

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar

**Untersuchung der Rolle des Zellzyklusregulators
Cks1 in der Pathogenese hämatopoetischer
Tumorerkrankungen**

Susanne Daemgen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. H. Luksch
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. U. Keller
	2. Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 29.04.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 31.07.2013 angenommen.

Für meine Eltern und Sebastian

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abstract.....	V
1 Einleitung.....	1
1.2 Der G1/S-Übergang	4
1.3 Der G2/M-Übergang.....	6
1.4 Der CDK-Inhibitor p27 ^{Kip1}	6
1.5 Cks1 und seine Rolle im Zellzyklus	9
1.5.1 Cks1 als Mittler des p27 ^{Kip1} -Abbaus am G1/S-Übergang	10
1.5.2 Cks1 und Skp2 bei der Tumorgenese	11
2 Material.....	14
2.1 Chemikalien, Medien und Supplement.....	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.3 Geräte und technisches Zubehör.....	18
2.4 Softwareprogramme	20
2.5 Enzyme	20
2.6 Oligonukleotide	21
2.6.1 Genotypisierung.....	21
2.6.2 Klonierung	21
2.6.3 Real time PCR.....	22
2.7 Klonierungsvektoren und Expressionsplasmide.....	22
2.8 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine.....	23
2.9 Antikörper.....	23

2.9.1	Westernblot.....	23
2.9.2	Durchflusszytometrie.....	24
2.10	Kits	25
2.11	Bakterien und Zelllinien.....	26
2.11.1	Bakterien.....	26
2.11.2	Zelllinien.....	26
2.12	Versuchstiere	26
2.13	Zellkulturmedien und -puffer	27
2.14	Stammlösungen und Puffer	29
3	Methoden.....	32
3.1	Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	32
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	32
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.1.3	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	33
3.1.4	Restriktionsverdau	34
3.1.5	Dephosphorylierung.....	34
3.1.6	Ligation.....	34
3.1.7	Topo-Klonierung	35
3.1.8	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben.....	35
3.1.9	Reverse Transkription zur Generierung von cDNA	36
3.1.10	Quantitative RT-PCR.....	36
3.2	Arbeiten mit Bakterien	37
3.2.1	Transformation.....	37
3.2.2	Plasmid-Präparation.....	38
3.2.3	Sequenzierung.....	38
3.3	Proteinbiochemische Methoden	38
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	38
3.3.2	SDS-Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot	39
3.3.3	Immunhistochemische Proteinbestimmung.....	40
3.4	Zellbiologische Methoden.....	40
3.4.1	Kultivierung von Suspensionszelllinien	40
3.4.2	Kultivierung adhärenter Zellen.....	41
3.4.3	Herstellung von Lymphomzelllinien	41

3.4.5	Proliferationsmessung mittels BrdU	43
3.4.6	Herstellung von Retroviren und retrovirale Infektion.....	43
3.4.7	Titration viraler Überstände	44
3.4.8	Selektion der Virus-Verpackungszelllinie	44
3.4.9	Methylzellulose-Assay	45
3.5	Grundlegende tierexperimentelle Techniken.....	45
3.5.1	Haltung und Verpaarung der Tiere	45
3.5.2	Markierung und Genotypisierung der Mäuse	45
3.5.3	Proliferationsmessung mittels BrdU	47
3.5.4	Knochenmarktransplantation	47
3.5.5	Überwachung transplantierte Tiere.....	49
3.5.6	Organaufbereitung transplantierte Tiere.....	49
3.5.7	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen	49
3.6	Histologie.....	50
3.7	Statistische Auswertungsverfahren.....	50
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Cks1-Expression lymphoproliferativer Tumorerkrankungen.....	51
4.2	<i>Cks1</i> -Verlust im murinen Modell des humanen Burkitt-Lymphoms	52
4.3	Untersuchung einer potentiellen onkogenen Rolle von Cks1	54
4.3.1	Etablierung eines retroviralen Transplantationsmodells.....	54
4.3.2	Cre-vermittelte B-Zell-spezifische Überexpression von Cks1	56
4.3.3	Modell einer ubiquitären Cks1-Überexpression	61
4.4	Die Rolle von Cks1 während der B-Zell-Entwicklung.....	65
4.5	<i>Cks1</i> -Verlust im Modell einer c-Myc-induzierten AML.....	67
4.6	Die Rolle von Cks1 während einer L-gp130-induzierten Erkrankung.....	70
4.6.1	Untersuchung potentieller koonogener Funktionen.....	70
4.6.2	Effekte eines <i>Cks1</i> -Verlustes in einer L-gp130-induzierten AML	81
5	Diskussion.....	88
5.1	<i>Cks1</i> -Verlust verringert Proliferation und induziert Apoptose <i>in vitro</i>	88
5.2	<i>Cks1</i> -defiziente Mäuse zeigen eine vergrößerte B1-Zellpopulation.....	91
5.3	Cks1-Überexpression induziert keine Erkrankung hämatopoetischer Zellen.....	93
5.4	Cks1 zeigt keine onkogene Kooperation in einer L-gp130-induzierten AML	96
5.5	Die bei der Tumorgenese beobachteten Effekte eines <i>Cks1</i> -Verlustes sind p27 ^{Kip1} -abhängig	101

Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung.....	107
7	Literaturverzeichnis.....	110
8	Abkürzungsverzeichnis.....	138
9	Abbildungsverzeichnis.....	144
10	Danksagung.....	147
11	Publikationen.....	149
	Lebenslauf.....	151

Abstract

Das Zellzyklusprotein Cks1 konnte bei diversen Tumorerkrankungen dereguliert nachgewiesen werden und gilt bei Überexpression als schlechter prognostischer Faktor. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer potentiellen onkogenen Rolle von Cks1 bei der Pathogenese hämatopoetischer Tumorerkrankungen. Zusätzlich wurden p27^{Kip1}-unabhängige Funktionen von Cks1 während der Tumorgenese untersucht. Unter Zuhilfenahme von verschiedenen Transplantationsmodellen konnte gezeigt werden, dass Cks1-Überexpression keine onkogenen Eigenschaften besitzt, jedoch während onkogen getriebener Proliferation über p27^{Kip1}-Abbau Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung nimmt. Die Evaluation einer koonkogenen Rolle von Cks1 mit dem konstitutiv aktiven gp130-Rezeptor L-gp130 zeigte keine kooperierende onkogene Aktivität. Zusätzlich konnte durch hochtitrige L-gp130-Transduktion neben der bekannten Induktion einer plasmablastischen Erkrankung ein neues AML-Modell etabliert werden.

The cell cycle protein Cks1 is deregulated in several malignancies and upregulation is associated with poor prognosis. This study examines the suspected oncogenic role of Cks1 during pathogenesis of hematopoietic malignancies. Additionally p27^{Kip1} independent functions of Cks1 during tumorigenesis were analyzed. By using different transplantation models it was shown, that Cks1 overexpression alone is not oncogenic, but Cks1 contributes to tumor proliferation by suppressing p27^{Kip1}. Evaluation of a cooncogenic role of Cks1 with the constitutively activated gp130 receptor L-gp130 showed no cooperating oncogenic activity. Furthermore high titer L-gp130 transduction led to the establishment of a new AML model.

1 Einleitung

Die Replikation der DNA und die darauf folgende Zellteilung gehören zu den grundlegenden Mechanismen, die in einer Zelle ablaufen. Proliferation unterliegt einem streng regulierten Prozess, der durch extrazelluläre proliferationsfördernde und -hemmende Faktoren gesteuert wird. Die Regulation des Zellzyklus basiert auf positiven und negativen Rückkopplungsschleifen, die den genauen Ablauf und die exakte Teilung in Tochterzellen gewährleisten. Zusätzlich gibt es Kontrollpunkte, an denen geprüft wird, ob die vorangegangenen Ereignisse fehlerfrei erfolgt sind. Zu diesen Zeitpunkten kann eine gesunde Zelle entscheiden, ob sie die Teilung fortführt, sie diese bis zur Behebung eines Schadens arretiert oder ob sie aufgrund nicht zu behebender Schäden in Apoptose geht. Fehlfunktionen innerhalb dieses Kontrollsystems können zu unkontrollierter Proliferation, Zellmigration und somit in der Folge zu der Entstehung von Krebs führen. Im Bereich der onkologischen Forschung werden die grundlegenden Prinzipien der Entstehung, Ausbreitung und Beeinflussbarkeit maligner Tumoren untersucht. Die Identifizierung der für die Tumorentstehung verantwortlichen molekularen Mechanismen ist die Voraussetzung für die Einschätzung des Tumorverhaltens und die Entwicklung gezielter Therapiemöglichkeiten. Dabei bedient man sich diverser Screeningmethoden mittels Gewebe- und Blutproben, die entsprechend der Untersuchungsanordnung von Modellorganismen oder erkrankten Patienten und gesunden Kontrollgruppen gewonnen werden. Auffällige Proteine werden bezüglich ihrer Rolle bei der Krankheitsentstehung und dem Krankheitsverlauf genauer untersucht. Hier setzt die Fragestellung der vorliegenden Arbeit an.

1.1 Zentrale Mechanismen der Zellzyklusregulation

Der Zellzyklus teilt sich in zwei Hauptphasen auf. In der Synthese-Phase (S-Phase) findet die Verdopplung der DNA statt, während in der Mitose (M-Phase) die Trennung der Schwesterchromatiden und die Zellteilung erfolgt. Die zusätzlichen Gap-Phasen 1 und 2 folgen jeweils auf die S- (G2) und M-Phase (G1). Während dieser Phasen kommt es zu Zellwachstum und der Verdopplung der Organellen. Außerdem kann die Zelle zu diesen Zeitpunkten auf interne und externe Signale reagieren und prüfen, ob angemessene Bedingungen herrschen und vorhergehende Prozesse vollständig abgelaufen sind. Somit bilden die Übergänge von den G-Phasen in die Hauptphasen zentrale Kontrollpunkte während des Zellzyklusablaufs.

Mitogene induzieren über Signalkaskaden den komplexen Ablauf des Zellzyklus, der durch Regulatorproteine geprüft und geleitet wird. Hierbei bilden Zyklin-abhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDKs) die grundlegenden regulatorischen Bestandteile (Hayward et al., 1981; Murray, 1994; Morgan, 1995). Die Konzentration dieser Serin/Threonin-Kinasen ist während des gesamten Zyklus im Zellkern konstant. Ihre katalytische Aktivität beschränkt sich jedoch auf Zellzyklusphasen, in denen sie an Zykline gebunden vorliegen (Nurse, 1990; Maller et al., 1991; Murray, 1994). Zykline werden zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus synthetisiert und abgebaut und beeinflussen neben der Aktivierung von CDKs auch ihre subzelluläre Lokalisation und Substratbindung (Moffat et al., 2000; Takizawa und Morgan, 2000). Zusätzlich zu der Bindung von Zyklinen bedarf die vollständige Aktivierung der Kinasen eine Phosphorylierung durch die CDK-aktivierende Kinase (CAK; Desai et al., 1992; Solomon et al., 1992; Murray, 1994). Die ersten CDKs wurden in Hefen entdeckt (Cdc2; *Schizosaccharomyces pombe* und Cdc28; *Saccharomyces cerevisiae*) und regulieren durch die Bindung aller Zyklinklassen den G1/S- und G2/M-Übergang. In Säugerzellen gibt es, anders als in Hefen, eine große Anzahl verschiedener CDKs, die während der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus aktiv sind (Abb. 1.1.1; Malumbres und Barbacid, 2005). CDK1, das humane Homolog zu Cdc2 und Cdc28, bindet an Zyklin A und B und ist ab dem Ende der S-Phase bis zum Eintritt in die Mitose aktiv. Die G1-Phase und der G1/S-Übergang werden durch die Aktivierung von CDK2, 4 und 6 mittels Bindung an D-, E- oder A-Zykline kontrolliert (Sherr, 1993; Reed, 1997; Malumbres und Barbacid, 2005). Entgegen dieser klassischen Ansicht

der Zellzykluskontrolle zeigten Santamaría et al. (2007), dass CDK1 den Zellzyklus in Säugerzellen, entsprechend dem CDK1 in Hefezellen, alleinständig regulieren kann.

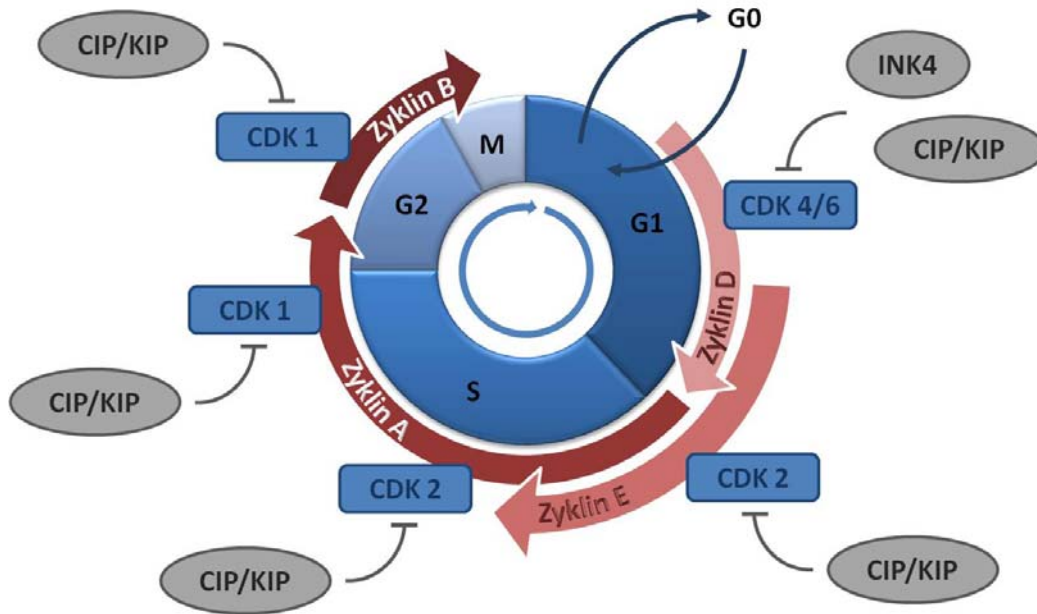


Abb. 1.1.1 Zentrale Mechanismen der Zellzyklusregulation

Die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus werden durch die katalytische Aktivität Zyklin-abhängiger Kinasen (CDK) reguliert. Die Aktivierung der einzelnen Kinasen geschieht durch die Bindung von Zyklinen, die zu bestimmten Zellzyklusphasen synthetisiert und abgebaut werden. Negative Regulation findet durch CDK-Inhibitor-Proteine der INK4- und CIP/KIP-Familie statt.

Neben der Aktivierung durch Zykline und CAK findet negative Regulation durch CDK-Inhibitor-Proteine (CKIs) statt. Sie binden an Zyklin/CDK-Komplexe und unterdrücken so die katalytische Aktivität der Kinasen (Abb. 1.1.1). Diese Inhibierung wird durch antiproliferative Signale vermittelt, wie dem Entzug von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, DNA Schäden, Kontaktinhibierung oder mangelnde zelluläre Adhäsion (Pagano, 1997). CKIs teilen sich in zwei Familien auf. Die Proteine der Ink4-Familie p15, p16, p18 und p19 (*Inhibitors of CDK4*) hemmen die Bindung der D-Zykline und damit CDK4- und CDK6-Aktivierung während der frühen G1-Phase (Serrano et al., 1993; Cánepa et al., 2007). Die Cip/Kip-Inhibitoren p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57 blockieren die Zyklin/CDK-Aktivität in allen Phasen des Zellzyklus, zeigen jedoch die höchste Affinität für Zyklin E/- und Zyklin A/CDK2-Komplexe am G1/S-Übergang (Denicourt und Dowdy, 2004). Die Expression der CKIs unterscheidet sich zwischen Zelltypen und Geweben und wird durch

antimitogene Signalwege beeinflusst (Elledge et al., 1996). Um den Fortlauf des Zellzyklus zu gewährleisten, müssen ihre Spiegel durch die der Zyklin/CDK-Komplexe übertroffen werden. Diese Änderung der Mengenverhältnisse findet während der G1-Phase auf unterschiedlichen Wegen statt, vor allem aber durch Sequestrierung und Ubiquitin-abhängige Proteolyse der Inhibitoren (Sherr und Roberts, 1999).

Die gezielte Proteolyse regulatorischer Proteine spielt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation (King et al., 1996; Hershko, 1997). Dies bedarf zunächst der Ubiquitylierung der Proteine, welche die Aktivität dreier Enzymklassen benötigt. Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1), Ubiquitin-verbindende Enzyme (E2 oder *ubiquitin conjugating enzyme* UBC) und Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3). Proteinligasen bilden neben Proteinkinasen die größte Enzymfamilie in Säugerzellen und sind unter anderem für den schnellen, irreversiblen Abbau zellzyklusregulatorischer Proteine zuständig. Die große Vielfalt der Proteinligasen ermöglicht eine hohe Substratspezifität, wodurch der Abbau vieler verschiedener Proteine innerhalb kürzester Zeit gewährleistet werden kann (Pagano und Benmaamar, 2003). Polyubiquitinierte Proteine werden durch das Proteasom als Substrate erkannt und abgebaut. Auf diese Weise können die Level regulatorischer Proteine gezielt in den inaktiven Grundzustand zurückversetzt werden, wodurch die Zelle nach einem abgeschlossenen Zellzyklus erneut auf extrazelluläre Signale reagieren kann (Hershko und Ciechanover, 1992; Jentsch, 1992).

1.2 Der G1/S-Übergang

Die G1-Phase bildet den End- und Anfangspunkt jeder Zellteilung. Zellen in dieser Phase haben drei Möglichkeiten: Teilung, Differenzierung oder Eintritt in die Ruhephase (Gap-Phase 0, G0). Erhält eine ruhende Zelle wachstumsstimulierende Signale verlässt sie die G0-Phase und tritt in die G1-Phase ein. G1-Zyklin/CDK-Komplexe ermöglichen durch Phosphorylierung von Schlüsselproteinen den Übergang in die Synthesephase, in der das Genom repliziert wird (Pines, 1993; Sherr, 1993). Nach dieser Passage sind keine externen Signale mehr notwendig, um den Zellzyklus zu vollenden (Pardee, 1989).

D-Zykline (D1, D2 und D3) unterscheiden sich durch ihre mitogeninduzierte Synthese von der periodischen Expression der restlichen Zykline. Dadurch bilden sie die direkte Verbindung zwischen externen Signalen und der Zellteilungsmechanik (Sherr und Roberts, 1999) und sind für die Zellzyklusinitiierung während der frühen G1-Phase zuständig. D-Zykline haben eine kurze Halbwertszeit, wodurch mitogeninduzierte Stimulation punktuell wirken kann (Matsushime et al., 1991). Ihre Level werden durch Wachstumsfaktor-abhängige Signale auf Ebenen der Transkription, Translation, Protein Stabilisierung, CDK-Bindung und Translokation erhöht (Sherr und Roberts, 2004). Hauptinteraktionspartner der D-Zykline während der frühen G1-Phase sind CDK4 und CDK6 (Matsushime et al., 1992; Bates et al., 1994; Meyerson und Harlow, 1994). Die zellzyklusfördernde Regulation der Zyklin D/CDK-Komplexe beruht auf der sequestorischen Reduktion von CKI-Leveln (p27^{Kip1}, p21^{Cip1}; Bouchard et al., 1999; Perez-Roger et al., 1999) und in der Inaktivierung von Zellzyklusinhibitoren der Retinoblastom-Familie (Rb, p107, p130; Harbour et al., 1999; Adams, 2001). Die Inaktivierung der Proteine der Rb-Familie wird ebenfalls durch Zyklin E/CDK2-Komplexe erfüllt. Ihre Aktivität beginnt in der späten G1-Phase und erreicht ihr Maximum am G1/S-Übergang (Lew et al., 1991; Dulić et al., 1992; Koff et al., 1992).

Da hypophosphoryliertes Rb während der G1-Phase mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie interagiert (Chellappan, 1991), inhibiert es die Expression von S-Phase-Genen (Hamel et al., 1992; Weintraub et al., 1992; Sherr, 1994). Durch Zyklin D-abhängige Phosphorylierung von Rb und zusätzliche Phosphorylierung durch Zyklin E/CDK2-Komplexe (Harbour und Dean, 2000; Adams, 2001), entlässt pRb E2F aus seiner Bindung und ermöglicht dadurch E2F-abhängige Gentranskription und den Übergang in die S-Phase (Trimarchi und Lees, 2002). Am Beginn der S-Phase bindet CDK2 an Zyklin A und ermöglicht so die Initiation der DNA-Replikation (Pagano und Draetta, 1991). Das freigewordene E2F induziert ebenfalls die Zyklin E- und Zyklin A-Expression, wodurch verstärkte Aktivierung von CDK2 und weitere Phosphorylierung von Rb stattfindet (Sherr und Roberts, 1999)

1.3 Der G2/M-Übergang

Die katalytische Aktivität von CDK1 wird während des G2/M-Übergangs durch B-Zykline (B1, B2) reguliert. Zuvor liegt es am Ende der S-Phase an Zyklin A gebunden vor und gewährleistet so den Übergang in die G2-Phase (Malumbres und Barbacid, 2005). Zyklin B/CDK1-Komplexe bilden den *maturation promoting factor* (MPF; Dunphy et al., 1988; Gautier et al., 1988), der für seine vollständige Aktivierung eine Translokation in den Zellkern (Gavet und Pines, 2010), sowie eine regulierte Phosphorylierung der Kinase benötigt. Während der G2-Phase wird CDK1 durch Wee1- und Myt1-vermittelte Phosphorylierung inhibiert (Parker und Piwnica-Worms, 1992; Liu et al., 1997). Diese negative Regulation wird am Ende der G2-Phase durch Cdc25-Phosphatasen aufgehoben (Strausfeld et al., 1991). Unvollständige Replikation, Stress und *DNA damage* können die CDK1-Dephosphorylierung verzögern und so den Eintritt in die Mitose verhindern (Zhou und Elledge, 2000; Bartek et al., 2004). Nach Aufhebung der repressorischen Phosphorylierung durch Cdc25 ist der MPF in der Lage den Übergang in die Mitose, durch die Phosphorylierung zahlreicher Substrate, zu gewährleisten (Stark und Taylor, 2006).

1.4 Der CDK-Inhibitor p27^{Kip1}

Cip/Kip-Proteine sind negative Regulatoren, deren Funktion an den Kontrollpunkten des Zellzyklus ausschlaggebend ist (Elledge et al., 1996). Manche Proteine dieser Familie haben gleichzeitig auch Zellzyklus-aktivierende Funktionen wie zum Beispiel die Stabilisierung von D-Zyklinen, die Unterstützung der Bildung von Zyklin D/CDK4- und Zyklin D/CDK6-Komplexen und ihrem nukleären Transport (LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999). Alle Cip/Kip-Proteine enthalten eine hoch konservierte Domäne, die für die Bindung und Hemmung von Zyklin/CDK-Komplexen benötigt wird (Nakanishi et al., 1995). p27^{Kip1} oder auch Kinase-Inhibitor Protein 1 (Kip1; Polyak et al., 1994) gehört wie p21^{Cip1} (*Cyclin Inhibitor Protein 1*) und p57 der Cip/Kip-Familie der CDK-Inhibitoren an. Durch die Hemmung von Zyklin E/- und Zyklin A/CDK2-Komplexen (Hengst et al., 1994; Nourse et al., 1994; Polyak et al., 1994; Slingerland et al., 1994) und Unterdrückung ihrer Aktivierung durch CAK (Kato et al., 1994; Polyak et al., 1994) verhindert es den Eintritt in die S-Phase und wird so zu einem Schlüsselprotein des G1/S-Übergangs. Zusätzlich zu

dieser Funktion bindet p27^{Kip1} CDK1 in der G2-Phase und ist so ebenfalls an der Regulation des G2/M-Übergang beteiligt (Nakayama et al., 2004).

p27^{Kip1}-Aktivität wird durch die Konzentration des Proteins, seine subzelluläre Lokalisation und den Phosphorylierungsstatus kontrolliert. In proliferierenden Zellen ist der größte Anteil von p27^{Kip1} in einer inaktiven Form an Zyklin D-abhängige Kinasen gebunden (Toyoshima und Hunter, 1994). Durch proliferationshemmende Signale wird ein Anstieg der Proteinmenge und Stabilisierung des freien Proteins hervorgerufen. Der Wachstumsfaktor *Transforming growth factor β* (TGFβ) induziert zum Beispiel die Expression von p15, einem CKI der Ink4-Familie, der die Freilassung von p27^{Kip1} aus CDK4- und CDK6-Komplexen ermöglicht (Polyak et al., 1994; Reynisdóttir et al., 1995). Freies p27^{Kip1} ist so wieder für die Hemmung von Zyklin E/CDK2-Komplexen verfügbar, wodurch ein unplanmäßiger Eintritt in die S-Phase verhindert wird.

Obwohl es verschiedene transkriptionelle und translationale Regulationen der p27^{Kip1}-Synthese gibt (Vlach et al., 1996; Millard et al., 1997; Chu et al., 2008), sind die mRNA-Level und die Proteinsynthese während des gesamten Zellzyklus und in der G0-Phase stabil (Polyak et al., 1994; Hengst und Reed, 1996). Die wesentliche Regulation des p27^{Kip1}-Gehalts der Zelle findet posttranslational statt (Pagano et al., 1995). Dabei wird nukleäres p27^{Kip1} während der G1-Phase durch Phosphorylierung am Serin 10 (Rodier et al., 2001; Kamura et al., 2004; Besson et al., 2006) und folgende, nicht-kovalente Sequestrierung des Proteins durch D-Zykline reduziert (Polyak et al., 1994; Blain et al., 1997; Cheng et al., 1998). Diese Senkung des p27^{Kip1}-Levels ermöglicht die Aktivierung von Zyklin E/- und Zyklin A/CDK2-Komplexen. Sie phosphorylieren p27^{Kip1} an der Aminosäureseitenkette des Threonien-187 (Thr-187), wodurch p27^{Kip1} gleichzeitig Inhibitor und Substrat dieser Zyklin-abhängigen Kinase ist (Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997; Montagnoli et al., 1999). Phospho-(Thr-187)-p27^{Kip1} ist nun für die Ubiquitylierung durch die E3-Ubiquitinligase SCF^{Skp2} und den folgenden proteasomalen Abbau markiert (Carrano et al., 1999; Sutterlüty et al., 1999; Tsvetkov et al., 1999). Die Aufrechterhaltung des Zyklin/CDK-Phospho-(Thr187)-p27^{Kip1}-Komplexes ist dabei entscheidend für die Erkennung und Ubiquitylierung des CDK-Inhibitors durch die Ligase (Montagnoli et al., 1999).

Der Multienzym-Komplex SCF^{Skp2} besteht aus den Proteinen Skp1 (*S-phase kinase associated protein*), einer Cullin Untereinheit (Cul1), dem *ring box protein 1* (RBX1) und dem

E-Box-Protein Skp2 (Carrano et al., 1999; Sutterlüty et al., 1999; Tsvetkov et al., 1999). Zusätzlich wird das Protein Cks1 für die Erkennung von Phospho-(Thr-187)-p27^{Kip1} benötigt (Kapitel 1.5.1). Der restliche p27^{Kip1}-Gehalt der Zelle bleibt an Zyklin D/CDK-Komplexe gebunden und wird bei Mitogenentzug in der folgenden G1-Phase freigesetzt um Zellzyklusarrest durch Zyklin/CDK2-Inhibierung auszulösen (Toyoshima und Hunter, 1994).

Aufgrund der Fähigkeit Zellproliferation zu blockieren zählt p27^{Kip1} zu den Tumorsuppressoren. Niedrige p27^{Kip1}-Level sind in verschiedenen humanen Tumorarten vorzufinden und sind ein bedeutender prognostischer Marker schlechter Überlebenschancen (Slingerland und Pagano, 2000; Chu et al., 2008). In karzinogenen Geweben führt nicht der Verlust von p27^{Kip1}-mRNA (Esposito et al., 1997; Chiarle et al., 2000), sondern p27^{Kip1}-Haploinsuffizienz, sowie veränderte Amplifikation oder Stabilisierung von Zyklin E, Skp2 oder Cks1 zu einem erhöhten Abbau des CDK-Inhibitors und verhindert so Zellzyklusarrest durch p27^{Kip1}-Akkumulation (Bloom und Pagano, 2003; Chu et al., 2008; Erlanson et al., 1998; Hershko et al., 2001; Kudo et al., 2001; Pietenpol et al., 1995). Im Mausmodell weisen p27^{Kip1}-defiziente Tiere, aufgrund erhöhter Zellzahlen, Gigantismus mit einhergehender Organomegalie auf, ohne dabei eine verminderte terminale Differenzierung erkennen zu lassen (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996). p27^{Kip1}-defiziente und haploinsuffiziente Tiere neigen zu Tumorinduktionen (Fero et al., 1998). Ebenfalls wurde der partielle Verlust von p27^{Kip1} bei vielen humanen Tumoren vorgefunden (Pietenpol et al., 1995; Sato et al., 1995), wohingegen Mutationen im p27^{Kip1}-Gen nur selten zu beobachten sind (Kawamata et al., 1995; Morosétti et al., 1995; Pietenpol et al., 1995; Ponce-Castañeda et al., 1995).

Zusätzlich zum p27^{Kip1}-Gehalt spielt die Lokalisation des Proteins eine Rolle bei der Karzinogenese. Zytoplasmatisches p27^{Kip1} fungiert als ein kooperierendes Onkogen während der Transformation und wird mit erhöhter Tumoraggressivität und verringerter Lebenserwartung gegenüber dem alleinigen nukleären Verlust von p27^{Kip1} assoziiert (Liang et al., 2002; Chu et al., 2008; Serres et al., 2011).

1.5 Cks1 und seine Rolle im Zellzyklus

Cks1 oder auch *Cdc kinase subunit 1* wurde ursprünglich in Hefen (*Saccharomyces pompe* und *Saccharomyces cerevisiae*) entdeckt (Hayles et al., 1986; Hadwiger et al., 1989). Es gehört der strukturell und funktionell hoch konservierten Familie der Suc1 (*suppressor of Cdc2 mutation*)/Cks-Proteine an, deren Mitglieder in allen eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Cks-Proteine sind durch ihre Fähigkeit an CDKs und phosphorylierte Proteine zu binden, wichtig für die fortlaufende Funktion des Zellzyklus (Brizuela et al., 1987; Richardson et al., 1990; Bourne et al., 1996; Pines, 1996). Kristallographische Analysen konnten zeigen, dass die Bindung von Cks-Proteinen außerhalb des aktiven Zentrums der CDKs stattfindet und zu keiner bedeutenden Strukturveränderung führt (Arvai et al., 1995; Bourne et al., 1996; Morris et al., 1998). Somit entsteht die erhöhte, Cks1-vermittelte Phosphorylierungsaktivität der Kinasen durch eine substratspezifische Ziel- beziehungsweise Bindungsfunktion für Zyklin/CDK-Komplexe und nicht durch zusätzliche Aktivierung (Tang und Reed, 1993).

Niedrige Eukaryoten besitzen ein Cks-Protein, während humane Zellen und die anderer Vertebraten zwei Paraloge, Cks1 und Cks2, exprimieren. Beide Proteine können die Funktion des Cks1 in Hefen ersetzen (Richardson et al., 1990), sind in ihrer Funktion in humanen Zellen jedoch nicht redundant (Ganoth et al., 2001; Spruck et al., 2001). Es wurden bereits viele Funktionen der Cks-Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus entdeckt. In niedrigen Eukaryoten wurden vornehmlich mitotische Funktionen von Cks1 untersucht. In *S. pompe* und *S. cerevisiae* sowie in *Xenopus* Eiern und *Caenorhabditis elegans* führt der Verlust von Cks1 zu mitotischem Arrest (Hayles et al., 1986; Patra und Dunphy, 1996; Polinko und Strome, 2000; Tang und Reed, 1993), der auf den Verlust CDK1-katalysierter Phosphorylierung mitotischer Regulatorproteine zurückzuführen ist (Patra und Dunphy, 1998; Rudner und Murray, 2000). Vermutlich unterstützt Cks1 die CDK-Substrat-Zusammenführung, indem es phosphorylierte Zielproteine über die eigene Phosphatbindungsstelle bindet (Bourne et al., 1996). Des Weiteren spielt Cks1 eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation essentieller mitotischer Faktoren (Morris et al., 2003; Yu et al., 2005).

Während das Cks1-Protein in Hefen eine Rolle am G1/S- aber auch am G2/M-Übergang spielt (Tang und Reed, 1993; Reynard et al., 2000), werden diese Funktionen in humanen

Zellen teilweise von beiden Paralogen übernommen, zum Teil aber auch nur von einem der Proteine erfüllt. Beide Proteine gewährleisten die effiziente Transkription entscheidender Zellzykluskontrollgene und fördern somit den G2/M-Übergang (Morris et al., 2003; Yu und Reed, 2004; Westbrook et al., 2007; Martinsson-Ahlzén et al., 2008), wodurch der Verlust beider Cks-Paraloge aufgrund fehlender Zyklin B1/CDK1-Expression bereits während des Morulastadiums letal ist (Martinsson-Ahlzén et al., 2008). Zudem werden beide Paraloge während der Prometaphase für die Spindelcheckpoint-unabhängige Degradierung von Zyklin A benötigt (Wolthuis et al., 2008; van Zon et al., 2010). Ihre unabhängigen Funktionen zeigen sich bereits in den Proteinspiegeln. Während das Cks1-Level am G1/S-Übergang maximal ist, wo das Protein für die SCF^{Skp2}-vermittelte Ubiquitinierung und den damit verbundenen Abbau von p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, p57 und p130 verantwortlich ist (Spruck et al., 2001; Ganoth et al., 2001; Yu et al., 1998; Bornstein et al., 2003; Kamura et al., 2003; Tedesco et al., 2002), erreicht Cks2 sein Maximum zu einem späteren Zeitpunkt im Zellzyklus (Richardson et al., 1990). Frontini et al., (2012) zeigten außerdem, dass Cks2 die Fähigkeit besitzt die SCF^{Skp2}-abhängige Funktion von Cks1 zu unterdrücken. Dabei schlagen sie ein Modell vor, bei dem Cks2 an phosphoryliertes p27^{Kip1} bindet und es so vor SCF^{Skp2}-vermitteltem Abbau schützt.

1.5.1 Cks1 als Mittler des p27^{Kip1}-Abbaus am G1/S-Übergang

Cks1 ist ein bedeutender Mediator bei der Erkennung von phosphoryliertem p27^{Kip1} (Ganoth et al., 2001; Spruck et al., 2001). Durch Bindung des SCF^{Skp2}-Ligase-Komplexes über Skp2 wird eine Konformationsänderung des F-Box-Proteins induziert, wodurch die Affinität für den CDK-Inhibitor verstärkt wird (Sitry et al., 2002; Yao et al., 2006). Diese Interaktion gewährleistet den effizienten Transfer von Ubiquitinmolekülen (Ub) und somit die Markierung des Proteins für den proteasomalen Abbau (Abb. 1.5.1.1; Bartek und Lukas, 2001).

Cks1- und Skp2-Level verhalten sich während des Zellzyklus ähnlich. Sie steigen am G1/S-Übergang an, erreichen ihr Maximum während der S- und G2-Phase (Richardson et al., 1990; Carrano et al., 1999; Marti et al., 1999) und werden in der späten M-Phase und zu Beginn der G1-Phase durch die Aktivität einer weiteren E3-Ubiquitinligase, dem *anaphase promoting complex/cyklosom-Cdh1* (APC/C^{Cdh1}), reduziert (Hattori et al., 2003;

Bashir et al., 2004). Cks1-defiziente Mäuse sind viabel. Sie zeigen einen verkleinerten Phänotyp entsprechend dem *Skp2*-defizienter Tiere und gegensätzlich dem der *p27^{Kip1}-Knockouts* (Spruck et al., 2001; Nakayama et al., 2000; Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996). Dabei ist die verminderte Größe nicht auf kleinere Zellen, sondern auf verringerte Zellzahlen zurückzuführen, die durch veränderte Proliferation verursacht werden (Spruck et al., 2001). Die Zellen Cks1- und Skp2-defizienter Tiere akkumulieren p27^{Kip1} in seiner phosphorylierten, an Zyklin E/CDK2 oder Zyklin A/CDK2 gebundenen, präubiquitylierten Form. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass Cks1 ein wesentlicher Faktor bei der Ubiquitylierung von p27^{Kip1} ist (Ganoth et al., 2001; Spruck et al., 2001).

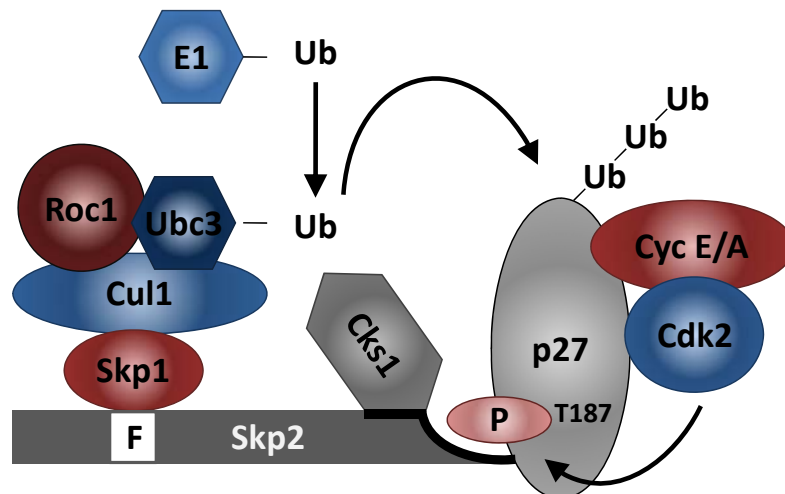


Abb. 1.5.1.1 SCF^{Skp2}-induzierte p27^{Kip1}-Degradierung adaptiert nach Bartek und Lukas (2001)

Durch direkte Bindung von Cks1 an das F-Box-Protein Skp2, ist die E3-Ubiquitinligase SCF^{Skp2} in der Lage Thr-187-phosphoryliertes p27^{Kip1} zu ubiquitylieren und den Inhibitor so für den proteasomalen Abbau zu markieren.

1.5.2 Cks1 und Skp2 bei der Tumorgenese

Ein niedriges p27^{Kip1}-Level ist in vielen Tumorerkrankungen ein schlechter prognostischer Faktor (Slingerland und Pagano, 2000; Chu et al., 2008). Da in erkrankten Zellen keine inaktivierenden Mutationen des *CDKN1B/p27^{Kip1}*-Gens und kein unverändertes p27^{Kip1}-mRNA-Level nachweisbar sind, wurde auf eine erhöhte Degradierung von p27^{Kip1}

durch Hyperaktivierung bestimmter Komponenten der E3-Ubiquitinligase SCF^{Skp2} geschlossen (Bloom und Pagano, 2003). Untersuchungen der mRNA- und Protein-Level von Skp2 und Cks1, den limitierenden Faktor beim p27^{Kip1}-Abbau (Ganoth et al., 2001; Spruck et al., 2001), ergaben viele Erkrankungen mit gesteigerten Spiegeln. Erhöhte Skp2-Level konnten in humanen Erkrankungen wie Lymphomen, primärem Darmkrebs, Brustkrebs, Hals und Nacken Karzinomen, Prostata- und Lungenkrebs, sowie in Magenkarzinomen nachgewiesen werden (Chiarle et al., 2000, 2002; Hershko et al., 2001; Shapira et al., 2005; Signoretti et al., 2002; Kudo et al., 2001; Gstaiger et al., 2001; Shintani et al., 2003; Drobnjak et al., 2003; Yokoi et al., 2002; Masuda et al., 2002). Außerdem führt Skp2-Überexpression in ruhenden Zellen bei niedriger Serumzugabe zu einer Induktion der DNA-Replikation (Sutterlüty et al., 1999). Im Gegensatz dazu bewirkt überexprimiertes Skp2 keine Zelltransformation *in vivo*, kooperiert allerdings mit aktiviertem N-Ras (*neuroblastoma rat sarcoma*) und führt so in den Zellen zu einem Proliferationsvorteil gegenüber Zellen mit endogenen Skp2-Leveln (Latres et al., 2001). Gesteigerte Expression von Cks1 wurde beim Plattenepithelkarzinom, Magenkarzinom, sowie bei Brust-, Prostata- und Darmkrebs mit hohen Proliferationsraten und einer schlechten Prognose assoziiert (Kitajima et al., 2004; Masuda et al., 2003; Slotky et al., 2005; Shapira et al., 2006, 2004, 2005). Das Multiple Myelom wird ebenfalls mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose assoziiert. Dabei besteht die häufigste Mutation in Myelomzellen in einer Amplifizierung des chromosomalen Abschnitts 1q21, die mit einer gesteigerten Expression von Cks1 einhergeht (Shaughnessy, 2005; Chang et al., 2006; Fonseca et al., 2006).

Während die Cks1- und Skp2-Überexpression in vielen Fällen mit einer Reduktion des p27^{Kip1}-Gehalts der Zelle korreliert, zeigen andere Studien, dass Cks1-Überexpression eine verschlechterte Prognose gegenüber Skp2-Überexpression bedeutet und teilweise sogar unabhängig von einem p27^{Kip1}-Verlust auftritt (kleinzelliges Lungenkarzinom; Inui et al., 2003; Multiples Myelom; Chang et al., 2010). Auch konnte Cks1-Überexpression mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien bei Darmkrebspatienten assoziiert werden, während die Level von Skp2 und p27^{Kip1} unauffällig blieben (Shapira et al., 2005). Beim Multiplen Myelom zeigt Skp2 im Gegensatz zu Cks1 keine signifikante Erhöhung (Shaughnessy, 2005). Ebenfalls führt der Verlust von Cks1 in transformierten Plasmazellen zu p27^{Kip1}-Akkumulation, einer starken Wachstumsinhibierung und zu Apoptose. Im Gegensatz dazu

resultiert die Reduktion von Skp2 oder die Expression einer nicht abbaubaren Mutante von p27^{Kip1} in p27^{Kip1}-Akkumulation und reduzierter Proliferation, induzierte jedoch keinen apoptotischen Phänotyp (Zhan et al., 2007).

Ein niedriger p27^{Kip1}-Gehalt und erhöhte Cks1- und Skp2-Level sind ein Kennzeichen c-Myc-induzierter Lymphome (Keller et al., 2007; Old et al., 2010). E μ -Myc-Mäuse sind ein Modell des humanen Burkitt-Lymphoms, bei dem das *c-Myc*-Gen durch Translokation unter die Kontrolle des E μ -Promotors der schweren Immunglobulin Seitenkette gestellt wurde. Die dadurch induzierte konstitutive c-Myc-Expression führt nach 6 bis 15 Wochen zu der Entstehung aggressiver B-Zell-Lymphome (Adams et al., 1985). Obwohl c-Myc repressorisch auf die Transkription des p27^{Kip1}-Promotors *CDKN1B* wirkt (Yang et al., 2001; Chandramohan et al., 2008), sind seine Effekte auf den Umsatz des Proteins ausschlaggebend. c-Myc induziert die Expression von Zyklin D1, D2 und CDK4 (Bouchard et al., 1999; Perez-Roger et al., 1999; Hermeking et al., 2000) die an der Sequestrierung von p27^{Kip1} beteiligt sind. Außerdem induziert c-Myc die Expression von E2F1 und der SCF^{Skp2}-Bestandteile Cull1, Skp2 und Cks1 (Baudino et al., 2003; O'Hagan et al., 2000; Old et al., 2010; Keller et al., 2007). Die Induktion von Skp2 und Cks1 findet dabei indirekt und auf mRNA-Ebene statt (Keller et al., 2007; Old et al., 2010).

Der Verlust von p27^{Kip1} beschleunigt die Lymphomagenese in E μ -Myc-Mäusen signifikant und resultiert in einer verminderten B-Zell-Differenzierung und einer gesteigerten Proliferation der Splenozyten (Martins und Berns, 2002). Im Gegensatz dazu führt *Cks1*- oder *Skp2*-Verlust in diesem Modell zu längeren Latenzzeiten und p27^{Kip1}-Akkumulation, bei gleichbleibender mRNA-Menge (Keller et al., 2007; Old et al., 2010). Auffälligerweise ist die Verzögerung des Krankheitsverlaufes durch *Skp2*-Verlust weniger gravierend als die der *Cks1*-Defizienz (Old et al., 2010). Ebenfalls führt nur der Verlust von *Cks1* zu verminderter Dissemination der Tumorzellen (Keller et al., 2007; Old et al., 2010). Dies konnte auch bei Brustkrebspatienten beobachtet werden (Wang et al., 2009). Diese Beobachtungen deuten auf eine Rolle von Cks1 während der Tumorentstehung hin, die außerhalb der p27^{Kip1}-Degradierung liegt und unterstreicht die Rolle von Cks1 als kritischem Mediator während der Tumorgenese.

2 Material

2.1 Chemikalien, Medien und Supplement

α -MEM	<i>Gibco</i>
β -Glycerophosphate	<i>Sigma-Aldrich</i>
2-Mercaptoethanol, 50 mM	<i>Invitrogen</i>
5-Fluorouracil	<i>Medac</i>
ACK-Lysepuffer	<i>Gibco</i>
Acrylamid/Bisacrylamid, 30 %	<i>Sigma-Aldrich</i>
Agarose NEEO ultra quality Roti [®] Garose	<i>Carl Roth</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bacto [™] Agar	<i>Omin Life Science</i>
Bacto [™] Hefeextrakt	<i>Roth</i>
Bacto [™] Trypton	<i>Roth</i>
Borax	<i>Sigma</i>
Bovine Serumalbumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich</i>

Material

Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail)	<i>Roche</i>
Deionisiertes Wasser	<i>Braun</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Riedel-de Haën</i>
Diphtherietoxin	<i>Calbiochem</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma-Aldrich</i>
dNTP Mix, 10 mM	<i>Fermentas</i>
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	<i>Invitrogen</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Invitrogen</i>
4,5g/l Glucose	<i>Gibco</i>
Ethanol	<i>Riedel-de Haën</i>
Ethidiumbromid	<i>Carl Roth</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Carl Roth</i>
Ethylenglycolbistetraessigsäure (EGTA)	<i>Carl Roth</i>
Fetales Kälber Serum (FCS)	<i>PAA Laboratories GmbH</i>
Fetales Kälber Serum Gold	<i>PAA Laboratories GmbH</i>
Formalin (4 %)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Gelatine	<i>Sigma</i>
Glukose	<i>Merck</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Glycin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Hank's Buffered Salt Solution, 10x (HBSS)	<i>Gibco</i>
HEPES	<i>Sigma-Aldrich</i>
Horse Serum (HS)	<i>PAA</i>
Hygromycin B, 50 mg/ml in PBS	<i>Sigma-Aldrich</i>
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	<i>Gibco</i>

Isopropanol	<i>Fluka</i>
Kaliumchlorid (KCl ₂)	<i>Merck</i>
L-Glutamin, 200 mM	<i>Invitrogen</i>
Lipofectamin [®] 2000	<i>Invitrogen</i>
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	<i>Merck</i>
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	<i>Roth</i>
Methanol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Methocult 3234	<i>Stem Cell Technologies</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Carl Roth</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Natriumfluorid (NaF)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	<i>Invitrogen</i>
NP-40	<i>MP Biomedicals</i>
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	<i>Invitrogen</i>
Opti-Mem [®] I Reduced Serum Media	<i>Invitrogen</i>
Penicillin/Streptomycin (P/S)	<i>Invitrogen</i>
Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Phosphat Buffered Saline (PBS)	<i>PAA</i>
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	<i>Invitrogen</i>
Polybren (Hexadimethrinbromid)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Propidium Iodid (PI)	<i>Invitrogen</i>
Proteinase K	<i>Ambion</i>
rekombinantes, murines Interleukin-3 (mIL-3)	<i>R&D Systems</i>
rekombinantes, murines Interleukin-6 (mIL-6)	<i>R&D Systems</i>

Material

rekombinantes, murines Interleukin-7 (mIL-7)	<i>R&D Systems</i>
rekombinanter, muriner Stammzellfaktor (mSCF)	<i>R&D Systems</i>
RNase OUT	<i>Invitrogen</i>
RPMI-1640 Medium (-L-Glutamin)	<i>Gibco</i>
Salzsäure (HCl)	<i>Merck</i>
SuperSignal West (Pico/Dura/Femto)	<i>Pierce</i>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	<i>Carl Roth</i>
Trockenmilchpulver	<i>Fluka</i>
Trypanblau 0,4 %	<i>Invitrogen</i>
Trypsin-EDTA-Lösung, 10x	<i>Gibco</i>
Tween 20	<i>Carl Roth</i>
Ultra Pure Distilled Water (Aqua dest.)	<i>Invitrogen</i>

2.2 Verbrauchsmaterialien

6 well-Platten	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
12 well-Platten	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
CL-Xposure film	<i>Thermo Scientific</i>
Cryo Tubes TM	<i>Corning</i>
Discardit TM II Spritze, steril	<i>BD Biosciences</i>
Eppis, 1,5 ml und 2 ml	<i>Sarstedt</i>
Facsröhrchen, 5 ml	<i>BD Biosciences</i>
MicroSpin Columns (illustra TM)	<i>GE Healthcare</i>
Objektträger	<i>Mediware</i>
PCR-Strips	<i>Biozym Scientific GMBH</i>

Petrischalen	<i>Peske</i>
Pipetten	<i>BD Biosciences</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt AG & Co.</i>
Parafilm	<i>Pechiney Plastic Packaging</i>
PVDF-Membran	<i>Bio-Rad</i>
S-Monovette [®] , EDTA	<i>Sarstedt</i>
Whatman [®] Papier	<i>Biometra</i>
Zellkulturflaschen	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
Zellkulturschalen	<i>TPP</i>
Zellsieb	<i>BD Bioscience</i>
Aluminiumnadeln	<i>Kendall Monoject</i>

2.3 Geräte und technisches Zubehör

-20°C Gefrierschrank (Liebherr Premium)	<i>Liebherr Hausgeräte GmbH</i>
4°C Kühlschrank (Liebherr Premium)	<i>Liebherr Hausgeräte GmbH</i>
-80°C Gefrierschrank	<i>Sanyo</i>
(V.I.P. [™] -86°C ULT, MDF-U52V)	<i>SANYO Electric Biomedical Co.</i>
Analysewaage	<i>Kern</i>
Bakterieninkubator (Infors HAT Minitron)	<i>Infors GmbH</i>
Brutschrank (Heraeus Hera cell 240)	<i>Heraeus</i>
Durchflusszytometer (Coulter [®] Epics [®] XL [™])	<i>Beckman Coulter GmbH-Diagnostics</i>
Durchflusszytometer (Cyan ADP Lx P8)	<i>Cytomation; Beckman Coulter</i>
Durchflusszytometer (MoFlo)	<i>Cytomation; Beckman Coulter</i>
Durchflusszytometer (Canto2)	<i>Becton Dickinson</i>

Material

Filmentwickler (Hyperprocessor)	<i>Amersham Life Science</i>
Glasplatten (Multigel Long)	<i>Biometra GmbH</i>
Glaswaren	<i>Labware SCHOTT AG</i>
Infrarotlampe	<i>Petra</i>
Käfigsystem IVC	<i>Tecniplast</i>
Lichtmikroskop	<i>Zeiss</i>
Microfuge (Heraeus Biofuge fresco)	<i>Heraeus</i>
Microfuge (Heraeus Megafuge 3.0 RS)	<i>Heraeus</i>
Microfuge (Heraeus Multifuge 3s)	<i>Heraeus</i>
Microfuge (MiniSpin)	<i>Eppendorf AG</i>
Minishaker (MS1)	<i>IKA® Werke GmbH & Co. KG</i>
PCR-Thermocycler	<i>MJ Research</i>
Photometer (SmartSpec™ PLUS)	<i>Bio-Rad</i>
Pipetboy	<i>Integra Biosciences AG</i>
Power Pac 200	<i>Bio-Rad</i>
Power Pac P25 T	<i>Biometra</i>
Real time PCR Maschine (7900 HT)	<i>Applied Biosystems</i>
SDS-Gelelektrophoresekammer (Multigel Long)	<i>Biometra GmbH</i>
Sezierbesteck	<i>Fine Science Tools GmbH</i>
SONOPLUS Homogenisator (SONOPLUS HD 2070)	<i>Bandelin electronic</i>
Sterilbank (HeraSafe HSP 18)	<i>Heraeus</i>
Stickstofftank (K-Series Cryo Storage Systems)	<i>Taylor Wharton GmbH</i>
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf AG</i>
Transferkammer	<i>Bio Rad</i>
UV-Lampe	<i>Biometra</i>

Vet abc Bloodcounter

Scil

Wasserbad

Grant

Zählkammer (Neubauer)

LO-Laboroptik

2.4 Softwareprogramme

Corel Photo Paint

FlowJo Version 7

Graph Pad Prism Version 5

Microsoft Excel

Microsoft PowerPoint

Microsoft Word

Vector NTI (*Invitrogen*)

2.5 Enzyme

PfuTurbo DNA Polymerase

Stratagene

Quick Ligase

New England BioLabs

Shrimp Alakline Phosphatase

Promega

Taq-Polymerase

Invitec

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden über die Firma *Fermentas* bezogen.

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Genotypisierung

Name	Sequenz 5'→3'
Cks1-1	CGGAGGATGTAAAACAATGAAA
Cks1-2	GGGAAATCGCCACAACAAAG
Cks1-Neo	CTGTGGTTTCCAAATGTGTCA
mgK3	TGGAACCCTGTGCCATCTCTAT
mcK5	GAGCAGACGCCCAAGAAGC
p27 ^{Kip1} -Neo	CCTTCTATGGCCTTCTTGACG
Myc Fw	ACCTCTCCGAAACCAGGCACCGCAA
Myc Rev	TCTTGCTCGCGCGCTAGTCCTTCC
CD 19 Cre Fw	AACCATTCAACACCCTTCC
CD 19 Cre Rev	CCAGACTAGATACAGACCAG
Cre7	TCAGCTACACCAGAGACGG

2.6.2 Klonierung

Name	Sequenz 5'→3'
Cks1 Fw EcoRI	CCGGAATTCATGTCCCACAAACAAATC
Cks1 Rev BglII	CGCAGATCTTCATTTCTTTGGCTTCTTGG
Cks1 Fw BglII	CCGAGATCTATGTCCCACAAACAAATC
Cks1 Rev XhoI	CGCCTCGAGTCATTTCTTTGGCTTCTTGG
Stop Fw EcoRI	CGCAGATCTTGCAGATATCCA
Stop Rev XhoI/BglII	GCGCTCGAGAGATCTATAACTTCG

IRES Fw EcoRI	CGCGAATTCTGGTGAGGCTGCT
thCD2 Rev Nco	CGCCCATGGACTAGTGGATCTC

2.6.3 Real time PCR

Name	Sequenz 5'→3'
Cks1 RT Fw m	CGTTCAGCAGAGTCAGGGATG
Cks1 RT Rev m	AGTGAGGACAGCTGTGGACCG

2.7 Klonierungsvektoren und Expressionsplasmide

MIG-R1	J. Miller und W. Pear, Philadelphia
MIG-Myc	zur Verfügung gestellt von C. Schmitt, Berlin
MIG-L-gp130	zur Verfügung gestellt von T. Dechow, München
MIG-wt gp130	zur Verfügung gestellt von T. Dechow, München
MIR	zur Verfügung gestellt von J. Duyster, München
MSCV-STOP	zur Verfügung gestellt von C. Miething, München
pMSCV-STOP-DEST-IRES-thCD2-WPRE	zur Verfügung gestellt von M. Schmitt-Supprian, München

2.8 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

Gene Ruler™ 1 kb Plus Ladder	<i>Invitrogen</i>
Precision Plus Protein Standards (Dual Color)	<i>Bio-Rad</i>

2.9 Antikörper

2.9.1 Westernblot

Primärantikörper	Konzentration	Hersteller
anti-Aktin; α -mouse	1/5000	<i>Sigma</i>
anti-BCL-2; α -mouse	1/2000	<i>BD Pharmingen</i>
anti-BCL-XL; α -rabbit	1/2000	<i>Cell Signaling</i>
anti-Cks1 (C-term); α -rabbit	1/125	<i>Zymed Laboratories</i>
anti-ERK1/2; α -rabbit	1/1000	<i>Cell Signaling</i>
anti-gp130; α -rabbit	1/2000	<i>Santa Cruz</i>
anti-Myc; α -rabbit	1/400	<i>Santa Cruz</i>
anti-p27 ^{Kip1} ; α -mouse	1/2000	<i>Transduction Laboratories</i>
anti-pERK1/2; α -rabbit	1/1000	<i>Cell Signaling</i>
anti-pSTAT3; α -rabbit	1/1000	<i>Cell Signaling</i>
anti-STAT3; α -rabbit	1/1000	<i>Cell Signaling</i>

Sekundärantikörper	Konzentration	Hersteller
anti-mouse (HRP-linked)	1/10000	<i>GE Healthcare</i>
anti-rabbit (HRP-linked)	1/10000	<i>GE Healthcare</i>

2.9.2 Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
CD2	PECy-7	1 µl/1Mio Zellen	<i>e Bioscience</i>
B220	FITC	1/400	<i>e Bioscience</i>
B220	AF780	1/200; 1/400	<i>e Bioscience</i>
B220	APC	1/200	<i>e Bioscience</i>
B220	PE-Cy5	1 µl/1Mio Zellen	<i>e Bioscience</i>
CD4	PE	1 µl/1Mio Zellen	<i>e Bioscience</i>
CD5	APC	1/200	<i>e Bioscience</i>
CD8a	PE	1 µl/1Mio Zellen	<i>BD Pharmingen</i>
CD11b	PE	1/500	<i>e Bioscience</i>
CD11b	PE-Cy5	1 µl/1Mio Zellen	<i>e Bioscience</i>
CD19	PE-Cy5	1/400	<i>e Bioscience</i>
CD19	PE-Cy7	1/400	<i>e Bioscience</i>
CD21	PE	1/200	<i>e Bioscience</i>
CD23	PE-Cy7	1/400	<i>e Bioscience</i>
CD25	PE-Cy5	1/200; 1/400	<i>e Bioscience</i>
CD40	PE	1/400	<i>e Bioscience</i>
CD43	FITC	1/200	<i>e Bioscience</i>
CD43	PE	1/200	<i>e Bioscience</i>
CD45	eFluor450	1 µl/1Mio Zellen	<i>e Bioscience</i>
CD86	PE-Cy5	1/400	<i>e Bioscience</i>
CD138	PE	1 µl/1Mio Zellen	<i>BD Pharmingen</i>
GR1	PE	1 µl/1Mio Zellen	<i>e Bioscience</i>

Material

IgD	FITC	1/200	<i>e Bioscience</i>
IgD	PE	1/200	<i>e Bioscience</i>
IgM	APC	1/200; 1/400	<i>e Bioscience</i>
IgM	FITC	1/200	<i>e Bioscience</i>
IgM	PE	1 µl/1Mio Zellen	<i>e Bioscience</i>
IgM	PE-Cy7	1/400	<i>e Bioscience</i>
MHC II	AF780	1/400	<i>e Bioscience</i>
MHC II	PE-Cy5	1/400	<i>e Bioscience</i>
Fc-Block		1/200	<i>e Bioscience</i>

2.10 Kits

FITC BrdU Flow Kit	<i>BD Pharmingen</i>
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen</i>
Bio-Rad Protein Assay	<i>Bio-Rad</i>
Qiagen [®] HiSpeed [®] Plasmid Maxi Kit	<i>Qiagen</i>
Qiagen [®] Omniscript RT Kit	<i>Qiagen</i>
Qiagen [®] Qiaschredder	<i>Qiagen</i>
Qiagen [®] Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen</i>
Power Sybr Green PCR Master Mix	<i>Applied Biosystems</i>

2.11 Bakterien und Zelllinien

2.11.1 Bakterien

One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* *Invitrogen*

2.11.2 Zelllinien

32 D immortalisierte myeloblastenähnliche Suspensionszelllinie, die aus murinen Langzeit Knochenmarkkulturen gewonnen wurde. Die Zellen sind von der Zugabe von Wachstumsfaktoren (mIL-3) abhängig.

Ba/F3 immortalisierte murine pro-B-Zelllinie, die aus peripherem Blut von Balb/c-Mäusen gewonnen wurde. Die Zellen sind von der Zugabe von Wachstumsfaktoren (mIL-3) abhängig.

EL08 murine Stromazelllinie aus der Aorta-Gonaden-Mesonephros Subregion

NIH-3T3 murine embryonale Fibroblastenzelllinie (Littlefield 1982)

Phoenix E ecotrope Retrovirus-produzierende Zelllinie, die auf der humanen 293T Zelllinie basiert. 293T Zellen wurden mit Konstrukten infiziert, welche die für die Virusproduktion wichtigen Proteine gag, pol und env codieren.

Lymphomzelllinien eigens gezüchtete, immortalisierte E μ -*Myc*-Zelllinien

2.12 Versuchstiere

wildtypische Kontrolltiere (C57BL/6-129 gemischter Hintergrund)

Cks1^{-/-} (C57BL/6-129 gemischter Hintergrund; Spruck et al., 2001)

Material

p27^{Kip1-/-} (C57BL/6-129 gemischter Hintergrund; Fero et al., 1996)

Cks1^{-/-};p27^{Kip1-/-} (C57BL/6-129 gemischter Hintergrund; eigene Kreuzung)

Eμ-Myc (C57BL/6-129 gemischter Hintergrund; eigene Kreuzung)

Eμ-Myc; Cks1^{-/-} (C57BL/6-129 gemischter Hintergrund; eigene Kreuzung)

CD19Cre (C57BL/6)

Für die Transplantationsexperimente wurden die C57BL/6- und Balb/c-Empfängertiere bei *Harlan Winkelmann* und *Charles River* bestellt.

2.13 Zellkulturmedien und -puffer

Basales Knochenmarkmedium (BBMM): IMDM
30 % FCS Gold
5 % BSA (10 % in IMDM)
1 % L-Glutamin (200 mM)
0,02 % 2-Mercaptoethanol
0,5 % Penicillin/Streptomycin-Lösung
steril filtrieren; Aufbewahrung bei 4°C

Prästimulationsmedium: BBMM
10 ng/ml mIL-3
10 ng/ml mIL-6
50 ng/ml mSCF

Stromazellmedium: α-MEM
15 % FCS (hitzeinaktiviert)
5 % HS
1 % Penicillin/Streptomycin Lösung
0,02 % 2-Mercaptoethanol
steril filtrieren; Aufbewahrung bei 4°C

NIH/3T3- und Phoenixzellmedium:	DMEM 10 % FCS (hitzeinaktiviert) Aufbewahrung bei 4°C
Lymphomzellmedium:	RPMI 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung 1 % NEAA 1 % L-Glutamin 0,1 % 2-Mercaptoethanol Aufbewahrung bei 4°C
32D- und Ba/F3-Zellmedium:	RPMI 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung 1 % L-Glutamin Aufbewahrung bei 4°C
HF2 ⁺ -Puffer:	10 % HBSS, 10x 2 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % HEPES 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung deionisiertes Wasser steril filtrieren; Aufbewahrung bei 4°C
Gelatine 1 %:	1 % Gelatinepulver deionisiertes Wasser autoklavieren; Aufbewahrung bei 4°C
FACS-Puffer:	0,5 % BSA DPBS Aufbewahrung bei 4°C

Einfriermedium: FCS
10 % DMSO
Aufbewahrung bei 4°C

2.14 Stammlösungen und Puffer

NAB-Puffer (1x): 0,19 % Borax
deionisiertes Wasser

LB-Medium (flüssig): 1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl
deionisiertes Wasser

LB-Medium (fest): 1,5 % Agar
LB Medium

SOC-Medium: 2 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
0,058 % NaCl
0,25 % MgCl₂ (1 M)
1 % MgSO₄ (1 M)
0,34 % Glukose
deionisiertes Wasser

APS (10 %): 10 % Ammoniumpersulfat in Aqua. dest

Azid-Lösung (4 %): 4 % Azid (NaN₃) in Aqua. dest

Bromphenolblau (1 %): 1 % Bromphenolblau in Aqua dest.

Ladepuffer, 50 ml (5x):	3,88 g DTT 250 mM Tris-HCl pH 6,8 5 g SDS 6,25 g Bromphenolblau (1 %) 50 % Glycerol 50 ml deionisiertes Wasser
Lysepuffer:	5 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 7,5 2,5 mM EGTA pH 7,5 0,1 % Tween 20 1 mM PMSF 10 mM β -Glycerophosphat 0,2 mM NaF 0,1 mM NaVO ₄ 10 % einer Roche Mini-Complete Tablette
Gewebe-Lysepuffer:	500 mM KCl 100 mM Tris (pH 8,3) 0,1 mg/ml Gelatine 1 % Tween 20 1 % NP40 deionisiertes Wasser 200 μ g/ml Proteinase K
Trenngel:	7,5-12 % Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM Tris/HCl, pH 8,8 0,1 % SDS 3 % APS 0,07 % TEMED

Material

Sammelgel:	5 % Acrylamid/Bisacrylamid 125 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,1 % SDS 7 % APS 0,14 % TEMED
SDS-Laufpuffer (10x):	14,4 % Glycin 3 % Tris 1 % SDS deionisiertes Wasser
Transferpuffer:	20 % Methanol 10 % SDS Laufpuffer (10x) deionisiertes Wasser

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Während der Klonierung wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, um das zu klonierende Gen zu amplifizieren und mit den benötigten Restriktionsschnittstellen zu versehen. Als Matrize wurden Vektoren verwendet, die das Zielgen enthielten. Die entworfenen Primer codierten die Sequenz einer anzuhängenden Restriktionsschnittstelle und enthielten mindestens 12 Basen der Anfangs- oder Endsequenz des zu amplifizierenden Gens. Für die bessere Erkennung durch Restriktionsendonukleasen wurden drei zusätzliche Nukleotide (G oder C) vor die Restriktionsschnittstelle gesetzt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen besaßen (55°C-61°C), einen GC-Gehalt von 40-60 % hatten und keine Selbsthomologie aufwiesen. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5°C unter der Schmelztemperatur gewählt, um die effiziente Anlagerung der Primer zu gewährleisten, jedoch unspezifische Bindung zu vermeiden.

Reaktionsansatz, 50 µl in H₂O: 1 µg Vektor; 1 µl Primer 1 [100 pmol/µl]; 1 µl Primer 2 [100 pmol/µl]; 1 µl dNTPs (5 mM pro Nukleotid); 5 µl 10x Puffer; 2,5 µl DMSO; 1 µl Pfu Polymerase

Das PCR-Programm beginnt mit dem erste Schritt, der vollständigen Dissoziation der Stränge. Der zweite Schritt beinhaltet den Amplifizierungszyklus von Dissoziation, Hybridisierung und Strangverlängerung, welcher für eine ausreichende Produktmenge 30 Mal wiederholt wurde. Schritt drei dient der Vollendung aller begonnenen Strangverlängerungen und Schritt vier gewährleistet die Stabilität der DNA bis zur Beendigung des Programms. Die PCR-Programme wurden jedem Produkt angepasst, dabei wurden vor allem die Zeiten der Dissoziation und der Strangverlängerung der Länge der Matrize angepasst (ca. 1 sec/10 Basen).

PCR-Programm (exemplarisch für Cks1):	1. 95°C	5 min
	2. 95°C	30 sec (Dissoziation)
	56°C	30 sec (Hybridisierung)
	72°C	30 sec. (Verlängerung)
3. 72°C	5 min	
4. 4°C	für immer	

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für eine gründliche Aufreinigung der PCR-Produkte wurden sie mit 10x DNA-Probenpuffer (*Qiagen*) versetzt und auf ein ethidiumbromidhaltiges, 1 % iges Agarosegel aufgetragen. Die angelegte Spannung von 200 Volt gewährleistete eine größenabhängige Auftrennung der negativ geladenen DNA-Moleküle.

NAB-Puffer (1x): 0,19 % Borax in deionisiertem Wasser

3.1.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das PCR-Produkt mit einem Skalpell unter geringer UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem „Qiaquick® Gel Extraction Kit“ von *Qiagen* nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde je nach erwünschter Konzentration mit Aqua dest. eluiert und anschließend direkt für den Restriktionsverdau verwendet, oder bei -20°C gelagert.

3.1.4 Restriktionsverdau

Um die korrekte Orientierung des PCR-Produktes im Zielvektor zu gewährleisten, wurden für die Klonierung der Expressionsplasmide am 5'- und 3'-Ende des PCR-Produktes unterschiedliche Restriktionsschnittstellen angefügt. Für die Durchführung dieser Klonierungsstrategie wurde bei der gestaffelten Klonierung des MIG-Stop-Cks1-Plasmides eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingefügt. Um eine 100 % ige Effizienz zu erzielen, wurde der Restriktionsverdau der aufgereinigten DNA und des Zielvektors einzeln durchgeführt. Für den vollständigen Verdau wurde die DNA eine Stunde bei 37°C und unter Zugabe überschüssiger Endonuklease und des entsprechenden Puffers inkubiert. Enzyme mit Star-Aktivität wurden genau dosiert, um unspezifische Restriktion zu vermeiden. Nach dem ersten Verdau des Zielvektors wurde eine erneute gelelektrophoretische Aufreinigung vorgenommen, wodurch der eröffnete Vektor von unverdaulichem Plasmid getrennt werden konnte. Nach der Restriktion wurde die DNA mit Hilfe des „Qiaquick[®] DNA Purifikation Kit“ von *Qiagen* aufgereinigt, mit Aqua dest. eluiert und direkt dephosphoryliert, oder bei -20°C gelagert.

Restriktionsansatz: 42 µl PCR Produkt; 3 µl Enzym; 5 µl Puffer

3.1.5 Dephosphorylierung

Trotz der bereits getroffenen Maßnahmen um die Religation des Zielvektors zu vermeiden, wurde zusätzlich die Dephosphorylierung des linearisierten Plasmids vorgenommen. Dafür wurde die aufgereinigte Vektor-DNA nach den Angaben des Herstellers mit Shrimp Alkaline Phosphatase von *Promega* inkubiert. Anschließend wurde das Enzym inaktiviert und die dephosphorylierte Vektor-DNA für die Ligation eingesetzt.

Restriktionsansatz: 45 µl Vektor DNA; 1 µl Enzym/µg DNA; 5 µl Puffer

3.1.6 Ligation

Die Ligation des linearisierten Zielvektors mit dem zu klonierenden PCR-Produkt wurde mit dem „Quick Ligation Kit“ von *New England Bio Labs* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentrationen der DNA wurde zuvor photometrisch bestimmt

und im Verhältnis 1:3 (Vektor und PCR Produkt) eingesetzt. Durch den Verdau zweier Restriktionsenzyme und die anschließende Phosphorylierung des linearisierten Expressionsvektors wurde einer Religation des Plasmids vorgebeugt.

Ligationsansatz: Vektor DNA und PCR Produkt in 10 µl Aqua dest.; 10 µl 2x Ligationspuffer; 1 µl Quick T4 DNA Ligase

3.1.7 Topo-Klonierung

Für die Klonierung des MSCV-Cks1-thCD2-Vektors wurde das System der Topo-Klonierung verwendet, da dieses einen schnellen Weg darstellt, um größere DNA-Fragmente zu klonieren. Dabei wird das PCR-Produkt direkt in den linearisierten pCR[®] 2.1 Topo[®]-Vektor subkloniert, welcher bereits mit der DNA-Topoisomerase I verbunden ist. Die freien 3'Enden des Vektors werden in einer ligasefreien Reaktion mit den freien 5'Enden des PCR-Produktes verbunden. Für eine effiziente Klonierungsreaktion wurde die vom Hersteller empfohlene Polyadenylierung vorgenommen. Das adenylierte PCR-Produkt wurde anschließend sofort für die Klonierungsreaktion eingesetzt. Nach Transformierung der Bakterienzellen wurden diese auf X-gal behandelten LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Alle Schritte der Topo Klonierung wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.8 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben

Bei einer Zellzahl über 1×10^5 wurde die mRNA für die Bestimmung der Expressionsaktivität der Zellen mit Hilfe des „RNeasy[®] Mini Kit“ von *Qiagen* nach Anleitung des Herstellers, aufgereinigt. Für die Homogenisierung wurden „Qiagen[®] QIAshredder“ von *Qiagen* verwendet. Für eine bessere Aufreinigung wurde zusätzlich der vom Hersteller empfohlene DNase-Verdau durchgeführt.

Bei geringeren Zellzahlen als 1×10^5 wurde die mRNA mit Hilfe des „Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™] Micro Kit“ von *Invitrogen* nach Anweisung des Herstellers isoliert und schlussendlich in 12 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die extrahierte RNA wurde anschließend direkt für die reverse Transkription eingesetzt, oder bei -80°C gelagert.

Für die RNA Gewinnung wurden in Stickstoff schockgefrorene Proben verwendet. Innerhalb eines Experiments wurde nur eine Aufreinigungsmethode verwendet.

3.1.9 Reverse Transkription zur Generierung von cDNA

Für die Generierung komplementärer cDNA wurden, je nach zuvor verwendeter mRNA-Aufreinigungsmethode, unterschiedliche Kitsysteme verwendet. Bei der RNA-Aufreinigung aus mehr als 1×10^5 Zellen wurde zunächst die Konzentration photometrisch bestimmt und 2 µg RNA wurden für jede Reaktion eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde mit dem „Qiagen® Omniscript RT Kit“ von *Qiagen* mit Oligo(dT)-Primern (*Invitrogen*) und RNase Out (*Invitrogen*) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei das Volumen des Reaktionsansatzes verdoppelt wurde. Des Weiteren wurde das Enzym nach der einstündigen Inkubation bei 37°C für 5 min bei 93°C inaktiviert. Die cDNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz: 2 µg RNA in 24 µl RNase freiem Wasser; 4 µl 10x Puffer RT; 4 µl dNTPs; 4 µl oligo-dT (1:5 Verdünnung); 2 µl RNase out (1:4 Verdünnung); 2 µl Reverse Transkriptase

Bei der Verwendung der auf Dynabeads basierenden RNA-Extraktion wurde die komplette RNA bis zu einer Menge von 1 µg für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Umschreibung mit zusätzlicher DNA Eliminierung wurde mit dem „QuantiTect® Reverse Transcription Kit“ von *Qiagen* nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Reaktionsansatz: 14 µl Eliminierungsansatz; 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase; 4 µl Quantiscript RT Puffer (5x); 1 µl RT Primer Mix

3.1.10 Quantitative RT-PCR

Für die Eichkurven der quantitativen RT-PCR wurde mRNA aus wildtypischem Knochenmark mittels des „Qiagen® Omniscript RT Kit“ von *Qiagen* in cDNA überschrieben. Der Reaktionsansatz wurde 1:8 verdünnt und für jedes Primerpaar in vier unterschiedlichen Konzentrationen gemessen. Eichkurven wurden bei jeder Messung neu gemessen und errechnet. Die Reaktionen für die Quantifizierung der spezifischen cDNA-Sequenzen

wurden mit dem Power Sybr Green PCR Master Mix von *Applied Biosystems* nach Anweisung des Herstellers angesetzt. Je nach ursprünglicher Zellzahl wurden angepasste Mengen aus der reversen Transkription eingesetzt und an einem Applied Biosystems 7900HT analysiert. Die Messungen wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt und zur Quantifizierung auf das Kontrollgen Ubiquitin normiert.

Reaktionsansatz: 10 µl Sybr Green; 1 µl Primermix [10 pmol/µl]; 1-3 µl cDNA; 6-8 µl Aqua dest.

Programm:	1. 50°C	2 min
	2. 95°C	5 min
	3. 95°C	15 sec
	58°C	20 sec
	72°C	30 sec
	Schritt 3.	40 Zyklen

3.2 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1 Transformation

Die Transformation der chemokompetenten Bakterien wurde durch einen Hitzeschock erhöht, da die rekombinanten DNA Moleküle dadurch verstärkt von den Zellen aufgenommen werden können. Dafür wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Die Hälfte des Ligationsansatzes, oder ein bereits bestehendes Plasmid (1 µg) wurden zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde 30 sec bei 42°C durchgeführt, wonach der Ansatz für 2 min auf Eis ruhen konnte. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je nach erwarteter Effizienz Teile des Ansatzes auf einer vorgewärmten LB-AMP-Platte ausgestrichen. Die anschließende Inkubation bei 37°C erfolgte über Nacht.

SOC-Medium: 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,058 % NaCl; 0,25 % MgCl₂ (1 M); 1 % MgSO₄ (1 M); 0,34 % Glukose; deionisiertes Wasser

LB-AMP-Platten: 1,5 % Agar in LB-Medium; autoklaviert und 100 mg/ml Ampicillin zugegeben

3.2.2 Plasmid-Präparation

Für die Vervielfältigung einzelner Zellklone und die damit verbundene Vervielfältigung der enthaltenen Plasmid-DNA wurde ampicillinhaltiges LB-Medium mit resistenten, auf LB-AMP-Platten gewachsenen Klonen oder aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je nach erwünschter Menge wurden 3 ml (Mini-Präparation) oder 200 ml (Maxi-Präparation) angeimpft. Für Maxi-Präparationen aus gepickten Zellklonen wurde morgens eine Vorkultur angesetzt, mit welcher abends die Hauptkultur angeimpft wurde. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des „Qiagen® Spin Miniprep Kit“ oder das „Qiagen® HiSpeed® Plasmid Maxi Kit“ von *Qiagen* nach den Angaben des Herstellers und unter Verwendung des mitgelieferten Puffersystems. Die DNA wurde mit Aqua dest. eluiert und die Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die DNA bei -20°C gelagert. Glycerolstocks wurden aus 600 µl der Bakterienkultur mit 400 µl 85 % Glycerol hergestellt und bei -80°C gelagert.

LB-AMP-Medium: 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl; deionisiertes Wasser; 75 mg/ml Ampicillin

3.2.3 Sequenzierung

Sequenzanalysen wurden von der Firma *GATC Biotech*, Konstanz durchgeführt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Zelllyse wurden in Stickstoff schockgefrorene Zellpellets in eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Durch anschließende Sonifizierung wurden die Zellen aufgebrochen und die Proteine wurden durch eine folgende Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) von den Zelltrümmern getrennt.

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch unter Verwendung des „Protein Assay Kits“ von *BioRad* nach Angaben des Herstellers bestimmt. Proteinlysate wurden bei -80°C gelagert.

Lysepuffer: 5 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 7,5; 2,5 mM EGTA pH 7,5; 0,1 % Tween 20; 1 mM PMSF; 10 mM β -Glycerophosphat; 0,2 mM NaF; 0,1 mM NaVO_4 ; 10 % einer Roche Mini-Complete Tablette

3.3.2 SDS-Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot

Die SDS-PAGE wird verwendet, um denaturierte Proteine größenabhängig aufzutrennen. Pro Ansatz wurden 30-50 μg Protein eingesetzt, welche auf ein einheitliches Volumen (bis 32 μl) gebracht und mit 5x SDS-Probenpuffer (1x eingesetzt) versetzt wurden. Die fertigen Ansätze wurden dann für 5 min auf 95°C erhitzt, anschließend auf Eis inkubiert und zur Sammlung der Flüssigkeit abzentrifugiert. Anschließend wurden sie auf das zuvor gegossene Gel (7,5-12 %) geladen und bis zum völligen Durchlauf der Ladefront an eine Spannung von zunächst 60 Volt angelegt, welche nach dem Einlaufen der Proben in das Gel auf 150 Volt erhöht wurde.

Ladepuffer (5x): 3,88 g DTT; 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 5 g SDS; 6,25 g Bromphenolblau (1 %); 50 % Glycerol; 50 ml deionisiertes Wasser

Trenngel: 7,5-12 % Acrylamid/Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS; 3 % APS; 0,07 % TEMED

Sammelgel: 5 % Acrylamid/Bisacrylamid; 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 7 % APS; 0,14 % TEMED

SDS-Laufpuffer: 1,44 % Glycin; 3 % Tris; 1 % SDS; deionisiertes Wasser

Die geleelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch einen Nasstransfer auf PVDF-Membranen geblottet. Dabei ist darauf zu achten, dass die zuvor in Methanol aktivierte Membran in Richtung der Anode weist, sodass die wandernden Proteine auf diese transferiert werden können. Der Transfer erfolgt unter ständiger Kühlung bei einer konstanten Stromstärke von 1 A. Die Dauer des Transfers ist abhängig von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine (etwa 1 min pro kDa).

Transferpuffer: 20 % Methanol; 10 % SDS Laufpuffer (10x); deionisiertes Wasser

3.3.3 Immunhistochemische Proteinbestimmung

Nach dem Transfer wurde die Membran zum Abblocken unspezifischer Reaktionen für 1h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver oder 10 % BSA (je nach Antikörper) in PBS-Tween (PBST) inkubiert. Anschließend wurde der Membranabschnitt über Nacht bei 4°C mit dem betreffenden Erstantikörper (5 % Milch oder 5 % BSA) inkubiert. Dreimaliges waschen mit PBST (10 min) und anschließende Inkubation mit dem Zweitantikörper (5 % Milch, 5 % BSA) für 45 min folgten. Vor dem Entwickeln wurde die Membran erneut gewaschen (2x10 min PBST, 20 min PBS). Für die Detektion der Proteine wurden, je nach erwarteter Signalstärke, die Entwicklerlösungen „Super Signal West“ (Pico, Dura und Femto) von *Pierce* verwendet.

Blockierlösung: 5 % Trockenmilchpulver in PBST; 10 % BSA in PBST

PBST: 0,1 % Tween 20 in PBS

3.4 Zellbiologische Methoden

Alle eukaryotischen Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 90 % relative Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Gehalt kultiviert.

3.4.1 Kultivierung von Suspensionszelllinien

Die murine pro-B-Zelllinie BA/F3 und die murine, myeloische Zelllinie 32D wurden in angereichertem RPMI-Medium unter Zugabe von mIL-3 (10 ng/ml) kultiviert. Um die Entwicklung eines IL-3-unabhängigen Subklons zu vermeiden, durfte die Dichte der Zellen 2×10^6 bzw. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml nicht überschreiten. Alle 2-3 Tage wurde die Kultur auf eine Dichte von 1×10^5 bzw. 2×10^4 Zellen/ml reduziert.

32D- und Ba/F3-Zellmedium: RPMI; 10 % FCS (hitzeinaktiviert); 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung; 1 % L-Glutamin

Die selbst erzeugten Lymphomzelllinien wurden in angereichertem RPMI-Medium kultiviert und mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml ausplattiert. Aufgrund ihres aggressiven

Wachstums und ihrer Anfälligkeit wurden sie täglich wieder auf diese Konzentration reduziert.

Lymphomzellmedium: RPMI; 10 % FCS (hitzeinaktiviert); 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung; 1 % NEAA; 1 % L-Glutamin; 0,1 % 2-Mercaptoethanol

3.4.2 Kultivierung adhärenter Zellen

NIH/3T3-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit annähernder Konfluenz ausgesät, um ein besseres Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Um Mutationen zu vermeiden, wurden die Zellen nach dem Erreichen 80 % iger Konfluenz durch Trypsinierung von der Zellkulturflasche gelöst und 1:10 gesplittet.

Phoenix E-Zellen wurden nach dem Auftauen mit einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen auf eine 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und etwa 24 h später wieder auf diese Zellzahl reduziert. Da Phoenixzellen sehr anfällig sind, wurden diese Zellen maximal 1 min trypsinisiert.

NIH/3T3- und Phoenixmedium: DMEM; 10 % FCS (hitzeinaktiviert)

1x Trypsin: 10 % Trypsin in 1x DPBS

Die Stromazelllinie EL08 wurde aufgrund ihrer unterstützenden Eigenschaften nichtadhärenter Zellen bei der Generierung der Lymphomzelllinien verwendet. Die Zellen wurden auf zuvor mit 0,1 % iger Gelatine behafteten Zellkulturschalen ausgesät und bei Konfluenz durch Trypsinierung 1:10 gesplittet.

Stromazellmedium: α -MEM; 15 % FCS (hitzeinaktiviert); 5 % HS; 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung; 0,02 % 2-Mercaptoethanol

3.4.3 Herstellung von Lymphomzelllinien

Für die Isolierung der Lymphomzellen wurden die erkrankten $E\mu$ -*Myc*-Mäuse getötet, die vergrößerten Lymphknoten wurden präparativ isoliert und anschließend mit PBS gespült. Das Tumorgewebe wurde mit einem Skalpell zerschnitten und durch einen 100 μ m-Sieb gepresst. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit Einfrier-

medium in einem Kryo-Einfriergerät „Mr. Frosti“ von *Nalgene* bei -80°C eingefroren. Für die weitere Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: FCS; 10 % DMSO

Die Generierung der Lymphomzelllinien fand über mehrere Wochen statt, bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Zellen alleinständig, ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren und die Anwesenheit von Stromazellen überleben konnten. Die eingefrorenen Lymphomzellen wurden aufgetaut, in frischem Lymphomzellmedium mit 10ng/ml mIL-7 aufgenommen und zu bereits am Vortag ausplattierten Stromazellen gegeben (Das Stromazellmedium wurde zuvor abgesaugt). Um das Überwachsen der Lymphomzellen durch Stromazellen zu vermeiden, wurden die Lymphomzellen bei Konfluenz der Stromazellen auf eine neue, am Vortag ausplattierte Zellschicht übertragen. Bei stetiger Proliferation der Lymphomzellen wurden sie ohne Stromazellen, aber unter der weiteren Zugabe von mIL-7 weiterkultiviert. Fand auch unter diesen Bedingungen eine stetige Proliferation statt, wurde den Zellen der Wachstumsfaktor entzogen. Bei konstanter Proliferation und geringer Zellmortalität wurden die Zellen zu einer Zelllinie erklärt.

Lymphomzellmedium: RPMI; 10 % FCS (hitzeinaktiviert); 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung; 1 % NEAA; 5 ml L-Glutamin; 0,1 % μl 2-Mercaptoethanol

3.4.4 Proliferative Zellzählungen

Proliferationskurven wurden durch tägliche Zählungen der Zellen nach Ausplattierung definierter Zellzahlen am Vortag oder zu Beginn des Versuches vorgenommen. Die Zählungen wurden mit 0,5 % Trypanblau unter Verwendung von Neubauer Zählkammern durchgeführt. Die Proliferation der Ba/F3-Zellen wurde unter mIL-3-Zugabe und -Entzug, durch tägliches Ausplattieren von 5×10^5 Zellen/ml und Zählungen am Folgetag gemessen. 32D-Zellen wurden unter Zugabe von mIL-3 auf die gleiche Art und Weise gezählt. Um einen längeren Versuchsaufbau für die Zellen unter mIL-3 Entzug zu gewährleisten, wurden am Tag 0 bereits alle Platten mit 4×10^5 Zellen/ml ausplattiert. Um das Überwachsen der Kultur und einen Nährstoffmangel zu vermeiden, wurden die Lymphomzelllinien täglich mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in frischem Medium ausgesät und am Folgetag gezählt. Zellzählungen wurden drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

3.4.5 Proliferationsmessung mittels BrdU

Für die genauere Bestimmung der proliferativen Aktivität der verschiedenen Lymphomzelllinien wurden die Zellen mit BrdU aus dem „BrdU Flow Kit“ von *BD Pharmingen*TM behandelt. Dafür wurden die Zellen für 5 min mit 10 µl BrdU-Lösung (1 mM BrdU in 1x DPBS)/ml Medium unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Reaktion wurde mit eiskaltem DPBS abgebrochen und das restliche BrdU wurde durch zweimaliges Waschen mit DPBS entfernt. Die BrdU-Inkorporation konnte im Folgenden durch die vom Hersteller vorgegebenen Fixierungs- und Färbungsschritte mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse der Zellen bestimmt werden.

3.4.6 Herstellung von Retroviren und retrovirale Infektion

Für die Transfektion der Phoenix E-Zellen wurden am Vorabend $2,2 \times 10^6$ Zellen pro 6 cm-Kulturschale ausplattiert. 20 µl „LipofectaminTM 2000“ von *Invitrogen* sowie 12 µg Plasmid-DNA wurden pro Schale mit je 500 µl Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Ansätze gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Medium von den Phoenixzellen abgenommen und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Um das Abschwemmen der schwach adhärenen Phoenixzellen zu verhindern, wurde der Lipofektionsansatz anschließend sehr vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 h im Brutschrank wurde das Medium erneut abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Der Retrovirale Überstand wurde nach 12, 24 und 36 h abgenommen und unter Zugabe von 4 bzw. 8 µg/ml Polybren direkt auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Für die Infektion adhärenter Zellen wurden diese am Vortag mit einer geringen Zelldichte ausplattiert, um Proliferation, die Voraussetzung retroviraler Infektion, zu gewährleisten (Miller et al., 1990a). Die alleinige Inkubation der NIH/3T3-Zellen mit dem Virusüberstand und 8 µg/ml Polybren genügte, um eine 100 % ige Infektion zu erlangen. Der Virusüberstand für die Infektion von Suspensionszellen wurde für die ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zusätzlich 3:1 mit dem jeweiligen Zellmedium gemischt. Die Viruspartikel wurden

während einer 90-minütigen Zentrifugation bei 2400 rpm und 32°C auf die Zellen gedrückt. Dies gewährleistete eine verbesserte Infektion während der folgenden Inkubation bei 37°C. Die Infektionseffizienz der Zellen wurde 24 h nach der letzten Infektion durchflusszytometrisch bestimmt.

3.4.7 Titration viraler Überstände

Für die Infektion primärer Knochenmarkzellen wurden die Virusüberstände zu Beginn der Arbeit titriert um zu gewährleisten, dass die Zellen durch den Virusüberstand ausreichend infiziert werden können. Dafür wurden am Vortag $2,5 \times 10^4$ NIH/3T3-Zellen pro Schale einer 6 *well*-Zellkulturplatte ausgesät. Nach ca. 14 h, der durchschnittlichen Verdopplungszeit von NIH/3T3-Zellen, wurden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe (1:20, 1:200, 1:500) des Virusüberstandes und unter Zugabe von 4 µg/ml Polybren für 48-72 h inkubiert. Die Infektion der Zellen wurde nach Trypsinierung der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Berechnung der infektiösen retroviralen Partikel pro ml erfolgte durch die Multiplikation von 5×10^4 , der Zellzahl bei Infektion, mit dem Verdünnungsfaktor und dem prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen der jeweiligen Verdünnungsstufe. Der Virustiter entspricht dann dem Mittelwert der drei unabhängig ermittelten Einzeltiter.

3.4.8 Selektion der Virus-Verpackungszelllinie

Phoenix E-Zellen tragen Plasmide mit den für die Virusproduktion wichtigen Genen gag, pol und env. Gag und pol liegen gemeinsam auf einem Vektor, welcher zusätzlich eine Hygromycin Resistenz trägt. Das Expressionsplasmid, welches für env kodiert, beinhaltet zusätzlich eine Resistenz für das Exotoxin Diphtherie-Toxin. Durch regelmäßige Selektion der Zellen kann gewährleistet werden, dass sie die Gene gag, pol und env exprimieren. Die Selektion findet über 7 Tage mit 300 µg/ml Hygromycin B und 1 µg/ml Diphtherietoxin statt. Die Zellen werden täglich auf 5×10^6 Zellen/75 cm²-Flasche gesplittet. Nach Absetzen des Selektionsmediums werden die Zellen zwischen Passage 4 und 10 für die Virusproduktion verwendet.

3.4.9 Methylzellulose-Assay

Für das Ansetzen eines Methylzellulose-Assays wurden die Zellen genau gezählt und die gewünschte Zellzahl wurde anschließend in 250 µl IMDM mit 20 % FCS aufgenommen. Dieser Ansatz wurde gründlich mit 2,5 ml der Methylzellulose gemischt. Nach Aufsteigen der Luftblasen wurden 2,2 ml der Mischung über eine stumpfe Aluminiumnadel in eine Spritze gezogen. Nach erneutem Aufsteigen der Luftblasen wurden je 1,1 ml der Zellsuspension in einer 3 cm-Schale verteilt. Beide Schalen wurden mit einer dritten, offenen, mit Wasser gefüllten Schale in eine 10 cm-Schale gestellt und für 10-14 Tage im Brutschrank inkubiert.

3.5 Grundlegende tierexperimentelle Techniken

Die tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten im Rahmen von durch die Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsanträgen.

3.5.1 Haltung und Verpaarung der Tiere

Die Haltung der Tiere erfolgte in speziellen, einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen. Autoklaviertes Futter der Firma *Altromin* und autoklaviertes Trinkwasser erhielten die Tiere ad libitum. Die Räumlichkeiten wurden speziell als Tierhaltungsräume konzipiert. Personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung und Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h mit Dämmerphase waren gewährleistet. Das Hygienemanagement erfolgte gemäß den Empfehlungen der FELASA.

3.5.2 Markierung und Genotypisierung der Mäuse

Die Markierung der Mäuse erfolgte in der Zucht im Alter von 3-4 Wochen durch Lochmarkierungen in den Ohren. Die ausgeschnittenen Gewebestücke wurden für die Genotypisierung in Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Das gesammelte Gewebe wurde über Nacht bei 50°C in Gewebe-Lysepuffer mit 200 µg/ml Proteinase K verdaut. Das Enzym wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert, das Lysat wurde gevortext und anschließend für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Die Genotypisierung wurde durch eine PCR durchgeführt, bei der für die Tiere spezifische Sequenzen amplifiziert wurden. Die Genotypisierung für *p27^{KIP1}* und *Eµ-Myc* wurden mit der Taq-Polymerase von *Qiagen* durchgeführt und die Genotypisierungen für *Cks1* und *CD19Cre* wurden mit der Taq-Polymerase von *Invitac* durchgeführt. dNTPs wurden bei der Firma *Fermentas* bezogen.

Gewebe-Lysepuffer: 500 mM KCl; 100 mM Tris (pH8,3); 0,1 mg/ml Gelatine; 1 % Tween 20; 1 % NP40; deionisiertes Wasser; 200 µg/ml Proteinase K

***p27^{KIP1}*-Genotypisierung:** 1 µl Lysat (DNA); 0,3 µl Primer mgK3 (100 pmol/µl); 0,3 µl Primer 2 (mcK5 oder *p27^{KIP1}*-Neo) (100 pmol/µl); 2 µl 10x Puffer; 4 µl 5x Q Solution; 0,7 µl dNTPs (10 mM pro Nukleotid); 0,3 µl Tag Polymerase; 11,4 µl Wasser

PCR-Programm: Start bei 95°C; 4x(30 sec 96°C; 30 sec 57°C; 2 min 65°C); 36x(30 sec 93°C; 30 sec 93°C; 2 min 65°C); 2 min 65°C; 4°C für immer

Für *p27^{KIP1}* wurden zwei getrennte PCR-Reaktionen angesetzt, bei denen das wildtypische Allel eine Größe von 1 kb hat und das Mutantenallel 0,5 kb groß ist.

***Cks1*-Genotypisierung:** 2 µl Lysat (DNA); 1,2 µl Primer *Cks1*-2 (100 pmol/µl); 0,6 µl Primer *Cks1*-1 (100 pmol/µl); 0,6 µl Primer *Cks1*-Neo (100 pmol/µl); 5 µl 10x Puffer; 3 µl MgCl₂; 1 µl dNTPs (10 mM pro Nukleotid); 0,5 µl Tag Polymerase; 36,1 µl Wasser

PCR-Programm: 2 min 94°C; 30x(30 sec 94°C; 30 sec 55°C; 1 min 72°C; 10 min 72°C; 4°C für immer

Die wildtypische Bande hat eine Größe von 150 bp, während das mutante Allel bei 200 bp verlief.

***Eµ-Myc*-Genotypisierung:** 2 µl Lysat (DNA); 1,5 µl Primer 1 (100 pmol/µl); 1,5 µl Primer 2 (100 pmol/µl); 2,5 µl 10x Puffer; 5 µl 5x Q Solution; 0,7 µl dNTPs (10 mM pro Nukleotid); 0,5 µl Tag Polymerase; 11,3 µl Wasser

PCR-Programm: 4 min 94°C; 33x(1 min 94°C; 90 sec 62°C; 2 min 72°C); 7 min 72°C; 4°C für immer

Das E μ -*Myc*-Allel hat eine Größe von 813 bp.

CD19Cre-Genotypisierung: 2 μ l Lysat (DNA); 0,3 μ l Primer Cre for (100 pmol/ μ l); 0,3 μ l Primer Cre rev (100 pmol/ μ l); 0,3 μ l Primer Cre7 (100 pmol/ μ l); 5 μ l 10x Puffer; 3 μ l MgCl₂; 1 μ l dNTPs (10 mM pro Nukleotid); 0,5 μ l Tag Polymerase; 37,6 μ l Wasser

PCR-Programm: 2 min 95°C; 30x(45 sec 95°C; 45 sec 57°C; 50 sec 72°C); 10 min 72°C; 4°C für immer

Die wildtypische Bande hat eine Größe von 492 bp, während die *CD19Cre*-Bande eine Größe von 715 bp hat.

3.5.3 Proliferationsmessung mittels BrdU

Für die Proliferationsmessung *in vivo* wurde den Tieren 12h vor Analyse intraperitoneal 100 μ l BrdU/20 g Körpergewicht der BrdU-Stammlösung von *BD Bioscience* gespritzt. Milz und Knochen wurden den geopferten Tieren präparativ entfernt. Die Milzen wurden unter Zuhilfenahme eines Spritzenkolbens durch ein 100- μ m Sieb gepresst. Die Knochen wurden auf beiden Seiten eröffnet und das Knochenmark wurde mit HF2⁺-Puffer durch eine Spritze herausgespült. Das Zelllysat wurde homogenisiert und durch einen 100 μ m-Spitzfilter gepresst. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte unter Zugabe von ACK-Erylysepuffer von *Gibco* für 5 min. 1×10^6 Zellen wurden pro Ansatz verwendet. Die Oberflächenfärbung, Fixierung und die anschließende Färbung der Zellen fand nach Angaben des Herstellers statt. Für die Oberflächenfärbung wurde 1 μ l Antikörper/ 1×10^6 Zellen verwendet. Alle Arbeiten wurden auf Eis mit auf 4°C gekühlten Puffern durchgeführt.

HF2⁺-Puffer: 10 % HBSS (10x); 2 % FCS (hitzeinaktiviert); 1 % HEPES; 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung; deionisiertes Wasser

3.5.4 Knochenmarktransplantation

Zur Anreicherung primärer Stammzellen wurde den Spendertieren das Uracil-Analogon 5-FU von *Medac* verabreicht. Dafür wurde ihnen 4 Tage vor der Knochenmarkent-

nahme 150 µg 5-FU in HF2⁺-Puffer/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Am vierten Tag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Knochen wurden präparativ entfernt. Die Entnahme des Knochenmarks wurde unter einer Sterilbank wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben durchgeführt. Bei späterer Nutzung der Zellen wurden diese mit 2x Einfriermedium und DMEM mit 10 % FCS eingefroren (1:1), bei sofortiger Nutzung wurde eine Erythrozytenlyse wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben durchgeführt. Alle verwendeten Puffer waren steril und auf 4°C gekühlt.

Für die retrovirale Infektion der primären Zellen mussten diese zuvor prästimuliert werden. Dies erfolgte über Nacht unter Zugabe von Prästimulationsmedium. Die hinzugefügten Wachstumsfaktoren sorgen für die Anregung von Zellteilung der primären Stammzellen, welche für die retrovirale Infektion ausschlaggebend ist.

Die retrovirale Transduktion erfolgte wie in Kapitel 3.4.6 für Suspensionszellen beschrieben. Für die Zentrifugation wurden abweichend davon pro 12 *well*-Schale 2 ml Virusüberstand mit 0,5 ml Prästimulationsmedium und 4 µg/ml Polybren gemischt. Die Endkonzentration der Zytokine entsprach den für das Prästimulationsmedium angegebenen Werten. Vor der folgenden Zentrifugation wurden 2 ml Medium abgenommen, die Zellen wurden abzentrifugiert, in neuem Medium aufgenommen und dem Ansatz wieder zugeführt.

Vor der Transplantation wurden die 6-8 Wochen alten Empfängertiere mit einer Dosis von 900 rad (9 Gy) für C57Bl/6- und 800 rad (8 Gy), für Balb/c-Mäuse, bestrahlt. Durch diese myeloablative Bestrahlung wird gewährleistet, dass die folgende Hämatopoese von den Transplantaten ausgeht. Die Tiere konnten sich vor der Transplantation für ein paar Stunden von der Bestrahlung erholen.

Die Transplantation der Virus-infizierten Zellen erfolgte nach durchflusszytometrischer Bestimmung der transgenen Anteile und Berechnung der zu injizierenden Zellzahl. Die Transplantate wurden in einem Volumen von 200 µl HF2⁺-Puffer aufgenommen und auf Eis transportiert. Für die Injektion wurden die Tiere unter einer Infrarotlampe erwärmt, wodurch ein Anschwellen der Schwanzvene und damit eine erleichterte Injektion hervorgerufen wird. Um durch die Transplantation hervorgerufene Infektionen zu vermeiden, wurde dem Trinkwasser der Tiere für 2 Wochen lang Ciprofloxacin (2 mg/100 ml) zugegeben.

3.5.5 Überwachung transplantierter Tiere

Die Überwachung der Mäuse erfolgte täglich durch Kontrolle des Befindens und wöchentlich bis monatlich durch Blutentnahmen. Diese wurden mit Rekonstitution des Systems nach 21 Tagen begonnen und durch Punktion der Wange durchgeführt. Das Vollblut wurde am „VetABC-Blood-Counter“ vermessen und die Zellen wurden nach zweimaliger Erythrozytenlyse mit ACK-Lysepuffer (10 min auf Eis) durchflusszytometrisch bestimmt. Bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes wurden die Tiere getötet und analysiert.

3.5.6 Organaufbereitung transplantierter Tiere

Die Organe erkrankter Tiere wurden auf pathologische Veränderungen untersucht. Dafür wurden sie nach Eröffnung des Abdomens und des Thorax entfernt und gewogen. Die Zellen der Milz und eines Lymphknotens wurden wie in Kapitel 3.5.3 aufbereitet, ebenfalls wurde das Knochenmark aus einem Femur und beiden Tibiae wie beschrieben präpariert. Das Blut wurde vermessen und es wurden Blutausstriche angefertigt. Anschließend wurde es einer Erythrozytenlyse unterzogen (Kapitel 3.5.5). Die Zellsuspensionen der anderen Organe wurden ebenfalls lysiert (Kapitel 3.5.3). Ein Teil der Zellen wurde für eine durchflusszytometrische Immunphänotypisierung verwendet. Die restlichen Zellen wurden aufgeteilt und anschließend viabel eingefroren oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blutausstriche wurden vom hämatologischen Routinelabor nach Pappenheim gefärbt.

3.5.7 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen

Durch Markierung zellspezifischer Oberflächenantigene mit fluorochromen Antikörpern können Zellen immunphänotypisch bestimmt werden. Dafür wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen eingesetzt, welche anschließend für 20 min mit den Antikörpern in FACS-Puffer bei 4°C und unter Lichtausschluss inkubiert wurden (Antikörperkonzentrationen Kapitel 2.9.2). Anschließendes Waschen mit 3 ml FACS-Puffer entfernte überschüssige Antikörper. Um tote Zellen aus den Analysen ausschließen zu können, wurden die gefärb-

ten Zellen für die durchflusszytometrische Messung in FACS-Puffer mit 1 µg/ml PI von *Invitrogen* aufgenommen.

Für die B-Zell-spezifischen Analysen wurden die Zellen vor der Antikörperfärbung mit FC Block™ Lösung (*ebioscience*) aufgenommen und für 15 min bei 4°C inkubiert.

FACS-Puffer: 0,5 % BSA in PBS

3.6 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurde ein Lymphknoten, ein Teil der Milz und ein Femur für 24 h in 4 % Formalin fixiert und bis zur histologischen Untersuchung in 70 % Ethanol gelagert. Die histologischen Schnitte wurden von der Pathologie angefertigt und ausgewertet.

3.7 Statistische Auswertungsverfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Student's t-Test für gepaarte Daten (Graph Pad Prism R Version 5). Alle Daten sind als Mittelwert ±SD aufgeführt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$, das heißt wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % liegt.

4 Ergebnisse

4.1 Cks1-Expression lymphoproliferativer Tumorerkrankungen

Signifikant erhöhte Cks1-Level wurden bereits bei diversen Tumorarten nachgewiesen und in den meisten Fällen mit einer schlechten Prognose des Krankheitsverlaufes assoziiert. Cks1-Überexpression wurde außer in soliden Tumoren wie Mammakarzinom, Prostatakarzinom, oralem Plattenepithelkarzinom, großzelligem Bronchialkarzinom oder kolorektalem Karzinom auch bei hämatopoetischen Tumorerkrankungen wie dem Burkitt-Lymphom oder dem Multiplen Myelom nachgewiesen (Slotky et al., 2005; Lan et al., 2008; Kitajima et al., 2004; Inui et al., 2003; Li et al., 2004; Keller et al., 2007; Shaughnessy, 2005; Fonseca et al., 2006).

Eine für diese Arbeit durchgeführte Datenbanksuche (www.oncomine.org) weist auf weitere hämatopoetische Erkrankungen, wie Hodgkin-Lymphome, diffus großzellige B-Zell-Lymphome und zentroblastische Lymphome mit erhöhten *Cks1*-mRNA-Leveln hin (Abb. 4.1.1 9, 5, 3). Im Gegensatz dazu gehen proliferativ weniger aktive Erkrankungen wie die chronische lymphatische Leukämie (CLL) mit normalen bis reduzierten *Cks1*-Leveln einher (Abb. 4.1.1, 4). Das erhöhte *Cks1*-mRNA-Level, das bei vielen verschiedenen aggressiven B-Zell-Erkrankungen vorliegt, lässt auf eine bisher unbekannt Rolle von Cks1 bei der Pathogenese dieser Erkrankungen schließen.

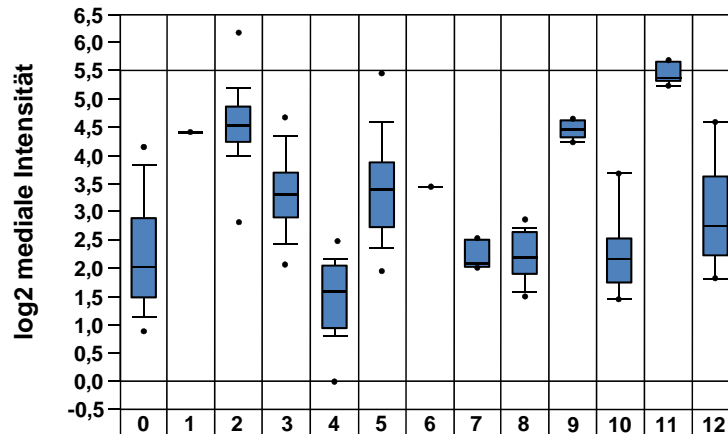


Abb. 4.1.1 Erhöhte *Cks1*-mRNA-Level bei B-lymphoiden Erkrankungen

Eine öffentliche Datenbank (www.oncomine.org) wurde nach Studien durchsucht, die *Cks1*-Transkriptlevel in gesunden Geweben mit Patientenproben B-lymphoider Erkrankungen vergleicht. Boxblotanalyse der log2 medialen, relativen Intensität der *Cks1*-Expression [reporter: 37347_at] **0**. Vergleichswert gesunder B-Zellen (58) **1**. B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (1) **2**. Burkitt-Lymphom (127) **3**. Zentroblastisches Lymphom (28) **4**. Chronische lymphatische Leukämie (34) **5**. Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (40) **6**. Embryonales Rhabdomyosarkom (1) **7**. Follikuläres Lymphom (6) **8**. Haarzell-Leukämie (16) **9**. Hodgkin-Lymphom (4) **10**. Mantelzell-Lymphom (8) **11**. Multiples Myelom (4) **12**. Primäres Effusionslymphom (9)

4.2 *Cks1*-Verlust im murinen Modell des humanen Burkitt-Lymphoms

Eine erhöhte Expression des Protoonkogens *c-Myc* wurde in diversen lymphoiden Erkrankungen beobachtet (Hayward et al., 1981; Payne et al., 1982; Nesbit et al., 1999). Die meisten Burkitt-Lymphome weisen eine Translokation des *c-Myc*-Gens in den *immunoglobulin heavy chain* Locus auf, die in einer B-Zell-spezifischen Überexpression des Transkriptionsfaktors resultiert. Der Nachweis dieser Translokation ist nahezu diagnostisch für Burkitt-Lymphome (Leder et al., 1983; Klein und Klein, 1985; Cory, 1986).

Die $E\mu$ -*Myc*-Maus ist ein transgenes Modell des humanen Burkitt-Lymphoms. Die konstitutive *c-Myc*-Expression beschränkt sich dabei auf das B-lymphoide Zellkompartiment, da das *c-Myc*-Gen unter der Kontrolle des $E\mu$ -*Enhancers* der schweren Kette der Immunglobuline steht. $E\mu$ -*Myc*-Mäuse entwickeln nach 6 bis 15 Wochen ein monoklonales multizentrisches Lymphom, woran sie innerhalb kürzester Zeit sterben (Adams et al., 1985). Neben der erhöhten *c-Myc*-Expression der Zellen ist die Lymphomentstehung von weiteren genetischen Veränderungen abhängig (*second hit*; Schuster et al., 2011). Diese Mutationen bewirken zusätzliche proliferative Vorteile (zum Beispiel der Verlust von p53;

Eischen et al., 1999), oder verhindern das zelleigene apoptotische Programm (Überexpression von BCL-2; Eischen et al., 2001).

Der Verlust von *Cks1* führt in transgenen E μ -*Myc*-Mäusen zu einer signifikanten Verzögerung der Tumorentstehung und einer verminderten Tumordissemination. Ebenfalls wurde gezeigt, dass *Cks1*-Verlust in prämaligen B-Lymphozyten zu reduzierter Proliferation führt (Keller et al., 2007). Um die Hypothese zu untersuchen, dass diese Proliferationsstörung neben dem Auftreten in prämaligen Zellen auch in erkrankten Lymphomzellen besteht, wurden wildtypische E μ -*Myc*-Mäuse mit *Cks1*-defizienten Tieren gepaart. Die für *Cks1* heterozygote F1-Generation wurde erneut verpaart und die daraus hervorgehenden *Cks1*^{-/-}; E μ -*Myc*^{+/-}-Tiere wurden bis zum Auftreten von Lymphomen beobachtet. Bei Erkrankung wurden die Zellen der wildtypischen (*Cks1*^{+/+}) und *Cks1*-defizienten (*Cks1*^{-/-}) E μ -*Myc*-Lymphome präpariert und auf der unterstützenden Stromazelllinie EL08 (Oostendorp et al., 2002) unter Zugabe von IL-7 kultiviert. Bei Zunahme der Proliferationsrate und stabiler Teilungsaktivität wurden die Lymphomzellen von den unterstützenden Stromazellen und der Zugabe von IL-7 entwöhnt, so dass sie ohne weitere Unterstützung selbstständig proliferierten. Für die Bestimmung der Proliferationsunterschiede der so entstandenen Zelllinien, wurde neben Zellzählungen und dem Ansetzen von Methylzellulosen auch die Einzelzellproliferation mittels BrdU-Inkorporation gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von *Cks1* auch in den erkrankten Zellen zu einer verminderten Proliferation führt, die sich in einem signifikanten Unterschied (p=0,006) der Zellzahlen ab dem zweiten Tag der Zählung zeigt (Abb. 4.2.1 C). Damit übereinstimmend ist ein signifikanter Unterschied (p=0,034) in der G0/G1-Phase und ein moderater Unterschied (p=0,056) in der S-Phase des Zellzyklus festzustellen (Abb. 4.2.1 B). Die verringerte Koloniebildung der *Cks1*-defizienten Zellen in Methylzellulose (Abb. 4.2.1 D) konnte nicht durch die verminderte Proliferation erklärt werden. Da der Verlust von *Cks1* zu Akkumulation von p27^{Kip1}-Protein führt (Abb. 4.2.1 A) und diese Akkumulation bekannterweise Apoptose induziert (Wang et al., 1997), wurden Messungen der apoptotischen Aktivität mittels Annexin/PI-Färbung durchgeführt. Diese zeigten eine signifikant erhöhte Apoptoserate in den *Cks1*-defizienten Zellen (Abb. 4.2.1 E). Somit hält die in prämaligen E μ -*Myc*-B-Lymphozyten beobachtete, verminderte Proliferation in *Cks1*^{-/-};E μ -*Myc*-Lymphomzelllinien an. Zusätzlich führt der Verlust von *Cks1* in den stromaunabhängigen Zellen zu gesteigerter Apoptose.

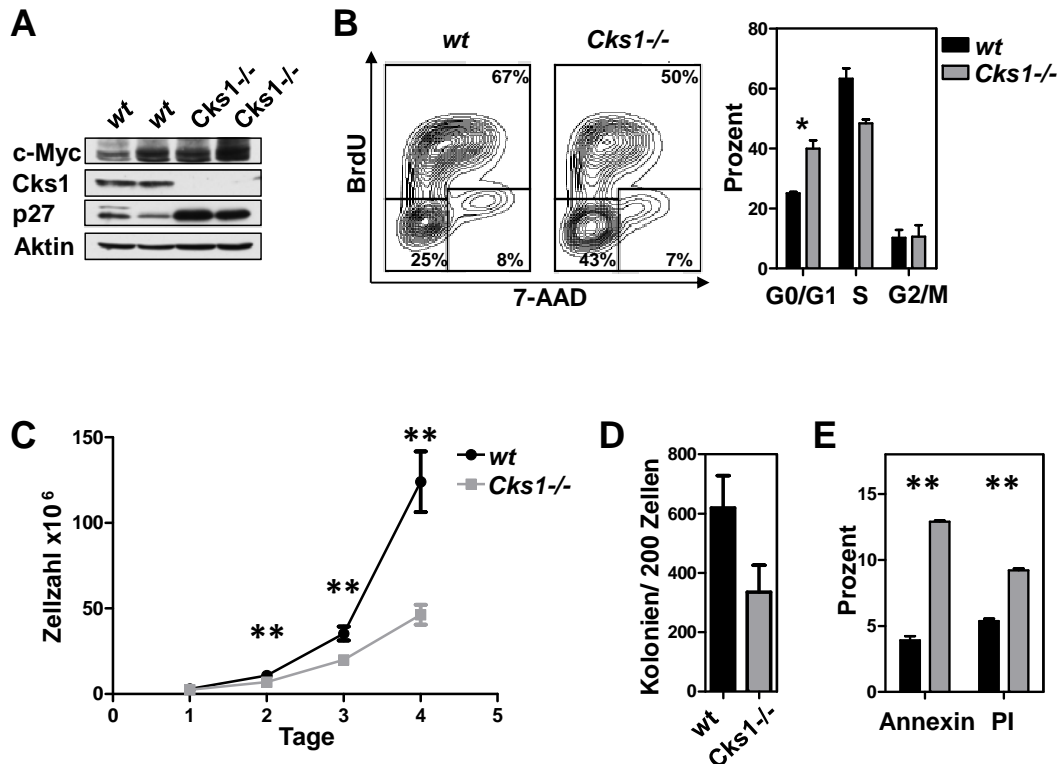


Abb. 4.2.1 *Cks1*-Defizienz in $E\mu$ -*Myc*-Lymphomen reduziert Proliferation und Koloniebildung *in vitro*

In vitro Kultur stromaunabhängiger, $E\mu$ -*Myc*-Lymphomzellen der angegebenen Genotypen. * bzw. ** zeigen p-Werte $\leq 0,05$ bzw. $\leq 0,01$ an. **A** Proteinbiochemische Bestimmung der Cks1- und p27^{Kip1}-Level in transgenen $E\mu$ -*Myc*-Lymphomzelllinien. **B** Durchflusszytometrische Messung eines BrdU-basierten Proliferationsassays *in vitro*. Links exemplarische Darstellung der Auftrennung im Durchflusszytometer; rechts graphische Darstellung der Ergebnisse. **C** Wachstumskurven der transgenen Zelllinien. **D** Untersuchung der Koloniebildung in Methylzellulose ohne Wachstumsfaktoren. **E** Graphische Darstellung durchflusszytometrischer Annexin/PI-Färbungen der Zelllinien.

4.3 Untersuchung einer potentiellen onkogenen Rolle von Cks1

4.3.1 Etablierung eines retroviralen Transplantationsmodells

Murine Transplantationsmodelle stellen einen wichtigen Bereich in der hämatopoetischen Forschung dar. Durch die Injektion retroviral beziehungsweise somatisch veränderter Spenderzellen in myeloablativ bestrahlte Empfängertiere können Abweichungen des normalen Zellverhaltens, möglicherweise onkogene Eigenschaften der beteiligten Gene erkannt und untersucht werden. Bei dem hier verwendeten retroviralen Transduktions- und

Transplantationsmodell wurde 5-Fluorouracil-mobilisiertes (5-FU) Knochenmark von Spendertieren durch retrovirale Transduktion genetisch verändert. Der bicistronische, retrovirale Expressionsvektor MIG (MSCV *murine stem cell virus* IRES GFP) enthält außer den retroviralen LTR-Sequenzen, die für die Produktion von Viruspartikeln benötigt werden, auch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES). Dieser IRES folgt das *green fluorescence protein* (GFP) und fungiert als Reporter. Durch die IRES wird das Reporterprotein in jedem Fall exprimiert, wodurch eine durchflusszytometrische Identifikation und Analyse transgener Zellen möglich wird.

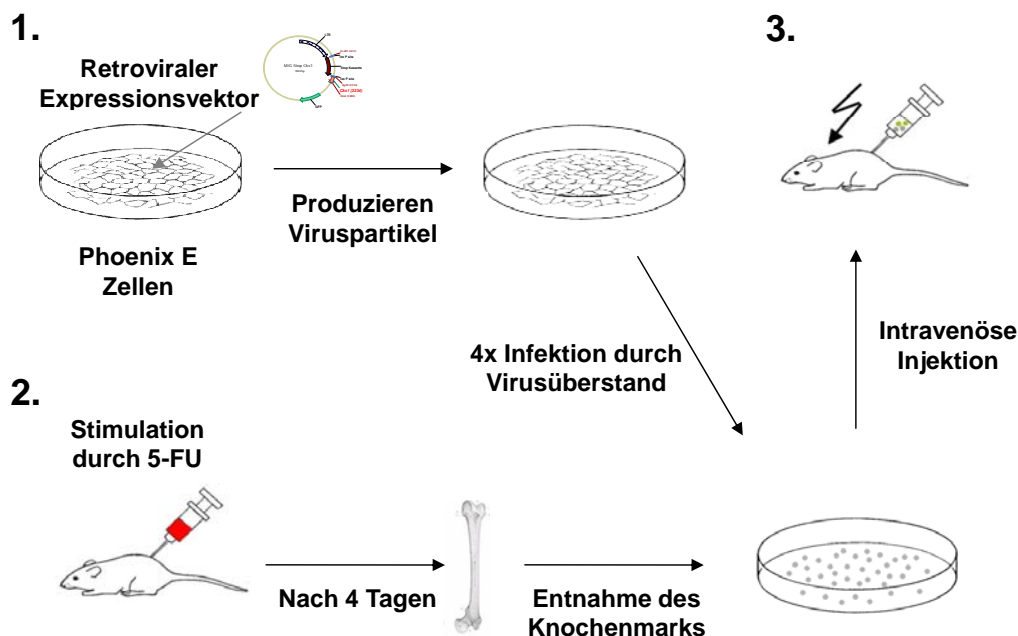


Abb. 4.3.1.1 Schematische Darstellung des retroviralen Transduktions- und Transplantationssystems

Das Transplantationssystem gliedert sich in drei Abschnitte. **1.** Transfektion des Vektors und Produktion von infektiösen Partikeln mittels der Virus-produzierenden Zelllinie Phoenix E. **2.** Mobilisierung des Knochenmarks der Spendertiere durch 5-FU-Stimulation. **3.** Infektion des Knochenmarks und intravenöse Injektion der transduzierten Zellen in letal bestrahlte Empfängertiere.

Das in Abbildung 4.3.1.1 gezeigte Transplantationsmodell teilt sich in drei Bereiche auf: 1. Die Virusproduktion, die durch transiente, liposomale Transfektion der ekotropen Verpackungszelllinie Phoenix E erreicht wird. Die Zellen geben die gebildeten Viruspartikel an den Überstand ab, wodurch sie einfach zu beziehen sind. 2. Die Spendertiere werden mit 5-FU, einem Pyrimidin-Analogon welches als Chemotherapeutikum eingesetzt wird, behandelt. 5-FU wird in DNA und RNA inkorporiert und führt schlussendlich zu

Zellzyklusarrest und Apoptose. Da es nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus wirkt, sterben ausschließlich Zellen, die sich in der Teilung befinden. Dadurch erhöht sich der prozentuale Anteil hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark (Longley et al., 2003). Das mobilisierte Spenderknochenmark wird extrahiert und, um die Infektion der Zellen durch den Retrovirus zu gewährleisten, für 12 h mit wachstumsstimulierenden Faktoren inkubiert. 3. Die Infektion der Zellen wird unter beständiger Zugabe von Zytokinen durch Zentrifugation mit dem Virusüberstand durchgeführt. Dabei werden die Viruspartikel auf die Zellen gepresst und können die proliferierenden Zellen in der folgenden Wachstumsphase infizieren. Nach Bestimmung der Infektionseffizienz werden die Zellen intravenös in letal bestrahlte Empfängertiere injiziert.

Cks1 und Skp2 wurden bei diversen Tumorerkrankungen überexprimiert vorgefunden und stellen einen prognostisch schlechten Faktor des Krankheitsverlaufs dar (Masuda et al., 2003; Kitajima et al., 2004; Shapira et al., 2004, 2005; Slotky et al., 2005; Shapira et al., 2006; Chiarle et al., 2000; Hershko et al., 2001; Kudo et al., 2001; Gstaiger et al., 2001; Chiarle et al., 2002; Signoretti et al., 2002; Yokoi et al., 2002; Masuda et al., 2002; Shintani et al., 2003; Drobnjak et al., 2003). Die gezielte Skp2-Expression führt in Mäusen zu niedriggradigen Prostatakarzinomen (Shim et al., 2003), kann aber bei ektooper Expression keine Erkrankung hervorrufen (Latres et al., 2001). In E μ -Myc-transgenen Mäusen führt der Verlust von *Cks1*, aber nicht *Skp2*-Verlust, trotz eines gleichwertig erhöhten p27^{Kip1}-Levels zu einer signifikanten Verzögerung der Lymphombildung und einer stark verminderten Tumordissemination (Keller et al., 2007; Old et al., 2010). Wegen der Cks1-abhängigen Veränderung diverser Krankheitsverläufe und einer potentiellen SCF^{Skp2}-unabhängigen Rolle von Cks1 bei der Tumorentstehung und Tumorausbreitung wurde eine intrinsische onkogene Aktivität von Cks1 vermutet. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde Cks1 in verschiedenen Zellpopulationen überexprimiert und transplantiert.

4.3.2 Cre-vermittelte B-Zell-spezifische Überexpression von Cks1

Für die gezielte Überexpression von Cks1 in B-Lymphozyten wurde die kodierende Sequenz von *Cks1* in einen MSCV-Stop-IRES-GFP-Vektor (MIG-Stop) mit translationaler Stop-Kassette kloniert. Das Konstrukt (Abb. 4.3.2.2 A) beinhaltet zusätzlich zu den bereits

genannten MIG-spezifischen Elementen eine Stop-Kassette. Die von loxP-Sequenzen flankierte Kasette enthält die translationale Abbruchsequenz TAG in allen drei Leserastern, wodurch die translationale Termination gewährleistet wird (Miething et al., in Vorbereitung). Die Stop-Kassette wird mit den loxP-Sequenzen und dem folgenden Gen vom Promotor aus transkribiert und kann bei Anwesenheit der Cre-Rekombinase entfernt werden (Hamilton und Abremski, 1984), wodurch die Translation der nachfolgenden proteinkodierenden Sequenz induziert wird. Dieses virale Rekombinationssystem gewährleistet die selektive Expression des Zielgens in transgenen Zellen (für die Cre-Rekombinase) und ermöglicht dadurch zellspezifische genetische Modifikationen (Abb. 4.3.2.1). Die Verwendung einer translationalen Stop-Kassette ist essentiell, da ein transkriptionales Stop-Element die Produktion retroviraler Viruspartikel inhibieren und somit eine Infektion unmöglich machen würde (Miller et al., 1990b).

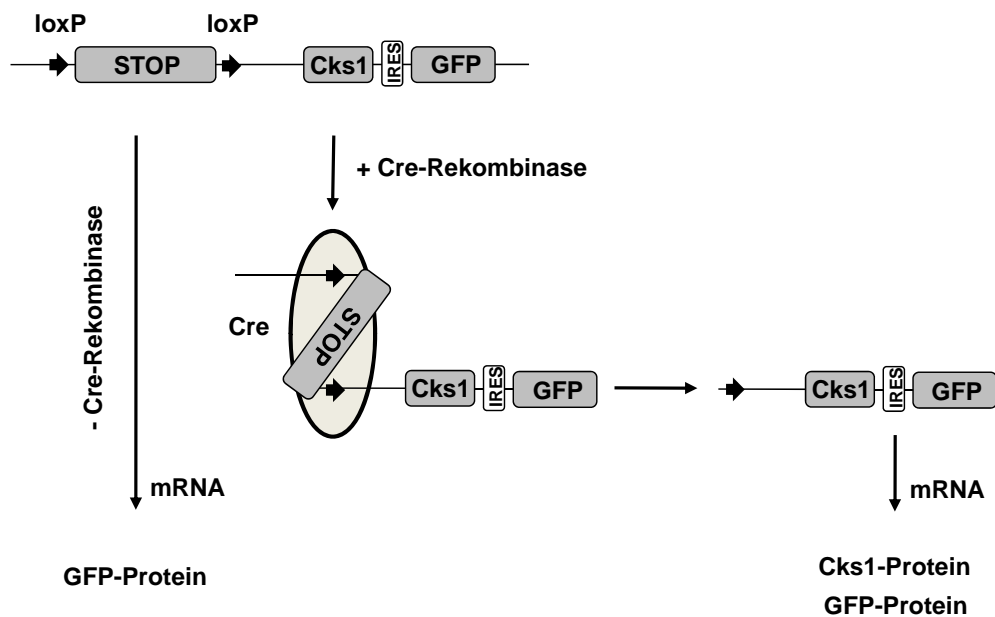


Abb. 4.3.2.1 Schematische Darstellung des Cre-loxP-Systems

Durch Anwesenheit der Cre-Rekombinase wird die Stop-Kassette herausgeschnitten und das Ablesen der *Cks1*-Sequenz ermöglicht. Die Expression von GFP steht unter der Kontrolle der IRES und wird nicht von der Stop-Kassette beeinflusst.

Die Undurchlässigkeit der Stop-Kassette wurde in NIH/3T3-Zellen geprüft, die zuvor mit einem MSCV-Cre-Puro- beziehungsweise MSCV-Puro-Vektor infiziert und anschließend selektioniert wurden. Diese Zellen wurden zusätzlich mit dem klonierten

MIG-Stop-Cks1-Konstrukt oder dem Leervektor (MIG-Stop) infiziert. Der Cks1-Gehalt einer zu 100 % infizierten Zellpopulation beweist die Undurchlässigkeit des Konstrukts, da die Menge des Zielproteins nur in den Zellen ansteigt, die mit MIG-Stop-Cks1 infiziert wurden und zusätzlich die Rekombinase exprimieren (Abb. 4.3.2.2 B).

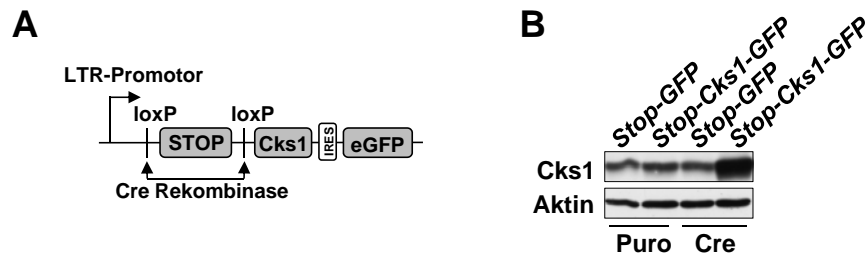


Abb. 4.3.2.2 Das MIG-Stop-Cks1-Konstrukt führt *in vitro* zu einer ausschließlichen Cks1-Expression in MSCV-Cre-infizierten NIH/3T3-Zellen

A Schematische Darstellung des klonierten MIG-Stop-Cks1-Konstrukts zeigt die von loxP-Stellen flankierte Stop-Kassette. Sie verhindert die Translation des Zielgens. **B** Proteinbiochemische Analyse der Cks1-Expression in NIH/3T3-Zellen bei An- und Abwesenheit der Cre-Rekombinase als Test für die Undurchlässigkeit der Stop-Kassette.

Nach Bestimmung der Überexpression *in vitro* wurden durch Transfektion der Virus-produzierenden Zelllinie Phoenix E infektiöse Partikel hergestellt. Diese wurden für die Infektion des 5-FU-mobilisierten Knochenmarks transgener CD19Cre-Spendertiere verwendet. Der CD19-Promotor, der ausschließlich in B-Lymphozyten aktiv ist und nach der Reifung zur prä-B-Zelle abgelesen wird, gewährleistet eine B-Zell-spezifische Cks1-Expression. Die Effizienz der Transfektion der Phoenix E-Zellen, festgestellt mittels FACS-Analyse, lag bei 80-90 %. Der Virustiter wurde an der Infektionsrate von NIH/3T3-Zellen durch eine Verdünnungsreihe des Virusüberstandes gemessen. Für die Infektion der Knochenmarkzellen wurden Virusüberstände mit mindestens 2×10^5 Partikeln/ml verwendet, da ein niedrigerer Titer zu ungenügender Infektion der primären Zellen geführt hätte (Hock und Miller, 1986; Hogge und Humphries, 1987). Die Infektionseffizienz der Knochenmarkzellen wurde mittels FACScan ermittelt. Dabei konnten die in ihrer Größe und Granularität abweichenden, primären Vorläuferzellen im *forward scatter* (FS, Durchlassstreuung) und *side scatter* (SS, seitliche Streuung) von den reifen Zellen unterschieden werden.

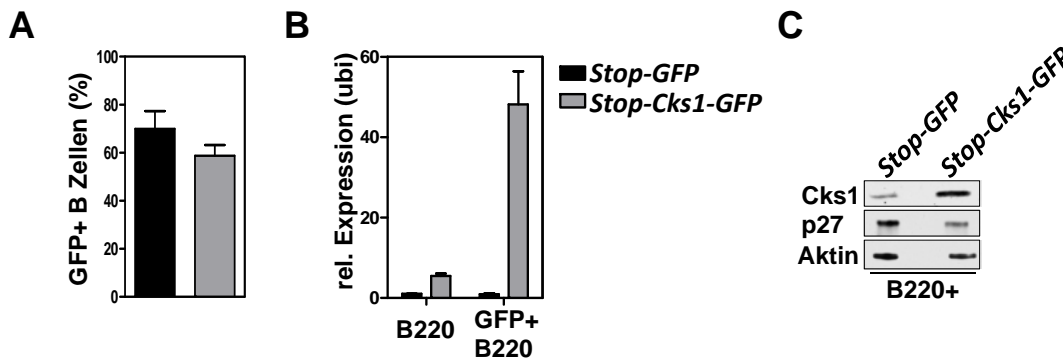


Abb. 4.3.2.3 MIG-Stop-Cks1-Transplantate zeigen hohe Cks1-Expression in B-Lymphozyten

Gepoolte Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation 15 % und 45 %). **A** Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung rekonstituierter transgener B-Zellen im Blut der Empfängertiere, 28 Tage nach Transplantation. **B** Graphische Darstellung der qRT-PCR-Analyse der relativen Cks1-Expression in GFP-positiven B-Zellen nach durchflusszytometrischer Sortierung, 60 Tage nach Transplantation. **C** Westernblotanalyse der angegebenen Proteine FACS-sortierter, GFP-positiver B-Zellen, 50 Tage nach Transplantation.

Die B-Zell-spezifische Überexpression wurde in zwei unabhängigen Transplantationsexperimenten mit unterschiedlicher Infektionsrate der Spenderzellen durchgeführt. Die primären Vorläuferzellen des ersten Experiments zeigten eine Infektionsrate von 15 %, woraufhin 2×10^5 transgene Zellen gespritzt wurden. Nach Rekonstitution des Knochenmarks konnte im Blut ein gemittelter Wert von 50 % transgener B-Zellen für die Versuchsgruppe und 55 % in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Infektionsrate des zweiten Experiments lag bei 45 %. Hier wurden 1×10^5 transgene Zellen gespritzt und es konnten Prozentanteile von 70 % (MIG-Stop-Cks1) und 90 % (MIG-Stop) rekonstituierter, transgener B-Zellen erreicht werden (durchschnittlicher Wert beider Rekonstitutionen, Abb. 4.3.2.3 A). Zusätzlich zur Anzahl der transgenen B-Zellen wurde die Transkriptionsrate von *Cks1* in durchflusszytometrisch sortierten B-Zellen nach 60 Tagen (Abb. 4.3.2.3 B) und die Menge an Protein nach 50 Tagen (Abb. 4.3.2.3 C) bestimmt. Hierbei ist auf RNA- und auf Proteinebene eine Hochregulation von Cks1 im Vergleich zu den mit Kontrollvektor infizierten Zellen festzustellen. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist die Reduktion von p27^{Kip1}-Protein durch die verstärkte Expression von Cks1 (Abb. 4.3.2.3 C).

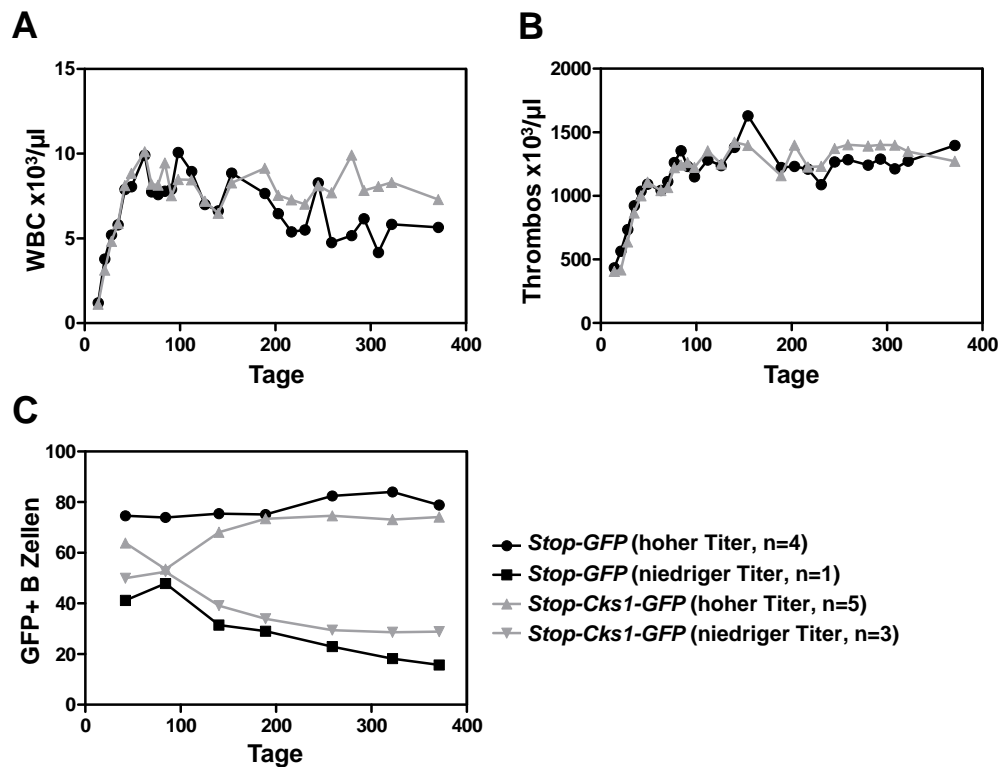


Abb. 4.3.2.4 Keine Unterschiede in den Blutbildern Cks1-überexprimierender Mäuse versus Kontrollen

Kombinierte Ergebnisse zweier unabhängiger MIG-Stop-Cks1-Transplantationen (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation 15 % und 45 %). **A** Anzahl der Leukozyten im Vollblut. **B** Anzahl der Thrombozyten im Vollblut. **C** Graphische Darstellung durchflusszytometrischer Messungen transgener B-Lymphozyten im peripheren Blut.

Das Monitoring der Mäuse beinhaltete die regelmäßige Anfertigung von Blutbildern, die anfangs wöchentlich, später monatlich durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Zellpopulationen im Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass bei beiden Transplantationsexperimenten in den Zellbestandteilen des Vollblutes (Abb. 4.3.2.4 A und B) und bei der Untersuchung der transgenen B-Zell-Population bis zum Ende der Untersuchung keine Unterschiede zwischen der Kontroll- (MIG-Stop) und der Versuchsgruppe (MIG-Stop-Cks1) auftraten. Bei einigen Versuchstieren nahm der Prozentanteil der transgenen Zellen im Blut mit der Zeit ab. Diese Beobachtung war unabhängig vom Experiment und der Gruppe (Abb. 4.3.2.4 C).

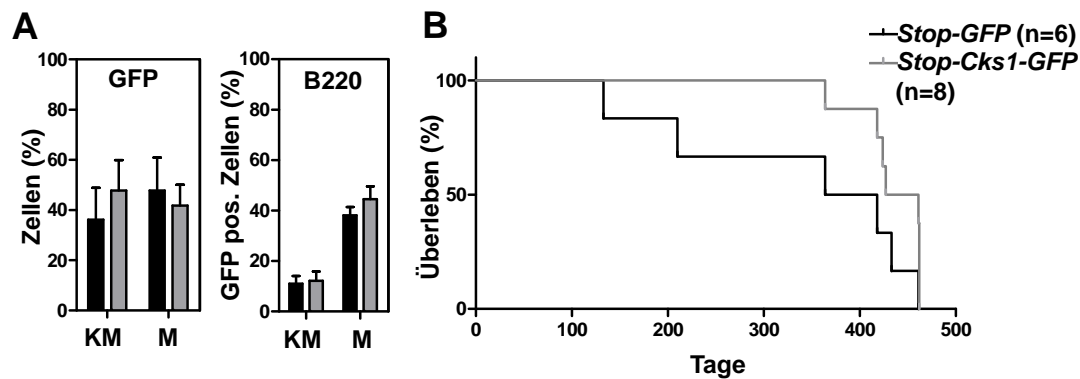


Abb. 4.3.2.5 Überexpression von Cks1 löst keine B-Zell-Erkrankung aus

Kombinierte Ergebnisse zweier unabhängiger MIG-Stop-Cks1-Transplantationsexperimente (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation 15 % und 45 %). **A** Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung nach Opfung der Versuchstiere aufgrund des verschlechterten Allgemeinzustandes. Linker Graph zeigt die Anzahl der CD45/GFP-positiven Zellen in Knochenmark und Milz. Rechts zeigt die Anzahl GFP-positiver B-Zellen in diesen Organen. **B** Überlebenskurven der Versuchstiere beider Gruppen.

Bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes wurden die Versuchstiere getötet und ihre hämatopoetischen Organe wurden durchflusszytometrisch analysiert. Hier zeigten sich, wie bereits im Blut beobachtet, keine Unterschiede der Kontroll- und der Cks1-überexprimierenden Gruppe in der Zahl transgener Zellen und im Anteil infizierter B-Zellen (Abb. 4.3.2.5 A). Übereinstimmend mit den unauffälligen B-Zell-Populationen der Organe wurde keine Verkürzung der Lebensdauer der Cks1-überexprimierenden Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe ersichtlich (mittlere Überlebensdauer der Versuchstiere: 444 Tage; mittlere Überlebensdauer der Kontrolltiere: 391 Tage; Abb. 4.3.2.5 B).

Es konnte gezeigt werden, dass Cks1, trotz der negativen Rolle, die es bei diversen B-Zell-Erkrankungen spielt, bei alleiniger Überexpression, nicht für die Lymphomentstehung ausreicht. Vielmehr erkrankten die Mäuse an strahleninduzierten Folgeschäden der Transplantation.

4.3.3 Modell einer ubiquitären Cks1-Überexpression

Cks1 spielt eine Rolle in diversen Tumorerkrankungen (Masuda et al., 2003; Kitajima et al., 2004; Shapira et al., 2004, 2005; Slotky et al., 2005; Shapira et al., 2006). Zudem zeigten Latres et al. (2001), dass die T-Zell-spezifische Überexpression des F-Box-

Proteins Skp2 die Entstehung Onkogen-induzierter Erkrankungen fördert (Latres et al., 2001). Da die CD19-spezifische Überexpression von Cks1 keine Transformation der Zellen induzieren konnte, wurde eine ubiquitäre Überexpression im gesamten hämatopoetischen System durchgeführt. In diesem Modell konnte zusätzlich geklärt werden, ob die fortgeschrittene Differenzierung der prä-B-Zelle eine Cks1-induzierte B-Zell-Transformation ausschließt.

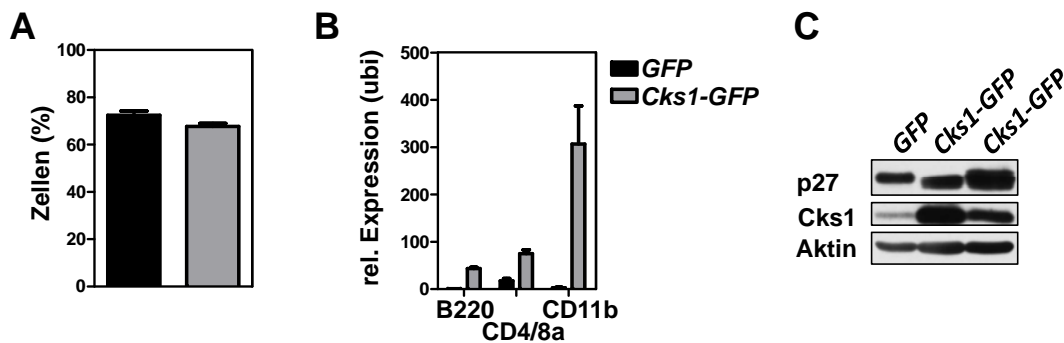


Abb. 4.3.3.1 Transplantate zeigen hohe Cks1-Level auf RNA- und Proteinebene

MIG-Cks1-Transplantationsexperiment (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation 30 %). **A** Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung rekonstituierter transgener Zellen im Blut der Empfänger, 21 Tage nach Transplantation (GFP n=6, Cks1-GFP n=8). **B** Graphische Darstellung der qRT-PCR-Analyse der relativen Cks1-Expression der angegebenen Zellpopulationen, 160 Tage nach der Transplantation (GFP n=2, Cks1-GFP n=3). **C** Proteinbiochemische Bestimmung der angegebenen Proteine zum Zeitpunkt der Erlösung der Versuchstiere. Zwei Mäuse der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Für die Gewährleistung der ubiquitären Cks1-Expression wurde die kodierende Sequenz von *Cks1* in den Expressionsvektor MSCV-IRES-GFP (MIG) kloniert. Bei der Produktion der Viruspartikel wurde wie bei der B-Zell-spezifischen Überexpression vorgegangen. Als Spendertiere wurden für diesen Versuch wildtypische C57BL/6-Mäuse verwendet. Die Rate der transgenen Vorläuferzellen betrug nach Infektion 30 %. Es wurden 4×10^5 Cks1-exprimierende Zellen intravenös in die zuvor myeloablativ bestrahlten Empfänger injiziert. Hierbei wurden erneut zwei Gruppen unterschieden: die der Kontrolltiere, deren transgene Zellen lediglich GFP exprimierten und die Versuchsgruppe, deren transgene Zellen mit dem Cks1-exprimierenden Plasmid infiziert wurden. Die Mäuse beider Gruppen zeigten nach vollständiger Rekonstitution im peripheren Blut einen gemittelten GFP-Gehalt von etwa 70 % (Abb. 4.3.3.1 A). Die relative Cks1-Expression in FACS-sor-

tierten transgenen Zellen zeigte 160 Tage nach der Transplantation in allen Zelltypen eine starke Erhöhung gegenüber den Kontrollzellen. Dabei war die Cks1-Expression in den Zellen des myeloischen Zellkompartiments verglichen mit B- und T-Zellen sogar noch um das sieben- beziehungsweise vierfache erhöht (Abb. 4.3.3.1 B). Übereinstimmend mit den relativen RNA-Mengen zeigte sich eine starke Erhöhung von Cks1-Protein im Knochenmark moribunder Versuchstiere, die jedoch nicht mit einer Reduktion an p27^{Kip1}-Protein einherging (Abb. 4.3.3.1 C).

Die Beobachtung der Versuchstiere beinhaltete erneut Blutbildanalysen und durchflusszytometrische Bestimmungen der Zellpopulationen. Die Ergebnisse zeigen keine Unterschiede der Leukozytenzahl, der Anzahl CD45/GFP-positiver Zellen und transgener myeloischer Zellen (CD11b/Gr1-positiv; Abb. 4.3.3.2 A, B, C). Ebenfalls zeigten sich keine Unterschiede im B- und T-Zell-Kompartiment.

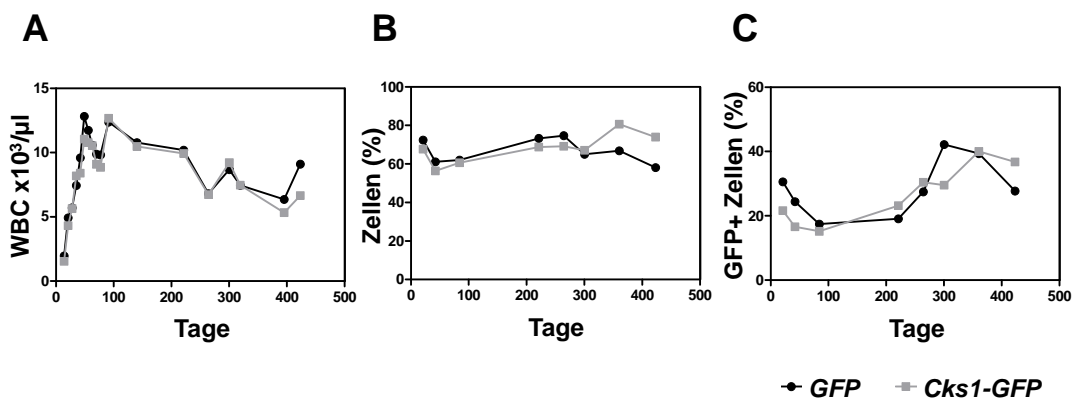


Abb. 4.3.3.2 Blutbildanalysen bei ubiquitärer Cks1-Expression zeigen keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen

MIG-Cks1-Transplantationsexperiment (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation 30 %). **A** Regelmäßige Messungen der Leukozyten im peripheren Blut. **B** Durchflusszytometrische Analyse der GFP-positiven und **C** der GFP-positiven, myeloischen Zellpopulation im Blut.

Die Versuchstiere wurden bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes untersucht und die hämatopoetischen Organe wurden durchflusszytometrisch analysiert. Trotz einer starken Divergenz der Anzahl transgener Zellen innerhalb beider Gruppen zeigte sich im Knochenmark Cks1-überexprimierender Mäuse eine signifikante Erhöhung myeloischer Zellen ($p=0,02$; Abb. 4.3.3.3 A). Auch das Milzgewicht vieler Cks1-Mäuse zeigte eine

Erhöhung gegenüber den Kontrollen, die jedoch in der Gruppe keine Signifikanz erreichten ($p=0,095$; Abb. 4.3.3.3 B). Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte der Organe ergaben wiederum bei beiden Gruppen Infiltrationen myeloischer Zellen (Abb. 4.3.3.3 C). Ebenfalls resultierte die Cks1-Überexpression in keiner verkürzten Latenzzeit (Cks1-Gruppe: 541,5 Tage MIG; Kontrollgruppe: 469 Tage; Abb. 4.3.3.3 D). Vorzeitige Analysen prämaligener Organe Cks1-exprimierender Mäuse (140 Tage nach Rekonstitution) zeigten den Blutbildern entsprechend keine Abweichungen der Zellzahlen im myeloischen Kompartiment (Daten nicht gezeigt).

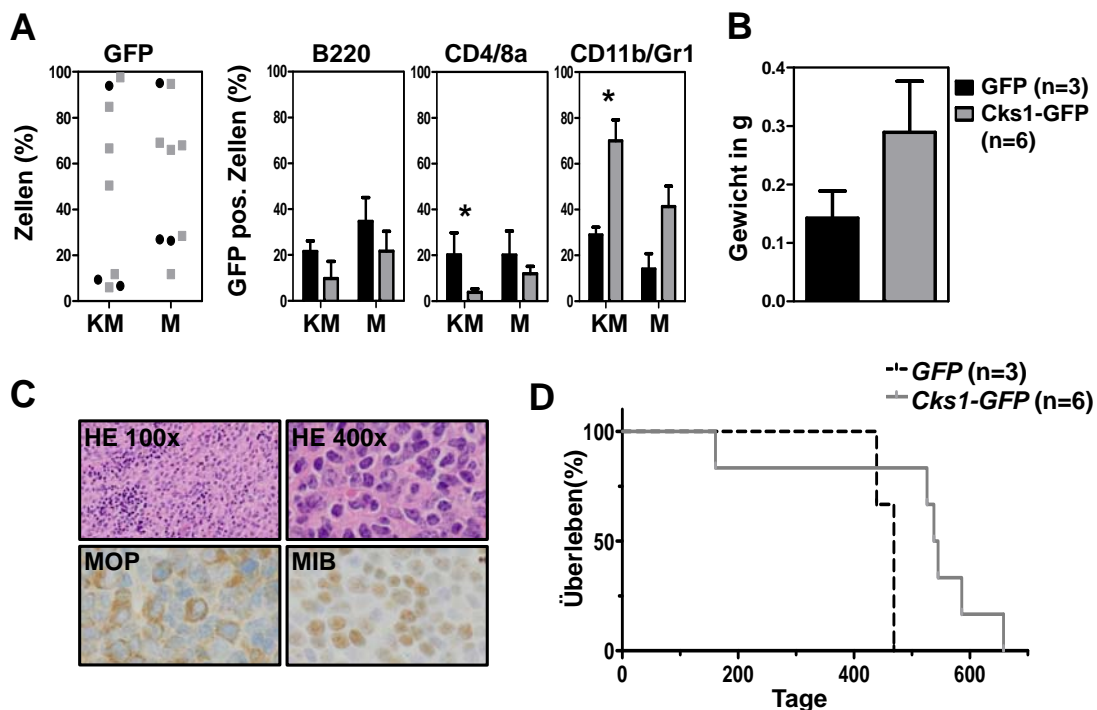


Abb. 4.3.3.3 Die ubiquitäre Überexpression von Cks1 bewirkt Myeloproliferation, führt jedoch nicht zu Krankheitsinduktion

MIG-Cks1-Transplantationsexperiment (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation 30 %). * zeigen p-Werte von $\leq 0,05$ an. **A** Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung der GFP-positiven Population (links) und ihrer zellulären Bestandteile in Knochenmark und Milz (B-Zellen, Mitte links; T-Zellen, Mitte rechts; Granulozyten und Monozyten, rechts). **B** Milzgewicht der unterschiedlichen Gruppen. **C** Histologische Milzschnitte der Cks1-überexprimierenden Gruppe. HE Färbung in 100x und 400x Vergrößerung. Myeloperoxidase (MOP) Färbung in 400x Vergrößerung. MIB-1 Färbung in 400x Vergrößerung. **D** Überlebenskurven der Versuchsgruppen.

Zusammenfassend führte die ubiquitäre Überexpression von Cks1 zu einem bedeutenden Anstieg der RNA- und Proteinmenge, der eine Vergrößerung des myeloischen Zell-

kompartiments zur Folge hatte. Dabei setzte die gesteigerte Myeloproliferation erst spät im Experiment ein (nach Tag 140) und konnte keine Erkrankung der Versuchstiere bewirken, bevor sie aufgrund strahleninduzierter Folgeschäden getötet werden mussten.

4.4 Die Rolle von Cks1 während der B-Zell-Entwicklung

Trotz auffallender Korrelation erhöhter Cks1-Expression mit diversen B-Zell-Erkrankungen war die Überexpression von Cks1 in CD19-positiven B-Zellen nicht in der Lage, Lymphomagenese zu induzieren. Ebenfalls hatte die konstitutive Cks1-Expression im gesamten hämatopoetischen System keine Transformation früherer B-Zell-Stadien zur Folge.

Um festzustellen, ob abweichende Cks1-Expression zu Unterschieden der Proliferationsrate und einer veränderten B-Zell-Entwicklung führen kann, wurde das Verhalten von B-Lymphozyten im bereits vorgestellten Modell der Überexpression, aber auch anhand von B-Zellen *Cks1*-defizienter Mäuse getestet.

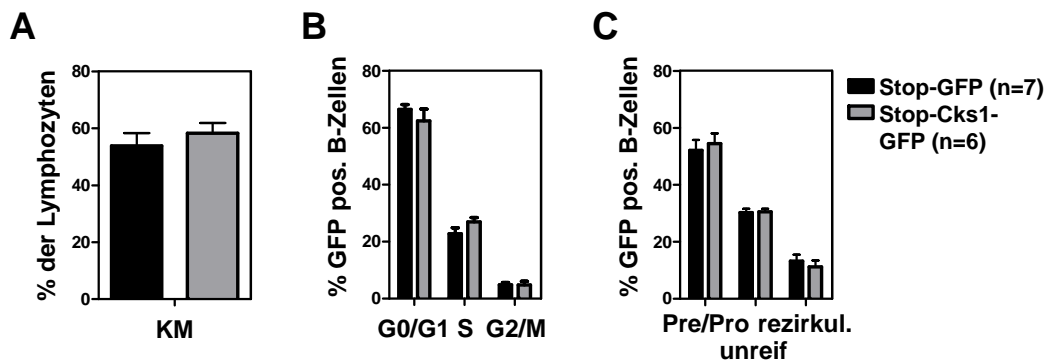


Abb. 4.4.1 B-Zell-spezifische Überexpression von Cks1 induziert keine Veränderung der B-Zell-Proliferation oder Differenzierung *in vivo*

MIG-Stop-Cks1-Transplantationsexperiment (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation 40 %). **A** Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils der B220-positiven B-Zellen aus allen Lymphozyten. **B** BrdU-basierende Proliferationsmessung transduzierter B220-positiver B-Lymphozyten, 12 h nach BrdU-Injektion. **C** Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung der angegebenen B-Zell-Populationen im Knochenmark.

Für die Analyse der Cks1-überexprimierenden B-Zellen wurden die Mäuse 50 Tage nach der Transplantation von 2×10^5 transgenen Zellen mit einer Infektionsrate von 40 %

untersucht. In diesem Zeitraum konnten sich die bestrahlten Empfänger vollständig erholen und die Zellen zu einer normalen Proliferation finden. 12 h vor der Analyse wurde BrdU intraperitoneal injiziert. Die Knochenmark- und Milzzellen wurden am Folgetag entnommen und die zellspezifischen Oberflächenantigene wurden für das Proliferationsassay und die durchflusszytometrische Bestimmung der B-Zell-Populationen markiert. Die Infektionsrate der rekonstituierten B-Zellen lag für das Knochenmark und die Milz in der Kontrollgruppe im Mittel bei etwa 80 %, in der Cks1-GFP-Gruppe bei 70 %. Die Proliferationsstudie wurde für transgene B-Zellen durchgeführt und zeigte, dass Cks1-Überexpression keine veränderte Proliferation der B-Zell-Population induziert (Abb. 4.4.1 B). Auch nach Unterscheidung reifer (IgM+) und unreifer (IgM-) B-Zellen waren keine Abweichungen zu erkennen (nicht gezeigt). Die Differenzierung der B-Zell-Populationen (Abb. 4.4.1 A) in prä/pro-B-Zellen, sowie unreife und rezirkulierende B-Zellen im Knochenmark (Abb. 4.4.1 C) und unreife und reife B-Zellen in der Milz (nicht gezeigt) zeigte keine anteiligen Unterschiede der Cks1-überexprimierenden Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

Veränderungen der B-Zell-Proliferation und des Differenzierungsverhaltens Cks1-defizienter Zellen wurden in *Cks1-Knockout*-Mäusen untersucht. Den Mäusen wurde ebenfalls 12 h vor der Analyse BrdU injiziert. Die Organe wurden präpariert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Proliferationsrate von prä/pro-, unreifen und rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark ergab keine Unterschiede (nicht gezeigt). Die Auswertung der B-Zell-Entwicklung hinsichtlich der rezirkulierenden Zellen ergab in der Milz eine geringe aber signifikante Erhöhung, die im Knochenmark jedoch nicht festzustellen war (nicht gezeigt). Weiterhin ergaben Messungen follikulärer und unreifer B-Zellen sowie der Marginalzonenzellen in der Milz und unreifer, rezirkulierender, prä- und pro-B-Zellen im Knochenmark keine Unterschiede (nicht gezeigt).

Neben der B-Zell-Entwicklung wurde auch die B1-Zell-Population *Cks1*-defizienter Mäuse untersucht. B1-Zellen sind eine Untergruppe der B-Zellen und bieten durch spontane Sezernierung von Antikörpern einen ersten Schutz in der frühen Phase der Immunantwort. Sie entstehen in der fötalen Leber und im neonatalen Knochenmark und haben die Fähigkeit sich selbst zu erneuern. Der prozentuale Anteil dieser Zellen zeigte in der Milz *Cks1*-defizienter Versuchstiere eine Verdoppelung gegenüber den wildtypischen Kontrollen. Da ihr Anteil in der Milz gering ist und sie sich vornehmlich innerhalb des Peritoneums befinden, wurden zur Bestätigung der Ergebnisse die Zellanteile in der Milz und im

Peritoneum weiterer Mäuse untersucht. Hierbei zeigte sich auch im Peritoneum eine signifikante Erhöhung dieser speziellen B-Zell-Population (Abb. 4.4.2).

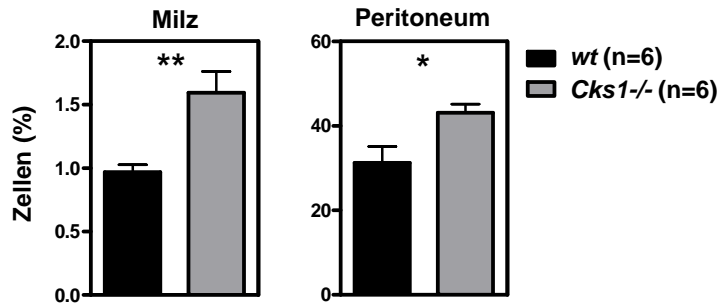


Abb. 4.4.2 Signifikant vergrößerte B1-Zell-Population in Milz und Peritoneum *Cks1*-defizienter Versuchstiere

Durchflusszytometrische Bestimmung der B1-Zell-Populationen (CD19⁺ B220^{low}) wildtypischer und *Cks1*-defizienter Mäuse in der Milz (links) und innerhalb des Peritoneums (rechts). * bzw. ** zeigen p-Werte $\leq 0,05$ bzw. $\leq 0,01$ an.

Die Proliferationsstudien *Cks1*-überexprimierender, aber auch *Cks1*-defizienter B-Lymphozyten ergaben trotz der augenscheinlichen Rolle von *Cks1* in c-Myc-getriebenen Lymphomen keine nachweislichen Unterschiede. Ebenfalls spielte der *Cks1*-Status der Zellen keine Rolle während der B-Zell-Differenzierung und zeigte keine Veränderungen der prozentualen Anteile der Populationen. Lediglich der Anteil an B1-Zellen in der Milz und im Peritoneum *Cks1*-defizienter Mäuse zeigte eine signifikante Vergrößerung.

4.5 *Cks1*-Verlust im Modell einer c-Myc-induzierten AML

Das Protoonkogen *c-Myc*, das bei 70 % aller Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt (Oster et al., 2002), ist auf verschiedenen Ebenen an der Regulierung des p27^{Kip1}-Levels während der späten G1-Phase beteiligt (Kapitel 1.4.2). Unter anderem reguliert c-Myc die Transkription von Proteinbestandteilen der SCF^{Skp2}-Ubiquitinligase und des kooperierenden Faktors *Cks1* (Old et al., 2010; Keller et al., 2007). c-Myc-Überexpression in hämatopoetischen Vorläuferzellen führt je nach Stammeshintergrund der transplantierten Mäuse zu einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer akuten myeloischen Leukämie (AML) mit einer medialen Überlebensdauer von 47-61 Tagen (Luo et al., 2005). Um

die Rolle von Cks1 bei der Pathogenese hämatopoetischer Tumorerkrankungen zu ergründen, wurde die von Luo et al. (2005) publizierte Induktion einer AML durch Überexpression von MIG-Myc in dem bereits beschriebenen retroviralen Transplantationsmodell angewendet. Da verschiedene $p27^{Kip1}$ -unabhängige Rollen von Cks1 während der Tumorgenese diskutiert werden, wurden neben der Transplantation wildtypischer und *Cks1*-defizienter Knochenmarkszellen ebenfalls $p27^{Kip1}$ -defiziente ($p27^{Kip1-/-}$) und doppeldefiziente ($Cks1^{-/-};p27^{Kip1-/-}$) Vorläuferzellen transduziert. Diese zusätzlichen Transplantationen sollten klären, ob die durch *Cks1*-Verlust entstehenden Effekte während der Tumorgenese auf eine Funktion außerhalb der SCF^{Skp2}-Ligase zurückzuführen sind, oder ob sie Auswirkungen der $p27^{Kip1}$ -Akkumulation sind und durch den gleichzeitigen Verlust von $p27^{Kip1}$ aufgehoben werden können.

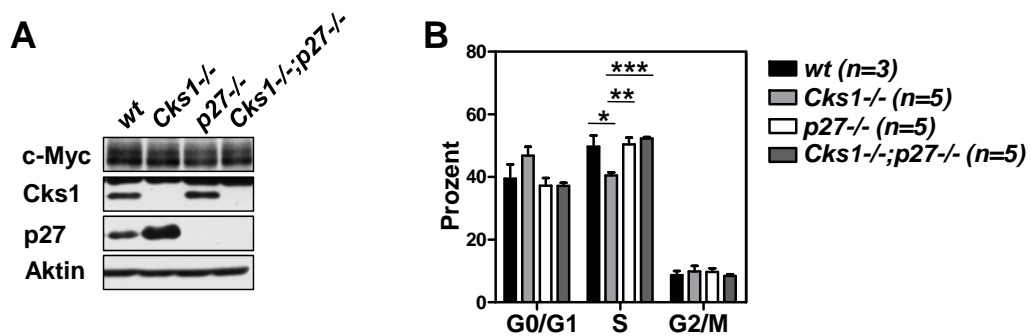


Abb. 4.5.1 Überexpression von c-Myc im Transduktions- und Transplantationsmodell führt zu verminderter Proliferation *Cks1*-defizienter Zellen im Vergleich zu wildtypischen, $p27^{Kip1-/-}$ - und $Cks1^{-/-};p27^{Kip1-/-}$ -Zellen

MIG-Myc-Transplantationsexperiment (Infektionsrate GFP⁺ Zellen bei der Transplantation 40-50 %). *, ** bzw. *** zeigen p-Werte $\leq 0,05$, $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$ an. **A** Proteinbiochemische Bestimmung der Expression von c-Myc, Cks1 und $p27^{Kip1}$ in den Empfängern, 21 Tage nach Transplantation. **B** BrdU-basierter Proliferationsassay der MIG-Myc-infizierten Granulozyten (CD11b/Gr1-positiv) im Knochenmark der Empfänger, 21 Tage nach Transplantation und 12 h nach BrdU-Injektion.

Zunächst erfolgten 21 Tage nach der Transplantation Proliferationsmessungen der retroviral veränderten Zellen. Der Zeitpunkt der Analyse wurde so gewählt, dass die vollständige Rekonstitution des hämatopoetischen Systems erfolgt war, aber noch keine Induktion der Erkrankung stattgefunden hatte. Abbildung 4.5.1 A zeigt die Expression der betroffenen Proteine in den Transplantaten zum Zeitpunkt der Proliferationsstudie. Die auftretende $p27^{Kip1}$ -Akkumulation durch *Cks1*-Verlust ist deutlich zu erkennen. Prämaligne

Proliferationsunterschiede wurden durch die intraperitoneale Injektion von BrdU und anschließende durchflusszytometrische Analyse festgestellt. Es zeigte sich, dass *Cks1*-defiziente Granulozyten (CD11b/Gr1-positiv) im Knochenmark erheblich langsamer proliferieren als wildtypische Zellen. Ebenfalls zeigten die $p27^{Kip1^{-/-}}$ -Granulozyten eine erhöhte Proliferationsrate gegenüber der *Cks1*-defizienter Zellen, die wie erwartet eine höhere Signifikanz zeigten als die der Wildtypen. Interessanterweise zeigten sich für die Zellen der $Cks1^{-/-};p27^{Kip1^{-/-}}$ -Gruppe Werte, die der Proliferationsrate der $p27^{Kip1^{-}}$ -defizienten Zellen glichen (Abb. 4.5.1 B).

Weitere Folgen und mögliche Unterschiede im Krankheitsverlauf sollten durch die Beobachtung der transplantierten Mäuse bis zum Ausbruch der AML geklärt werden. Bei Anzeichen der Erkrankung und Verschlechterung des Allgemeinzustandes wurden die Versuchstiere getötet und analysiert. Blutbilder der c-Myc-exprimierenden Gruppe zeigten eine Thrombozytopenie im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch normale Werte für Erythrozyten und Leukozyten. Lediglich 20 % der Mäuse entwickelten bei Einsetzen der Erkrankung eine Leukozytose (Leukozyten $> 20\text{-}88 \times 10^3/\mu\text{l}$). Alle Versuchstiere ließen die für dieses Modell bereits beschriebenen Anzeichen einer AML erkennen (Luo et al., 2005). Knochenmark, Milz und Blut enthielten einen auffallend hohen Anteil myeloischer Zellen (Abb. 4.5.2 A rechts). Ebenfalls zeigte sich eine Splenomegalie (Abb. 4.5.2 C) und eine Paralyse der Hinterbeine, die durch Abwanderung krankhafter Zellen aus dem Knochenmark in den Spinalkanal hervorgerufen wurde (Verminderte Zellzahl im Knochenmark, Abb. 4.5.2 B und Luo et al., 2005). Überraschenderweise zeigten sich trotz der stark veränderten Proliferationsrate der einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Krankheitsverlauf (mediales Überleben: *wt* 52 Tage; *Cks1*^{-/-} 48 Tage; $p27^{Kip1^{-/-}}$ 53 Tage; $Cks1^{-/-};p27^{Kip1^{-/-}}$ 39 Tage; Abb. 4.5.2 D). Ebenfalls blieb die Dissemination erkrankter Zellen im Vergleich zu der im E μ -Myc-Modell beobachteten Reduktion bei *Cks1*-Verlust unauffällig (Abb. 4.5.2 A).

Die Ergebnisse zeigen, dass der simultane Verlust von $p27^{Kip1}$ den Proliferationsdefekt *Cks1*-defizienter Zellen ausgleichen kann. Somit ist die durch *Cks1*-Verlust hervorgerufene $p27^{Kip1}$ -Akkumulation für die Verringerung der Zellteilungsgeschwindigkeit verantwortlich. Ebenfalls zeigte sich, dass trotz der signifikant abweichenden Granulozyten-Pro-

liferation der unterschiedlichen Genotypen keine genotypenabhängigen Krankheitsverläufe auftraten.

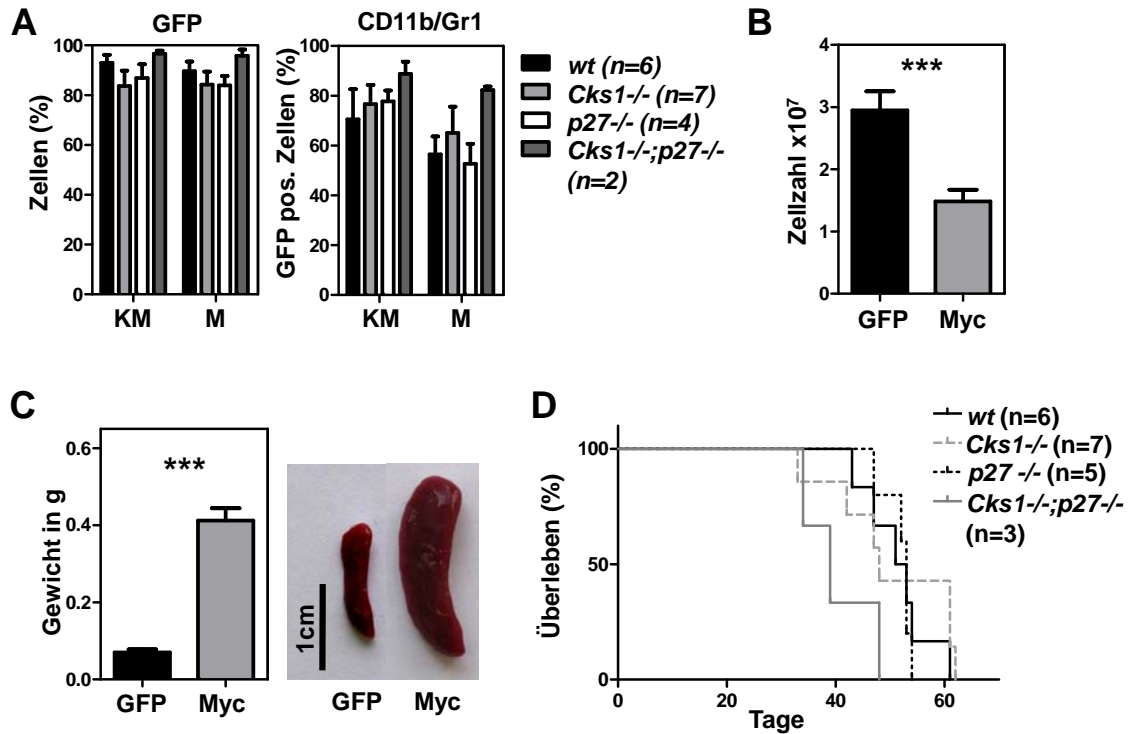


Abb. 4.5.2 *Cks1*⁻ und *p27^{Kip1}*⁻-Verlust haben keinen Effekt auf die Ausbreitung und Latenz einer durch c-Myc-induzierten AML

MIG-Myc-Transplantationsexperiment (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation 30-50 %). *** zeigen p-Werte $\leq 0,001$ an. **A** Durchflusszytometrische Bestimmung der Anteile GFP-positiver Zellen in Knochenmark und Milz (links), sowie Anteile der myeloischen Zellen im Zellpool der c-Myc-infizierten Spenderzellen (rechts). **B** Zählung der Knochenmarkszellen nach Lyse der Erythrozyten, gepoolte Gruppen. **C** Graphische Darstellung des Milzgewichts der Kontrollgruppe im Vergleich zur erkrankten c-Myc-Gruppe (links), gepoolte Gruppen. Exemplarische Fotografie aus der wt-Gruppe (wt GFP, wt Myc) (rechts). **D** Überlebenskurven der Versuchstiere aller Gruppen (wt (n=6), *Cks1*^{-/-} (n=7), *p27^{Kip1}*^{-/-} (n=5), *Cks1*^{-/-}; *p27^{Kip1}*^{-/-} (n=3)).

4.6 Die Rolle von Cks1 während einer L-gp130-induzierten Erkrankung

4.6.1 Untersuchung potentieller koonkogener Funktionen

Das Glykoprotein 130 (gp130) ist ein ubiquitär exprimiertes, signalübertragendes Molekül, das in der Zellmembran lokalisiert ist und bei Bindung von Rezeptor gekoppel-

tem Interleukin-6 (IL-6) Homodimere ausbildet (Taga und Kishimoto, 1995; Heinrich et al., 2003). Diese Homodimerbildung führt zu Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors und Signaltransduktion via dem *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*-Signalweg (JAK/STAT-Signalweg; Abb. 4.6.1.1 A; Hibi et al., 1996). Ebenfalls findet eine Aktivierung der Ras-*extracellular signal regulated kinase* 1 und 2 (ERK1/2) statt (Takahashi-Tezuka et al., 1998).

Stuhlmann-Laeisz et al. (2006) tauschten die extrazelluläre Domäne des gp130-Moleküls durch eine c-jun Leucin-Zipper-Region aus, wodurch das chimäre konstitutiv aktive Rezeptorprotein L-gp130 entstand (Abb. 4.6.1.1 B). Dieses Konstrukt wurde in dieser Arbeit verwendet, um potentielle koonkogene Funktionen von Cks1 zu untersuchen.

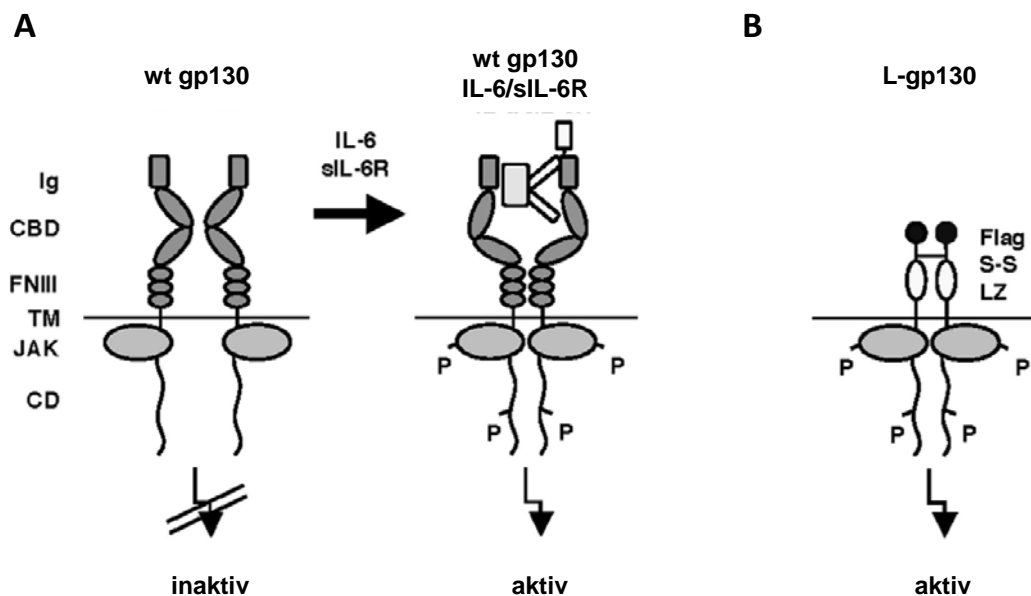


Abb. 4.6.1.1 Schematische Darstellung des konstitutiv aktiven L-gp130-Rezeptors adaptiert nach Stuhlmann-Laeisz (2006)

A Schematische Darstellung des gp130-Rezeptors in seiner inaktiven Form (links) und als aktives, IL-6-Rezeptor-gebundenes Dimer (rechts). **B** Die konstitutiv aktive L-gp130-Form.

Um die Zelltransformation durch das L-gp130-Systems zu bestätigen, wurde eine Infektion der gp130-defizienten, murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3 durchgeführt. Stuhlmann-Laeisz et al. (2006) zeigten, dass diese IL-3-abhängige Zelllinie durch L-gp130-Überexpression unabhängig von der Zugabe von Zytokinen wird. Abbildung 4.6.1.2 A zeigt die Expression der MIG-L-gp130- und MIG-wt gp130-Konstrukte (kodiert wildtypisches

gp130). Durch die L-gp130-induzierte Faktorunabhängigkeit proliferieren die transgenen Zellen mit der annähernd gleichen Rate wie infizierte Zellen unter Zugabe des Zytokins. Im Gegensatz dazu trat bei den wt gp130-infizierten sowie den parental Zellen unter IL-3 Entzug Wachstumsarrest und eine Reduktion der Zellzahl ein (Abb. 4.6.1.2 B). Die Faktorunabhängigkeit der durch MIG-L-gp130-transformierten Zellen konnte ebenfalls durch Koloniebildung in Methylzellulose bestätigt werden, während sich bei den wt gp130-infizierten Zellen keine Kolonien zeigten (Abb. 4.6.1.2 C).

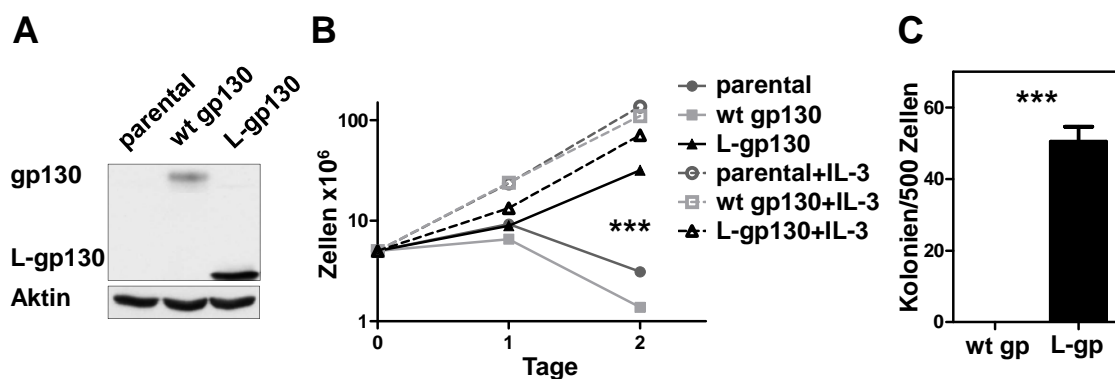


Abb. 4.6.1.2 Konstitutiv aktives gp130 führt in der murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3 zu Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation und Koloniebildung in Methylzellulose

*** zeigen p-Werte von $\leq 0,001$ an. **A** Westernblotanalyse der angegebenen Proteine in retroviral infizierten Ba/F3-Zellen. **B** Wachstumskurve der Zellen unter Zugabe von IL-3 und bei Entzug des Zytokins. **C** Graphische Darstellung der Koloniebildung in Methylzellulose ohne die Zugabe von Zytokinen.

Kürzlich konnten wir zeigen (Dechow und Götze et al., Manuskript in Vorbereitung), dass die Transplantation MIG-L-gp130-infizierter, 5-FU-stimulierter Vorläuferzellen nach 200 Tagen medialem Überleben eine verstärkte Bildung von B-Zellen und eine folgende Ausdifferenzierung zu Plasmazellen hervorruft. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese Plasmazellen bei sekundärer Transplantation innerhalb von 75 Tagen zu Multiplen Myelomen führten, wobei die Mäuse viele der beim Menschen beobachteten Anzeichen der Erkrankung, wie hochgradige Infiltration des Knochenmarks, osteolytische Knochenläsionen, sowie Gammopathie und Nierenversagen aufwiesen.

Das Multiple Myelom oder auch Plasmozytom ist eine Erkrankung der B-Lymphozyten, bei dem B-Zellen zu Plasmazellen (CD138-positiv) ausdifferenzieren und sich anschließend unkontrolliert vermehren. Plasmozytomzellen bilden anstatt funktionstüchtiger Anti-

körper Paraproteine, die durch ihre Unvollständigkeit keine reguläre Immunantwort ermöglichen. Ebenfalls wird durch den starken Überschuss an Plasmazellen die Proliferation gesunder Erythrozyten und Leukozyten gehemmt. Letzteres führt zusätzlich zu einer Schwächung des Immunsystems und einer damit einhergehenden Infektionsanfälligkeit.

Cks1-Amplifikation wurde als ein schlechter prognostischer Faktor beim Multiplen Myelom bestimmt und geht mit einer Verkürzung der Lebensdauer betroffener Patienten einher (Chang et al., 2006; Fonseca et al., 2006; Zhan et al., 2007). Ebenfalls führt Überexpression von Cks1 wie L-gp130-Expression zu einer Aktivierung der ERK- sowie JAK/STAT-Signalwege (Shi et al., 2010).

Da die alleinige Expression von Cks1 im retroviralen Transplantationsversuch zu keiner Erkrankung führte, wurde das L-gp130-Modell für eine Koexpressionsstudie verwendet. Für die Untersuchung koonkogener Funktionen von Cks1 bei hämatopoetischen Tumorerkrankungen wurden 5-FU-stimulierte Balb/c-Knochenmarkzellen mit retroviralen Partikeln infiziert. Zusätzlich zum MIG-L-gp130-Vektor wurden die Zellen mit einem Cks1-exprimierenden Plasmid beziehungsweise einem Leervektor infiziert. Für diesen Versuch wurden zwei unterschiedliche Cks1-Expressionsplasmide verwendet. Zum einen wurde die kodierende Sequenz von *Cks1* in ein Expressionsplasmid mit einem rot fluoreszierenden Reporterprotein (*red fluoreszenz protein*, RFP) kloniert, zum anderen wurde ein Expressionsvektor verwendet, der einen trunkierten humanen CD2-Rezeptor als Reporter trägt (M1thCD2-Cks1). Die Infektionseffizienz des Spenderknochenmarks betrug in zwei unabhängigen Versuchen etwa 50 % für die L-gp130-Gruppe und 40 % für die Kontrollgruppe, die anstatt des L-gp130 wildtypisches gp130 exprimiert. Da es sich bei dem Protein L-gp130 um den krankheitsauslösenden Faktor handelt, wurden die Zellzahlen der Gruppen nach dessen Expression angeglichen. Der Wechsel des Expressionsplasmids zwischen den Experimenten wurde vorgenommen, da das RFP-Reporterkonstrukt ein schlecht detektierbares Signal im Durchflusszytometer ergab. Dadurch konnten doppelinfizierte Zellen nicht unterschieden werden. Die Westernblotanalyse des Knochenmarks maligner L-gp130-exprimierender Mäuse und frühzeitig getöteter Kontrolltiere in Abbildung 4.6.1.3 zeigt jedoch, dass die gesteigerte Cks1-Expression sogar in unsortierten Zellen deutlich zu erkennen ist. Dies spricht für eine gute Transfektionseffizienz des Vektors. Ebenfalls ist ein deutlicher Anstieg des wt gp130-Levels und der Expression von L-gp130 zu erkennen. Letztere führt zu der Induktion des Cks1-, p27^{Kip1}-, c-Myc- und Bcl-2-Proteinanteils der

Zellen, sowie zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3. Zudem kann eine zusätzliche STAT3-Aktivierung bei den Cks1-überexprimierenden L-gp130-Zellen beobachtet werden.

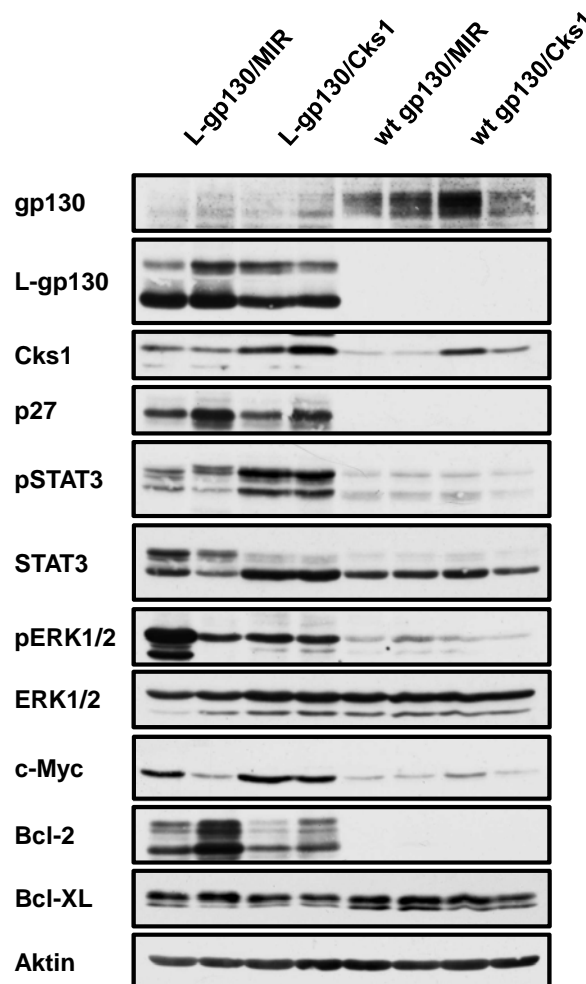


Abb. 4.6.1.3 Cks1-Überexpression führt in L-gp130-transduzierten Zellen zu einer zusätzlichen Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges

Westernblotanalyse der angegebenen Proteine im Knochenmark moribunder L-gp130/MIR- und L-gp130/MIR-Cks1-exprimierender Versuchstiere im Vergleich zu den respektiven Kontrollen (wt gp130).

Die Transplantationen wurden nach letaler Bestrahlung mit 3×10^5 beziehungsweise $2,5 \times 10^5$ transgenen Zellen durchgeführt. Die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems durch die transduzierten Vorläuferzellen wurde nach 20 Tagen mittels Blutentnahme durch Punktion der Wange und durchflusszytometrische Messung auf etwa 90 % bestimmt (Abb.

4.6.1.4 A Spalte 7). Im Folgenden wurden die Mäuse regelmäßigen Blutuntersuchungen unterzogen, die einen gleichbleibenden Anteil transgener Zellen zeigten.

A

Gruppe	Anzahl der Tiere (n=)	Leukozyten (WBZ x10 ³ /µl)	Leukozytose (WBZ >20x10 ³ /µl)	Thrombozyten (x10 ³ /µl)	Erythrozyten (RBZ x10 ⁶ /µl)	med.GFP Tag 20 % PB	med.GFP moribund % KM	Mediales Überleben (Tage)	Myeloproliferation (n=)	T-Zellproliferation (n=)
L-gp130	8	14.34 - 234.9	n=7	279-1449 (n=1>1000)	7.69 - 10.55	90.13	85.1 (n=8)	119	7	1
wt gp130	5	11.42 - 16.58	n=0	1356-1689	8.94 - 9.18	87.87	64.4 (n=5)	>187	0	0
L-gp130 /Cks1	12	13.97 - 85.94	n=10	203-1261 (n=1>1000)	1.05 - 12.54	90.65	85.6 (n=9)	88	12	0
wt gp130 /Cks1	6	9.18 - 17.84	n=0	1305-2020	8.27 - 10.29	87.24	73.8 (n=6)	>187	0	0

B

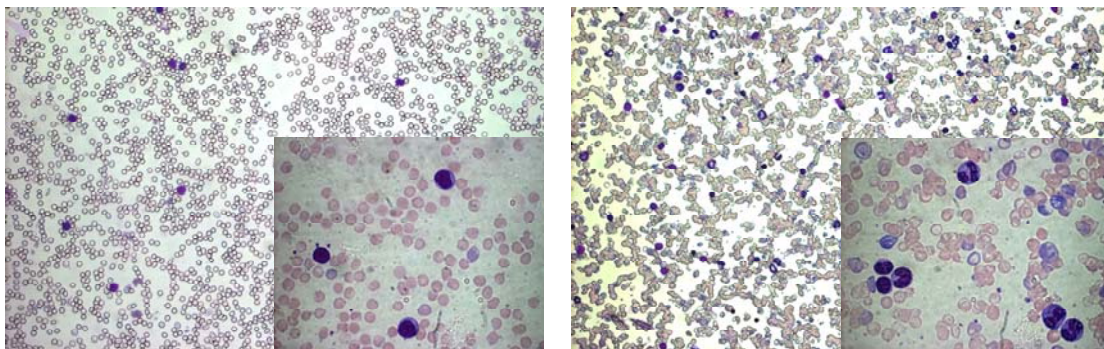


Abb. 4.6.1.4 L-gp130 induziert *in vivo* eine Leukozytose bei gleichzeitiger Thrombozytopenie

Gepoolte Ergebnisse zweier unabhängiger MIG-L-gp130-Transplantations-experimente (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation: 50 % für alle L-gp130-Gruppen; 40 % für alle wt gp130-Gruppen). **A** Tabellarische Darstellung der Blutwerte nach Erkrankung der L-gp130- und L-gp130/Cks1-exprimierenden Mäuse und der Kontrolltiere zum Zeitpunkt der Opfung sowie GFP-Status im Knochenmark und mediales Überleben. **B** Repräsentative Blutausstriche der Gruppen ohne induzierte Cks1-Expression, zum Zeitpunkt der Opfung. Kontrollgruppe (links) und L-gp130-exprimierende Gruppe (rechts). Gefärbt nach Pappenheim.

Bei erheblicher Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere (definiert anhand der Vorgaben des Tierschutzgesetzes), die durch Gewichtsverlust und Einschränkung der Beweglichkeit gekennzeichnet war, zeigte sich bei sieben von acht Versuchstieren der L-gp130-Gruppe und zehn von zwölf Mäusen der L-gp130/Cks1-Gruppe eine Leukozytose mit Zahlen zwischen $2,5 \times 10^4$ - $2,35 \times 10^5$ Zellen/ μ l Blut (Abb. 4.6.1.4 A Spalte 3 und 4, erste und dritte Zeile). Ebenfalls war eine Thrombozytopenie der L-gp130-exprimierenden Gruppe auffällig, die vom Beginn der Überwachung bis hin zur Erkrankung mit Zellzahlen unter 1×10^6 Zellen/ μ l zu beobachten war (Abb. 4.6.1.4 A Spalte 5, erste und dritte Zeile). Die Anzahl der Erythrozyten der L-gp130-exprimierenden Mäuse und auch die Blutwerte der wt gp130-exprimierenden Kontrolltiere blieben während der gesamten Zeit im Normbereich, während fünf der zwölf L-gp130/Cks1-Mäuse eine Anämie, also eine Reduktion der Erythrozyten zeigten (Abb. 4.6.1.4 A Spalte 6). Abbildung 4.6.1.4 B zeigt Blutausstriche der L-gp130-exprimierenden Versuchstiere zum Zeitpunkt der Erkrankung im Vergleich zu den Kontrollen. Gut zu erkennen ist die erhöhte Anzahl an Leukozyten (Monozyten und Granulozyten mit ihren charakteristischen unregelmäßig geformten Nuklei) bei der L-gp130-Gruppe.

Die erkrankten Versuchstiere wurden getötet, untersucht und durchflusszytometrisch vermessen. Die Kontrolltiere wurden nach Erkrankung aller L-gp130-Mäuse getötet und untersucht. Zusätzlich zu der in Abbildung 4.6.1.4 gezeigten Leukozytose war eine Splenomegalie und eine Lymphadenopathie der L-gp130-exprimierenden Mäuse festzustellen (Abb. 4.6.1.6 A). Bei der durchflusszytometrischen Zellbestimmung der hämatopoetischen Organe wurden zusätzlich zu der Markierung spezifischer Oberflächenantigenen für Granulozyten, Monozyten, B- und T-Lymphozyten auch Antikörper gegen CD138 und humanes CD2 (zweites Experiment) verwendet. Dadurch konnten bestehende Plasmazellpopulationen und die Koexpression von Cks1 bestimmt werden.

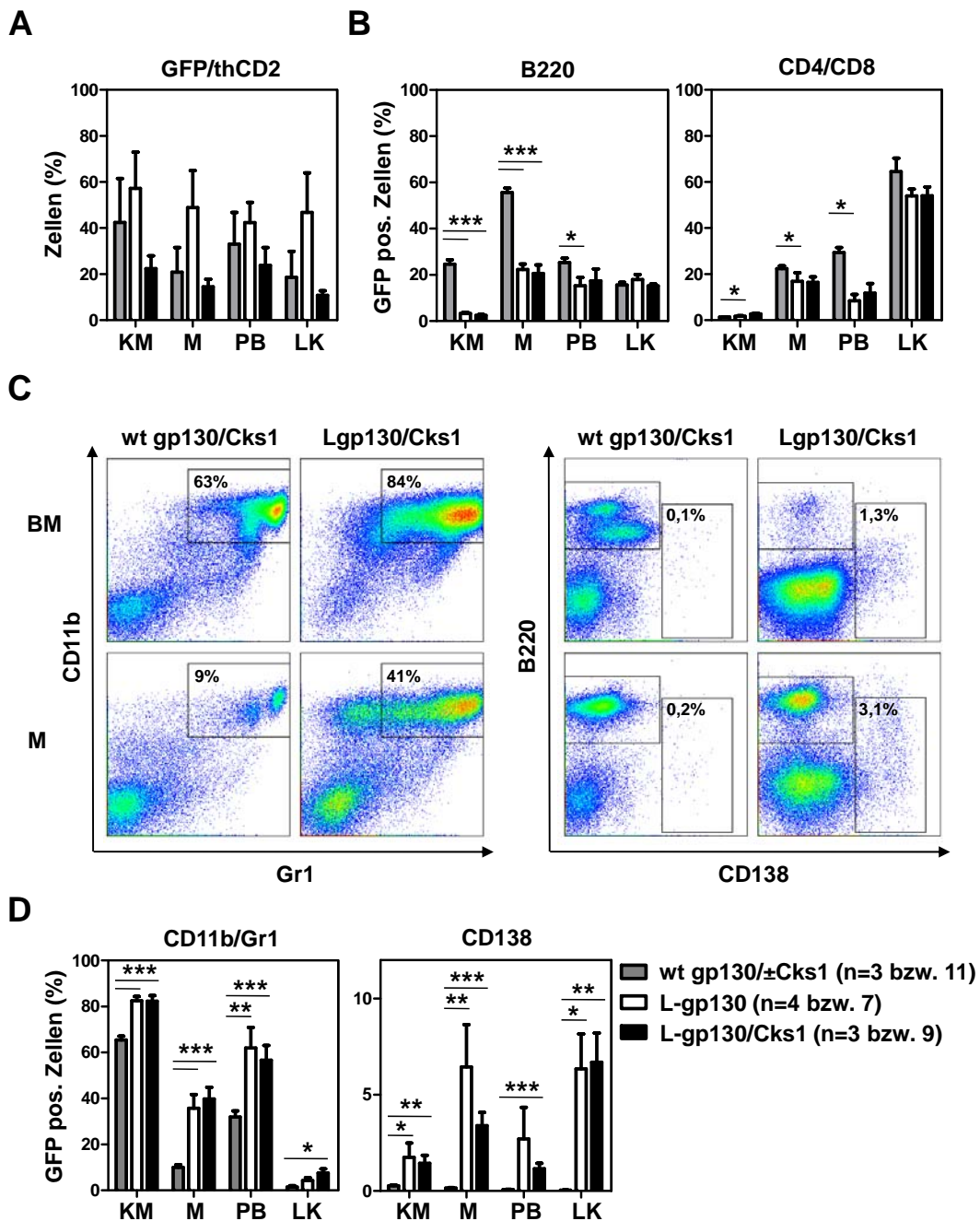


Abb. 4.6.1.5 L-gp130-Expression führt *in vivo* zu einer myeloproliferativen Erkrankung

*, ** bzw. *** zeigen p-Werte $\leq 0,05$, $\leq 0,01$ bzw. $\leq 0,001$ an. **A** Durchflusszytometrische Bestimmung der prozentuellen Anteile GFP/thCD2-doppelpositiver Zellen des MIG/MithCD2 - Transplantationsexperiments (wt gp130/±Cks1 (n=3); L-gp130 (n=4); L-gp130/Cks1 (n=3)). **B** Graphische Darstellung der Anteile durchflusszytometrisch bestimmter B- (links) und T-Lymphozyten (rechts) beider Experimente (MIR-L-gp130 und MithCD2-L-gp130). **C** Repräsentative und **D** Graphische Darstellung der myeloischen Population (links) und CD138-positiver Plasmazellanteile (rechts) der angegebenen Gruppen beider Experimente (MIR-L-gp130 und MSCV-L-gp130-thCD2). (B, C und D: wt gp130/±Cks1 (n=11); L-gp130 (n=7); L-gp130/Cks1 (n=9)).

Der Anteil transgener Zellen im Knochenmark betrug bei beiden L-gp130-exprimierenden Gruppen einen gemittelten Wert von etwa 85 %, während er bei den Kontrolltieren 64 % (wt gp130) und 74 % (wt gp130/Cks1) aufwies (Abb. 4.6.1.4 A, Spalte 8). Abbildung 4.6.1.5 A zeigt den Anteil GFP/thCD2 doppelpositiver Zellen in den Organen der Mäuse der zweiten Transplantation (Koexpression MIthCD2-Cks1). Es ist zu erkennen, dass die Koexpression von Cks1 zu keinem proliferativen Vorteil der betroffenen Zellen führt (Im Vergleich zu den wt gp130-infizierten Zellen) und sogar niedrigere Zellzahlen als L-gp130/thCD2 exprimierende Versuchstiere aufweist (Abb. 4.6.1.5 A). Die Proliferation der L-gp130/Cks1-doppelpositiven Zellen in den Blutproben des zweiten Transplantations-experiments zeigte ebenfalls keine Vorteile gegenüber dem Wachstum der L-gp130-positiven Zellen (nicht gezeigt). Abbildung 4.6.1.5 B und D zeigen die Prozentanteile der unterschiedlichen Zellpopulationen der transgenen Zellen im Knochenmark, in der Milz, im peripheren Blut und in den Lymphknoten. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass anstatt der erwarteten Vergrößerung und Differenzierung der B-Zell-Population ein Anstieg der Zahl myeloischer Zellen stattgefunden hat. Bei 19 von 20 L-gp130-exprimierenden Mäusen war diese Myeloproliferation zu beobachten. Eine Maus zeigte einen extremen Anstieg der T-Lymphozyten (dieses Tier wurde aus den gezeigten Abbildungen 4.6.1.5 B und D ausgeschlossen). Die durchflusszytometrischen Ergebnisse konnten anhand histopathologischer Untersuchungen der Organe bestätigt werden. Neben der vergrößerten Anzahl myeloischer Zellen war bei der L-gp130-infizierten Gruppe zusätzlich eine zwar kleine, aber im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant vergrößerte Plasmazellpopulation zu erkennen (Abb. 4.6.1.5 D).

Der Vergleich der Zellpopulationen sowie das mittlere Überleben der L-gp130-exprimierenden Gruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings war im Gegensatz zu der von Dechow und Götze et al. (unpublizierte Daten, Manuskript in Vorbereitung) gezeigten mittleren Lebensdauer von etwa 200 Tagen eine stark verkürzte Lebensdauer von 88 Tagen für L-gp130/Cks1- und 119 Tagen für L-gp130-exprimierende Mäuse zu beobachten. Bis zur Erkrankung des letzten L-gp130-exprimierenden Versuchstieres (Tag 187 nach Transplantation) verstarb kein Kontrolltier (Abb. 4.6.1.6 B).

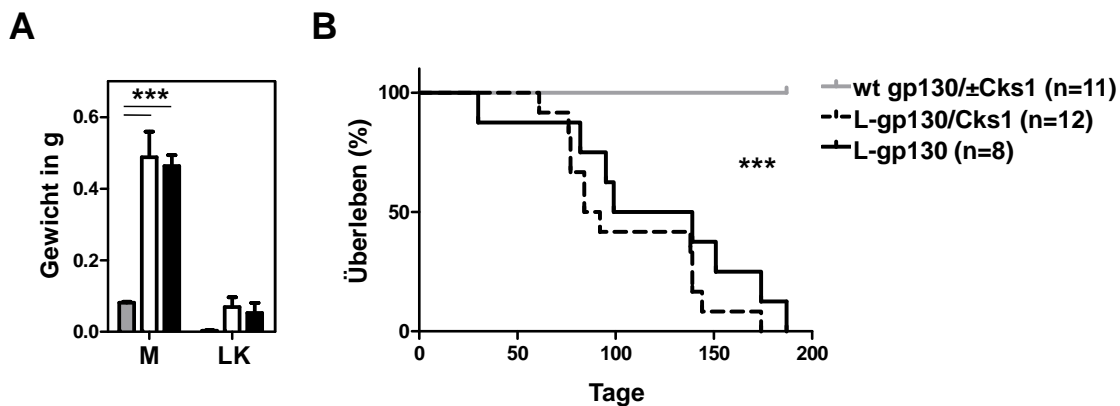


Abb. 4.6.1.6 Cks1-Überexpression führt zu keiner Veränderung der Latenzzeit einer durch L-gp130 induzierten AML

Gepoolte Ergebnisse zweier unabhängiger L-gp130-Transplantationsexperimente (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation: 50 % für alle L-gp130-Gruppen; 40 % für alle wt gp130-Gruppen). *** zeigen p-Werte $\leq 0,001$ an. **A** Graphische Darstellung des gemittelten Milzgewichts und des Gewichts beider Lymphknoten. **B** Überlebenskurve der L-gp130-transplantierten Mäuse im Vergleich mit L-gp130/Cks1-exprimierenden Mäusen und Kontrolltieren.

Die L-gp130-induzierte Zelltransformation konnte durch Infektion der pro-B-Zelllinie Ba/F3 gezeigt werden. Da L-gp130 *in vivo* zu der Entstehung einer AML führte, sollte die Transformation myeloischer Zellen *in vitro* durch Infektion der murinen, myeloischen, IL-3-abhängigen Zelllinie 32D bestätigt werden. Ebenfalls wurden L-gp130-infizierte Zellen genutzt, um Proliferationsunterschiede bei simultaner Cks1-Expression zu bestimmen. Die Zellen wurden retroviral mit beiden Vektoren infiziert und durchflusszytometrisch sortiert. Abbildung 4.6.1.7 zeigt eine Proliferationsmessung der unterschiedlich infizierten 32D-Zellen mit und ohne die Zugabe von IL-3 (gemittelte Werte aller Gruppen bei IL-3 Zugabe). Während die IL-3-stimulierten Zellen normal proliferierten, konnte zunächst eine Abnahme der Zellzahlen aller Zellen unter IL-3 Entzug beobachtet werden. Diese erholte sich in den L-gp130-infizierten Zellen ab Tag 2, sodass eine geringe Proliferation zu erkennen war, die sich ab Tag 4 signifikant von der wt gp130-infizierter Zellen unterschied. Im Gegensatz dazu und zu den Ergebnissen der Ba/F3-Zellen führte die Kultivierung L-gp130-infizierter Zellen in Methylzellulose zu keiner Koloniebildung. Diese Ergebnisse bestätigen die der Transplantationsversuche, da die zusätzliche Infektion von Cks1 auch *in vitro* zu keiner veränderten Proliferation führte, weder bei IL-3 Zugabe noch unter Entzug.

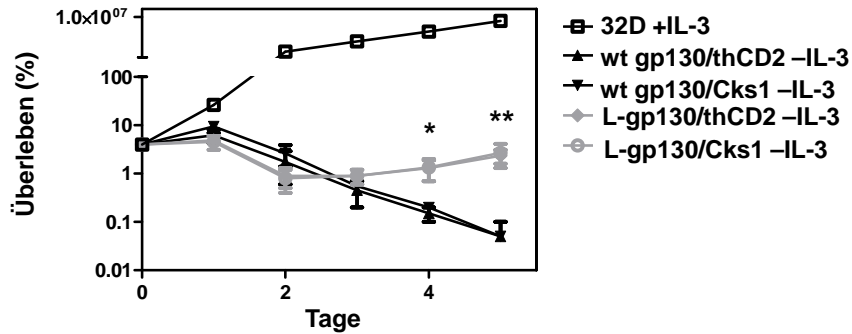


Abb. 4.6.1.7 Cks1-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Proliferationsrate L-gp130-exprimierender 32D-Zellen

Zellzählung L-gp130- und wt gp130-exprimierender, MlthCD2-Cks1- und MlthCD2-infizierter 32D-Zellen. * bzw. ** zeigen p-Werte $\leq 0,05$ bzw. $\leq 0,01$, bei Ignorierung des Cks1-Status der Gruppen unter IL-3-Zugabe an.

Vergleichende Westernblotanalysen der transgenen 32D-Zellen (Abb. 4.6.1.8) zeigten erhöhte Proteinspiegel der retroviral transduzierten Gene (*wt gp130*, *L-gp130* und *Cks1*). Ebenfalls war ein erhöhter Phosphorylierungsstatus von STAT3 durch L-gp130-Infektion zu erkennen. Die verlangsamte Proliferation der für sieben Tage gehungerten L-gp130-exprimierenden Zellen geht mit einer starken Erhöhung an p27^{Kip1}-Protein und einem extremen Abfall an c-Myc sowie vermindertem L-gp130 einher. Ebenfalls ist bei IL-3-Entzug eine signifikante Reduktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-XL und eine verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 zu beobachten. Im Gegensatz zu den primären Mausknochenmarkzellen ist keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 durch L-gp130-Expression zu erkennen. Veränderte Proteinspiegel durch die zusätzliche Überexpression von Cks1 waren in 32D-Zellen nicht zu erkennen.

Zusammenfassend führte L-gp130-Überexpression in der pro-B-Zelllinie BA/F3 zu faktorunabhängiger Proliferation und Koloniebildung in Methylzellulose. Diese Effekte waren in den myeloischen 32D-Zellen nicht zu beobachten. Die Zellen proliferierten nur in geringem Maße und waren nicht in der Lage, in Methylzellulose ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren zu überleben. Dennoch führte die Überexpression von L-gp130 in Balb/c-Mäusen, neben der von Dechow und Götze et al. (Manuskript in Vorbereitung) gezeigten Induktion eines Plasmozytoms, zu der Entstehung einer im Verlauf aggressiveren AML. Die Koexpression von Cks1 führte *in vivo* zwar zu einer zusätzlichen

Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges, konnte allerdings keine Akzeleration der Erkrankung hervorrufen.

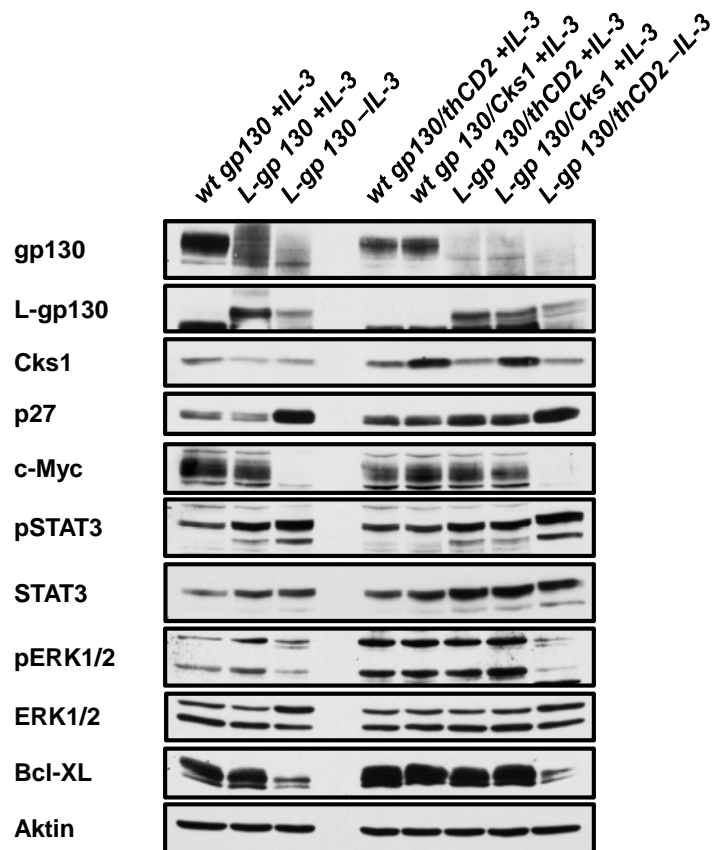


Abb. 4.6.1.8 Cks1-Überexpression zeigt *in vitro* keinen Effekt auf eine L-gp130-vermittelte STAT3-Signaltransduktion

Westernblotanalyse der angegebenen Proteine in FACS sortierten L-gp130- und L-gp130/Cks1-exprimierenden 32D-Zellen bei Zugabe von IL-3 im Vergleich zu den respektiven Kontrollen und unter IL-3-Entzug (nach 7 Tagen; nur L-gp130).

4.6.2 Effekte eines *Cks1*-Verlustes in einer L-gp130-induzierten AML

Das in Kapitel 4.5 beschriebene c-Myc-AML-Modell führte zu einer aggressiven Erkrankung mit sehr kurzen Latenzzeiten. Obwohl der Verlust von *Cks1* zu einer verminderten Wachstumsrate der Granulozyten führte, hatte dieser proliferative Defekt, anders als in E μ -*Myc*-transgenen Mäusen, keinen Effekt auf den Krankheitsverlauf. Da dies möglicherweise eine Folge des aggressiven Krankheitsverlaufes war, konnte nicht vollständig

geklärt werden, welchen Einfluss der *Cks1*-Verlust auf die Erkrankung nehmen konnte und ob auftretende Effekte auf p27^{Kip1}-Akkumulation zurückzuführen waren. Deshalb wurde die Fragestellung in dem weniger aggressiven L-gp130-Transplantationsmodell adressiert. Es wurden zwei unabhängige Transplantationsexperimente mit je fünf Versuchstieren pro Versuchsgruppe (*wt*, *Cks1*^{-/-}, *p27*^{Kip1}^{-/-}, *Cks1*^{-/-};*p27*^{Kip1}^{-/-}) durchgeführt. Die Infektionseffizienzen lagen dabei bei 50-60 % und es wurden 2×10^5 transgene Zellen in die myeloablativ bestrahlten wildtypischen C57BL/6-Empfänger injiziert. 35 Tage nach der Transplantation zeigte sich für alle Gruppen eine Rekonstitution L-gp130-infizierter Zellen von 60-70 %. Laufende Blutuntersuchungen waren für dieses Experiment nicht möglich, da durch auferlegte Quarantäne des Mausbereichs kein biologisch aktives Material aus den Räumlichkeiten gebracht werden durfte. Von den Mäusen, bei denen eine finale Blutanalyse durchgeführt werden konnte, zeigten 10 von 19 Versuchstieren eine Leukozytose mit Werten von $2,26 \times 10^4$ bis $1,10 \times 10^5$ Zellen/ μ l Blut. Die Werte der Kontrolltiere lagen bei $3,79 \times 10^3$ bis $1,46 \times 10^4$ Zellen/ μ l Blut. Außerdem zeigten fünf weitere L-gp130-exprimierende Mäuse erhöhte Zellwerte bei ihrer zuletzt durchgeführten Blutuntersuchung. Alle Versuchstiere hatten entsprechend der Balb/c-Mäuse verringerte Thrombozytenzahlen gegenüber den Kontrollen. Zusätzlich zeigten jedoch 16 der 19 Mäuse eine Anämie mit Werten von $0,44 - 6,52 \times 10^6$ Erythrozyten/ μ l (Kontrollen $7,12 - 9,55 \times 10^6$ Erythrozyten/ μ l). Die Abbildung 4.6.2.1 zeigt Blutausstriche einer transgenen *wt*/L-gp130-Maus (rechts) gegenüber einem wildtypischen Kontrolltier (links). Die erhöhte Anzahl an Leukozyten ist im Vergleich gut zu erkennen.

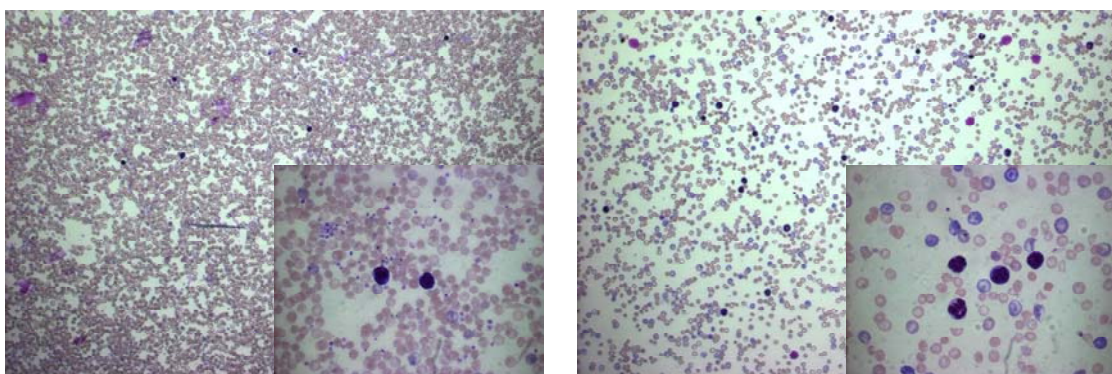


Abb. 4.6.2.1 Konstitutive gp130-Aktivierung kann in C57Bl/6-Mäusen Leukozytosen hervorrufen

Repräsentative Blutausstriche eines Kontrolltiers (links) im Vergleich mit einem L-gp130-überexprimierenden Tier (rechts) aus der wildtypischen Gruppe.

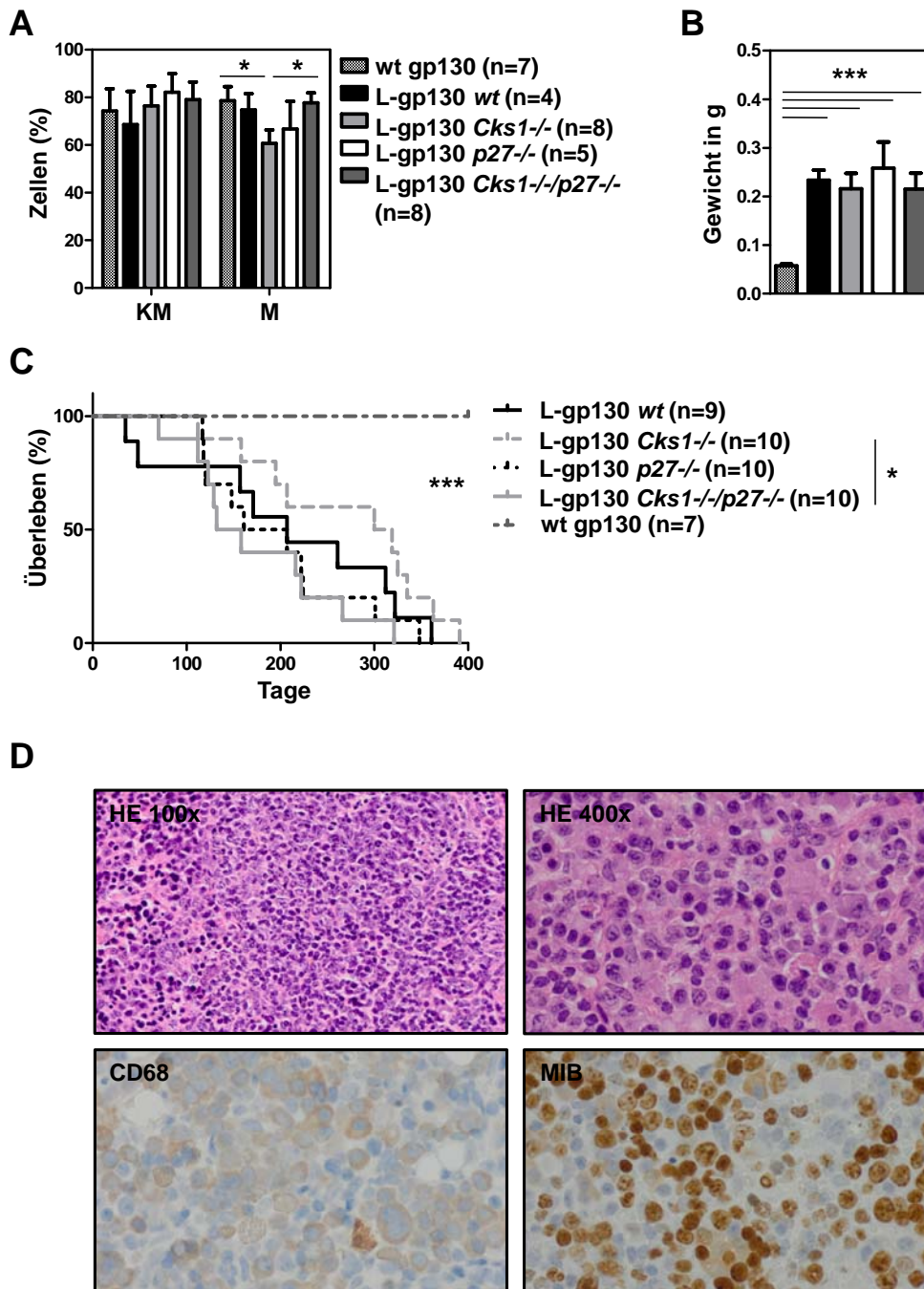


Abb. 4.6.2.2 *Cks1*-Verlust kann in einer L-gp130-induzierten Erkrankung durch simultanen *p27^{Kip1}*-Verlust ausgeglichen werden

Auswertung zweier Transplantationsexperimente L-gp130- und wt gp130-infizierter Zellen der Genotypen *wt*, *Cks1*^{-/-}, *p27^{Kip1}*^{-/-}, *Cks1*^{-/-};*p27^{Kip1}*^{-/-} (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation: 50 - 60 %). * bzw. *** zeigen p-Werte ≤ 0,05, bzw. ≤ 0,001 an. **A** Durchflusszytometrische Bestimmung CD45/GFP-positiver Zellen in Knochenmark und Milz. **B** Durchschnittliches Milzgewicht der angegebenen Gruppen. **C** Überlebenskurven der transplantierten Mäuse. **D** Histologische Milzschnitte aus der *Cks1*^{-/-};*p27^{Kip1}*^{-/-}-Gruppe. HE-Färbung in 100x und 400x Vergrößerung. CD68-Färbung in 400x Vergrößerung. MIB-1-Färbung in 400x Vergrößerung.

Bei Erkrankung der Versuchstiere wurde wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben vorgegangen. Im Folgenden wurden die Kontrolltiere, die innerhalb der Lebenszeit der L-gp130-exprimierenden Mäuse erkrankten, aus den Auswertungen ausgeschlossen (die Histologie zeigte keine Infiltration der Milz). Abbildung 4.6.2.2 A zeigt den Anteil an transgenen Zellen im Knochenmark und in der Milz. Wie bei den Balb/c-Mäusen zeigte sich in allen L-gp130-Gruppen eine Splenomegalie (Abb. 4.6.2.2 B). Ebenfalls verzeichneten die durchflusszytometrischen Zellbestimmungen eine für fast alle Gruppen signifikante Vergrößerung der Monozyten- und Granulozytenpopulation, wodurch ein extremer Abfall der B-Zellen auftrat (Abb. 4.6.2.3 B). Lediglich die Mäuse der $p27^{Kip1^{-/-}}$ -Gruppe konnten im Knochenmark und in der Milz keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren erlangen, dafür erreichte die myeloische Population im Blut eine weit höhere Signifikanz als die der anderen Gruppen (nicht gezeigt). Für diese Vergleiche wurde aus der *wt*, $p27^{Kip1^{-/-}}$ und $Cks1^{-/-};p27^{Kip1^{-/-}}$ Gruppe je ein Tier ausgeschlossen, das anstatt einer myeloischen Überproliferation Anzeichen einer T-Zell-Erkrankung zeigte. Die T-Zellzahlen der restlichen Mäuse unterschieden sich nicht von denen der Kontrollen (nicht gezeigt). Die Plasmazellpopulationen der L-gp130-exprimierenden Mäuse zeigten im Vergleich zu den Kontrollen wie beim Balb/c-Modell erhöhte Werte, die jedoch durch die Inhomogenität der L-gp130-Gruppe nur selten Signifikanz erreichten (Abb. 4.6.2.3 B). Die durchflusszytometrischen Werte wurden wie bei den Balb/c-Mäusen durch die Histologie bestätigt (Abb.4.6.2.2 D).

Unterschiede zwischen den L-gp130-exprimierenden Gruppen zeigten sich hauptsächlich in der medialen Lebenszeit der Versuchstiere (Abb. 4.6.2.2 C). Obwohl die Überlebenskurven keine extremen Abweichungen zeigten, gab es doch signifikante Veränderungen. Das niedrigste mediale Überleben hatte die $Cks1^{-/-};p27^{Kip1^{-/-}}$ -Gruppe mit 145 Tagen gefolgt von der $p27^{Kip1^{-/-}}$ -Gruppe mit 184 Tagen. Die Krankheitsverläufe der Tiere der $Cks1^{-/-};p27^{Kip1^{-/-}}$ -Gruppe unterschieden sich signifikant von denen der $Cks1^{-/-}$ Gruppe mit einem Mittelwert von 309,5 Tagen. Die $p27^{Kip1^{-/-}}$ - Gruppe zeigte trotz eines ähnlichen, jedoch leicht verzögerten Verlaufs keine Signifikanz (Anmerkung: bei Ausschluss der ersten erkrankten $Cks1^{-/-}$ Maus am Tag 112 entstand ein signifikanter Unterschied $p=0,049$). Die Gruppe der wildtypischen Transplantate lag mit 207 Tagen medialer Lebenszeit zwischen denen der anderen Gruppen, zeigte allerdings gegenüber keiner der Gruppen Signifikanz.

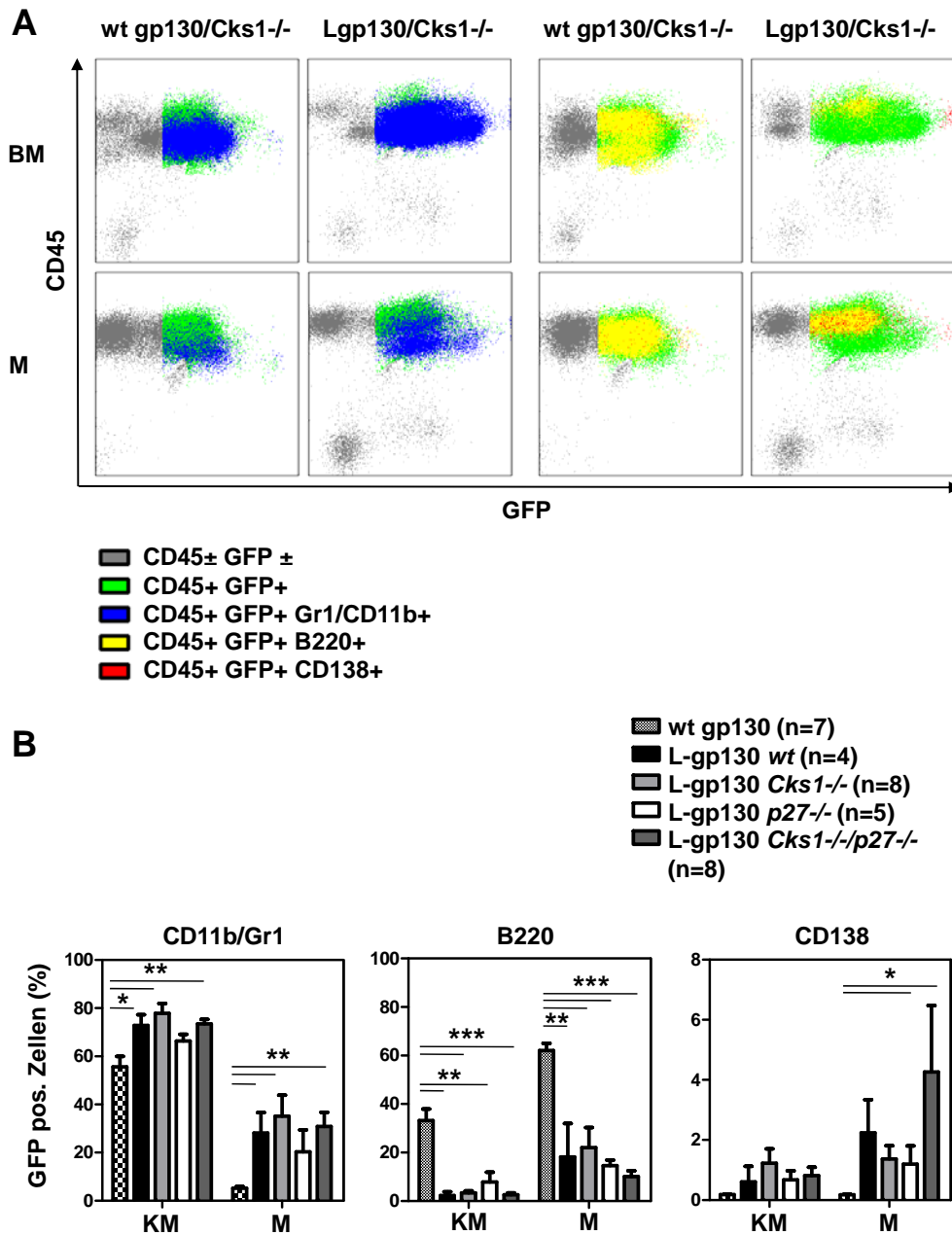


Abb. 4.6.2.3 L-gp130-Expression in *Cks1*^{-/-} und *p27^{Kip1}*-defizienten Transplantaten induziert eine AML ohne Unterschiede im Disseminationsverhalten hervorzurufen

Auswertung zweier Transplantationsexperimente L-gp130- und wt gp130-infizierter Zellen der Genotypen *wt*, *Cks1*^{-/-}, *p27^{Kip1}*^{-/-}, *Cks1*^{-/-}; *p27^{Kip1}*^{-/-} (Infektionsrate GFP+ Zellen bei der Transplantation: 50 - 60 %). *, ** bzw. *** zeigen p-Werte ≤ 0,05, ≤ 0,01 bzw. ≤ 0,001 an. **A** Repräsentative und **B** Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Untersuchungen des Knochenmarks und der Milz erkrankter L-gp130-infizierter Mäuse im Vergleich untereinander und zu gesunden, wt gp130-exprimierenden Kontrolltieren (B: CD11b/Gr1-positive Zellen (links), B-Lymphozyten (Mitte) und CD138-positive Plasmazellen (rechts)).

Weitere Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten sich in einem Unterschied der *Cks1*^{-/-}-Mäuse im Gehalt transgener Zellen verglichen zur *Cks1*^{-/-}; *p27^{Kip1}*^{-/-}-Gruppe. Diese

Abweichung trat allerdings nur in der Milz auf. Im Knochenmark, Blut und in den Lymphknoten waren die Werte vergleichbar.

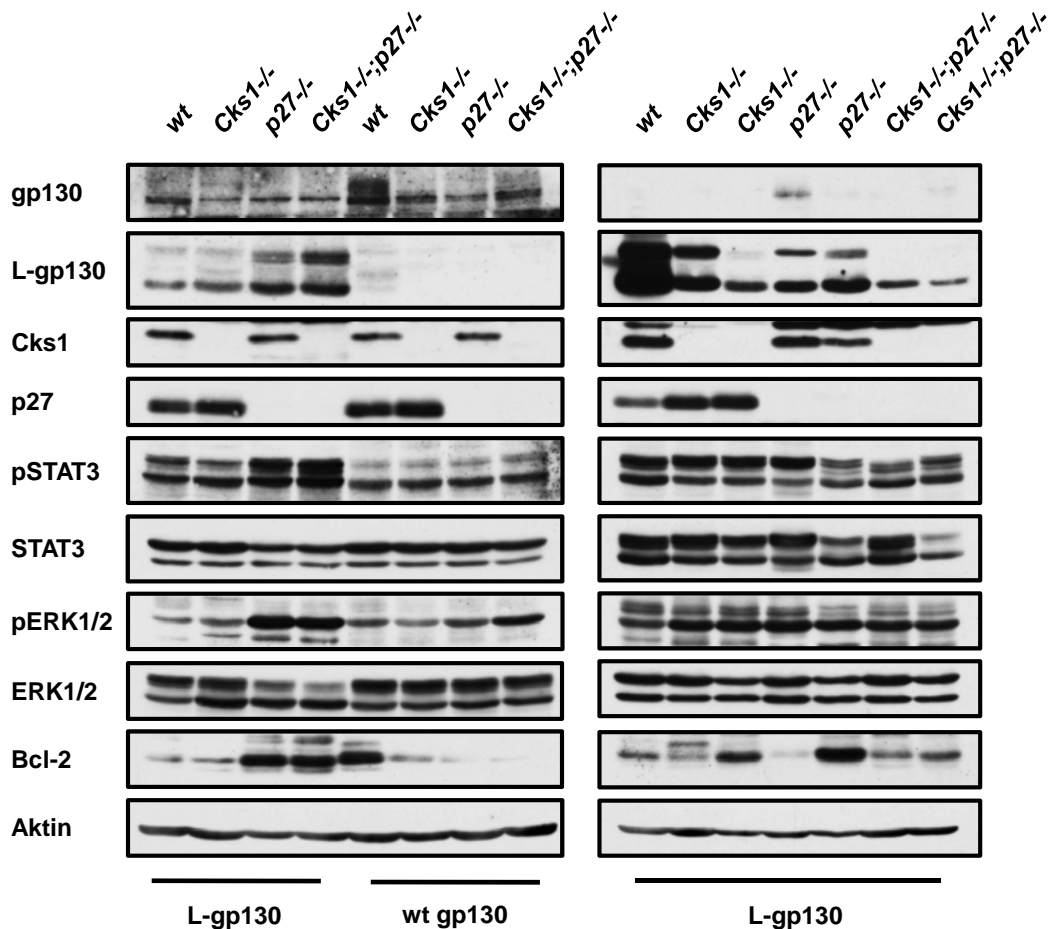


Abb. 4.6.2.4 L-gp130-induzierte Signaltransduktion ist unabhängig von Cks1 und p27^{Kip1} in C57BL/6-Mäusen

Westernblotanalyse der angegebenen Proteine im Knochenmark moribunder L-gp130- und wt gp130-infizierter Versuchstiere der Genotypen wt, Cks1^{-/-}, p27^{Kip1}^{-/-} und Cks1^{-/-};p27^{Kip1}^{-/-}.

Auf Proteinebene konnten außer der durch den Verlust von Cks1 beobachteten Akkumulation von p27^{Kip1} keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb.4.6.2.4). Obwohl die Überexpression von Cks1 zu einer zusätzlichen Aktivierung von STAT3 führte, zeigte der Verlust keinerlei Beeinträchtigung des Phosphorylierungsstatus. Erneut zeigte sich eine L-gp130-vermittelte Aktivierung von STAT3, jedoch nur eine inhomogene Aktivierung von ERK1/2. Ebenfalls blieb die bei den Balb/c-Mäusen beobachtete L-gp130-vermittelte Induktion der Cks1-Proteinelevel sowie die Akkumulati-

on von $p27^{Kip1}$ aus. Auch die Bcl-2-Level zeigten lediglich inhomogene Erhöhungen durch das konstitutiv aktive Protein und gingen nicht mit den Intensitäten der L-gp130-Level einher.

Insgesamt führte der Verlust von *Cks1* in der L-gp130-induzierten Erkrankung zu einer gemäßigten Krankheitsverzögerung, die sich von der $p27^{Kip1}$ -defizienter Mäuse unterschied, aber keine Signifikanz erreichte. Interessanterweise führte der simultane Verlust von *Cks1* und $p27^{Kip1}$ im Vergleich zu *Cks1*-defizienten Versuchstieren zu einer signifikant verkürzten Induktionszeit. Neben den veränderten Latenzzeiten zeigten sich keine bemerkenswerten Unterschiede im Krankheitsverlauf der Gruppen.

5 Diskussion

Das Zellzyklusprotein Cks1 konnte in diversen Tumorerkrankungen dereguliert nachgewiesen werden und wird als ein potentieller onkogener Faktor bei der Tumorgenese diskutiert (Masuda et al., 2003; Inui et al., 2003; Kitajima et al., 2004; Shapira et al., 2004; Slotky et al., 2005; Shaughnessy, 2005; Shapira et al., 2005, 2006; Zhan et al., 2007; Chang et al., 2010). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob Cks1 bei der Krankheitsentstehung sowie dem Krankheitsverlauf maligner Tumoren eine Rolle spielt und untersucht mögliche SCF^{Skp2}-unabhängige Effekte auf die Pathogenese.

5.1 *Cks1*-Verlust verringert Proliferation und induziert Apoptose *in vitro*

Keller et al. (2007) konnten zeigen, dass der Verlust von *Cks1* in primären, präkanzerösen E μ -*Myc*-B-Lymphozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Anwesenheit unterstützender Stromazellen zu einer verlangsamten Zellproliferation führt. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die verlangsamte Proliferation der B-Lymphozyten auch nach der Lymphomagenese vorhält (Kapitel 4.2). Insbesondere zeigte sich, im Gegensatz zu den Ergebnissen in präkanzerösen stromaabhängigen B-Zellen (Keller et al., 2007), dass der Verlust von *Cks1* zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate Stroma-deprivierter Lymphomzellen führt (Kapitel 4.2). Diese Beobachtung geht mit den Ergebnissen einher, dass reduzierte Cks1-Level in Brustkrebszellen in einer gesteigerten Caspase 3-Aktivität und einer erhöhten Apoptoserate resultieren (Wang et al., 2009), während

Cks1-*Knockdown* beim Ösophaguskarzinom eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber Bestrahlung induziert (Wang et al., 2012).

Mögliche Erklärungen für die gesteigerte apoptotische Aktivität *Cks1*-defizienter Zellen können in einer Vielzahl extrinsischer und intrinsischer Signalwege zu finden sein. Westbrook et al. (2007) demonstrierten, dass Cks1 die Expression der Zellzyklus-abhängigen Kinase CDK1 reguliert. Cks1-Defizienz könnte demnach zum Ausfall der antiapoptischen Funktion dieser Kinase führen (Ongkeko et al., 1995; Itzhaki et al., 1997; Matthes et al., 2010) und die Lymphomzellen so anfälliger für extrinsische proapoptische Signale machen. Auch könnte der Verlust von Cks1 eine Reduktion der Überlebenssignale über den MAPK/ERK-Signalweg auslösen und so Apoptose ermöglichen (Wang et al., 2009). Des Weiteren ist die Rolle der Cks-Proteine bei der Replikation des mitochondrialen Genoms zu beachten, die die Interaktion mit dem *mitochondrial single stranded DNA binding protein* (mtSSB) betrifft. Es wurde gezeigt, dass der Verlust der Cks-Proteine in den Mitochondrien von MEFs zu fehlerhafter Replikation und somit zu unvollständiger DNA und Fragmentierung der Organellen führt (Radulovic et al., 2010). Obwohl die Fragmentierung von Mitochondrien mit der Ausschüttung von Zytocrom C und anschließender Apoptose in Verbindung gebracht wird (Suen et al., 2008), beobachteten Radulovic et al. (2010) keine Zunahme apoptotischer Aktivität. Martinsson-Ahlzén et al. (2008) konnten in MEFs ebenfalls keine gesteigerte Apoptoserate feststellen, zeigten aber, dass der Verlust der Cks-Proteine in HeLa-Zellen zu Apoptose führt. Die höhere Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen ist möglicherweise durch die Akkumulation somatischer Mutationen in der mitochondrialen DNA neoplastischer Zellen zu erklären (Chinnery et al., 2002; Shadel, 2008). Die durch den Verlust der Cks-Proteine ausgelöste, zusätzliche Destabilisierung des mitochondrialen Genoms könnte somit schließlich zu Apoptose führen. Ob replikative Defekte auch bei alleinigem *Cks1*-Verlust auftreten, wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Allerdings zeigten Tsai et al. (2005), dass Cks1-überexprimierende Lungenkarzinomzellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cks1-Verlust aufweisen. Hier führte der Verlust zu Apoptose, während er keine verstärkte apoptotische Aktivität in gesunden Lungenfibroblasten auslösen konnte. Die gesteigerte Apoptoserate der in dieser Arbeit untersuchten *Cks1*-defizienten Lymphomzellen gegenüber prämaligen B-Lymphozyten könnte den genannten Hinweisen zufolge durch zusätzliche, in der Zelle auftretende Mutationen erklärt werden.

Neben SCF^{Skp2}-unabhängigen Mechanismen bei der Apoptoseinduktion ist zusätzlich eine Proteolyse-abhängige Rolle zu diskutieren. So wurde neben diversen antiapoptischen Eigenschaften der CDK-Inhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} (Jung et al., 2010; Starostina und Kipreos, 2012; Coqueret, 2003; Liang et al., 2007) auch über proapoptische Funktionen berichtet. Im Falle von p21^{Cip1} gehen diese häufig mit Mutationen des Tumorsuppressors p53 einher (Gartel und Tyner, 2002; Jung et al., 2010), die allerdings bei Eμ-*Myc*; *Cks1*^{-/-}-Lymphomen keine Auffälligkeit gegenüber wildtypischen Eμ-*Myc*-Lymphomen gezeigt haben (Keller et al., 2007). Ebenfalls scheint p21^{Cip1}, anders als p27^{Kip1}, keinen Einfluss auf die c-Myc-vermittelte Lymphomagenese zu haben (Martins und Berns, 2002). Im Gegensatz dazu sind p27^{Kip1}-abhängige Effekte auf die apoptotischen Signalwege *Cks1*-defizienter Zellen naheliegend, da SCF^{Skp2} am G1/S-Übergang hauptsächlich für dessen Ubiquitylierung verantwortlich ist (Nakayama et al., 2004; Kossatz et al., 2004). Hemmung der SCF^{Skp2}-Ubiquitinligase führt in neoplastischen Zellen zu G1/S-Arrest und induziert dadurch Caspase-unabhängige Apoptose (Chen et al., 2008). Ebenfalls löst ein hohes p27^{Kip1}-Level in proliferierenden Zellen Apoptose aus (Wang et al., 1997; Katayose et al., 1997; Dijkers et al., 2000), während ein niedriger Proteinspiegel in Krebszellen mit geringem Zellsterben korreliert (Ohtani et al., 1999; Masuda et al., 2002; Eguchi et al., 2004). Des Weiteren induziert die Reduktion von c-Myc in Melanomzellen einen Anstieg des p27^{Kip1}-Levels und Apoptose (D'Agnano et al., 2001). Dagegen spricht für eine Cks1-vermittelte Apoptose, dass der Verlust von Cks1, aber nicht der daraus resultierende Anstieg von p27^{Kip1}, in Myelomzellen zu verminderter Proliferation und zu Apoptose führt (Zhan et al., 2007). Ebenfalls kann die direkte Überexpression von p27^{Kip1} Autophagozytose in neoplastischen Zellen induzieren und wirkt so antiapoptotisch (Komata et al., 2003; Liang et al., 2007). Dieser Mechanismus geht jedoch mit einem nukleären Export des Proteins einher (Fujita et al., 2003), der in c-Myc-induzierten Erkrankungen (Serres et al., 2011), im Gegensatz zu Ras- (Besson et al., 2006) und Akt-induzierten Neoplasmen (Viglietto et al., 2002; Motti et al., 2004), nicht stattfindet.

Neben der gesteigerten Apoptoserate *Cks1*-defizienter Tumorzellen wurde in diversen Studien beobachtet, dass der Verlust von Cks1 eine höhere Abhängigkeit der betroffenen Zellen von unterstützenden Stromazellen induziert. So führt die Reduktion von Cks1 in Myelomzelllinien zu Apoptose, die jedoch durch die Zugabe von Osteoklasten unterdrückt wird (Zhan et al., 2007). Dies weist auf eine verminderte Abhängigkeit Cks1-expri-

mierender Tumorzellen von Überlebenssignalen aus der Mikroumgebung hin (Levens et al., 2000; Kay et al., 2007; Lwin et al., 2007; Mraz et al., 2011; Cacciatore et al., 2012). Möglicherweise können interne, durch den Verlust von *Cks1* ausgelöste, proapoptotische Signale durch stromaabhängige antiapoptotische Signale ausgeglichen werden. Diese *Cks1*-vermittelte Unabhängigkeit von der Mikroumgebung könnte eine mögliche Erklärung für das erhöhte Migrationsverhalten *Cks1*-überexprimierender Zellen (Lan et al., 2008; Wang et al., 2009, 2012), beziehungsweise die verminderte Dissemination *Cks1*-defizienter Lymphozyten sein (Keller et al., 2007). $p27^{Kip1}$ -Überexpression wurde ebenfalls mit der verminderten Migration neoplastischer Zellen in Verbindung gebracht (Supriatno et al., 2003). Im Gegensatz dazu führt die zytoplasmatische Lokalisation von $p21^{Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ zu gesteigerter Zellmigration durch Hemmung des RhoA-ROCK-LIMK-cofilin-Signalweges (Starostina und Kipreos, 2012), der allerdings keine Rolle bei der Dissemination hämatopoetischer Zellen spielt (Pals et al., 2007).

Ob die hier beobachtete Anfälligkeit *Cks1*-defizienter Zellen auf interne, $p27^{Kip1}$ -unabhängige, proapoptotische Signale zurückzuführen ist, oder ob die beobachteten Effekte aufgrund des veränderten $p27^{Kip1}$ -Gehalts als Folge der *Cks1*-Defizienz entstehen, könnte der Verlust beider Proteine im $E\mu$ -*Myc*-Modell klären. Ebenfalls könnte die verminderte Motilität *Cks1*-defizienter Zellen genauer untersucht werden. Wesentliche Bemühungen dieses Mausmodell in allen Genotypen zu etablieren, scheiterten während dieser Arbeit an der hohen Letalität und der verminderten Fertilität der $p27^{Kip1}$ - und *Cks1*^{-/-}; $p27^{Kip1}$ -heterozygoten beziehungsweise -defizienten Mäusen und den daraus resultierenden geringen Nachkommenszahlen der transgenen *Knockout*-Tiere. Eine zukünftige Studie mit einer größeren Population wäre ein wichtiger Schritt um den Einfluss von $p27^{Kip1}$ im Vergleich zu *Cks1* zu bestimmen.

5.2 *Cks1*-defiziente Mäuse zeigen eine vergrößerte B1-Zellpopulation

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL oder auch B-Zell-CLL, B-CLL) ist die einzige hämatopoetische Tumorerkrankung, bei der keine charakteristische chromosomale Translokation für die Krebsentstehung verantwortlich ist. Vielmehr entstehen zahlreiche chromosomale Aberrationen durch genomische Instabilität (Salin et al., 2009), die in

ihrer Folge zu der im klinischen Verlauf sehr heterogenen Erkrankung führen. Charakteristisch für CLL ist die sukzessive Akkumulation CD5-positiver B-Zellen (Boumsell et al., 1978; Keating, 1999; Bannerji und Byrd, 2000). Das Oberflächenantigen CD5 ist ein Pan-T-Zellmarker, der jedoch auch von humanen B-Lymphozyten unterschiedlicher Entwicklungs- und Aktivierungsstufen exprimiert wird (Dalloul, 2009). In Mäusen wird CD5 ausschließlich auf B1-Zellen (B1a-Zellen) exprimiert. Diese werden vornehmlich während der Embryogenese in der fötalen Leber und im neonatalen Knochenmark gebildet und sind bei adulten Mäusen in der Milz (weniger als 5 %), aber vor allem im Peritoneum vorzufinden (Berland und Wortis, 2002). Humane B1-Zellen wurden erst kürzlich von Griffin et al. (2011) identifiziert. Sie sind wie murine B1-Zellen hauptsächlich CD5-positiv und werden als ein potentieller Ursprung von CLL betrachtet und untersucht (Boumsell et al., 1978; Griffin et al., 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten B-Zell-Differenzierungsanalysen *Cks1*-defizienter Mäuse konnten keine Unterschiede der B-Zell-Populationen der *Knock-out*-Tiere gegenüber wildtypischen Tieren erbringen. Jedoch zeigte sich eine signifikant erhöhte Zahl der B1-Zellen in Milz und Peritoneum (Kapitel 4.4). B1-Zellen als ein potentieller Ursprung von CLL wurden bisher nicht im Bezug auf *Cks1*-Expression untersucht. Erhöhte $p27^{Kip1}$ -Level konnten jedoch in Lymphozyten akuter und intermediärer CLL-Erkrankungen mit einer beschleunigten Proliferation und einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten in Verbindung gebracht werden (Vrhovac et al., 1998; Wolowiec et al., 2009; Winkler et al., 2010). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu vielen Erkrankungen, bei denen der Verlust von $p27^{Kip1}$ die Überlebenswahrscheinlichkeit verringert (Slingerland und Pagano, 2000; Chu et al., 2008). Der Unterschied dabei ist allerdings vornehmlich in der Natur der Erkrankung zu suchen. Während es sich beispielsweise beim Burkitt-Lymphom um eine hoch proliferative Erkrankung handelt (Wright, 1999; Carbone et al., 2008), wird CLL durch die Akkumulation ruhender Lymphozyten und eine defekte Apoptose charakterisiert (Kitada et al., 1998; Caligaris-Cappio, 2000; Cimmino et al., 2005). *In vitro* führt ein hohes $p27^{Kip1}$ -Level in CLL-Zellen zu einer verminderten apoptotischen Aktivität (Vrhovac et al., 1998) und verhindern den Eintritt der Zelle in die S-Phase (Dehner, 1995; Wołowiec et al., 1995; Plate et al., 2000). Die antiapoptotische Wirkung von $p27^{Kip1}$ -Überexpression wurden ebenfalls in anderen nicht-proliferierenden Systemen festgestellt (Dimanche-Boitrel et al., 1998; Masuda et al., 2001). Des Weiteren führt

p27^{Kip1}-Verlust in E2A-siRNA- oder Fludarabin-behandelten CLL-Zellen zu einer gesteigerten Apoptoserate (Kardava et al., 2011; Sanhes et al., 2003).

Demzufolge ist möglicherweise der Anstieg des p27^{Kip1}-Proteinspiegels *Cks1*-defizienter Mäuse auf die hier gezeigte, vergrößerte B1-Zell-Population zurückzuführen. Bisher wurde keine verstärkte CLL-Bildung bei *Cks1*^{-/-}-Mäusen festgestellt. Da CLL-Entstehung aufgrund der Heterogenität der Tumorzellen allerdings als ein mehrstufiger Prozess diskutiert wird (Sieklicka et al., 2008), wäre es interessant, die Empfindlichkeit dieser *Knockout*-Tiere gegenüber onkogenen CLL-induzierenden Faktoren, wie zum Beispiel *Tcl1* (*T cell leukemia/lymphoma 1*), zu untersuchen (Pekarsky et al., 2005; Herling et al., 2006). E μ -*Tcl1*-Mäuse exprimieren das Onkogen unter der Kontrolle des E μ -Enhancers und beschränken so die transgene Expression auf das B-Zell-Kompartiment (Shaw et al., 1999). Diese Tiere entwickeln nach 13-18 Monaten eine Erkrankung, die der humanen CLL entspricht (Bichi et al., 2002). Die Kreuzung der *Cks1*^{-/-}-Mäuse mit E μ -*Tcl1*-Mäusen könnte daher weiteren Aufschluss über die Rolle von Cks1 und p27^{Kip1} und ihren Effekt auf die Tumorentstehung erbringen. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant, die B1-Zell-Populationen der p27^{Kip1}^{-/-}- und *Cks1*^{-/-};p27^{Kip1}^{-/-}-Mäuse zu messen und E μ -*Tcl1*-Kreuzungen dieser Genotypen im Vergleich zu den E μ -*Tcl1*;*Cks1*^{-/-}-Tieren zu untersuchen.

5.3 Cks1-Überexpression induziert keine Erkrankung hämatopoetischer Zellen

Die Rolle von Cks1 bei der Tumorgenese ist bisher noch nicht geklärt. Ungewöhnlich hohe Cks1-Proteinspiegel treten bei verschiedenen Tumorerkrankungen auf und stellen einen negativen prognostischen Faktor dar (Masuda et al., 2003; Inui et al., 2003; Kitajima et al., 2004; Shapira et al., 2004; Slotky et al., 2005; Shaughnessy, 2005; Shapira et al., 2005, 2006; Zhan et al., 2007; Chang et al., 2010). Neben gesteigerter Cks1-Expression wurde bei vielen Erkrankungen auch die Überexpression des F-Box-Proteins Skp2 beobachtet (Shapira et al., 2005, 2006). Die Level beider Proteine korrelieren in den meisten Fällen miteinander und auf umgekehrte Weise mit dem Level von p27^{Kip1} (Shapira et al., 2005). Murine *Knockout*-Modelle beider Proteine akkumulieren p27^{Kip1} (Spruck et al.,

2001; Nakayama et al., 2000), jedoch führt in $E\mu$ -*Myc*-Mäusen ausschließlich der Verlust von Cks1 zu einer signifikant verzögerten Lymphomagenese (Keller et al., 2007; Old et al., 2010). Somit scheint Cks1 eine entscheidendere Rolle als Skp2 bei der c-Myc-induzierten Erkrankung zuzukommen, die außerhalb seiner SCF^{Skp2}-bezogenen Aufgabe liegt.

Aufgrund des Nachweises, dass gesteigerte Transkription von *Cks1* in diversen hochproliferativen B-Zell-Erkrankungen auftritt (Kapitel 4.1) und den oben genannten bisher bekannten Forschungsergebnissen, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage, ob alleinige Überexpression von Cks1 in B-Zellen zu Lymphomagenese führen kann. In CD19Cre-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Cks1 ab dem prä-B-Zell-Stadium keine erhöhte Proliferation, veränderte B-Zell-Aktivierung oder -Differenzierung hervorruft (Kapitel 4.4). Ebenfalls unterlagen die Mäuse Folgen der Bestrahlung ohne dabei Anzeichen einer durch Cks1 induzierten Erkrankung aufzuweisen (Kapitel 4.3.2). Die B-Zell-Entwicklung vor dem prä-B-Zell-Stadium und die potentiellen onkogenen Eigenschaften des Cks1-Proteins im gesamten hämatopoetischen System wurden in einem Modell konstitutiver Cks1-Expression untersucht (Kapitel 4.3.3). Es zeigte sich eine vergrößerte Population myeloischer Zellen im Knochenmark und in der Milz Cks1-überexprimierender Mäuse. Die Analysen der Versuchstiere wurden zu einem Zeitpunkt durchgeführt, an dem sie bereits wegen fortgeschrittener strahleninduzierter Schäden getötet werden mussten. Frühzeitige Analysen transgener Versuchstiere der Cks1-Gruppe und deren Überwachung mittels Blutanalysen konnten keine myeloproliferativen Tendenzen zeigen. Ebenfalls deuten Infiltrationen myeloischer Zellen in den Milzen der Versuchstiere beider Gruppen auf erhöhte Zellzahlen als Folge der Bestrahlung hin (Fry, 1981; Duran-Struuck und Dysko, 2009). Ein Grund für den hohen Anteil myeloischer Zellen könnte in einer verminderten Apoptoserate zu finden sein, wie sie in Cks1-überexprimierenden Mammakarzinomzellen beobachtet wurde (Wang et al., 2009). Da die Zellen des myeloischen Kompartiments die höchste Cks1-Expression zeigten und da auch Versuchstiere der Cks1-Gruppe mit einem niedrigen Anteil transgener Zellen in Knochenmark und Milz hohe Prozentanteile transgener myeloischer Zellen aufwiesen (Kapitel 4.3.3), könnte eine gesteigerte Überlebensrate der Cks1-überexprimierenden Zellpopulation der Grund für den relativ hohen Anteil myeloischer Zellen sein (Kapitel 4.3.3).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass B-Zell-spezifische und ubiquitäre hämatopoetische Cks1-Überexpression trotz der ausgeprägteren Effekte eines *Cks1*-Verlustes im murinen E μ -*Myc*-Modell keine Symptome einer hämatopoetischen Erkrankung beziehungsweise keine Veränderung in den untersuchten zellulären Signalwegen induziert (Kapitel 4.3.2, 4.3.3 und 4.4). Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen von Latres et al. (2001), bei denen Skp2-Überexpression ohne onkogene Teilnahme keine T-Zell-Erkrankung induzieren konnte.

Obwohl die gezeigten Transplantationsmodelle nicht zu der Induktion einer hämatopoetischen Erkrankung führten, trägt Cks1 über verschiedene SCF^{Skp2}-unabhängige Wege zur Onkogenese bei. So fördert Cks1 zum Beispiel durch die Unterstützung NF- κ B-abhängiger IL-8-Expression die Proliferation hepatozellulärer Karzinomzellen (Lee et al., 2011). Ebenfalls kann Cks1, wie bereits in Kapitel 5.5 diskutiert, mutierte Zellen stabilisieren und damit die apoptotische Antwort beeinflussen. Zudem kann die Überexpression von Cks1 durch Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs sogar antiapoptotisch wirken (Wang et al., 2009). Die bereits diskutierte Unabhängigkeit von extrinsischen Überlebenssignalen verleiht hämatopoetischen Zellen möglicherweise die Fähigkeit zu disseminieren (Kapitel 5.1) und könnte bei soliden Tumoren in Migration und erhöhter Aggressivität der Erkrankung resultieren (Lan et al., 2008; Wang et al., 2009, 2012). Ob es sich dabei um einen p27^{Kip1}-abhängigen oder -unabhängigen Effekt handelt, muss jedoch noch geklärt werden. Ebenfalls zeigen die Ergebnisse von Liberal et al. (2012), dass Cks1-Überexpression und die Bindung von Cks1 an Cdk2 während der Onkogenese zu der Aufhebung des Intra-S-Phase-Kontrollpunktes führt. Cks1-Überexpression stellt demzufolge eine Möglichkeit prämaligner Zellen dar, trotz replikativem Stress DNA-Reparatur zu umgehen. Dies führt zu einem proliferativen Vorteil sowie genomischer Instabilität, die in gesteigerter Tumorbildung resultieren (Bartkova et al., 2005; Bartek et al., 2007). Cks1 spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle während der Mitose. Tang und Reed (1993) konnten zeigen, dass der Verlust der Cks1-Funktion in Hefen zu mitotischen Defekten führt. Außerdem wurde Cks1-vermittelte transkriptionelle Regulation bedeutender mitotischer Proteine in Hefen und Säugerzellen nachgewiesen (Morris et al., 2003; Yu und Reed, 2004; Westbrook et al., 2007; Martinsson-Ahlzén et al., 2008). Den Verlauf der Mitose gewährleisten Cks-Proteine, indem sie Cdc20-gebundenes Zyklin A binden und so dessen Ubiquitylierung und Degradierung durch den APC/C herbeiführen (Wolthuis et al., 2008). Bezüglich der Rolle

von Cks1 am G1/S-Übergang zeigten Hoellein et al. (2012), dass Cks1 zusätzlich zu der hauptsächlichen SCF^{Skp2}-abhängigen Funktion eine SCF^{Skp2}- und p27^{Kip1}-unabhängige Rolle spielt, vermutlich indem es Cdk1-Expression und Cdk2-Kinaseaktivität reguliert (Hoellein et al., 2012). Inwiefern die mitotische Funktion von Cks1 und die p27^{Kip1}-unabhängige Rolle am G1/S-Übergang in transformierten Zellen relevant sind, ist bisher jedoch nicht bekannt.

Eine Erklärung für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf der E μ -Myc;*Cks1*^{-/-}- und der E μ -Myc;*Skp2*^{-/-}-Mäuse könnte ein unterschiedliches Verhalten der neoplastischen Zellen hinsichtlich Seneszenz sein. *Skp2*-Defizienz kann in MEFs ohne onkogene Beteiligung keine Seneszenz induzieren (Lin et al., 2010). Im Gegensatz dazu gehen *Cks1*^{-/-}-MEFs *in vitro* frühzeitig in Seneszenz (Hoellein et al., 2012). Campaner et al. (2010) zeigten, dass der Verlust von *Cdk2* im E μ -Myc-Modell zu einer signifikant verlängerten Latenzzeit aufgrund von Seneszenz führt. Zwar ist Cks1-abhängige Seneszenz durch den zusätzlichen Verlust von p27^{Kip1} aufzuheben (Hoellein et al., 2012), möglicherweise zeigen *Cks1*^{-/-}-Zellen jedoch eine größere Bereitschaft für Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) als *Skp2*-defiziente Zellen.

5.4 Cks1 zeigt keine onkogene Kooperation in einer L-gp130-induzierten AML

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionales Zytokin und stimuliert eine große Anzahl zellulärer Mechanismen. Dies beinhaltet die Regulation der Proliferation, Differenzierung und Reifung verschiedener hämatopoetischer Zellen (Kishimoto et al., 1995; Peters et al., 1998). IL-6-Signaltransduktion erfolgt über den IL-6-Rezeptor und das Glykoprotein 130 kDa (gp130; Taga und Kishimoto, 1995; Heinrich et al., 1998, 2003). gp130-Dimerisierung führt zu der Aktivierung der Janus-Tyrosinkinase (JAK) und somit zu Phosphorylierung und Aktivierung der *signal transducer and activator of transcription*-Familie (STAT) von Transkriptionsfaktoren (Heinrich et al., 1998; Hirano, 1998). Ebenfalls führt gp130-Aktivierung zu der Stimulation der Ras/*mitogen activated protein kinase*-Signalwege (MAPK bzw. *extracellular signal regulated kinase* ERK; Hibi et al., 1996).

Stuhlmann-Laeisz et al. (2006) beschrieben einen konstitutiv aktiven gp130-Rezeptor, L-gp130, dessen extrazelluläre Domäne durch eine *basic leucine zipper domain* (bZIP-Domäne, Leucin Zipper) ausgetauscht wurde. bZIP-gp130-Dimerisierung führt zu einer konstitutiven Zytokin-unabhängigen Aktivierung des gp130-Signalwegs.

IL-6-getriebene gp130-Signaltransduktion unterscheidet sich je nach Zelltyp und kann in unterschiedlichen Zellen zu gegensätzlichen Effekten führen. In humanen Myelomzellen induziert die Stimulation durch IL-6 Zellzyklusarrest *in vitro* (Zarling et al., 1986; Morinaga et al., 1989). Dies geschieht durch Induktion von p27^{Kip1}-mRNA und -Protein und ist STAT3-aktivierungsabhängig (Kortylewski et al., 1999). In M1-Zellen, einer murinen monozytären Zelllinie, führt IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung zu Zellzyklusarrest und zu der Differenzierung in Makrophagen (Minami et al., 1996; Nakajima et al., 1996). *Granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), ein IL-6-verwandtes Zytokin, induziert STAT3-Aktivität und führt in der murinen, myeloischen, IL-3-abhängigen Zelllinie 32D zu Zellzyklusarrest und neutrophiler Differenzierung (de Koning et al., 2000). In dieser Arbeit konnte bei 32D-Zellen nach IL-3-Entzug, trotz signifikanter Proliferationsunterschiede der L-gp130- und wt gp130-exprimierenden Zellen, ebenfalls verminderte Proliferation der transgenen L-gp130-Zellen festgestellt werden (Kapitel 4.6.1). Wie bei de Koning et al. (2000) beschrieben, ging L-gp130-Expression unter IL-3-Entzug nach 7 Tagen mit einer massiven Erhöhung des p27^{Kip1}-Proteinlevels einher. Diese Induktion wird vermutlich durch eine funktionale STAT3-Bindungsstelle in der p27^{Kip1}-Promotorregion hervorgerufen (de Koning et al., 2000). Die geringe Proliferationsrate und das ausbleibende Koloniewachstum der 32D-Zellen in Methylzellulose (Kapitel 4.6.1) kann durch p27^{Kip1}-vermittelten G1-Arrest (Sherr und Roberts, 1995; de Koning et al., 1998) und den Verlust proliferationsfördernder Proteine wie c-Myc (Hoffman et al., 2002) erklärt werden. Ebenfalls könnte die Reduktion der L-gp130-Level, vermutlich durch STAT3-vermittelte negative Rückkopplung (Auernhammer et al., 1999; Lee et al., 2002), und der damit einhergehende Abfall an ERK1/2-Aktivität dafür zuständig sein. Die antiproliferativen Effekte wurden zusätzlich von einer Reduktion antiapoptotischer Proteine wie Bcl-XL begleitet (Kapitel 4.6.1). Im Kontrast dazu steht die von Stuhlmann-Laeisz et al. (2006) gezeigte konstitutive STAT3-Aktivierung und Zytokin-unabhängige Proliferation L-gp130-infizierter Ba/F3-Zellen, die mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten retroviralen Transduktionsmodell reproduziert werden konnte (Kapitel 4.3.1 und 4.6.1). Die Koloniebildung

L-gp130-infizierter Ba/F3-Zellen verdeutlicht zusätzlich deren Fähigkeit, IL-3- beziehungsweise Hyper IL-6-unabhängig zu wachsen (Kapitel 4.6.1). gp130-induzierte STAT3-Aktivierung führt in der pro-B-Zelllinie zu reduzierter p27^{Kip1}-Expression und zum Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase (Fukada et al., 1998). Die Beobachtungen in den unterschiedlichen Zelltypen verdeutlichen die verschiedenen und sogar teilweise gegensätzlichen wachstumsregulierenden Effekte von Zytokinen der IL-6-Familie.

In noch unveröffentlichten Daten konnten wir kürzlich zeigen, dass L-gp130-Expression im murinen Transduktions- und Transplantationsmodell nach etwa 200 Tagen zu einer CD138-positiven Erkrankung mit den morphologischen Eigenschaften eines Multiphen Myeloms führt (Dechow und Götze et al., in Vorbereitung). Da Cks1 als ein negativer prognostischer Faktor beim Multiphen Myelom gilt (Chang et al., 2006; Fonseca et al., 2006; Zhan et al., 2007), wurde Cks1 in der vorliegenden Arbeit in L-gp130-exprimierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen koexprimiert. Im Gegensatz zu den von Dechow und Götze et al. gezeigten Ergebnissen führte die Überexpression von L-gp130 zu erheblich kürzeren Latenzzeiten der transplantierten Mäuse und zeigte entgegengesetzt zu der zuvor beobachteten Expansion der Plasmazellpopulation einen hohen Anteil myeloischer Zellen (Kapitel 4.6.1). Ein Wechsel des malignen Phänotyps induzierter Tumorerkrankungen wurde bereits bei anderen Transplantationsexperimenten beobachtet. So zeigten Miething et al. (2003), dass retrovirale Transduktion 5-FU-behandelter Knochenmarkszellen mit dem onkogenen Fusionsprotein NPM-ALK (*Nucleophosmin-Anaplastic Lymphoma Kinase*) je nach Grad der Transduktionseffizienz zu unterschiedlichen Erkrankungen führt. Dabei induzierte eine 45 % ige Transduktion der Zellen bereits nach 0,8 Monaten medialer Lebenszeit eine Histiozytose mit einem hohen Anteil CD11b/Gr1-positiver Zellen. Die Verwendung einer niedrigeren Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*, MOI) und die daraus resultierende niedrige Transduktionseffizienz von weniger als 1 % der Zellen führte nach 4,13 Monaten medialem Überleben der Versuchstiere zu einer Erkrankung plasmablastischer Herkunft (Miething et al., 2003). Vergleicht man die Transplantationsexperimente von Dechow und Götze et al. mit den in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Ergebnissen, ist auffällig, dass sich die Transduktionseffizienzen der Transplantate ebenfalls stark unterscheiden. Die Ursache des malignen Phänotyps könnte demnach in Schwellenwerten L-gp130-induzierter Signaltransduktion liegen. Jenkins et al. (2005) zeigten, dass konstitutive gp130-Signaltransduktion (*gp130*^{Y757F/Y757F} Modell) zu einer Myelopoese

im Knochenmark führt, die durch die Reduktion STAT3-vermittelter Signaltransduktion aufgehoben wird. Ebenfalls ist der durch ERK (Xing et al., 1996) induzierte Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) ein entscheidender Faktor bei der Myelopoese (Sakamoto und Frank, 2009) und wird bei AML überexprimiert vorgefunden (Crans und Sakamoto, 2001; Shankar et al., 2005; Pigazzi et al., 2007). Ein weiterer Grund für die Entstehung einer AML bei hoher Transduktionsrate könnte die Resistenz myeloischer Vorläuferzellen gegenüber Apoptose sein (Luo et al., 2005; Högstrand et al., 2012), die möglicherweise durch gp130-abhängige Induktion von c-Myc hervorgerufen wird (Bromberg et al., 1999; Kiuchi et al., 1999; Sears et al., 2000). Gleichzeitig zeigt die vergrößerte Plasmazellpopulation der L-gp130-exprimierenden Mäuse einen signifikanten Unterschied zu der wildtypischen Gruppe, der auf eine gesteigerte L-gp130-induzierte B-Zell-Differenzierung schließen lässt (Kapitel 4.6.1). Dieser Anstieg impliziert, dass die Entstehung der aggressiveren AML der plasmablastischen Erkrankung zuvorkommt. Hierbei erfordert die Entstehung der AML eine höhere Einzelzellinfektion und eine daraus folgende stärkere Expression des onkogenen Faktors L-gp130, während die Induktion des Multiplen Myeloms möglicherweise auf weitere entscheidende Mutationen (*second hit*; Banerjee et al., 2010) angewiesen ist.

Die hämatopoetischen Zellpopulationen L-gp130/Cks1-exprimierender Mäuse unterschieden sich in den hier präsentierten Ergebnissen nicht von denen der L-gp130-Gruppe. Ebenfalls wichen die Latenzzeiten nur geringfügig voneinander ab. Auf Proteinebene kam es in allen L-gp130-exprimierenden BALB/c-Zellen zu einer Induktion gp130-vermittelter STAT3- und ERK1/2-Aktivierung, bei gleichbleibenden Proteinspiegeln. Dabei kam es in den L-gp130/Cks1-exprimierenden Zellen zusätzlich zu einer Cks1-abhängigen Induktion der STAT3-Proteinmenge und -Phosphorylierung (Kapitel 4.6.1). Shi et al. (2010) zeigten, dass verstärkte Cks1-Expression in Myelomzellen zu der Aktivierung des JAK/STAT3-Signalweges führt. Ebenfalls wurde in dieser Studie gesteigerte ERK1/2-Aktivität beschrieben, die im hier vorliegenden Modell jedoch nicht beobachtet werden konnte (Kapitel 4.6.1).

Neben der Aktivierung von STAT3 und ERK1/2 ist eine gesteigerte L-gp130-vermittelte Cks1-Expression zu erkennen (Kapitel 4.6.1). Diese wurde vermutlich durch transkriptionelle Induktion von c-Myc durch STAT3 (Bromberg et al., 1999; Kiuchi et al., 1999) und gesteigerte Stabilität des c-Myc-Proteins durch ERK1/2 (Sears et al., 2000) ausgelöst. Posi-

tive Regulation des Transkriptionsfaktors c-Myc gemeinsam mit ERK1/2-Signalaktivierung fördert den Übergang von der G0- in die G1-Phase des Zellzyklus, ist aber nicht ausreichend für den Eintritt in die S-Phase (Jones et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit der ERK-vermittelten Regulation von Cks1 ist die Induktion des ERK1/2-*downstream*-Effektors und Transkriptionsfaktors Forkhead Box M1 (FOXM1; Costa, 2005), der essentiell für die Transkription von *Cks1* ist (Wang et al., 2005). Diese Möglichkeiten würden ebenfalls die ausbleibende Induktion von Cks1 in L-gp130-exprimierenden 32D-Zellen erklären, da hier weder c-Myc-Induktion noch ERK1/2-Aktivierung stattgefunden hat (Kapitel 4.6.1).

Im Widerspruch zu den proliferationsfördernden Signalen L-gp130-exprimierender Zellen (Cks1- oder c-Myc-Induktion) steht der extreme Anstieg an p27^{Kip1}-Protein. Dieser Anstieg ist ausschlaggebend für p27^{Kip1}-vermittelten G1-Arrest und das myeloische Differenzierungsprogramm (Sherr und Roberts, 1995; de Koning et al., 1998), spricht allerdings gegen eine L-gp130-vermittelte Proliferation. Zusätzlich spricht ein erhöhtes nukleäres p27^{Kip1}-Level für gesteigerte apoptotische Aktivität (Wang et al., 1997). Diese steht wiederum im Gegensatz zu STAT3-abhängigen antiapoptotischen Signalen wie c-Myc-vermittelter Bcl-2-Expression (Fukada et al., 1996; Shirogane et al., 1999), die in den innerhalb dieser Arbeit transplantierten Mäusen ebenfalls zu erkennen war (Kapitel 4.6.1). Neben den Tumor-supprimierenden Eigenschaften eines hohen nukleären p27^{Kip1}-Levels wurden onkogene Funktionen mit einer zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins in Verbindung gebracht (Besson et al., 2007). In Melanomzellen ist p27^{Kip1}-Delokalisation auf konstitutive Aktivierung von ERK1/2 zurückzuführen. Dieser Prozess ist Calpain-abhängig, führt im Verlauf allerdings zu einem zytoplasmatischen Abbau des Inhibitors (Delmas et al., 2003). Ebenfalls wurde bei Ras-abhängigem Lungenkrebs eine erhöhte Phosphorylierung an Serin 10 und eine daraus resultierende zytoplasmatische Lokalisation von p27^{Kip1} beobachtet (Besson et al., 2006). Des Weiteren führt simultane Expression von p27^{Kip1} und Ras bei Mäusen zu erhöhter Tumorgenese in Verbindung mit zytoplasmatischer Lokalisation (Serres et al., 2011). ERK 1/2 fördert G1-Progression durch die Akkumulation von Zyklin D1 (Meloche und Pouysségur, 2007), Zyklin D1 seinerseits ist zuständig für die Sequenzierung von p27^{Kip1} während der G1-Phase (Perez-Roger et al., 1999). Unter Berücksichtigung der oben genannten Daten liegt die Ursache der gesteigerten Proliferation der myeloischen Zellen möglicherweise trotz des erhöhten p27^{Kip1}-Levels in einer ERK1/2-vermittelten, zytoplasmatischen Lokalisation des CDK-Inhibitors.

In der vorliegenden Arbeit führte die Expression von L-gp130 im Transduktions- und Transplantationsmodell zu der Entstehung einer AML, die in ihrem Verlauf aggressiver ist als das zuvor beobachtete Multiple Myelom. Dies entspricht trotz der widersprüchlichen Signale (p27^{Kip1}-Level) den kürzlich von Kroy et al. (2012) publizierten Ergebnissen. Sie zeigen, dass konstante STAT3-Aktivierung, ausgelöst durch den Verlust Ras/ERK1/2-vermittelter Signaltransduktion, in transplantierten Mäusen zu einer stark erhöhten Proliferationsrate CD11b-positiver Zellen führt. Des Weiteren zeigten Zhang et al. (2010), dass STAT3 für die G-CSF-vermittelte Beschleunigung des granulozytären Zellzyklus und der Reifung myeloischer Vorläuferzellen erforderlich ist. Durch die Kontrolle proliferationsfördernder Transkriptionsfaktoren wie c-Myc wird es zu einem essenziellen Vermittler während der Granulopoese (Zhang et al., 2010).

Die Koexpression von Cks1 war nicht in der Lage, eine Akzeleration der Erkrankung hervorzurufen, obwohl eine zusätzliche Aktivierung des STAT3-Signalweges beobachtet werden konnte (Kapitel 4.6.1). Koonkogene Eigenschaften von Skp2 konnten in Kooperation mit Ras beobachtet werden, was vornehmlich auf den Abbau von p27^{Kip1} zurückzuführen ist (Latres et al., 2001). Ebenfalls führt *Cks1*-Verlust im Eμ-*Myc*-Modell zu einer signifikant verlängerten Latenzzeit, die hauptsächlich durch den Verlust posttranslationaler p27^{Kip1}-Regulation durch c-Myc-vermittelte Cks1-Induktion zu erklären ist (Keller et al., 2007). Im vorliegenden Modell war das p27^{Kip1}-Level trotz der Induktion von Cks1 und c-Myc gesteigert. Eine zytoplasmatische Lokalisation von p27^{Kip1} könnte dafür verantwortlich sein, dass das Protein außerhalb der Reichweite des SCF^{Skp2/Cks1}-vermittelten Abbaus liegt. Dies und eine potentielle Sättigung STAT3-vermittelter Signaltransduktion könnte erklären, weshalb Cks1 trotz zusätzlicher Induktion der onkogenen Signalwege keine koonkogenen Eigenschaften in dem hier verwendeten L-gp130-Modell zeigt.

5.5 Die bei der Tumorgenese beobachteten Effekte eines *Cks1*-Verlustes sind p27^{Kip1}-abhängig

Beobachtungen bei der Tumorgenese diverser Krebserkrankungen weisen auf SCF^{Skp2}-unabhängige Funktionen von Cks1 hin (Inui et al., 2003; Keller et al., 2007; Old et al., 2010; Chang et al., 2010). In Kapitel 5.3 wurden bereits viele der regulatorischen,

Die bei der Tumorgenese beobachteten Effekte eines Cks1-Verlustes sind p27^{Kip1}-abhängig

SCF^{Skp2}-unabhängigen Effekte von Cks1 bezüglich Apoptose (Zhan et al., 2007; Wang et al., 2009) und Mitose (Morris et al., 2003; Yu und Reed, 2004; Westbrook et al., 2007; Martinsson-Ahlzén et al., 2008; Wolthuis et al., 2008) und während des G1/S-Übergangs (Hoellein et al., 2012) und des internen S-Phase-Kontrollpunkts (Liberal et al., 2012) beschrieben. Zusätzlich spielen zahlreiche Proteolyse-abhängige Effekte eine entscheidende Rolle bei der Onkogenese, die durch deregulierte SCF^{Skp2/Cks1}-Zielproteine entstehen. SCF^{Skp2/Cks1}-vermittelter Abbau in der späten G1- und frühen S-Phase ermöglicht den S-Phase-Eintritt und schützt vor replikativem Arrest (Li und Jin, 2010; Pospiech et al., 2010). Zudem gewährleistet SCF^{Skp2/Cks1}-abhängiger Abbau von p27^{Kip1} am G2/M-Übergang den Eintritt in die Mitose (Malek et al., 2001; Nakayama et al., 2004). Neben p27^{Kip1} werden die CKIs p21^{Cip1} und p57 sowie das pRb-verwandte Protein p130 durch den SCF^{Skp2/Cks1} für den Abbau markiert (Carrano et al., 1999; Yu et al., 1998; Kamura et al., 2003; Tedesco et al., 2002). All diese Proteine sind Tumorsuppressoren, deren niedrige Level in Tumoren zu gesteigerter Proliferation führen (Abbas und Dutta, 2009; Besson et al., 2008; Guo et al., 2010; Schaffer et al., 2010). Die CKIs p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57 spielen unterschiedliche Rollen während der Zellzyklusregulation (Starostina und Kipreos, 2012), die sich wiederum in gesunden und malignen Zellen unterscheiden.

p27^{Kip1} kann fast alle Effekte eines *Skp2*-Verlustes aufheben und ist somit das Hauptziel SCF^{Skp2}-vermittelter proteolytischer Aktivität (Nakayama et al., 2004; Kossatz et al., 2004). Es gilt als ein spezifischer proliferativer Regulator der hämatopoetischen Organe (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996) und wirkt hauptsächlich durch CDK-abhängige Hemmung der Zellproliferation als Tumorsuppressor (Philipp-Staheli et al., 2002). p27^{Kip1} induziert G1/S- und G2/M-Arrest, um die Reparatur von DNA-Schäden zu gewährleisten (Petrocelli und Slingerland, 2000; Zhou et al., 2004; Payne et al., 2008; Cuadrado et al., 2009). Ob es dabei Teil des initialen (Payne et al., 2008) oder verspäteten (Cuadrado et al., 2009) Arrests ist, ist jedoch noch unklar. Liontos et al. (2010) zeigten allerdings, dass p27^{Kip1}-Akkumulation, gegensätzlich zu der Skp2-abhängigen Proteolyse in gesunden Zellen, unter genotoxischem Stress auf den p38-MAP-Kinaseweg zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigten Lin et al. (2010), dass der Verlust von Skp2 unter onkogenem Stress zu Seneszenz führt und von p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und dem aktivierenden Transkriptionsfaktor 4 (Atf4) abhängig ist. Eine weitere Rolle während der Tu-

morgense spielt die p27^{Kip1}-abhängige Unterdrückung zentrosomaler Amplifikation (Sugihara et al., 2006).

Zusätzlich zu p27^{Kip1} können die bereits erwähnten SCF^{Skp2/Cks1}-Zielproteine p21^{Cip1}, p57 und p130 eine Rolle während der Tumorgenese spielen. Obwohl p21^{Cip1} hauptsächlich transkriptionell reguliert wird (Gartel und Tyner, 1999; Jung et al., 2010) und p27^{Kip1} ausschlaggebend für SCF^{Skp2}-vermittelte Zellzyklusprogression am G1/S-Übergang ist (Nakayama et al., 2004; Kossatz et al., 2004), spielt p21^{Cip1} eine tragende Rolle beim Zellzyklusarrest aufgrund von DNA-Schäden (Nakayama und Nakayama, 1998). Der SCF^{Skp2}-vermittelte Abbau von p21^{Cip1} am G1/S-Übergang und in der frühen S-Phase ist im regulären Zellzyklus zwar nicht ausschlaggebend (Kossatz et al., 2004), gewinnt jedoch bei schadensinduziertem Arrest an Bedeutung (Bendjennat et al., 2003). p21^{Cip1} vermittelt p53-abhängigen und -unabhängigen Wachstumsarrest (Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995) und inhibiert neben Zyklin/CDK-Komplexen auch E2F-Proteine, wodurch es Zellzyklusarrest und Seneszenz induziert (Afshari et al., 1996). In c-Myc-getriebenen Erkrankungen und in lienalen B-Lymphozyten führt der Verlust von CDK2 zu gesteigerter, p21^{Cip1}-abhängiger Seneszenz (Campaner et al., 2010). Zusätzlich stabilisiert p21^{Cip1} p27^{Kip1}-Protein (Steinman et al., 2001; He et al., 2006) und induziert die Expression weiterer Seneszenz-assoziiierter Proteine (Chang et al., 2000). In der S-Phase findet durch p21^{Cip1} CDK-unabhängiger replikativer Arrest statt, der durch die direkte Bindung des Inhibitors an das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) vermittelt wird (Moldovan et al., 2007; Abbas und Dutta, 2009; Jung et al., 2010).

p57 wird ebenfalls am G1/S-Übergang und am Anfang der S-Phase durch SCF^{Skp2/Cks1} reguliert. Die Tumor suppressierenden Eigenschaften dieses Inhibitors beziehen sich wie bei p21^{Cip1} auf CDK- und PCNA-Hemmung (Guo et al., 2010). Als Antwort auf zellulären Stress wird p57 durch die p38-Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) induziert (Joaquin et al., 2012) und spielt möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Induktion von Seneszenz (Pateras et al., 2009; Zou et al., 2011; Matsumoto et al., 2011). Allerdings wird p57 vornehmlich während der Organogenese exprimiert (Pateras et al., 2009) und ist in reifen hämatopoetischen Zellen nur in geringen Mengen vorhanden (Matsuoka et al., 1995; Matsumoto et al., 2011).

Neben deregulierten p27^{Kip1}-Leveln wurden bei einem hohen Prozentteil (~80 %) untersuchter Burkitt-Lymphome niedrige nukleäre p130-Proteinspiegel beobachtet (Cinti et al.,

Die bei der Tumorgenese beobachteten Effekte eines Cks1-Verlustes sind p27^{Kip1}-abhängig

2000). Die Hauptfunktion von p130 liegt in der G0-Phase, in der es direkt mit E2F4 und E2F5 interagiert und so zur Reprimierung verschiedener Zellzyklus-Gene führt (Nevins, 1992; Wang et al., 1994; Dyson, 1998; Gaubatz et al., 2000; Stiegler und Giordano, 2001). p130 kann jedoch *in vitro* und *in vivo* ebenfalls als CDK2-Inhibitor am G1/S-Übergang wirken und dadurch den Verlust von p27^{Kip1} kompensieren (Coats et al., 1999; Collado et al., 2000; Soeiro et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Effekte eines *Cks1*-Verlusts auf die Onkogen-getriebene Proliferation p27^{Kip1}-abhängig sind. Der simultane Verlust von p27^{Kip1} führte in *Cks1*-defizienten Granulozyten zu einer kompletten Rekonstitution c-Myc-getriebener Proliferation (Kapitel 4.5). Genotypenunabhängige Krankheitsverläufe einer c-Myc-getriebenen AML weisen darauf hin, dass Cks1 eine größere Rolle bei der B-Zell-Lymphomagenese als bei der AML-Entstehung spielt (Kapitel 4.5; Keller et al., 2007). Ebenfalls könnte die extrem kurze Latenzzeit des aggressiven, retroviral induzierten Versuchsmodells ein Grund für die unauffälligen Krankheitsverläufe der verschiedenen *Knockout*-Tiere sein. Übereinstimmend mit dieser Hypothese zeigte der Verlust von *Cks1* oder p27^{Kip1} im weniger aggressiven L-gp130-Expressionsmodell ähnliche Tendenzen wie im Lymphommodell. Die Gruppen zeigten jedoch lediglich stark divergierende Latenzzeiten, die knapp außerhalb der Signifikanz lagen, während sich das mediale Überleben der wildtypischen Gruppe dazwischen befand. Im Gegensatz dazu konnten signifikante Ergebnisse zeigen, dass der simultane Verlust von *Cks1* und p27^{Kip1} die verzögerte Krankheitsentstehung *Cks1*-defizienter Mäuse aufhob (Kapitel 4.6.2). Diese Beobachtung weist neben den p27^{Kip1}-abhängigen, proliferativen Effekten in prämaligen Granulozyten auf einen vorherrschenden p27^{Kip1}-unterdrückenden Effekt von Cks1 während der Pathogenese hin.

Genotypen-spezifische Unterschiede in den beteiligten Signalwegen konnten nicht erkannt werden. Dagegen zeigten Vergleiche der Proteinspiegel in den Knochenmarkzellen der malignen C57BL/6- und BALB/c-Mäuse gravierende Unterschiede (Kapitel 4.6.2 und 4.6.1). Die L-gp130-induzierten Effekte auf die Signalwege und Proteinlevel waren in den C57BL/6-*Knockout*-Tieren sehr inhomogen, korrelierten jedoch nicht mit den Genotypen. Im Gegensatz dazu führte L-gp130-Expression in BALB/c-Mäusen zu einer stabilen Aktivierung der STAT3- und ERK1/2-Signaltransduktion. Die verminderte Aktivität der unter-

suchten Signalwege in den C57BL/6-Mäusen spiegelte sich auch im Ausmaß der Erkrankung wieder. Zwar zeigten die C57BL/6-Mäuse bei Erkrankung eine Splenomegalie, allerdings war das gemittelte Milzgewicht signifikant geringer als das der BALB/c-Mäuse. Ebenfalls zeigte sich in den C57BL/6-Mäusen keine Lymphadenopathie. Am gravierendsten war jedoch die unterschiedliche Latenzzeit der verschiedenen Mausstämme. Vermutlich sind genetische Prädispositionen des BALB/c-Stammes dafür verantwortlich, dass die Tiere stärker auf onkogene Stimuli reagieren als die robusteren C57BL/6-Mäuse. So sind Balb/c-Mäuse zum Beispiel anfälliger für retinale Erkrankungen (Fukushima et al., 2006), Mammakarzinome (Kuperwasser et al., 2000) und Influenza Infektionen (Ding et al., 2008). Ebenfalls sind sie refraktär gegenüber DNA-Doppelstrangbrüchen (Potter et al., 1988) und sind im hämatopoetischen System durch Mutationen im *CDKN2A*-Gen (codiert für den CKI p16^{INK4A}; Dilworth et al., 2000) empfänglich für Pristan-induzierte Multiple Myelome (Mock et al., 1993). Diese genetischen Dispositionen steuern vermutlich zu dem aggressiveren Krankheitsverlauf der BALB/c-Mäuse bei, schließen jedoch die Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung durch exzessive STAT3-Aktivierung in C57BL/6-Mäusen nicht aus.

Ein verändertes Disseminationsverhalten, wie im E μ -*Myc*-Modell beobachtet (Keller et al., 2007), wurde nicht festgestellt (Kapitel 4.6.2). Mögliche apoptotische Hintergründe für das veränderte Disseminationsverhalten *Cks1*-defizienter E μ -*Myc*-Zellen wurden bereits in Kapitel 5.1 besprochen. Ebenfalls ist dabei die Abhängigkeit von p27^{Kip1} in Betracht zu ziehen. Während der Verlust von *Cks1* im E μ -*Myc*-Modell zu einem Anstieg von p27^{Kip1} führt (Keller et al., 2007), blieb das p27^{Kip1}-Level in den L-gp130-exprimierenden Zellen stabil (Kapitel 4.6.2). Gegensätzlich zu dieser Hypothese führt der Verlust von *Skp2* im E μ -*Myc*-Modell trotz p27^{Kip1}-Akkumulation zu keiner verminderten Dissemination (Old et al., 2010).

Die Migration hämatopoetischer Zellen ist von bestimmten Oberflächenrezeptoren abhängig, deren Expressionsmuster sich bei Lymphom- und AML-Zellen unterscheidet (Pals et al., 2007). Während die Dissemination von E μ -*Myc*-Lymphomzellen vom CC-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) abhängig ist (Rehm et al., 2011), migrieren AML-Zellen vornehmlich aufgrund von CXC-Motiv-Rezeptor 4-Aktivierung (CXCR4; Möhle et al., 1998; Tavor et al., 2004). Der Verlust von *Cks1* führt im E μ -*Myc*-Modell unter anderem zu verminderter Dissemination in die Meningen (Keller et al., 2007). CCR7 gilt bei T-Zell-Leukämien als

Die bei der Tumorgnese beobachteten Effekte eines Cks1-Verlustes sind p27^{Kip1}-abhängig

ein essentieller Regulator der Infiltration des Zentralen Nervensystems (Buonamici et al., 2009). Neben Dissemination induzieren CCR7-Signalwege in T-Zellen auch G2-Phase-Arrest, der durch die Regulation von p27^{Kip1}-Protein und CDK1 erfolgt (Ziegler et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigten Xu et al. (2011), dass CCR7-Signaling beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zu G2/M-Phase-Progression führt. Ebenfalls wurden in dendritischen Zellen und T-Lymphozyten neben migratorischen Auswirkungen des CCR7-Signalweges auch überlebensfördernde Effekte beobachtet (Kim et al., 2005; Escribano et al., 2009; Liu et al., 2010). CCR7-Expression wird in prä-B-Zellen durch den *nuclear factor κB* (NF-κB) und AP-1 aktiviert (Krappmann et al., 2004). Lee et al. (2011) zeigten, dass die NF-κB-abhängige transkriptionelle Kontrolle von Interleukin-8 in hepatozellulären Karzinomzellen durch den Verlust von Cks1 beeinträchtigt wird. Dabei reduziert Cks1-Verlust die IκB (*inhibitor of κB*) Kinase-Untereinheiten IKKα und IKKβ auf p27^{Kip1}-unabhängige Weise und verringert so den Abbau des NF-κB-Inhibitors IκB und somit NF-κB-abhängige Transkription (Lee et al., 2011). Somit könnte Cks1-vermittelte Reduktion von CCR7 der Auslöser für die verringerte Dissemination (Keller et al., 2007) und womöglich auch das verminderte Überleben (Kapitel 4.2) Cks1-defizienter Eμ-Myc-Zellen sein. Gleichzeitig erklärt die p27^{Kip1}-unabhängige Kontrolle von IKKα und IKKβ den ausbleibenden Effekt in Skp2^{-/-};Eμ-Myc-Mäusen (Old et al., 2010). Da Cks1-Verlust in Brustkrebszellen ebenfalls zu verminderter CXCR4-Expression führt (Helbig et al., 2003), müsste in weiteren Experimenten geklärt werden, ob Cks1 in AML-Zellen ebenfalls die Expression des Rezeptors beeinflusst.

6 Zusammenfassung

Die Identifikation molekularer Mechanismen, die der Entstehung von Tumorerkrankungen und ihrem aggressiven Verlauf zugrunde liegen, ist wesentlich für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden in der Krebstherapie. Durch Screenings von Tumormaterial werden potentielle Zielproteine identifiziert und bezüglich ihrer Rolle bei der Krankheitsentstehung und während des Krankheitsverlaufs untersucht. Das Zellzyklusprotein Cks1 konnte in diversen Tumorerkrankungen dereguliert nachgewiesen werden und stellt bei Überexpression einen schlechten prognostischen Faktor dar. Verschiedene Studien diskutierten bereits eine potentielle onkogene Rolle des Zellzyklusregulators, seine Bedeutung bei der Tumorgenese ist bisher jedoch noch ungeklärt. Cks1 ist ein Hauptmediator des SCF^{Skp2}-vermittelten Abbaus des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}. Durch seine Bindung an das F-Box-Protein Skp2 kann phosphoryliertes p27^{Kip1} erkannt und für den weiteren Abbau ubiquitinyliert werden. Entsprechend führt der Verlust von *Cks1* oder *Skp2* im Eμ-*Myc*-Modell, einem murinen Modell des humanen Burkitt-Lymphoms, zu Akkumulation von p27^{Kip1}. Auffälligerweise verzögert jedoch ausschließlich *Cks1*-Verlust die Lymphomagenese signifikant und führt zusätzlich zu einer stark verminderten Dissemination der Lymphomzellen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer potentiellen onkogenen Rolle von Cks1 bei der Pathogenese hämatopoetischer Tumorerkrankungen. Ebenfalls wurden p27^{Kip1}-unabhängige Funktionen von Cks1 während der Tumorgenese untersucht. Die Ergebnisse belegen, dass prämaligne, durch Cks1-Verlust hervorgerufene, proliferative Defizite in Eμ-*Myc*-Lymphomzellen fortbestehen. Diese proliferativen Nachteile Cks1-defi-

zienter Zellen traten ausschließlich im Onkogen-getriebenen Zellwachstum auf. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass der Verlust von Cks1 die Apoptoserate stromaunabhängiger E μ -Myc-Lymphomzellen signifikant steigerte. Bestimmungen der B-Zell-Populationen Cks1-defizienter Versuchstiere ergaben stark vergrößerte B1-Zell-Populationen, die im Hinblick auf CLL-Entstehung in weiteren Studien zu klären bleiben.

Die onkogene Rolle von Cks1 wurde in verschiedenen hämatopoetischen Transplantationsmodellen untersucht. Wegen auffälliger Cks1-mRNA-Level in diversen B-Zell-Erkrankungen wurde zunächst konstitutive Cks1-Expression im B-Zell-Kompartiment durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Cks1 in diesem Modell keine onkogenen Eigenschaften besitzt. Auch induzierte das gesteigerte Cks1-Level keine Veränderung der B-Zell-Populationen, der Proliferationsraten oder der Differenzierungsmuster. Ubiquitäre Überexpression von Cks1 im hämatopoetischen System induzierte Myeloproliferation, die allerdings ebenfalls nicht für eine Krankheitsinduktion ausreichte. Koexpressionsstudien von Cks1 und L-gp130, einem konstitutiv aktiven gp130-Rezeptor, zeigten, dass hochtitrige L-gp130-Transduktion im Transplantationsmodell neben der bereits beobachteten Induktion eines Multiplen Myeloms zu AML-Entstehung führen kann. Die Koexpression von Cks1 bewirkte zwar eine zusätzliche Stat3-Aktivierung, konnte jedoch keine Akzeleration der Erkrankung hervorrufen.

Potentielle onkogene Eigenschaften von Cks1 außerhalb der SCF^{Skp2}-bezogenen Funktion wurden in einem doppeldefizienten Mausmodell untersucht. In einer c-Myc-getriebenen AML konnte gezeigt werden, dass proliferative Nachteile *Cks1*-defizienter Zellen auf unterdrückende Effekte von p27^{Kip1} zurückzuführen sind. Ebenfalls führte der simultane Verlust von *Cks1* und p27^{Kip1} in der L-gp130-induzierten Tumorgenese zu einer beschleunigten Erkrankung, die der p27^{Kip1}-defizienter Mäuse glich. Zusätzliche Cks1-abhängige Effekte im Verhalten der Tumorzellen konnten in diesem Modell nicht beobachtet werden.

Die Tumorgenese ist ein vielschichtiger Prozess durch den die Zellen die Fähigkeit erlangen, zelleigene Kontrollmechanismen zu umgehen. Obwohl Cks1 in dem hier verwendeten Modell nicht in der Lage war, Erkrankungen zu induzieren, ist das Protein Bestandteil zahlreicher SCF^{Skp2}-abhängiger und -unabhängiger zellregulatorischer Mechanismen wie der proliferativen Kontrolle, der *DNA damage response*, der Apoptose, der Seneszenz sowie der Migration und Dissemination. Dadurch erlangen neoplastische Zellen durch Überexpression des Zellzyklusregulators die Fähigkeit der unkontrollierten Prolife-

ration und der aggressiven Tumorausbreitung. Dies macht Cks1 trotz der fehlenden onkogenen Eigenschaften zu einem potentiellen Ziel zukünftiger Krebstherapien.

7 Literaturverzeichnis

Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 9, 400–414.

Adams, P.D. (2001). Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1471, M123–M133.

Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533–538.

Afshari, C.A., Nichols, M.A., Xiong, Y., and Mudryj, M. (1996). A role for a p21-E2F interaction during senescence arrest of normal human fibroblasts. *Cell Growth and Differentiation* 7, 979–988.

Arvai, A.S., Bourne, Y., Hickey, M.J., and Tainer, J.A. (1995). Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J. Mol. Biol.* 249, 835–842.

Auernhammer, C.J., Bousquet, C., and Melmed, S. (1999). Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: Characterization of the murine SOCS-3 promoter. *PNAS* 96, 6964–6969.

Banerjee, P., Crawford, L., Samuelson, E., and Feuer, G. (2010). Hematopoietic stem cells and retroviral infection. *Retrovirology* 7, 8.

Bannerji, R., and Byrd, J.C. (2000). Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 12, 22–29.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nat. Cell Biol.* 3, E95–98.

Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 792–804.

Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 26, 7773–7779.

Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864–870.

Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2004). Control of the SCFSkp2–Cks1 ubiquitin ligase by the APC/CCdh1 ubiquitin ligase. *Nature* 428, 190–193.

Bates, S., Bonetta, L., MacAllan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C., and Peters, G. (1994). CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9, 71–79.

Baudino, T.A., Maclean, K.H., Brennan, J., Parganas, E., Yang, C., Aslanian, A., Lees, J.A., Sherr, C.J., Roussel, M.F., and Cleveland, J.L. (2003). Myc-Mediated Proliferation and Lymphomagenesis, but Not Apoptosis, Are Compromised by E2f1 Loss. *Molecular Cell* 11, 905–914.

Bendjennat, M., Boulaire, J., Jascur, T., Brickner, H., Barbier, V., Sarasin, A., Fotedar, A., and Fotedar, R. (2003). UV Irradiation Triggers Ubiquitin-Dependent Degradation of p21WAF1 to Promote DNA Repair. *Cell* 114, 599–610.

Berland, R., and Wortis, H.H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 253–300.

Besson, A., Gurian-West, M., Chen, X., Kelly-Spratt, K.S., Kemp, C.J., and Roberts, J.M. (2006). A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev.* 20, 47–64.

Besson, A., Hwang, H.C., Cicero, S., Donovan, S.L., Gurian-West, M., Johnson, D., Clurman, B.E., Dyer, M.A., and Roberts, J.M. (2007). Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev.* 21, 1731–1746.

Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* 14, 159–169.

Bichi, R., Shinton, S.A., Martin, E.S., Koval, A., Calin, G.A., Cesari, R., Russo, G., Hardy, R.R., and Croce, C.M. (2002). Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6955–6960.

Blain, S.W., Montalvo, E., and Massagué, J. (1997). Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J. Biol. Chem.* 272, 25863–25872.

Bloom, J., and Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 13, 41–47.

- Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M., and Hershko, A. (2003). Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J. Biol. Chem.* *278*, 25752–25757.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* *18*, 5321–5333.
- Boumsell, L., Bernard, A., Lepage, V., Degos, L., Lemerle, J., and Dausset, J. (1978). Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *Eur. J. Immunol.* *8*, 900–904.
- Bourne, Y., Watson, M.H., Hickey, M.J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S.I., and Tainer, J.A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* *84*, 863–874.
- Brizuela, L., Draetta, G., and Beach, D. (1987). p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *EMBO J* *6*, 3507–3514.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell, J.E., Jr (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* *98*, 295–303.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* *377*, 552–557.
- Buonamici, S., Trimarchi, T., Ruocco, M.G., Reavie, L., Cathelin, S., Mar, B.G., Klinakis, A., Lukyanov, Y., Tseng, J.-C., Sen, F., et al. (2009). CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* *459*, 1000–1004.
- Cacciatore, M., Guarnotta, C., Calvaruso, M., Sangaletti, S., Florena, A.M., Franco, V., Colombo, M.P., and Tripodo, C. (2012). Microenvironment-Centred Dynamics in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Advances in Hematology* *2012*, 1–12.
- Campaner, S., Doni, M., Hydbring, P., Verrecchia, A., Bianchi, L., Sardella, D., Schleker, T., Perna, D., Tronnorsjö, S., Murga, M., et al. (2010). Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. *Nat. Cell Biol.* *12*, 54–59; sup pp 1–14.
- Cánepa, E.T., Scassa, M.E., Ceruti, J.M., Marazita, M.C., Carcagno, A.L., Sirkin, P.F., and Ogara, M.F. (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* *59*, 419–426.
- Carbone, A., Gloghini, A., and Dotti, G. (2008). EBV-Associated Lymphoproliferative Disorders: Classification and Treatment. *The Oncologist* *13*, 577–585.
- Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biology* *1*, 193–199.
- Chandramohan, V., Mineva, N.D., Burke, B., Jeay, S., Wu, M., Shen, J., Yang, W., Hann, S.R., and Sonenshein, G.E. (2008). c-Myc represses FOXO3a-mediated transcription of the

gene encoding the p27(Kip1) cyclin dependent kinase inhibitor. *J. Cell. Biochem.* *104*, 2091–2106.

Chang, B.D., Watanabe, K., Broude, E.V., Fang, J., Poole, J.C., Kalinichenko, T.V., and Roninson, I.B. (2000). Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 4291–4296.

Chang, H., Qi, X., Trieu, Y., Xu, W., Reader, J.C., Ning, Y., and Reece, D. (2006). Multiple myeloma patients with CKS1B gene amplification have a shorter progression-free survival post-autologous stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* *135*, 486–491.

Chang, H., Jiang, N., Jiang, H., Saha, M.N., Qi, C., Xu, W., and Reece, D. (2010). CKS1B nuclear expression is inversely correlated with p27Kip1 expression and is predictive of an adverse survival in patients with multiple myeloma. *Haematologica* *95*, 1542–1547.

Chellappan (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* *65*, 1053–1061.

Chen, Q., Xie, W., Kuhn, D.J., Voorhees, P.M., Lopez-Girona, A., Mendy, D., Corral, L.G., Krenitsky, V.P., Xu, W., Parseval, L.M., et al. (2008). Targeting the p27 E3 ligase SCFSkp2 results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy. *Blood* *111*, 4690–4699.

Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 1091–1096.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK “inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* *18*, 1571–1583.

Chiarle, R., Budel, L.M., Skolnik, J., Frizzera, G., Chilosi, M., Corato, A., Pizzolo, G., Magidson, J., Montagnoli, A., Pagano, M., et al. (2000). Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* *95*, 619–626.

Chiarle, R., Fan, Y., Piva, R., Boggino, H., Skolnik, J., Novero, D., Palestro, G., De Wolf-Peeters, C., Chilosi, M., Pagano, M., et al. (2002). S-Phase Kinase-Associated Protein 2 Expression in Non-Hodgkin’s Lymphoma Inversely Correlates with p27 Expression and Defines Cells in S Phase. *Am J Pathol* *160*, 1457–1466.

Chinnery, P.F., Samuels, D.C., Elson, J., and Turnbull, D.M. (2002). Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? *The Lancet* *360*, 1323–1325.

Chu, I.M., Hengst, L., and Slingerland, J.M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* *8*, 253–267.

- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS* *102*, 13944–13949.
- Cinti, C., Leoncini, L., Nyongo, A., Ferrari, F., Lazzi, S., Bellan, C., Vatti, R., Zamparelli, A., Cevenini, G., Tosi, G.M., et al. (2000). Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. *Am. J. Pathol.* *156*, 751–760.
- Coats, S., Whyte, P., Fero, M.L., Lacy, S., Chung, G., Randel, E., Firpo, E., and Roberts, J.M. (1999). A new pathway for mitogen-dependent Cdk2 regulation uncovered in p27Kip1-deficient cells. *Current Biology* *9*, 163–173.
- Collado, M., Medema, R.H., Garcia-Cao, I., Dubuisson, M.L., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B.M., Serrano, M., and Lam, E.W. (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J. Biol. Chem.* *275*, 21960–21968.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biology* *13*, 65–70.
- Cory, S. (1986). Activation Of Cellular Oncogenes in Hemopoietic Cells by Chromosome Translocation. In *Advances in Cancer Research*, George Klein and Sidney Weinhouse, ed. (Academic Press), pp. 189–234.
- Costa, R.H. (2005). FoxM1 dances with mitosis. *Nat. Cell Biol.* *7*, 108–110.
- Crans, H.N., and Sakamoto, K.M. (2001). Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia* *15*, 313–331.
- Cuadrado, M., Gutierrez-Martinez, P., Swat, A., Nebreda, A.R., and Fernandez-Capetillo, O. (2009). p27Kip1 stabilization is essential for the maintenance of cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cancer Res.* *69*, 8726–8732.
- D'Agnano, I., Valentini, A., Fornari, C., Bucci, B., Starace, G., Felsani, A., and Citro, G. (2001). Myc down-regulation induces apoptosis in M14 melanoma cells by increasing p27kip1 levels. *Oncogene* *20*, 2814–2825.
- Dalloul, A. (2009). CD5: A safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmunity Reviews* *8*, 349–353.
- Dehner, L.P.L. (1995). Here we go again: a new classification of malignant lymphomas. A viewpoint from the trenches. *Am J Clin Pathol* *103*, 539.
- Delmas, C., Aragou, N., Poussard, S., Cottin, P., Darbon, J.-M., and Manenti, S. (2003). MAP kinase-dependent degradation of p27Kip1 by calpains in choroidal melanoma cells. Requirement of p27Kip1 nuclear export. *J. Biol. Chem.* *278*, 12443–12451.

Deng, C., Zhang, P., Wade Harper, J., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice Lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684.

Denicourt, C., and Dowdy, S.F. (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev.* 18, 851–855.

Desai, D., Gu, Y., and Morgan, D.O. (1992). Activation of human cyclin-dependent kinases in vitro. *Mol Biol Cell* 3, 571–582.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N.S., Lam, E.W., Burgering, B.M., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., et al. (2000). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol. Cell. Biol.* 20, 9138–9148.

Dilworth, D., Liu, L., Stewart, A.K., Berenson, J.R., Lassam, N., and Hogg, D. (2000). Germline CDKN2A mutation implicated in predisposition to multiple myeloma. *Blood* 95, 1869–1871.

Dimanche-Boitrel, M.T., Micheau, O., Hammann, A., Haugg, M., Eymin, B., Chauffert, B., and Solary, E. (1998). Contribution of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 to the confluence-dependent resistance of HT29 human colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 77, 796–802.

Ding, M., Lu, L., and Toth, L.A. (2008). Gene expression in lung and basal forebrain during influenza infection in mice. *Genes Brain Behav.* 7, 173–183.

Drobnjak, M., Melamed, J., Taneja, S., Melzer, K., Wieczorek, R., Levinson, B., Zeleniuch-Jacquotte, A., Polsky, D., Ferrara, J., Perez-Soler, R., et al. (2003). Altered expression of p27 and Skp2 proteins in prostate cancer of African-American patients. *Clin. Cancer Res.* 9, 2613–2619.

Dulić, V., Lees, E., and Reed, S.I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257, 1958–1961.

Dunphy, W.G., Brizuela, L., Beach, D., and Newport, J. (1988). The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54, 423–431.

Duran-Struuck, R., and Dysko, R.C. (2009). Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in BMT Studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48, 11–22.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245–2262.

Eguchi, H., Carpentier, S., Kim, S.S., and Moss, S.F. (2004). p27kip1 regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*. *Gut* 53, 797–804.

- Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Cleveland, J.L. (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev.* 13, 2658–2669.
- Eischen, C.M., Packham, G., Nip, J., Fee, B.E., Hiebert, S.W., Zambetti, G.P., and Cleveland, J.L. (2001). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 20, 6983–6993.
- Elledge, S.J., Winston, J., and Harper, J.W. (1996). A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 6, 388–392.
- Erlanson, M., Portin, C., Linderholm, B., Lindh, J., Roos, G., and Landberg, G. (1998). Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood* 92, 770–777.
- Escribano, C., Delgado-Martín, C., and Rodríguez-Fernández, J.L. (2009). CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3beta. *J. Immunol.* 183, 6282–6295.
- Esposito, V., Baldi, A., De Luca, A., Groger, A.M., Loda, M., Giordano, G.G., Caputi, M., Baldi, F., Pagano, M., and Giordano, A. (1997). Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 57, 3381–3385.
- F Caligaris-Cappio (2000). Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 4, 5–21.
- Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., et al. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733–744.
- Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M., and Kemp, C.J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177–180.
- Fonseca, R., Van Wier, S.A., Chng, W.J., Ketterling, R., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Bergsagel, P.L., Rajkumar, S.V., Greipp, P.R., Litzow, M.R., et al. (2006). Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia* 20, 2034–2040.
- Frontini, M., Kukalev, A., Leo, E., Ng, Y.-M., Cervantes, M., Cheng, C.-W., Holic, R., Dormann, D., Tse, E., Pommier, Y., et al. (2012). The CDK Subunit CKS2 Counteracts CKS1 to Control Cyclin A/CDK2 Activity in Maintaining Replicative Fidelity and Neurodevelopment. *Developmental Cell* 23, 356–370.
- Fry, R.J.M. (1981). Experimental Radiation Carcinogenesis: What Have We Learned? *Radiation Research* 87, 224–239.
- Fujita, N., Sato, S., and Tsuruo, T. (2003). Phosphorylation of p27Kip1 at Threonine 198 by p90 Ribosomal Protein S6 Kinases Promotes Its Binding to 14-3-3 and Cytoplasmic Localization. *J. Biol. Chem.* 278, 49254–49260.

Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996). Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5, 449–460.

Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J.* 17, 6670–6677.

Fukushima, A., Yamaguchi, T., Ishida, W., Fukata, K., Taniguchi, T., Liu, F.-T., and Ueno, H. (2006). Genetic background determines susceptibility to experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis: comparison of Balb/c and C57BL/6 mice. *Exp. Eye Res.* 82, 210–218.

Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T.K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., and Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat. Cell Biol.* 3, 321–324.

Gartel, A.L., and Tyner, A.L. (1999). Transcriptional Regulation of the p21(WAF1/CIP1)Gene. *Experimental Cell Research* 246, 280–289.

Gartel, A.L., and Tyner, A.L. (2002). The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis 1 Supported in part by NIH Grant R01 DK56283 (to A. L. T.) for the p21 research and Campus Research Board and Illinois Department of Public Health Penny Severns Breast and Cervical Cancer grants (to A. L. G.).1. *Mol Cancer Ther* 1, 639–649.

Gaubatz, S., Lindeman, G.J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J.R., Livingston, D.M., and Rempel, R.E. (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol. Cell* 6, 729–735.

Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54, 433–439.

Gavet, O., and Pines, J. (2010). Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol* 189, 247–259.

Griffin, D.O., Holodick, N.E., and Rothstein, T.L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. *J Exp Med* 208, 67–80.

Gstaiger, M., Jordan, R., Lim, M., Catzavelos, C., Mestan, J., Slingerland, J., and Krek, W. (2001). Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *PNAS* 98, 5043–5048.

Guo, H., Tian, T., Nan, K., and Wang, W. (2010). p57: A multifunctional protein in cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 36, 1321–1329.

Hadwiger, J.A., Wittenberg, C., Mendenhall, M.D., and Reed, S.I. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* Cks1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2034–2041.

- Hamel, P.A., Gill, R.M., Phillips, R.A., and Gallie, B.L. (1992). Transcriptional repression of the E2-containing promoters E1aE, c-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene. *Mol Cell Biol* 12, 3431–3438.
- Hamilton, D.L., and Abremski, K. (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J. Mol. Biol.* 178, 481–486.
- Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2393–2409.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859–869.
- Hattori, T., Kitagawa, K., Uchida, C., Oda, T., and Kitagawa, M. (2003). Cks1 is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway in a cell cycle-dependent manner. *Genes Cells* 8, 889–896.
- Hayles, J., Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1986). The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol. Gen. Genet.* 202, 291–293.
- Hayward, W.S., Neel, B.G., and Astrin, S.M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* 290, 475–480.
- He, G., Kuang, J., Huang, Z., Koomen, J., Kobayashi, R., Khokhar, A.R., and Siddik, Z.H. (2006). Upregulation of p27 and its inhibition of CDK2/cyclin E activity following DNA damage by a novel platinum agent are dependent on the expression of p21. *British Journal of Cancer* 95, 1514–1524.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334 (Pt 2), 297–314.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20.
- Helbig, G., Christopherson, K.W., 2nd, Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K.D., Broxmeyer, H.E., and Nakshatri, H. (2003). NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 278, 21631–21638.
- Hengst, L., and Reed, S.I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271, 1861–1864.
- Hengst, L., Dulic, V., Slingerland, J.M., Lees, E., and Reed, S.I. (1994). A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5291–5295.

- Herling, M., Patel, K.A., Khalili, J., Schlette, E., Kobayashi, R., Medeiros, L.J., and Jones, D. (2006). TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 20, 280–285.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O’Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F., et al. (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *PNAS* 97, 2229–2234.
- Hershko, A. (1997). Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 788–799.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761–807.
- Hershko, D., Bornstein, G., Ben-Izhak, O., Carrano, A., Pagano, M., Krausz, M.M., and Hershko, A. (2001). Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 91, 1745–1751.
- Hibi, M., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.* 74, 1–12.
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* 16, 249–284.
- Hock, R.A., and Miller, A.D. (1986). Retrovirus-mediated transfer and expression of drug resistance genes in human haematopoietic progenitor cells. *Nature* 320, 275–277.
- Hoellein, A., Graf, S., Bassermann, F., Schoeffmann, S., Platz, U., Hölzlwimmer, G., Kröger, M., Peschel, C., Oostendorp, R., Quintanilla-Fend, L., et al. (2012). Cks1 promotion of S phase entry and proliferation is independent of p27Kip1 suppression. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2416–2427.
- Hoffman, B., Amanullah, A., Shafarenko, M., and Liebermann, D.A. (2002). The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene* 21, 3414–3421.
- Hogge, D.E., and Humphries, R.K. (1987). Gene transfer to primary normal and malignant human hemopoietic progenitors using recombinant retroviruses. *Blood* 69, 611–617.
- Högstrand, K., Hejll, E., Sander, B., Rozell, B., Larsson, L.-G., and Grandien, A. (2012). Inhibition of the intrinsic but not the extrinsic apoptosis pathway accelerates and drives MYC-driven tumorigenesis towards acute myeloid leukemia. *PLoS ONE* 7, e31366.
- Inui, N., Kitagawa, K., Miwa, S., Hattori, T., Chida, K., Nakamura, H., and Kitagawa, M. (2003). High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 978–984.
- Itzhaki, J.E., Gilbert, C.S., and Porter, A.C.G. (1997). Construction by gene targeting in human cells of a “conditional” CDC2 mutant that rereplicates its DNA. *Nature Genetics* 15, 258–265.

- Jenkins, B.J., Roberts, A.W., Najdovska, M., Grail, D., and Ernst, M. (2005). The threshold of gp130-dependent STAT3 signaling is critical for normal regulation of hematopoiesis. *Blood* *105*, 3512–3520.
- Jentsch, S. (1992). The Ubiquitin-Conjugation System. *Annual Review of Genetics* *26*, 179–207.
- Joaquin, M., Gubern, A., González-Nuñez, D., Josué Ruiz, E., Ferreiro, I., de Nadal, E., Nebreda, A.R., and Posas, F. (2012). The p57 CDKi integrates stress signals into cell-cycle progression to promote cell survival upon stress. *EMBO J* *31*, 2952–2964.
- Jones, N.C., Fedorov, Y.V., Rosenthal, R.S., and Olwin, B.B. (2001). ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J. Cell. Physiol.* *186*, 104–115.
- Jung, Y.-S., Qian, Y., and Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular Signalling* *22*, 1003–1012.
- Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2003). Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 10231–10236.
- Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2004). Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1229–1235.
- Kardava, L., Yang, Q., St Leger, A., Foon, K.A., Lentzsch, S., Vallejo, A.N., Milcarek, C., and Borghesi, L. (2011). The B lineage transcription factor E2A regulates apoptosis in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Int. Immunol.* *23*, 375–384.
- Katayose, Y., Kim, M., Rakkar, A.N., Li, Z., Cowan, K.H., and Seth, P. (1997). Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res.* *57*, 5441–5445.
- Kato, J.Y., Matsuoka, M., Strom, D.K., and Sherr, C.J. (1994). Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 2713–2721.
- Kawamata, N., Morosetti, R., Miller, C.W., Park, D., Spirin, K.S., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Hatta, Y., Simpson, J., and Wilczynski, S. (1995). Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res.* *55*, 2266–2269.
- Kay, N.E., Shanafelt, T.D., Strege, A.K., Lee, Y.K., Bone, N.D., and Raza, A. (2007). Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an “angiogenic switch.” *Leuk. Res.* *31*, 899–906.
- Keating, M.J. (1999). Chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* *26*, 107–114.

Keller, U.B., Old, J.B., Dorsey, F.C., Nilsson, J.A., Nilsson, L., MacLean, K.H., Chung, L., Yang, C., Spruck, C., Boyd, K., et al. (2007). Myc targets Cks1 to provoke the suppression of p27Kip1, proliferation and lymphomagenesis. *EMBO J.* 26, 2562–2574.

Kim, J.-W., Ferris, R.L., and Whiteside, T.L. (2005). Chemokine C receptor 7 expression and protection of circulating CD8⁺ T lymphocytes from apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 11, 7901–7910.

King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., and Kirschner, M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652–1659.

Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., and Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243–1254.

Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.-G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., et al. (1998). Expression of Apoptosis-Regulating Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia: Correlations With In Vitro and In Vivo Chemoresponses. *Blood* 91, 3379–3389.

Kitajima, S., Kudo, Y., Ogawa, I., Bashir, T., Kitagawa, M., Miyauchi, M., Pagano, M., and Takata, T. (2004). Role of Cks1 Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Am J Pathol* 165, 2147–2155.

Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999). STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J. Exp. Med.* 189, 63–73.

Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721–732.

Klein, G., and Klein, E. (1985). Myc/Ig juxtaposition by chromosomal translocations: some new insights, puzzles and paradoxes. *Immunology Today* 6, 208–215.

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., and Roberts, J.M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257, 1689–1694.

Komata, T., Kanzawa, T., Takeuchi, H., Germano, I.M., Schreiber, M., Kondo, Y., and Kondo, S. (2003). Antitumour effect of cyclin-dependent kinase inhibitors (p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1) on malignant glioma cells. *British Journal of Cancer* 88, 1277–1280.

De Koning, J.P., Soede-Bobok, A.A., Schelen, A.M., Smith, L., van Leeuwen, D., Santini, V., Burgering, B.M., Bos, J.L., Lowenberg, B., and Touw, I.P. (1998). Proliferation signaling and activation of Shc, p21Ras, and Myc via tyrosine 764 of human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood* 91, 1924–1933.

- De Koning, J.P., Soede-Bobok, A.A., Ward, A.C., Schelen, A.M., Antonissen, C., van Leeuwen, D., Löwenberg, B., and Touw, I.P. (2000). STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene* 19, 3290–3298.
- Kortylewski, M., Heinrich, P.C., Mackiewicz, A., Schniertshauer, U., Klingmüller, U., Nakajima, K., Hirano, T., Horn, F., and Behrmann, I. (1999). Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 18, 3742–3753.
- Kossatz, U., Dietrich, N., Zender, L., Buer, J., Manns, M.P., and Malek, N.P. (2004). Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev.* 18, 2602–2607.
- Krappmann, D., Wegener, E., Sunami, Y., Esen, M., Thiel, A., Mordmüller, B., and Scheidereit, C. (2004). The I κ B Kinase Complex and NF- κ B Act as Master Regulators of Lipopolysaccharide-Induced Gene Expression and Control Subordinate Activation of AP-1. *Mol Cell Biol* 24, 6488–6500.
- Kroy, D.C., Hebing, L., Sander, L.E., Gassler, N., Erschfeld, S., Sackett, S., Galm, O., Trautwein, C., and Streetz, K.L. (2012). Differential Role of gp130-Dependent STAT and Ras Signalling for Haematopoiesis Following Bone-Marrow Transplantation. *PLoS One* 7.
- Kudo, Y., Kitajima, S., Sato, S., Miyauchi, M., Ogawa, I., and Takata, T. (2001). High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 61, 7044–7047.
- Kuperwasser, C., Hurlbut, G.D., Kittrell, F.S., Dickinson, E.S., Laucirica, R., Medina, D., Naber, S.P., and Jerry, D.J. (2000). Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *Am. J. Pathol.* 157, 2151–2159.
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11, 847–862.
- Lan, Y., Zhang, Y., Wang, J., Lin, C., Ittmann, M.M., and Wang, F. (2008). Aberrant expression of Cks1 and Cks2 contributes to prostate tumorigenesis by promoting proliferation and inhibiting programmed cell death. *Int J Cancer* 123, 543–551.
- Latres, E., Chiarle, R., Schulman, B.A., Pavletich, N.P., Pellicer, A., Inghirami, G., and Pagano, M. (2001). Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2515–2520.
- Leder, P., Battey, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T., and Taub, R. (1983). Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222, 765–771.

- Lee, C., Raz, R., Gimeno, R., Gertner, R., Wistinghausen, B., Takeshita, K., DePinho, R.A., and Levy, D.E. (2002). STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* *17*, 63–72.
- Lee, E.-K., Kim, D.-G., Kim, J.-S., and Yoon, Y. (2011). Cell-cycle regulator Cks1 promotes hepatocellular carcinoma by supporting NF- κ B-dependent expression of interleukin-8. *Cancer Res.* *71*, 6827–6835.
- Levens, J.M., Gordon, J., and Gregory, C.D. (2000). Micro-environmental factors in the survival of human B-lymphoma cells. *Cell Death Differ.* *7*, 59–69.
- Lew, D.J., Dulić, V., and Reed, S.I. (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* *66*, 1197–1206.
- Li, C., and Jin, J. (2010). DNA replication licensing control and rereplication prevention. *Protein Cell* *1*, 227–236.
- Li, M., Lin, Y.-M., Hasegawa, S., Shimokawa, T., Murata, K., Kameyama, M., Ishikawa, O., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nakamura, Y., et al. (2004). Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int. J. Oncol.* *24*, 305–312.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.-H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., et al. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat. Med.* *8*, 1153–1160.
- Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., et al. (2007). The energy sensing LKB1–AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology* *9*, 218–224.
- Liberal, V., Martinsson-Ahlzén, H.-S., Liberal, J., Spruck, C.H., Widschwendter, M., McGowan, C.H., and Reed, S.I. (2012). Cyclin-dependent kinase subunit (Cks) 1 or Cks2 overexpression overrides the DNA damage response barrier triggered by activated oncoproteins. *PNAS* *109*, 2754–2759.
- Lin, H.-K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S.-W., Chan, C.-H., Chan, C.-H., Yang, W.-L., Wang, J., Egia, A., et al. (2010). Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* *464*, 374–379.
- Liontos, M., Velimezi, G., Pateras, I.S., Angelopoulou, R., Papavassiliou, A.G., Bartek, J., and Gorgoulis, V.G. (2010). The roles of p27Kip1 and DNA damage signalling in the chemotherapy-induced delayed cell cycle checkpoint. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* *14*, 2264–2267.
- Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., and Piwnicka-Worms, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 571–583.

- Liu, F.-Y., Zhao, Z.-J., Li, P., Ding, X., Zong, Z.-H., and Sun, C.-F. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the survival of cells mediated by chemokine receptor 7 through PI3K/Akt in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Oral Maxillofac Surg* 48, 291–296.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338.
- Luo, H., Li, Q., O’Neal, J., Kreisel, F., Le Beau, M.M., and Tomasson, M.H. (2005). C-Myc Rapidly Induces Acute Myeloid Leukemia in Mice Without Evidence of Lymphoma-Associated Antiapoptotic Mutations. *Blood* 106, 2452–2461.
- Lwin, T., Hazlehurst, L.A., Li, Z., Dessureault, S., Sotomayor, E., Moscinski, L.C., Dalton, W.S., and Tao, J. (2007). Bone marrow stromal cells prevent apoptosis of lymphoma cells by upregulation of anti-apoptotic proteins associated with activation of NF-kappaB (RelB/p52) in non-Hodgkin’s lymphoma cells. *Leukemia* 21, 1521–1531.
- Malek, N.P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakidis, T.R., and Roberts, J.M. (2001). A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature* 413, 323–327.
- Maller, J.L., Roy, L.M., and Izumi, T. (1991). Cell Cycle and Mitotic Control in *Xenopus* Eggs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 56, 533–538.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 630–641.
- Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M., and Krek, W. (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF^{SKP2} and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat. Cell Biol.* 1, 14–19.
- Martins, C.P., and Berns, A. (2002). Loss of p27Kip1 but not p21Cip1 decreases survival and synergizes with MYC in murine lymphomagenesis. *The EMBO Journal* 21, 3739–3748.
- Martinsson-Ahlzén, H.-S., Liberal, V., Grünenfelder, B., Chaves, S.R., Spruck, C.H., and Reed, S.I. (2008). Cyclin-Dependent Kinase-Associated Proteins Cks1 and Cks2 Are Essential during Early Embryogenesis and for Cell Cycle Progression in Somatic Cells. *Mol Cell Biol* 28, 5698–5709.
- Masuda, A., Osada, H., Yatabe, Y., Kozaki, K., Tatematsu, Y., Takahashi, T., Hida, T., Takahashi, T., and Takahashi, T. (2001). Protective Function of p27KIP1 against Apoptosis in Small Cell Lung Cancer Cells in Unfavorable Microenvironments. *Am J Pathol* 158, 87–96.
- Masuda, T., Inoue, H., Sonoda, H., Mine, S., Yoshikawa, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.-I., and Mori, M. (2002). Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant

phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res.* 62, 3819–3825.

Masuda, T.-A., Inoue, H., Nishida, K., Sonoda, H., Yoshikawa, Y., Kakeji, Y., Utsunomiya, T., and Mori, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9, 5693–5698.

Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 9, 262–271.

Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9, 650–662.

Matsushime, H., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1991). Novel mammalian cyclins (CYL genes) expressed during G1. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56, 69–74.

Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71, 323–334.

Matthess, Y., Raab, M., Sanhaji, M., Lavrik, I.N., and Strebhardt, K. (2010). Cdk1/Cyclin B1 Controls Fas-Mediated Apoptosis by Regulating Caspase-8 Activity. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5726–5740.

Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227–3239.

Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14, 2077–2086.

Miething, C., Grundler, R., Fend, F., Hoepfl, J., Mugler, C., von Schilling, C., Morris, S.W., Peschel, C., and Duyster, J. (2003). The oncogenic fusion protein nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) induces two distinct malignant phenotypes in a murine retroviral transplantation model. *Oncogene* 22, 4642–4647.

Millard, S.S., Yan, J.S., Nguyen, H., Pagano, M., Kiyokawa, H., and Koff, A. (1997). Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J. Biol. Chem.* 272, 7093–7098.

Miller, D.G., Adam, M.A., and Miller, A.D. (1990a). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4239–4242.

Miller, R.H., Girones, R., Cote, P.J., Hornbuckle, W.E., Chestnut, T., Baldwin, B.H., Korba, B.E., Tennant, B.C., Gerin, J.L., and Purcell, R.H. (1990b). Evidence against a requisite role for defective virus in the establishment of persistent hepadnavirus infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9329–9332.

- Minami, M., Inoue, M., Wei, S., Takeda, K., Matsumoto, M., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 3963–3966.
- Mock, B.A., Krall, M.M., and Dosik, J.K. (1993). Genetic mapping of tumor susceptibility genes involved in mouse plasmacytomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 9499–9503.
- Moffat, J., Huang, D., and Andrews, B. (2000). Functions of Pho85 cyclin-dependent kinases in budding yeast. *Prog Cell Cycle Res* *4*, 97–106.
- Möhle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M.A., Brugger, W., and Kanz, L. (1998). The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* *91*, 4523–4530.
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* *129*, 665–679.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A.C., Draetta, G.F., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev.* *13*, 1181–1189.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* *374*, 131–134.
- Morinaga, Y., Suzuki, H., Takatsuki, F., Akiyama, Y., Taniyama, T., Matsushima, K., and Onozaki, K. (1989). Contribution of IL-6 to the antiproliferative effect of IL-1 and tumor necrosis factor on tumor cell lines. *J. Immunol.* *143*, 3538–3542.
- Morosétti, R., Kawamata, N., Gombart, A.F., Miller, C.W., Hatta, Y., Hiramata, T., Said, J.W., Tomonaga, M., and Koeffler, H.P. (1995). Alterations of the p27KIP1 gene in non-Hodgkin's lymphomas and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* *86*, 1924–1930.
- Morris, M.C., Heitz, F., and Divita, G. (1998). Kinetics of dimerization and interactions of p13suc1 with cyclin-dependent kinases. *Biochemistry* *37*, 14257–14266.
- Morris, M.C., Kaiser, P., Rudyak, S., Baskerville, C., Watson, M.H., and Reed, S.I. (2003). Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* *423*, 1009–1013.
- Motti, M.L., De Marco, C., Califano, D., Fusco, A., and Viglietto, G. (2004). Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in breast cancer. *Cell Cycle* *3*, 1074–1080.
- Mraz, M., Zent, C.S., Church, A.K., Jelinek, D.F., Wu, X., Pospisilova, S., Ansell, S.M., Novak, A.J., Kay, N.E., Witzig, T.E., et al. (2011). Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br. J. Haematol.* *155*, 53–64.

Murray, A.W. (1994). Cyclin-dependent kinases: regulators of the cell cycle and more. *Chemistry & Biology 1*, 191–195.

Nakajima, K., Yamanaka, Y., Nakae, K., Kojima, H., Ichiba, M., Kiuchi, N., Kitaoka, T., Fukada, T., Hibi, M., and Hirano, T. (1996). A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J. 15*, 3651–3658.

Nakanishi, M., Robetorye, R.S., Adami, G.R., Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R. (1995). Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *EMBO J 14*, 555–563.

Nakayama, K., and Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays 20*, 1020–1029.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., and Nakayama, K. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell 85*, 707–720.

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., et al. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J. 19*, 2069–2081.

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K.I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev. Cell 6*, 661–672.

Nesbit, C.E., Tersak, J.M., and Prochownik, E.V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene 18*, 3004–3016.

Nevins, J.R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science 258*, 424–429.

Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massague, J., Crabtree, G.R., and Roberts, J.M. (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature 372*, 570–573.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature 344*, 503–508.

O'Hagan, R.C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I.M., Alt, F.W., Kaelin, W.G., and DePinho, R.A. (2000). Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev 14*, 2185–2191.

Ohtani, M., Isozaki, H., Fujii, K., Nomura, E., Niki, M., Mabuchi, H., Nishiguchi, K., Toyoda, M., Ishibashi, T., and Tanigawa, N. (1999). Impact of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and apoptosis in tumor cells on the overall survival of patients with non-early stage gastric carcinoma. *Cancer 85*, 1711–1718.

- Old, J.B., Kratzat, S., Hoellein, A., Graf, S., Nilsson, J.A., Nilsson, L., Nakayama, K.I., Peschel, C., Cleveland, J.L., and Keller, U.B. (2010). Skp2 Directs Myc-Mediated Suppression of p27Kip1 yet Has Modest Effects on Myc-Driven Lymphomagenesis. *Mol Cancer Res* 8, 353–362.
- Ongkeko, W., Ferguson, D.J., Harris, A.L., and Norbury, C. (1995). Inactivation of Cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *J. Cell. Sci.* 108 (Pt 8), 2897–2904.
- Oostendorp, R.A.J., Harvey, K.N., Kusadasi, N., De Bruijn, M.F.T.R., Saris, C., Ploemacher, R.E., Medvinsky, A.L., and Dzierzak, E.A. (2002). Stromal Cell Lines from Mouse Aorta-Gonads-Mesonephros Subregions Are Potent Supporters of Hematopoietic Stem Cell Activity. *Blood* 99, 1183–1189.
- Oster, S.K., Ho, C.S.W., Soucie, E.L., and Penn, L.Z. (2002). The myc oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv. Cancer Res.* 84, 81–154.
- Pagano, M. (1997). Cell Cycle Regulation by the Ubiquitin Pathway. *FASEB J* 11, 1067–1075.
- Pagano, M., and Benmaamar, R. (2003). When protein destruction runs amok, malignancy is on the loose. *Cancer Cell* 4, 251–256.
- Pagano, M., and Draetta, G. (1991). Cyclin A, cell cycle control and oncogenesis. *Prog. Growth Factor Res.* 3, 267–277.
- Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682–685.
- Pals, S.T., Gorter, D.J.J. de, and Spaargaren, M. (2007). Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood* 110, 3102–3111.
- Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603–608.
- Parker, L.L., and Piwnicka-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257, 1955–1957.
- Pateras, I.S., Apostolopoulou, K., Niforou, K., Kotsinas, A., and Gorgoulis, V.G. (2009). p57KIP2: “Kip”ing the cell under control. *Mol. Cancer Res.* 7, 1902–1919.
- Patra, D., and Dunphy, W.G. (1996). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev.* 10, 1503–1515.
- Patra, D., and Dunphy, W.G. (1998). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev.* 12, 2549–2559.
- Payne, G.S., Bishop, J.M., and Varmus, H.E. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* 295, 209–214.

Payne, S.R., Zhang, S., Tsuchiya, K., Moser, R., Gurley, K.E., Longton, G., deBoer, J., and Kemp, C.J. (2008). p27kip1 Deficiency Impairs G2/M Arrest in Response to DNA Damage, Leading to an Increase in Genetic Instability. *Mol Cell Biol* 28, 258–268.

Pekarsky, Y., Calin, G.A., and Aqeilan, R. (2005). Chronic lymphocytic leukemia: molecular genetics and animal models. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 294, 51–70.

Perez-Roger, I., Kim, S.-H., Griffiths, B., Sewing, A., and Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate Myc-induced proliferation via sequestration of p27Kip1 and p21Cip1. *The EMBO Journal* 18, 5310–5320.

Peters, M., Blinn, G., Solem, F., Fischer, M., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Rose-John, S. (1998). In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J. Immunol.* 161, 3575–3581.

Petrocelli, T., and Slingerland, J. (2000). UVB induced cell cycle checkpoints in an early stage human melanoma line, WM35. *Oncogene* 19, 4480–4490.

Philipp-Staheli, J., Kim, K.-H., Payne, S.R., Gurley, K.E., Liggitt, D., Longton, G., and Kemp, C.J. (2002). Pathway-specific tumor suppression. Reduction of p27 accelerates gastrointestinal tumorigenesis in Apc mutant mice, but not in Smad3 mutant mice. *Cancer Cell* 1, 355–368.

Pietenpol, J.A., Bohlander, S.K., Sato, Y., Papadopoulos, N., Liu, B., Friedman, C., Trask, B.J., Roberts, J.M., Kinzler, K.W., and Rowley, J.D. (1995). Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res.* 55, 1206–1210.

Pigazzi, M., Ricotti, E., Germano, G., Faggian, D., Aricò, M., and Basso, G. (2007). cAMP response element binding protein (CREB) overexpression CREB has been described as critical for leukemia progression. *Haematologica* 92, 1435–1437.

Pines, J. (1993). Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends Biochem. Sci.* 18, 195–197.

Pines, J. (1996). Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr. Biol.* 6, 1399–1402.

Plate, J.M., Petersen, K.S., Buckingham, L., Shahidi, H., and Schofield, C.M. (2000). Gene expression in chronic lymphocytic leukemia B cells and changes during induction of apoptosis. *Exp. Hematol.* 28, 1214–1224.

Polinko, E.S., and Strome, S. (2000). Depletion of a Cks homolog in *C. elegans* embryos uncovers a post-metaphase role in both meiosis and mitosis. *Curr. Biol.* 10, 1471–1474.

Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8, 9–22.

Ponce-Castañeda, M.V., Lee, M.H., Latres, E., Polyak, K., Lacombe, L., Montgomery, K., Mathew, S., Krauter, K., Sheinfeld, J., and Massague, J. (1995). p27Kip1: chromosomal

- mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res.* 55, 1211–1214.
- Pospiech, H., Grosse, F., and Pisani, F.M. (2010). The initiation step of eukaryotic DNA replication. *Subcell. Biochem.* 50, 79–104.
- Potter, M., Sanford, K.K., Parshad, R., Huppi, K., and Mock, B. (1988). Susceptibility and resistance to plasmacytomagenesis: possible role of genes that modify efficiency of chromatin repair. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 137, 289–294.
- Radulovic, M., Crane, E., Crawford, M., Godovac-Zimmermann, J., and Yu, V.P.C.C. (2010). CKS Proteins Protect Mitochondrial Genome Integrity by Interacting with Mitochondrial Single-stranded DNA-binding Protein. *Mol Cell Proteomics* 9, 145–152.
- Reed, S.I. (1997). Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* 29, 7–23.
- Rehm, A., Mensen, A., Schradi, K., Gerlach, K., Wittstock, S., Winter, S., Büchner, G., Dörken, B., Lipp, M., and Höpken, U.E. (2011). Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs. *Blood* 118, 1020–1033.
- Reynard, G.J., Reynolds, W., Verma, R., and Deshaies, R.J. (2000). Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5858–5864.
- Reynisdóttir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massagué, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 9, 1831–1845.
- Richardson, H.E., Stueland, C.S., Thomas, J., Russell, P., and Reed, S.I. (1990). Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* 4, 1332–1344.
- Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G.F., Pagano, M., and Meloche, S. (2001). p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J* 20, 6672–6682.
- Rudner, A.D., and Murray, A.W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J. Cell Biol.* 149, 1377–1390.
- Sakamoto, K.M., and Frank, D.A. (2009). CREB in the Pathophysiology of Cancer: Implications for Targeting Transcription Factors for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 15, 2583–2587.
- Salin, H., Ricoul, M., Morat, L., and Sabatier, L. (2009). Increased genomic alteration complexity and telomere shortening in B-CLL cells resistant to radiation-induced apoptosis. *Cytogenet Genome Res* 122, 343–349.

Sanhes, L., Tang, R., Delmer, A., DeCaprio, J.A., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (2003). Fludarabine-induced apoptosis of B chronic lymphocytic leukemia cells includes early cleavage of p27kip1 by caspases. *Leukemia* 17, 1104–1111.

Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Cáceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448, 811–815.

Sato, Y., Suto, Y., Pietenpol, J., Golub, T.R., Gilliland, D.G., Davis, E.M., Beau, M.L., Roberts, J.M., Vogelstein, B., and Rowley, J.D. (1995). TEL and KIP1 define the smallest region of deletions on 12p13 in hematopoietic malignancies. *Blood* 86, 1525–1533.

Schaffer, B.E., Park, K.-S., Yiu, G., Conklin, J.F., Lin, C., Burkhart, D.L., Karnezis, A.N., Sweet-Cordero, E.A., and Sage, J. (2010). Loss of p130 accelerates tumor development in a mouse model for human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 70, 3877–3883.

Schuster, C., Berger, A., Hoelzl, M.A., Putz, E.M., Frenzel, A., Simma, O., Moritz, N., Hoelbl, A., Kovacic, B., Freissmuth, M., et al. (2011). The cooperating mutation or “second hit” determines the immunologic visibility toward MYC-induced murine lymphomas. *Blood* 118, 4635–4645.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 14, 2501–2514.

Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704–707.

Serres, M.P., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Concha, C., Gurian-West, M., Daburon, V., Roberts, J.M., and Besson, A. (2011). Cytoplasmic p27 is oncogenic and cooperates with Ras both in vivo and in vitro. *Oncogene* 30, 2846–2858.

Shadel, G.S. (2008). Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology. *Am. J. Pathol.* 172, 1445–1456.

Shankar, D.B., Cheng, J.C., Kinjo, K., Federman, N., Moore, T.B., Gill, A., Rao, N.P., Landaw, E.M., and Sakamoto, K.M. (2005). The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 7, 351–362.

Shapira, M., Ben-Izhak, O., Bishara, B., Futerman, B., Minkov, I., Krausz, M.M., Pagano, M., and Hershko, D.D. (2004). Alterations in the expression of the cell cycle regulatory protein cyclin kinase subunit 1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 100, 1615–1621.

Shapira, M., Ben-Izhak, O., Linn, S., Futerman, B., Minkov, I., and Hershko, D.D. (2005). The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 103, 1336–1346.

Shapira, M., Ben-Izhak, O., Slotky, M., Goldin, O., Lahav-Baratz, S., and Hershko, D.D. (2006). Expression of the ubiquitin ligase subunit cyclin kinase subunit 1 and its relationship to S-phase kinase protein 2 and p27Kip1 in prostate cancer. *J. Urol.* 176, 2285–2289.

- Shaughnessy, J. (2005). Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology 10 Suppl 1*, 117–126.
- Shaw, A.C., Swat, W., Davidson, L., and Alt, F.W. (1999). Induction of Ig light chain gene rearrangement in heavy chain-deficient B cells by activated Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 2239–2243.
- Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M., and Clurman, B.E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* *11*, 1464–1478.
- Sherr, C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* *73*, 1059–1065.
- Sherr, C.J. (1994). The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol.* *4*, 15–18.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* *9*, 1149–1163.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* *13*, 1501–1512.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* *18*, 2699–2711.
- Shi, L., Wang, S., Zangari, M., Xu, H., Cao, T.M., Xu, C., Wu, Y., Xiao, F., Liu, Y., Yang, Y., et al. (2010). Over-expression of CKS1B activates both MEK/ERK and JAK/STAT3 signaling pathways and promotes myeloma cell drug -resistance. *Oncotarget* *1*, 22–33.
- Shim, E.-H., Johnson, L., Noh, H.-L., Kim, Y.-J., Sun, H., Zeiss, C., and Zhang, H. (2003). Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia, dysplasia, and low-grade carcinoma in the mouse prostate. *Cancer Res.* *63*, 1583–1588.
- Shintani, S., Li, C., Mihara, M., Hino, S., Nakashiro, K.-I., and Hamakawa, H. (2003). Skp2 and Jab1 expression are associated with inverse expression of p27(KIP1) and poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oncology* *65*, 355–362.
- Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J.M.M., Shima, D.T., Hibi, M., and Hirano, T. (1999). Synergistic Roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-Mediated Cell Cycle Progression and Antiapoptosis. *Immunity* *11*, 709–719.
- Sieklucka, M., Pozarowski, P., Bojarska-Junak, A., Hus, I., Dmoszynska, A., and Rolinski, J. (2008). Apoptosis in B-CLL: the relationship between higher ex vivo spontaneous apoptosis before treatment in III-IV Rai stage patients and poor outcome. *Oncol. Rep.* *19*, 1611–1620.
- Signoretto, S., Di Marcotullio, L., Richardson, A., Ramaswamy, S., Isaac, B., Rue, M., Monti, F., Loda, M., and Pagano, M. (2002). Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* *110*, 633–641.

Sitry, D., Seeliger, M.A., Ko, T.K., Ganoth, D., Breward, S.E., Itzhaki, L.S., Pagano, M., and Hershko, A. (2002). Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *J. Biol. Chem.* 277, 42233–42240.

Slingerland, J., and Pagano, M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J. Cell. Physiol.* 183, 10–17.

Slingerland, J.M., Hengst, L., Pan, C.H., Alexander, D., Stampfer, M.R., and Reed, S.I. (1994). A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3683–3694.

Slotky, M., Shapira, M., Ben-Izhak, O., Linn, S., Futerman, B., Tsalic, M., and Hershko, D.D. (2005). The expression of the ubiquitin ligase subunit Cks1 in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 7, R737–744.

Soeiro, I., Mohamedali, A., Romanska, H.M., Lea, N.C., Child, E.S., Glassford, J., Orr, S.J., Roberts, C., Naresh, K.N., Lalani, E.-N., et al. (2006). p27Kip1 and p130 Cooperate To Regulate Hematopoietic Cell Proliferation In Vivo. *Mol Cell Biol* 26, 6170–6184.

Solomon, M.J., Lee, T., and Kirschner, M.W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* 3, 13–27.

Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A.P., Ryan, A., Krek, T.W., and Reed, S.I. (2001). A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol. Cell* 7, 639–650.

Stark, G.R., and Taylor, W.R. (2006). Control of the G2/M transition. *Mol. Biotechnol.* 32, 227–248.

Starostina, N.G., and Kipreos, E.T. (2012). Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends in Cell Biology* 22, 33–41.

Steinman, R.A., Lu, Y., Yaroslavskiy, B., and Stehle, C. (2001). Cell cycle-independent upregulation of p27Kip1 by p21Waf1 in K562 cells. *Oncogene* 20, 6524–6530.

Stiegler, P., and Giordano, A. (2001). The family of retinoblastoma proteins. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 11, 59–76.

Strausfeld, U., Labbé, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., and Dorée, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 351, 242–245.

Stuhlmann-Laeisz, C., Lang, S., Chalaris, A., Krzysztof, P., Enge, S., Eichler, J., Klingmüller, U., Samuel, M., Ernst, M., Rose-John, S., et al. (2006). Forced Dimerization of gp130 Leads to Constitutive STAT3 Activation, Cytokine-independent Growth, and Blockade of Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Mol Biol Cell* 17, 2986–2995.

Suen, D.-F., Norris, K.L., and Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 22, 1577–1590.

- Sugihara, E., Kanai, M., Saito, S., Nitta, T., Toyoshima, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Fukasawa, K., Schwab, M., Saya, H., et al. (2006). Suppression of Centrosome Amplification after DNA Damage Depends on p27 Accumulation. *Cancer Res* 66, 4020–4029.
- Supriatno, Harada, K., Kawaguchi, S., Yoshida, H., and Sato, M. (2003). Effect of p27Kip1 on the ability of invasion and metastasis of an oral cancer cell line. *Oncology Reports* 10, 527.
- Sutterlüty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Müller, U., and Krek, W. (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 207–214.
- Taga, T., and Kishimoto, T. (1995). Signaling mechanisms through cytokine receptors that share signal transducing receptor components. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 17–23.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4109–4117.
- Takizawa, C.G., and Morgan, D.O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 658–665.
- Tang, Y., and Reed, S.I. (1993). The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7, 822–832.
- Tavor, S., Petit, I., Porozov, S., Avigdor, A., Dar, A., Leider-Trejo, L., Shemtov, N., Deutsch, V., Naparstek, E., Nagler, A., et al. (2004). CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res.* 64, 2817–2824.
- Tedesco, D., Lukas, J., and Reed, S.I. (2002). The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev.* 16, 2946–2957.
- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67–74.
- Trimarchi, J.M., and Lees, J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 11–20.
- Tsai, Y.-S., Chang, H.-C., Chuang, L.-Y., and Hung, W.-C. (2005). RNA silencing of Cks1 induced G2/M arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *IUBMB Life* 57, 583–589.
- Tsvetkov, L.M., Yeh, K.H., Lee, S.J., Sun, H., and Zhang, H. (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* 9, 661–664.
- Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tsihchlis, P., Bellacosa, A., et al. (2002). Cytoplasmic relocalization and

inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Medicine* 8, 1136–1144.

Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D., and Amati, B. (1996). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J* 15, 6595–6604.

Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J* 16, 5334–5344.

Vrhovac, R., Delmer, A., Tang, R., Marie, J.-P., Zittoun, R., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (1998). Prognostic Significance of the Cell Cycle Inhibitor p27Kip1 in Chronic B-Cell Lymphocytic Leukemia. *Blood* 91, 4694–4700.

Wang, I.-C., Chen, Y.-J., Hughes, D., Petrovic, V., Major, M.L., Park, H.J., Tan, Y., Ackerson, T., and Costa, R.H. (2005). Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10875–10894.

Wang, J.Y., Knudsen, E.S., and Welch, P.J. (1994). The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv. Cancer Res.* 64, 25–85.

Wang, X., Gorospe, M., Huang, Y., and Holbrook, N.J. (1997). p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene* 15, 2991–2997.

Wang, X.-C., Tian, J., Tian, L.-L., Wu, H.-L., Meng, A., Ma, T.-H., Xiao, J., Xiao, X.-L., and Li, C.-H. (2009). Role of Cks1 amplification and overexpression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 1107–1113.

Wang, X.-C., Tian, L.-L., Tian, J., Li, D., Wang, Y., Wu, H., Zheng, H., and Meng, A.-M. (2012). Overexpression of Cks1 Increases the Radiotherapy Resistance of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Radiation Research* 53, 72–78.

Weintraub, S.J., Prater, C.A., and Dean, D.C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358, 259–261.

Westbrook, L., Manuvakhova, M., Kern, F.G., Estes, N.R., 2nd, Ramanathan, H.N., and Thottassery, J.V. (2007). Cks1 regulates cdk1 expression: a novel role during mitotic entry in breast cancer cells. *Cancer Res.* 67, 11393–11401.

Winkler, D., Schneider, C., Zucknick, M., Bögelein, D., Schulze, K., Zenz, T., Mohr, J., Philippen, A., Huber, H., Bühler, A., et al. (2010). Protein expression analysis of chronic lymphocytic leukemia defines the effect of genetic aberrations and uncovers a correlation of CDK4, P27 and P53 with hierarchical risk. *Haematologica* 95, 1880–1888.

Wolowiec, D., Wojtowicz, M., Ciszak, L., Kosmaczewska, A., Frydecka, I., Potoczek, S., Urbaniak-Kujda, D., Kapelko-Slowik, K., and Kuliczowski, K. (2009). High intracellular content of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in early- and intermediate stage B-cell chronic lymphocytic leukemia lymphocytes predicts rapid progression of the disease. *European Journal of Haematology* 82, 260–266.

- Wołowiec, D., Benchaib, M., Pernas, P., Deviller, P., Souchier, C., Rimokh, R., Felman, P., Bryon, P.A., and Ffrench, M. (1995). Expression of cell cycle regulatory proteins in chronic lymphocytic leukemias. Comparison with non-Hodgkin's lymphomas and non-neoplastic lymphoid tissue. *Leukemia* 9, 1382–1388.
- Wolthuis, R., Clay-Farrace, L., van Zon, W., Yekezare, M., Koop, L., Ogink, J., Medema, R., and Pines, J. (2008). Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A. *Mol. Cell* 30, 290–302.
- Wright, D.H. (1999). What Is Burkitt's Lymphoma and When Is It Endemic? *Blood* 93, 758–759.
- Xing, J., Ginty, D.D., and Greenberg, M.E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273, 959–963.
- Xu, Y., Liu, L., Qiu, X., Jiang, L., Huang, B., Li, H., Li, Z., Luo, W., and Wang, E. (2011). CCL21/CCR7 Promotes G2/M Phase Progression via the ERK Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* 6, e21119.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofmann, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., et al. (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 20, 1688–1702.
- Yao, Z.-P., Zhou, M., Kelly, S.E., Seeliger, M.A., Robinson, C.V., and Itzhaki, L.S. (2006). Activation of ubiquitin ligase SCF(Skp2) by Cks1: insights from hydrogen exchange mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* 363, 673–686.
- Yokoi, S., Yasui, K., Saito-Ohara, F., Koshikawa, K., Iizasa, T., Fujisawa, T., Terasaki, T., Horii, A., Takahashi, T., Hirohashi, S., et al. (2002). A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. *Am. J. Pathol.* 161, 207–216.
- Yu, V.P.C.C., and Reed, S.I. (2004). Cks1 is dispensable for survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* 3, 1402–1404.
- Yu, V.P.C.C., Baskerville, C., Grünfelder, B., and Reed, S.I. (2005). A Kinase-Independent Function of Cks1 and Cdk1 in Regulation of Transcription. *Molecular Cell* 17, 145–151.
- Yu, Z.K., Gervais, J.L., and Zhang, H. (1998). Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11324–11329.
- Zarling, J.M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M.B., Lioubin, M.N., and Todaro, G.J. (1986). Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9739–9743.
- Zhan, F., Colla, S., Wu, X., Chen, B., Stewart, J.P., Kuehl, W.M., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr (2007). CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates mul-

multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 109, 4995–5001.

Zhang, H., Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A.D., Li, H.S., Murray, P.J., and Watowich, S.S. (2010). STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood* 116, 2462–2471.

Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.

Zhou, H., Kato, A., Yasuda, H., Miyaji, T., Fujigaki, Y., Yamamoto, T., Yonemura, K., and Hishida, A. (2004). The induction of cell cycle regulatory and DNA repair proteins in cisplatin-induced acute renal failure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200, 111–120.

Ziegler, E., Oberbarnscheidt, M., Bulfone-Paus, S., Förster, R., Kunzendorf, U., and Krautwald, S. (2007). CCR7 Signaling Inhibits T Cell Proliferation. *J Immunol* 179, 6485–6493.

Van Zon, W., Ogink, J., ter Riet, B., Medema, R.H., te Riele, H., and Wolthuis, R.M.F. (2010). The APC/C recruits cyclin B1-Cdk1-Cks in prometaphase before D box recognition to control mitotic exit. *J Cell Biol* 190, 587–602.

Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* 9, 247–261.

8 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
α	alpha (anti)
β	beta
λ	Wellenlänge
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μmol	10^{-6} Mol
μM ($\mu\text{mol/l}$)	10^{-6} Mol/Liter
Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
APC/C	<i>anaphase promoting complex/cyclosome</i>
APC	Allophycocyanin
Atf	aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin Triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
B-CLL	B-Zell CLL
b-ZIP	<i>basic leucine zipper domain</i>
BBMM	Basales Knochenmarkmedium (<i>basal bone marrow medium</i>)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma extra large</i>

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Celsius
CAK	Cdk aktivierende Kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdc	<i>cell division cycle</i>
Cdh	Cadherin
CDK	Zyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Cip	CDK Inhibitor Protein
CKI	Cdk Inhibitor
Cks	<i>cyclin dependent kinase subunit</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	Cre-Rekombinase
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cul	Cullin
CXCR	CXC-Motiv-Rezeptor
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetra acetic acid</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinase (<i>extracellular signal regulated</i>)

	<i>kinase)</i>
et al.	et alii
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FOXM1	<i>forkhead box protein M1</i>
FS	<i>forward scatter</i>
Fw	Vorwärts (<i>forward</i>)
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G0-Phase	<i>Gapphase 0</i>
G1-Phase	<i>Gapphase 1</i>
G2-Phase	<i>Gapphase 2</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
gp130	Glykoprotein 130kDa
Gy	Gray (1 Gy=1 J/kg)
h	human, Stunde (<i>hour</i>)
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin Eosin
HS	<i>horse serum</i>
IκB	<i>inhibitor of κB</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
Ink	<i>inhibitors of CDK4</i>
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare

Abkürzungsverzeichnis

KCl ₂	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
Kip	Kinase Inhibitor Protein
KM	Knochenmark
LB	Luria-Bertani
LIMK	<i>LIM domain kinase</i>
lin	linear
log	logarithmisch
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	murin
M	Milz
M-Phase	Mitose
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MIG	MSCV IRES GFP
min	Minute
MIR	MSCV IRES RFP
ml	Milliliter
mM (mmol/l)	10 ⁻³ Mol/Liter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOP	Myeloperoxidase
MPF	<i>maturation promoting factor</i>
mRNA	messenger RNA
mSCF	muriner Stammzellfaktor (<i>murine stem cell factor</i>)
MSCV	<i>murine stem cell virus</i>
mtSSB	<i>mitochondrial single stranded DNA binding protein</i>
N-Ras	<i>neuroblastoma rat sarcoma</i>
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat

NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure (<i>Non-essential amino acid</i>)
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
nM (nmol/l)	10 ⁻⁹ Mol/Liter
NPM-ALK	<i>nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase</i>
NTP	Nucleosid Triphosphat
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
p	Phosphorylierung
P/S	Penicillin/Streptavidin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	peripheres Blut
PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	pondus Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulphonyl Fluorid
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Ras	<i>rat sarcoma protein</i>
Rb	Retinoblastom
RBX	<i>ring box protein 1</i>
Rev	entgegengesetzt (<i>reverse</i>)
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Reverse Transkriptase/Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S-Phase	Synthesephase
SAPK	Stress-aktivierte Protein Kinase
SCF	Skp1-Cullin-F-box
SDS	Natrium Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
sec	Sekunde
SEM	Standardabweichung (<i>standard error of the mean</i>)
Ser	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Skp	<i>S-phase kinase-associated protein</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SS	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Strep	Streptavidin
Suc	<i>suppressor of Cdc mutation</i>
TAE	Tris-Acetat Puffer
Tcl	<i>T cell leukemia/lymphoma</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
thCD2	<i>trunkated human CD2</i>
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
Ub	Ubiquitin
UBC	<i>ubiquitin conjugating enzyme</i>
WBZ	weiße Blutzellen
wt	Wildtyp

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1.1 Zentrale Mechanismen der Zellzyklusregulation	3
Abb. 1.5.1.1 SCF ^{Skp2} -induzierte p27 ^{Kip1} -Degradierung adaptiert nach Bartek und Lukas (2001).....	11
Abb. 4.1.1 Erhöhte <i>Cks1</i> -mRNA-Level bei B-lymphoiden Erkrankungen.....	52
Abb. 4.2.1 <i>Cks1</i> -Defizienz in E μ - <i>Myc</i> -Lymphomen reduziert Proliferation und Koloniebildung <i>in vitro</i>	54
Abb. 4.3.1.1 Schematische Darstellung des retroviralen Transduktions- und Transplantationssystems	55
Abb. 4.3.2.1 Schematische Darstellung des Cre-loxP-Systems	57
Abb. 4.3.2.2 Das MIG-Stop-Cks1-Konstrukt führt <i>in vitro</i> zu einer ausschließlichen Cks1-Expression in MSCV-Cre-infizierten NIH/3T3-Zellen	58
Abb. 4.3.2.3 MIG-Stop-Cks1-Transplantate zeigen hohe Cks1-Expression in B-Lymphozyten	59
Abb. 4.3.2.4 Keine Unterschiede in den Blutbildern Cks1-überexprimierender Mäuse versus Kontrollen.....	60
Abb. 4.3.2.5 Überexpression von Cks1 löst keine B-Zell-Erkrankung aus.....	61
Abb. 4.3.3.1 Transplantate zeigen hohe Cks1-Level auf RNA- und Proteinebene.....	62

Abb. 4.3.3.2 Blutbildanalysen bei ubiquitärer Cks1-Expression zeigen keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen	63
Abb. 4.3.3.3 Die ubiquitäre Überexpression von Cks1 bewirkt Myeloproliferation, führt jedoch nicht zu Krankheitsinduktion.....	64
Abb. 4.4.1 B-Zell-spezifische Überexpression von Cks1 induziert keine Veränderung der B-Zell-Proliferation oder Differenzierung <i>in vivo</i>	65
Abb. 4.4.2 Signifikant vergrößerte B1-Zell-Population in Milz und Peritoneum <i>Cks1</i> -defizienter Versuchstiere.....	67
Abb. 4.5.1 Überexpression von c-Myc im Transduktions- und Transplantationsmodell führt zu verminderter Proliferation <i>Cks1</i> -defizienter Zellen im Vergleich zu wildtypischen, <i>p27^{Kip1}^{-/-}</i> - und <i>Cks1^{-/-};p27^{Kip1}^{-/-}</i> -Zellen	68
Abb. 4.5.2 <i>Cks1</i> - und <i>p27^{Kip1}</i> -Verlust haben keinen Effekt auf die Ausbreitung und Latenz einer durch c-Myc-induzierten AML	70
Abb. 4.6.1.1 Schematische Darstellung des konstitutiv aktiven L-gp130-Rezeptors adaptiert nach Stuhlmann-Laeisz (2006).....	71
Abb. 4.6.1.2 Konstitutiv aktives gp130 führt in der murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3 zu Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation und Koloniebildung in Methylzellulose	72
Abb. 4.6.1.3 Cks1-Überexpression führt in L-gp130-transduzierten Zellen zu einer zusätzlichen Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges.....	74
Abb. 4.6.1.4 L-gp130 induziert <i>in vivo</i> eine Leukozytose bei gleichzeitiger Thrombozytopenie.....	75
Abb. 4.6.1.5 L-gp130-Expression führt <i>in vivo</i> zu einer myeloproliferativen Erkrankung	77
Abb. 4.6.1.6 Cks1-Überexpression führt zu keiner Veränderung der Latenzzeit einer durch L-gp130 induzierten AML	79
Abb. 4.6.1.7 Cks1-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Proliferationsrate L-gp130-exprimierender 32D-Zellen	80

Abb. 4.6.1.8 Cks1-Überexpression zeigt <i>in vitro</i> keinen Effekt auf eine L-gp130-vermittelte STAT3-Signaltransduktion	81
Abb. 4.6.2.1 Konstitutive gp130-Aktivierung kann in C57Bl/6-Mäusen Leukozytosen hervorrufen	82
Abb. 4.6.2.2 <i>Cks1</i> -Verlust kann in einer L-gp130-induzierten Erkrankung durch simultanen <i>p27^{Kip1}</i> -Verlust ausgeglichen werden.....	83
Abb. 4.6.2.3 L-gp130-Expression in <i>Cks1</i> - und <i>p27^{Kip1}</i> -defizienten Transplantaten induziert eine AML ohne Unterschiede im Disseminationsverhalten hervorzurufen	85
Abb. 4.6.2.4 L-gp130-induzierte Signaltransduktion ist unabhängig von Cks1 und <i>p27^{Kip1}</i> in C57BL/6-Mäusen	86

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der letzten Jahre unterstützt haben und mir mit helfender Hand beiseite standen.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ulrich Keller für die Möglichkeit, dieses interessante Thema in seiner Forschungsgruppe zu bearbeiten. Vielen Dank für die aktive Betreuung und die wissenschaftlichen Ratschläge, sowie den Optimismus in pessimistischen Zeiten.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Angelika Schnieke für die freundliche Bereitschaft, die Dissertation von Seiten des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der technischen Universität München zu übernehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation im Hämatopoetischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München anfertigen zu können.

Allen Mitgliedern der AG Keller möchte ich für die gemeinsame Zeit und die Hilfe danken. Stephanie, Viktoriya und Alex, es war mir eine Freude eine Bench mit euch zu teilen, auch wenn es bestimmt nicht immer leicht mit mir war.

Für die gute Arbeitsatmosphäre möchte ich allen ehemaligen und jetzigen Kolleginnen und Kollegen in der Trogerstraße 32 danken. Insbesondere Nikolas, Jonas und Elke, wir hatten eine gute Zeit, leider seid ihr viel zu früh gegangen. AG Ringshausen danke ich für viele gemeinsame Liter Kaffee mit noch mehr Zucker. Robert Oostendorp und Mitgliedern sei-

ner Gruppe danke ich für helfende Gespräche und die Unterstützung während meiner Anfangszeit.

Auch danke ich den Externen Olli, Mela und Mark. Danke Olli für deine Hilfe (auch mal bis spät in die Nacht), zwei drei Bierchen und viele Gemeinsamkeiten, die man entdecken konnte. Mela, schön dass sich unsere Wege wieder gekreuzt haben. Vielen Dank für die Korrekturen. Dafür danke ich auch Mark, dessen kritisches Auge mir sehr geholfen hat.

Justus Duyster und den Mitgliedern seiner Gruppe Anna-Lena Illert, Corinna Albers und Nicolas Schneider möchte ich für die Unterstützung bei der Etablierung des Transplantationsmodells in unserem Labor danken.

Für die histologischen Arbeiten danke ich Dr. Martina Rudelius. Auch den Mitarbeitern des ZPF, sowie der FACS-Facility um Dr. Matthias Schiemann danke ich für ihre Unterstützung.

Für die Möglichkeit mit MIG-Stop und L-gp130 zu arbeiten danke ich Dr. Cornelius Miething und Univ. Prof. Dr. Stefan Rose-John.

Sebastian, Dir danke ich für die vielen guten Momente. Du warst die größte Stütze für mich während der ganzen Zeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums und der Dissertation. Danke, dass ihr bis zur letzten Minute für mich da wart.

11 Publikationen

Old JB, Kratzat S, Hoellein A, Graf S, Nilsson JA, Nilsson L, Nakayama KI, Peschel C, Cleveland JL, Keller UB.

“Skp2 directs Myc-mediated suppression of p27Kip1 yet has modest effects on Myc-driven lymphomagenesis” *Mol Cancer Res.* 2010 Mar;8(3):353-62

Kratzat S, Nikolova V, Miething C, Hoellein A, Schoeffmann S, Gorka O, Pietschmann E, Illert AL, Ruland J, Peschel C, Nilsson J, Duyster J, Keller U.

“Cks1 Is Required for Tumor Cell Proliferation but Not Sufficient to Induce Hematopoietic Malignancies” *PLoS One.* 2012, 7(5): e37433

Dörr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Däbritz JHM, Lisec J, Lenze D, Gerhardt A, Schleicher K, Kratzat S, Purfürst B, Walenta S, Mueller-Klieser W, Gräler M, Hummel M, Keller U, Buck AK, Dörken B, Willmitzer L, Reimann M, Kempa S, Lee S and Schmitt CA.

„Synthetic Lethal Metabolic Targeting of Cellular Senescence in Cancer Therapy“ *Nature.* 2013 Sep 19;501(7467):421-5

Dechow T#, Götze KS#, Rudelius M, Kratzat S, Behnke K, Pechloff K, Bullinger L, Fend F, Steidle S, Mitova N, Li Z, Thaler M, Bauer J, Pietschmann E, Albers C, Grundler R, Ruland J, Peschel C, Duyster J, Rose-John S, Bassermann F, and Keller U. #equal contribution

“Constitutive gp130 signaling is sufficient to induce multiple myeloma, collaborates with Myc and directs the plasma cell phenotype” (submitted to JCI)

Tomiatti V, Pietschmann E, Kratz S, Hoellein A, Quintanilla-Fend L, von Bubnoff N, Peschel C, Oostendorp RAJ, and Keller U.

“Cks1 is a critical regulator of hematopoietic stem cell cycling/quiescence and homeostasisoperating upstream of CDK inhibitors” (submitted to blood)

Kratz S#, Huberle C#, Rudelius M, Behnke K, Rose-John S, Oostendorp R, Peschel C, Dechow T, Götze KS and Keller U #equal contribution

“High efficiency retroviral transduction of bone marrow with an activated gp130 mutant reconstitutes recipient mice with a myeloproliferative disease proceeding to acute myeloid leukemia” (manuscript in preparation)