Narezkina *et al.*, 2004) und das Humane Immundefizienzvirus (HIV) präferentiell in aktive Gene inseriert (Schroder *et al.*, 2002), scheinen MLVs die Promotorregion aktiver Gene zu bevorzugen (Wu *et al.*, 2003). Bei MLV entfallen 20,2% aller Integrationen in eine Transkriptionsstart-Region (± 5 kb). Dies würde bei einer völlig zufällige Insertion in das Genom nur in 4,3% der Fälle auftreten (Wu *et al.*, 2003). Auch die Sequenz an der Integrationsstelle scheint von Bedeutung zu sein, da im Integrationsbereich der drei genannten Retroviren bestimmte präferierte Basen ausgemacht werden

konnten (Holman und Coffin, 2005). Trotz intensiver Untersuchungen sind die Mechanismen für die Selektion von Zielsequenzen noch nicht genau verstanden. Der Zugang zur DNA scheint einen wesentlichen Einfluss zu haben, da Integrationen vor allem im offenen Chromatin zu finden sind und nur sehr selten im Heterochromatin der Centromere. Da aber verschiedene Retroviren unterschiedliche Präferenzen für ihre Integration zeigen, kann dies nicht der einzige Mechanismus sein. Es wird spekuliert, ob virus-spezifische Interaktionen mit Wirtsproteinen ebenfalls eine Rolle spielen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Präferenzen der verschiedenen Retroviren auch dadurch beeinflusst werden, in welchem Stadium des Zellzyklus die Integration stattfindet. Für MLV ist bekannt, dass die Mitose für die Integration unerlässlich ist, während für HIV bekannt ist, dass das Virus auch in ruhenden Zellen integrieren kann (Bushman *et al.*, 2005).

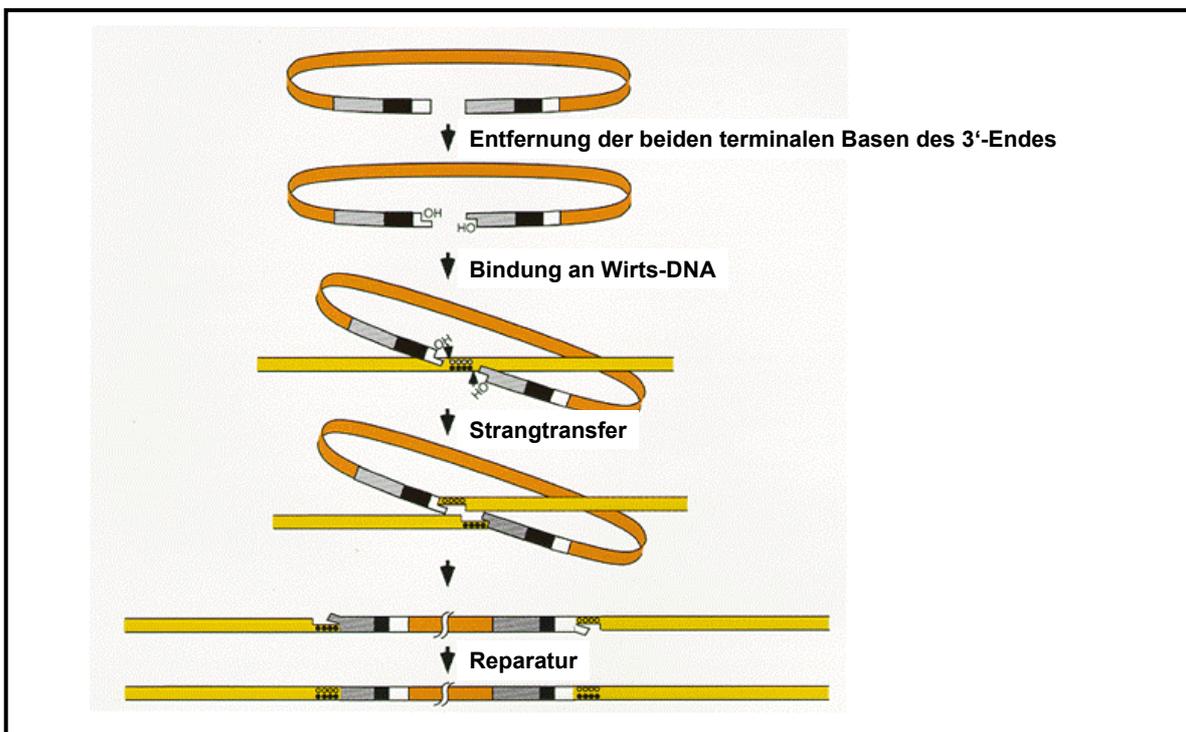


Abbildung 3 Mechanismus der viralen Integration von MLVs. Die beiden Basen an den 3'-Termini werden durch die virale Integrase entfernt. Die Wirts-DNA wird an der Integrationsstelle in einem Abstand von 4 Basen geschnitten und mit den 3'-Termini der Virus-DNA verbunden. Basen, die nicht komplementär sind werden am 5'-Terminus entfernt und die Lücke durch ein Reparatursystem gefüllt (Coffin *et al.*, 1997).

3.2 Retrovirale Integration und ihr Einfluss auf die Genexpression

Die (In)Aktivierung von zellulären Genen durch integrierte Proviren kann auf verschiedene Weisen erfolgen (Abbildung 4). Integriert das Provirus stromaufwärts von einem Gen in der gleichen transkriptionellen Orientierung, so kann der virale Promotor im 5'- oder 3'-LTR anstelle des zellulären Promotors genutzt werden. Der virale Promotor unterliegt nicht den gleichen Regulationsmechanismen wie der zelluläre Promotor, was zu einer deregulierten Transkription des zellulären Gens führt. Wird der Promotor im 5'-LTR genutzt, wird häufig das Polyadenylierungssignal im 3'-LTR überlesen und durch die Nutzung der viralen *Splice-Donor*-Sequenz (SD) ein Fusionstranskript generiert. Häufig ist aber auch bei Promotor-Insertionen die 5'-LTR-Sequenz deletiert, wodurch der Promotor

in der 3'-LTR-Sequenz genutzt wird (Westaway *et al.*, 1984). Promotor-Insertionen können auch im ersten Intron eines Gens lokalisiert sein. In diesem Fall ist das endogene Transkript durch Nutzung des viralen Polyadenylierungssignals (pA) trunziert, aber der provirale Promotor vermittelt die Transkription aller stromabwärts liegenden Exons. Liegt der Translationsstart im zweiten Exon, wird dennoch ein Protein von voller Länge erzeugt. In anderen Fällen, zum Beispiel bei Insertionen im *c-Myb* Gen, wird ein verkürztes Protein von einem alternativen Startcodon gebildet (Mukhopadhyaya und Wolff, 1992). Die Transkription eines Gens kann auch vom endogenen Genpromotor durch die Nutzung von viralen Verstärkerelementen (*Enhancer*) stimuliert werden. Dieser Mechanismus ist wohl der häufigste Mechanismus der Genaktivierung durch integrierte Proviren, da *Enhancer* über extrem große Entfernungen und sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts vom Gen wirken können. Ein Beispiel stellen Integrationen dar, die über 200 kb entfernt vom *c-Myc* Locus liegen, aber dennoch zu einer verstärkten Transkription des Gens führen (Lazo *et al.*, 1990). Bei *Enhancer*-Insertionen wird die Transkription der zellulären Gene durch Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an die viralen Verstärkerelemente in der U3-Region des LTR vermittelt. Insertionen innerhalb eines Gens in gegensätzlicher Orientierung können das Protein durch ein Polyadenylierungssignal verkürzen. Dadurch kann ein inaktives Protein entstehen oder dem verkürzten Protein fehlen regulatorische Sequenzen und es ist konstitutiv aktiv. Ein Beispiel für ein konstitutiv aktives Protein ist das Produkt des *Tpl2* Gens, das nach retroviraler Insertion im Intron 7 entsteht. Diese Integration führt zu einer konstitutiv aktiven, verkürzten Serin/Threonin-Kinase (Makris *et al.*, 1993; Patriotis *et al.*, 1993). Die Genexpression kann ebenfalls durch Integrationen in Kontrollsequenzen beeinflusst werden. Zum Beispiel führt eine bekannte Integration stromabwärts vom *Pim1* Gen dazu, dass das virale Polyadenylierungssignal vor dem zellulären positioniert ist. Dadurch sind die endogenen Sequenzen in diesem Bereich, die normalerweise für eine relativ instabile *Pim1* mRNA verantwortlich sind, kein Bestandteil des Transkriptes mehr und es kommt zu abnormalen *Pim1* Mengen (Selten *et al.*, 1985; Selten *et al.*, 1986).

Die Integration eines Provirus in zelluläre Gene oder in deren regulatorische Sequenzen kann durch die oben beschriebenen Mechanismen zu ihrer Aktivierung oder Inaktivierung führen. Bedingt dies einen direkten Selektionsvorteil der betroffenen Zelle, so wird sie präferentiell expandieren. Für die Transformation von Zellen sind meistens mehrere Integrationen in verschiedenen Genen und ihre dadurch bedingte Dysregulation notwendig. Das Zusammenwirken der Genprodukte führt zur Expansion der betroffenen Zellen und zum Auswachsen eines Tumors. In diesem Tumor dominieren Zellklone mit Integrationen, die durch Aktivierung/Inaktivierung von zellulären Genen einen selektiven Vorteil vermitteln. Die integrierten Proviren dienen so als Markierung von Genen, die an der Tumorgenese beteiligt sind. Die kritischen Integrationen für die Tumorentwicklung können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen kann die Integration zur Aktivierung von Onkogenen oder zum anderen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (Jonkers und Berns, 1996). Allerdings wird die Inaktivierung von Tumorsuppressoren nur dann zu einem Selektionsvorteil führen, wenn beide Allele inaktiviert sind. Ausnahmen bilden hier Tumorsuppressoren mit Haploinsuffizienz oder die Bildung dominant negativer Proteine

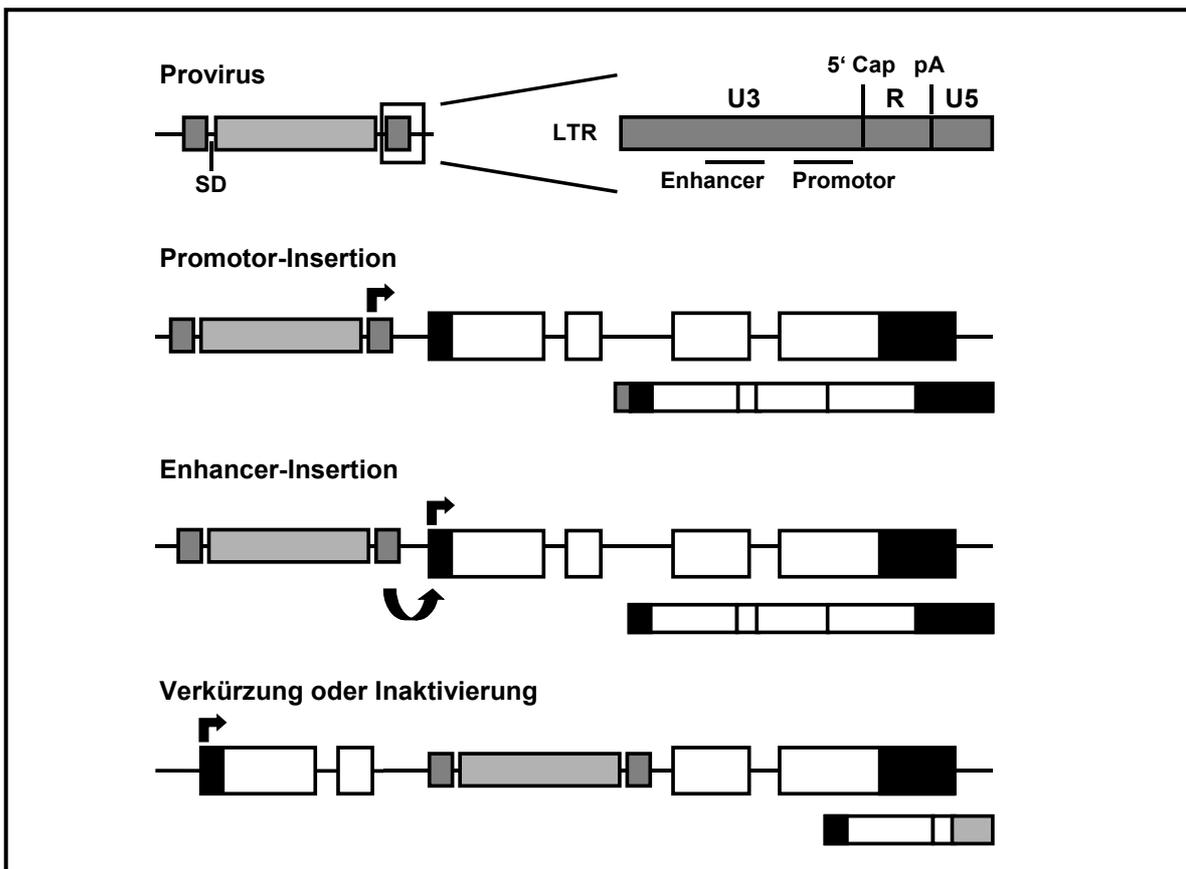


Abbildung 4 Einfluss auf die Genexpression durch inserierte Proviren. Das MLV-LTR enthält Promotor- und Enhancersequenzen in der U3-Region und ein Polyadenylierungssignal (pA) in der R-Region. Diese Elemente können endogene Gene deregulieren. SD: *Splice Donor*.

Ein Locus wird als *common integration site* (CIS) definiert, wenn in zwei oder mehr unabhängigen Tumoren provirale Insertionen in diesem Locus gefunden wurden (Uren *et al.*, 2005). Bei einer moderaten Anzahl Integrationsstellen, die sich auf das Genom verteilen, ist es höchst unwahrscheinlich, dass zwei Integrationen zufällig innerhalb desselben Locus in unabhängigen Tumoren zu finden sind. Wahrscheinlicher ist, dass die Integrationsstellen durch ihren Einfluss auf die Genexpression einen selektiven Vorteil vermitteln und so zur Expansion der betroffenen Zellen führt.

Mit Hilfe der retroviralen Insertionsmutagenese konnten in der Vergangenheit zahlreiche CIS identifiziert werden. Für den endgültigen Nachweis der Existenz eines Onkogens oder eines Tumorsuppressorgens in diesen Loci müssen indessen weitere Untersuchungen eine veränderte Genexpression belegen und zeigen, dass die Dysregulation der Gene in Modellsystemen zur Tumorgenese beiträgt. *In vitro* Versuche und Tiermodelle konnten diese Nachweise für Genprodukte bekannter CIS häufig erbringen. Des Weiteren wurden auch für zahlreiche Kandidatengene funktionell äquivalente Mutationen in humanen Tumoren gefunden (Uren *et al.*, 2005). Diese Befunde belegen, dass die Methode der Insertionsmutagenese Erkenntnisse liefert, die auch auf maligne Erkrankungen des Menschen übertragbar sind.

3.3 Anwendungen der retroviralen Insertionsmutagenese

Neben der Identifikation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen kann retrovirale Insertionsmutagenese auch zur Identifikation von Genen dienen, deren Produkte bei der Tumorgenese kooperieren oder für unterschiedliche Phänotypen verantwortlich sind.

Die durch eine provirale Integration veränderte Expression zellulärer Gene kann einen Vorteil vermitteln und zum selektiven Auswachsen von Zellen mit dieser Integration führen. Dysregulieren zusätzliche provirale Integrationen Gene, deren Produkte mit den durch die erste Integration aktivierten/inaktivierten Genprodukten kooperieren, führt dies zu einer schnellen Expansion von Subklonen mit beiden Integrationen. Dieser Vorgang wird als Onkogenkooperation bezeichnet. Für die Identifikation von kooperierenden Onkogenen stehen im Wesentlichen zwei verschiedene Versuchssysteme zur Verfügung. Zum einen sind Integrationsstellen, die häufig gemeinsam in unabhängigen Tumoren auftreten, ein Hinweis, dass die Produkte der durch die Integrationen deregulierten Gene kooperieren. Ein prominentes Beispiel sind hier Integrationen im *c-Myc* und im *Pim1* Locus, die oft zusammen in retroviral induzierten Lymphomen gefunden werden (Selten *et al.*, 1984). Dieser Weg zur Identifikation kooperierender Onkogene hat allerdings den Nachteil, dass die durch replikationskompetente Retroviren hervorgerufenen Tumore oftmals nicht klonal sind. So kann, auch wenn zwei Gene im selben Tumor durch Insertion dysreguliert sind, nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Vorgang in zwei verschiedenen Zellpopulationen stattgefunden hat. Der zweite, direkte, Ansatz zur Identifikation von kooperierenden Onkogenen ist die retrovirale Insertionsmutagenese in transgenen Mäusen, die ein konstitutiv aktives Onkogen tragen. Ein bekanntes Beispiel ist ein Mausmodell, in dem das humane *c-MYC* Onkogen unter der Kontrolle von Immunglobulin-Verstärkerelementen exprimiert wird (Adams *et al.*, 1985). In diesem Modell konnten durch Insertionsmutagenese zahlreiche Gene identifiziert werden, deren Produkte mit *c-MYC* in der Tumorgenese kooperieren (Haupt *et al.*, 1991; van Lohuizen *et al.*, 1991). Auch die Nutzung von Mausmodellen, in denen bestimmte Tumorsuppressoren fehlen, kann zur Identifikation von Signalwegen führen, die für die Tumorgenese von Bedeutung sind. Retrovirale Insertionsmutagenese wurde zum Beispiel in Mäusen durchgeführt, denen der Tumorsuppressor $p27^{Kip}$ oder der *Cdkn2a* Locus, der für $p16^{INK4a}$ und $p14^{ARF}$ codiert, fehlen (Hwang *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2002). Durch Insertionsmutagenese in Mäusen, in denen bestimmte Gene deletiert sind, können solche, die für substituierende Genprodukte codieren, identifiziert werden (Jonkers und Berns, 1996).

Andere methodische Ansätze der Insertionsmutagenese zielen darauf ab, Gene zu identifizieren, deren Produkte für einen bestimmten Tumorphänotyp verantwortlich sind. Auf diesem Weg konnten Tumorprogressionsfaktoren entdeckt werden, da die Transplantation von Tumorzellen in Rezipienten zum Auswachsen von aggressiveren Zellklonen führte, die durch bestimmte Integrationen gekennzeichnet waren (Breuer *et al.*, 1989). Es wurden auch *in vitro* Versuche unternommen durch Insertionsmutagenese Gene zu finden, deren Dysregulation einen bestimmten Tumorphänotyp verursachen. So konnten Gene identifiziert werden, deren Produkte für die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren verantwortlich waren (Stocking *et al.*, 1988) oder die Invasion von Zellen vermitteln und vermutlich eine Rolle bei der Metastasierung spielen (Habets *et al.*, 1994).

III Fragestellung

Zahlreiche hämatologische Neoplasien sprechen gut auf klassische Chemo- oder Strahlentherapien an. Dies korreliert mit der Tatsache, dass die Tumore meist Wildtyp p53 exprimieren, einen der wichtigsten Mediatoren des apoptotischen Zelltods. Trotz des guten Ansprechens auf die Therapie sind die Langzeitüberlebensraten oftmals schlecht, da es zum Auswachsen von therapieresistenten Rezidiven kommt. Dabei ist die Resistenz nur zu einem geringen Teil auf den Verlust der Wildtyp p53 Expression zurückzuführen. Die Identifikation von Mechanismen, durch die Tumorzellen eine Therapie überleben, ist ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung neuer Therapieansätze für Krebserkrankungen.

Um kritische Mutationen in bestrahlungsresistenten Tumoren zu definieren, soll die Methode der Insertionsmutagenese angewendet und erweitert werden. Zuerst soll ein Modell etabliert werden, bei dem in Mäusen Lymphome durch Infektion mit dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV) induziert werden. Anschließend werden durch die Behandlung eines Teils der Tumorzellen *ex vivo* mit γ -Strahlung die Bedingungen der Strahlentherapie modelliert. Die Transplantation der Tumorzellen in mehrere Rezipienten ermöglicht den Vergleich zwischen Sekundärtumoren, die aus bestrahlten und unbestrahlten Tumorzellen erwachsen sind. Die zugrunde liegende Arbeitshypothese besagt, dass ein integriertes Provirus und die dadurch veränderte Expression eines zellulären Gens kausal für die Stressresistenz verantwortlich sein kann. Trifft diese Hypothese zu, ist zu erwarten, dass in unabhängigen Experimenten nach Transplantation und Bestrahlung Subklone auswachsen, die durch dieselben Integrationsstellen gekennzeichnet sind. Bei der Analyse von Integrationsorten soll diese Hypothese überprüft werden und bestimmt werden, ob das Vorkommen bestimmter Integrationen mit einer Stressresistenz korreliert. Entsprechend können die integrierten Proviren, die vermehrt in stressresistenten Tumoren identifiziert werden, als Markierung potentieller Überlebensgene dienen. Durch weiterführende Analysen soll bestimmt werden, ob die Integration einen Einfluss auf die Expression von Genen des Integrationsorts hat. Die mit diesem Ansatz identifizierten potentiellen Überlebensgene sollen durch funktionelle Analysen weiter charakterisiert und ihr Einfluss auf die Stressresistenz bestimmt werden.

IV Material und Methoden

IV.1 Material

IV.1.1 Enzyme

Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben in den entsprechenden Puffern verwendet.

AMV Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
Klenow Fragment	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Pfu</i> Polymerase (rekombinant)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteinase K	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Sigma (Taufkirchen)
RNasin®	Promega (Mannheim)
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

IV.1.2 Kits

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
DecaLabel™ DNA Labeling Kit	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Gel Extraction Kit	Millipore (Schwalbach)
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche (Mannheim)
Lineage Cell Depletion Kit (mouse)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
NucleoSpin® Tissue Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Profection Mammalian Transfection System Calcium Phosphate	Promega (Mannheim)
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
<i>Taq</i> Polymerase Core Kit	Qiagen (Hilden)

IV.1.3 Mausstämme

Für die intraperitoneale Infektion neonataler Mäuse mit replikationskompetentem MoMLV wurden transgene E λ -MYC Mäuse in einem C57BL/6 Zuchthintergrund (Kovalchuk *et al.*, 2000) verwendet. Diese Mäuse exprimieren das humane Onkogen *c-MYC* unter Kontrolle vom Immunglobulin λ Locus. Da dieser nur in B-Zellen aktiv ist, ist die Expression von *c-MYC* auf das B-Zellkompartiment beschränkt. Für die Zucht dieses Stamms wurden heterozygote, transgene Mäuse mit C57BL/6 Mäusen verpaart, die Nachkommen wurden genotypisiert und transgene Mäuse für die Zucht verwendet.

Sekundär- und Tertiärtumore wurden durch intraperitoneale Injektion von Tumorzellen in C57BL/6 Mäuse erzeugt.

Transformationsversuche wurden mit NOD/*scid* Mäusen (Prochazka *et al.*, 1992) durchgeführt.

IV.1.4 Bakterienstämme

Für diese Arbeit wurde der *Escherichia coli* Laborstamm XL10-Gold® ((ultrakompetent, blau/weiß Selektion) (Stratagene, La Jolla, USA)) verwendet. Die Herstellung kompetenter Bakterien mit Ca²⁺, die Transformation, die Kultivierung und die Stammhaltung erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook und Russell, 2001).

IV.1.5 Zelllinien

IV.1.5.1 Primäre Zellen

Tumorzellen wurden aus Tumoren von C57BL/6 Eλ-MYC Mäusen isoliert und in B-Zellmedium kultiviert.

IV.1.5.2 Murine Zelllinien

NIH3T3 Aus NIH Swiss Mausembryo-Fibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie (Jainchill *et al.*, 1969). ATCC¹ #CRL-1658. Kultivierung in DMEM mit 10% FCS.

PhoenixGP Derivat der aus humanen, embryonalen Nierenzellen gewonnenen Zelllinie 293T mit stabiler Expression der *gag* und *pol* Genprodukte. ATCC #3514. Die Zellen können bei ATCC bestellt werden, werden aber nicht in der Online Datenbank geführt. Weitere Informationen unter <http://www.stanford.edu/group/nolan/MTAs/mtas.html>. Kultivierung in DMEM mit 10% FCS.

Sc-1 Aus Mausembryo-Fibroblasten gewonnene Zelllinie (Hartley und Rowe, 1975). ATCC #CRL-1404. Kultivierung in MEM mit 10% FCS.

Ba/F3 Aus peripheren Blutzellen von Balb/c Mäusen gewonnene, IL3-abhängige Pro B-Zellen (Palacios *et al.*, 1984; Palacios und Steinmetz, 1985). DSMZ² #ACC300. Kultivierung in RPMI1640 mit 10% FCS und 10 ng/ml IL3.

IV.1.6 Medien

IV.1.6.1 Bakterienkulturmedien

Luria-Bertani Medium (LB) 10 g/l Bacto-Trypton (Becton Dickinson, Heidelberg), 5 g/l Bacto-Hefeextrakt (Becton Dickinson, Heidelberg), 10 g/l NaCl; pH 7,5 mit NaOH

Luria-Bertani Agar 15 g/l Agar in LB Medium

Die Medien wurden 20 Minuten bei 121°C (1,1 kg/cm²) autoklaviert. Dem Agar wurde nach Abkühlen auf 55°C 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt, bevor er in Petrischalen gegossen wurde. Für eine blau/weiß Selektion wurde er unmittelbar vor dem Ausstreichen von Transformationsansätzen mit 40 µl IPTG (20 mg/ml) und 40 µl X-Gal (20 mg/ml) bestrichen. Dem Flüssigmedium wurde vor Gebrauch 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

¹ American Type Culture Collection, Manassas, USA. <http://www.atcc.org>

² Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig. <http://www.dsmz.de>

IV.1.6.2 Zellkulturmedien und -lösungen

FCS	Fötales Kälberserum (Sigma, Taufkirchen)
Serum Supreme	Synthetisch modifiziertes Kälberserum (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien)
PBS	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Penicillin/Streptomycin	5000 U/ml Penicillin, 5000 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)
Trypsin/EDTA	20% (v/v) Trypsin/EDTA 10 × Konzentrat (Biochrom, Berlin) in Wasser
B-Zellmedium	43% (v/v) DMEM (PAA, Pasching, Österreich), 43% (v/v) IMDM, 10% (v/v) FCS, 4 mM Glutamin (Serva, Heidelberg), 1 mM Natrium-Pyruvat (Invitrogen, Karlsruhe), 1% Penicillin/Streptomycin, 100 µM 2-Mercaptoethanol, 3% IL7 Überstand ³
DMEM (NIH3T3)	DMEM (PAA, Pasching, Österreich), 10% (v/v) FCS
DMEM (PhoenixGP)	10% (v/v) DMEM 10 × Konzentrat (Biochrom, Berlin), 10% (v/v) Serum Supreme, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat; pH 8,2 (eingestellt mit Natriumhydrogencarbonat)
DMEM/HEPES (PhoenixGP)	DMEM (PhoenixGP), 20 mM HEPES (pH 7,2) (Invitrogen, Karlsruhe)
Einfriermedium	90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO
IMDM	IMDM Trockensubstanz (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst in Wasser (auf 280 mOs); pH 7,6
MEM	MEM (Sigma, Taufkirchen), 10% (v/v) FCS, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat
RPMI1640	RPMI1640 Trockensubstanz (Invitrogen, Karlsruhe), gelöst in Wasser (auf 280 mOs); pH 7,4
RPMI1640 (Ba/F3)	RPMI1640, 10% (v/v) FCS, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 8% (v/v) IL3 ⁴
RPMI1640 (Tumorzellen)	RPMI1640, 10% (v/v) FCS, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 100 µM 2-Mercaptoethanol

³ Überstand von IL7 produzierenden Zellen, J558L Plasmazytomzellen, transfiziert mit dem Vektor BMGNeo-IL7 (Rolink *et al.*, 1993)

⁴ Überstand von IL3 produzierenden Zellen, X63-AG8-653 Plasmazytomzellen, transfiziert mit dem Vektor BMGNeo-IL3 (Karasuyama und Melchers, 1988)

IV.1.7 Puffer

1 × TAE	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure
1 × TAE (modifiziert) ⁵	40 mM Trisacetat (pH 8,0), 0,1 mM EDTA
1 × TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)

IV.1.8 Antikörper

IV.1.8.1 Primäre Antikörper

Die Klone der monoklonalen Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen für die Western-Blot-Analysen (in Klammern) sind angegeben.

Anti-Bcl-x _L	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den C-Terminus von Bcl-x _L . Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) #sc-8392. Klon H-5, (1 : 150)
Anti-Caspase 3	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen aktive Caspase 3 (<i>cleaved caspase-3</i> (Asp175)). Cell Signaling (Danvers, USA) #9661 (1 : 500)
Anti-Gadd45β	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Gadd45β. Novus Biologicals (Littleton, USA) BC 100-GADD 45b (1 : 1.000)
Anti-Tubulin	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen α-Tubulin. Oncogene (Calbiochem, San Diego, USA) #CP06. Klon DM1A (1 : 5.000)

IV.1.8.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen-HRP	IgG (H+L) aus Esel, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Rockland (Biomol, Hamburg) #611-703-127 (1 : 15.000)
Anti-Maus-HRP	IgG (H+L) aus Esel, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Jackson (Dianova, Hamburg) #715-035-150 (1 : 10.000)

IV.1.8.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Anti-B220	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen B220. Biolegend (San Diego, USA) #103208 (PE gekoppelt). Klon RA3-6B
Anti-CD3e	Monoklonaler Antikörper aus Hamster gegen CD3e. Becton Dickinson (Heidelberg) #553064 (PE gekoppelt). Klon 145-2C11

⁵ für präparative Gele

Anti-CD11b	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen CD11b. Becton Dickinson (Heidelberg) #553408 (FITC gekoppelt). Klon M1/70
Anti-CD45 (LCA)	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen CD45. Becton Dickinson (Heidelberg) #553079 (FITC gekoppelt), #553081 (PE gekoppelt). Klon 30-F11
Anti-CD90.2	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen CD90.2 (Thy1.2). Becton Dickinson (Heidelberg) #553004 (FITC gekoppelt). Klon 53-2.1
Anti-Gr-1	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen Gr-1. Becton Dickinson (Heidelberg) #553128 (PE gekoppelt). Klon RB6-8C5
Anti-IgM	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen IgM. Becton Dickinson (Heidelberg) #553408 (FITC gekoppelt). Klon R6-60.2

IV.1.9 Plasmide

Angegeben sind die laborüblichen Bezeichnungen mit einer genaueren Beschreibung der Plasmide. Plasmide, die mit R gekennzeichnet sind, wurden in diesem Labor hergestellt, Plasmide die mit # gekennzeichnet sind, stammen aus anderen Quellen.

IV.1.9.1 Plasmide für die Klonierung

#202	pBS SK+ Bluescript (Stratagene, La Jolla, USA); Amp ^R und blau/weiß Selektion geeignet.
#341	pXcm; pUC18 Derivat mit einem von <i>XcmI</i> Schnittstellen flankierten Kanamycin-Resistenzgen in der <i>BamHI</i> Schnittstelle von pUC18. Entfernung des Gens durch Restriktionsverdau mit <i>XcmI</i> führt zu T-Überhängen, die zur Klonierung von <i>Taq</i> -amplifizierten PCR-Fragmenten geeignet sind. Amp ^R und blau/weiß Selektion geeignet.

IV.1.9.2 Klonierte Sonden

#392	pBS SK+ Bluescript mit codierender <i>Gapdh</i> Sequenz (Sabath <i>et al.</i> , 1990)
#442	pSP64 mit genomischer Sequenz des <i>Pim1</i> Locus (Cuyppers <i>et al.</i> , 1984)
#595	pUC19 mit genomischer Sequenz des <i>Ahi1</i> Locus (Poirier <i>et al.</i> , 1988)
#597	pSP64 mit genomischer Sequenz des <i>Bmi1</i> Locus (van Lohuizen <i>et al.</i> , 1991)
#598	pSP72 mit genomischer Sequenz des <i>Bla1</i> Locus (idem)

#599	pSP72 mit genomischer Sequenz des <i>Pal1</i> Locus (idem)
#600	pSP72 mit genomischer Sequenz des <i>Tic1</i> Locus (Breuer <i>et al.</i> , 1989) ⁶
R 686	pUC-Mo; Vektor mit proviraler MoMLV Sequenz (Harbers <i>et al.</i> , 1981)
R 1300	pXcm mit Provirus-flankierender genomischer <i>Gadd45β</i> Sequenz. AF176045 ⁷ (7891-8604 bp)
R 1301	pXcm mit Provirus-flankierender genomischer <i>Gadd45β</i> Sequenz. AC091518.22 (102280-102598 bp)
R 1302	pXcm mit Provirus-flankierender genomischer <i>Bcl2l1</i> Sequenz. AL731857.9 (71654-71919 bp)
R 1303	pXcm mit Provirus-flankierender genomischer <i>Bcl2l1</i> Sequenz. AF088904 (6889-7291bp)
R 1304	pXcm mit codierender <i>Gadd45β</i> Sequenz.
R 1309	pXcm mit Provirus-flankierender genomischer <i>Rasgrp1</i> Sequenz. AL844579.10 (30012-30166 bp)

IV.1.9.3 Helferplasmide für die Virusproduktion

R 690	pSV40-gag/pol; trägt die MoMLV <i>gag</i> - und <i>pol</i> -Gene unter Kontrolle des SV40 Promotors.
#522	pEcoenv-I-puro; trägt das ökotrope <i>env</i> -Gen unter Kontrolle des EF1 α Promotors (Morita <i>et al.</i> , 2000).

IV.1.9.4 Retrovirale Konstrukte

R 780	pSF91-I-eGFP-PRE; γ -retroviraler Vektor mit eGFP als Reportergen; trägt als 3'-LTR das SFFV-LTR (Schwieger <i>et al.</i> , 2002)
R 1116	pSF91-bcl-x _L ; trägt die codierende Sequenz für Bcl-x _L
R 1117	pSF91-gadd45 β ; trägt die codierende Sequenz für Gadd45 β

⁶ #595-600 wurden freundlicherweise für diese Arbeit von M. van Lohuizen zur Verfügung gestellt.

⁷ Sequenz aus der NIH Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit Angabe der Basenpaare.

IV.1.10 Oligonukleotide

Tabelle 1 Die verwendeten Oligonukleotide sind mit ihrer Orientierung, dem Organismus an deren DNA sie spezifisch binden, dem Verwendungszweck, der Bindestelle des 5'-Nukleotids (basierend auf der NIH Datenbank) und ihrer Sequenz dargestellt. F: vorwärts; R: rückwärts

Primer	Org.	Verwendung	Bindung an	Sequenz 5'-3'
CS 236 (F)	MoMLV	Amplifikation von <i>env</i>	J02255 (5787 bp)	caa cgc tcc caa aat ccc ct
CS 245 (R)	MoMLV	Amplifikation von <i>env</i>	J02255 (6792 bp)	cac aac cag cac tct tg
CS 412 (F)	R 780	Sequenzierung von R 780		gct cga caa agt taa gta at
CS 413 (R)	R 780	Sequenzierung von R 780		ggc ctt att cca agc ggc tt
MF 141 (R)	MoMLV	LM-PCR; 5'-biotinyliert	J02255 (8066 bp)	tct ggg gac cat ctg ttc ttg gcc c
MKF 35 (F)	Maus	Real Time PCR <i>Hprt</i>	BC083145.1 (512 bp)	gct ggt gaa aag gac ctc t
MKF 36 (R)	Maus	Real Time PCR <i>Hprt</i>	BC083145.1 (750 bp)	cac agg act aga aca cct gc
MR 32 (F)	Human	Genotypisierung MYC Mäuse	HSMYCE12 (3305 bp)	ctg ctg gtg gtg ggc ggt gtc tc
MR 33 (R)	Human	Genotypisierung MYC Mäuse	HSMYCE12 (2384 bp)	tgt cca aag ggg gtg aaa ggg tgc tc
Bcl-x _L (F)	Maus	Amplifikation <i>Bcl2/1</i> CDS	NM_009743.3 (908 bp)	gga ctg gtt gag ccc atc tc
Bcl-x _L (R)	Maus	Amplifikation <i>Bcl2/1</i> CDS	NM_009743.3 (4945 bp)	gag gtg aga ggt gag tgg ac
Bcl-x _L LM2 (F)	Maus	Amplifikation Integrationsstelle	AF088904 (6708 bp)	cct ccc cga cct atg ata ca
Bcl-x _L LM2 (R)	Maus	Amplifikation Integrationsstelle	AF088904 (7270 bp)	ggg gcc tca gtc cta ttc tc
Gadd45 (F)	Maus	Amplifikation <i>Gadd45β</i> CDS	AF176045 (4945 bp)	gct gtg gag tgt gac tgc at
Gadd45 (R)	Maus	Amplifikation <i>Gadd45β</i> CDS	AF176045 (6294 bp)	aga tgt ttg gag tgg gtc tca
LC 1		LM-PCR; bindet in Linker		gac ccg gga gat ctg aat tc
LC 2		LM-PCR; bindet in Linker		agt ggc aca gca gtt agg
LIN 1		Synthetischer Linker (LM-PCR)		gac ccg gga gat ctg aat tca gtg gca cag cag tta gg
LIN 2		Synthetischer Linker (LM-PCR)		cct aac tgc tgt gcc act gaa ttc aga tct ccc g
LTR 1 (R)	MoMLV	LM-PCR; bindet in LTR	J02255 (7903 bp)	cct gac ctt gat ctg aac tt
LTR 2 (R)	MoMLV	LM-PCR; bindet in LTR	J02255 (7844 bp)	tgg cgt tac tta agc tag ctt
AE 6 (R)	Maus	Sequenzierung von p53	NM_011640.1 (1543 bp)	att cag ctc ccg gaa cat ct
AE 11 (F)	Maus	Klonierung von p53	NM_011640.1 (537 bp)	atg act gcc atg gag gag tca
AE 12 (R)	Maus	Klonierung von p53	NM_011640.1 (1678 bp)	gtc agg ccc cac ttt ctt gac ca
AE 13 (F)	Maus	Real Time PCR <i>Gadd45β</i>	AF176045 (4993 bp)	gac aac gcg gtt cag aag at
AE 14 (R)	Maus	Real Time PCR <i>Gadd45β</i>	AF176045 (5754 bp)	acg act gga tca ggg tga ag
AE 15 (F)	Maus	Real Time PCR <i>Bcl2/1</i>	NM_009743.3 (678 bp)	ggg gag tcg gat tgc aag tt
AE 16 (R)	Maus	Real Time PCR <i>Bcl2/1</i>	NM_009743.3 (882 bp)	tgt ctg gtc act tcc gac tg

IV.1.11 DNA-Sonden

Alle Sonden für Northern- und Southern-Blot-Analysen wurden durch PCR oder Restriktionsverdau der unter IV.1.9 angegebenen Plasmide hergestellt. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der verwendeten Sonden sowie ihre Herstellung.

Tabelle 2 Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Sonden für die Hybridisierung von Southern- und Northern-Blots. Angegeben sind für die Sonden: das Plasmid, die Größe der Sonde, die Restriktionsenzyme, bzw. Primer für die Herstellung, das Enzym für den Restriktionsverdau in der Southern-Blot-Analyse sowie die Größe der dort zu erwartenden Bande ohne Integration.

Sonde	Plasmid	Größe	Herstellung	Enzyme	Bandengröße
Mo-env	R 686	0,9 kb	CS 236/CS 245	<i>BglII</i>	3,3 kb
Pim1	#442	0,9 kb	<i>BamHI</i>	<i>KpnI</i>	7 kb
Ahi1	#595	0,8 kb	<i>PstI/HindIII</i>	<i>KpnI</i>	9 kb
Bmi1	#597	2 kb	<i>BamHI/EcoRI</i>	<i>KpnI</i>	20 kb
Bla1	#598	0,7 kb	<i>KpnI/SalI</i>	<i>KpnI</i>	35 kb
Pal1	#599	1,4 kb	<i>BglII/EcoRI</i>	<i>KpnI</i>	23 kb
Tic1	#600	1,5 kb	<i>PstI/EcoRI</i>	<i>KpnI</i>	29 kb
Gadd45 β (1)	R 1300	0,7 kb	<i>Csp6I</i>	<i>HindIII</i>	9 kb
Gadd45 β (2)	R 1301	0,7 kb	<i>BamHI</i>	<i>BglII</i>	8 kb
Bcl-x _L (1)	R 1302	0,24 kb	<i>SpeI</i>	<i>BglII</i>	3 kb
Bcl-x _L (2)	R 1303	0,6 kb	<i>XbaI/SacI</i>	<i>BglII</i>	5 kb
Rasgrp1	R 1309	0,3 kb	<i>BamHI</i>	<i>BglII</i>	5 kb
Gadd45 β	R 1304	0,54 kb	<i>BamHI</i>	Northern	1,2 kb
GAPDH	#392	1,2 kb	<i>EcoRI</i>	Northern	1,3 kb

IV.1.12 Geräte

Genannt werden hier nur die für die Datenerhebung relevanten Geräte. Weitere Geräte wie Zentrifugen, Pipetten, Waagen und Brutschränke entsprechen heutigen Laborstandards und werden nicht gesondert aufgeführt.

Durchflusszytometer	BD FACS Canto Flow Cytometer mit der FACS Diva Software Version 4.1.2 (Becton Dickinson, Heidelberg)
Durchflusszytometer	BD FACS Aria Flow Cytometer mit Sortierfunktion mit der FACS Diva Software Version 4.1.1 (Becton Dickinson, Heidelberg)
Durchflusszytometer	Coulter Epics XL-MCL mit der Betriebssoftware System II; Darstellung der Ergebnisse mit Expo-32; (Beckman Coulter, Krefeld)
Light Cycler	Light Cycler Instrument mit der Light Cycler Software Version 3.5 (Roche, Mannheim)

IV.2 Methoden

IV.2.1 Mausmodell

IV.2.1.1 Infektion von neonatalen Mäusen

Neugeborene Mäuse aus Verpaarungen von heterozygoten *c-MYC* transgenen Männchen mit C57BL/6 Weibchen wurden innerhalb von 24 h nach der Geburt mit replikationskompetentem MoMLV infiziert. 50 µl virushaltiger Überstand ($1,6 \times 10^6$ infektiöse Einheiten/ml) wurden intraperitoneal mit einer 27G × 3/4“ Kanüle injiziert. Die Tiere wurden nach 21 Tagen von den Müttern getrennt, genotypisiert und nach Geschlechtern getrennt gehalten.

IV.2.1.2 Identifikation transgener Mäuse

Zur Genotypisierung der *c-MYC* transgenen Mäuse wurde den Tieren 3 Wochen nach der Geburt unter Betäubung mit einem sterilen Skalpell etwa 4 mm Schwanz entfernt und die Wunde mit einem heißen LötKolben verödet. Außerdem wurden sie mit einer Ohrmarkierung zur späteren Identifikation versehen. Die Aufreinigung der Schwanzbiopsien erfolgte mit dem NucleoSpin Tissue Kit nach Herstellerangaben. Anschließend wurden 2 µl der aufgereinigten DNA in einer Standard-PCR mit den Primern MR 32 und MR 33 eingesetzt. Transgene Mäuse konnten durch das Auftreten einer etwa 900 bp großen Bande in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte identifiziert werden.

IV.2.1.3 Transplantation und Bestrahlung von Tumorzellen

Die Tiere wurden dreimal in der Woche auf das Auftreten von Krankheitssymptomen wie vergrößerte Organe (Lymphknoten, Milz und Leber), Apathie, buckelige Haltung, und Hecheln untersucht. Tieren mit eindeutigen Krankheitssymptomen wurde nach einer Betäubung mit Ether durch Eröffnen der rechten Armvene Blut entnommen, welches in ein Kapillarblutröhrchen, das EDTA zur Gerinnungshemmung enthielt, überführt wurde. Die Tiere wurden dann durch Genickbruch getötet.

Sollten Tumorzellen transplantiert werden, wurde die Maus in einem Ethanolbad in die Zellkultur überführt, wo alle weiteren Schritte unter einer sterilen Werkbank durchgeführt wurden. Sollte lediglich eine Autopsie mit Organentnahme durchgeführt werden, wurde die Maus auf einer OP-Unterlage fixiert und durch Besprühen mit Ethanol semisterilisiert. In beiden Fällen wurde zunächst mit einem doppelten Y-Schnitt die Dermis eröffnet, so dass der Hals, die Achseln, die Lenden und das Peritoneum frei lagen. So konnten die zervikalen, axialen und peripheren Lymphknoten untersucht werden. Anschließend wurde zur Untersuchung der inneren Organe die Bauchhöhle geöffnet und das Sternum durchtrennt. Die vergrößerten Organe wurden entnommen und für die Präparation von genomischer DNA bzw. RNA in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Organe für durchflusszytometrische Analysen wurden in 5 ml RPMI1640 überführt. Die in Stickstoff fixierten Organe wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -70°C aufbewahrt.

Für die Transplantation von primären Tumorzellen wurden vergrößerte Lymphknoten und die Milz entfernt und in RPMI1640 kurz gewaschen. Anschließend wurden die Organe mit

dem Stempel einer Spritze unter mehrfachem Spülen mit Kulturmedium durch ein Drahtsieb mit 160 µm Maschenweite gedrückt. Die Zellen wurden gezählt und entweder sofort transplantiert oder nach der in IV.2.3.4 beschriebenen Methode eingefroren.

Für die Erzeugung von Sekundärtumoren wurden 3-6 Mäusen je 5×10^6 Zellen in 0,5 ml RPMI1640 (ohne Zusätze) intraperitoneal mit einer 23G \times 1 ¼" Kanüle injiziert. Dabei erhielt eine Mauskohorte bestrahlte, die andere unbestrahlte Zellen des Primärtumors. Für die Bestrahlung von Zellen vor der Transplantation wurde die LISA-Strahlenquelle mit einer offenen Cäsium-137 Quelle des Heinrich-Pette-Instituts verwendet. 5×10^6 Zellen in 0,5 ml RPMI1640 (ohne Zusätze) pro Maus wurden mit 6,85 Gy bestrahlt und anschließend transplantiert. Die Mäuse wurden dreimal pro Woche auf das Auftreten von Sekundärtumoren untersucht.

Für Tertiärtumore wurden mit dem selben Verfahren 5×10^5 Zellen pro Maus transplantiert. Es wurden bestrahlte und unbestrahlte Zellen in Kohorten von jeweils 3 bis 5 Mäusen transplantiert.

Für die Evaluation der Zellzahl, welche die Bestrahlung überlebt, wurde eine serielle Verdünnung von Tumorzellen erstellt. Die Mäuse erhielten intraperitoneal zwischen 5×10^6 und 1×10^2 Zellen bzw. 5×10^6 bestrahlte Zellen und der Zeitpunkt der Tumorentstehung wurde verglichen.

IV.2.1.4 Analyse erkrankter Tiere

IV.2.1.4.1 Analyse der Blutparameter

May-Grünwald Lösung 0,25% (w/v) May-Grünwald in Methanol

Giemsa Lösung 0,4% (w/v) Giemsa-Stammlösung (Sigma, Taufkirchen)

Zur morphologischen Auswertung des entnommenen Blutes wurden pro Tier zwei Blutausstriche mit jeweils 2 µl Blut hergestellt. Das Blut wurde auf einen beschichteten Objektträger (Roth, Karlsruhe) pipettiert und mit einem im 45° Grad Winkel gehaltenen zweiten Objektträger entlang der Längsachse gleichmäßig ausgestrichen. Die Ausstriche sind vor der Färbung über Nacht getrocknet. Die erste Färbung der Objektträger erfolgte für 5 Minuten in May-Grünwald Lösung, die anschließend mit deionisiertem Wasser gründlich abgewaschen wurde. Für den zweiten Färbeschritt wurde 1:20 verdünnte Giemsa Lösung für 20 Minuten appliziert, die danach ebenfalls mit deionisiertem Wasser gründlich abgewaschen wurde. Die Präparate wurden getrocknet und dann mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop.

Zur Bestimmung des zellulären Anteils am Volumen des Blutes (Hämatokritwert) wurden Hämatokritröhrchen mit Blut gefüllt, verschlossen und bei 11.000 rpm (Biofuge Haemo, Heraeus, Langenselbold) für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Hämatokritwert mit Hilfe einer Hämatokritschablone abgelesen.

Die Leukozytenzahl wurde nach Lyse der Erythrozyten mit Essigsäure bestimmt. Dazu wurde das Blut im Verhältnis 1:20 mit 3%iger Essigsäure verdünnt und die Leukozyten in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

IV.2.1.4.2 Durchflusszytometrische Analyse von Organen

Die bei der Präparation entnommenen Organe (IV.2.1.3) wurden innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Die Vereinzelnung der Zellen wurde analog zu der Herstellung einer Zellsuspension für die Transplantation durchgeführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei $300 \times g$ (RT) abzentrifugiert und in 10 ml PBS resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Für die Antikörperfärbung wurden pro Färbeansatz 1×10^6 Zellen in einem Volumen von 200-300 μ l PBS eingesetzt. Die Zellen wurden mit 1 μ l Antikörper (siehe Tabelle 3) gefärbt und für mindestens 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurden die Ansätze mit PBS auf 1,5 ml aufgefüllt und 5 Minuten bei $300 \times g$ (RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment anschließend in 500 μ l PBS aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension durchflusszytometrisch analysiert (IV.2.3.7). Bei der Analyse der Tumore macht man sich die Tatsache zunutze, dass die verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen während und nach der Differenzierung bestimmte Proteine auf der Oberfläche exprimieren, die von monoklonalen Antikörpern erkannt werden können. Durch eine Kopplung der Antikörper an die Fluoreszenzfarbstoffe FITC (grün) und PE (rot) können die Zellen im Durchflusszytometer quantitativ erfasst werden. Zellen können gleichzeitig mit mehreren Antikörpern gefärbt werden, wenn diese an unterschiedliche Farbstoffe gekoppelt sind. In den Histogrammen zeichnen sich Zellen mit gekoppelten Antikörpern durch eine hohe Intensität des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes aus, während Zellen ohne gebundene Antikörper eine geringe Fluoreszenzintensität zeigen und daher im unteren linken Quadranten eines Histogrammes liegen. Im Forward Scatter (FSC) wird bei der durchflusszytometrischen Analyse die Zellgröße, im Sideward Scatter (SSC) die Granularität der Zellen bestimmt. Für die Analyse wurde im Forward- und Sideward Scatter eine einheitliche Zellpopulation ausgewählt, so dass Zelltrümmer und Erythrozyten nicht in die Messung einbezogen wurden.

Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Antikörper (IV.1.8.3) und der mit diesen detektierten Zellen. LCA: *leukocyte common antigen*, FITC: Fluorescein-gekoppelt (grüner Fluoreszenzfarbstoff), PE: Phycoerythrin-gekoppelt (roter Fluoreszenzfarbstoff)

FITC	PE	Detektion
CD45 (LCA)		Kompensation
	CD45 (LCA)	Kompensation
CD90	CD3e	T-Zellen
IgM	B220	B-Zellen
CD11b	Gr-1	Granulozyten

aufgespulte DNA wurde kurz an der Luft getrocknet und abhängig von der Menge in einem Volumen von 200-500 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren konnte mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

IV.2.2.4 Isolation von RNA

Cäsiumchlorid-Puffer	5,7 M CsCl, 25 mM Natriumacetat; in DEPC-H ₂ O
DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrocarbonat in H ₂ O, 12 h 37°C, dann autoklaviert
GIT-Puffer	4 M Guanidin-Isothiocyanat, 25 mM Natriumacetat in DEPC-H ₂ O; vor Gebrauch Zugabe von 2-Mercaptoethanol (120 mM)

Die Isolation von RNA erfolgte aus schockgefrorenem und bei -70°C gelagertem Gewebe. 300 mg des Gewebes wurden in 3 ml gekühltem GIT-Puffer durch Ultraschall mittels des Sonifiers B12 (Bransa Sonic Power Company, Danbury, USA) auf Stufe 6 für 30 Sekunden zerkleinert. Dadurch wurden die Zellwände zerstört und die zelluläre DNA fragmentiert. Das Probengefäß wurde während der Behandlung auf Eis gekühlt. Vor Zerkleinerung der nächsten Probe erfolgte die Reinigung der Geräteteile mit Probenkontakt zunächst mit 0,1% SDS, gefolgt von Wasser, Ethanol und GIT-Puffer. Die Gewebesuspension wurde vorsichtig auf ein Kissen aus 1,2 ml Cäsiumchlorid-Puffer in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (11 × 60 mm, Beckman Coulter, Krefeld) geschichtet. Während der Zentrifugation bei 121.000 × g bei 20°C über Nacht (SW 60 Rotor) bildete sich ein Dichtegradient, in dem die RNA sedimentierte, während genomische DNA und Proteine sich weiter oben im Gradienten befanden. Der Protein- und DNA-haltige Überstand wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und verworfen. Das RNA-Pellet wurde in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen erneut mit 100 µl DEPC-Wasser ausgespült um RNA-Reste zu lösen, die ebenfalls in das 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert wurden. Nach einer Ethanol-Präzipitation mit Hilfe 1/10 Volumens 3 M Natriumacetat (pH 6,0) wurde das RNA-Pellet in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert und die Quantität und Reinheit mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Außerdem wurde die Qualität durch Analyse von 1 µg RNA auf einem Agarose-Gel überprüft. Bei guter Qualität sind nach der Elektrophorese zwei Banden ribosomaler RNA (28 S und 18 S) sichtbar. Das Verhältnis 28 S : 18 S ist dann 2:1.

IV.2.2.5 Reverse Transkription

Zur Übersetzung der zellulären RNA-Transkripte in cDNA wurde die isolierte RNA in eine reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt. Diese erfolgte mit der AMV Reversen Transkriptase nach Herstellerprotokoll unter Verwendung von Oligo-dT Primern.

IV.2.2.6 PCR und Sequenzierung

IV.2.2.6.1 PCR

Die spezifische Amplifikation von DNA-Segmenten erfolgte durch die PCR-Methode (Saiki *et al.*, 1988). Die Standard-PCR in einem Volumen von 25 µl fand unter folgenden Bedingungen mit den Komponenten des *Taq* Polymerase Core Kits statt: PCR-Puffer (1 ×), dNTP Mix (200 µM – 400 µM), Primer 1 (0,2 – 0,4 µM), Primer 2 (0,2 – 0,4 µM) und *Taq* Polymerase (0,04 U/µl). Als Ausgangs-DNA wurden 10 ng Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA verwendet. Die Amplifikation aus cDNA, welche durch reverse Transkription gewonnen wurde, fand in einem Volumen von 35 µl unter obigen Bedingungen statt. Dabei wurden 5 µl einer reversen Transkriptionsreaktion als Ausgangsmaterial eingesetzt. Das PCR-Programm wurde ausgehend vom Standardprogramm (initiale Denaturierung (5 min, 95°C), 35 Zyklen Denaturierung (30 sec, 95°C), Annealing (30 sec, primer-spezifische Annealingtemperatur) und Elongation (60 sec, 72°C), gefolgt von einer finalen Elongation (5 min, 72°C)) optimiert. Lange PCR-Produkte, die für die Klonierung vorgesehen waren, wurden mit *Pfu* Polymerase unter für dieses Enzym optimierten Bedingungen amplifiziert. Diese Polymerase baut aufgrund ihrer Korrektur-eigenschaften achtmal weniger falsche Basen ein als die *Taq* Polymerase.

IV.2.2.6.2 Sequenzierung

Die DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe eines kommerziellen Kits sequenziert. In einem Ansatz von 20 µl wurden 800 ng DNA, 3 µl BigDye (IV.1.2) und 15 pmol Primer vermischt. Die Ansätze wurden im Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert: initiale Denaturierung (1 min, 95°C), 40 Zyklen Denaturierung (30 sec, 95°C), Annealing (15 sec, 50°C) und Elongation (4 min, 60°C). Der Reaktionsansatz wurde durch Ethanol-Präzipitation gefällt, das Pellet getrocknet und im Sequenzierservicelabor (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) analysiert.

IV.2.2.6.3 LM/EPTS-PCR

2 × Binde- und Waschpuffer (B+W)	10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8), 2 M NaCl
----------------------------------	--

5 × Annealing-Puffer	0,35 M MgCl ₂ , 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)
----------------------	--

Diese PCR dient der simultanen Amplifikation von multiplen Provirus-flankierenden genomischen DNA-Sequenzen. Die ursprüngliche *ligation-mediated extension primer tag selection* (LM/EPTS) PCR von Schmidt (Schmidt *et al.*, 2001) wurde für diese Arbeit in zahlreichen Punkten modifiziert, weswegen hier die komplette Methode beschrieben wird. Die Methode wird anschließend der Einfachheit halber als LM-PCR bezeichnet.

Zur Herstellung der synthetischen Linker wurden LIN 1 und LIN 2 (Tabelle 1) in äquimolaren Mengen zusammengegeben und 5 Minuten bei 70°C im Wasserbad denaturiert. Anschließend wurde Annealing-Puffer (1 ×) zugegeben und alles für weitere 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Das Wasserbad wurde ausgeschaltet, so dass der Ansatz über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen konnte. Dabei konnten zwischen den komplementären

Sequenzen Basenpaarungen stattfinden, so dass der synthetische Linker im Doppelstrang vorlag.

Abbildung 5 zeigt schematisch den Ablauf der LM-PCR. 2 µg genomische DNA (IV.2.2.3) wurden in einem Volumen von 40 µl mit 10 U *Csp6I* über Nacht bei 37°C verdaut und mittels Ethanol-Präzipitation gefällt. Das getrocknete DNA-Pellet wurde anschließend in 13,5 µl H₂O resuspendiert und in eine Primer-Extensions-Reaktion (20 µl) unter folgenden Bedingungen eingesetzt: PCR-Puffer (1×), *Taq* Polymerase (5 U), dNTPs (500 µM) und Primer MF 141 (250 nM). Die Verlängerung des Primers erfolgte durch Denaturierung der DNA (5 min, 95°C), Annealing des Primers (30 min, 64°C) und Elongation (15 min, 72°C). Anschließend wurde die DNA mit dem Qiaquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben von überschüssigen dNTPs gereinigt und mit 42 µl Wasser von der Säule eluiert. 200 µg Strep Dynabeads M280 (Dyna, Hamburg) wurden nach Herstellerangaben gewaschen und in 40 µl 2 × B+W Puffer resuspendiert. Die aufgereinigten Produkte aus der Primer-Extension wurden mit den Dynabeads vermischt und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung der biotinylierten Produkte aus der Primer-Extensions-Reaktion an die magnetisierten Streptavidin-beschichteten Partikel zu gewährleisten. Zur stetigen Durchmischung wurden die Reaktionsgefäße in einem Hybridisierungssofen in Rotation gehalten. Anschließend erfolgte die Extraktion der biotinylierten Produkte mit einem magnetischen Partikel-Extraktor ((MPE) (Boehringer, Mannheim)). Hierfür wurde das Reaktionsgefäß in die Halterung des Geräts gespannt. Nach einer Minute konnte der Überstand mit nicht-biotinylierter DNA abgenommen werden, während die Streptavidin-Partikel und die daran gebundene biotinylierte DNA durch die magnetische Wechselwirkung zurückgehalten wurden. Nach zwei Waschschrritten der Partikel mit je 100 µl Wasser im MPE wurden diese in 6 µl Wasser resuspendiert und es erfolgte die Ligation des synthetischen Linkers mittels der T4 DNA Ligase unter folgenden Bedingungen: 6 µl Partikel-gebundene DNA, Ligase-Puffer (1 ×), Ligase (30 U) und Linker (125 pmol). Die Ligationsreaktion fand bei 4°C über Nacht statt. Nach zwei Waschschrritten im MPE mit je 100 µl Wasser zur Entfernung von ungebundenem Linker wurden die Partikel in 10 µl H₂O resuspendiert. 1 µl der Suspension diente als Ausgangsmaterial für eine *Nested*-PCR-Reaktion.

Die erste PCR erfolgte mit dem Primer LTR 1, der spezifisch in der retroviralen Sequenz bindet und dem Primer LC 1, der spezifisch in der Linker-Sequenz bindet. Es wurden dNTPs (200 µM), Primer (je 1 µM) und *Taq* Polymerase (2,5 U) in PCR-Puffer (1 ×) in 25 µl Ansätzen für die Amplifikation der Ligationsprodukte unter folgenden Bedingungen eingesetzt: Denaturierung (30 sec, 95°C), Annealing (45 sec, 60°C) und Elongation (60 sec, 72°C) für 35 Zyklen und finale Elongation bei 72°C (10 min). Die zweite PCR wurde bei identischen Bedingungen mit den beiden inneren Primern LTR 2 und LC 2 durchgeführt. Als Ausgangs-DNA diente 1 µl des Produkts der ersten Amplifikationsrunde. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% (w/v) 1 × TBE Agarose-Gel aufgetrennt und dann aus dem Gel isoliert. Nach der Klonierung der isolierten DNA-Fragmente und der Sequenzierung der Klone konnten die unbekannt genomschen Sequenzen, in die das Provirus integriert hat, mit Hilfe von Datenbanken identifiziert werden.

Eine alternative Methode stellt die direkte Sequenzierung der aus dem Gel eluierten Fragmente dar. Gleichgroße PCR-Fragmente komigrieren allerdings bei der Gelelektrophorese und so würden bei der direkten Sequenzierung nur die Fragmente sequenziert werden, die den Großteil der Fragmentpopulation ausmachen, bzw. würde die Sequenzierung bei etwa gleichgroßen DNA-Populationen fehlschlagen. Fragmente von selten vorkommenden Insertionsstellen oder solche, die schlechter amplifiziert werden, würden mit der direkten Sequenzierung nicht detektiert werden. Daher wurde für diese Arbeit die Klonierung aller PCR-Banden bevorzugt.

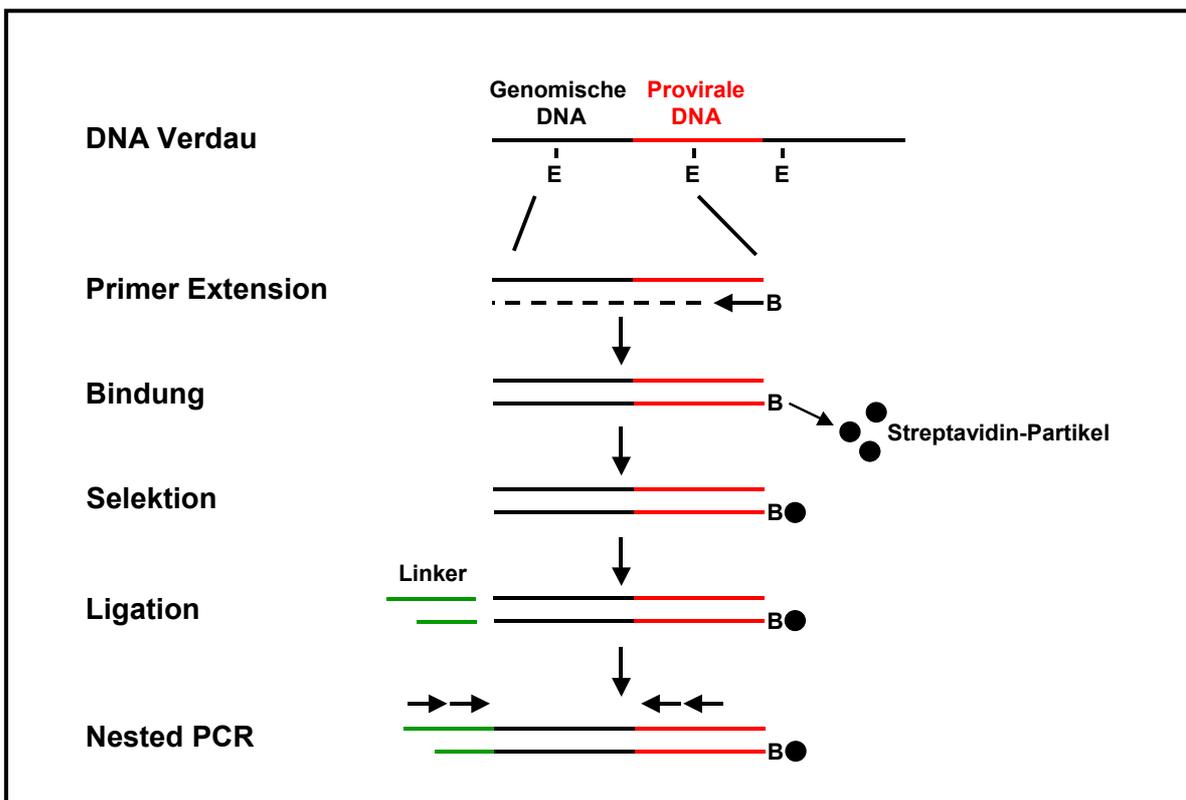


Abbildung 5 LM/EPTS-PCR. Schematische Abbildung der LM/EPTS-PCR. Nach dem Verdau genomischer DNA erfolgt eine Primer-Extensions-Reaktion mit einem biotinylierten Primer, der in der proviralen LTR-Region bindet. Die biotinylierten Produkte werden anschließend an Streptavidin-gekoppelte magnetische Partikel gebunden, die mittels magnetischer Selektion extrahiert werden können. Nach der Ligation eines synthetischen Linkers können die unbekannt genomschen DNA-Sequenzen mit Primern, die spezifisch an die bekannte provirale bzw. die Linker-Sequenz binden, amplifiziert und durch nachfolgende Klonierung und Sequenzierung identifiziert werden.

IV.2.2.7 Klonierung von DNA

IV.2.2.7.1 Herstellung linearisierter Vektor-DNA

Die Vektoren pBluescript und pXcm wurden mit *SmaI* bzw. *XcmI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Bande der linearisierten Vektor-DNA wurde aus dem Gel isoliert. Bei der Linearisierung des Vektors pXcm mit dem Restriktionsenzym *XcmI* entstanden T-Überhänge, die sich zur direkten Klonierung von *Taq*-amplifizierten PCR-Produkten (mit A-Überhängen) eigneten. Bei der Linearisierung des Vektors pBluescript mit dem Restriktionsenzym *SmaI* entstand DNA ohne kohäsive Enden (*blunt ended* DNA), die zur direkten Klonierung von *Pfu*-amplifizierten PCR-Fragmenten verwendet werden konnte.

Der retrovirale Vektor pSF91-I-eGFP-PRE wurde mit *NotI* linearisiert, das Enzym wurde hitzeinaktiviert und die Überhänge anschließend mit Hilfe des Klenow Fragments nach Herstellerangaben aufgefüllt, so dass Vektor-DNA ohne Überhänge vorlag (*blunt ended* Vektor). Nach Hitzeinaktivierung der Klenow Polymerase wurde die Vektor-DNA mit der *Calf Intestine Phosphatase* (CIP) nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Anschließend wurde der Vektor gelelektrophoretisch von den Enzymen getrennt und aus dem Gel isoliert. Die Menge der Vektor-DNA wurde dabei durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Größenstandard abgeschätzt.

IV.2.2.7.2 Klonierung der Provirus-flankierenden Sequenzen aus der LM-PCR

Die nach der LM-PCR isolierten DNA-Banden wurden in den linearisierten pXcm Vektor kloniert. Für die Ligation wurden aus dem Gel eluierte DNA-Fragmente mit linearisiertem Vektor im molaren Verhältnis von etwa 4:1 in eine Standardligation mit T4 DNA Ligase nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach Transformation der Ligationsprodukte in XL10-Gold Bakterien wurden inserthaltige Kolonien mittels blau/weiß Selektion identifiziert, in Flüssigkultur propagiert, Plasmid-DNA im kleinen Maßstab aufgereinigt und mit Hilfe von M13 Standardprimern sequenziert. Erhaltene Sequenzen wurden mit dem DNASTar 4.0 Programm (Madison, USA) *in silico* auf den durch die LM-PCR amplifizierten LTR-Bereich überprüft. Anschließend wurden die an den LTR-Bereich angrenzenden, unbekannt genomischen Sequenzen mittels BLAST (*B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool) oder BLAT (*B*last *L*ike *A*lignment *T*ool) Analyse in den Datenbanken ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) und der University of California (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) identifiziert.

Aus den auf diese Weise hergestellten Plasmiden wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen (Tabelle 2) die genomischen Fragmente entfernt, gelelektrophoretisch aufgereinigt und als Sonden für Southern-Blot-Analysen eingesetzt. Einzige Ausnahme stellte hier die Sonde Bcl-x_L (2) dar. Die klonierte Sequenz war zwar geeignet zur zweifelsfreien Identifikation der Integrationsstelle, aber zu kurz, um als Sonde zu dienen. Daher wurden zur Klonierung der genomischen Sequenz am Integrationsort Oligonukleotide verwendet, welche diese Sequenz spezifisch in einer PCR-Reaktion amplifizieren. Diese wurde unter Standardbedingungen mit den Primern Bcl-x_LLM2 (F) und Bcl-x_LLM2 (R) durchgeführt, das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt, wie die durch LM-PCR erhaltenen Fragmente in den pXcm Vektor kloniert und anschließend durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft.

IV.2.2.7.3 Klonierung von p53 in pBluescript

Die p53 codierende Sequenz wurde mit den Primern AE 11 und AE 12 mittels *Pfu* Polymerase nach reverser Transkription von Tumor-RNA aus cDNA amplifiziert, der PCR-Reaktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden aus dem Gel eluiert. Der Primer AE 11 bindet in der Translations-Startsequenz in Exon 2 und der Primer AE 12 20 bp vor dem Stopp-Codon. Die so erhaltenen p53-Fragmente enthalten also bis auf die letzten 20 Basenpaare, welche äußerst selten Mutationen aufweisen (Vousden und Lu, 2002), die komplette codierende Sequenz und können so auf Mutationen untersucht werden. Isolierte DNA wurde mit linearisiertem pBluescript Vektor

im molaren Verhältnis von etwa 4:1 in eine Standardligation mit T4 DNA Ligase nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde in XL10-Gold Bakterien transformiert und inserthaltige Kolonien durch blau/weiß Selektion identifiziert. Diese wurden in Flüssigkultur propagiert und die Plasmid-DNA isoliert. Nach den Sequenzierungen mit M13 Primern sowie einem Zwischenprimer wurden die erhaltenen Sequenzen mit dem DNASTar Programm durch Abgleich mit der *p53* Wildtypsequenz auf Mutationen untersucht.

IV.2.2.7.4 Klonierung von *Gadd45β* und *Bcl2l1* in retrovirale Vektoren

Die codierenden Sequenzen wurden mittels Standard-PCRs mit den in IV.1.10 angegebenen Primern aus cDNA amplifiziert und in den pBluescript oder den pXcm Vektor kloniert. Inserthaltige Bakterienkolonien wurden durch blau/weiß Selektion identifiziert und in Flüssigkultur propagiert. Die Plasmid-DNA wurde aufgereinigt und die Sequenz des Inserts durch Sequenzierung mit M13 Standardprimern bestimmt. Fehlerfreie Inserts wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen aus den Vektoren geschnitten und die kohäsiven Enden mit Klenow Polymerase nach Herstellerangaben aufgefüllt. Anschließend wurden die Fragmente durch Gelelektrophorese von der Vektor-DNA getrennt und isoliert. Die DNA-Menge wurde durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Größenstandard abgeschätzt. Die Ligation der DNA in den retroviralen Vektoren pSF91-I-eGFP-PRE erfolgte nach Herstellerprotokoll mit 30 U T4 Ligase im molaren Vektor/DNA Verhältnis 1:4. Als Hintergrundkontrolle wurde ein Ligationsansatz nur mit dephosphoryliertem Vektor mitgeführt. Nach der Transformation wurden die erhaltenen Kolonien propagiert und die korrekte Orientierung des Inserts durch einen Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen überprüft. Gegebenenfalls konnten die klonierten Fragmente auch durch Sequenzierung mit den Primern CS 412 und CS 413 überprüft werden.

IV.2.2.8 Herstellung radioaktiv markierter Sonden und Größenstandards

Zur Herstellung eines radioaktiv markierten Größenstandards wurden 2 µg λ-DNA mit 15 U *HindIII* in einem Volumen von 20 µl 1,5 Stunden bei 37°C gespalten. Die vollständige Spaltung wurde mit einem Aliquot des Spaltungsansatzes gelelektrophoretisch überprüft. Anschließend wurden die verbliebenen 17 µl mit 1,11 MBq [α -³²P]-dCTP, 3 µl Mix C des DecaLabel™ Kits und 5 U Klenow Polymerase in einem Volumen von 30 µl bei entsprechenden Pufferbedingungen radioaktiv markiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden zum Stoppen der enzymatischen Reaktion und Erhöhung des Probenvolumens 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 45 µl TE-Puffer zugesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe von Sephacryl-Säulen (MobiSpin S300, MoBiTec, Göttingen) durch Zentrifugation (2 min, 800 × g) entfernt.

Die DNA für die verschiedenen in dieser Arbeit genutzten Sonden wurde wie in IV.1.11 aufgelistet durch einen Restriktionsverdau oder PCR hergestellt und durch Gelelektrophorese aufgereinigt. Die radioaktive Markierung der aus dem Gel eluierten DNA erfolgte mit dem DecaLabel™ Kit entsprechend den Herstellerangaben in einem Volumen von 50 µl. Nach dem Einbau von 1,85 MBq [α -³²P]-dCTP wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt, die nicht eingebauten Nukleotide wie oben beschrieben mit Hilfe von Sephacryl-Säulen entfernt und der Ansatz im Szintillator

vermessen. Es sollen mindestens $1,5 \times 10^7$ cpm für 10 ml Hybridisierungspuffer eingesetzt werden.

IV.2.2.9 Nachweis von RNA und DNA im Blotverfahren

20 × SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7
50 × Denhardt	1% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1% (w/v) BSA
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1 M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris; pH 7,5
Hybridisierungspuffer	6 × SSC, 0,5 M deionisiertes Formamid, 0,5% SDS, 2,5 × Denhardt, 8% Dextransulfat, 100 µg/ml Lachsperma-DNA
Waschlösung I	1 × SSC
Waschlösung II	0,1% SDS, 0,1 × SSC

IV.2.2.9.1 Southern-Blot-Analyse

Der Nachweis von DNA-Sequenzen erfolgte mit der Southern-Blot-Methode, mit der DNA-Fragmente durch die spezifische Bindung einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden können.

Für die Southern-Blot-Analyse wurden 10 µg genomische DNA mit Restriktionsendonukleasen (35 U) in einem Volumen von 50 µl für 5 Stunden bei der entsprechenden Temperatur gespalten. Nach etwa 1 Stunde wurden die Ansätze durch Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt. Die Trennung der Spaltprodukte erfolgte auf einem 0,8% (w/v) 1 × TAE Agarose-Gel. Als Größenstandard wurde radioaktiv markierte (ca. 2×10^5 cpm) *HindIII* gespaltene λ-DNA mitgeführt. Die Elektrophorese fand bei 30 V über Nacht statt. Nach der Elektrophorese wurde der Erfolg des Restriktionsverbaus mittels UV-Illumination überprüft, das Gel wurde vermessen, 20 Minuten in Denaturierungslösung und anschließend 20 Minuten in Neutralisierungslösung geschwenkt. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte durch Ausnutzung von Kapillarkräften. Für den Blot wurde eine Plastikwanne mit 1,5 l 10 × SSC gefüllt, eine Glasscheibe diente als Brücke, auf welche zwei übereinander liegende Stücke Whatman-Papier so platziert wurden, dass die Enden in den Laufpuffer ragten. Auf diese wurde das Gel luftblasenfrei aufgelegt, es folgte die auf Gelgröße zurechtgeschnittene, angefeuchtete Membran (0,45 µm Biodyne B Transfer Membrane, PALL, Pensacola, USA) und dann zwei ebenfalls angefeuchtete Whatman-Papiere in Gelgröße. Der Bereich um das Gel wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt, um den Pufferfluss exklusiv durch das Gel zu gewährleisten. Mehrere Lagen saugfähige Papierhandtücher, die mit einem Gewicht beschwert wurden, bildeten den Abschluss. Der Transfer der DNA fand über Nacht statt. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese zweimal mit der Auto Crosslinker Funktion im UV-Crosslinker (1800, Stratagene, La Jolla, USA) vernetzt. Danach wurde die Membran im

Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer für mindestens 30 Minuten bei 55°C prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde unmittelbar vor der Zugabe zum Hybridisierungspuffer 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe der Sonde erfolgte die Hybridisierung bei 55°C über Nacht. Dabei wurde das Hybridisierungsröhrchen im Hybridisierungssofen in Rotation gehalten, um die Membran stetig benetzt zu halten. Nach Verwerfen der Hybridisierungslösung wurde die Membran zweimal kurz mit 20 ml Waschlösung I im Hybridisierungsröhrchen gewaschen. Die nächsten beiden Waschschriffe erfolgten in einer Plastikwanne mit 250 ml vorgewärmter Waschlösung II für jeweils 40 Minuten bei 65°C. Danach wurde die Membran in Folie eingeschweißt und in einer Filmkassette fixiert. Die Detektion der spezifisch gebundenen, radioaktiven Sonden erfolgte durch Auflage eines Röntgenfilms, der je nach Signalstärke bei -70°C exponiert wurde. Die Filmentwicklung erfolgte mit dem Classic E.O.S. Filmentwickler (AGFA, Köln). Sollte nach dieser Detektion eine weitere Hybridisierung mit einer anderen Sonde erfolgen, wurde die gebundene Sonde zuerst von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran zweimal mit 95°C warmem 0,5% SDS (je 5 min) gewaschen und anschließend mit der oben beschriebenen Methode erneut hybridisiert.

IV.2.2.9.2 Northern-Blot-Analyse

10 × RNA-Ladepuffer	50% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene Cyanol FF
20 × MOPS	400 mM MOPS, 60 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA; pH 7

Der Nachweis von RNA-Transkripten erfolgte mittels Northern-Blot-Analyse, bei der diese durch spezifische Bindung einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

Dazu wurden 10 µg RNA in 1 M Glyoxal, 1 × MOPS Puffer und 7,5 M DMSO für 60 Minuten bei 50°C denaturiert. Mit einem radioaktiven Größenstandard wurde in entsprechender Weise verfahren. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese mit RNA-Ladepuffer (1 ×) versetzt und auf ein 1,2% (w/v) 1 × MOPS Agarose-Gel geladen. Die Elektrophorese wurde 10 Minuten bei 70 V, anschließend über Nacht bei 30 V in 1 × MOPS Puffer durchgeführt. Um ein pH-Gefälle zu vermeiden wurde zum Pufferaustausch eine Umwälzpumpe angeschlossen. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu dem Southern-Blot-Verfahren, wobei der einzige Unterschied eine Temperatur von 42°C bei der Hybridisierung war.

IV.2.2.10 Real Time PCR

Mit der Real Time PCR kann die relative Menge spezifischer Transkripte in verschiedenen Proben gemessen und miteinander verglichen werden. Für diese Arbeit wurden Amplifikate mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green detektiert. Dieser kann sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagern und nach der Einlagerung ein starkes Fluoreszenzsignal emittieren. Nimmt die DNA-Menge während der Amplifikation zu, steigt damit auch das Fluoreszenzsignal. Während der Real Time PCR wird in jedem Zyklus der PCR das Fluoreszenzsignal bestimmt und damit auch der Anstieg des Signals detektiert, wenn die Amplifikatmenge steigt. Durch den C_T -Wert (*Threshold Cycle*) wird der Zyklus angegeben, in dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal übersteigt. Je mehr Ausgangsmaterial eines spezifischen Transkripts vorhanden ist, desto früher findet der Anstieg der Fluoreszenz über den Detektionslevel statt und desto geringer ist damit der C_T -Wert. Zur Normalisierung der Ergebnisse wird eine Probe für alle Messreihen als Kalibrator festgelegt, zu dem alle Proben in Verhältnis gesetzt werden. Dadurch werden Schwankungen zwischen den verschiedenen Läufen egalisiert, die zum Beispiel durch Pipettierfehler beim Master Mix zustande kommen. Da die Ausgangsmengen an eingesetzter cDNA schwanken können, wird für alle Proben der C_T -Wert eines Referenzgens bestimmt, das in allen Zellen gleich exprimiert wird (*housekeeping gene*) und mit der selben Effizienz amplifiziert wird. Die C_T -Werte des zu bestimmenden Gens jeder Probe werden in Verhältnis zum Referenzgen gesetzt, um die Proben untereinander vergleichbar zu machen. Daraus ergibt sich für die Quantifizierung nach der Kalibrator-normalisierten Methode folgende Formel.

$$\text{normalisiertes Verhältnis} = \frac{\text{Konz. Zielgen (Probe)}}{\text{Konz. Referenzgen (Probe)}} \times \frac{\text{Konz. Referenzgen (Kalibrator)}}{\text{Konz. Zielgen (Kalibrator)}}$$

Für diese Arbeit sollten die relativen Transkriptmengen von *Bcl2/1* und *Gadd45 β* in Tumorgewebe bestimmt werden. Als Referenzgen diente das Gen für die Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (*Hprt*). Für die Versuche wurde aus Tumorgewebe RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese für die Real Time PCR im Light Cycler eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit in 20 μ l Reaktionsansätzen mit 2 μ l cDNA, Primern (je 0,5 μ M) (IV.1.10), 2 μ l Master Mix und nachstehenden $MgCl_2$ Endkonzentrationen: 3,5 mM $MgCl_2$ für *Hprt*, 3 mM $MgCl_2$ für *Bcl2/1* und 2 mM $MgCl_2$ für *Gadd45 β* . Die Amplifikation fand unter folgenden Bedingungen statt: *Bcl2/1* und *Gadd45 β* 95°C für 10 Minuten initiale Denaturierung der DNA, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung (8 sec, 95°C), Annealing (8 sec, 60°C) und Elongation (8 sec, 72°C); *Hprt* 95°C für 10 Minuten initiale Denaturierung der DNA, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung (15 sec, 95°C), Annealing (10 sec, 58°C) und Elongation (16 sec, 72°C). Für jede Probe wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen die einzelnen Proben jeweils in Duplikaten amplifiziert wurden. Für die relative Quantifizierung wurde die oben beschriebene Formel angewandt.

IV.2.3 Zellkultur

Wenn kein anderes Vorgehen beschrieben ist, wurde stets mit vorgewärmten Lösungen gearbeitet.

IV.2.3.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5%iger CO₂-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchte von 95% gehalten. Die Kultivierung erfolgte in beschichteten Gewebekulturschalen und die Zellen wurden subkonfluent gehalten. Je nach Dichte der Zellen und ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden diese alle 3-4 Tage passagiert und dabei im Verhältnis 1:6 bis 1:11 verdünnt. Für die Passagierung wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen, durch Zugabe von Trypsin/EDTA (Inkubation 1 min, 37°C) abgelöst und in frischem Medium suspendiert. In Abhängigkeit der gewünschten Verdünnung wurden Aliquots der Zellen in frische Zellkulturschalen gegeben und mit einer geeigneten Menge Medium versetzt.

IV.2.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Suspensionszellen (Ba/F3) wurden ebenfalls unter den oben aufgeführten Bedingungen kultiviert und abhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:6 verdünnt. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm² Kulturflaschen.

IV.2.3.3 Kultivierung von Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden wie beschrieben aus Eλ-MYC Mäusen isoliert (IV.2.1.3). Zur Kultivierung wurden sie bei einer Dichte von 1×10^6 /ml in B-Zellmedium gehalten.

IV.2.3.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut. Danach erfolgte der zügige Transfer in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (5 min, 300 × g) wurde der Überstand verworfen, die Zellen in der gewünschten Menge Kulturmedium resuspendiert und anschließend kultiviert.

Adhärenente Zellen wurden zum Einfrieren mit Trypsin vom Plattenboden gelöst, zur Inaktivierung des Trypsins in frischem Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (RT, 5 min, 300 × g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Einfriermedium je Schale (Ø 10 cm) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Einfriereröhrchen überführt und anschließend in gekühlten Einfriercontainern (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Rochester, USA) bei -70°C eingefroren. Nach einem Tag wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Suspensionszellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (RT, 5 min, 300 × g), in 1 ml Einfriermedium je 5×10^6 Zellen aufgenommen und wie oben beschrieben eingefroren.

IV.2.3.5 Herstellung infektiöser Viruspartikel

Die Herstellung infektiöser Viruspartikel erfolgte durch Kotransfektion von Plasmiden in eine Produzentenzelllinie mittels Calciumphosphat. Dazu wurde ein Plasmid verwendet, das für das virale Genom codierte, aber nicht die *gag*-, die *pol*- und die *env*-Sequenzen

trug. Für die Bildung von Viruspartikeln sind jedoch die viralen Strukturproteine, Enzyme und Hüllproteine, die von *gag*, *pol* und *env* codiert werden, notwendig. Daher wurden Plasmide mit diesen Sequenzen kotransfiziert, so dass von Zellen, die mit allen Plasmiden transfiziert waren, infektiöse Viruspartikel gebildet werden konnten. Den von der Produzentenzelllinie gebildeten Viren fehlten im Genom die *gag*-, *pol*- und *env*-Sequenzen, dadurch waren sie replikationsin~~u~~kompetent, exprimierten aber nach Integration alle im viralen Genom vorhandenen Gene. Als *env*-Gen wurde das Gen für das ökotrope Hüllprotein (pEcoenv) gewählt. Mit diesem Hüllprotein pseudotypisierte Viruspartikel sind in der Lage, Mauszellen über den CAT-1 Rezeptor zu infizieren

Die Transfektion erfolgte mit dem Profection Mammalian Transfection Kit (IV.1.2). Für die Transfektion wurden 5×10^6 PhoenixGP Zellen pro Kulturschale (\varnothing 10 cm) etwa 16 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt und neues Medium mit 25 μ M Chloroquin auf die Zellen gegeben. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde in einem Volumen von 500 μ l 0,25 mM Calciumchlorid-Lösung aufgenommen. Für die Herstellung von γ -Retroviren wurden 5 μ g retroviraler Vektor, 10 μ g pSV40-gag/pol und 3 μ g pEcoenv pro Schale (\varnothing 10 cm) verwendet. Das Plasmidgemisch wurde tropfenweise zu 500 μ l $2 \times$ HEPES Puffer gegeben, wobei mit einer gestopften Pasteurpipette zur besseren Durchmischung und zur Oberflächenvergrößerung Luft durch den Puffer geblasen wurde. Nach einer 15-minütigen Inkubation des Ansatzes, während der sich ein Calciumphosphat/DNA-Präzipitat bildete, wurde dieser tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 8 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch 6 ml DMEM/HEPES ersetzt. Viermal in Folge wurde alle 8-14 Stunden virushaltiger Überstand abgenommen und die Zellen mit 6 ml frischem Medium gefüttert. Der Virusüberstand wurde durch 0,22 μ m Millex GP Filter (Millipore, Schwalbach) gefiltert und bei -70°C eingefroren.

IV.2.3.6 Titerbestimmung

Zur qualitativen Überprüfung der Virusüberstände wurden die Virustiter bestimmt, die angeben, wie viele infektiöse Einheiten pro Milliliter Überstand vorhanden sind. Für die Titerbestimmung sollten die Infektionsraten unter 10% liegen, um Mehrfachinfektionen und damit eine Verfälschung der erhaltenen Werte zu vermeiden.

Dafür wurden 5×10^4 Sc-1 Zellen je Loch in 500 μ l Medium in 24-Lochplatten ausgesät. 3 Stunden nach Aussäen der Zellen wurden diese je Loch mit 20 bzw. 100 μ l Virusüberstand versehen und es wurden 8 μ g/ml Polybren zugesetzt. Nach Zugabe der Überstände wurden die Platten bei Raumtemperatur 1 Stunde bei $700 \times g$ zentrifugiert. 72 Stunden nach der Infektion wurde im Durchflusszytometer bestimmt, wie viele Zellen das fluoreszierende Reporterprotein eGFP exprimieren und daher infiziert sind. Dafür wurden die Sc-1 Zellen mit Trypsin/EDTA von den Zellkulturschalen gelöst und das Trypsin wurde durch Zugabe von 1 Volumen PBS (mit 10% FCS) inaktiviert. Anschließend wurden die eGFP-haltigen Zellen mit dem Durchflusszytometer detektiert. Die infektiösen Einheiten pro Milliliter (IE/ml) können nach der Formel $T = Z \times A/V$ berechnet werden (T: Titer, Z: Anzahl der ausgesäten Zellen, A: Anteil der infizierten Zellen, durchflusszytometrisch bestimmt, V: Volumen des Virusüberstandes für die Infektion).

IV.2.3.7 Analyse von Zellen im Durchflusszytometer (FACS-Analyse)

Mit Hilfe des Durchflusszytometers können Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden, die entweder von Reportergenen gebildet werden oder mittels Antikörper an die Zellen gekoppelt sind. Bei Messung von zwei und mehr Farben gleichzeitig wurde die automatische Kompensationsroutine des Durchflusszytometers verwendet, die die Überlappung der Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine berücksichtigt und aus den Ergebnissen eliminiert. Die Messungen erfolgten stets mit einem geeigneten Volumen zwischen 300 µl und 500 µl.

IV.2.3.8 Sortieren von Zellen

Das Sortieren von Zellen anhand ihrer veränderten Fluoreszenzeigenschaften aufgrund der Expression eines Reportergens erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers mit Sortierfunktion, dem FACS Aria, in der Abteilung für Großgeräte am Heinrich-Pette-Institut durch Arne Düsedau. Als Einstellung wurde die höchste Reinheitsstufe gewählt, um zu gewährleisten, dass nur eGFP positive Zellen für die Weiterkultivierung gewonnen wurden.

Für den Sortiervorgang wurden die Zellen von den Kulturschalen abgelöst (adhärent wachsende Zellen) bzw. den Kulturschalen entnommen (Suspensionszellen), nach Zentrifugation (RT, 300 × g, 5 min) in PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Je 3×10^6 Zellen wurden in 1 ml PBS (1% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und durch ein Sieb in ein steriles FACS-Röhrchen überführt. Die eGFP exprimierenden Zellen wurden in vorgelegtes Medium (10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin) sortiert. Die sortierten Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen, anschließend entsprechend ihrer Zellzahl in geeigneten Kulturgefäßen ausplattiert und unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde dem Medium nach dem Sortieren grundsätzlich 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Erst nach dem vierten Passagieren der Zellen wurden diese wieder in Medium ohne Antibiotika gehalten.

IV.2.3.9 Infektion von Zellen

IV.2.3.9.1 Infektion von NIH3T3

Diese Zellen wurden in 6-Lochplatten bei einer Dichte von 8×10^5 Zellen pro Loch ausgesät und für 3 Stunden kultiviert um das Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Dann wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 2 ml Virusüberstand überschichtet und 8 µg/ml Polybren zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 1 Stunde bei 700 × g zentrifugiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit frischem Medium versetzt. 72 Stunden nach der Infektion wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt und die eGFP-exprimierenden Zellen bei Infektionsraten von <75% durch Sortierung angereichert (IV.2.3.8).

IV.2.3.9.2 Infektion von Ba/F3 Zellen

Stopplösung	PBS, 2% BSA
Waschlösung	HBSS, 25 mM HEPES

Für die Infektion von Ba/F3 Zellen wurden 6-Lochplatten für Suspensionszellen mit Retronectin beschichtet. Hierzu wurden 2 ml Retronectin (50 µg/ml, TaKaRa, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) je Loch auf die Platten gegeben und diese entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Retronectinlösung wurde entfernt und zwecks Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 ml Stopplösung pro Loch inkubiert. Nach Entfernen der Stopplösung wurden die Platten einmal mit 3 ml Waschlösung pro Loch gewaschen.

Zur Beschichtung der Platten mit Viren wurden 1,5 ml Virusüberstand pro Loch auf die Platten gegeben und diese zentrifugiert (20 min, 700 × g, RT). Dann wurde der Virusüberstand entfernt und verworfen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden 8×10^5 Zellen pro Loch ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte eine analoge Beschichtung von neuen 6-Lochplatten und die Zellen wurden für eine zweite Infektion auf diese Platten umgesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen von den Retronectinplatten entfernt und auf Platten ohne Retronectin ausgesät. Auch für diese Zellen wurde nach 72 Stunden die Infektionsrate bestimmt und die eGFP exprimierenden Zellen mittels Sortierung angereichert.

IV.2.3.10 Bestrahlung von Zellen

Zur Untersuchung der Reaktion von Zellen auf DNA-Schäden wurden Schäden durch Bestrahlung mit UV-Licht oder γ-Strahlung induziert. Für diese Versuche befanden sich die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase. Nach Bestrahlung wurden die Zellen weiterhin unter Standardbedingungen gehalten und zu verschiedenen Zeitpunkten für diverse Analysen aufgearbeitet.

Zur UV-Bestrahlung von NIH3T3 Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Absaugen der Waschflüssigkeit wurden die Zellen in Kulturschalen ohne Deckel mit UV-Licht (25 und 50 J/m²) im UV-Crosslinker 1800 bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt und bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung in Kultur gehalten.

Für die γ-Bestrahlung wurde die LISA-Strahlenquelle mit einer offenen Cäsium-137 Quelle des Heinrich-Pette-Instituts verwendet. Die Bestrahlung der Zellen mit 6 bzw. 10 Gy erfolgte in ihren Kulturschalen ohne Entfernen des Mediums. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung unter den üblichen Kulturbedingungen gehalten.

IV.2.3.11 Serumentzug

Zur Untersuchung der Reaktion von Zellen auf Serumentzug wurden NIH3T3 Zellen in Medium ohne Serum gehalten. Dazu wurden exponentiell wachsende Zellen mit PBS gewaschen und nach Abnahme der Waschlösung mit Medium ohne Serum versetzt. Anschließend wurden die Zellen bis zur Aufarbeitung für die Analyse unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Für die Analyse wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und das Trypsin mit dem abgenommenen Medium inaktiviert. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, $300 \times g$, RT), in 1:15 verdünnter Propidiumiodid-Lösung (IV.2.3.14) resuspendiert und unmittelbar nach dem Anfärben durchflusszytometrisch analysiert. Propidiumiodid kann nicht in lebende Zellen eindringen, so wurde bei der FACS-Analyse der prozentuale Anteil toter, also angefärbter, Zellen bestimmt.

IV.2.3.12 Vorbereitung von NIH3T3 Zellen für die Transplantation

Für die Evaluation, ob Fibroblasten transformiert sind und deshalb *in vivo* proliferieren können, wurden exponentiell wachsende NIH3T3 Zellen mit Trypsin/EDTA von drei Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm) gelöst und das Trypsin durch Zugabe von Medium inaktiviert. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, $300 \times g$, RT), der Überstand verworfen und die Zellen zur Entfernung von FCS-Rückständen mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurden die Zellen in PBS resuspendiert und die Zelldichte durch Zugabe von PBS auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Es wurden 100 μ l der Zellsuspension, also 1×10^6 Zellen, subkutan in den Nacken von NOD/*scid* Mäusen injiziert.

IV.2.3.13 Herstellung von Zellsedimenten für Western-Blot-Analysen

Zur Herstellung von Zellsedimenten adhärent wachsender Zellen wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach Abnahme der Waschlösung wurden die Zellen mit einem Gummischaber vom Plattenboden abgelöst und in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Sedimentation der Zellen durch schnelle Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bei -70°C gelagert. Für Western-Blot-Analysen wurden Kulturschalen mit 15 cm Durchmesser verwendet.

Die Suspensionszellen wurden in 50 ml Falcon-Gefäße überführt und 6 Minuten bei $300 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 50 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml kaltem PBS aufgenommen, in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und dort erneut durch schnelles Zentrifugieren sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen ebenfalls bei -70°C gelagert. Alle Reaktionsgefäße wurden während dieser Versuche auf Eis gelagert und es wurde auf schnelle Arbeitsweise geachtet.

IV.2.3.14 Zellzyklusanalysen

PBS/EDTA	0,1% (w/v) EDTA in PBS; pH 7,5
Propidiumiodid-Lösung	0,5 mg/ml Propidiumiodid in 380 mM Natriumcitrat; pH 7,0; Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
RNase A	10 mg/ml RNase A in 10 mM Natriumacetat (pH 5,2); 15 min kochen, nach langsamer Abkühlung auf Raumtemperatur pH durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Tris/HCl (pH 7,4) einstellen; Lagerung bei -20°C
Färbelösung	1:15 Propidiumiodid-Lösung, 1:30 RNase A in PBS

Durch Analyse des DNA-Gehalts von einzelnen Zellen innerhalb einer Zellpopulation kann die prozentuale Zellzyklusverteilung dieser Population bestimmt werden. Nach Färbung der DNA mit dem Fluorochrom Propidiumiodid zeigen die Histogramme einer Zellpopulation eine charakteristische Verteilung: Zellen mit einheitlich geringem DNA-Gehalt (G_0/G_1), Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt (G_2/M) und Zellen mit intermediärem DNA-Gehalt, die sich in der S-Phase befinden. Da apoptotische Zellen ihre DNA mittels einer spezifischen Endonuklease degradieren und die kleineren Fragmente leicht aus den fixierten Zellen extrahiert werden, zeigen diese Zellen einen geringeren DNA-Gehalt als Zellen in der G_1 -Phase (Sub G_1).

Für durchflusszytometrische Analysen von bestrahlten, adhärennten Zellen wurden diese mit Ethanol fixiert. Dazu wurde das Medium in 15 ml Falcon-Gefäße überführt, die Zellen mit PBS/EDTA gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Schalenboden gelöst. Das Trypsin wurde mit dem vorher abgenommenen Medium inaktiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension in den Falcon-Gefäßen sedimentiert ($300 \times g$, 6 min, 4°C). Der gesamte Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 500 μ l gekühltem PBS/EDTA resuspendiert (Vortex auf geringster Stufe). Die Zellen wurden danach durch tropfenweise Zugabe von 80%igem eiskalten (-20°C) Ethanol unter stetigem Durchmischen (Vortex, geringste Stufe) fixiert. Zur Gewährleistung des Austausches des intrazellulären Wassers durch Ethanol wurden die Zellen mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Fixierung von Suspensionszellen erfolgte analog, lediglich die Trypsinierung der Zellen entfiel. Für die DNA-Färbung wurden die in Ethanol fixierten und bei -20°C gelagerten Zellen zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend sedimentiert ($300 \times g$, 6 min, 16°C). Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen zwecks Rehydrierung in 5 ml PBS/EDTA vorsichtig resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Nach erneuter Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurde der Überstand verworfen, das Sediment in 0,5 – 1 ml Färbelösung resuspendiert und mindestens 30 Minuten im 37°C warmen Wasserbad bei Dunkelheit inkubiert. Vor der Messung wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden jeweils 10.000 Ereignisse ohne Dubletten erfasst. Zur quantitativen Zellzyklusanalyse wurde die Software Multicycle (Phoenix) eingesetzt.

IV.2.3.15 DNA-Fragmentierungsanalysen

Lysepuffer	400 mM NaCl, 0,5% SDS, 2 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0)
TE+	150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

Während der Apoptose kommt es zur Aktivierung einer spezifischen Endonuklease, welche die genomische DNA internukleosomal in Fragmente von 180 bp oder ein Vielfaches davon schneidet (Wyllie, 1980). Diese Fragmente können in einem Agarose-Gel aufgetrennt werden und sind dann als DNA-Leiter sichtbar (*DNA laddering*).

Die Isolierung der DNA erfolgte aus 1×10^7 Tumorzellen, entweder direkt nach der Entnahme oder nach drei Stunden Kultivierung in B-Zellmedium. Ein Teil der Zellen wurde mit 6,85 Gy in der LISA-Strahlenquelle bestrahlt, anschließend in B-Zellmedium gegeben und wie die unbestrahlten Kontrollzellen für drei Stunden kultiviert. Für die Lyse wurden die Zellen nach Zentrifugation (5 min, $300 \times g$, RT) mit 250 μ l Lysepuffer versetzt. Nach intensivem Mischen (Vortex) und Zusatz von 50 μ g Proteinase K wurden die Ansätze für 6 Stunden bei 50°C im Thermoschüttler inkubiert. Die Proben wurde anschließend zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert, die DNA aus der wässrigen Phase danach mit Ethanol präzipitiert und in TE+ (2 Stunden, 37°C, Schüttler) resuspendiert. Die Konzentration der Lösung wurde photometrisch bestimmt und 2,5 μ g DNA wurden in einem 1% (w/v) $1 \times$ TBE Agarose-Gel aufgetrennt.

IV.2.4 Proteinbiochemische Methoden

IV.2.4.1 Western-Blot-Analysen

IV.2.4.1.1 Zelllyse

E1A-Lysepuffer	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40 ; pH 7 Vor Gebrauch Zugabe von 1 Tablette Complete Mini Proteinaseinhibitor (Roche, Mannheim) pro 10 ml Lysepuffer; Lagerung auf Eis
6 \times Probenpuffer	350 mM Tris/HCl (pH 6,8), 35% (v/v) Glycerol, 10% SDS, 0,6 M DTT, 0,012% (w/v) Bromphenolblau

Die gefrorenen Zellsedimente (IV.2.3.13) wurden auf Eis mit dem gleichen Volumen gekühltem E1A-Lysepuffer versetzt und darin resuspendiert. Die Ansätze wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und regelmäßig durch schnelles Ziehen der Reaktionsgefäße über eine raue Oberfläche gemischt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die Lysate zentrifugiert (30 min, $20.817 \times g$, 4°C), die Überstände in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) mit dem Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Biorad, München) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht dabei auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an basische und

aromatische Aminosäuren. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Lysate mit einem entsprechenden Volumen $6 \times$ Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die fertigen Lysate wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

IV.2.4.1.2 SDS-PAGE

4 \times Tris/SDS-Puffer pH 6,8	0,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS
4 \times Tris/SDS-Puffer pH 8,8	1,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS
10 \times Laufpuffer	125 mM Tris; 960 mM Glycin, 1% SDS
Sammelgel 13% (5 Stück)	3,9 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 7,5 ml 4 \times Tris/SDS-Puffer (pH 6,8), 18,3 ml H_2O , 150 μl 10% APS, 30 μl TEMED
Trenngel 13% (5 Stück)	19,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 11,25 ml 4 \times Tris/SDS-Puffer (pH 8,8), 14,25 ml H_2O , 150 μl 10% APS, 30 μl TEMED

Die SDS-PAGE dient der Trennung von Proteingemischen nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht.

Minigele (100 mm \times 80 mm \times 1 mm) wurden nach vorheriger Entgasung der Lösung (ohne APS und TEMED) im Ölpumpenvakuum mit Hilfe des Hoefer-Systems (Hoefer Mighty Small II, Hoefer, San Francisco, USA) gegossen. In den Gelen wurden Lysate mit Proteinmengen von 50-100 μg aufgetrennt. Außerdem wurde ein gefärbter Größenstandard SDS-7B (Sigma, Taufkirchen) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20-25 mA/Gel.

IV.2.4.1.3 Western-Blot und immunologische Detektion

Block-Puffer	5% Magermilchpulver in TBS-Tween
Blot-Puffer	192 mM Glycin, 50 mM Tris; pH 8,3
TBS-Tween	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20

Proteine können nach ihrer größenabhängigen Auftrennung in der SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Membran spezifisch durch zwei sukzessive Antikörperbindeschritte detektiert werden.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Tankblot-Verfahren (Mini-Trans Blot Cell, Biorad, München) in 60 Minuten bei konstanten 100 V unter Eiskühlung auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Dazu wurde die Membran kurz mit Methanol aktiviert und nach Abspülen mit deionisiertem Wasser in Blot-Puffer äquilibriert. Nach dem Blot wurde die Membran auf dem Schwenktisch für 45 Minuten in Block-Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen zu besetzen. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit einem spezifischen primären Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die

Membran viermal für 15 Minuten mit TBS-Tween gewaschen und danach 60 Minuten mit einem sekundären, peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert, welcher an den Erstantikörper bindet. Zur Entfernung von ungebundenem Sekundärantikörper erfolgten vier weitere Waschschriffe, analog zu den oben beschriebenen. Spezifische Antikörper-interaktionen wurden dann in der ECL-Reaktion detektiert. Zur Weiterverwendung wurde die Membran anschließend in TBS-Tween gewaschen und vor Zugabe eines neuen primären Antikörpers erneut 30-40 Minuten in Block-Puffer inkubiert.

IV.2.4.1.4 ECL-Reaktion

Luminol-Stammlösung	250 mM 3-Aminophthalhydrazid in DMSO ; Lagerung bei -20°C
4-Cumarsäure-Stammlösung	90 mM p-Hydroxyzimtsäure in DMSO; Lagerung bei -20°C
Lösung A	200 µl Luminol-Stammlösung, 88 µl Cumarsäure-Stammlösung, 20 ml 100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
Lösung B	30 µl H ₂ O ₂ (30%), 20 ml 100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
ECL-Lösung	1:1 Gemisch aus Lösung A und B, unmittelbar vor Gebrauch

Zur Detektion von Antikörper-gebundenen Proteinen wurde die Membran mit ECL-Lösung 1 Minute im Dunkeln inkubiert und dann für verschiedene Zeiten (15 sec - 30 min) auf Röntgenfilmen exponiert. Die an die sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) spaltet dabei das in der ECL-Lösung vorhandene Wasserstoffperoxid. Die entstehenden Radikale lösen eine Chemilumineszenz-Reaktion aus, welche zur Schwärzung des Röntgenfilms an der Position des gebundenen HRP-gekoppelten Antikörpers führt.

Im Falle schwer zu detektierender Proteine wurde an Stelle der selbst hergestellten ECL-Lösung SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Pierce-Reagenz (Perbio Science, Bonn) gemäß Herstellerangaben verwendet.

V Ergebnisse

1. Infektion von Mäusen mit dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV) beschleunigt die Tumorgenese

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Faktoren, die einen Überlebensvorteil nach der Induktion von Stress vermitteln. Dazu soll zuerst ein System etabliert werden, das es ermöglicht, kritische Mutationen für das Überleben von Tumorzellen nach Bestrahlung zu detektieren (Abbildung 6). Zu diesem Zweck werden durch Infektion von neugeborenen Mäusen mit MoMLV Tumore durch Insertionsmutagenese induziert. Nach der Tumorbildung werden die Tumore entnommen, *ex vivo* bestrahlt und in immunkompetente Rezipienten transplantiert. Tumorzellen mit einer Bestrahlungsresistenz können *in vivo* zu Sekundärtumoren auswachsen. Ist ein integriertes Provirus durch (In)Aktivierung zellulärer Gene kausal für die Stressresistenz verantwortlich, ist zu erwarten, dass in unabhängigen Experimenten nach Transplantation und Bestrahlung Subklone auswachsen, die durch dieselben Integrationsstellen gekennzeichnet sind. Die durch die Integration markierten Resistenzgene sollen im Folgenden identifiziert und funktionell analysiert werden. Für die Etablierung des Systems ist der Beweis der Sensitivität von Zellen aus retroviral induzierten Primärtumoren gegenüber Bestrahlung erforderlich. Außerdem ist es notwendig zu belegen, dass nach der Bestrahlung Tumorsubklone auswachsen, in denen bestimmte Integrationen mit einer Bestrahlungsresistenz korrelieren.

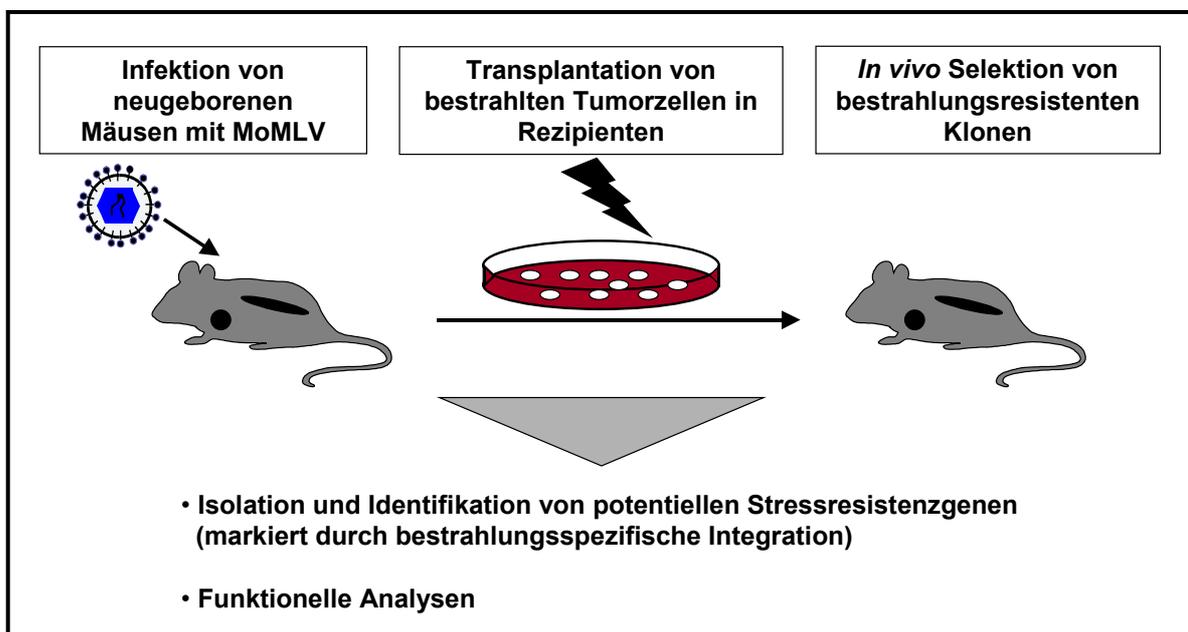


Abbildung 6 Übersicht über den Versuchsaufbau.

Für diese Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell gewählt, in dem das humane *c-MYC* Onkogen unter der Kontrolle von Ig λ Immunglobulin-Verstärkerelementen (*Enhancer*) exprimiert wird und das als Modell für Burkitt Lymphome gilt (Kovalchuk *et al.*, 2000). Da die Immunglobulin-Verstärkerelemente nur in B-Zellen aktiv sind, ist die Expression des *c-MYC* Gens auf diese Zellen beschränkt. Die Rolle des *c-MYC* Onkogens für humane Tumore wurde erstmals in Burkitt Lymphomen erkannt, in denen eine chromosomale Translokation das Gen unter die Kontrolle von Immunglobulin-*Enhancern* stellt (Blum *et al.*, 2004). Seitdem wurde die deregulierte Expression von *c-MYC* für eine Reihe hämatologischer und nicht-hämatologischer Neoplasien nachgewiesen (Grandori *et al.*, 2000; Marcu *et al.*, 1992; Sanchez-Beato *et al.*, 2003). Die für diese Arbeit verwendeten, heterozygoten, transgenen Mäuse entwickeln mit einer mittleren Latenzzeit von 100 Tagen aggressive, klonale B-Zelltumore in Lymphknoten und Milz, die sich durch eine hohe Anzahl mitotischer Zellen auszeichnen (Kovalchuk *et al.*, 2000). Für die Zucht wurden heterozygote, transgene Männchen mit C57BL/6 Wildtypweibchen verpaart. So wurden *c-MYC*- und Wildtypmäuse im Verhältnis 1:1 erhalten. Die Mäuse wurden innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt intraperitoneal mit 50 μ l MoMLV infiziert, wobei die Zahl der infektiösen Einheiten bei $1,6 \times 10^6$ /ml lag. Drei Wochen nach der Geburt wurden die Tiere genotypisiert und in der Folgezeit dreimal pro Woche auf das Auftreten von Krankheitssymptomen untersucht. Von besonderem Interesse war die Tumorentwicklung der E λ -*MYC* Mäuse, da noch nie gezeigt werden konnte, dass die Tumorentstehung durch Infektion mit einem Retrovirus und der daraus resultierenden Insertionsmutagenese beeinflusst wird. Des Weiteren erlaubt die parallele Infektion von Mäusen mit verschiedenen genetischen Hintergründen den direkten Vergleich von zwei Mausmodellen, nämlich dem Wildtypmodell und dem E λ -*MYC* Modell.

Infolge der Infektion entwickelten C57BL/6 Wildtypmäuse Lymphome mit einer Latenzzeit (Median) von 158 Tagen (Abbildung 7). Typischerweise konnte eine starke Vergrößerung der Milz, der Leber, der mesenterischen Lymphknoten und des Thymus beobachtet werden. Weitere Organe waren äußerst selten befallen. Die Analyse der Blutparameter zeigte, dass 20% der analysierten Mäuse ($n = 35$) normale Leukozytenzahlen (Lkz) aufwiesen ($2-10 \times 10^6$ Lkz/ml Blut), während bei allen anderen Mäusen eine leukämische Ausschwemmung beobachtet werden konnte (bis zu 128×10^6 Lkz/ml Blut). Als Mittelwert lagen $33,57 \times 10^6$ Lkz/ml Blut vor ($\pm 29,57$ Lkz/ml Blut). Der durchschnittliche Hämatokritwert der infizierten Tiere ($38,66\% \pm 10,1$) lag dabei knapp unterhalb der Normalwerte von 45-49% (Metcalf, 2005). Außerdem wurden angefärbte Blutaussstriche mikroskopisch untersucht. Dort war ersichtlich, dass es sich bei den leukämischen Zellen im peripheren Blut um Zellen lymphatischen Ursprungs handelte (nicht gezeigt).

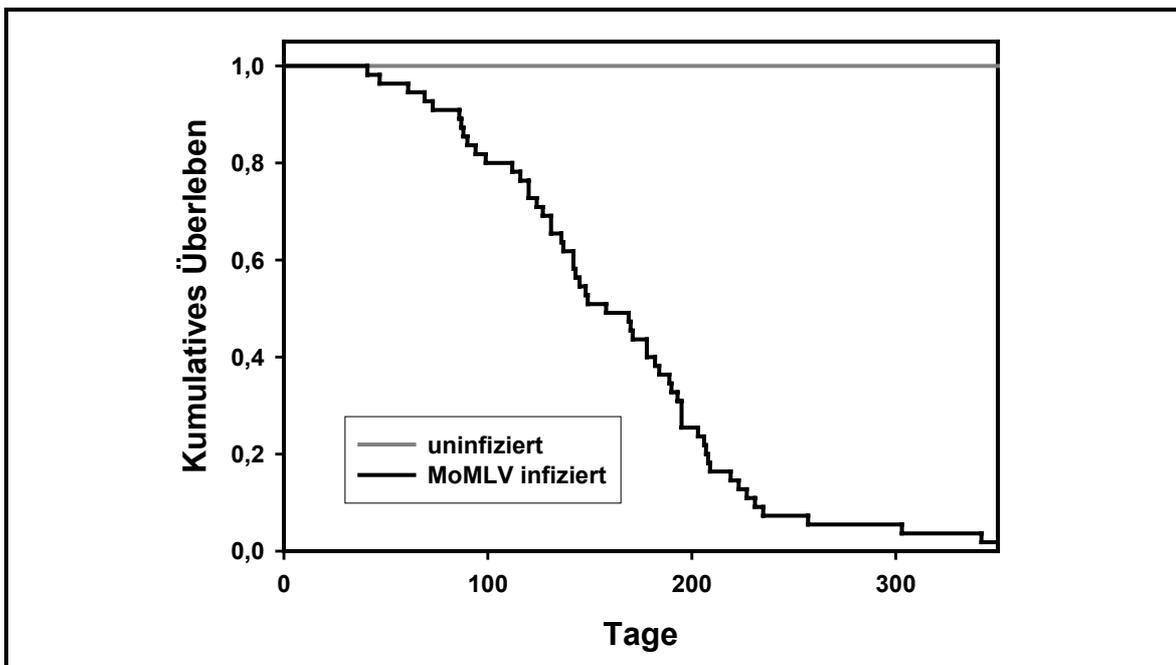


Abbildung 7 Infizierte Wildtypmäuse entwickeln Tumore mit einer Latenzzeit von 158 Tagen (Median). Dargestellt ist das kumulative Überleben von Mäusen gegen die Zeit (Tage). 55 Wildtypmäuse wurden nach der Geburt intraperitoneal mit MoMLV infiziert und nach Bildung von Tumoren geopfert und analysiert. Als Kontrolle dienten uninferzierte Wildtypmäuse.

Zur weiteren Charakterisierung der Tumore wurden die Tumorzellen aus der Milz oder den vergrößerten Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass verschiedene hämatopoetische Zelltypen während und nach der Differenzierung bestimmte Proteine auf der Oberfläche exprimieren, die von Antikörpern erkannt werden können. Die Analyse der Tumorzellen infizierter Wildtypmäuse ergab einen einheitlichen Phänotyp für alle analysierten Mäuse, der durch die Expression der T-Zell-typischen Oberflächenmoleküle CD90 und CD3e gekennzeichnet war, aber nicht die B-Zell-typischen Oberflächenmoleküle IgM und B220 zeigte (Abbildung 8). Typische Oberflächenmoleküle für Granulozyten (CD11b und Gr-1) wurden von den Tumorzellen nicht exprimiert. Es kann daher gefolgert werden, dass eine T-Zellerkrankung vorlag.

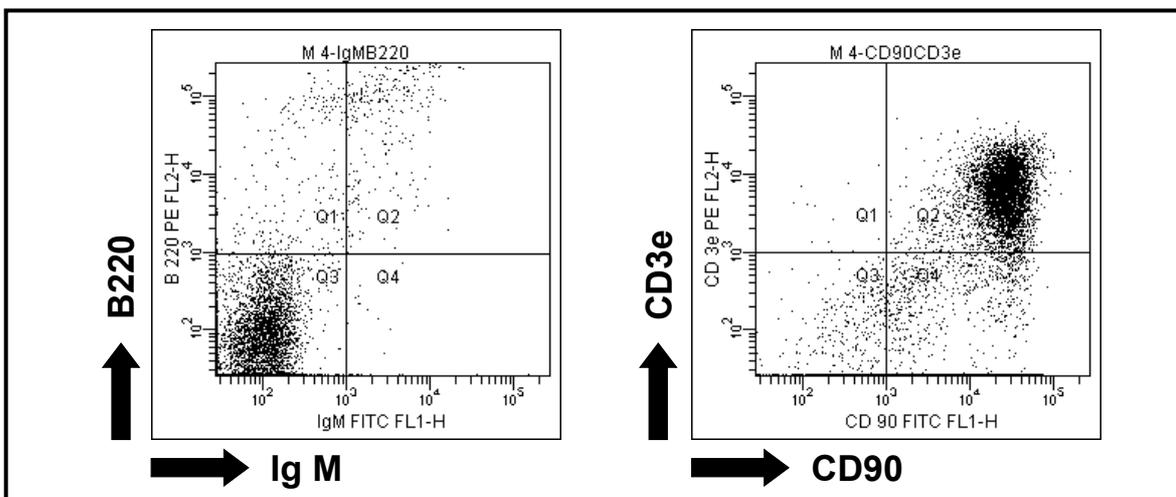


Abbildung 8 Infizierte Wildtypmäuse entwickeln T-Zelltumore. FACS-Analyse von Tumorzellen der Maus M 4. Eine Einzelzellsuspension wurde mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der gezeigte Tumor exprimierte die Oberflächenmoleküle CD90 und CD3e.

Transgene E λ -MYC Mäuse entwickelten nach Infektion Lymphome mit einer Latenzzeit von 49 Tagen (Median). Die Tumorgenese war also im Vergleich zu uninfizierten, transgenen Mäusen, bei denen die mittlere Latenzzeit bei 100 Tagen lag, deutlich beschleunigt (Abbildung 9). Als Begründung für die akzelerierte Tumorbildung lässt sich die durch integrierte provirale Elemente verursachte (In)Aktivierung von zellulären Genen anführen, deren Produkte mit c-MYC kooperieren. Diese Befunde zeigen erstmals, dass die Infektion von E λ -MYC Mäusen mit MoMLV die Tumorgenese beschleunigt und die Methode der Insertionsmutagenese in diesem Mausmodell angewendet werden kann.

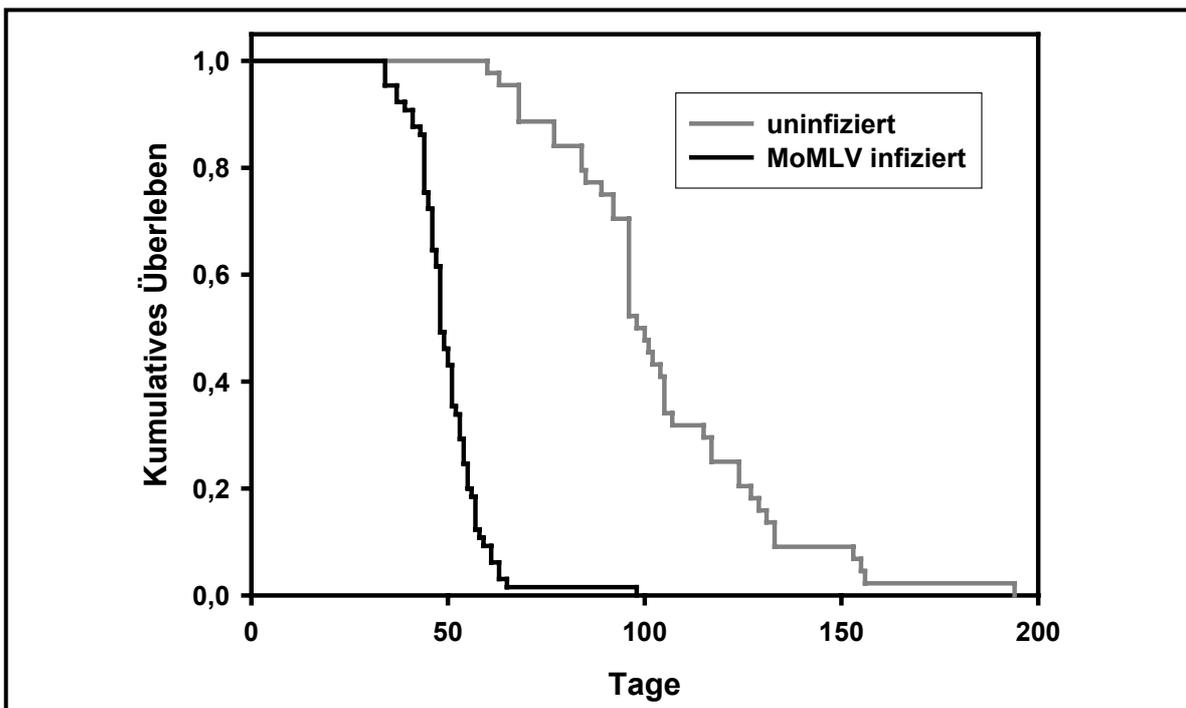


Abbildung 9 Infektion von E λ -MYC Mäusen akzeleriert die Tumorgenese. Dargestellt ist das kumulative Überleben von Mäusen gegen die Zeit (Tage). 65 transgene Mäuse wurden nach der Geburt intraperitoneal mit MoMLV infiziert und nach Bildung von Tumoren geopfert und analysiert. Transgene Mäuse entwickelten Tumore mit einer mittlere Latenzzeit von 100 Tagen (Median), während diese Latenzzeit bei infizierten Mäusen deutlich verkürzt war (49 Tage).

Die Tumore waren stets in allen Lymphknoten, der Milz und dem Thymus etabliert. Außerdem konnten in einigen Fällen Metastasen in anderen Organen wie den Nieren oder der Lunge beobachtet werden. Die Leber war im Gegensatz zu den T-Zelltumoren der Wildtypmäuse meist nur leicht vergrößert. Abbildung 10 zeigt beispielhaft die befallenen Organe. Die Analyse der Blutparameter zeigte, dass nur zwei der analysierten 43 Mäuse normale Leukozytenzahlen aufwiesen, während bei allen anderen Mäusen eine leukämische Ausschwemmung in verschiedenem Ausmaß beobachtet werden konnte (bis zu 358×10^6 Lkz/ml Blut). Im Mittel waren $113,92 \times 10^6$ Leukozyten/ml Blut vorhanden ($\pm 75,34$), was verdeutlicht, dass die Leukozytenzahl meist extrem stark erhöht war. Der durchschnittliche Hämatokritwert der infizierten Tiere ($43,2\% \pm 5,5$) lag dabei annähernd im Bereich der Normalwerte von 45-49%. Die mikroskopische Analyse von angefärbten Blutaussstrichen zeigte eine hohe Anzahl lymphatischer Zellen im peripheren Blut (nicht abgebildet). In einigen Fällen lag eine hohe Zahl undifferenzierter Zellen (Blasten) im Blut vor, in diesem Fall spricht man von einer akuten Leukämie.



Abbildung 10 Tumore in transgenen Mäusen. Abgebildet ist eine Maus mit Tumorentwicklung in allen lymphatischen Organen und einer leicht vergrößerten Leber (links). Im Vergleich dazu eine Kontrollmaus (rechts).

Die durchflusszytometrische Analyse der Tumorzellen (Abbildung 11) ergab, dass 54,16% der analysierten Tumore ($n = 24$) das B-Zell-typische Molekül B220 auf der Oberfläche exprimieren, aber nicht das Oberflächenimmunglobulin IgM. Das Oberflächenprotein B220 wird bei der Differenzierung von B-Zellen bereits in sehr frühen Stadien exprimiert, während IgM erst in späteren Stadien als Oberflächenmolekül exprimiert wird (Hardy und Hayakawa, 2001). Daher handelte es sich bei diesen Tumoren um Vorläufer B-Zell-lymphome. 33,3% der analysierten Tumore zeigten außer der Expression von B220 auch IgM als Oberflächenprotein und bestanden daher aus weiter differenzierten Zellen. Sie werden im Folgenden als B-Zelllymphome bezeichnet. Die verbleibenden 12,5% der Tumore wiesen Zellpopulationen beider Phänotypen auf. Typische Oberflächenproteine für T-Zellen (CD90 und CD3e) oder Granulozyten (CD11b und Gr-1) konnten bei keinem analysierten Tumor detektiert werden. Die fehlende Expression von IgM auf Tumorzellen in mehr als 50% der infizierten Mäuse korreliert nicht mit den publizierten Daten, nach denen die Lymphome der $E\lambda$ -MYC Mäuse stets IgM als Oberflächenprotein aufweisen (Kovalchuk *et al.*, 2000). Ein Grund könnte die Infektion der Mäuse mit MoMLV sein. Das Virus könnte vermehrt Vorläufer B-Zellen infizieren, wenn dieser Zellpool in den neugeborenen Mäusen durch die Expression von c-MYC stark vergrößert ist. Diese Möglichkeit ist jedoch unwahrscheinlich, da auch in uninfizierten, transgenen Mäusen Tumore gefunden wurden, die kein IgM auf der Oberfläche exprimierten. Allerdings wurden auch, entgegen der publizierten Daten, von den Autoren der Originalpublikation uninfizierte, transgene Mäuse mit einem IgM-negativen Phänotyp gefunden (G.W. Bornkamm, persönliche Kommunikation).

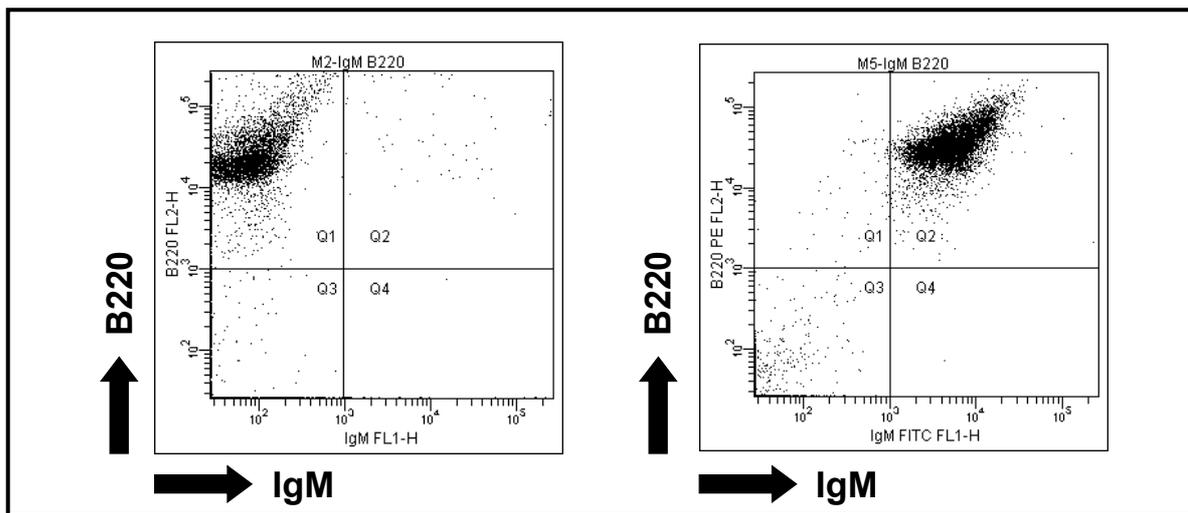


Abbildung 11 Infizierte Mäuse entwickelten B-Zelltumore mit verschiedenen Phänotypen. FACS-Analyse von Tumorzellen aus zwei verschiedenen Mäusen. Eine Einzelzellsuspension wurde mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet sind rechts der B-Zell- (M 5) und links der Vorläufer B-Zellphänotyp (M 2).

2. Tumorzellen sind sensitiv gegenüber γ -Strahlung

Zur Überprüfung der Schadensantwort von Tumorzellen auf genotoxischen Stress wurde getestet, ob die Tumorzellen durch Bestrahlung mit γ -Strahlen in Apoptose gehen, da dies die übliche Art des Zelltods nach schweren genotoxischen Schäden ist (Gudkov und Komarova, 2003). Dazu wurden Merkmale der Apoptose in primären Tumorzellen nach Bestrahlung überprüft. Retroviral induzierte Primärtumore wurden aus E λ -MYC Mäusen entfernt, eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Tumorzellen nach Bestrahlung mit 6,85 Gy in B-Zellmedium kultiviert. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen. Nach drei Stunden wurden die Zellen geerntet und für die Analysen aufgearbeitet.

Im apoptotischen Prozess erfolgt die Eliminierung von Zellen durch den gesteuerten Abbau von Proteinen und DNA (Danial und Korsmeyer, 2004). Ein wichtiger Faktor ist hierbei die Protease Caspase 3, die nach der Induktion des apoptotischen Programms durch proteolytische Spaltung aus dem Proenzym Procaspase 3 gebildet wird (Lavrik *et al.*, 2005). Kann die aktivierte Caspase 3 mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden, ist dies ein deutliches Indiz, dass in den Zellen der intrinsische apoptotische Signalweg aktiviert ist. Ein weiteres wichtiges Kennzeichen für apoptotische Zellen ist die Caspase aktivierte Endonuklease CAD (Wyllie, 1980). Diese schneidet die genomische DNA zwischen den Nukleosomen und erzeugt Fragmente von 180 bp Länge oder einem Vielfachen davon, die in der Gelelektrophorese der DNA als sogenannte apoptotische Leitern nachgewiesen werden können (*DNA laddering*).

Abbildung 12A zeigt die Analyse von drei unterschiedlichen Tumoren. Es wurden dabei für alle Proben gleiche DNA-Mengen auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Direkt nach der Entnahme konnte keine Fragmentierung der DNA beobachtet werden. Die deutlich schwächeren Banden in diesen Proben kamen zustande, da ein Teil der hochmolekularen DNA bei der Elektrophorese in den Taschen des Gels verblieben war. Drei Stunden nach Bestrahlung konnten deutliche apoptotische Leitern

detektiert werden, die sehr viel ausgeprägter waren als die Leitern nach drei Stunden Kultivierung ohne Bestrahlung. Dies zeigt, dass die Tumorzellen vor allem nach Bestrahlung eine aktivierte Endonuklease haben. Zum Nachweis der aktivierten Caspase 3 wurde ein Antikörper verwendet, der nur die aktive Form der Protease erkennt. Abbildung 12B zeigt exemplarisch die Analyse von zwei Tumoren. Aktivierte Caspase 3 war in diesen Tumoren nach Bestrahlung deutlich zu erkennen, während sie ohne Bestrahlung in sehr viel geringeren Mengen in den Zellen vorlag und direkt nach der Entnahme nicht detektiert werden konnte. Der Nachweis von Aktin diente als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels.

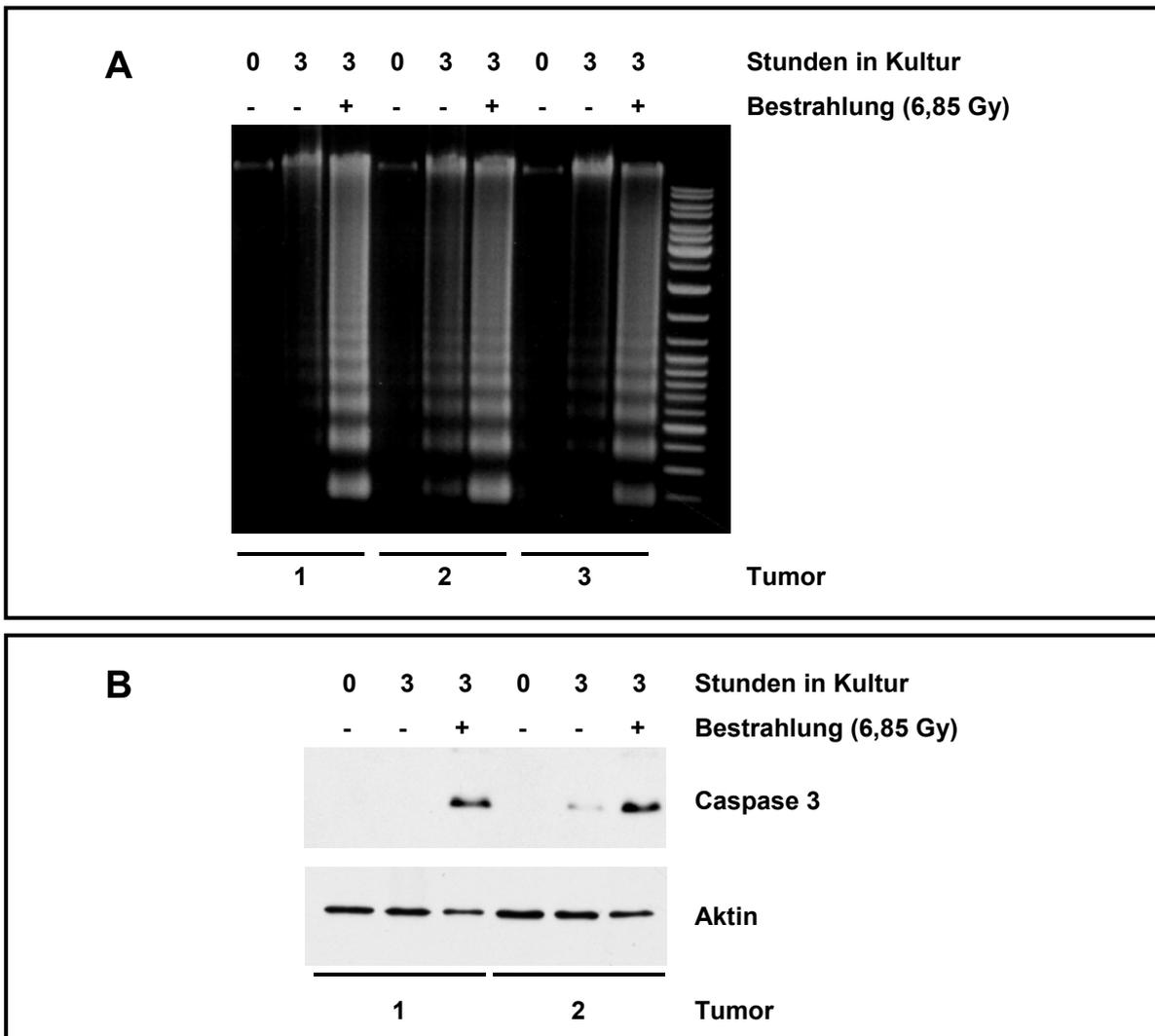


Abbildung 12 Tumorzellen gehen nach Bestrahlung in Apoptose. A) Nachweis der DNA-Fragmentierung. Tumorzellen wurden entnommen und für drei Stunden kultiviert (unbestrahlt und nach Bestrahlung). DNA wurde isoliert und auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Gezeigt sind drei verschiedene Tumore (1-3), in denen drei Stunden nach Bestrahlung deutliche apoptotische Leitern sichtbar waren (Spur 3, 6 und 9). **B)** Western-Blot zum Nachweis aktivierter Caspase 3. Tumorzellen wurden entnommen, Zellen mit und ohne Bestrahlung wurden für den angegebenen Zeitraum kultiviert und für die Western-Blot-Analyse aufbereitet. Gezeigt sind zwei verschiedene Tumore. Drei Stunden nach Bestrahlung war eine Aktivierung von Caspase 3 erkennbar, während ohne Bestrahlung nur eine extrem schwache Aktivierung der Caspase 3 in Tumor 2 zu sehen war. Der Nachweis von Aktin zeigte die gleichmäßige Beladung des Gels.

Diese Befunde zeigen, dass primären Tumorzellen aus E λ -MYC Mäusen nach γ -Bestrahlung beide überprüften apoptotischen Merkmale ausprägen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Tumorzellen nach Bestrahlung durch Apoptose eliminiert werden.

Es sollte als nächstes bestimmt werden, wie viele Zellen nach der Bestrahlung zur Tumorbildung befähigt waren. Dazu wurden Tumorzellen entnommen und eine serielle Verdünnung (5×10^6 bis 1×10^2 Zellen) dieser Zellen intraperitoneal in C57BL/6 Rezipienten (drei Mäuse je Verdünnungsstufe) injiziert. Außerdem wurden 5×10^6 Zellen nach Bestrahlung (6,85 Gy) in eine zweite Kohorte von acht Mäusen transplantiert.

Abbildung 13 macht deutlich, dass im Fall der unbestrahlten Zellen die Latenzzeit der Tumorentwicklung länger war, je weniger Zellen injiziert wurden. Mäuse, die 5×10^6 Tumorzellen erhalten hatten, entwickelten innerhalb von 14 Tagen Tumore, während Mäuse, die 1×10^2 Tumorzellen erhalten hatten, erst nach 26 bzw. 28 Tagen Tumore bildeten. Die Latenzzeit der Tumorgenese nach Transplantation von 5×10^6 bestrahlten Zellen war in allen Fällen länger und lag zwischen 29 und 58 Tagen. Daraus kann gefolgert werden, dass von den 5×10^6 Zellen weniger als 100 die Bestrahlung überlebt hatten. Dieser Versuch wurde mit ähnlichen Ergebnissen mit drei unabhängigen Primärtumoren durchgeführt.

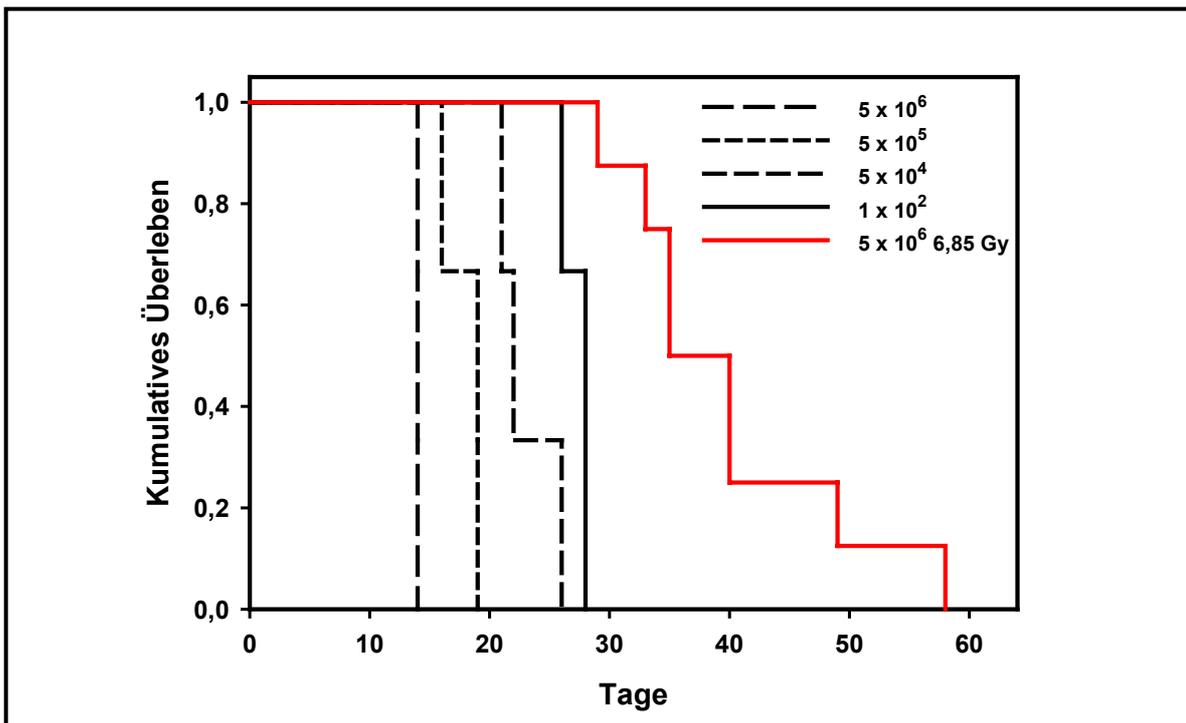


Abbildung 13 Elimination von mehr als 99% der Tumorzellen durch Bestrahlung. Dargestellt ist das kumulative Überleben von Mäusen gegen die Zeit (Tage). Je drei Mäuse pro Verdünnungsstufe wurde die angegebenen Anzahl Tumorzellen intraperitoneal transplantiert. Acht Mäuse erhielten 5×10^6 mit 6,85 Gy bestrahlte Zellen (rot).

Die Befunde belegen, dass nur wenige Zellen die Bestrahlung mit der gewählten Dosis überleben, während ein Großteil der Zellen durch Apoptose eliminiert wird.

3. Evaluation von Integrationsstellen nach Bestrahlung

In einem durch retrovirale Insertion induzierten Tumor haben bestimmte Integrationsereignisse eine infizierte Zelle soweit entartet, dass die Zelle einen Selektionsvorteil hat und als Zellklon expandiert. Die Transformation findet durch die Insertion der Proviren in für die Zelle funktionell wichtige Gene und deren hierdurch bedingte Aktivierung oder Inaktivierung statt. Dies führt letztendlich zur Ausbildung eines Tumors, der aus den sich rasant vermehrenden, identischen Nachkommen einer transformierten Zelle besteht. Oligo- bzw. polyklonale Tumore bestehen aus mehreren parallel ausgewachsenen Einzeltumoren.

Zur Evaluation von Überlebensmechanismen der durch Insertionsmutagenese erhaltenen Tumorzellen wurden mit MoMLV infizierte Mäuse mit Tumoren getötet und eine Einzelzellsuspension dieser Primärtumore hergestellt. Zur Induktion von Apoptose wurden diese Zellen mit γ -Strahlung bestrahlt und anschließend intraperitoneal in C57BL/6 Mäuse transplantiert. Das Auswachsen eines bestimmten Subklons zum Sekundärtumor nach der Bestrahlung und Transplantation zeigt, dass die Zellen dieses Klonen einen Überlebensvorteil haben. Wenn ein integriertes Provirus durch die (In)Aktivierung eines zellulären Gens kausal dafür verantwortlich ist, ist zu erwarten, dass in unabhängigen Experimenten nach Transplantation und Bestrahlung Subklone zu Sekundärtumoren auswachsen, die durch dieselben Integrationsstellen gekennzeichnet sind. Als Kontrolle erfolgte dementsprechend die Transplantation von unbestrahlten Zellen in eine zweite Mauskoorte. In den Sekundärtumoren dieser Kohorte sollte theoretisch ein Integrationsereignis, das durch Deregulation zellulärer Gene einen Überlebensvorteil nach Bestrahlung vermittelt, nicht unbedingt zu detektieren sein bzw. sollten auch Subklone mit Integrationsstellen auswachsen, die keinen Überlebensvorteil nach Bestrahlung haben. Neue Integrationsstellen in Sekundärtumoren, die in retroviral induzierten Primärtumoren nicht detektierbar waren, können prinzipiell durch zwei unterschiedliche Ereignisse zustande kommen. Zum einen können bereits existierende Tumorsubklone auswachsen und zum anderen können neue Integrationsereignisse stattgefunden haben.

Für die Versuche wurden die Mäuse nach der Transplantation von Tumorzellen dreimal wöchentlich auf das Auftreten von Krankheitssymptomen untersucht und nach der Entwicklung von Sekundärtumoren getötet. Nach der Isolation genomischer DNA aus den Tumoren wurden mittels Southern-Blot-Analyse die Integrationsmuster des Primärtumors und der Sekundärtumore mit und ohne Bestrahlung verglichen, um die oben dargelegte Hypothese zu überprüfen.

3.1 Die Transplantation von bestrahlten Tumorzellen infizierter Wildtypmäuse führt nicht zum Auswachsen von Klonen mit bestrahlungsspezifischen Integrationen

Um zu bestimmen, ob nach der Transplantation und Bestrahlung Subklone mit spezifischen Integrationsstellen auswachsen, wurde Tumor-DNA mit dem Enzym *BglII* gespalten, das außerhalb des von der Mo-*env* Sonde detektierbaren Bereichs des Provirus schneidet. Diese geschnittene DNA wurde anschließend im Southern-Blot-Verfahren mit einer Sonde gegen die MoMLV *env*-Sequenz analysiert. Abhängig von der Lage der

zweiten Schnittstelle im Wirtsgenom und somit vom Integrationsort, werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe generiert. Die Schärfe der Banden und ihre Intensität lassen Rückschlüsse auf die Häufigkeit der jeweiligen Integrationsereignisse zu. Das heißt, je intensiver eine Bande ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Integrationen in allen Tumorzellen vorliegt. In Abbildung 14 ist eine exemplarische Southern-Blot-Analyse eines Transplantationsexperiments mit einem T-Zelltumor abgebildet. Es ist ersichtlich, dass die mit einer Sonde gegen die MoMLV *env*-Sequenz detektierten Banden dieselbe Intensität innerhalb eines Tumors zeigten. Die intensiver erscheinende Bande in der Blotmitte repräsentiert wahrscheinlich mehrere Banden mit der gleichen Größe. Außerdem zeigten alle aus dem Primärtumor M 99 entstandenen bestrahlten Sekundärtumore (RM 100 – RM 106) exakt das gleiche Integrationsmuster wie der parentale Tumor (M 99). Diese Befunde belegen, dass die Tumore aus einem Zellklon bestanden, also monoklonal waren.

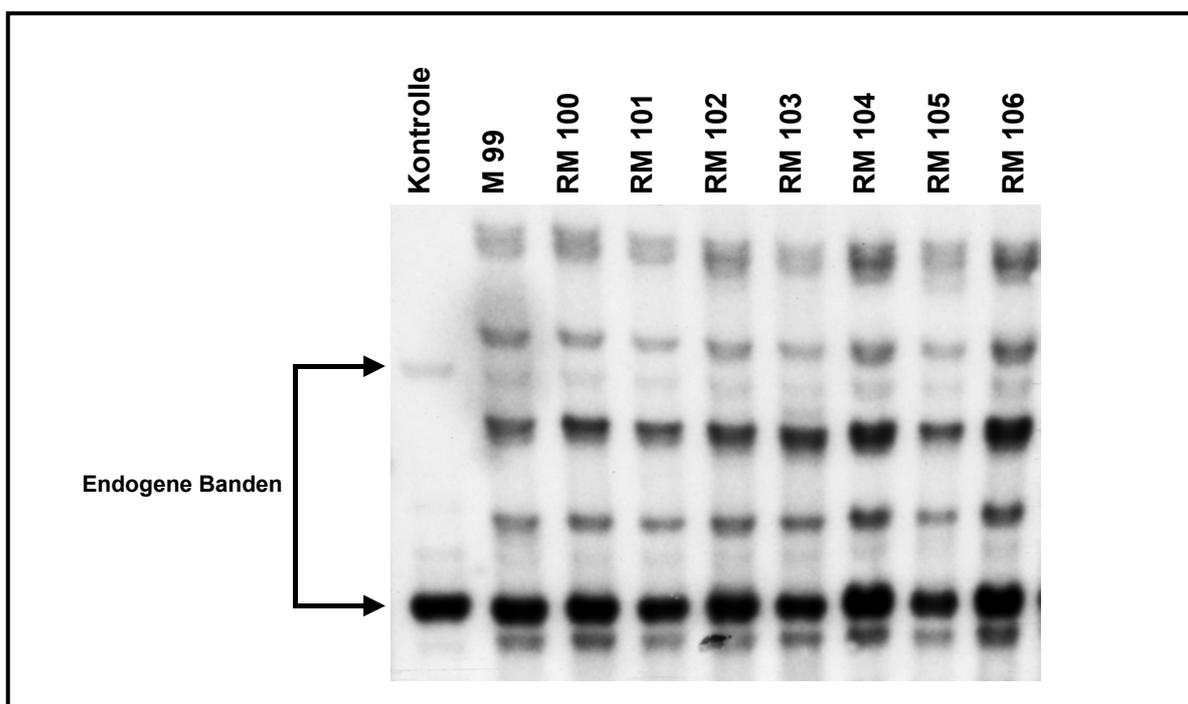


Abbildung 14 In Tumoren von Wildtypmäusen konnten nach Bestrahlung keine neuen Integrationsstellen detektiert werden. Southern-Blot-Analyse von einem T-Zelltumor (M 99) und den dazugehörigen bestrahlten Sekundärtumoren (RM 100 – 106). Genomische DNA von Primär- und Sekundärtumoren wurde mit *BglII* geschnitten, auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Integrationsstellen wurden mit einer Sonde gegen die MoMLV *env*-Sequenz detektiert. Als Kontrolle diente genomische Milz-DNA einer uninfizierten Wildtypmaus. Alle Sekundärtumore zeigten das gleiche Integrationsmuster wie der Primärtumor. Die dicker erscheinende Bande in der Mitte des Southern-Blots repräsentiert wahrscheinlich mehrere Banden mit der gleichen Größe und ist daher intensiver.

Nur in einem von vier Experimenten wuchsen nach der Transplantation von Tumorzellen Subklone mit neuen Integrationsstellen im Vergleich zum parentalen Tumor aus. In diesem einen Fall waren die Integrationsmuster in allen Sekundärtumoren, unabhängig von der Bestrahlung, gleich. Da jedoch das Auswachsen von Subklonen mit einem veränderten Integrationsmuster nach Bestrahlung in dem gewählten Ansatz eine Grundvoraussetzung ist und die Integration in der Hypothese als Markierung potentieller Überlebensgene dient, wurde von der Arbeit mit dem Wildtypmodell abgesehen.

3.2 Die Transplantation von bestrahlten Tumorzellen infizierter E λ -MYC Mäuse führt zum Auswachsen von Klonen mit bestrahlungsspezifischen Integrationen

Abbildung 15 zeigt exemplarisch, dass in Southern-Blot-Analysen von Tumoren infizierter E λ -MYC Mäuse Banden von deutlich unterschiedlicher Intensität detektiert wurden. Dieser Befund belegt, dass mehrere Zellpopulationen in den Tumoren existierten (Oligoklonalität). Außerdem ist im Primärtumor (M 94) ein starker Hintergrund zu erkennen. Dieses Phänomen konnte in allen retroviral induzierten Primärtumoren der E λ -MYC Mäuse beobachtet werden und ist bedingt durch ihre Polyklonalität. In diesen Tumoren lagen zahlreiche Zellpopulationen vor, von denen lediglich die größten gut detektiert werden konnten und daher im Southern-Blot als klar definierte Banden sichtbar waren, während die kleineren Populationen für den Hintergrund verantwortlich waren. Dieser Hintergrund war in allen Sekundärtumoren deutlich geringer. Der Befund lässt auf die Selektion von Subklonen sowohl durch die Transplantation als auch durch die Transplantation und Bestrahlung schließen.

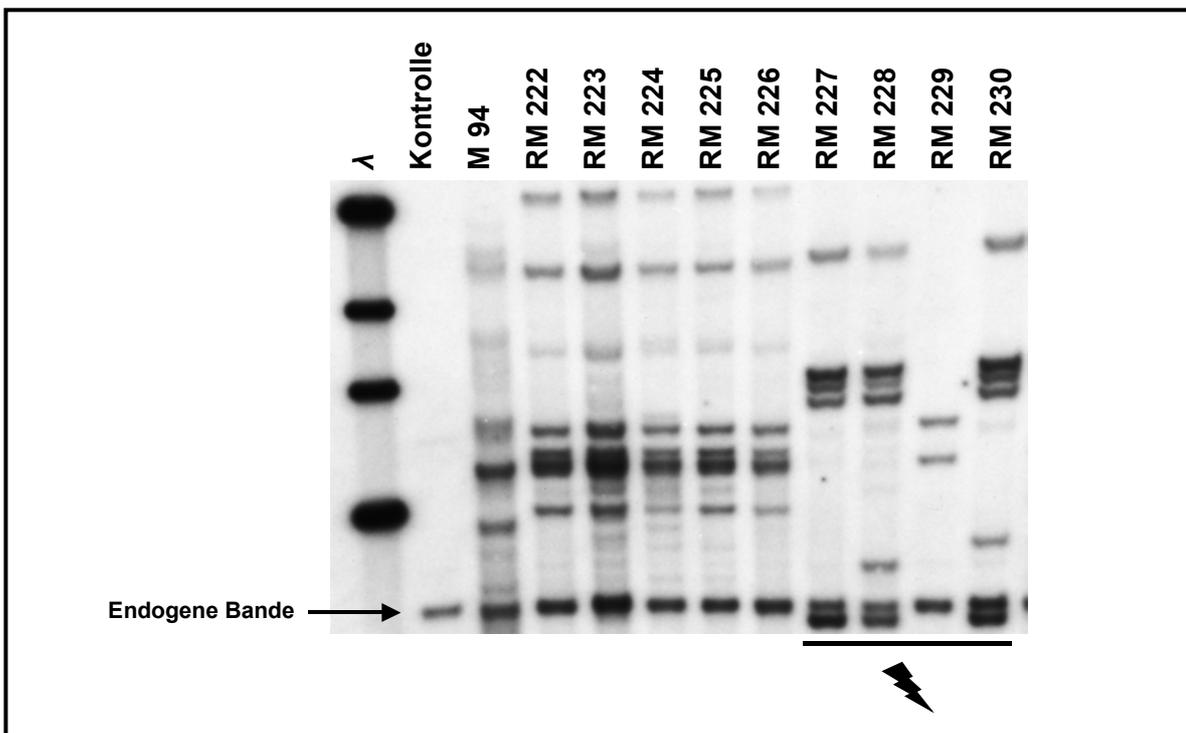


Abbildung 15 Neue Integrationsstellen nach Bestrahlung und Transplantation. Southern-Blot-Analyse von einem B-Zell-tumor. Genomische DNA von einem Primärtumor (M 94) und den daraus nach Transplantation entstandenen Sekundärtumoren (RM 222 – RM 230) wurde mit *BglIII* geschnitten und auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Integrationsstellen wurden mit einer Sonde gegen die MoMLV *env*-Sequenz detektiert. Als Kontrolle diente Tumor-DNA einer uninfizierten, transgenen Maus. Sekundärtumore, die sich aus bestrahlten Tumorzellen entwickelt haben, sind durch einen Blitz gekennzeichnet. λ: Größenstandard (mit *HindIII* geschnittenen λ DNA). Sekundärtumore aus bestrahlten Tumorzellen eines Primärtumors zeigen ein deutlich anderes Integrationsmuster als Sekundärtumore aus unbestrahlten Tumorzellen.

In dem abgebildeten Southern-Blot ist erkennbar, dass die Sekundärtumore (RM 227 – RM 230), die sich aus bestrahlten Tumorzellen des Primärtumors M 94 entwickelt hatten, ein anderes Integrationsmuster aufwiesen, als die Sekundärtumore (RM 222 – 226), die sich aus unbestrahlten Zellen des Primärtumors entwickelt hatten. Als Kontrolle diente

DNA aus einem Tumor einer uninfizierten, transgenen Maus. Im Kontrolltumor ist nur eine Bande sichtbar (endogene Bande) die ein replikationsin kompetentes Retrovirus im Mausgenom repräsentiert. Endogene retrovirale Sequenzen sind vererbbar und stammen aus Integrationen in Keimzellen (Jonkers und Berns, 1996). Die Anzahl der mit der verwendeten Sonde detektierbaren ökotropen, endogenen Viren ist für die verschiedenen Mausstämme unterschiedlich. Im C57BL/6 Stamm, der als Zuchthintergrund für die transgenen Eλ-MYC Mäuse diente, liegt eine einzelne dieser Sequenzen vor (Jenkins *et al.*, 1982), die hier in der Kontrolle sichtbar ist.

Auch in weiteren Experimenten konnte in Sekundärtumoren, die aus bestrahlten Primärtumorzellen entstanden waren, eine Veränderung des Integrationsmusters im Vergleich zu Sekundärtumoren aus unbestrahlten Zellen beobachtet werden. Dies zeigte sich im Auftreten einzelner oder mehrerer neuer Integrationen bzw. deren Verlust im Vergleich zu unbestrahlten Tumoren. Insgesamt wurden Zellen aus zehn unabhängigen Primärtumoren in Empfänger transplantiert. In 6/10 Fällen war in den Sekundärtumoren eine Veränderung des Integrationsmusters sichtbar, die aber nicht ausschließlich nach Bestrahlung auftrat. In 4/10 Fällen konnten Veränderungen ausschließlich nach Bestrahlung beobachtet werden. Diese Befunde belegen, dass in dem Eλ-MYC Modell die Voraussetzung der zugrundeliegenden Hypothese, nämlich das Auftreten neuer Integrationsstellen nach Bestrahlung, tatsächlich erfüllt war. Alle folgenden Analysen wurden daher mit diesem Mausmodell durchgeführt.

4. Sekundärtumore, die sich aus bestrahlten Primärtumorzellen entwickelt haben, sind resistent gegen Bestrahlung

Es stellte sich die Frage, ob durch die Bestrahlung Zellen selektioniert wurden, die bestrahlungsresistent waren, und damit zu Tumoren auswuchsen, bei denen dann alle Zellen diese Resistenz aufwiesen.

Hierzu wurde eine Zellsuspension aus Sekundärtumoren hergestellt und eine Menge von 5×10^5 Zellen zur Bildung von Tertiärtumoren intraperitoneal in C57BL/6 Rezipienten injiziert. Die Zahl der transplantierten Zellen lag dabei eine Zehnerpotenz niedriger als bei den Versuchen zur Sekundärtumorbildung, um Unterschiede in der Latenzzeit besser ausmachen zu können. Drei bis fünf Mäuse erhielten jeweils unbestrahlte Zellen und drei bis fünf Mäuse mit 6,85 Gy bestrahlte Zellen aus Sekundärtumoren. Werden durch die Bestrahlung Zellen selektioniert, die bestrahlungsresistent sind und wachsen diese Zellen dann zu einem Sekundärtumor aus, sollte sich bei der Tertiärtumorbildung aufgrund der bereits in allen Zellen vorhandenen Resistenz die Latenzzeit mit und ohne Bestrahlung nur geringfügig unterscheiden. In der Theorie werden ohne Bestrahlung der Primärtumorzellen keine bestrahlungsresistenten Zellen bei der Sekundärtumorbildung selektioniert, daher sollte bei der Tertiärtumorbildung die Latenzzeit nach Bestrahlung deutlich länger sein. Abbildung 16 verdeutlicht schematisch diesen Versuchsansatz.

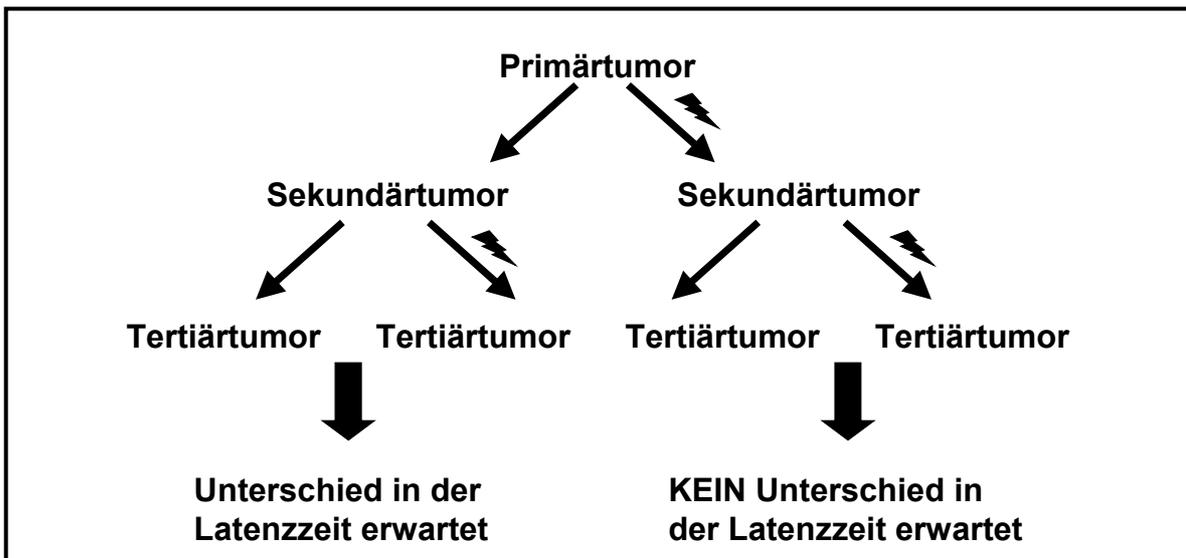


Abbildung 16 Schema zum Testen der Bestrahlungsresistenz. Der Blitz zeigt, welche Tumorzellen bestrahlt wurden.

Abbildung 17 zeigt das Überleben von Mäusen mit Tertiärtumoren. Die Abbildung fasst die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten zusammen, das heißt die wiederholte Transplantation von fünf unabhängigen Primärtumoren. Es wird deutlich, dass die oben beschriebenen Annahmen tatsächlich zutreffen. Die mediane Latenzzeit der Tertiärtumorbildung nach Bestrahlung von Sekundärtumorzellen, die sich aus bestrahlten Primärtumorzellen entwickelt hatten, lag deutlich näher an der von unbestrahlten Kontrollen als dies für Tertiärtumore aus bestrahlten Sekundärtumorzellen, die sich aus unbestrahlten Primärtumoren entwickelt hatten, der Fall war. Sieben aus 17 Mäusen, die bestrahlte Tumorzellen aus unbestrahlten Sekundärtumoren erhalten hatten, entwickelten keine Tumore. Dies zeigt, dass durch die Bestrahlung Zellen selektioniert wurden und zu Sekundärtumoren auswuchsen, die eine Bestrahlungsresistenz aufwiesen. Dennoch gibt es auch in der Kontrollgruppe Tertiärtumore, die sich schnell aus bestrahlten Tumorzellen bildeten (Latenzzeit <30 Tage). Dies spricht dafür, dass auch die Transplantation an sich Zellen selektionieren kann, die besser an Stress adaptiert sind.

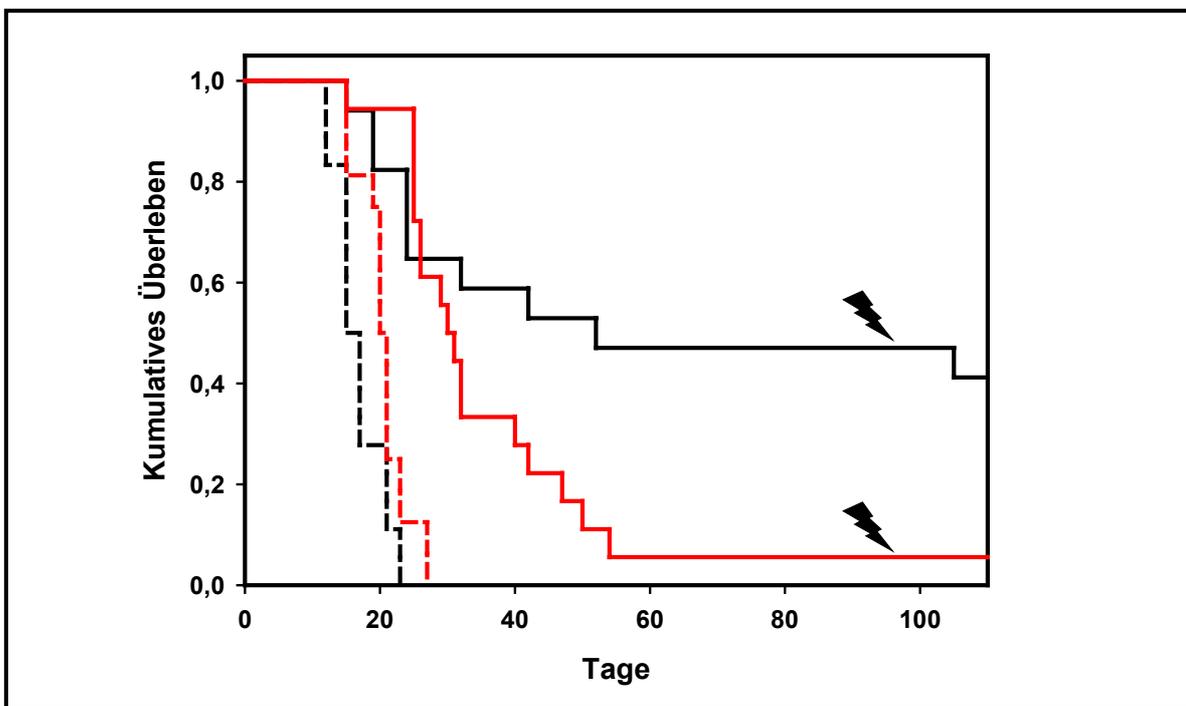


Abbildung 17 Sekundärtumore aus bestrahlten Tumorzellen sind strahlenresistent. Dargestellt ist das kumulative Überleben von Mäusen mit Tertiärtumoren gegen die Zeit (Tage). Bestrahlte (dargestellt mit einem Blitz) oder unbestrahlte Tumorzellen aus Sekundärtumoren wurden intraperitoneal in Rezipienten transplantiert und das Überleben dieser Mäuse überwacht. Die schwarzen Linien zeigen das Überleben von Mäusen mit Tertiärtumoren aus unbestrahlten Sekundärtumoren, die roten Linien zeigen das Überleben von Mäusen mit Tertiärtumoren aus bestrahlten Sekundärtumoren. Diese beiden Kurven der Tumorentwicklung liegen deutlich dichter zusammen als die Kurven der Tertiärtumbildung aus unbestrahlten Sekundärtumoren.

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass aus bestrahlungssensitiven Tumoren von $E\lambda$ -MYC Mäusen durch Bestrahlung Zellen selektiert wurden, die eine Stressresistenz und, verglichen mit unbestrahlten Kontrolltumoren, ein verändertes Integrationsmuster auswiesen. Dies zeigt, dass ein geeignetes Modellsystem etabliert werden konnte, das alle Grundbedingungen (bestrahlungsresistente Tumore mit einem spezifischen Integrationsmuster) für weitere Untersuchungen erfüllte. Im Folgenden soll untersucht werden, ob diese Tumore Integrationsstellen tragen, die häufiger oder ausschließlich in bestrahlten Tumoren zu finden sind. Tritt die Integration in einem Locus in mehreren, unabhängig erzeugten, bestrahlten Tumoren auf, nicht aber in unbestrahlten, ist dies ein Indiz dafür, dass durch die Integration ein zelluläres Gen aktiviert/inaktiviert wurde, das für die Stressresistenz verantwortlich sein könnte.

5. Identifikation von Integrationsstellen

Zur Identifikation der Integrationsstellen von bestrahlten Sekundärtumoren wurde die LM/EPTS-PCR angewendet. Mit dieser Methode konnten zahlreiche Integrationsstellen identifiziert werden. In Tabelle 4 ist eine Übersicht über alle *common integration sites* (CIS) gegeben, die in den analysierten Tumoren detektiert wurden. Außerdem ist aufgeführt, wie häufig diese CIS in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden. In zwei Datenbanken, in denen die Ergebnisse vieler Publikationen zur Identifikation von Integrationsorten in verschiedenen Mausmodellen zusammengefasst sind (<http://www.nki>.

nl/protagdb/ mit 37 verschiedenen Integrationsorten und <http://genome2.ncicfcrf.gov/RTCGD> mit 339 verschiedenen CIS (Akagi *et al.*, 2004)) kann determiniert werden, ob es sich bei einem Locus um eine CIS handelt. Tabelle 5 im Anhang zeigt eine Auflistung aller 76 Loci mit Integration, die in dieser Arbeit identifiziert wurden. Hier sind alle bekannten Gene in 100 kb Entfernung zu der jeweiligen Integrationsstellen angegeben. Dieses große genomische Fenster wurde gewählt, da Studien gezeigt haben, dass retrovirale Insertionen Gene betreffen können, die sehr weit vom Integrationsort entfernt sind (Lazo *et al.*, 1990).

Tabelle 4 Übersicht über die identifizierten CIS. Die bekannten CIS mit Angabe, auf welchem Chromosom (Chr) sie sich befinden und wie häufig sie identifiziert wurden (Anz.). Außerdem ist mit Referenz angegeben, ob diese Integration bereits in transgenen *c-MYC* Mäusen gefunden wurde. Gadd45 β ist grau hinterlegt, da dieser Locus bisher nicht als retroviraler Integrationsort bekannt war.

Locus	(Vermutlich) betroffenes Gen/Protein	Chr	Anz.	MYC	Referenz
Bmi1	Polycomb-Komplex Protein BMI-1	2	4	+	(Haupt <i>et al.</i> , 1991; van Lohuizen <i>et al.</i> , 1991)
Ahi1	<i>Abelson helper integration site 1</i>	10	3	+	(Poirier <i>et al.</i> , 1988)
Pim2	Serin/Threonin-Kinase	x	3	+	(van der Lugt <i>et al.</i> , 1995)
Bcl2l1	Apoptose-Regulator Bcl-x _L	2	2	-	
Mcl1	EAT/MCL-1 Protein	3	2	+	(Mikkers <i>et al.</i> , 2002)
Runx3	Runt Transkriptionsfaktor 3	4	2	-	
Gadd45β	<i>Growth arrest and DNA damage inducible protein β</i>	10	2	-	
Zfhx1b	Zinkfinger Homeobox Protein 1b	2	1	+	(Mikkers <i>et al.</i> , 2002)
Sfpi1	Transkriptionsfaktor PU.1	2	1	-	
Rasgrp1	<i>RAS Guanyl releasing protein 1</i>	2	1	+	(Mikkers <i>et al.</i> , 2002)
Gfi1	<i>growth factor independence</i>	5	1	+	(van Lohuizen <i>et al.</i> , 1991)
Ptpn6	Tyrosin-Phosphatase	6	1	-	
Plekha2	Protein mit Pleckstrin-Homologie Domäne	8	1	-	
Trp53	Tumor Suppressor p53	11	1	-	
Pps	Inositol-Phosphatase	11	1	-	
Pim1	Serin/Threonin-Kinase	17	1	+	(Cuypers <i>et al.</i> , 1984)

Für den Großteil der identifizierten CIS wurde bereits nachgewiesen, dass in diesen Loci mit *c-Myc* kooperierende Onkogene lokalisiert sind (Tabelle 4), wodurch die wichtige Rolle der betroffenen Gene bei der Tumorgenese belegt wird. Vier der betroffenen Gene, *Bmi1*, *Runx3*, *Pim1* und *Pim2*, kooperieren wahrscheinlich mit *c-Myc*, indem ihre Produkte die *c-Myc*-induzierte Apoptose verhindern. Die Kooperation von *Bmi1*, einem Mitglied der Polycomb-Gruppe transkriptioneller Repressoren, mit *c-MYC* in der Tumorgenese konnte auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass *Bmi1* die *c-MYC*-induzierte Apoptose durch

negative Regulation von p19^{ARF} inhibiert (Jacobs *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus verhindert aber nicht die durch Bestrahlung induzierte Apoptose. Der Mechanismus, durch den die Serin/Threonin-Kinasen Pim1 und Pim2 c-Myc induzierte Apoptose inhibieren ist weniger gut verstanden. Für Pim2 konnte belegt werden, dass diese Kinase das proapoptotische Protein Bad phosphorylieren kann und so dessen Aktivität einschränkt (Fox *et al.*, 2003). Durch Southern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass sieben aus 31 Primärtumore eine Integration im *Pim1* Locus trugen (Daten nicht gezeigt). Daraus kann gefolgert werden, dass Tumorsubklone mit dieser Integrationsstelle nicht erst durch die Bestrahlung selektioniert werden. Die Rolle von Runx3 und den verwandten Proteinen Runx1 und Runx2 während der Tumorgenese ist gut beschrieben. Kontrovers diskutiert werden allerdings noch die gleichzeitigen Funktionen als Onkogene und als Tumorsuppressoren (Blyth *et al.*, 2005). Neuere Studien lassen vermuten, dass auch die Runx Proteine eine anti-apoptotische Aufgabe erfüllen, dies scheint aber abhängig vom Zellkontext zu sein (Abe *et al.*, 2005; Blyth *et al.*, 2006). Da diese Proteine die c-Myc induzierte Apoptose inhibieren und auch in Primärtumoren gefunden werden können, werden die Loci in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert.

Die mit *c-Myc* kooperierenden Onkogene *Ahi1* und *Gfi1*, welche in drei bzw. in einem Tumorsatz als Integrationsort gefunden wurden, konnten ebenfalls schon in Primärtumoren identifiziert werden (*Ahi1* 2/31, *Gfi1* 6/31). Es ist auch für diese Gene daher unwahrscheinlich, dass Tumorsubklone mit dieser Integrationsstelle erst durch die Bestrahlung selektioniert wurden. Auch Integrationen im *Rasgrp1* Locus waren nicht bestrahlungsspezifisch (Abbildung 18). Die Integration in den *Rasgrp1* Locus wurde in einem strahlenresistenten Sekundärtumor, der sich aus Zellen des Primärtumors M 110 entwickelt hatte, identifiziert. Mit einer Southern-Blot-Analyse, konnte gezeigt werden, dass in allen Sekundärtumoren und im Primärtumor eine Integration im *Rasgrp1* Locus vorlag.

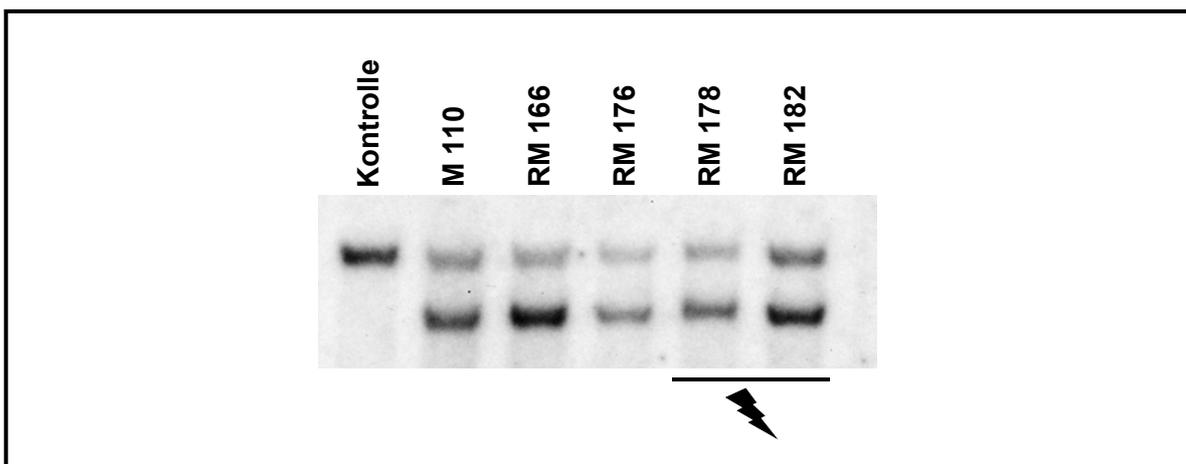


Abbildung 18 Eine Integration im *Rasgrp1* Locus lag bestrahlungsunabhängig in allen Tumoren vor. Southern-Blot-Analyse von einem Primärtumor (M 110) und vier daraus erwachsenen Sekundärtumoren (RM 166 – 182). Genomische DNA der Tumore wurde mit *BglIII* geschnitten, in einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit der *Rasgrp1* Sonde. Als Kontrolle diente DNA aus einem uninfizierten B-Zelltumor. Diese Kontrolle zeigt die Größe der Bande ohne Integration. Der Blitz markiert die Sekundärtumore, die aus bestrahlten Zellen entstanden sind. Eine Integration konnte in allen Tumoren detektiert werden.

Das Vorkommen bestimmter Integrationen sowohl im Primär-, als auch in Sekundärtumoren konnte auch für weitere bekannte CIS, die in anderen stressresistenten Tumoren gefunden wurden (im *Pim1* und *Gfi1* Locus), durch Southern-Blots bestätigt werden.

Drei Loci, die in unabhängigen, bestrahlungsresistenten Tumoren gefunden wurden, enthielten interessante Kandidatengene, deren Produkte für das Überleben von Tumorsubklonen nach Bestrahlung verantwortlich sein könnten. Zwei Gene, *Mcl1* und *Bcl2/1* codieren für Proteine der Bcl-2 Familie, Mcl1 und Bcl-x_L. Mcl1 ist ein gut charakterisiertes anti-apoptotisches Molekül, das die mitochondrial vermittelte Apoptose blockiert (Reynolds *et al.*, 1994; Willis *et al.*, 2005). Dieser Genlocus wurde bereits in mehreren Modellen, darunter auch in transgenen *c-MYC* Mäusen, als CIS identifiziert (Lund *et al.*, 2002; Mikkers *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002). Auch Bcl-x_L stellt ein bekanntes anti-apoptotisches Molekül dar (Boise *et al.*, 1993). Dieser Locus konnte aber nie als CIS in transgenen *c-MYC* Mäusen identifiziert werden, stellt also eine neue CIS für *c-MYC* Modelle dar. Die dritte Integrationsstelle betraf den *Gadd45β* Locus. Dieser wurde noch in keinem Mausmodell als retroviraler Integrationsort identifiziert. Daher konzentrierte sich die weitere Arbeit auf die letzten beiden Loci.

6. Analyse des *Bcl2/1* Locus

6.1 Insertion im *Bcl2/1* Locus in Tumoren mit Wildtyp p53

Eine in dieser Arbeit mehrfach identifizierte Integrationsstelle wurde dem *Bcl2/1* Locus zugeordnet. Abbildung 19 zeigt die gefundenen Integrationsorte und die Orientierung der proviralen Sequenz. Insgesamt wurden drei verschiedene Integrationsstellen identifiziert, von denen zwei aus Sekundärtumoren isoliert wurden, die von demselben Primärtumor (M 47) stammten (dargestellt durch schwarze Pfeile). Die proviralen Sequenzen waren in diesen Tumoren im zweiten Intron des *Bcl2/1* Gens lokalisiert und befanden sich in derselben Orientierung wie das Gen. Die dritte Integrationsstelle wurde aus einem Sekundärtumor isoliert, der sich aus Zellen eines unabhängigen Primärtumors entwickelt hatte (M 116). Diese Integration befand sich 300 bp stromaufwärts vom ersten codierenden Exon und lag in inverser Orientierung vor.

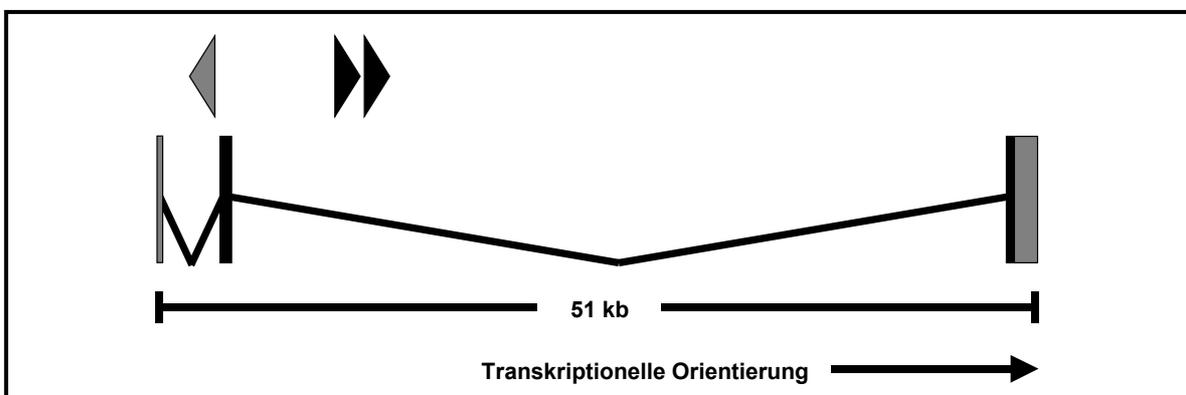


Abbildung 19 Integrationen im *Bcl2/1* Locus. Die transkriptionelle Orientierung des Gens ist angegeben. Codierende Exons sind in schwarz dargestellt, nicht codierende in grau. Die Richtung der Dreiecke symbolisiert die provirale Orientierung. Schwarz dargestellte Dreiecke zeigen zwei verschiedene Integrationsorte im großen Intron des Gens aus zwei Sekundärtumoren vom Primärtumor M 47. Das graue Dreieck zeigt eine Integration 300 bp stromaufwärts vom ersten codierenden Exon aus einem Sekundärtumor vom Primärtumor M 116.

Für diese Arbeit stellte sich die Frage, ob eine Integration im *Bcl2/1* Locus vermehrt in bestrahlten Tumoren vorkam oder bereits im Primärtumor vorhanden war. Dazu wurden die Primärtumore und die dazugehörigen Sekundärtumore, in denen diese Integrationsstelle identifiziert wurde, durch Southern-Blots analysiert, welche mit Sonden gegen die genomische *Bcl2/1* Sequenz am Integrationsort hybridisiert wurden.

Bei der Analyse des Primärtumors M 47 mit den dazugehörigen Sekundärtumoren ergab sich, dass eine Integration im großen Intron des *Bcl2/1* Gens ausschließlich in den beiden Sekundärtumoren RM 67 und RM 68 detektiert werden konnte, die sich beide aus bestrahlten Zellen des Primärtumors entwickelt hatten und beide einen Wildtyp p53-Status aufwiesen. Der dritte Sekundärtumor aus bestrahlten Tumorzellen (RM 70) sowie alle Sekundärtumore aus unbestrahlten Zellen des Primärtumors (RM 63 – 65) zeigten keine Integration im *Bcl2/1* Locus, ebenso wie der Primärtumor (Abbildung 20).

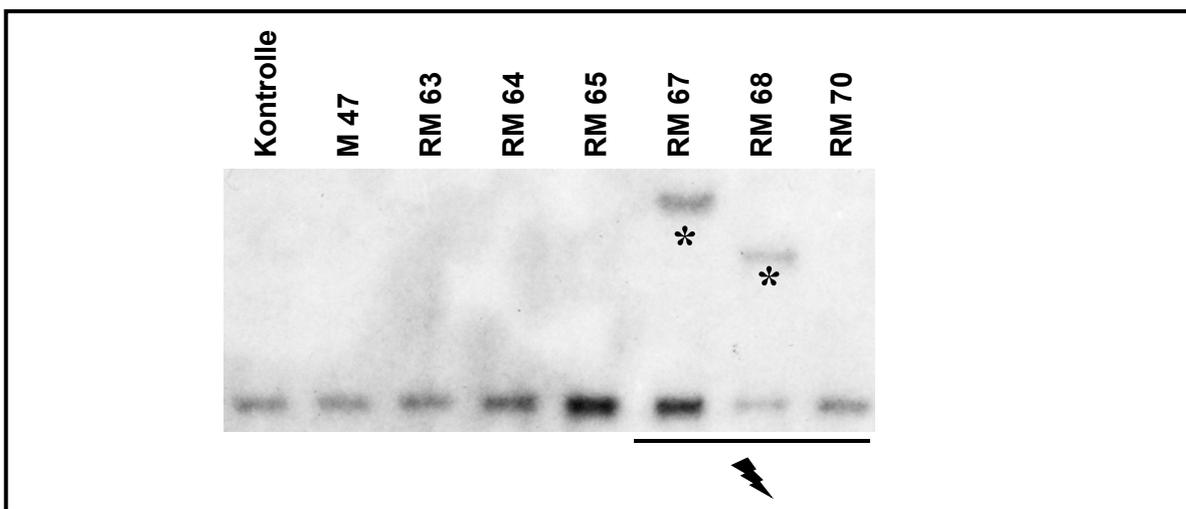


Abbildung 20 Integration im *Bcl2/1* Locus in Sekundärtumoren nach Bestrahlung. Abgebildet ist ein Southern-Blot der mit der Sonde *Bcl-x_L* (1) hybridisiert wurde, welche die Integration im zweiten Intron des Gens detektieren kann. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Bgl*III geschnitten. Als Kontrolle diente Tumorgewebe aus einem Tumor einer nicht infizierten, transgenen Maus. Die Bande repräsentiert das genomische Fragment ohne Integration. Alle Sekundärtumore (RM 63 – RM 70) stammen aus dem Primärtumor M 47. Banden, die durch ein integriertes Provirus entstanden sind, sind markiert (*). Der Blitz markiert die Tumore, die aus bestrahlten Tumorzellen des Primärtumors hervorgegangen sind. Eine Integration konnte in den Sekundärtumoren RM 67 und 68 detektiert werden

Die Analyse des zweiten Primärtumors (M 116) und der dazugehörigen Sekundärtumore ergab, dass 12/15 Sekundärtumore, unabhängig vom Bestrahlungsstatus, eine Integration im *Bcl2/1* Locus aufwiesen nicht aber der Primärtumor (Daten nicht abgebildet).

6.2 Expression von *Bcl-x_L*

Es stellte sich die Frage, ob die Integration im *Bcl2/1* Locus einen Effekt auf die Transkription des Gens hatte. Da die Transkriptmengen für *Bcl2/1* sehr gering sind, wurde hier auf die sensitive Methode der Real Time PCR zurückgegriffen. Dazu wurde aus Tumoren isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und diese in eine PCR-Reaktion eingesetzt.

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Real Time PCR vom Primärtumor M 47 und dazugehörigen Sekundärtumoren. Als Kontrolle diente cDNA, die aus einem Tumor einer nicht infizierten, transgenen Maus gewonnen wurde. Die relative *Bcl2/1* Expression aus

diesem Kontrolltumor wurde als 1 definiert und die Expression aller anderen Tumore dazu in Relation aufgetragen. Es wird deutlich, dass nur die Sekundärtumore, die sich aus bestrahlten Zellen entwickelt haben, deutlich erhöhte *Bcl2/1* mRNA-Mengen aufwiesen. Für die beiden Tumore mit Integration (RM 67 und RM 68) lagen die Werte 13- bzw. 11-mal höher als für die uninfierte Kontrolle. Auch der Tumor RM 70 zeigte eine 6-fach erhöhte Expression, damit jedoch lediglich die Hälfte der Transkriptmenge der Tumore mit Integration. Da das von diesem Gen codierte Protein Bcl-x_L anti-apoptotisch wirkt (Boise *et al.*, 1993), ist das Auswachsen von Zellen mit erhöhten *Bcl2/1* Mengen nach Bestrahlung nicht überraschend. Die stark erhöhten Transkriptmengen in den Tumoren RM 67 und RM 68 lassen darauf schließen, dass das integrierte Provirus kausal für die Aktivierung des *Bcl2/1* Gens verantwortlich ist. Die Daten zeigen aber auch, dass, wie im Sekundärtumor RM 70, durch die Bestrahlung Zellen selektiert wurden, in denen das Gen für das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L auf andere Weise aktiviert war. Expressionsstudien des zweiten Primärtumors (M 116) mit dazugehörigen Sekundärtumoren zeigten, dass in diesen Tumoren die *Bcl2/1* Transkriptmengen durch die Integration im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert waren (Daten nicht abgebildet). Diese Befunde können mehrere Ursachen haben. Da integrierte Proviren prinzipiell über große Entfernungen wirken können (Lazo *et al.*, 1990), könnte ein anderes Gen durch die Integration betroffen sein, dessen Dysregulation zu einem Wachstumsvorteil beim Auswachsen von Sekundärtumoren unabhängig von der Bestrahlung führt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Integration während der Tumorgenese zu einer erhöhten Genexpression führte, später aber durch zelluläre Faktoren herunterreguliert wurde. Beide Möglichkeiten würden die erzielten Ergebnisse erklären.

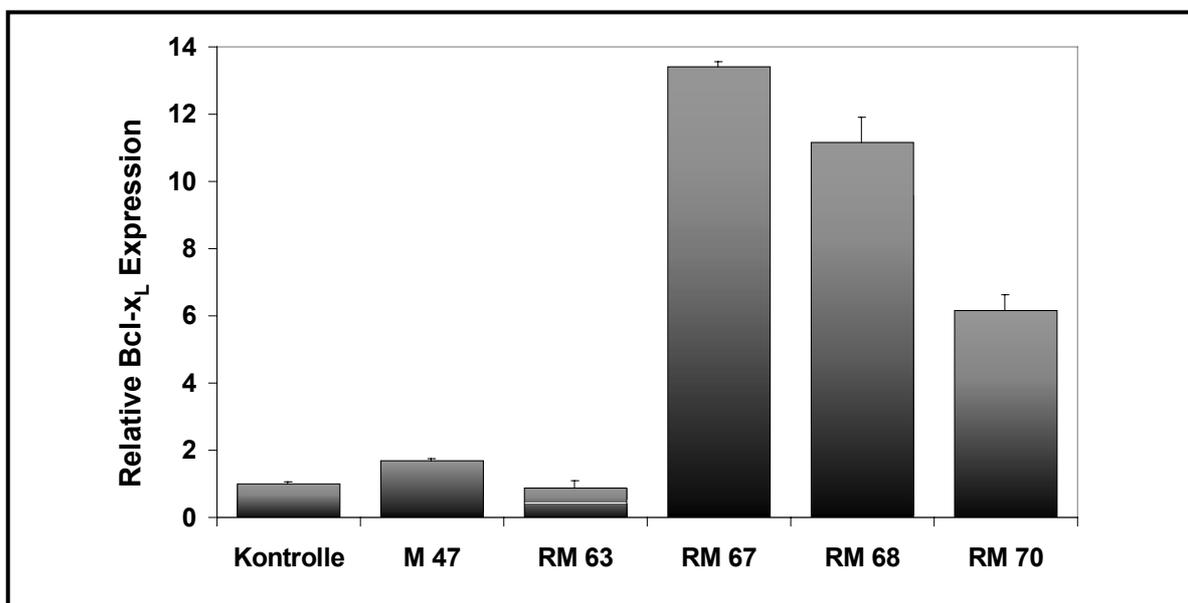


Abbildung 21 Provirusintegration erhöht die *Bcl2/1* mRNA-Menge. RNA von Tumoren wurde aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Die Menge der *Bcl2/1* mRNA wurden in Doppelbestimmungen in jeweils zwei unabhängigen Experimenten bestimmt. Graphisch dargestellt ist die relative *Bcl2/1* Expression je Tumor im Vergleich zu einem uninfierten Kontrolltumor. Die Messfehler sind mit den üblichen Fehlerbalken dargestellt. Eine deutlich erhöhte *Bcl2/1* Expression ist in den Tumoren RM 67 und RM 68 sichtbar, die eine provirale Integration in der Intronsequenz tragen. Auch der dritte Tumor, der aus bestrahlten Primärtumorzellen entstanden ist (RM 70), zeigt eine erhöhte Expression.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass im Primärtumor M 47 Zellen mit einer proviralen Integration im Intron des *Bcl2/1* Gens vorhanden waren, die aufgrund der Integration verstärkte Expression des Gens zeigten. Diese Zellen konnten die Bestrahlung überleben und nach der Transplantation zu Sekundärtumoren auswachsen. Die dargestellten Daten zeigen die erste detaillierte Analyse der für dieses Mausmodell neuen CIS im *Bcl2/1* Locus. Insbesondere konnte durch diese Versuche exemplarisch nachgewiesen werden, dass Integrationen, die die Expression von bekannten Überlebensgenen aktivieren, in Sekundärtumoren, die nach Bestrahlung ausgewachsen sind, angereichert waren. Die Identifikation des *Bcl2/1* Locus dient damit als *proof-of-principle* für den gewählten methodischen Ansatz.

7. Integration im *Gadd45 β* Locus in Tumoren mit Wildtyp p53

Ein Integrationsort aus zwei unabhängigen Sekundärtumoren konnte dem *Gadd45 β* Locus zugeordnet werden (Abbildung 22). In beiden Sekundärtumoren, in denen eine Integration identifiziert wurde, lag das Provirus in der gleichen Orientierung vor wie das *Gadd45 β* Gen, welches am nächsten zu den Integrationsorten war. Beide Integrationen wurden stromabwärts vom Gen in einer Entfernung von 1,5 bzw. 6,4 kb identifiziert.

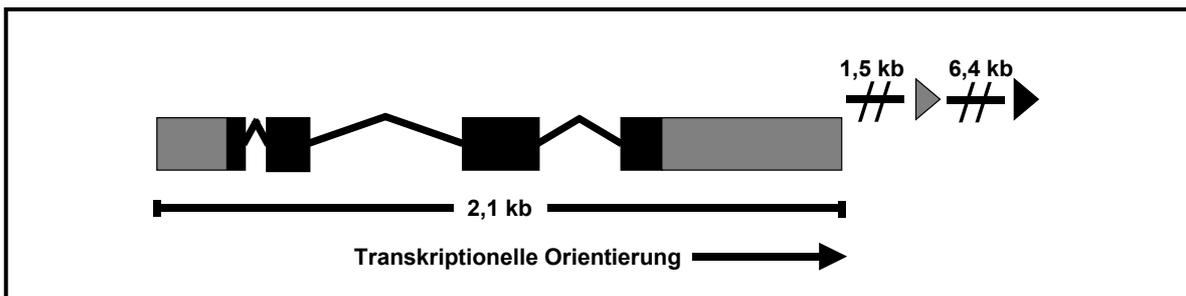


Abbildung 22 Integration im *Gadd45 β* Locus. Die transkriptionelle Orientierung des Gens ist angegeben. Codierende Exons sind schwarz dargestellt, nicht codierende grau. Die Richtung der Dreiecke symbolisiert die provirale Orientierung. Das schwarz dargestellte Dreieck zeigt die Integration 6,4 kb stromabwärts vom *Gadd45 β* Gen in einem Sekundärtumor vom Primärtumor M 94. Das graue Dreieck zeigt eine Integration 1,5 kb stromabwärts vom Gen in einem Sekundärtumor vom Primärtumor M 88.

Wie für die Integration im *Bcl2/1* Locus sollte auch für diese Integrationen bestimmt werden, ob sie eventuell nur in Sekundärtumoren aus bestrahlten Tumorzellen zu finden waren. Hierzu wurde Tumor-DNA im Southern-Blot-Verfahren durch Hybridisierung mit spezifischen Sonden für die beiden Integrationsorte analysiert.

Die Analyse des Primärtumors M 88 mit den dazugehörigen Sekundärtumoren (Abbildung 23A) ergab, dass die Integration 1,5 kb stromabwärts vom *Gadd45 β* Gen in vier von fünf Sekundärtumoren (RM 51, 86, 88 und 89) detektiert werden konnte, die sich aus bestrahlten Zellen des Primärtumors entwickelt hatten. Nur in zwei von sieben Sekundärtumoren, die sich aus unbestrahlten Zellen des Primärtumors entwickelt hatten, war dies ebenfalls zu sehen (RM 84 und 85). Der Primärtumor sowie alle anderen Sekundärtumore zeigten keine mit dieser Sonde detektierbare Integration im *Gadd45 β* Locus. Jedoch wurde mittels LM-PCR auch für den Primärtumor M 88 eine Integration im *Gadd45 β* Locus gefunden. Offensichtlich war die Zellpopulation, in welcher diese Integration im

Primärtumor vorlag, zu klein um mittels Southern-Blot detektiert zu werden, jedoch groß genug um mit der sensitiveren PCR-Methode gefunden zu werden. Diese Daten zeigen, dass die Integration 1,5 kb stromabwärts vom *Gadd45 β* Gen vermehrt nach Bestrahlung detektiert werden konnte. Für die Tumore RM 86 und 88 wurde exemplarisch der p53-Status bestimmt und es ergab sich, dass die p53 Sequenz frei von Mutationen war.

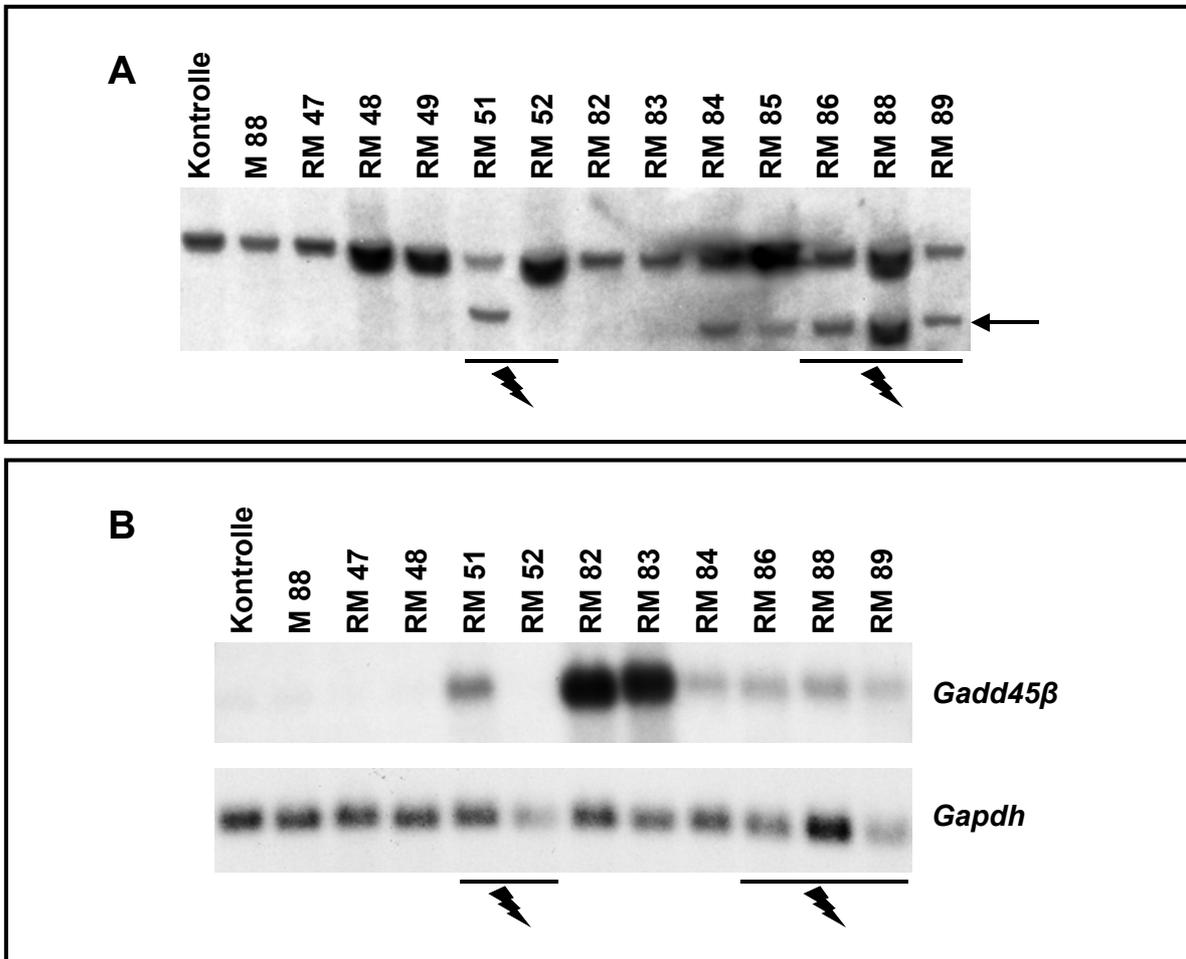


Abbildung 23 Integration im *Gadd45 β* Locus in Sekundärtumoren nach Bestrahlung und dadurch bedingte verstärkte Expression. A) Abgebildet ist ein Southern-Blot (*HindIII* geschnittene DNA), der mit der Sonde *Gadd45 β* (1) hybridisiert wurde, welche die Integration 1,5 kb stromabwärts von *Gadd45 β* detektiert. Als Kontrolle diente DNA aus Tumorgewebe einer nicht infizierten transgenen Maus, hier kann die Größe der Bande für Tumore ohne Integration entnommen werden. Der Pfeil markiert die Bande im Fall einer Integration. Alle Sekundärtumore (RM 47 – RM 89) stammen aus dem Primärtumor M 88. Der Blitz markiert die Tumore, die aus bestrahlten Tumorzellen des Primärtumors hervorgegangen sind. Eine Integration ist in den Tumoren RM 51, 84, 85, 86, 88 und 89 erkennbar. **B)** Northern-Blot-Analyse. RNA wurde aus Tumorgewebe aufgearbeitet und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der RNA auf eine Membran wurde diese mit spezifischen Sonden gegen die *Gadd45 β* CDS und die *Gapdh* CDS hybridisiert. Die Detektion von *Gapdh* diente als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung des Gels. Erkennbar ist eine erhöhte Expression in den Sekundärtumoren RM 51, 82, 83, 84, 86, 88 und 89.

Es sollte bestimmt werden, ob die Integration 1,5 kb stromabwärts vom *Gadd45 β* Gen einen Effekt auf die Transkription des Gens hatte. Dazu wurden *Gadd45 β* Transkripte im Northern-Blot mit spezifischen Sonden gegen die codierende Sequenz detektiert und die Intensität der Banden verglichen. Eine Northern-Blot-Analyse des Primärtumors M 88 und den dazugehörigen Sekundärtumoren (Abbildung 23B) ergab, dass *Gadd45 β* Transkripte vermehrt in den Sekundärtumoren RM 51, 82, 83, 84, 86, 88 und 89 detektiert werden konnten.

also in allen Sekundärtumoren mit Integration (RM 51, 84, 86, 88, 89) sowie in zwei Tumoren ohne Integration (RM 82 und 83). Dabei ist erwähnenswert, dass in den beiden Sekundärtumoren ohne Integration die Transkriptmenge um ein Vielfaches höher war, als bei den Tumoren mit Integration. Eine Quantifizierung der Expression durch Real Time PCR bestätigte dieses Ergebnis und ergab, dass in den Sekundärtumoren mit Integration die Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle um ein 5-faches erhöht war, während die Tumore RM 82 und 83 eine über 100-fach erhöhte *Gadd45 β* Expression zeigten. Diese Daten machen deutlich, dass die Integration im *Gadd45 β* Locus zu einer verstärkten Transkription des *Gadd45 β* Gens führte, welche auch durch andere Ereignisse erzielt wurde.

Bei der Analyse des Primärtumors M 94 mit den dazugehörigen Sekundärtumoren (Abbildung 24A) konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Sekundärtumore, die sich aus bestrahlten Zellen entwickelt hatten, eine Integration im *Gadd45 β* Locus aufwiesen (RM 227, 228 und 230), während weder der Primärtumor noch die unbestrahlten Sekundärtumore diese Integration zeigten. Eine Southern-Blot-Analyse für weitere aus diesem Primärtumor entstandenen Sekundärtumore bestätigte diese Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Aus zwei Southern-Blot-Analysen ergab sich, dass kein Sekundärtumor (von 10 Tumoren), der sich aus unbestrahlten Zellen des Primärtumors entwickelt hatte, diese Integration zeigte, während neun von 13 Sekundärtumore die aus bestrahlten Zellen entstanden waren, eine Integration im *Gadd45 β* Locus aufwiesen. Die Daten machen deutlich, dass diese Integration ausschließlich nach Bestrahlung detektierbar war. Auch hier wurde exemplarisch für den Tumor RM 227 der p53-Status bestimmt. Es ergab sich, dass die p53 Sequenz nicht mutiert war.

Auch für diesen Tumorsatz sollte bestimmt werden, ob die Integration im *Gadd45 β* Locus einen Effekt auf die Transkription des *Gadd45 β* Gens hatte. Da die Transkriptmengen mit einer Northern-Blot-Analyse nicht ausreichend gut detektiert werden konnten, wurde wiederum die Real Time PCR angewandt. Dazu wurde aus Tumoren isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Diese ergab, dass in zwei Tumoren mit Integration (RM 227 und 230) die *Gadd45 β* Expression im Vergleich zu uninfizierten Kontrolltumoren 3,5 bis 4-fach erhöht war (Abbildung 24B). Dies war überraschenderweise für den dritten getesteten Sekundärtumor mit Integration (RM 228) nicht der Fall. Diese Daten machen deutlich, dass die Integration in zwei aus drei Fällen eine verstärkte Expression des *Gadd45 β* Gens bedingte, während Tumore ohne Integration Transkriptmengen aufwiesen, die vergleichbar mit der uninfizierten Kontrolle bzw. leicht erhöht waren.

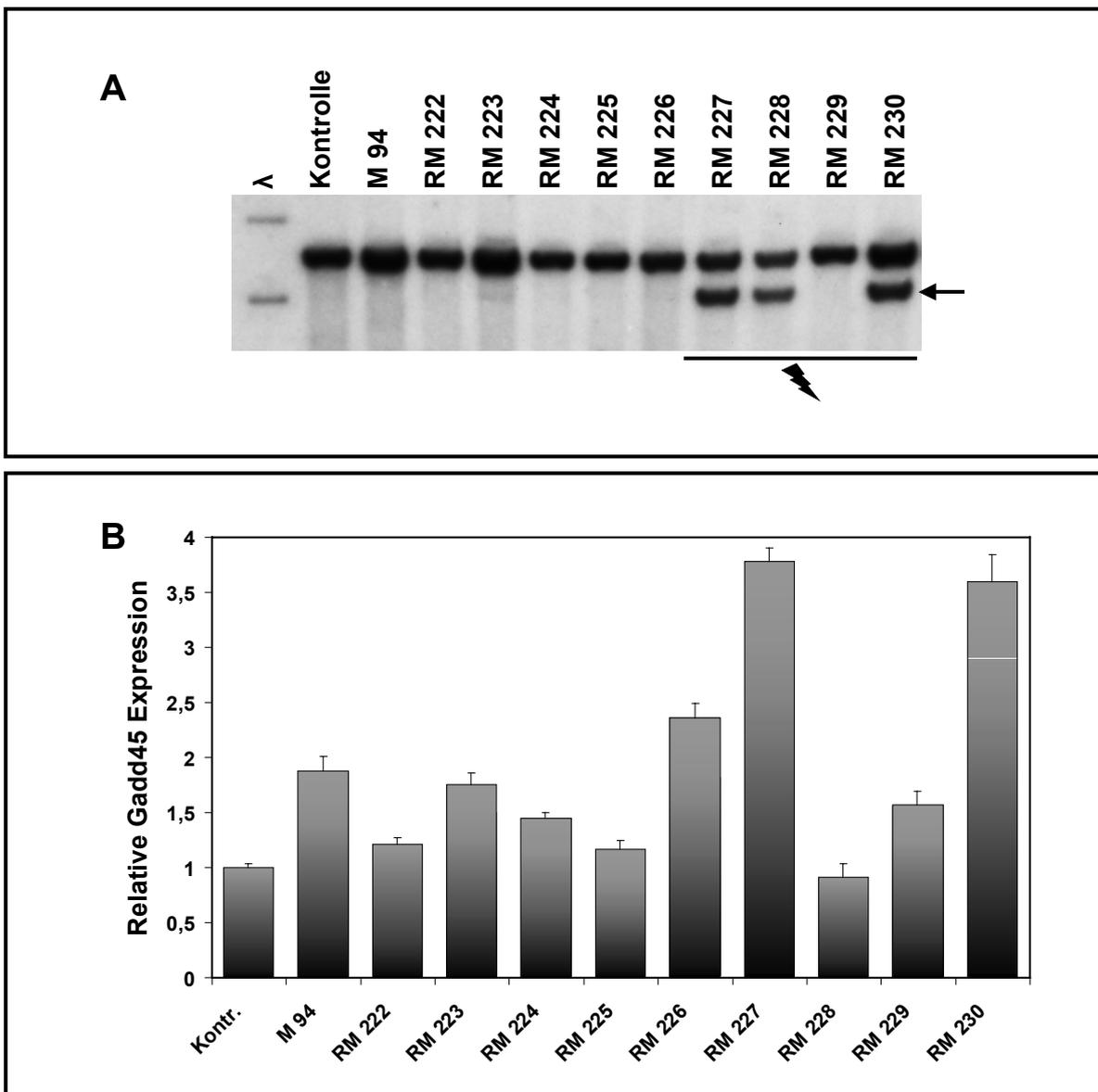


Abbildung 24 Integration im *Gadd45β* Locus in Sekundärtumoren nach Bestrahlung und dadurch bedingte verstärkte Expression. A) Abgebildet ist ein Southern-Blot (*BglII* geschnittene DNA), der mit der Sonde *Gadd45β* (2) hybridisiert wurde, welche die Integration 6,4 kb stromabwärts vom Gen detektieren kann. Alle Sekundärtumore (RM 222 – 230) entstammen dem parentalen Tumor M 94. Bestrahlte Tumore sind mit einem Blitz markiert. Als Kontrolle diente DNA aus Tumorgewebe einer nicht infizierten transgenen Maus, hier kann die Größe der Bande für Tumore ohne Integration entnommen werden. Eine Integration kann in den Sekundärtumoren RM 227, 228 und 230 ausgemacht werden (Pfeil). **B)** Real Time PCR. RNA aus den angegebenen Tumoren wurde in cDNA umgeschrieben und in eine PCR eingesetzt. Als Kontrolle diente cDNA aus einem uninfizierten Tumor. Es ist zu erkennen, dass in den Sekundärtumoren RM 227 und RM 230 eine im Vergleich zur Kontrolle mehr als 3,5-fach erhöhte Expression vorliegt.

In einer Southern-Blot-Analyse aller im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Primärtumore konnte keine der beiden Integrationsstellen im *Gadd45β* Locus detektiert werden (Daten nicht abgebildet). Diese Integrationen sind also spezifisch für Sekundärtumore vor allem nach Bestrahlung. Es stellt sich die Frage, ob die Integrationen tatsächlich das *Gadd45β* Gen betreffen oder ob ein anderes Gen in diesem Abschnitt des Chromosoms dereguliert ist. Semiquantitative PCR-Analysen zahlreicher getesteter Sekundärtumore mit und ohne Integration (Daten nicht gezeigt) zeigten für andere Gene in der Umgebung der Integrationen allerdings keine Unterschiede in der Expression.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass in Sekundärtumoren aus zwei unabhängigen Primärtumoren eine Integration im *Gadd45 β* Locus ausschließlich/ vermehrt auftrat, wenn die Primärtumorzellen vor der Transplantation bestrahlt wurden. Da die Integrationen erhöhte *Gadd45 β* Transkriptmengen bedingten, ist dies ein Indiz dafür, dass verstärkte *Gadd45 β* Expression das Überleben von Tumorzellen nach Bestrahlung fördert. Damit ist *Gadd45 β* ein mit diesem methodischen Ansatz identifiziertes Kandidatengen, dessen veränderte Expression zu einer Stressresistenz führen kann.

8. Funktionelle Analyse von *Gadd45 β*

Gadd45 β wurde ursprünglich wegen Sequenzhomologien der *growth arrest and DNA damage inducible* *Gadd45* Familie zugeordnet (Abdollahi *et al.*, 1991) und wird durch zahlreiche Stress-Stimuli induziert (De Smaele *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 1994). Die genaue Funktion von *Gadd45 β* wird aber noch kontrovers diskutiert.

Um *Gadd45 β* näher zu charakterisieren und die Rolle des Proteins bei einer Stressresistenz zu evaluieren, wurde ein retrovirales Expressionssystem gewählt, mit dessen Hilfe *Gadd45 β* in Zellen überexprimiert werden kann (Abbildung 25). Dazu wurde die *Gadd45 β* codierende Sequenz in einen retroviralen Vektor kloniert, der außerdem hinter einer internen Ribosomeneintrittsstelle als Reporter gen das Gen für das grün fluoreszierende Protein eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) trug. Durch Kotransfektion dieses retroviralen Vektors mit Helferplasmiden, die für retrovirale Proteine codieren, in eine Produzentenzelllinie konnten infektiöse Viruspartikel gewonnen werden. Bei der Infektion von Zellen mit diesen Viren kam es zur Integration des retroviralen Vektors, von dem dann in den infizierten Zellen *Gadd45 β* und der eGFP Reporter exprimiert wurden. Durch die stabile Integration in das zelluläre Genom wurde das Provirus bei der Vermehrung der Zellen an die nächste Generation weitergegeben. *Gadd45 β* exprimierende Zellen konnten aufgrund der Expression von eGFP mit Hilfe von durchflusszytometrischen Messungen detektiert werden und durch eine Sortierung bis zur 98%igen Reinheit angereichert werden.

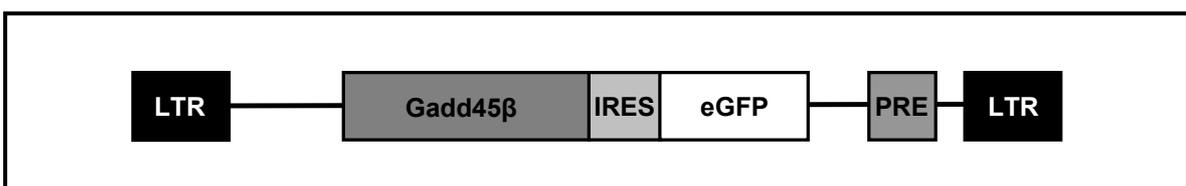


Abbildung 25 Retrovirales *Gadd45 β* Expressionskonstrukt. LTR: *long terminal repeat*, IRES: interne Ribosomeneintrittsstelle, eGFP: *enhanced green fluorescent protein*, PRE: post-transkriptionelles regulatorisches Element

8.1 *Gadd45 β* ist ein Onkogen

Da die Integration im *Gadd45 β* Locus vor allem nach Bestrahlung in Tumoren gefunden wurde, aber eine erhöhte Expression auch in unbestrahlten Tumoren detektiert werden konnte, sollte im Folgenden determiniert werden, ob *Gadd45 β* selbst in der Lage ist, Zellen zu transformieren. Dazu wurde ein klassischer Transformationsversuch durchgeführt.

Eine Eigenschaft transformierter Zellen ist das Wachstum *in vivo*. Injiziert man transformierte Fibroblasten in immundefiziente Mäuse, so wachsen diese zu einem Tumor aus (Ahuja *et al.*, 2005). Für diesen Versuch wurden Fibroblasten mit dem oben beschriebenen Expressionsvektor infiziert (Infektionsrate von >90%). Anschließend wurden 1×10^6 Zellen subcutan in den Nacken von NOD/*scid* Mäuse (n = 8) injiziert. Außer der Kontrollgruppe (n = 9), die mit einem leeren Vektor infizierte Zellen erhalten hatte, wurden einer weiteren Kohorte (n = 9) uninifizierte NIH3T3 Zellen injiziert. Die Mäuse wurden dreimal wöchentlich auf das Auftreten von Tumoren im Injektionsbereich untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass Gadd45 β exprimierende Zellen innerhalb von 15 Tagen lokal begrenzte Tumore im Bereich der Injektion bildeten, die durchschnittlich 0,83 g wogen (Abbildung 26). Es konnten keine Metastasen in anderen Organen festgestellt werden. Hingegen zeigte keine der Kontrollgruppen innerhalb dieser Zeit Tumorbildung. Alle Kontrollgruppen bildeten dennoch im Beobachtungszeitraum von 33 Tagen Tumore. Mäuse, die mit dem leeren Vektor infizierte Fibroblasten erhalten hatten, bildeten nach 27 Tagen Tumore mit einem Durchschnittsgewicht von 0,5 g und Mäuse, die uninifizierte Fibroblasten erhalten hatten, bildeten nach 33 Tagen Tumore mit einem Durchschnittsgewicht von 0,48 g. Sowohl die Latenzzeit, als auch das Gewicht sind aber deutlich verschieden von den Gadd45 β überexprimierenden Tumoren.

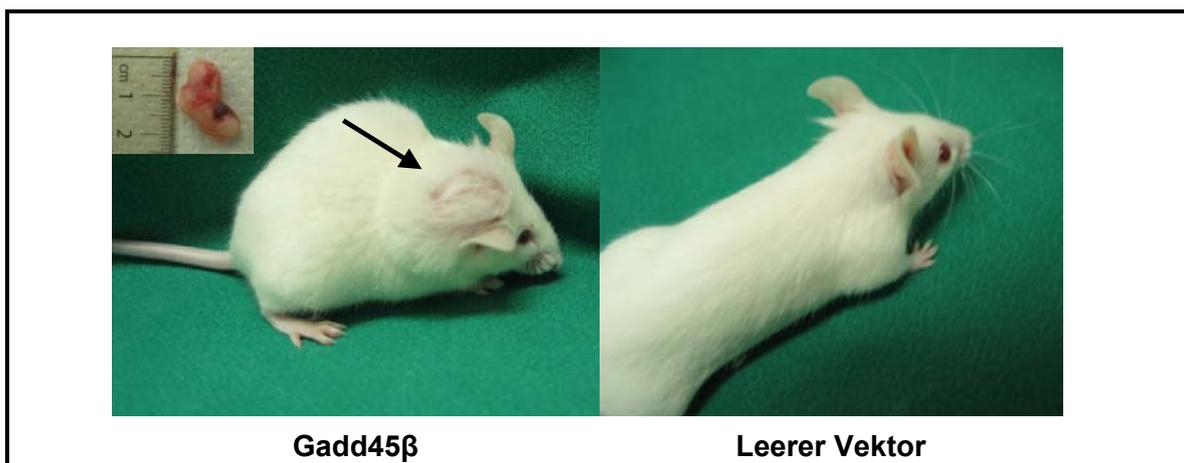


Abbildung 26 Gadd45 β Überexpression führt zu Tumorwachstum *in vivo*. Fibroblasten wurden mit einem Gadd45 β Expressionsvektor bzw. mit einem leeren Vektor infiziert und 1×10^6 Zellen subcutan in den Nacken von NOD/*scid* Mäusen injiziert. Nach 15 Tagen wurden Fotos von beiden Mausgruppen aufgenommen. Links eine Maus, die Gadd45 β überexprimierende Zellen erhalten hatte. In der Ecke das Bild des entfernten Tumors. Rechts eine Maus, die mit einem leeren Vektor infizierte Zellen erhalten hatte.

Dieser Versuch zeigt, dass Gadd45 β in der Lage ist, Fibroblasten zu transformieren und dadurch *in vivo* Tumore zu induzieren. Die Beobachtung belegt, dass Gadd45 β tumorigenes Potential besitzt, eine Eigenschaft, die bisher für dieses Protein nicht bekannt war und hier erstmals beschrieben wird. Es stellte sich die Frage, wie Gadd45 β das Tumorwachstum positiv beeinflussen kann. Eine logische Schlussfolgerung aus dem Mausmodell, in welchem der Gadd45 β Locus als CIS nach Bestrahlung isoliert wurde, ist, dass es anti-apoptische Eigenschaften hat.

8.2 Bcl-x_L, aber nicht Gadd45 β , inhibiert Apoptose nach Bestrahlung

Zur Klärung dieser Frage wurden NIH3T3 Zellen und Ba/F3 Zellen, eine Vorläufer B-Zelllinie, mit retroviralen Vektoren infiziert. Zusätzlich zum Gadd45 β Expressionsvektor und dem leeren Vektor wurde ein Bcl-x_L Expressionsvektor verwendet. Dieser sollte als Positivkontrolle dienen, da Bcl-x_L ein bekanntes anti-apoptotisches Protein ist. Die Zellen wurden mit den Vektoren infiziert und mit Hilfe des FACS Aria auf die Expression des Reportergens eGFP sortiert, so dass für die Versuche nur Zellen verwendet wurden, die die gewünschten Proteine exprimierten. Zur Induktion von Apoptose wurden Fibroblasten mit 25 bzw. 50 J/m² UV-Licht bestrahlt, da bekannt ist, dass die Zellen nach diesen Bestrahlungsdosen durch den programmierten Zelltod eliminiert werden (Speidel *et al.*, 2006). Die Zellen wurden bestrahlt und 48 Stunden nach Bestrahlung für Western-Blot-Analysen und 42 Stunden nach Bestrahlung für Zellzyklusanalysen aufgearbeitet.

In Abbildung 27 ist eine exemplarische Western-Blot-Analyse von NIH3T3 Fibroblasten abgebildet, die Bcl-x_L bzw. Gadd45 β überexprimieren. Durch die Detektion von aktivierter Caspase 3, einem Protein, das in dieser Form nur im Fall von Apoptose zu detektieren ist, ist zu erkennen, dass nach Bestrahlung nur Bcl-x_L exprimierende Zellen keine aktivierte Caspase 3 zeigten. Gadd45 β exprimierende Zellen, mit einem leeren Vektor infizierte Fibroblasten und uninfizierte NIH3T3 Zellen zeigten alle nach Bestrahlung aktivierte Caspase 3. Die Caspase 3 Menge war vor allem nach Bestrahlung mit 50 J/m² erhöht, eine längere Exposition des Films zeigte aber auch bei Bestrahlung mit 25 J/m² in diesen Zellen aktivierte Caspase 3. Außerdem wird in der Abbildung durch die Verwendung spezifischer Antikörper gezeigt, dass die Zellen die gewünschten Proteine überexprimierten (Gadd45 β und Bcl-x_L). Die Detektion von GFP zeigte in allen Zellen ähnliche Expression vom retroviralen Konstrukt und die Verwendung eines Tubulin-spezifischen Antikörpers die gleichmäßige Beladung des Gels.

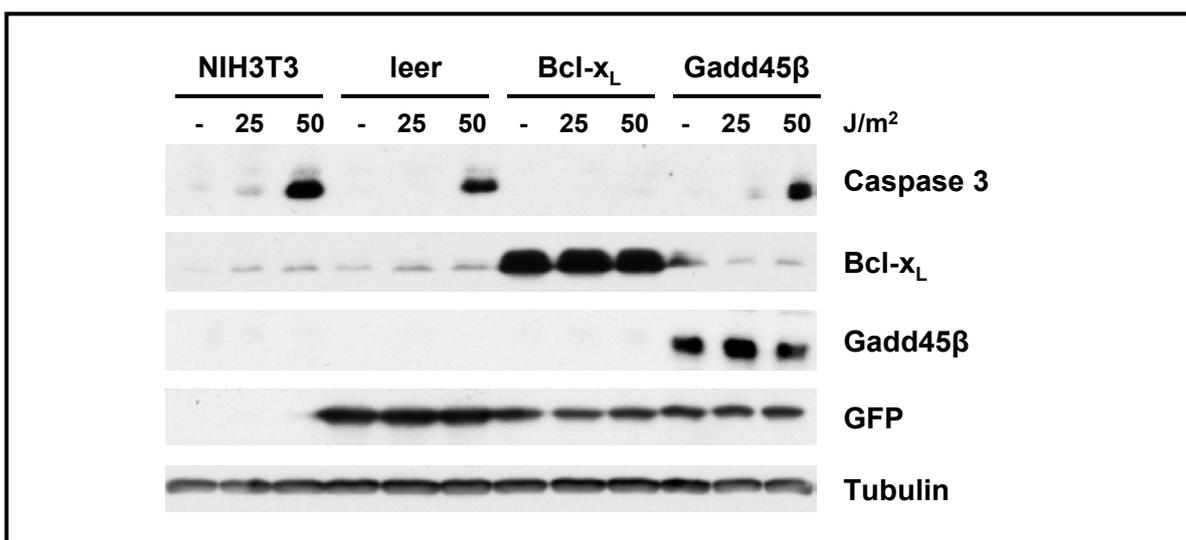


Abbildung 27 Bcl-x_L inhibiert UV-induzierte Apoptose in Fibroblasten. Western-Blot-Analyse von NIH3T3 Fibroblasten, mit leerem Vektor infizierten NIH3T3 Zellen (leer), Bcl-x_L überexprimierenden Zellen und Gadd45 β überexprimierenden Zellen. Die Detektion von Bcl-x_L und Gadd45 β zeigt die Überexpression der jeweiligen Proteine. Die Detektion von GFP zeigt die gleichmäßige Expression vom viralen Konstrukt, Tubulin die gleichmäßige Beladung des Gels. Alle Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. In Bcl-x_L exprimierenden Zellen ist aktivierte Caspase 3 nach Bestrahlung nicht zu detektieren, jedoch in allen anderen.

Diese Ergebnisse sollten mit durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen verifiziert werden. Durch die Analyse des DNA-Gehaltes von einzelnen Zellen innerhalb einer Zellpopulation kann die prozentuale Zellzyklusverteilung dieser Population bestimmt werden. Nach Färbung der DNA mit dem Fluorochrom Propidiumiodid ist die im Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenzintensität direkt proportional zum DNA-Gehalt einer Zelle. Daher zeigen die Histogramme einer Zellpopulation eine charakteristische Verteilung: Zellen mit einheitlich geringem DNA-Gehalt (G_0/G_1), Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt (G_2/M) und Zellen mit intermediärem DNA-Gehalt, die sich in der S-Phase befinden. Da apoptotische Zellen ihre DNA mittels einer spezifischen Endonuklease degradieren und die kleineren Fragmente leicht aus den fixierten Zellen extrahiert werden, zeigen diese Zellen einen geringeren DNA-Gehalt (Sub G_1) als Zellen in der G_1 -Phase.

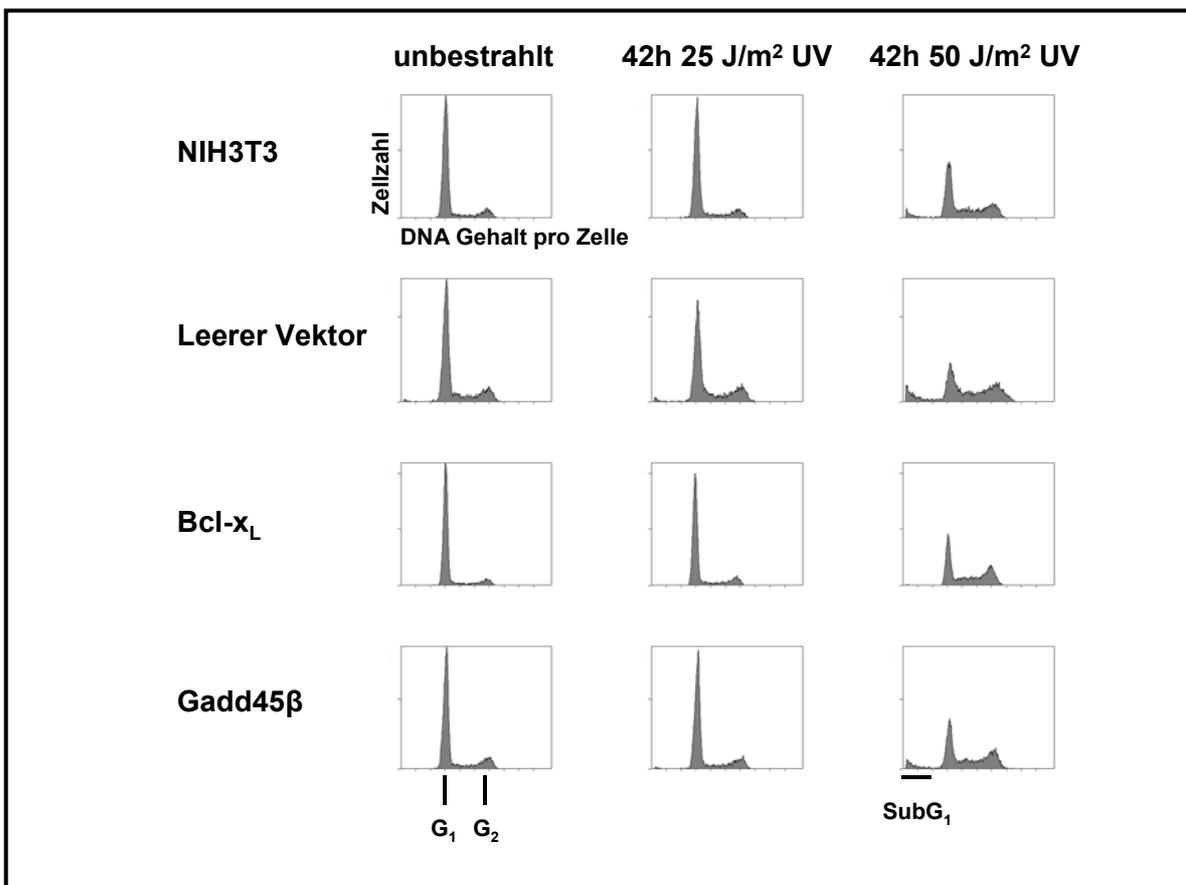


Abbildung 28 Bcl-x_L vermittelt Schutz vor UV-induzierter Apoptose. Zellzyklusprofile von NIH3T3 Fibroblasten, mit leerem Vektor infizierten Zellen, Bcl-x_L überexprimierenden NIH3T3 Zellen und Gadd45 β überexprimierenden Zellen. Die Zellen wurden mit der angegebenen Dosis UV-Licht bestrahlt und nach 42 Stunden mit Ethanol fixiert. Für die Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen durchflusszytometrisch erfasst. Bcl-x_L exprimierende Zellen zeigten im Gegensatz zu allen anderen Fibroblasten keine Zellen in der Sub G_1 -Phase.

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich, reagieren die mit unterschiedlichen Vektoren infizierten Zellen verschieden auf die Bestrahlung. Ausgehend von einem normalen durchflusszytometrischen Profil mit ca. 75% G_1 -Phase Zellen (DNA-Gehalt von 2 N), 15% S-Phase Zellen (DNA-Gehalt zwischen 2 N und 4 N) und 10% G_2 -Phase Zellen (DNA-Gehalt 4 N) führte UV-Bestrahlung der Zellen zu einer signifikanten Änderung in der Verteilung der Zellpopulationen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. NIH3T3 Fibroblasten, mit dem leeren Vektor infizierte Zellen und Gadd45 β exprimierende Zellen zeigten 42

Stunden nach DNA-Schädigung durch 50 J/m^2 UV-Strahlung Zellen in der SubG₁-Fraktion, also apoptotische Zellen. Dieser Teil der Zellpopulation war in Bcl-x_L exprimierenden Zellen nach Bestrahlung nicht detektierbar. Damit bestätigte die durchflusszytometrische Analyse die durch Western-Blot-Analyse erhaltenen Daten, dass Bcl-x_L im Gegensatz zu Gadd45 β eine anti-apoptotische Wirkung hat.

Diese Versuche wurden mit Ba/F3 Zellen wiederholt um zu zeigen, dass die erzielten Ergebnisse nicht abhängig vom Zellsystem waren. Zur Induktion von Apoptose wurde die hämatopoetische Zelllinie Ba/F3 mit γ -Strahlung behandelt. Die damit erzielten Ergebnisse entsprachen den Ergebnissen, die mit bestrahlten Fibroblasten erzielt wurden und werden daher hier nicht erneut detailliert dargestellt. Eine Zusammenfassung der Versuche mit den beiden Zelllinie ist in Abbildung 29 gegeben.

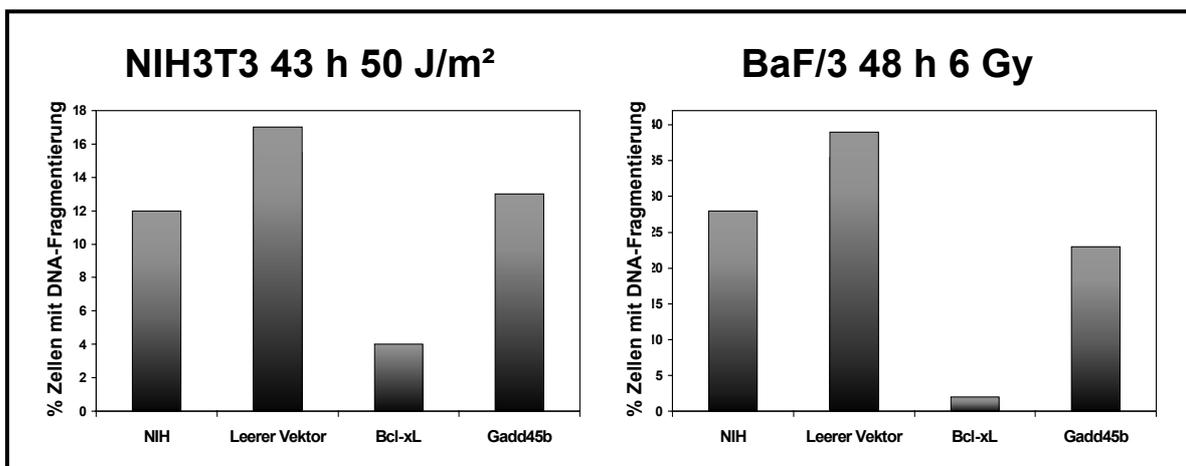


Abbildung 29 Bcl-x_L vermittelt Schutz vor Apoptose. Die Daten aus den Versuchen mit NIH3T3 Fibroblasten und BaF/3 Zellen sind dargestellt. Aufgetragen ist der Prozentsatz von Zellen, die DNA-Fragmentierung aufweisen (SubG₁) 43 Stunden nach Behandlung der Zellen mit 50 J/m^2 UV-Bestrahlung (NIH3T3) bzw. 48 Stunden nach 6 Gy γ -Bestrahlung (BaF/3).

Diese Daten belegen, dass Gadd45 β in den gewählten Zelllinien keine anti-apoptotische Funktion erfüllt, während Bcl-x_L erwartungsgemäß den programmierten Zelltod nach Bestrahlung mit UV- oder γ -Strahlen verhindert.

8.3 Gadd45 β vermittelt einen Überlebensvorteil bei Serumentzug

Es stellte sich die Frage, unter welchen Umständen die Expression von Gadd45 β einen Überlebensvorteil vermittelt. Dazu wurde getestet, wie Gadd45 β exprimierende Zellen sich bei Serumentzug verhalten. Dieser Versuchsansatz wurde gewählt, da Tumorzellen häufig extremen Bedingungen ausgesetzt sind, zu denen auch eine mangelhafte Versorgung mit Nährstoffen und wichtigen Wachstumsfaktoren gehört. Zellen in Kultur benötigen die im Serum vorhandenen Faktoren und können ohne Serum nicht überleben. Die Fibroblasten aus den obigen Versuchen wurden für diese Versuche in Medium ohne Serum gehalten. 32 und 77 Stunden nach Serumentzug wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Farbstoff Propidiumiodid kann lediglich in tote Zellen eindringen und diese daher anfärben. Die toten Zellen können so durch die Färbung in der durchflusszytometrischen Analyse von den lebenden unterschieden werden.

In Abbildung 30 sind die Versuchsergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten zusammenfassend dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass Fibroblasten, mit einem leeren Vektor infizierte Fibroblasten und auch Bcl-x_L überexprimierende Zellen nach Serumentzug starben. Nach 77 Stunden waren in allen Fällen mindestens 38% der Zellen tot. Gadd45 β exprimierende Zellen zeigten dagegen eine andere Reaktion nach Serumentzug. Nur in einem der beiden Experimente waren tote Zellen detektierbar und in diesem Versuch lag der Prozentsatz 77 Stunden nach Serumentzug bei lediglich 7%. In dem zweiten Experiment wurden keine toten Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse detektiert. Dies erklärt den relativ hohen Fehlerbalken. Im Gegensatz zu allen anderen Zellen waren die Gadd45 β exprimierenden Zellen in der Lage unter den Bedingungen des Serumentzugs sogar zu proliferieren. Einzig Gadd45 β war in diesem Versuch also in der Lage den Zelltod zu verhindern und weitere Proliferation zu ermöglichen. Dabei konnte durch Western-Blot-Analysen und Zellzyklusanalysen (Daten nicht abgebildet) gezeigt werden, dass es sich nicht um einen apoptotischen Zelltod handelte, da nur ein sehr geringer Anteil der Zellen DNA-Fragmentierung zeigte und nur sehr wenig aktivierte Caspase 3 im Western-Blot detektiert werden konnte. Diese Befunde belegen, dass Gadd45 β den nicht-apoptotischen Zelltod inhibieren kann und bei Überexpression auf diese Weise zu einer Therapieresistenz beitragen kann.

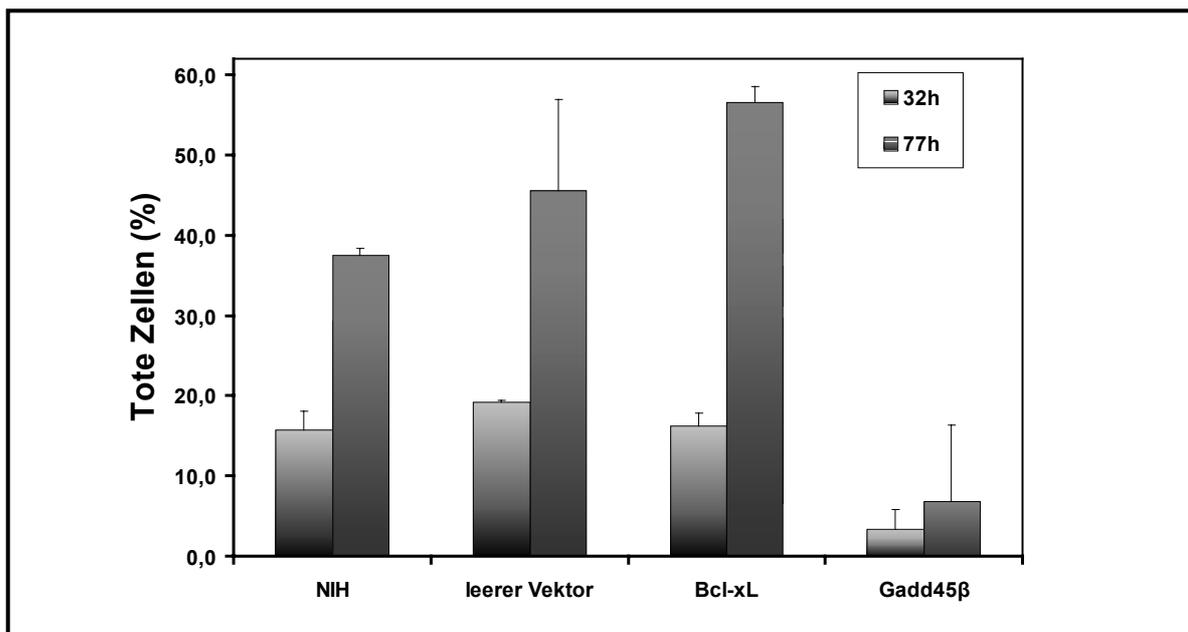


Abbildung 30 Gadd45 β exprimierende Zellen sind vor dem Zelltod nach Serumentzug geschützt. Darstellung von zwei unabhängigen durchflusszytometrischen Experimenten. NIH3T3 Zellen, die mit den entsprechenden Vektoren infiziert sind, wurden für diese Experimente in serumfreiem Medium gehalten, nach 32 bzw. 77 Stunden mit Propidiumiodid angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Aufgetragen sind die toten Zellen in Prozent der Gesamtpopulation nach 32 und 77 Stunden.

VI Diskussion

Hauptziel dieser Arbeit war die Identifikation von Faktoren, die in Tumorzellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil nach Induktion von Stress vermitteln und so zu einer Therapieresistenz beitragen können.

Um kritische Mutationen zu definieren, die für das Überleben von Tumorzellen nach Stress verantwortlich sind, wurde die Methode der retroviralen Insertionsmutagenese angewendet und erweitert. Im Mausmodell wurden durch Infektion mit dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV) Tumore induziert und durch die Behandlung eines Teils der Tumorzellen mit γ -Strahlung die Bedingungen einer Strahlentherapie modelliert. Nach der Transplantation in Rezipienten und dem Auswachsen der Zellen zu Sekundärtumoren konnten Tumorsubklone analysiert werden, die eine Bestrahlung überlebt hatten. Die zugrunde liegende Arbeitshypothese besagt, dass durch die Bestrahlung Zellen selektiert werden, die nach der Applikation von Stress einen Überlebensvorteil haben. Dieser Überlebensvorteil kann prinzipiell durch ein integriertes Provirus und die daraus resultierende Aktivierung oder Inaktivierung von zellulären Genen vermittelt werden. Korreliert eine bestimmte Integrationsstelle in mehreren unabhängigen Tumoren mit einer Bestrahlungsresistenz, ist dies ein Indiz, dass das integrierte Provirus die Resistenz durch Dysregulation zellulärer Gene vermittelt.

1. Etablierung des Modellsystems

Es konnte gezeigt werden, dass MoMLV induzierte Primärtumore stets sensitiv gegenüber γ -Strahlung waren und durch die Bestrahlung Apoptose induziert wurde. Dennoch halten einige Zellen dem Selektionsdruck der Bestrahlung offensichtlich stand und induzieren nach Transplantation in Empfängertiere stressresistente Sekundärtumore.

Eine mögliche Ursache für die Bestrahlungsresistenz kann sein, dass die Integration des Provirus zur Aktivierung oder Inaktivierung eines funktionell wichtigen Gens führt. Dies ist Grundlage der Arbeitshypothese und soll in den folgenden Abschnitten diskutiert werden. Dennoch können auch integrationsunabhängige Ereignisse für eine Stressresistenz nicht ausgeschlossen werden. So kann die durch Bestrahlung induzierte Schädigung der DNA zu *de novo* Mutationen in Tumorzellen führen. Verhindert eine solche Mutation den Zelltod nach Bestrahlung, können diese Zellen zu Sekundärtumoren auswachsen. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Selektion von Zellen, die einen Defekt in einem Signalweg haben, der zum programmierten Zelltod führt. Von großer Bedeutung im hämatopoetischen System ist der Signalweg der p53 vermittelten Apoptose. Der Tumorsuppressor p53 trägt, wie in der Einleitung beschrieben, zur Eliminierung von Tumorzellen durch Apoptose nach DNA-Schädigung bei. Die eminente Bedeutung von p53 wird vor allem dadurch deutlich, dass 50-60% aller menschlichen Tumore eine Mutation im *p53* Gen aufweisen oder eine Inaktivierung des Proteins zeigen (Hainaut und Hollstein, 2000). Aber auch andere Moleküle der apoptotischen Signalwege sind häufig in humanen Tumoren dysreguliert oder mutiert und werden mit einer gesteigerten Stressresistenz in Verbindung gebracht (Igney und Krammer, 2002). Um auszuschließen, dass die Bestrahlungsresistenz auf

einer Mutation von p53 beruht, wurde der p53-Status der Tumore ermittelt. Weitere Analysen erfolgten dementsprechend nur mit Tumoren, die Wildtyp p53 exprimierten.

2. Selektion von Subklonen nach Bestrahlung

Die erhaltenen T-Zelltumore der Wildtypmäuse waren mono-/oligoklonal und durch Bestrahlung von primären Tumorzellen konnte nicht auf Subklone mit einem veränderten Integrationsmuster selektioniert werden. Anders stellte sich die Situation bei den B-Zelltumoren der transgenen Mäuse dar. Die Primärtumore waren oligo-/polyklonal und nach der Bestrahlung von Primärtumorzellen wuchsen oftmals Subklone aus, die sich durch ein - verglichen mit unbestrahlten Sekundärtumoren - verändertes Integrationsmuster auszeichneten. Die Daten zeigen, dass nur im Falle polyklonaler B-Zelltumore nach der Bestrahlung Subklone mit einem veränderten Integrationsmuster auswuchsen, während dies bei den mono-/oligoklonalen T-Zelltumoren nicht der Fall war. Die Wahrscheinlichkeit, dass von den zahlreichen Zellpopulationen polyklonaler Tumore einige einen Überlebensvorteil nach Bestrahlung haben, ist deutlich größer als bei den wenigen Subklonen der mono-/oligoklonalen Tumore.

Die kurze Latenzzeit der B-Zelltumore mit ihrer Oligo-/Polyklonalität, die selektiven Veränderungen im Integrationsmuster nach Bestrahlung und das Auswachsen bestrahlungsrésistenter Subklone belegen, dass dieses Modell geeignet ist, um Integrationsereignisse zu identifizieren, die durch Dysregulation zellulärer Gene einen Überlebensvorteil nach Stress vermitteln konnten. Die Befunde argumentieren gegen *de novo* Mutationen und belegen die Hypothese, dass Integrationen kausal für die Stressresistenz verantwortlich sein können.

3. Identifikation von Integrationsstellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Integrationsstellen identifiziert werden, die kausal für eine Stressresistenz verantwortlich sein könnten. Ein wichtiges Indiz hierfür ist, dass die Integration in einen Locus mehrfach in unabhängigen bestrahlungsrésistenten Tumoren gefunden wird. Ohne Identifikation der betroffenen Gene und weiterführende funktionelle Studien sind die CIS aber lediglich ein Hinweis dafür, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen Stressresistenz und Integration bestehen könnte.

Erwartungsgemäß wurden in dieser Arbeit Integrationsstellen mehrfach in unabhängigen Tumoren identifiziert. Zur Beantwortung der Frage, ob die gefundenen Integrationsstellen vermehrt in Sekundärtumoren nach Bestrahlung auftraten, wurden die Tumore mit dazugehörigen Kontrolltumoren und den entsprechenden Primärtumoren mit spezifischen Sonden für die jeweiligen Integrationsorte analysiert. Dabei stellten sich der *Bcl2/1* Locus und der *Gadd45 β* Locus als besonders interessant heraus (siehe unten). Für andere Integrationsorte konnten die Integrationen im bestrahlungssensitiven Primärtumor und in bestrahlungssensitiven sowie -résistenten Sekundärtumoren beobachtet werden. Ein solcher Befund bestätigt eine Kooperation der Genprodukte dieser Loci mit c-MYC und

widerlegt die Hypothese, dass Zellpopulationen mit diesen Integrationsereignissen erst durch die Bestrahlung selektiert werden.

4. Validierung des Modells durch Integration im *Bcl2/1* Locus

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Integrationsorte im *Bcl2/1* Locus bestimmt. Eine Integration im zweiten Intron des *Bcl2/1* Gens wurde auch in einer Arbeit von Hwang in retroviral induzierten T-Zelltumoren gefunden (Hwang *et al.*, 2002). Außerdem wurden Integrationen in diesem Locus in T-Zelllinien und myeloiden Zelllinien identifiziert (Packham *et al.*, 1998). Bisher ist eine Integration in diesem Locus weder in B-Zellen noch im E μ -MYC Mausmodell, welches dem hier verwendeten Mausmodell sehr ähnelt, identifiziert worden. Daher stellt die Integration für dieses Modell eine neue CIS dar.

Die Analyse eines Primärtumors und der dazugehörigen Sekundärtumore ergab, dass in zwei Sekundärtumoren mit Wildtyp p53, die aus bestrahlten Primärtumorzellen hervorgegangen sind, eine Integration im großen Intron des *Bcl2/1* Gens vorlag, die zu einer verstärkten Expression des Genprodukts führte. Es soll hervorgehoben werden, dass es sich in den beiden Tumoren um unterschiedliche Integrationen handelt, die über 1000 bp voneinander entfernt sind. Daraus kann gefolgert werden, dass die Integrationsereignisse unabhängig voneinander in verschiedenen Zellen aufgetreten sind. Die Zellen sind nach Bestrahlung der Primärtumorzellen in zwei Rezipienten zu Sekundärtumoren ausgewachsen. Dies deutet darauf hin, dass eine Integration und die dadurch bedingte verstärkte Expression des *Bcl2/1* Gens für die Tumorzellen nach Bestrahlung zu einem Selektionsvorteil führt. Auch ein dritter Sekundärtumor in diesem Tumorsatz zeigte erhöhte Expression des *Bcl2/1* Gens, jedoch ohne detektierbare Integration in diesem Locus. Dies kann die Folge integrationsunabhängiger Ereignisse sein und zeigt, dass Zellen mit einer erhöhten Expression von Bcl-x_L selektiv die Bestrahlung überleben. Es ist auch möglich, dass in diesem Tumor eine Integration im *Bcl2/1* Locus vorlag, die zu einer verstärkten Expression des Gens führte, aber in der Southern-Blot-Analyse mit den verwendeten Sonden nicht detektiert werden konnte. Da die Integrationsstellen dieses Tumor mittels LM/EPTS-PCR detektiert worden sind und keine Integration im *Bcl2/1* Locus gefunden wurde, ist diese Möglichkeit aber unwahrscheinlich. Auch der Einfluss epigenetischer Faktoren auf die Genexpression ist nicht auszuschließen. Die Analyse von einem weiteren Primärtumor mit den dazugehörigen Sekundärtumoren ergab, dass eine Integration im *Bcl2/1* Locus unabhängig von der Bestrahlung in zahlreichen Sekundärtumoren detektiert werden konnte. Diese Integration führte nicht zu einer verstärkten Expression des *Bcl2/1* Gens. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Integration während der Tumorgenese zu einer erhöhten Genexpression führte, später aber durch zelluläre Faktoren herunterreguliert wurde. Außerdem ist denkbar, dass die Integration keinen Effekt auf die Expression hat. Beide Möglichkeiten würden die erzielten Ergebnisse erklären.

Der Befund, dass eine erhöhte Bcl-x_L Expression in Tumorsubklonen gefunden wurde, die nach Bestrahlung überleben, ist nicht überraschend. Für das Protein aus der Bcl-2 Proteinfamilie ist gezeigt, dass es nach einer Vielzahl von Stimuli die Apoptose verhindern

kann (Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003). Dies korreliert mit Studien, die belegen, dass erhöhte Bcl-x_L Mengen eine Therapieresistenz von Tumorzellen aus humanen hämatologischen und soliden Tumoren bewirken (Dole *et al.*, 1995; Findley *et al.*, 1997; Minn *et al.*, 1995). Auch für zwei weitere eng verwandte anti-apoptotische Mitglieder der Proteinfamilie, Bcl-2 (Campos *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 1995) und Mcl1 (Kaufmann *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1997), konnte gezeigt werden, dass sie bei Überexpression zu einer Therapieresistenz beitragen. Ebenso wurde im Mausmodell die durch Bcl-2 verursachte Resistenz gegen verschiedenste Chemotherapeutika und Bestrahlung nachgewiesen (Schmitt *et al.*, 2000). Die Identifikation des *Bcl2l1* Locus als CIS nach Bestrahlung kann demnach als Bestätigung des methodischen Ansatzes dieser Arbeit gewertet werden. Es konnte folglich ein System etabliert werden, in dem retrovirale Insertionsmutagenese angewendet wurde, um zelluläre Gene zu identifizieren, deren Produkte eine Stressresistenz vermitteln und so zu einer Therapieresistenz beitragen können.

5. Integration in den *Gadd45β* Locus

Die interessanteste Integration, die in dieser Arbeit gefunden wurde, betrifft den *Gadd45β* Locus. Eine Analyse der verfügbaren Literatur sowie der Datenbanken ergab, dass in diesem Locus noch nie eine retrovirale Integration gefunden worden ist, unabhängig vom Mausmodell, der Tumorart und dem benutzten Retrovirus. Damit handelt es sich bei diesem Locus um eine völlig neue *common integration site*. Diese konnte hauptsächlich in Sekundärtumoren nach Bestrahlung, aber in keinem Primärtumor detektiert werden.

In einem Tumorsatz wurden Integrationen vermehrt in Sekundärtumoren aus bestrahlten Zellen gefunden, die in allen Fällen etwa 5-fach erhöhte Transkriptmengen des *Gadd45β* Gens bewirkten. Jedoch wurde auch in zwei Tumoren ohne Integration eine stark erhöhte Transkription des Gens detektiert. Eine Analyse dieser Tumore mittels LM/EPTS-PCR ergab, dass eine Integration im *Tp12* Locus vorlag. *Tp12* aktiviert den Transkriptionsfaktor NF-κB (Das *et al.*, 2005), einen bekannten Aktivator von *Gadd45β*, und bietet so eine mögliche Erklärung für die verstärkte Expression von *Gadd45β* in den beiden Tumoren. Der zweite Tumorsatz zeigte ähnliche Befunde. Hier konnte eine Integration ausschließlich in Sekundärtumoren detektiert werden, die sich aus bestrahlten Tumorzellen entwickelt hatten. Diese Integration führte in zwei von drei getesteten Tumoren zu einer erhöhten Transkription. Überraschend war die Tatsache, dass die erhöhte Transkription nicht in allen drei getesteten Tumoren mit Integration gefunden wurde. Es ist denkbar, dass in dem für die Expressionsanalyse eingesetzten Tumor keine Integration vorlag. Eventuell liegt in diesem Fall aber auch eine negative Regulation der Expression durch andere in dem Tumor vorhandene Faktoren vor.

Die Expression von *Gadd45β* wird durch zahlreiche verschiedene Stimuli induziert, unter anderem durch den *tumor necrosis factor α* (TNFα) in Mausembryo-Fibroblasten (De Smaele *et al.*, 2001), durch den *transforming growth factor β* (TGFβ) in der myeloischen Leukämie-Zelllinie M1, der Pankreas-Zelllinie Panc-1 und der murinen Hepatocyten-Zelllinie AML12 (Selvakumaran *et al.*, 1994; Takekawa *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2003), durch genotoxische Agenzien in 3T3 und M1 Zellen (Takekawa und Saito, 1998; Zhan *et*

al., 1994), durch terminale Differenzierungssignale in M1 Zellen (Vairapandi *et al.*, 1996; Zhan *et al.*, 1994), durch inflammatorische Cytokine (IL12 und IL18) in T_H1 Zellen (T-Helfer Zellen) (Yang *et al.*, 2001), durch den T-Zellrezeptor-Signalweg (Lu *et al.*, 2004) sowie durch Stimulation der angeborenen Immunantwort durch Lipopolysaccharid in Macrophagen (Lang *et al.*, 2002). Die transkriptionelle Aktivierung von *gadd45β* scheint prinzipiell durch zwei verschiedene Wege möglich zu sein. Zum einen gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor NF-κB (De Smaele *et al.*, 2001; Eliseev *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005) und zum anderen durch Smad-Transkriptionsfaktoren (Major und Jones, 2004; Takekawa *et al.*, 2002).

Die DNA-Analysen und die Expressionsdaten zeigten, dass eine Integration und die dadurch erreichte verstärkte Expression des *Gadd45β* Gens vermehrt in Sekundärtumoren detektierbar war, die sich aus bestrahlten Tumorzellen entwickelt hatten. Dieser Befund führte zu einer näheren Charakterisierung von *Gadd45β*, da der Schluss nahe lag, dass eine verstärkte Expression von *Gadd45β* einen Vorteil nach Transplantation und Bestrahlung bietet.

6. Funktionelle Analysen von *Gadd45β*

Ebenso vielfältig wie die induzierenden Stimuli sind die Konsequenzen der *Gadd45β* Induktion. So konnte gezeigt werden, dass *Gadd45β* eine Rolle beim Überleben von Zellen (De Smaele *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2006a; Gupta *et al.*, 2005; Papa *et al.*, 2004a; Zazzeroni *et al.*, 2003), bei der Apoptose (Takekawa und Saito, 1998; Vairapandi *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2003), bei der Kontrolle des Zellzyklus (Vairapandi *et al.*, 2002), bei der angeborenen Immunität und bei Entzündungsreaktionen (Lang *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2001) spielt. *Gadd45β* vermittelt seine Funktion durch Interaktion mit zahlreichen Proteinen. So gehören MAPK Kinasen (MKK7) (Papa *et al.*, 2004a), MAPKK Kinasen (MTK1/MEKK4) (Takekawa und Saito, 1998), Cyclin abhängige Kinasen (Cdk1) (Vairapandi *et al.*, 2002) und Cdk-Inhibitoren (p21) zu den Interaktionspartnern. Aber auch andere Proteine, zum Beispiel das nukleäre Protein PCNA, interagieren mit *Gadd45β* (Vairapandi *et al.*, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst geklärt werden, aus welchem Grund eine erhöhte *Gadd45β* Expression einen Vorteil für Zellen bietet. Da eine erhöhte Expression von *Gadd45β* nicht ausschließlich in Tumoren gefunden wurde, die aus bestrahlten Zellen entstanden sind, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei *Gadd45β* um ein Onkogen handelt. Ein Versuch mit *Gadd45β* überexprimierenden Fibroblasten bestätigte diese Hypothese, da *Gadd45β* überexprimierende Zellen Tumore *in vivo* bildeten. Hier soll angemerkt werden, dass auch die Kontrollzellen in der Lage waren, diese Tumore *in vivo* zu induzieren. Diese bildeten sich allerdings nach einer wesentlich längeren Latenzzeit und waren deutlich kleiner. Zunächst waren diese Befunde überraschend, da dieses Phänomen bei untransformierte Zellen nicht auftreten sollte. Es wurden auch in einer Studie zum Transformationspotential des Proteins Ron mit NIH3T3 Zellen Tumore in Kontrollen gefunden, die ebenfalls eine längere Latenzzeit und eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit aufwiesen (Peace *et al.*, 2001). In einer anderen Studie wurde

darauf verwiesen, dass NIH3T3 Fibroblasten manchmal spontane Transformation zeigen (Bromberg *et al.*, 1999). Dies liefert eine mögliche Erklärung für die erzielten Ergebnisse.

Nach der Identifikation von *Gadd45 β* als Onkogen sollte evaluiert werden, auf welchem Mechanismus die tumorigene Aktivität des Proteins beruht. Da eine verstärkte *Gadd45 β* Expression vor allem in Tumorsubklonen gefunden worden war, die nach Bestrahlung überlebten, lag die Hypothese nahe, dass *Gadd45 β* ein Inhibitor des apoptotischen Zelltods sein könnte. Dieses wurde in zwei verschiedenen Zelllinien getestet. Dabei zeigte sich, dass lediglich Bcl-x_L überexprimierende Zellen vor Apoptose geschützt waren, *Gadd45 β* jedoch keinen Schutz vor strahleninduzierter Apoptose bot. Die Tatsache, dass Bcl-x_L Zellen vor dem kontrollierten Zelltod schützt, war nicht überraschend, da bekannt ist, dass Bcl-x_L Apoptose verhindern kann, indem es die Entlassung von pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien nach zahlreichen Stimuli inhibiert (Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003). Überraschend waren hingegen die Befunde zu *Gadd45 β* . In *Gadd45 β* überexprimierenden Zellen konnte keine Veränderung in der Fähigkeit zur strahleninduzierten Apoptose festgestellt werden. Dies ist insofern überraschend, als dass verschiedene Studien sowohl einen pro- als auch eine anti-apoptotische Rolle von *Gadd45 β* belegen. Eine Serie von Arbeiten konnte zeigen, dass *Gadd45 β* ein wichtiges pro-apoptotisches Molekül ist. In zahlreichen Zelllinien und primären Zellen wirkte *Gadd45 β* nach Applikation von TGF β pro-apoptotisch (Selvakumaran *et al.*, 1994; Yoo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2001). Andere Arbeiten zeigten, dass die Expression von *Gadd45 β* an sich cytotoxisch war und Apoptose induzierte (Takekawa und Saito, 1998; Vairapandi *et al.*, 2000). Letztere Beobachtung konnte in beiden für diese Arbeit verwendeten Zelllinien allerdings nicht gemacht werden. Auch in anderen Studien konnten stabile, *Gadd45 β* überexprimierende Zellklone für Untersuchungen gewonnen werden, ohne dass cytotoxische Effekte beschrieben wurden (Chi *et al.*, 2004; Smith und Mocarski, 2005; Yang *et al.*, 2001; Zerbini *et al.*, 2004). Mechanistisch wurde gezeigt, dass der pro-apoptotische Effekt auf der Aktivierung von *Gadd45 β* durch Smad-Transkriptionsfaktoren nach TGF β -Stimulation beruht. *Gadd45 β* ist dann in der Lage das Protein MTK1/MEKK4, eine MAPKK Kinase, zu aktivieren, die den p38 Signalweg, welcher zur Apoptose führen kann, induziert (Takekawa *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2003). Eine Modellvorstellung aus der Publikation von Takekawa und Kollegen ist in Abbildung 31 leicht verändert dargestellt (Takekawa *et al.*, 2002).

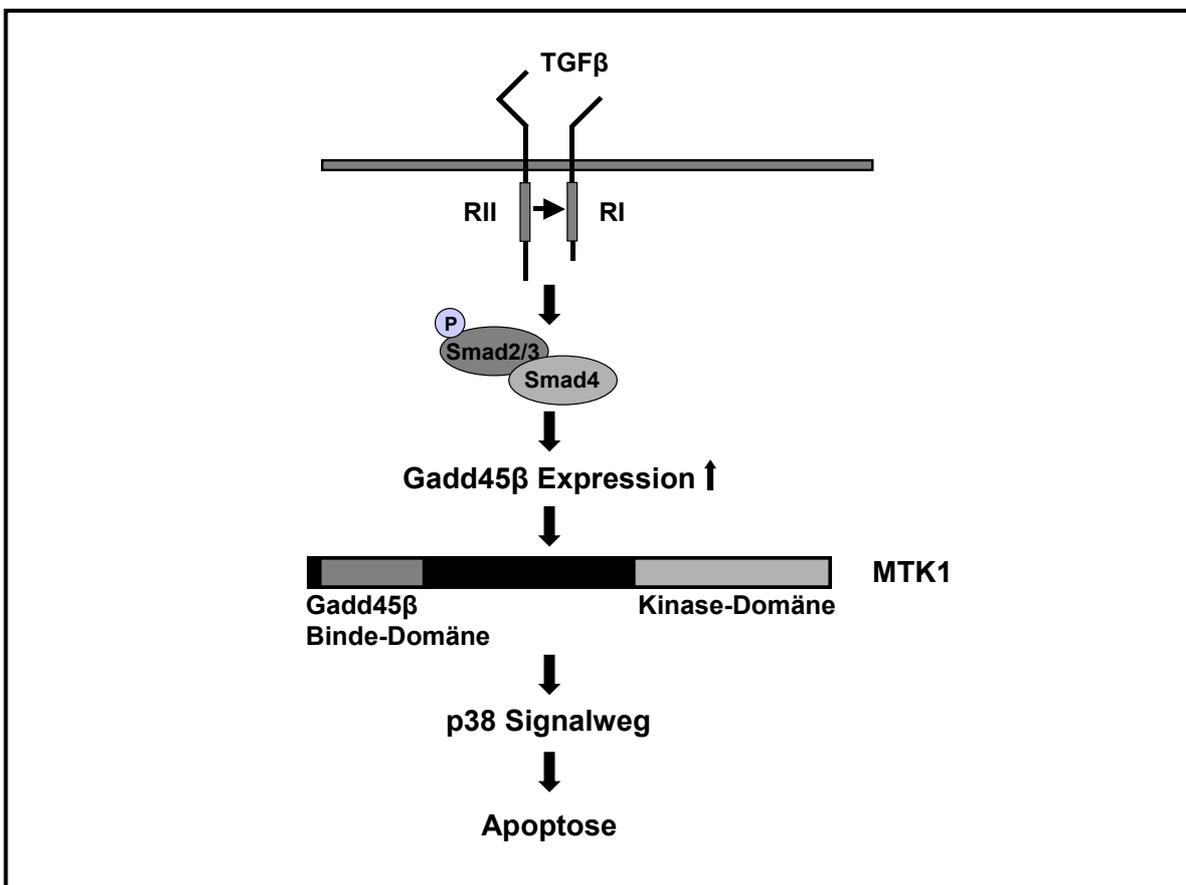


Abbildung 31 Modell der TGFβ vermittelten Apoptose. Nach Bindung von TGFβ an den zellulären Rezeptor phosphoryliert und aktiviert TβRII TβRI. TβRI phosphoryliert daraufhin Smad2 oder Smad3. Daraus resultiert die Formierung stabiler Heterodimere mit Smad4. Dieser Komplex induziert im Nucleus eine verstärkte *Gadd45β* Expression. *Gadd45β* bindet und aktiviert MTK1 und verursacht so eine p38 Aktivierung. Durch Translokation von p38 in den Nucleus werden Zielgene über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren induziert und führen zu Apoptose (Takekawa *et al.*, 2002).

Eine weitere Serie von Arbeiten konnte dagegen zeigen, dass *Gadd45β* eine anti-apoptotische Funktion erfüllt. Es wurde gezeigt, dass *Gadd45β* ein durch NF-κB auf Transkriptionsebene reguliertes Schlüsselprotein ist, das in der Lage ist, den pro-apoptotischen JNK-Signalweg nach TNFα Applikation zu inhibieren (De Smaele *et al.*, 2001). Die Inhibition des JNK-Signalwegs wird durch Bindung von *Gadd45β* an MKK7/JNKK2 und die daraus resultierende Inhibition der Kinase-Aktivität von MKK7 vermittelt (Papa *et al.*, 2004a). Diese Experimente, kombiniert mit Befunden aus anderen Studien, ermöglichten die Aufstellung eines Modells, wie die JNK-vermittelte Apoptose, unabhängig von der Modulation der Genexpression durch JNK, abläuft und durch *Gadd45β* inhibiert werden kann (Abbildung 32 aus (Papa *et al.*, 2004b)). Die Aktivierung von JNK durch TNFα kann zu einer Caspase 8 unabhängigen Spaltung des pro-apoptotischen Moleküls Bid führen. Das Spaltprodukt *β*Bid löst dann an den Mitochondrien die selektive Freigabe von Smac/DIABLO aus, einem Faktor, der im Cytosol durch Bindung an IAP1 (*inhibitor of apoptosis protein*) Caspase 8 freisetzt und so Apoptose induziert (Deng *et al.*, 2003). Im Modell wird dieser Prozess durch *Gadd45β* vermittelte Inhibition von MKK7 und damit von JNK unterbunden. Einen weiteren Beweis für die anti-apoptotische Aktivität von *Gadd45β* lieferte eine Studie, in der gezeigt wurde, dass das Protein in Burkitt Lymphom-Zelllinien den protektiven Effekt von CD40 Kostimulation gegen Fas induzierte Apoptose

vermittelt. Gadd45 β zeigte in diesen Zelllinien nach verschiedenen apoptotischen Stimuli jedoch keinen Effekt auf mitochondrial vermittelte Apoptose (Zazzeroni *et al.*, 2003). Dagegen konnte eine andere Arbeit belegen, dass Gadd45 β auch die mitochondrial vermittelte Apoptose verhindert (Eliseev *et al.*, 2005).

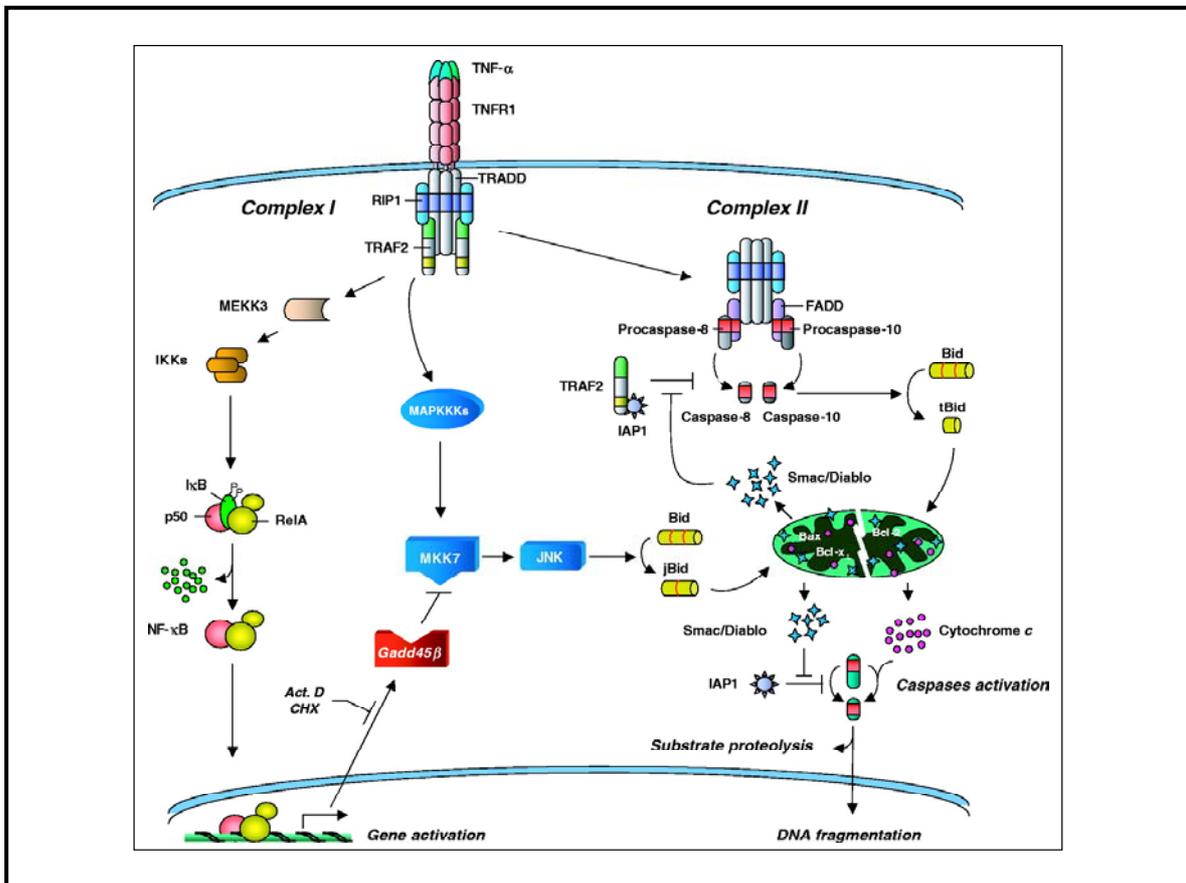


Abbildung 32 Modell zum Schutz vor Apoptose durch Gadd45 β . Die Formation des Komplex I nach TNF α Applikation führt zu NF- κ B Aktivierung, Gadd45 β Induktion, JNK-Inhibition und zum Überleben der Zelle. Auch gezeigt ist die JNK-Aktivierung, die in Formation von jBid resultiert. jBid vermittelt den Zelltod durch die Entlassung von Smac/DIABLO ins Cytosol, wodurch der TRAF2-IAP1 Komplex inhibiert und Caspase 8 aktiviert wird. Die Gadd45 β -MKK7 Interaktion, die diesen Weg inhibiert, ist ebenfalls gezeigt. Quelle: Papa *et al.*, 2004b.

Weitere Arbeiten, in denen die Reaktion von Gadd45 β ^{-/-} Knochenmarkszellen auf genotoxischen Stress untersucht wurde, belegten ebenfalls eine anti-apoptotische Rolle für Gadd45 β . Zuerst konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Zellen von Gadd45^{-/-} Mäusen nach Induktion von genotoxischem Stress vermehrt in Apoptose gehen, während Gadd45 β -Expression in diesen Zellen den Wildtypphänotyp wieder herstellen konnte (Gupta *et al.*, 2005). In einer weiteren Veröffentlichung wurde der Versuch unternommen, diesen Effekt mechanistisch aufzuklären. Konform mit dem oben dargestellten Modell konnte gezeigt werden, dass lang andauernde JNK-Aktivität in Gadd45 β ^{-/-} Knochenmarkszellen mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber UV-vermittelter Apoptose assoziiert ist. In den Versuchen wurde gezeigt, dass UV-induziertes Gadd45 β die JNK-Aktivität inhibiert und so zum Überleben der Zellen beiträgt (Gupta *et al.*, 2006a). Gadd45 β defiziente Knochenmarkszellen zeigen außerdem eine ausgeprägtere apoptotische

Antwort auf Cytokinstimulation als Zellen von Wildtypmäusen (Gupta *et al.*, 2006b) und belegen damit ebenfalls die anti-apoptotische Aktivität des Proteins.

In keiner der bisher erwähnten Studien konnte eine Aktivierung des ERK-Signalwegs festgestellt werden, obwohl dieser Signalweg in einigen Studien explizit untersucht wurde (De Smaele *et al.*, 2001; Takekawa und Saito, 1998; Yoo *et al.*, 2003). Dennoch zeigte eine Arbeitsgruppe, dass ERK, NF- κ B und Gadd45 β in der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 durch ionisierende Strahlung koaktiviert werden und ein Netzwerk bilden, um die Zellen vor der induzierten Cytotoxizität zu schützen (Wang *et al.*, 2005).

Zusammengefasst zeichnen alle oben diskutierten Studien ein kontroverses Bild von Gadd45 β und dem Einfluss des Proteins auf die Apoptose. Wahrscheinlich bestimmen viele Faktoren wie Zelltyp, Stress-Stimulus und die interagierenden Proteine die Konsequenz der Gadd45 β -Aktivierung. So konnte sowohl für Rezeptor vermittelte Apoptose, als auch für die mitochondrial vermittelte Apoptose eine anti-apoptotische Rolle für Gadd45 β belegt werden, während das Protein nach TGF β -Stimulation eine pro-apoptotische Rolle spielt. In beiden Fällen moduliert Gadd45 β durch Interaktion die Aktivität von Kinasen der MAPK Familie.

7. Protektiver Effekt von Gadd45 β nach Serumentzug

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Einfluss auf die strahleninduzierte Apoptose in den beiden benutzten Zelllinien festgestellt werden. Es wäre durchaus denkbar, dass Gadd45 β dennoch im Originalsystem eine anti-apoptotische Funktion erfüllt und daher in bestrahlten Sekundärtumoren als CIS detektiert wurde. Um dies zu belegen, wäre die retrovirale Überexpression von Gadd45 β in primären Tumorzellen ein ideales Testsystem. Diese Versuche scheiterten jedoch daran, dass die primären Tumorzellen in Kultur zu einem Großteil starben. Dieser Effekt war bereits von primären Zellen aus dem E μ -MYC Modell bekannt, da auch hier innerhalb von 20 Stunden mehr als 80% der kultivierten B-Zellen starben (Egle *et al.*, 2004). Zwar gelang Schmitt und Kollegen die retrovirale Infektion von primären Tumorzellen aus E μ -MYC Mäusen mit Expressionsvektoren (Schmitt *et al.*, 2002a; Schmitt *et al.*, 2000), dennoch gingen auch hier zahlreiche kultivierte Tumorzellen in Apoptose. Die überlebenden Zellen zeigten häufig starke Veränderungen durch die Zellkulturbedingungen, die sich in einer Apoptoseresistenz widerspiegelten. Weitere Versuche im Rahmen dieser Arbeit legen zudem den Schluss nahe, dass Gadd45 β auch unabhängig von einem Einfluss auf die Apoptose für eine Stressresistenz verantwortlich sein kann.

Statt des erwarteten anti-apoptotischen Potentials von Gadd45 β konnte in dieser Arbeit erstmals ein profunder Einfluss von Gadd45 β auf das Überleben von Zellen nach Serumentzug bewiesen werden. Dies zeigt deutlich, dass Gadd45 β den Zelltod nach bestimmten Stimuli verhindern kann. Der Zelltod nach Serumentzug ist bisher nur schlecht charakterisiert. In einigen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass der Zelltod nach Serumentzug ohne DNA-Fragmentierung abläuft und die Protease Caspase 3 nicht aktiviert wird (Leicht *et al.*, 2003). Dagegen wurde in anderen Arbeiten sowohl eine aktivierte Caspase 3 als auch DNA-Fragmentierung detektiert (Paddenberg *et al.*, 2001).

Wiederum andere Studien zeigten DNA-Fragmentierung, die durch *TUNEL-Assays* (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labeling*) detektierbar war, sich aber nicht in den typischen apoptotischen Leitern äußerte, die durch eine Endonuklease erzeugt werden, welche DNA internukleosomal in 180 bp große Fragmente schneidet (Kues *et al.*, 2002). Diese Untersuchungen beschreiben aber lediglich einige diagnostische Charakteristika der Apoptose. Die Bezeichnung Apoptose beruht auf morphologischen Merkmalen und ist durch Reduktion des Zellvolumens (Pyknose), Chromatinkondensation, Fragmentierung des Nukleus (Karyohexis), geringe oder keine ultrastrukturellen Veränderungen der cytoplasmatischen Organellen, Formation von Ausstülpungen der Zellmembran und den Erhalt der Cytoplasmamembran während des Prozesses der Apoptose gekennzeichnet (Kerr *et al.*, 1972). Elektronenmikroskopische Studien ergaben, dass nach Serumentzug zwar Merkmale der Apoptose, nämlich die Chromatinkondensation und die Ausstülpung der Zellmembran ausgeprägt sind, zeigten aber auch abrupte Zellyse und die Zerstörung von Organellen in späteren Stadien, was gegen einen kontrollierten apoptotischen Zelltod spricht (Simm *et al.*, 1997). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte nur eine schwache Caspase 3 Aktivierung und nur in wenigen Zellen eine DNA-Fragmentierung ausgemacht werden. Dies zeigt, dass es sich bei dem Zelltod nach Serumentzug nicht um einen streng apoptotischen Prozess handelt. Die vorliegende Arbeit belegt, dass der Zelltod durch Serumentzug durch Expression von Gadd45 β inhibiert werden kann. Daraus folgt, dass Gadd45 β offensichtlich nicht-apoptotische Wege des Zelltods blockieren kann.

Es ist zu spekulieren, aus welchen Gründen Gadd45 β überexprimierende Tumorzellen einen so klaren Vorteil nach Bestrahlung und Transplantation haben. Eine Ursache könnte im experimentellen System liegen. Die Zellen der Primärtumore wurden in serum-freien Medium transplantiert, da die Injektion von FCS in Mäusen eine starke Immunreaktion auslösen kann. Auch wenn der Zeitraum des Serumentzugs extrem kurz war, ist es dennoch möglich, dass dadurch Zellen selektiert wurden, die diesen Serumentzug besser überleben konnten, also Gadd45 β überexprimierende Zellen. Da die Bestrahlung erwiesenermaßen einen Großteil der Zellen abtötet, besteht die Möglichkeit, dass Gadd45 β überexprimierende Zellen diese Doppelbelastung Serumentzug/ Bestrahlung bevorzugt überleben.

Es stellt sich jedoch die Frage, ob Tumorzellen nach Applikation von Bestrahlung oder Chemotherapeutika *in vivo* tatsächlich ausschließlich durch p53-vermittelte Apoptose eliminiert werden. Zwar konnten Studien belegen, dass mehr als 90% primärer Tumorzellen aus E μ -MYC Mäusen durch Applikation verschiedener Chemotherapeutika und durch γ -Strahlung durch p53-vermittelte Apoptose eliminiert wurden (Schmitt *et al.*, 2002a; Schmitt *et al.*, 2000). Aber auch wenn aufgrund zahlreicher Studien Apoptose als Ursache für die Eliminierung von Tumorzellen allgemein anerkannt ist, soll darauf hingewiesen werden, dass andere Mechanismen ebenso dazu beitragen können. So zeigte eine Arbeit, dass E μ -MYC Lymphome nicht nur mit Apoptose auf die Therapie reagieren, sondern auch durch Induktion eines Seneszenzprogramms. Die Induktion des von p16^{INK4a} induzierten Seneszenzprogramms trug in dem Versuchsansatz zum Ausgang der Therapie bei, was eindrucksvoll dadurch bewiesen wurde, dass Mäuse mit Tumoren mit einem

intakten Seneszenzprogramm eine deutlich bessere Prognose nach Chemotherapie hatten, als solche mit Seneszenz defekten Tumoren (Schmitt *et al.*, 2002b). Neben Apoptose und Seneszenz können Tumorzellen nach der Induktion eines DNA-Schadens zudem durch Nekrose, mitotische Katastrophe und Autophagie eliminiert werden (Okada und Mak, 2004). Die Form des Zelltods hängt dabei vom Kontext ab, also dem Zelltyp, dem Genotyp der Zelle, der Art des induzierten Schadens und der Dosis, die zur Schadensinduktion gewählt wurde (Brown und Attardi, 2005).

Eine neuere Modellvorstellung besagt, dass die Mehrheit der Tumorzellen durch Therapie zwar durch Apoptose eliminiert wird, dass aber parallel dazu auch noch andere Wege des Zelltods existieren und zur Eliminierung von Tumorzellen in der Therapie beitragen (Kroemer und Jaattela, 2005; Okada und Mak, 2004). Es ist bekannt, dass zum Beispiel die Inhibition von Caspasen den Zelltod nicht verhindert, sondern dass dies lediglich zu einer Verschiebung der Morphologie des Zelltods führt. Statt durch „klassische“ Apoptose werden die Zellen durch Apoptose ähnlichen Zelltod (es fehlen Merkmale wie Chromatin-Kondensation, Karyohexis und DNA-Fragmentierung), Autophagie oder Nekrose eliminiert (Kroemer und Martin, 2005). Hieraus lässt sich ein Modell zur Erklärung der erzielten Ergebnisse entwickeln. Ist Gadd45 β in der Lage, einen essentiellen alternativen Weg des Zelltods zu inhibieren, wachsen die Zellen nach Bestrahlung und Transplantation zu einem Sekundärtumor aus. Diese Modellvorstellung ist in Abbildung 33 gezeigt. Ein letztendlicher Beweis für die Richtigkeit dieses Modells würde jedoch weiterer *in vivo* Evidenzen bedürfen. Die Daten dieser Arbeit und auch oben erwähnte Studien zeigen, dass ein Großteil der Zellen durch klassische Apoptose eliminiert wird. Daher ist zu erwarten, dass der große Anteil apoptotischer Zellen jede andere Zellpopulation, die durch alternative Mechanismen eliminiert wird, in den meisten experimentellen Systemen kaschiert.

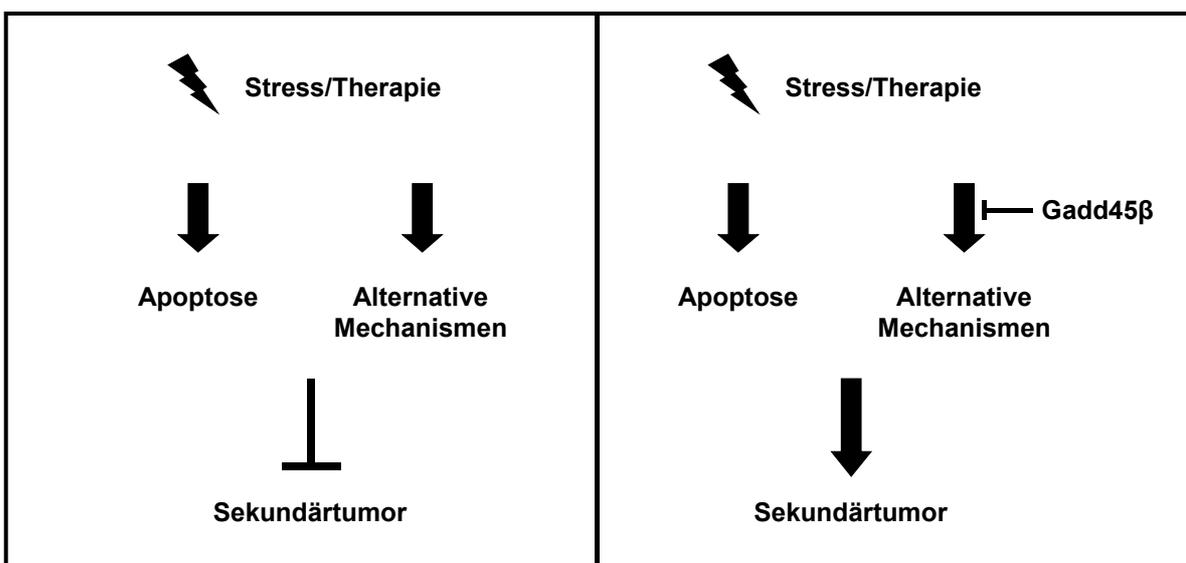


Abbildung 33 Modell zur Gadd45 β vermittelten Stressresistenz. In Tumorzellen führt Stress, zum Beispiel bei der Therapie, zur Eliminierung der Tumorzellen primär durch Apoptose, daneben jedoch auch durch andere Mechanismen des nicht-apoptotischen Zelltods. Gadd45 β ist in der Lage, einen essentiellen alternativen Mechanismus zu inhibieren und verhindert so die Eliminierung der Tumorzellen.

Auch wenn der Zelltod nach Serumentzug nur unzureichend definiert ist, ist es möglich, dass auch dieser nicht-apoptotische Mechanismus zu einem Therapieerfolg beitragen kann. Die Relevanz alternativer zum Zelltod oder zur dauerhaften Wachstumsinhibition führender Mechanismen für die Therapie ist bislang nur ungenügend geklärt. Die meisten Hinweise auf ihre Existenz stammen aus Zellkulturstudien. Es gibt aber Hinweise, dass sie auch *in vivo* eine Rolle für die Eliminierung von Zellen spielen. So konnte gezeigt werden, dass Seneszenz auch *in vivo* zum Ausgang einer Therapie beiträgt (Schmitt *et al.*, 2002b). Obwohl die meisten Hinweise auf Autophagie aus Zellkulturexperimenten stammen, gibt es Indizien, dass Autophagie auch *in vivo* bei der Therapie eine Rolle spielen kann, da Inhibitoren der Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), die normalerweise die Autophagie verhindert (Kroemer und Jaattela, 2005), Tumorregression in Patienten mit Nierenkarzinomen induzieren (Dutcher, 2004). Jedoch ist nicht bekannt, in welchem Ausmaß der Autophagie induzierende Effekt des Medikaments dazu beiträgt. Wahrscheinlich spielen also zahlreiche synergistisch wirkende Mechanismen bei der Eliminierung von Tumorzellen in der Therapie eine Rolle (Brown und Attardi, 2005; Johnstone *et al.*, 2002; Okada und Mak, 2004).

Das etablierte Mausmodell erwies sich in dieser Arbeit als sehr geeignet zur Identifikation von Stressresistenzgenen. Dennoch korrelierte erhöhte Expression nicht immer mit einer vorhandenen Integration. Es würde sich in Zukunft anbieten durch Microarray-Untersuchungen stressresistenter Tumore weitere Gene zu identifizieren, die häufig eine veränderte Expression zeigen. Die in dieser Arbeit erbrachten Befunde zeigen, dass Gadd45 β eine Rolle beim Überleben von Tumorzellen unter Stressbedingungen spielt, indem das Protein den nicht-apoptotischen Zelltod inhibiert. Damit konnte die These unterstützt werden, dass alternative Wege des Zelltods eine elementare Rolle bei der Therapie maligner Erkrankungen spielen. In Zukunft könnte die Induktion von nicht-apoptotischem Zelltod einen Ansatzpunkt für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien bieten, eventuell sogar durch Inhibition von Gadd45 β .

VII Abkürzungsverzeichnis

ALV	<i>Avian Leukosis-Sarcoma Virus</i>
bp	Basenpaar
CD	Zelluläre Oberflächenproteine auf Zellen des Immunsystems
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
CDS	Codierende Sequenz
CIS	<i>Common Integration Site</i>
cpm	<i>Counts per Minute</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
<i>env</i>	Gen für retrovirale Hüllproteine
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FITC	Fluorescein
<i>gag</i>	Gen für die retroviralen Kapsidproteine
Gy	Gray
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horse-Radish Peroxidase</i>)
IE	Infektiöse Einheiten
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle
kb	1000 Basenpaare; Kilobasen
LCA	Oberflächenprotein auf Leukozyten (<i>Leucocyte common antigen</i>)
LM/EPTS-PCR	<i>Ligation-Mediated Extension Primer Tag Selection PCR</i>
Lkz	Leukozyten
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MEF	Mausembryo-Fibroblasten
MGI	<i>Mouse Genome Informatics</i>
MLV	Murines Leukämievirus
MoMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MPE	Magnetischer Partikel Extraktor

pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS	Primerbindestelle
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
<i>pol</i>	Gen für die retroviralen Enzyme
PPT	Polypurin-Bereich (<i>polypurine tract</i>)
PRE	Post-transkriptionelles regulatorisches Element
rpm	Umdrehungen pro Minuten (<i>Rounds per Minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SD	<i>Splice Donor</i>
SFFV	<i>Spleen Focus Forming Virus</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	Tumornekrose Faktor
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labeling</i>
U 3	<i>unique 3</i>
U 5	<i>unique 5</i>
UTR	Untranslatierte Region
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-Galactopyranosid

VIII Anhang

Tabelle 5 Identifizierte Integrationsstellen. Hier aufgeführt sind die Integrationsstellen mit Angaben der Lokalisation auf dem Chromosom und in welcher Maus die Integrationsstelle gefunden wurde. Die Kandidatengene sind mit einer kurzen Beschreibung und der dazugehörigen Identifikationsnummer der MGI-Datenbank (*mouse genome informatics*) notiert. Außerdem ist der Integrationsort in Relation zum Gen angegeben, und ob es sich um eine CIS handelt. Us: stromaufwärts vom Gen; ds: stromabwärts vom Gen; UTR: untranslatierte Region

Chr	Mb	Maus	Symbol	Beschreibung	Integration	MGI	CIS
1	35,6	RM 299	keine				
1	134,16	RM 299	Nuak2	NUAK Familie, SNF1-ähnliche Kinase	4,8 kb ds	MGI:1921387	
1			Tmcc2	Transmembran- und <i>coiled-coil</i> Domäne 2	17,7 kb ds	MGI:1916125	
1			Ripk5	Serin/Threonin-Kinase	79 kb us	MGI:1925064	
1	137,99	RM 257	Kif21b	Kinesin Familie, Microtubuli-bindendes Protein	Intron-Exon	MGI:109234	
2	18,52	RM 299	Bmi1/Pcgf4	Polycomb-Komplex Protein BMI-1	68,3 kb us	MGI:88174	Ja
2	18,59	RM 68	Bmi1/Pcgf4	Polycomb-Komplex Protein BMI-1	in 5' UTR	MGI:88174	Ja
2	18,6	RM 133	Bmi1/Pcgf4	Polycomb-Komplex Protein BMI-1	10 kb ds	MGI:88174;	Ja
2	18,6	RM 176; RM 182	Bmi1/Pcgf4	Polycomb-Komplex Protein BMI-1	2,2 kb ds	MGI:88174	Ja
2	28,6	RM 222	Ralgds	Ral-Guanin-Nukleotid Dissoziationsstimulator	44,7 kb ds	MGI:107485	
2			Cel	Gallensalz-aktivierter Lipase Vorläufer	34,5 kb us	MGI:88374	
2			Gfi1b	<i>growth factor independence 1B</i>	11,5 kb ds	MGI:1276578	
2	32,23	RM 222	Pompt1	Protein O-Mannosyl-Transferase 1	14,5 kb us	MGI:2138994	
2			Uck1	Uridin-Cytidin Kinase 1	32,8 kb ds	MGI:98904	
2	45,3	M 47	Zfx1b	Zinkfinger Homeobox Protein 1b	164 kb ds	MGI:1344407	Ja
2	90,93	RM 222	Cugbp1	CUG RNA-Bindeprotein 1	63 kb ds	MGI:1342295	
2			Rapsn	Rezeptor-assoziiertes Protein von Synapsen	34,4 kb ds	MGI:99422	
2			Psmc3	26S Protease regulatorische Untereinheit	20,7 kb ds	MGI:1098754	
2			Sfp1	Transkriptionsfaktor PU.1	16,4 kb us	MGI:98282	Ja
2	117,07	RM 176	Rasgrp1	<i>RAS Guanyl releasing protein 1</i>	Intron 1-2	MGI:1314635	Ja
2	118,54	RM 222	Plcb2	Phospholipase C, beta 2	75,43 kb us	MGI:107465	
2			lvd	Isovaleryl-CoA Dehydrogenase, mitochondrialer Vorläufer	57,6 kb us	MGI:1929242	
2			Disp2	<i>dispatched homolog 2</i>	8,7 kb ds	MGI:2388733	
2	150,58	RM 86	Pygb	Glycogen-Phosphorylase	53,8 kb ds	MGI:97828	
2	152,25	RM 67	Bcl2l1	Apoptoseregulator Bcl-x _L	Intron 1-2	MGI:88139	Ja
2	152,28	RM 212	Bcl2l1	Apoptoseregulator Bcl-x _L	Intron 1-2	MGI:88139	Ja
2	158,19	RM 212	Ppp1r16b	TGFβ-inhibiertes Membrane-assoziiertes Protein	Intron 3-4	MGI:2151841	
2	165,64	RM 227	Prkcbp1	hypothetisches Protein	72 kb us	MGI:1918025	
2			ncoa3	Nukleärer Rezeptor, Koaktivator 3	80,4 kb us	MGI:1276535	
2	166,23	RM 123	keine				
2	168,04	RM 238	keine				
3	52,53	RM 227	foxo1	<i>forkhead box O1a</i>	95 kb ds	MGI:1890077	
3	95,73	RM 178	Mcl1	EAT/MCL-1 Protein, Apoptoseregulator	4,4 kb us	MGI:101769	Ja
3			Ensa1	Endosulfon Alpha, Isoform a	22,2 kb ds	MGI:1891189	
3			Ecm1	extrazelluläres Matrixprotein 1	79,75 kb ds	MGI:103060	
3	95,73	RM 299	Ctss1	Cathepsin S Vorläufer	89,5 kb ds	MGI:107341	
3			Ensa	Endosulfon Alpha, Isoform a	13,5 kb ds	MGI:1891189	
3			Ecm1	extrazelluläres Matrixprotein 1	88,24 kb ds	MGI:103060	
3			Mcl1	EAT/MCL-1 Protein, Apoptoseregulator	12,9 kb us	MGI:101769	Ja
3	96,64	RM 257	Txnib	Thioredoxin interagierendes Protein	Exon-Intron	MGI:1889549	
3			Hfe2	Hemojuvelin Vorläufer	29,18 kb ds	MGI:1916835	
3			Rbm8a	RNA-Bindeprotein 8A	71,44 kb us	MGI:1913129	
3			Pex11b	peroxisomales Membranprotein 11B	86,23 kn us	MGI:1338882	
4	134,4	RM 238	Runx3	Runt Transkriptionsfaktor 3	Intron 1-2	MGI:102672	Ja

4			Clic4	Chloridkanal-Protein 4	35,9 kb ds	MGI:1352754	Ja
4	134,51	RM 212	Runx 3	Runt Transkriptionsfaktor 3	15 kb us	MGI:102672	Ja
4			Clic 4	Chloridkanal-Protein 4	75 kb ds	MGI:1352754	Ja
4	149,06	RM 212	Slc45a1	<i>solute carrier family 45</i>	63,6 kb ds	MGI:2653235	
4	150,73	RM 68	keine				
5	36,69	RM 227	sorcs2	SorCS2 Vorläufer	intron 1-2	MGI:1932289	
5			grpl1	GrpE Protein Homolog 1	97 kb us	MGI:1334417	
5	64,78	RM 257	keine				
5	106,9	RM 116; RM 132	Gfi1	<i>growth factor independence</i>	1,9 kb us	MGI:103170	Ja
5			Evi 5	ökotrope virale Integrationsstelle 5	15,91 kb ds	MGI:104736	
6	106,69	RM 299	IL5R	IL5 Rezeptor alpha	Intron 9-10	MGI:96558	
6			Trmt1	tRNA-Nukleotidyltransferase 1	52,7 kb us	MGI:1917297	
6			Crbn	Cereblon	50,44 kb ds	MGI:1913277	
6	124,75	M 47	Ptpn6	Tyrosine-Phosphatase	in 5' UTR	MGI:96055	Ja
6			Eno 2	Enolase 2	37,48 kb da	MGI:95394;	
6			Tpi 1	Triosephosphat-Isomerase 1	78,7 kb us	MGI:98797;	
7	3,8	RM 68	Rdh13	Retinol-Dehydrogenase 13	6,3 kb ds	MGI:1918732;	
7			Ncr1	Cytotoxizität-aktivierender Rezeptor 1	74,1 kb ds	MGI:1336212	
7	124,26	RM 67	Itgam	Integrin alpha M	96,9 kb ds	MGI:96607	
7			Itgax	Integrin alpha X	9 kb ds	MGI:96609;	
7			Cox6a2	Cytochrom c Oxidase, Untereinheit VI a	45,8 kb ds	MGI:104649	
8	26,56	RM 227	plekha2	Protein mit Pleckstrin-Homologie Domäne	2,4 kb us	MGI:1928144	Ja
8			tacc1	Transformierendes saures coiled-coil Protein	50,35 kb ds	MGI:2443510	
8			adam9	ADAM 9 Vorläufer	87,3 us	MGI:105376	
8	34,53	RM 299	keine				
8	45,82	RM 222	Enpp6	Pyrophosphatase/Phosphodiesterase	Exon 2-3	MGI:2445171	
8	125,58	RM 238	Cbfa2t3h	<i>core-binding</i> Faktor, alpha Untereinheit	2,7 kb us	MGI:1338013	
8			Pabpn1	Poly(A) Bindeprotein 2	78,9 kb us	MGI:2685954	
9	51,16	RM 132	Pou2af1	B-Zell spezifischer Koaktivator OBF-1	29,7 kb us	MGI:105086	
9			Btg4	B-Zell Translokationsgen	64,3 kb ds	MGI:1860140	
9	108,05	RM 212	lhpk1	Inositol Hexaphosphat Kinase 1	18,1 kb us	MGI:1351633	
9			Traip	TRAF-interagierendes Protein	11,9 kb ds	MGI:1096377	
9			Mst1r	Makrophagen-stimulierendes Protein	63,8 kb ds	MGI:99614	
9			Mst1	Hepatocyten-Wachstumsfaktor-ähnlich	93,8 kb us	MGI:96080	
10	20,8	RM 178	Myb	Myeloblastosis Protoonkogen	47,69 kb ds	MGI:97249	Ja
10			Ahi1	<i>Abelson helper integration site 1</i>	Intron 23-24	MGI:87971	
10	20,81	RM 176; RM 182	Myb	Myeloblastosis Protoonkogen	40,3 kb ds	MGI:97249	Ja
10			Ahi1	<i>Abelson helper integration site 1</i>	3,9 kb ds	MGI:87971	
10	20,87	RM 123	Myb	Myeloblastosis Protoonkogen	25,6 kb us	MGI:97249	Ja
10			Ahi1	<i>Abelson helper integration site 1</i>	106 kb us	MGI:87971	
10	55,56	RM 238	Esr1	Östrogen-Rezeptor 1	Intron	MGI:1352467	
10	80,33	RM 86; M 88	Gadd45b	<i>Growth arrest and DNA damage inducible protein beta</i>	1,5 kb ds	MGI:107776	
10			Lsm7	U6 snRNA-assoziiertes Protein	80 kb us	MGI:1913344	
10			Timm 13	Translokase-Untereinheit der inneren Mitochondrienmembrane	32,49 kb us	MGI:1353429	
10			Lmnb2	Lamin B2	15 kb us	MGI:96796	
10			Gng7	Guanin Nukleotidbindeprotein Untereinheit	15 kb ds	MGI:95787;	
10			Diras1	GTP-Bindeprotein	88,2 kb ds	MGI:2183442	
10	80,34	RM 227	Gadd45b	<i>Growth arrest and DNA damage inducible protein beta</i>	6,4 kb ds	MGI:107776	
10			Lsm7	U6 snRNA-assoziiertes Protein	83,4 kb us	MGI:1913344	
10			Timm 13	Translokase-Untereinheit der inneren Mitochondrienmembrane	37,84 kb us	MGI:1353429	
10			Lmnb2	Lamin B2	32,24 kb us	MGI:96796	
10			Gng7	Guanin Nukleotidbindeprotein Untereinheit	62,13 kb ds	MGI:95787;	
10			Diras1	GTP-Bindeprotein	86,14 kb ds	MGI:2183442	
10	117,26	RM 68	Slc35e3	<i>solute carrier family 35</i>	1 kb us	MGI:2448489	

10			Nup107	Nukleoporin 107	3,2 kb ds	MGI:2143854	
10			Mdm2	Ubiquitin-Protein Ligase E3	36,3 kb us	MGI:96952;	
11	34,01	RM 222	Lcp2	cytosolisches Lymphozytenprotein 2	Exon 3-4	MGI:1321402	
11			Kcnmb1	Untereinheit von Ca-aktiviertem Kalium Kanal	95 kb ds	MGI:1334203	
11	45,01	RM 222	Ebf1	Transkriptionsfaktor COE1	57,3 kb ds	MGI:95275	
11	69,3	RM 212	trp53	Tumorsuppressor p53	Exon 1	MGI:98834	Ja
11	75,38	RM 212	Myo1c	Myosin Ic	Intron 1-2	MGI:106612	
11			Pps	Inositol-Phosphatase	7,5 kb ds	MGI:1194899	Ja
11			Crk	Protoonkogene C-crk (p38)	22,7 kb us	MGI:88508	
11			Ywhae	14-3-3 Protein ε	76,3 kb us	MGI:894689	
11	114,26	M 88; RM 87	keine				
13	22,94	M 2	Histone	verschiedene Gene für Histonproteine			
13	34,5	M 47	Bph1	Biphenyl-Hydrolase-ähnlich	Intron 4-5	MGI:1915271	
13			Nqo2	NAD(P)H Dehydrogenase, Chinon 2	65 kb ds	MGI:104513;	
13			Ripk1	Rezeptor-interagierende Ser/Thr-Kinase	15,9 kb ds	MGI:108212	
13	37,03	RM 212	Ly86	Lymphocyten Antigen Vorläufer 86	77,6 kb ds	MGI:1321404	
13	43,22	RM 257	Tbc1d7	TBC1 Domäne Mitglied 7	42,3 kb us	MGI:1914296	
13	51,2	RM 68; RM 70	keine				
13	52,16	RM 299	keine				
13	73,15	M 88	Gpr150	<i>Orphan receptor</i>	83,7 kb us	MGI:2441872	
14	22,78	M 47, RM 67, RM 68	keine				
14	26,67	RM 212	Eaf1	ELL-assoziiertes Faktor 1	25,48 kb us	MGI:1921677	
15	59,71	RM 67	Trib 1	Tribbles Homolog 1	Intron 2-3	MGI:2443397	
15	75	M 116	Cyp11b2	Cytochrom P450 11B2	69 kb us	MGI:88584;	
15			Ly6e	Lymphocyten Antigen 6	30,14 kb us	MGI:106651	
16	36,53	M 47	Eaf 1	Testosteron regulierter Tumor Suppressor	Intron	MGI:1921677	
16			lqcb1	IQ Calmodulin-Bindemotiv enthaltendes Protein 1	6.1 kb us	MGI:2443764	
16			Slc15a2	Oligopeptid-Transporter	36,9 kb us	MGI:1890457;	
17	26,19	RM 178	Anks	Ankyrin Wiederholungsmotiv	Exon 12	MGI:2446180	
17			Tcp11	Testis-spezifisches Protein PBS13	57,99 kb ds	MGI:98544	
17	29,14	RM 257	Pim1	Serin/Threonin-Kinase	71,47 kb us	MGI:97584	Ja
17			Fgd2	FYVE, RhoGEF und PH Domäne beinhaltendes Protein	39,78 kb ds	MGI:1347084	
17	31,89	RM 299	Notch3	Notch Homolog 3 Vorläufer	Intron 1-2	MGI:99460	
17			Brd4	Bromodomäne beinhaltendes Protein	31 kb ds	MGI:1888520	
18	32,79	M 2	Bin-1	Amphiphysin II	Intron 1-2	MGI:108092	
18	54,97	RM 257	keine				
18	56,83	RM 257	LmnB1	LaminB1	Exon 1	MGI:96795	
18			March3	Membran-assoziiertes RING Finger Protein 3	53,23 kb ds	MGI:2443667	
19	57,1	RM 67	Ablim1	Aktin-Bindeprotein	Intron 1-2	MGI:1194500	
x	7,02	RM 67	Pim2	Serin/Threonin-Kinase	13,46 kb us	MGI:97587	Ja
x			Gata 1	Erytroider Transkriptionsfaktor	75,3 kb ds	MGI:95661	
x			Timm17b	Translokase-Untereinheit der inneren Mitochondrienmembrane	34,56 kb us	MGI:1343176	
x			Hdac6	Histon Deacetylase 6	65,29 kb ds	MGI:1333752	
x			Gripap1	GRIP1 assoziiertes Protein 1	43,79 kb ds	MGI:1859616;	
x	7,04	RM 222	Pim2	Serin/Threonin-Kinase	0,2 kb ds	MGI:97587	Ja
x			Gripap1	GRIP1 assoziiertes Protein 1	63 kb ds	MGI:1859616	
x			Timm17b	Translokase-Untereinheit der inneren Mitochondrienmembrane	15,4 kb us	MGI:1343176	
x			Hdac6	Histon Deacetylase 6	46,15 kb ds	MGI:1333752	
x			Gata 1	Erytroider Transkriptionsfaktor	75,3 kb ds	MGI:95661	
x	7,04	RM 238	Pim2	Serin/Threonin-Kinase	3'UTR	MGI:97587	Ja
x			Slc35a2	UDP-Galactose Translokator	1 kb us	MGI:1345297	
x	43,23	RM 67	Xpnpep1	X-Prolyl Aminopeptidase 2	28 kb ds	MGI:2180001	
x			Zdhhc9	Palmitoyltransferase für HRAS und NRAS	34 kb ds	MGI:2444393	

IX Literatur

- Abdollahi, A., Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D. A.** (1991). Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene* 6, 165-167.
- Abe, N., Kohu, K., Ohmori, H., Hayashi, K., Watanabe, T., Hozumi, K., Sato, T., Habu, S., Satake, M.** (2005). Reduction of Runx1 transcription factor activity up-regulates Fas and Bim expression and enhances the apoptotic sensitivity of double positive thymocytes. *J Immunol* 175, 4475-4482.
- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., Brinster, R. L.** (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.
- Ahuja, D., Saenz-Robles, M. T., Pipas, J. M.** (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 24, 7729-7745.
- Akagi, K., Suzuki, T., Stephens, R. M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G.** (2004). RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res* 32, D523-527.
- Albritton, L. M., Tseng, L., Scadden, D., Cunningham, J. M.** (1989). A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 57, 659-666.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., Oren, M.** (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* 12, 461-468.
- Blum, K. A., Lozanski, G., Byrd, J. C.** (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104, 3009-3020.
- Blyth, K., Cameron, E. R., Neil, J. C.** (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 376-387.
- Blyth, K., Vaillant, F., Hanlon, L., Mackay, N., Bell, M., Jenkins, A., Neil, J. C., Cameron, E. R.** (2006). Runx2 and MYC collaborate in lymphoma development by suppressing apoptotic and growth arrest pathways in vivo. *Cancer Res* 66, 2195-2201.
- Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C. B.** (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breuer, M. L., Cuypers, H. T., Berns, A.** (1989). Evidence for the involvement of pim-2, a new common proviral insertion site, in progression of lymphomas. *Embo J* 8, 743-748.
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., Darnell, J. E., Jr.** (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.

- Brown, J. M., Attardi, L. D.** (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 5, 231-237.
- Bushman, F., Lewinski, M., Ciuffi, A., Barr, S., Leipzig, J., Hannenhalli, S., Hoffmann, C.** (2005). Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nature* 3, 848-858.
- Campos, L., Rouault, J. P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., Archimbaud, E., Magaud, J. P., Guyotat, D.** (1993). High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 81, 3091-3096.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., Halazonetis, T. D.** (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14, 278-288.
- Chi, H., Lu, B., Takekawa, M., Davis, R. J., Flavell, R. A.** (2004). GADD45beta/GADD45gamma and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT4-independent IFNgamma production in T cells. *Embo J* 23, 1576-1586.
- Chipuk, J. E., Green, D. R.** (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*.
- Chipuk, J. E., Maurer, U., Green, D. R., Schuler, M.** (2003). Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 4, 371-381.
- Codogno, P., Meijer, A. J.** (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1509-1518.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., Varmus, H. E.** (1997). *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Collett, M. S., Purchio, A. F., Erikson, R. L.** (1980). Avian sarcoma virus-transforming protein, pp60src shows protein kinase activity specific for tyrosine. *Nature* 285, 167-169.
- Cory, S., Adams, J. M.** (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Cuypers, H. T., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E. R., Boelens, W., van Wezenbeek, P., Melief, C., Berns, A.** (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* 37, 141-150.
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J.** (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Das, S., Cho, J., Lambertz, I., Kelliher, M. A., Eliopoulos, A. G., Du, K., Tschlis, P. N.** (2005). Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem* 280, 23748-23757.
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D. U., Jin, R., Jones, J., Cong, R., Franzoso, G.** (2001). Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 414, 308-313.

- Degli Esposti, M., Dive, C.** (2003). Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 455-461.
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y., Wu, X.** (2003). A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115, 61-70.
- Dole, M. G., Jasty, R., Cooper, M. J., Thompson, C. B., Nunez, G., Castle, V. P.** (1995). Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 55, 2576-2582.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Dutcher, J. P.** (2004). Mammalian target of rapamycin inhibition. *Clin Cancer Res* 10, 6382S-6387S.
- Egle, A., Harris, A. W., Bouillet, P., Cory, S.** (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6164-6169.
- Eliseev, R. A., Zuscik, M. J., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J., Drissi, H., Rosier, R. N.** (2005). Increased radiation-induced apoptosis of Saos2 cells via inhibition of NFkappaB: a role for c-Jun N-terminal kinase. *J Cell Biochem* 96, 1262-1273.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S.** (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Findley, H. W., Gu, L., Yeager, A. M., Zhou, M.** (1997). Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xL, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89, 2986-2993.
- Fox, C. J., Hammerman, P. S., Cinalli, R. M., Master, S. R., Chodosh, L. A., Thompson, C. B.** (2003). The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev* 17, 1841-1854.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., Eisenman, R. N.** (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699.
- Gudkov, A. V., Komarova, E. A.** (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 3, 117-129.
- Gupta, M., Gupta, S., Hoffman, B., Liebermann, D. A.** (2006a). GADD45A and GADD45B protect hematopoietic cells from UV induced apoptosis via distinct signaling pathways including P38 activation and JNK inhibition. *J Biol Chem*.
- Gupta, M., Gupta, S. K., Balliet, A. G., Hollander, M. C., Fornace, A. J., Hoffman, B., Liebermann, D. A.** (2005). Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis. *Oncogene* 24, 7170-7179.

- Gupta, S. K., Gupta, M., Hoffman, B., Liebermann, D. A.** (2006b). Hematopoietic cells from gadd45a-deficient and gadd45b-deficient mice exhibit impaired stress responses to acute stimulation with cytokines, myeloablation and inflammation. *Oncogene*.
- Habets, G. G., Scholtes, E. H., Zuydgeest, D., van der Kammen, R. A., Stam, J. C., Berns, A., Collard, J. G.** (1994). Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 77, 537-549.
- Hainaut, P., Hollstein, M.** (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77, 81-137.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harbers, K., Schnieke, A., Stuhlmann, H., Jahner, D., Jaenisch, R.** (1981). DNA methylation and gene expression: endogenous retroviral genome becomes infectious after molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7609-7613.
- Hardy, R. R., Hayakawa, K.** (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19, 595-621.
- Hartley, J. W., Rowe, W. P.** (1975). Clonal cells lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses. *Virology* 65, 128-134.
- Haupt, Y., Alexander, W. S., Barri, G., Klinken, S. P., Adams, J. M.** (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 65, 753-763.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M.** (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S.** (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.
- Holman, A. G., Coffin, J. M.** (2005). Symmetrical base preferences surrounding HIV-1, avian sarcoma/leukosis virus, and murine leukemia virus integration sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6103-6107.
- Hunter, T., Sefton, B. M.** (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1311-1315.
- Hwang, H. C., Martins, C. P., Bronkhorst, Y., Randel, E., Berns, A., Fero, M., Clurman, B. E.** (2002). Identification of oncogenes collaborating with p27Kip1 loss by insertional mutagenesis and high-throughput insertion site analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11293-11298.
- Igney, F. H., Krammer, P. H.** (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288.

- Jacobs, J. J., Scheijen, B., Voncken, J. W., Kieboom, K., Berns, A., van Lohuizen, M.** (1999). Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 13, 2678-2690.
- Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., Todaro, G. J.** (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4, 549-553.
- Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Taylor, B. A., Lee, B. K.** (1982). Organization, distribution, and stability of endogenous ecotropic murine leukemia virus DNA sequences in chromosomes of *Mus musculus*. *J Virol* 43, 26-36.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Lowe, S. W.** (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164.
- Jonkers, J., Berns, A.** (1996). Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim Biophys Acta* 1287, 29-57.
- Karasuyama, H., Melchers, F.** (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* 18, 97-104.
- Kaufmann, S. H., Karp, J. E., Svingen, P. A., Krajewski, S., Burke, P. J., Gore, S. D., Reed, J. C.** (1998). Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood* 91, 991-1000.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E.** (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Kovalchuk, A. L., Qi, C. F., Torrey, T. A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G. W., Janz, S., Morse, H. C. r.** (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med* 192, 1183-1190.
- Krammer, P. H.** (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 71, 163-210.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G.** (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1463-1467.
- Kroemer, G., Jaattela, M.** (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5, 886-897.
- Kroemer, G., Martin, S. J.** (2005). Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11, 725-730.
- Kues, W. A., Carnwath, J. W., Paul, D., Niemann, H.** (2002). Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts by serum deprivation initiates a nonconventional form of apoptosis. *Cloning Stem Cells* 4, 231-243.

- Lang, R., Patel, D., Morris, J. J., Rutschman, R. L., Murray, P. J.** (2002). Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* *169*, 2253-2263.
- Lavrik, I. N., Golks, A., Krammer, P. H.** (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* *115*, 2665-2672.
- Lazo, P. A., Lee, J. S., Tschlis, P. N.** (1990). Long-distance activation of the Myc protooncogene by provirus insertion in Mlvi-1 or Mlvi-4 in rat T-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 170-173.
- Leicht, M., Marx, G., Karbach, D., Gekle, M., Kohler, T., Zimmer, H. G.** (2003). Mechanism of cell death of rat cardiac fibroblasts induced by serum depletion. *Mol Cell Biochem* *251*, 119-126.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J.** (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.
- Li, L. Y., Luo, X., Wang, X.** (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479-489.
- Lindsten, T., Golden, J. A., Zong, W. X., Minarcik, J., Harris, M. H., Thompson, C. B.** (2003). The proapoptotic activities of Bax and Bak limit the size of the neural stem cell pool. *J Neurosci* *23*, 11112-11119.
- Lu, B., Ferrandino, A. F., Flavell, R. A.** (2004). Gadd45beta is important for perpetuating cognate and inflammatory signals in T cells. *Nat Immunol* *5*, 38-44.
- Lund, A. H., Turner, G., Trubetskoy, A., Verhoeven, E., Wientjens, E., Hulsman, D., Russell, R., DePinho, R. A., Lenz, J., van Lohuizen, M.** (2002). Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice. *Nat Genet* *32*, 160-165.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X.** (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.
- Major, M. B., Jones, D. A.** (2004). Identification of a gadd45beta 3' enhancer that mediates SMAD3- and SMAD4-dependent transcriptional induction by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* *279*, 5278-5287.
- Makris, A., Patriotis, C., Bear, S. E., Tschlis, P. N.** (1993). Genomic organization and expression of Tpl-2 in normal cells and Moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell lymphomas: activation by provirus insertion. *J Virol* *67*, 4283-4289.
- Marcu, K. B., Bossone, S. A., Patel, A. J.** (1992). myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* *61*, 809-860.

- Metcalf, D.** (2005). *Blood Lines - An Introduction to Characterizing Blood Diseases of the Post-Genomic Mouse*, AlphaMed Press).
- Mikkers, H., Allen, J., Knipscheer, P., L., R., Hart, A., Vink, E., Berns, A.** (2002). High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer. *Nat Genet* 32, 153-159.
- Minn, A. J., Rudin, C. M., Boise, L. H., Thompson, C. B.** (1995). Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86, 1903-1910.
- Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J. R., Bushman, F. D.** (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2, E234.
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D., Deppert, W.** (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17, 631-636.
- Mooslehner, K., Karls, U., Harbers, K.** (1990). Retroviral integration sites in transgenic *Mov* mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions. *J Virol* 64, 3056-3058.
- Morita, S., Kojima, T., Kitamura, T.** (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063-1066.
- Mukhopadhyaya, R., Wolff, L.** (1992). New sites of proviral integration associated with murine promonocytic leukemias and evidence for alternate modes of c-myb activation. *J Virol* 66, 6035-6044.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., Fukuyama, H.** (2003). Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 108-116.
- Narezkina, A., Taganov, K. D., Litwin, S., Stoyanova, R., Hayashi, J., Seeger, C., Skalka, A. M., Katz, R. A.** (2004). Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites. *J Virol* 78, 11656-11663.
- Nicotera, P., Melino, G.** (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23, 2757-2765.
- Okada, H., Mak, T. W.** (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4, 592-603.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P.** (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Packham, G., White, E. L., Eischen, C. M., Yang, H., Parganas, E., Ihle, J. N., Grillot, D. A., Zambetti, G. P., Nunez, G., Cleveland, J. L.** (1998). Selective regulation of Bcl-XL by a Jak kinase-dependent pathway is bypassed in murine hematopoietic malignancies. *Genes Dev* 12, 2475-2487.
- Paddenberg, R., Loos, S., Schoneberger, H. J., Wulf, S., Muller, A., Iwig, M., Mannherz, H. G.** (2001). Serum withdrawal induces a redistribution of intracellular gelsolin towards F-actin in NIH 3T3 fibroblasts preceding apoptotic cell death. *Eur J Cell Biol* 80, 366-378.

- Palacios, R., Henson, G., Steinmetz, M., McKearn, J. P.** (1984). Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature* 309, 126-131.
- Palacios, R., Steinmetz, M.** (1985). Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* 41, 727-734.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D. U., Pham, C. G., Nelsbach, A. H., Melis, T., De Smaele, E., Tang, W. J., D'Adamio, L., Franzoso, G.** (2004a). Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 6, 146-153.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C., Franzoso, G.** (2004b). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* 117, 5197-5208.
- Patriotis, C., Makris, A., Bear, S. E., Tschlis, P. N.** (1993). Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2251-2255.
- Peace, B. E., Hughes, M. J., Degen, S. J., Waltz, S. E.** (2001). Point mutations and overexpression of Ron induce transformation, tumor formation, and metastasis. *Oncogene* 20, 6142-6151.
- Picksley, S. M., Lane, D. P.** (1993). The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays* 15, 689-690.
- Poirier, Y., Kozak, C., Jolicoeur, P.** (1988). Identification of a common helper provirus integration site in Abelson murine leukemia virus-induced lymphoma DNA. *J Virol* 62, 3985-3992.
- Prochazka, M., Gaskins, H. R., Shultz, L. D., Leiter, E. H.** (1992). The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3290-3294.
- Reynolds, J. E., Yang, T., Qian, L., Jenkinson, J. D., Zhou, P., Eastman, A., Craig, R. W.** (1994). Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 54, 6348-6352.
- Rohdewohld, H., Weiher, H., Reik, W., Jaenisch, R., Breindl, M.** (1987). Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J Virol* 61, 336-343.
- Rolink, A., Grawunder, U., Haasner, D., Strasser, A., Melchers, F.** (1993). Immature surface Ig+ B cells can continue to rearrange kappa and lambda L chain gene loci. *J Exp Med* 178, 1263-1270.
- Rous, P.** (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent seperable from the tumor cells. *J Exp Med* 13, 397-411.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C., Vousden, K. H.** (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13, 332-337.

- Sabath, D. E., Broome, H. E., Prystowsky, M. B.** (1990). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene* 91, 185-191.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Russell, D.** (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York, CSHL Press).
- Sanchez-Beato, M., Sanchez-Aguilera, A., Piris, M. A.** (2003). Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 101, 1220-1235.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Peter, M. E.** (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Scherdin, U., Rhodes, K., Breindl, M.** (1990). Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol* 64, 907-912.
- Schmidt, M., Hoffmann, G., Wissler, M., Lemke, N., Mussig, A., Glimm, H., Williams, D. A., Ragg, S., Hesemann, C. U., von Kalle, C.** (2001). Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther* 12, 743-749.
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Baranov, E., Hoffman, R. M., Lowe, S. W.** (2002a). Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 1, 289-298.
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M., Lowe, S. W.** (2002b). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109, 335-346.
- Schmitt, C. A., Rosenthal, C. T., Lowe, S. W.** (2000). Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat Med* 6, 1029-1035.
- Schmitz, I., Walczak, H., Krammer, P. H., Peter, M. E.** (1999). Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ* 6, 821-822.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., Bushman, F.** (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-529.
- Schwieger, M., Lohler, J., Friel, J., Scheller, M., Horak, I., Stocking, C.** (2002). AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSBP deficiency. *J Exp Med* 196, 1227-1240.
- Selten, G., Cuypers, H. T., Berns, A.** (1985). Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas. *Embo J* 4, 1793-1798.

- Selten, G., Cuypers, H. T., Boelens, W., Robanus-Maandag, E., Verbeek, J., Domen, J., van Beveren, C., Berns, A.** (1986). The primary structure of the putative oncogene pim-1 shows extensive homology with protein kinases. *Cell* 46, 603-611.
- Selten, G., Cuypers, H. T., Zijlstra, M., Melief, C., Berns, A.** (1984). Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *Embo J* 3, 3215-3222.
- Selvakumaran, M., Lin, H. K., Sjin, R. T., Reed, J. C., Liebermann, D. A., Hoffman, B.** (1994). The novel primary response gene MyD118 and the proto-oncogenes myb, myc, and bcl-2 modulate transforming growth factor beta 1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biol* 14, 2352-2360.
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C.** (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14, 289-300.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., Tsujimoto, Y.** (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221-1228.
- Simm, A., Bertsch, G., Frank, H., Zimmermann, U., Hoppe, J.** (1997). Cell death of AKR-2B fibroblasts after serum removal: a process between apoptosis and necrosis. *J Cell Sci* 110 (Pt 7), 819-828.
- Smith, G. B., Mocarski, E. S.** (2005). Contribution of GADD45 family members to cell death suppression by cellular Bcl-xL and cytomegalovirus vMIA. *J Virol* 79, 14923-14932.
- Speidel, D., Helmbold, H., Deppert, W.** (2006). Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncogene* 25, 940-953.
- Stocking, C., Loliger, C., Kawai, M., Suciu, S., Gough, N., Ostertag, W.** (1988). Identification of genes involved in growth autonomy of hematopoietic cells by analysis of factor-independent mutants. *Cell* 53, 869-879.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., Kroemer, G.** (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, T., Shen, H., Akagi, K., Morse, H. C., Malley, J. D., Naiman, D. Q., Jenkins, N. A., Copeland, N. G.** (2002). New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet* 32, 166-174.
- Takekawa, M., Saito, H.** (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95, 521-530.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K., Saito, H.** (2002). Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF-beta. *Embo J* 21, 6473-6482.

- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y.** (1998). Caspases: Enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tsujimoto, Y.** (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 195, 158-167.
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S.** (2005). Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1528-1534.
- Uren, A. G., Kool, J., Berns, A., van Lohuizen, M.** (2005). Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future. *Oncogene* 24, 7656-7672.
- Vairapandi, M., Azam, N., Balliet, A. G., Hoffman, B., Liebermann, D. A.** (2000). Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* 275, 16810-16819.
- Vairapandi, M., Balliet, A. G., Fornace, A. J., Jr., Hoffman, B., Liebermann, D. A.** (1996). The differentiation primary response gene MyD118, related to GADD45, encodes for a nuclear protein which interacts with PCNA and p21WAF1/CIP1. *Oncogene* 12, 2579-2594.
- Vairapandi, M., Balliet, A. G., Hoffman, B., Liebermann, D. A.** (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 192, 327-338.
- van der Lugt, N. M., Domen, J., Verhoeven, E., Linders, K., van der Gulden, H., Allen, J., Berns, A.** (1995). Proviral tagging in E mu-myc transgenic mice lacking the Pim-1 proto-oncogene leads to compensatory activation of Pim-2. *EMBO J* 14, 2536-2544.
- van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., Berns, A.** (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-752.
- Vijaya, S., Steffen, D. L., Robinson, H. L.** (1986). Acceptor sites for retroviral integrations map near DNase I-hypersensitive sites in chromatin. *J Virol* 60, 683-692.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W.** (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A. J.** (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Vousden, K. H., Lu, X.** (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
- Wang, T., Hu, Y. C., Dong, S., Fan, M., Tamae, D., Ozeki, M., Gao, Q., Gius, D., Li, J. J.** (2005). Co-activation of ERK, NF-kappaB, and GADD45beta in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 280, 12593-12601.
- Weller, M., Malipiero, U., Aguzzi, A., Reed, J. C., Fontana, A.** (1995). Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human

malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J Clin Invest* 95, 2633-2643.

Westaway, D., Payne, G., Varmus, H. E. (1984). Proviral deletions and oncogene base-substitutions in insertionally mutagenized c-myc alleles may contribute to the progression of avian bursal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 843-847.

Willis, S. N., Adams, J. M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17, 617-625.

Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., Huang, D. C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19, 1294-1305.

Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7, 1126-1132.

Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749-1751.

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.

Xu, Y. (2003). Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ* 10, 400-403.

Yang, J., Zhu, H., Murphy, T. L., Ouyang, W., Murphy, K. M. (2001). IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2, 157-164.

Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A. G., Hoffman, B., Fornace, A. J., Jr., Liebermann, D. A., Bottinger, E. P., Roberts, A. B. (2003). Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem* 278, 43001-43007.

Yorimitsu, T., Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1542-1552.

Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H., Lenardo, M. J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304, 1500-1502.

Zazzeroni, F., Papa, S., Algeciras-Schimmich, A., Alvarez, K., Melis, T., Bubici, C., Majewski, N., Hay, N., De Smaele, E., Peter, M. E., Franzoso, G. (2003). Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimulation against Fas-induced apoptosis. *Blood* 102, 3270-3279.

Zerbini, L. F., Wang, Y., Czibere, A., Correa, R. G., Cho, J. Y., Ijiri, K., Wei, W., Joseph, M., Gu, X., Grall, F., Goldring, M. B., Zhou, J. R., Liebermann, T. A. (2004). NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13618-13623.

- Zhan, Q., Lord, K. A., Alamo, I., Jr., Hollander, M. C., Carrier, F., Ron, D., Kohn, K. W., Hoffman, B., Liebermann, D. A., Fornace, A. J., Jr.** (1994). The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. *Mol Cell Biol* 14, 2361-2371.
- Zhang, N., Ahsan, M. H., Zhu, L., Sambucetti, L. C., Purchio, A. F., West, D. B.** (2005). NF-kappaB and not the MAPK signaling pathway regulates GADD45beta expression during acute inflammation. *J Biol Chem* 280, 21400-21408.
- Zhang, W., Hoffman, B., Liebermann, D. A.** (2001). Ectopic expression of MyD118/Gadd45/CR6 (Gadd45beta/alpha/gamma) sensitizes neoplastic cells to genotoxic stress-induced apoptosis. *Int J Oncol* 18, 749-757.
- Zhou, P., Qian, L., Kozopas, K. M., Craig, R. W.** (1997). Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 89, 630-643.
- Zong, W. X., Thompson, C. B.** (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 20, 1-15.

Danksagung

Dr. Carol Stocking danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am HPI anzufertigen. Ihre exzellente Betreuung, die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und die gute Arbeitsatmosphäre waren von unschätzbarem Wert.

Bei Prof. Wolfgang Deppert möchte ich mich für die Betreuung dieses Promotionsvorhabens bedanken. Er war als Berater stets ansprechbar und hat mit vielen hilfreichen Hinweisen den Erfolg dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst.

Ein besonderer Dank gebührt Daniel Speidel für seine Hilfe und Unterstützung. Seine zahlreichen Tipps, seine tatkräftige Unterstützung und seine schier endlose Geduld waren bei der Entstehung dieser Arbeit enorm wichtig.

Allen Kollegen des Heinrich-Pette-Instituts, vor allem der Abteilung Stocking, danke ich ganz herzlich für die angenehme und lehrreiche Zusammenarbeit und das Zuhören in jeder Lebens- und Laborlage.

Ein besonderes Dankeschön geht an Simone Scheiper für die schnelle und sorgfältige Korrektur dieses Gesamtwerks.