

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik – hämatologische
Forschung
am Klinikum rechts der Isar

**Untersuchung der Auswirkungen von MYC-
Überexpression in hämatopoetischen Zellen auf die
Knochenmark-Mikroumgebung in einem murinen AML-
Modell**

Katharina Monika Franke

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Ruland

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Ulrich Keller

2. Prof. Dr. Hans-Jürgen Wester

Die Dissertation wurde am 14.07.2016 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.01.2017 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abstract	VI
Zusammenfassung	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Hämatopoese	1
1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen	1
1.1.2 Embryonale Hämatopoese	2
1.1.3 Adulte Hämatopoese	3
1.1.4 Oberflächenmarker bei HSC/HPC	4
1.2 Die hämatopoetische Mikroumgebung (Nische)	5
1.2.1 Aufbau der hämatopoetischen Nische	6
1.2.2 Regulatorische Signale in der Nische	7
1.2.3 MYC-Funktionen und die Rolle in HSC sowie in Tumorzellen	9
1.2.4 Rolle der Nische bei Leukämieerkrankung	11
1.2.5 Blutstammzellerkrankung	13
1.3 Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit	15
2 Material	16
2.1 Versuchstiere.....	16
2.2 Zelllinien	16
2.3 Zellkulturmedien und -puffer	17
2.4 Stammlösungen und Puffer	19
2.5 Bakterien	22
2.6 Plasmide.....	22

2.7	Primer	22
2.7.1	Genotypisierung.....	22
2.7.2	Klonierung	22
2.7.3	Real Time PCR.....	23
2.8	Antikörper	23
2.8.1	Westernblot	23
2.8.2	Sekundärantikörper	24
2.8.3	Durchflusszytometrie	24
2.9	Kits.....	25
2.10	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	25
2.11	Enzyme.....	25
2.12	Chemikalien, Medien und Supplement	25
2.13	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.14	Geräte und technisches Zubehör.....	29
2.15	Softwareprogramme	30
3	Methoden.....	31
3.1	Molekularbiologische Methoden	31
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.1.3	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	32
3.1.4	Restriktionsenzymverdau	33
3.1.5	Dephosphorylierung.....	33
3.1.6	Ligation	33
3.1.7	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben	34
3.1.8	Reverse Transkription zur Generierung von cDNA.....	34
3.1.9	Quantitative RT-PCR	35

3.2	Bakterielle Arbeiten.....	36
3.2.1	Transformation	36
3.2.2	Plasmid-Präparation	36
3.2.3	Sequenzierung	37
3.3	Proteinbiochemische Methoden	37
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	37
3.3.2	SDS-Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot	38
3.3.3	Immunhistochemische Proteinbestimmung	39
3.4	Zellbiologische Methoden	39
3.4.1	Kultivierung von Suspensionszellen	39
3.4.2	Kultivierung von adhärenenten Zellen	40
3.4.3	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	40
3.4.4	Herstellung von Retroviren und die retrovirale Infektion	41
3.4.5	Selektion der Virus-Verpackungszelllinie.....	42
3.4.6	Zellsort und Oberflächenfärbung für Durchflusszytometrie.....	43
3.5	Grundlegende tierexperimentelle Techniken	43
3.5.1	Haltung und Verpaarung der Mäuse.....	43
3.5.2	Markierung und Genotypisierung der Mäuse.....	43
3.5.3	Knochenmarkstransplantation	44
3.5.4	Überwachung transplantiertes Tiere.....	45
3.5.5	Applikation von Tamoxifen.....	46
3.5.6	Organaufbereitung transplantiertes Mäuse	46
3.6	Transkriptomanalyse	47
3.7	Bioinformatische Auswertung	47
3.8	Histologie.....	48
3.9	Statistische Auswertungsverfahren.....	48

4	Ergebnisse	49
4.1	MYC-Überexpression induziert eine letale myeloproliferative Erkrankung	49
4.2	Das konditionale MycER-Modell in hämatopoetischen Zellen	51
4.2.1	MycER kann <i>in vitro</i> aktiviert werden.....	51
4.2.2	MYC-Überexpression reguliert das Transkriptom von Stromazellen	54
4.3	Das konditionale MycER-Modell in transplantierten Knochenmarkszellen	56
4.3.1	Stabile Rekonstitution des blutbildenden Systems in Mäusen mit transplantierten MycER-Knochenmarkszellen.....	56
4.3.2	<i>In vivo</i> MYC-Aktivierung resultiert in einer MYC- Zielgentranskription	58
4.4	Einfluss der MYC-Expression in den HSPC auf die KM- Mikroumgebung.....	62
4.4.1	MYC-Expression in den HSPC reguliert die Zusammensetzung der Nische	62
4.4.2	MYC-Expression in den HSPC verursacht transkriptionelle Änderungen in den EC	67
4.5	MYC reguliert die Expression von CXCR4	71
4.5.1	In humanen Zelllinien kann kein direkter Zusammenhang zwischen der CXCR4- und der MYC-Expression festgestellt werden.....	71
4.5.2	MYC-Überexpression steigert die Expression von CXCR4 sowohl <i>in vitro</i> als auch <i>in vivo</i>	72
4.5.3	Konditionale MycER-Aktivierung <i>in vivo</i> resultiert in einer myeloid- spezifischen CXCR4-Expression	76
5	Diskussion	78
5.1	MycER-Aktivierung <i>in vitro</i> induziert eine Stressantwort in co- kultivierten Stromazellen.....	78

5.2	Das <i>in vivo</i> MycER-Modell verursacht lediglich eine Myeloproliferation nach dauerhafter Aktivierung.....	80
5.3	<i>In vivo</i> MYC-Aktivierung verursacht einen Rückgang der EC mit transkriptioneller Änderung.....	81
5.4	MYC beeinflusst die CXCR4-Oberflächenexpression.....	85
5.5	Fazit.....	89
6	Literaturverzeichnis.....	90
7	Abkürzungsverzeichnis	101
8	Abbildungsverzeichnis	106
9	Danksagung	107
10	Anhang: Genlisten Transkriptomanalysen.....	108

Abstract

Tumor diseases arise not only from genetic alternations in the tumor cells themselves, but also from dysfunction of the microenvironment. In many tumors it has not been possible to completely eliminate and permanently cure the disease despite the reduction of the tumor mass by therapies. The oncogene c-Myc (MYC) is overexpressed in about 70 % of all malignant diseases and has not only cell intrinsic functions, such as the maintenance of the stem cell phenotype in the hematopoietic stem cells, but it also plays an important role in the interaction of the cell with its microenvironment.

In this project, the interaction of leukemic cells with their microenvironment was characterized with the help of conditional *Myc*-overexpressing hematopoietic stem/progenitor cells in a mouse model. It should be investigated whether MYC causes specific changes in the microenvironment and thereby creates convenient conditions for the tumor persistence. An important parameter in the hematopoietic niche is the CXCR4-CXCL12-pathway which therefore was included in this study.

For the establishment of the *Myc*-overexpressing mouse model, bone marrow cells were infected with the help of a retroviral transduction model. Subsequently, *Myc* expressing bone marrow was transplanted into mice. This resulted in a rapid onset of a myeloproliferative disorder.

Due to the nearly complete infiltration of bone marrow with leukemic cells, a conditional *Myc* model (*MycER*) was used to more precisely analyze the interactions of the *Myc*-expressing cells with their microenvironment. The conditional *MycER* model was established with the help of the transduction-transplantation mechanism in the murine system. This resulted in a stable engraftment of the infected cells without any abnormalities in the mice or any hints of a disorder without tamoxifen. The activation of *MycER* for four days resulted in the induction of the target genes of *Myc*, but without any changes in the hematopoiesis. By contrast, mice which were treated long term with tamoxifen developed a myeloproliferative disease similar to the mice expressing *Myc* constitutively.

In order to find a connection between the expression of MYC and CXCR4, different human cell lines were analyzed for the expression of these two transcripts. No correlation could be shown. However, the forced expression of MYC resulted in the upregulation of CXCR4. Furthermore, increased MYC activity in the mouse model resulted in a rise of the CXCR4 expression *in vivo*.

As the goal of this work was the analysis of oncogene-specific alternations in the microenvironment, the hematopoietic niche cells were examined additionally. It could be shown that the endothelial cells were reduced in the *Myc-GFP* mice and in the short-term, as well as in the long-term treated *MycER* mice. Niche cells enriched with endothelial cells showed a different transcriptome expression profile depending on whether the *MycER* activity was induced in the mice or not.

It could be shown that the inducible *in vivo* *MycER* transfection-transplantation model is useful for the analyses of premalignant changes in the microenvironment of hematopoietic cells in an AML-like leukemia model. The first detailed examinations of the microenvironment of this *in vivo* model concentrated on the vascular niche. Therefore, this model could be helpful in the analyses of changes in the various niche cell populations after an oncogene-induced malignant transformation of hematopoietic cells.

Zusammenfassung

Tumorerkrankungen entstehen sowohl durch genetische Veränderungen in den Tumorzellen selbst, als auch durch Störungen der Mikroumgebung. In vielen Tumoren ist es, trotz Reduktion der Tumormasse durch erfolgte Therapien, nicht gelungen eine komplette Eradikation und somit eine langfristige Heilung zu erzielen. Das Onkogen c-Myc (MYC) wird in etwa 70 % aller malignen Erkrankungen überexprimiert und hat nicht nur zellintrinsische Funktionen, wie beispielsweise die Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps in hämatopoetischen Stammzellen, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Zelle mit ihrer Mikroumgebung.

Die Interaktionen von Leukämiezellen mit ihrer Mikroumgebung sollten im Rahmen dieses Projektes anhand von konditional *Myc*-überexprimierenden hämatopoetischen Stamm-/ Vorläuferzellen im Mausmodell charakterisiert werden. Hierbei sollte gezeigt werden, dass MYC spezifische Veränderungen in der Mikroumgebung verursacht und folglich die Tumorpersistenz begünstigt. Eine wichtige Signalachse in der hämatopoetischen Nische ist der CXCR4-CXCL12-Signalweg, weshalb dieser detaillierter analysiert wurde.

Zur Etablierung des *Myc*-überexprimierenden Mausmodells wurde Knochenmark mittels eines retroviralen Transduktionsmodells infiziert, sodass es *Myc* überexprimierte, und anschließend in Mäuse transplantiert. Dies bedingte einen schleunigen Beginn einer myeloproliferativen Erkrankung.

Da in diesem Modell fast das komplette Knochenmark von Leukämiezellen infiltriert war, wurde ein konditionales *Myc*-Modell (*MycER*) verwendet, um die Interaktionen der *Myc*-exprimierenden Zellen mit ihrer Mikroumgebung besser untersuchen zu können. Auch dieses konditionale *MycER*-Modell wurde mittels Transduktions-Transplantationsmechanismus im murinen System etabliert. Es führte zu einer stabilen Rekonstruktion des blutbildenden Systems ohne große Abnormitäten in den Mäusen und ohne Anzeichen einer Erkrankung in der Abwesenheit von Tamoxifen. Die Aktivierung des *MycER*s für vier Tage führte zur Induktion der Zielgene von MYC, allerdings zu keinerlei Veränderungen in der

Hämatopoese. Im Gegensatz hierzu entwickelten Tiere, die langfristig mit Tamoxifen behandelt wurden, eine myeloproliferative Erkrankung ähnlich der Mäuse, die MYC konstitutiv überexprimierten.

Um einen Zusammenhang zwischen der Expression von MYC und CXCR4 festzustellen, wurden verschiedene humane Zelllinien auf die Expression der beiden Transkripte hin untersucht. Eine Korrelation war hierbei nicht ersichtlich. Die verstärkte Überexpression von MYC führte jedoch zur Hochregulation von CXCR4. Im Mausmodell bedingte eine verstärkte MYC-Aktivität ebenfalls einen Anstieg der CXCR4-Expression.

Da das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der MYC-spezifischen Veränderungen in der Mikroumgebung zum Inhalt hatte, wurden die hämatopoetischen Nischenzellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Endothelzellen sowohl in den *Myc-GFP* Mäusen, als auch in den kurzfristig sowie in den langfristig behandelten *MycER* Mäusen reduziert waren. Nischenzellen angereichert mit Endothelzellen zeigten in einer Transkriptomanalyse auch ein unterschiedliches Expressionsprofil, abhängig davon, ob sie aus Mäusen stammten, in denen die MycER-Aktivität angeschaltet worden war oder nicht.

Es wurde gezeigt, dass das induzierbare *in vivo* MycER Transfektions-Transplantationsmodell dafür geeignet ist, als AML-ähnliches Leukämiemodell zur Untersuchung prämaligener Veränderungen in der Mikroumgebung der hämatopoetischen Zellen zu dienen. Erste genauere Untersuchungen der Mikroumgebung in diesem *in vivo* Modell konzentrierten sich auf die vaskuläre Nische. Deshalb könnte dieses konditionale *in vivo* MycER-Modell helfen, die Veränderungen der einzelnen Nischenzellpopulationen nach erfolgter onkogeninduzierter, maligner Transformation der hämatopoetischen Zellen genauer zu untersuchen.

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Das Blutssystem von Säugetieren setzt sich aus mehr als zehn differenten Zelllinien zusammen. Diese beinhalten Erythrozyten, Thrombozyten, T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen. Die diversen Arten von Blutzellen erfüllen ganz unterschiedliche Aufgaben im Organismus: Erythrozyten sind verantwortlich für den Sauerstofftransport, Leukozyten sind relevant für die Immunantwort und Thrombozyten sind am Gerinnungsvorgang beteiligt. Bei dem für die Blutzellbildung verantwortlichen Prozess (Hämatopoese) entstehen alle reifen Blutzelltypen aus einer kleinen Population multipotenter, hämatopoetischer Stammzellen (HSC), welche vorwiegend im Knochenmark (KM) nachgewiesen werden können. Sie regenerieren sich ein Leben lang selbst und bilden durch asymmetrische Teilung den Beginn einer hierarchischen Organisation der Zelldifferenzierungen bis aus ihnen schlussendlich die reifen Blutzellen entstehen [1].

1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen

Viele Blutzellen haben eine begrenzte Lebensdauer und müssen deshalb ständig neu gebildet werden. Wenn Blutzellen in Apoptose gehen und erneuert werden, beginnen die ruhenden HSC sich zu teilen. Durch interne und externe Signale können sich multipotente HSC differenzieren und entwickeln sich in Richtung hämatopoetischer Vorläuferzellen (HPC). Diese wiederum differenzieren sich weiter, werden spezifisch für eine Abstammungslinie und bilden schlussendlich alle reifen Blutzellen [2, 3]. Da die HSC das Blutssystem während des ganzen Lebens ersetzen, müssen sie sich auch selbst regenerieren, damit nach einer erfolgten Zellteilung auch weiterhin Zellen mit Stammzellcharakter vorhanden sind. Selbsterneuerung ist, zusammen mit Ruhephasen, in denen die Zellen keinerlei Zellteilungen unterliegen, die wichtigste Eigenschaft von HSC und wird experimentell dadurch definiert, dass es den Zellen möglich ist, langfristig alle

Blutzelllinien eines Empfängers nach einer Stammzelltransplantation zu rekonstruieren [4].

1.1.2 Embryonale Hämatopoese

Bevor sie ihr ruhendes Stadium im adulten KM erreichen, besitzen HSC während der Embryogenese einen aktiven Zellzyklus und proliferieren, um das Blutsystem aufzubauen [2, 5]. Die Hämatopoese im Mausembryo beginnt mit der unverzüglichen Produktion von roten Blutkörperchen, um den Sauerstofftransport zu gewährleisten. Diese 'primitiven' Erythrozyten besitzen, im Gegensatz zu den späteren, noch Zellkerne. Außerdem ist die Hämatopoese durch wenig HSC-Aktivität gekennzeichnet. Daneben entstehen auch erste Makrophagen und Megakaryozyten. Diese Blutbildung beginnt im Dottersack am Tag E7,5 der embryonalen Entwicklung [6, 7]. Etwas später entstehen an diesem Ort zudem myeloerythroide Vorläufer, die sich allerdings erst in der Leber final ausdifferenzieren [8]. Die weitere Hämatopoese, die dann alle Blutzelllinien bildet, findet in verschiedenen Regionen des Embryos statt. Die HSC können am Tag E8,5 aus der Aorta-Gonaden-Mesonephros-(AGM-)Region sowie der Plazenta und aus dem Dottersack am Tag E10 isoliert werden [9-12]. Die HSC werden in der AGM-Region aus spezialisierten Endothelzellen der Aorta neu gebildet [13, 14]. Ab Tag E11,5 – 12,5 wandern die HSC über den Blutkreislauf in die fötale Leber, expandieren und differenzieren bis zur Geburt zu Vorläuferzellen aus [7, 13]. Ab Tag E17,5 sowie in den ersten zwei Wochen nach der Geburt verlassen die HSC die Leber und besiedeln das KM [2, 14, 15] über das Blutgefäßsystem. Dabei finden sie ihren Bestimmungsort mittels verschiedener Zyto- und Chemokine, wie beispielsweise durch den Chemokin Signalweg von CXCR4-CXCL12. Nach der Besiedelung stellen die HSC ihre Teilungsaktivität weitestgehend ein und eine Zirkulation der HSC ins Gewebe und vice versa ins KM findet nur noch auf einem sehr niedrigen Niveau statt [16]. Am Ende der Embryogenese und einige Wochen nach der Geburt finden sich auch HSC in der fötalen Milz. Hier findet allerdings keine Expansion statt, sondern eine Weiterdifferenzierung der HSC zu Vorläuferzellen [8].

1.1.3 Adulte Hämatopoese

Die adulte Hämatopoese erfolgt im KM und im lymphatischen System mittels Lymphknoten, Milz und Thymus. Es gibt eine hierarchische Organisation der Blutbildung mit einer fortschreitenden Einschränkung der Selbsterneuerungskapazität und der Differenzierungswege (Abb. 1) [17]. Durch Wachstumsfaktoren werden verschiedene Signalwege reguliert. Dies resultiert in einer veränderten Expression von Transkriptionsfaktoren. Abhängig von der Kombination der Transkriptionsfaktoren differenzieren die hämatopoetischen Zellen zu unterschiedlichen Blutzelllinien. Außerdem ist die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps von HSC. So ist beispielsweise Forkhead box O (FoxO) ein wichtiger Regulator des HSC-Reservoirs und der Selbsterneuerung [18, 19]. Die unterschiedlichen Stadien der Stammzellen können durch verschiedene Oberflächenmarker auf der Zellmembran voneinander unterschieden werden. Die am geringsten differenzierten, multipotenten langzeit-repopulierenden HSC (LT-HSC) sind c-Kit+, Sca-1+ und CD43-. Diese Zellen teilen sich, im Gegensatz zu den pluripotenten, kurzzeit-repopulierenden HSC (ST-HSC; c-Kit+, Sca-1+, CD34+), selten [8]. LT-HSC teilen sich asymmetrisch und bilden dadurch eine identische Kopie ihrer selbst, mit all ihren Stammzeleigenschaften, und eine differenziertere ST-HSC [3, 20, 21]. Die ST-HSC haben eine kürzere Lebensspanne und ein geringeres Potential sich selbst zu erneuern. Sie können in multipotente Vorläuferzellen (MPP) ausdifferenzieren. Diese differenzieren wiederum durch verschiedene Transkriptionsfaktoraktivität entweder zu gemeinsamen lymphoiden (CLP) oder gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP). So führt beispielsweise die Expression von PU.1 zur Differenzierung der Zellen in die myeloide Linie. Studien konnten zeigen, dass durch eine sukzessive Expression von zelllinienspezifischen Genen es zur stetig fortschreitenden Differenzierung der Blutzellen kommt [17]. Dies führt zum hierarchischen Aufbau der Hämatopoese. So sind CLP und CMP wiederum der Ursprung aller reifen Blutzelltypen [3, 20]. T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und die antigenpräsentierende dendritischen Zellen entstehen aus den CLP. Die CMP differenzieren entweder zu GMP (Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen) oder

zu MEP (Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen). Entsprechend ihrer Namensgebung, entwickeln sich die GMP zu Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen und die MEP zu Erythrozyten und Thrombozyten [3, 20].

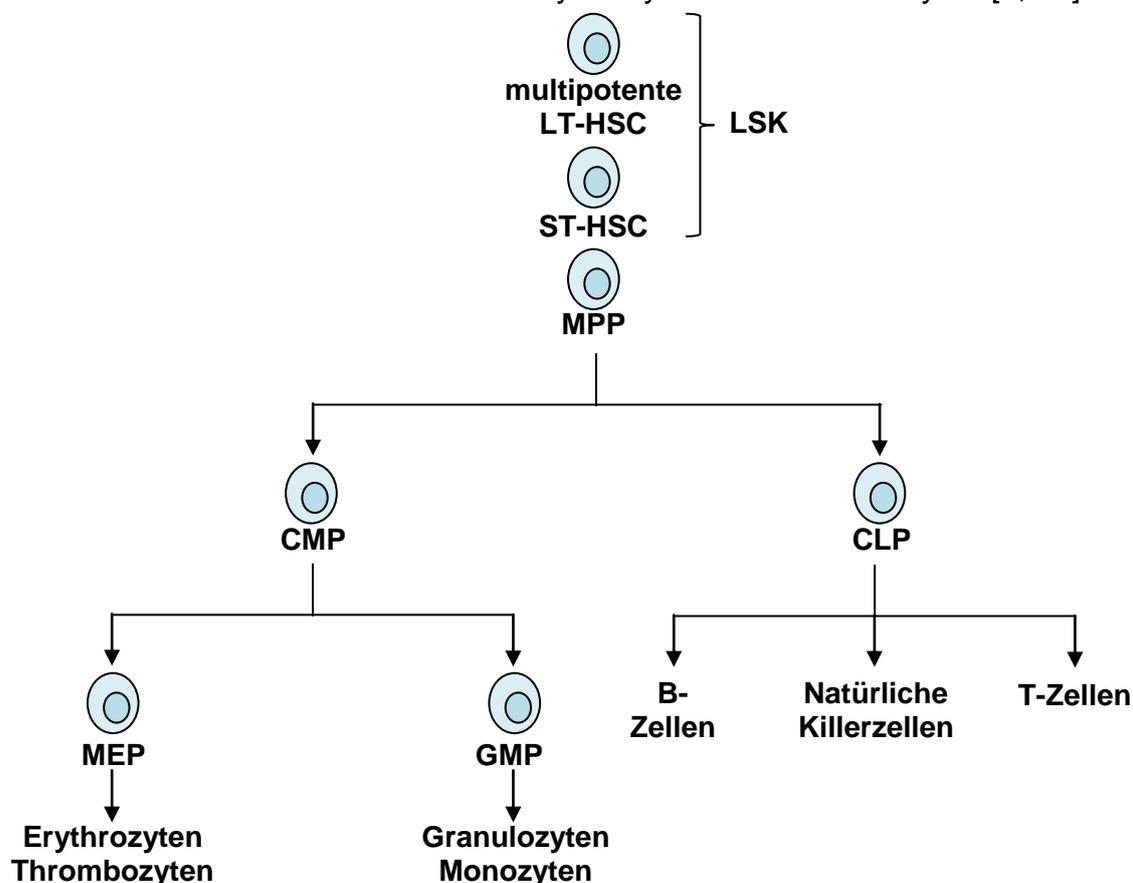


Abbildung 1: Hierarchischer Aufbau der Hämatopoese

In der multipotenten LSK (Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺) Population befinden sich sowohl Langzeit- (LT-HSC) als auch Kurzzeit- (ST-HSC) hämatopoetische Stammzellen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung zu MPP (multipotenten Vorläuferzellen) verlieren die Zellen zunehmend die Möglichkeit zur Selbsterneuerung, woraufhin die gemeinsamen lymphoiden (CLP) oder gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP) auf ihre Abstammungslinie festgelegt sind und alle reifen Blutzellen bilden.

1.1.4 Oberflächenmarker bei HSC/HPC

Die verschiedenen Blutzelltypen können aufgrund ihrer Oberflächenproteine auf der Zellmembran mittels Durchflusszytometrie phänotypisch unterschieden werden. Alle HSC sind negativ für Lineagemarker (Lin⁻) differenzierterer Blutzellen. Des Weiteren exprimieren sie das Stammzellantigen 1 (Sca-1 oder auch Ly6A/E) und den Rezeptor für den Stammzellfaktor (c-Kit oder CD117) auf

ihrer Oberfläche. Deswegen werden die HSC auch LSK (Lin-, Sca-1+, c-Kit+) genannt [3, 22, 23]. Während der letzten Jahre wurden weitere Oberflächenmarker gefunden, um die LT- und ST-HSC besser zu charakterisieren. Die LT-HSC setzen sich aus CD34-/schwach und Rezeptortyrosinkinase (Flk2) negativen Zellen zusammen, während die ST-HSC CD34+ und Flk2+ sind [23, 24]. CD34 kann allerdings erst HSPC bei Mäusen ab einem Alter von 8 Wochen herangezogen werden. Geringe Thy1.1-Expression ist ein Marker für alle LSK-Zellen [20, 25]; die Abnahme dieses Oberflächenproteins zusammen mit der Flk2-Expression zeigt einen Rückgang des Selbsterneuerungspotentials in HSC an [24]. Die LT-HSC können auch von den ST-HSC durch die Expression von Markern der SLAM-Familie (signaling lymphocyte activation molecule), einer Untergruppe der Immunoglobulingenfamilie, unterschieden werden. Zur SLAM-Familie gehören CD150 und CD48. Während frühe LT-HSC sowohl negativ für CD48 oder CD34 und positiv für CD150 sind, exprimieren ST-HSC alle drei Oberflächenmarker [26-28]. Weiter differenziert sind die MPP. Sie werden ebenfalls als Lin- und c-Kit+ definiert. Allerdings exprimieren sie entweder kein oder nur schwach Sca-1 auf ihrer Oberfläche. Interleukin 7 Rezeptor α (IL7R α) ist ein typischer Marker, um CMP und CLP zu charakterisieren. CLP stellen die Thy1.1- und IL7R α + -Fraktion der MPP [29]. In der IL7R α - Population der MPP kann man drei verschiedene myeloide Vorläuferpopulationen unterscheiden [30]: CMP sind CD34+, CD16/23- (Fc γ -Rezeptor), GMP exprimieren CD34 sowie CD16/32 stark und MEP sind CD34- und exprimieren CD16/32 gering [20, 31].

1.2 Die hämatopoetische Mikroumgebung (Nische)

Die Produktion von 10^{11} – 10^{12} reifen Blutzellen pro Tag aus dem HSPC-Pool (hämatopoetischer Stamm-/ Vorläuferzellpool) setzt eine strikte Regulation von intrinsischen und extrinsischen Signalen voraus [1, 32, 33]. Der Großteil der HSC befindet sich im KM in einer spezifischen Mikroumgebung, der sogenannten Stammzellnische. Man kann eine Stammzellnische als dreidimensionale Struktur beschreiben, bestehend aus verschiedenen Zelltypen und Signalmolekülen, wie beispielsweise Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die das numerische

Gleichgewicht der Stammzellen aufrechterhalten soll, indem sie die Differenzierung und die Selbsterneuerung steuert [34]. Diese Balance wird in der Nische sowohl durch Zell-Zellinteraktionen der HSC mit den Nischenzellen als auch mittels der extrazellulären Matrix reguliert [34-37].

1.2.1 Aufbau der hämatopoetischen Nische

Die Nische besteht aus polymorphen Zelltypen, die im KM verschiedenartig lokalisiert sind. Es wurde gezeigt, dass HSC sich in direktem Kontakt mit Nestin+ mesenchymalen Zellen, Gliazellen [38], mit (N-Cadherin+), Osteoblasten (OBC, SNO) [39, 40], CXCL12-reichen retikulären (CAR) Zellen [41] sowie mit sinusoidalen Endothelzellen (EC) [42] und endostealen Arteriolen [43] befinden. Innerhalb der Nische bilden diese unterschiedlichen Zelltypen ein anatomisches Geflecht in einer hypoxischen, kalziumreichen Umgebung [44], welche die Balance zwischen aktiven, teilenden und ruhenden HSC hält. Die aktivierten HSC befinden sich in Kontakt mit den perivaskulären CAR und Nestin+ Zellen in der Nähe der Sinusoide. Zusammen mit sinusoidalen EC bilden diese Zellen die so genannte vaskuläre Nische (Abb. 2). MPP können hier in die Blutzirkulation eintreten [26, 45-47]. Die EC und die umgebenden perivaskulären mesenchymalen Stromazellen (MSC) stellen das HSC-Gleichgewicht sowohl durch direkten Zellkontakt, als auch durch die Produktion von sezernierten Faktoren, wie stroma-derived Faktor 1 α (SDF-1 α , auch CXCL12), sicher. Ruhende HSC stehen in direktem Kontakt mit spezialisierten Osteoblasten, die die endosteale Oberfläche auskleiden und die HSC unter anderem mittels N-Cadherin-Verbindungen verankern. MYC beispielsweise reguliert sowohl die N-Cadherin-Expression als auch die Interaktionen der HSC mit der Nische [48]. Die HSC sind zudem in Kontakt mit CAR-Zellen [34, 40, 47, 49, 50]. In dieser sogenannten endostealen Nische bilden die erwähnten Zelltypen zusammen mit Fibroblasten und potenziell weiteren Zellen eine hypoxische Umgebung sowie eine dichte extrazelluläre Matrix, welche die HSC im Ruhezustand hält und sie zusätzlich vor reaktivem Sauerstoff schützt. (Abb. 2) [45, 51, 52].

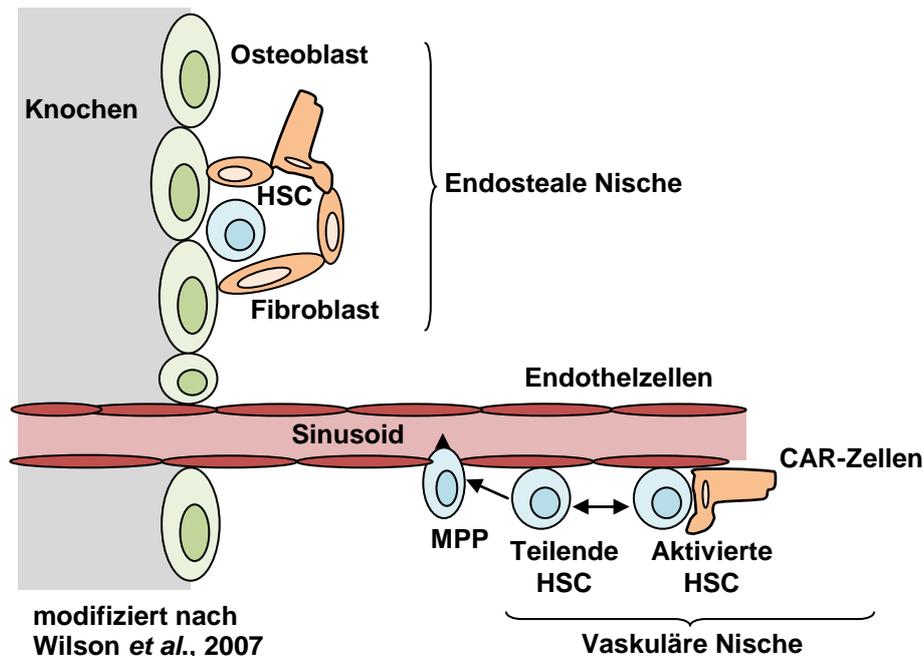


Abbildung 2: HSC Nischenmodell in der Maus

Ruhende HSC befinden sich in direkten Kontakt mit Osteoblasten, die die Oberfläche der Knochen auskleiden. Außerdem befinden sich hier in der endostealen Nische CAR-Zellen und Fibroblasten. Die ruhenden HSC werden aktiviert und befinden sich dann in der Nähe von perivaskulären CAR-Zellen und Endothelzellen in der vaskulären Nische. Hier teilen sie sich und die Vorläuferzellen können in die Blutzirkulation eintreten.

1.2.2 Regulatorische Signale in der Nische

Wachstumsfaktoren und Zytokine

Eine große Anzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die die Hämatopoese regulieren, werden in der HSC-Nische produziert. Zum Beispiel werden G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Interleukin 6 (IL6), der FMS verwandte Tyrosinkinase 3 Ligand (Flt3L) sowie Stammzellfaktor (SCF) von endothelialen Zellen des KM exprimiert [53, 54]. SCF, welcher an den c-Kit-Rezeptor bindet und diesen aktiviert, spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Langzeit-Repopulationsaktivität der HSC [55, 56]. Im KM wird SCF auch von Osteoblasten und Nestin+ mesenchymalen Stromazellen (MSC) exprimiert [54]. Osteoblasten produzieren noch andere bedeutsame Komponenten, um die Repopulationsaktivität und Ruhephase der HSC aufrecht zu erhalten. Dies sind unter anderem Thrombopoietin (TPO) und Angiopoietin 1 (Ang-1). Ang-1 wird jedoch auch von Nestin- MSC exprimiert [54].

Die CSXCR4-CXCL12-Signalachse

Manche inflammatorischen Zytokine spielen ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der HSC, wie beispielsweise der Chemokinligand C-X-C-Motiv 12 (CXCL12, auch SDF-1 α), welcher von CAR-Zellen, Nestin+ MSC, Osteoblasten und EC exprimiert wird [38, 47]. Chemokinrezeptoren bilden eine große Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche die Chemotaxis in Richtung der Chemokingradienten vermitteln. Der Chemokinrezeptor-4 (CXCR4) bindet seinen Liganden CXCL12, welcher durch nachgeschaltete Regulation des MAP-Kinase- und des PI3K-Signalwegs Poolgröße, Homing, Mobilisierung und Adhäsion der HSC reguliert [57, 58]. CXCR4 wird normalerweise von T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen sowie von LT- also auch ST-HSC innerhalb der KM-Nische exprimiert [59, 60], wohingegen CXCL12 hauptsächlich von der Mikroumgebung sezerniert wird [61, 62]. Außerdem wird CXCR4, der Rezeptor von SDF-1 α , für die längerfristige Aufrechterhaltung der HSC-Aktivität benötigt [47, 54, 63, 64]. Die Interaktion von CXCR4 und CXCL12 ist wichtig für Lokalisation und Retention der HSC sowie der MPP. Des Weiteren spielt CXCL12 eine gewichtige Rolle in der Kolonisierung des KM während der frühen Entwicklungsphasen [65, 66].

Der TGF- β -Signalweg

Transforming Growth Factor β (TGF- β) ist ein Protein mit zahlreichen Funktionen: diese schließen Zelldifferenzierung, Embryonenentwicklung, Regulation des Immunsystems, Tumorentwicklung, eine antiinflammatorische Wirkung und Angiogenese mit ein. TGF- β ist von großer Wichtigkeit für die Regulation der HSC [67, 68]. Es existieren drei Isoformen des Proteins: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3, welche ihrerseits als Homodimer an zwei heterogene Rezeptoren - T β RI und T β RII – binden. Diese Rezeptoren sind Serin/Threonin-Kinasen, deren Funktion in der Aktivierung von intrazellulären Proteinen, sogenannten Smads, besteht. Letztere können wiederum in zwei Untergruppen eingeteilt werden: Smad 2/3 und Smad 1/5/8. Die zuletzt genannte Gruppe leitet das TGF- β -Signal weiter zu Smad 4. Dieses transloziert in den Nukleus und reguliert die Gentranskription [67], was beispielsweise zur Supprimierung der MYC-Expression führt [69]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass das TGF- β -Signal die HSC in

der Ruhephase hält [68, 70-74]. In 'normalen' Zellen stoppt TGF- β den Zellzyklus, induziert Differenzierung und fördert Apoptose. Sowohl die Krebszellen als auch die umgebenden Stromazellen proliferieren und steigern zudem ihre TGF- β -Produktion. Die Expressionssteigerung wirkt folglich auf die Mikroumgebung und bewirkt eine Immunsuppression sowie eine Angiogenese-Induzierung [75]. Dies ist ein Beispiel für die Wechselwirkungen, mit denen entstehende Tumorzellen ihre Mikroumgebung beeinflussen können.

1.2.3 MYC-Funktionen und die Rolle in HSC sowie in Tumorzellen

Der Wnt-Signalweg

Die Wnt-Proteinfamilie beinhaltet sekretierte Liganden, welche an die Oberflächenrezeptoren Frizzled (Fzd) binden und sowohl den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Zweig des Wnt-abhängigen-Signalwegs parakrin sowie autokrin induzieren können [67, 76]. Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryo- und der Tumorgenese [77] und ist darüber hinaus an der Zellformgebung sowie Migration beteiligt [78]. Während der Embryogenese induziert das Wnt-Signal die Bildung von Blutzellen aus Stammzellen [79]. Die embryonalen Stammzellen müssen ausdifferenzieren, proliferieren und wachsen, um alle spezialisierten Gewebe zu bilden. Dieser Prozess wird durch den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert. Das verstärkte Signal durch Wnt führt zu einem verringertem Abbau von β -Catenin, dieses transloziert in den Nukleus, wodurch die Transkription von zellzyklusregulierenden Genen wie beispielsweise MYC aktiviert wird [80, 81]. Besonders deutlich wird dieser Prozess im Blutsystem, wo Wnt3a zur Proliferation und Expansion der HSC führt [82]. Der kanonische Wnt-Signalweg ist ebenfalls maßgeblich für die Regulation der Proliferation und den Erhalt der HSC durch die hämatopoetische Nische im adulten Organismus [83]. Überdies führt der Verlust von β -Catenin, einem nachgeschalteten Protein im kanonischen Signalweg, zu einer verringerten Langzeit-Repopulationseffizienz der HSC [84]. Eine Überexpression von β -Catenin hingegen, führt zum Verlust der HSC, da die Selbsterneuerung gestört ist [85, 86]. Zudem konnte gezeigt werden, dass über den nicht-kanonischen Signalweg, der unabhängig von β -Catenin wirkt, die HSC in der Nische gehalten werden [87]. Der Wnt-Signalweg ist allerdings

nicht nur wichtig für die Entwicklung der normalen HSC, sondern auch für das Überleben des leukämischen Klons und den Übergang in die Blastenkrise der chronisch myeloischen Leukämie (CML) [84, 88]. Auch in der Entstehung der AML sind Mitglieder des Wnt-Signalwegs, β - und γ -Catenin, beteiligt [89, 90].

MYC als Onkoprotein

Eines der direkten Zielgene des kanonischen β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs ist *MYC*. MYC Onkoproteine (c-Myc/MYC, N-Myc/MYCN und L-Myc/MYCL1) sind Mitglieder der Familie der „basic region/ Helix-Loop-Helix/ Leucine Zipper (bHLHZip)“- Transkriptionsfaktoren. Sie sind bei der Regulation einer Vielzahl von Zellfunktionen beteiligt, unter anderem an der Proliferation, dem Metabolismus, Wachstum- und Differenzierungsprozessen sowie der Apoptose [91-95]. Bis zu 15 % aller Gene werden durch MYC reguliert [96, 97]; diese Transkriptionsfaktoren werden wiederum in etwa 70 % aller humanen Malignome überexprimiert [98, 99] - bedingt durch Genamplifikationen, Gentranslokationen oder Mutationen in MYC-regulierenden Signalwegen. Normalerweise werden Zellen vor den proliferativen Effekten der MYC-Überexpression durch die Induktion des p53-Apoptoseprogramms bewahrt. Eine übermäßige Expression von MYC aktiviert den Tumorsuppressor ARF, der seinerseits den p53-Inhibitor MDM2 inaktiviert und somit zunächst zum Zellzyklusarrest sowie schlussendlich zur Apoptose führt [100, 101]. Eine Mutation dieses Signalwegs führt jedoch zur übermäßigen Expression von MYC, folglich zur vermehrten Proliferation der betroffenen Zellen und final zum Malignom.

MYC-Funktionen in HSC

Ein essentielles Charakteristikum der HSC ist die Balance zwischen ruhendem und aktivem Zellzyklus. Abhängig von extrinsischen und intrinsischen Faktoren ruhen HSC, erneuern sich selbst, differenzieren, migrieren oder sterben. HSC werden ständig benötigt um Blutzellen, die eine kurze Lebensspanne haben, zu ersetzen [20]. Im Falle von Verletzungen treten ruhende HSC ebenfalls in den Zellzyklus ein. Die intrinsischen Signale, die den Zellzyklus der HSC regulieren beinhalten unter anderem Cyclin/CDK-Komplexe, das Rb Protein und CKI [2].

c-Myc (MYC) spielt eine wesentliche Rolle in der Homöostase der HSC. Die Konzentration in den Tochterzellen der teilenden HSC gibt den Ausschlag, ob sich diese Zellen weiter differenzieren oder die Eigenschaften der HSC beibehalten. So führt die Überexpression von MYC in den LT-HSC zum Verlust ihrer Selbsterneuerungskapazität und zur vermehrten Differenzierung zu ST-HSC, insbesondere zu MPP. Die MPP wiederum proliferieren vermehrt durch MYC-Überexpression, differenzieren aber nicht weiter zu reifen Blutzellen aus. Dies führt nach einiger Zeit zum Verlust des Stammzellkompartiments sowie der reifen Zellen und zur Anreicherung unreifer Vorläuferzellen (Abb. 3) [48, 102, 103]. Außerdem wurde *MYC* als essentielles Gen für die Induktion eines embryonalen Stammzellphänotyps [104-106] – vermutlich bedingt durch dessen Funktionen im Zellzyklus, bei der Blockierung und Umkehrung von Zelldifferenzierungsvorgängen, beim Chromatin-Remodelling und der Selektion von geeigneten Kandidatenzellen – identifiziert [107].

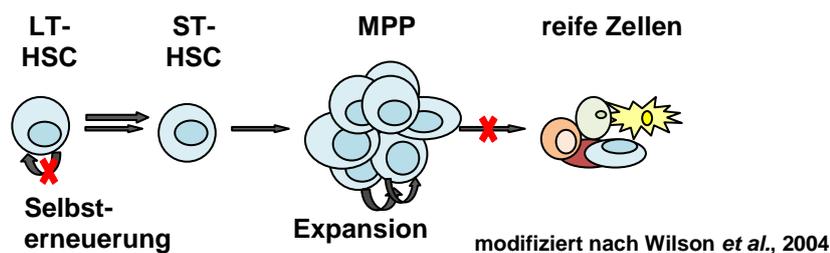


Abbildung 3: Modell für die Regulation der Hämatopoese durch MYC-Überexpression

Durch die Überexpression von MYC in den LT-HSC differenzieren diese und verlieren ihr Potenzial zur Selbsterneuerung. Dies führt zum Verlust der HSC. Außerdem proliferieren die MPP vermehrt, differenzieren aber nicht zu den reifen Zellen aus, womit alle Blutzelltypen im Laufe der Zeit verloren gehen.

1.2.4 Rolle der Nische bei Leukämieerkrankung

Seit längerem wird vermutet, dass das tumorzellumgebende Gewebe einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei einer Tumorerkrankung hat. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Gendelektionen in den Nischenzellen zur Entstehung eines myeloproliferativen Syndroms führten [108-111]. Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass die Mikroumgebung über tumorzell-extrinsische Mechanismen die Wahrscheinlichkeit maligner

Transformationen erhöhen kann. Des Weiteren schützt die Mikroumgebung die Tumorzellen vor der Einwirkung von Chemotherapeutika. Damit kann es, auch nach effektiver Behandlung, zum erneuten Ausbruch der Leukämie kommen. Ein Signalweg, über den die Leukämiezellen in ihrer protektiven Umgebung gehalten werden und nach peripherer Zirkulation auch wieder rekrutiert werden, ist die CXCR4 (CD184)- SDF-1 (CXCL12)-Achse [112]. Die Überexpression von CXCR4 ist ein schlechter Prognosefaktor für verschiedenartigste Krebserkrankungen [113, 114], besonders bei hämatopoetischen Tumoren [115-117]. CXCR4 Überexpression in Tumoren und die CXCL12-abhängige Rezeptoraktivierung sind Schlüsselsignale für Progression und Metastasierung [118, 119]. Eine potentielle Ursache für eine solche Überexpression ist die Entstehung einer hypoxischen Mikroumgebung durch die Tumorprogression, wodurch die Krebszellen dazu veranlasst werden vermehrt CXCR4 zu exprimieren [120]. Die Kombination von CXCR4 Expression und die Interaktion mit den Nischenzellen in der chronischen lymphoiden Leukämie (CLL) [121] sowie im multiplen Myelom (MM) [122] könnten ursächlich für die Medikamentenresistenz sein, da sie eine schützende Nische bilden.

Tumorstammzellen ähneln normalen Stammzellen, nehmen deren Nische ein und werden ebenfalls durch die Mikroumgebung in ihrer Selbsterneuerung sowie Differenzierung gesteuert [123]. Außerdem verhindern Tumorzellen die normale HSC Homöostase, was schließlich zum Verlust der normalen Hämatopoese führen kann [37, 124]. Es ist denkbar, dass frühe genetische Läsionen, welche nicht ausreichend wären, um eine maligne Transformation zu verursachen, zu einer tumorunterstützenden Nische führen können. Diese Nische begünstigt dann nicht nur die Tumorentstehung, sondern schützt die Tumorzellen vor einer Therapie [125]. So wird beispielsweise die Interaktion zwischen CXCR4 und CXCL12 von den Leukämiezellen genutzt, um die Nische zu okkupieren. Dabei sind die Leukämiezellen in der Lage die Nische direkt zu verändern durch die Herabregulation von CXCL12 [124].

1.2.5 Blutstammzellerkrankung

Myeloproliferative Erkrankungen

Der Krankheitsgruppe der myeloproliferativen Erkrankungen, zu der auch die chronisch myeloische Leukämie (CML), Polycythaemia Vera (PV) und die primäre Myelofibrose (PMF) gerechnet werden, liegt eine klonale Entartung einer pluripotenten, myeloischen, hämatopoetischen Vorläuferzelle zu Grunde. Die Entartung führt zu einem Wachstumsvorteil unterschiedlicher myeloischer Zelllinien (Granulo-, Erythro- und Megakaryopoese), bei denen es, im Gegensatz zur akuten Leukämie, zur Ausreifung von Blutzellen kommt. Typisch ist, außer den Blutveränderungen, häufig eine Splenomegalie (Milzvergrößerung) und oftmals auch eine Hepatomegalie (Lebervergrößerung). Alle myeloproliferativen Erkrankungen tragen das Risiko eines Übergehens in eine akute myeloische Leukämie (bzw. "Blastenkrise") in sich, allerdings mit deutlich variierender Wahrscheinlichkeit. Der Krankheitsverlauf ist chronisch und die Schwere der Erkrankung nimmt im Lauf der Zeit zu (Progredienz). Die Differenzialdiagnostik ist in frühen Krankheitsstadien schwierig und eine eindeutige Zuordnung anfangs oft nicht möglich. Vielmals überschneiden sich die einzelnen Erkrankungen oder gehen ineinander über. Nur die CML kann genetisch gut von den anderen myeloischen Erkrankungen, auch im Anfangsstadium, unterschieden werden, da sie durch das sogenannte Philadelphia-Chromosom bzw. das BCR-ABL-Gen charakterisiert werden kann. Das Philadelphia-Chromosom entsteht durch die reziproke Translokation zwischen dem Abelson (ABL) Gen auf Chromosom 9 und der brake point cluster Region (BCR) auf Chromosom 22. Dadurch entsteht das Fusionsprotein BCR-ABL - eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die zur verstärkten Proliferation und zum Überleben der Leukämiezellen führt [126, 127].

AML, akute myeloische Leukämie

Charakteristisch für Leukämie sind eine abnormale Proliferation, Verlust der Apoptose, sowie ein Anstieg der Anzahl an weißen Blutkörperchen. Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Expansion von HSC oder GMP innerhalb des KM [123, 128-130], welche oftmals durch eine Blutleukozytose charakterisiert ist. Die leukämischen Zellen breiten sich im KM, im Blut, in den

Lymphknoten und zudem in der Milz aus. Die Folge ist eine Verdrängung der normalen Hämatopoese, was in einem Mangel an Erythrozyten, Thrombozyten und funktionsfähigen Granulozyten sowie Monozyten resultiert, da die unreifen Vorstufen der Myelopoese nicht weiter zu reifen Blutzellen ausdifferenzieren.

Die Prognose für den Großteil der Patienten ist daher nach wie vor sehr schlecht. Die Einsicht, dass spezifische Mutationen ursächlich für die Krankheit sind, lieferte jedoch zahlreiche Zielstrukturen für die molekulare Therapie. So wurde z. B. ein Inhibitor für die Rezeptortyrosinkinase FLT3 entwickelt, welche in circa 30 % aller AML-Fällen konstitutiv aktiv ist [131]. Patienten mit dieser Mutation haben eine sehr schlechte Prognose bezüglich möglicher Heilungschancen bzw. -erfolge. FLT3 wird normal in HSPC exprimiert. Die Expression geht im Laufe der Differenzierung der hämatopoetischen Zellen zurück. Die Rezeptortyrosinkinase spielt eine Rolle beim Überleben, der Proliferation und der Differenzierung der Zellen. Der FLT3-Ligand (FL) verursacht, in Zusammenarbeit mit anderen Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise c-Kit-Ligand, Thrombopoietin oder Interleukin-3, eine Expansion der HSPC [131]. Nichtsdestotrotz können auch derartige molekulare Therapien die AML nicht heilen.

Auch die konventionelle Chemotherapie bewirkt nicht die gewünschte Heilung der Krankheit, da sich die leukämischen Stammzellen nur ein sehr geringes Teilungsverhalten aufweisen und somit, nach erfolgreicher Therapie, einen erneuten Ausbruch der Krankheit verursachen können [132]. Außerdem produziert die KM-Mikroumgebung Signale, die das Überleben der AML-Zellen sicherstellen. Beide Nischen, die endosteale und die vaskuläre, bieten eine Umgebung, welche sowohl normale HSC als auch leukämische Stammzellen unterstützt. Verschiedenste Zytokine, Chemokine und Integrine in diesen Nischen vermittelt das Homing sowie das Überleben dieser Zellen, welche wichtig für die Progression der Leukämie [133, 134] sind. Beispielsweise inhibieren Osteoblasten die CXCL12-vermittelte Apoptose von CXCR4-exprimierenden AML-Zellen [135]. Und es konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Wirkung der CXCR4-Expression auf die AML-Zellen und der Schwere der Krankheit besteht [136].

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit

Das Projekt hatte zum einen das Ziel festzustellen, ob das Leukämiemodell mit einem konditional aktivierten Modellonkogen (MycER) geeignet ist die Auswirkungen der malignen Transformation von HSPC auf die Mikroumgebung im KM zu untersuchen. Zugleich sollte die Hypothese überprüft werden, ob MYC spezifische Veränderungen in der Mikroumgebung auslöst. Diese Onkogen-induzierten Veränderungen könnten günstige Bedingungen für eine Tumorpersistenz, trotz effektiver Elimination der wesentlichen Tumormasse durch die Therapie, hervorrufen. MYC Überexpression kommt in vielen Malignomen (beispielsweise AML) vor und ist mit einer ungünstigen Prognose sowie mit einer aggressiven Tumorbiologie assoziiert [98, 137]. Obwohl *MYC* in der AML keine klassische genetische Aberration darstellt, ist *MYC* auch hier mit einer aggressiven Biologie und schlechter Prognose verbunden und beeinflusst außerdem den Stammzellphänotyp [104-106]. Zur Untersuchung dieser Annahme wurden sowohl zelluläre als auch transkriptionelle Veränderungen in der Mikroumgebung betrachtet. Zudem wurde die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4, der eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung zwischen Nischen- sowie hämatopoetischen Zellen spielt und auch mit einer negativen Prognose in Verbindung gebracht wird, einer genaueren Analyse unterzogen.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Tierversuchsbestimmungen durchgeführt.

E μ -Myc (C57BL/6 Hintergrund; eigene Zucht)

Für die Transplantationsexperimente wurden C57BL/6J-Tiere verwendet.

2.2 Zelllinien

32D [138]	immortalisierte myeloblastenähnliche Suspensionszelllinie, die aus murinen Langzeit-Knochenmarkkulturen gewonnen wurde. Die Zellen sind von der Zugabe von Wachstumsfaktoren (mIL-3) abhängig.
EL08-1D2 [139]	murine Stromazelllinie aus embryonaler Leber (PD Dr. Robert Oostendorp, Klinikum rechts der Isar)
S17 [139]	murine Stromazelllinie aus embryonaler Leber (PD Dr. Robert Oostendorp, Klinikum rechts der Isar)
NIH-3T3 [140]	murine embryonale Fibroblastenzelllinie
NX (Phoenix) Eco 293T [141]	ecotrope Retrovirus-produzierende Zelllinie, die auf der humanen 293T-Zelllinie basiert. 293T-Zellen wurden mit Konstrukten infiziert, welche für die Virusproduktion wichtige Proteine Gag, Pol und Env codieren
RPMI 8226/s [142]	humane Multiple-Myelom-Zelllinie aus peripherem Blut

OCI-Ly10 [143]	humane Zelllinie aus diffus großzelligen B-Zelllymphom
SUDHL-6 [144]	humane Zelllinie aus diffus großzelligem B-Zelllymphom
Daudi [145, 146]	humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie
Raji [147]	humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie
MV4-11 [148, 149]	humane AML-Zelllinie aus peripherem Blut
Molm-13 [150]	humane AML-Zelllinie aus peripherem Blut
THP-1 [151]	humane AML-Zelllinie aus peripherem Blut
PDX-AML-Zellen	„patient derived xenograft“ akute myeloische Leukämiezellen, bereitgestellt von I. Jeremias, München

2.3 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 mL-3 10 ng/ml mL-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

Phoenixzellmedium:	DMEM 10 % FCS (hitzeinaktiviert) Aufbewahrung bei 4 °C
NIH/3T3- Zellmedium:	DMEM 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung Aufbewahrung bei 4 °C
32D- Zellmedium:	RPMI 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung 1 % L-Glutamin Aufbewahrung bei 4 °C
Multiples Myelomzellmedium:	RPMI 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung 1 % L-Glutamin Aufbewahrung bei 4 °C
AML-Zellmedium:	RPMI 20 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung 1 % L-Glutamin Aufbewahrung bei 4 °C
Burkitt-Lymphomzellmedium:	RPMI 20 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren 0,1 % 2-Mercaptoethanol Aufbewahrung bei 4 °C

OCI-Ly10-Zellmedium:	<p>IMDM Glutamax 20 % gefrorenes humanes Frischplasma 1 % Heparin (Natrium 25000) 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung 0,1 % 2-Mercaptoethanol 2x steril filtrieren Aufbewahrung bei 4 °C</p>
HF2+-Puffer:	<p>10 % HBSS, 10x 2 % FCS (hitzeinaktiviert) 1 % HEPES 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung deionisiertes Wasser steril filtrieren; Aufbewahrung bei 4 °C</p>
Gelatine 1 %:	<p>1 % Gelatinepulver deionisiertes Wasser autoklavieren; Aufbewahrung bei 4 °C</p>
FACS-Puffer:	<p>0,5 % BSA DPBS Aufbewahrung bei 4 °C</p>
Einfriermedium:	<p>FCS 10 % DMSO Aufbewahrung bei 4 °C</p>

2.4 Stammlösungen und Puffer

NAB-Puffer (1x):	<p>0,19 % Borax deionisiertes Wasser</p>
LB-Medium (flüssig):	<p>1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl deionisiertes Wasser</p>

LB-Medium (fest):	1,5 % Agar LB Medium
SOC-Medium:	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,058 % NaCl 0,25 % MgCl ₂ (1 M) 1 % MgSO ₄ (1 M) 0,34 % Glukose deionisiertes Wasser
APS (10 %):	10 % Ammoniumpersulfat in Aqua dest.
Azid-Lösung (4 %):	4 % Azid (NaN ₃) in Aqua dest.
Bromphenolblau (1 %):	1 % Bromphenolblau in Aqua dest.
Ladepuffer, 50 ml (5 x):	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 deionisiertes Wasser

Nukleärer Proteinpräparationspuffer A:	1 M HEPES 1 M KCl 1 M Saccharose 1 M MgCl ₂ 1 M DTT 0,1 M PMSF 10 % einer Roche Mini-Complete- Tablette deionisiertes Wasser
Nukleärer Proteinpräparationspuffer B:	1 M HEPES 1 M KCl 1 M NaCl 1 M DTT 0,1 M PMSF Glycerol (87 %-ig) 10 % einer Roche Mini-Complete- Tablette deionisiertes Wasser
Trenngel:	10 - 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 (10 x):	14,4 % Glycin 3 % Tris 1 % SDS deionisiertes Wasser
------------------------	--

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

2.5 Bakterien

DH5- α chemisch kompetente *E. coli* (Invitrogen)

2.6 Plasmide

MIG-R1	J. Miller und W. Pear, Philadelphia
MIG-Myc	zur Verfügung gestellt von C. Schmitt, Berlin
MIG-MycER-EGFP	Littlewood TM <i>et al.</i> , London [152]

2.7 Primer

2.7.1 Genotypisierung

Name	Sequenz 5' \rightarrow 3'
Myc fwd	ACCTCTCCGAAACCAGGCACCGCAA
Myc rev	TCTTGCTCGCGCGCTAGTCCTTTCC

2.7.2 Klonierung

Name	Sequenz 5' \rightarrow 3'
CXCR4 fwd	GTAAACATGAGGGGATCAGTATATACTTCA
CXCR4 rev	GGATCCTTAGCTGGAGTGAAAACCTTGAAGAC

2.7.3 Real Time PCR

Name	Sequenz 5' → 3'
Ubiquitin (human) fwd	CCTGAGGGGTGGCTGTTAAT
Ubiquitin (human) rev	ACCATGCAACGAAACCTTTATT
Ubiquitin (murin) fwd	TGGCTATTAATTATTCGGTCTGCAT
Ubiquitin (murin) rev	CTTGGCTAAGTCGACCTTGTGA
c-Myc (human) fwd	TGCGTAGTTGTGCTGATGTGTGGA
c-Myc (human) rev	TCAGAGTCTGGATCACCTTCTGCT
ODC (murin) fwd	CTTGGCTAAGTCGACCTTGTGA
ODC (murin) rev	CATGGTTCTCGATGTGCTTACAG
CAD (murin) fwd	CTGCCCCGGATTGATTGATGTC
CAD (murin) rev	GGTATTAGGCATAGCACAACCA
CXCR4 (human) fwd	CCGTGGCAAACCTGGTACTTT
CXCR4 (human) rev	TTTCAGCCAACAGCTTCCTT
CXCR4 (murin) fwd	GGGTCATCAAGCAAGGATGT
CXCR4 (murin) rev	GGCAGACTTTTGA ACTTGG
SCF-1 (murin) fwd	AGAGCCAACGTCAAGCATCT
SCF-1 (murin) rev	TAATTTTCGGGTCAATGCACA

2.8 Antikörper

2.8.1 Westernblot

Primärantikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
anti-Aktin	mouse	1/5000	<i>Sigma-Aldrich</i>
anti-Myc	rabbit	1/400	<i>Santa Cruz</i>
anti-XIAP	rabbit	1/1000	<i>Cell Signaling</i>
anti-H3	mouse	1/1000	<i>Cell Signaling</i>
anti-CXCR4	rabbit	1/1000	<i>abcam</i>

2.8.2 Sekundärantikörper

Straptavidin, eFluor®450 conjugated, *eBioscience*

Anti-rabbit IgG, HRP conjugated, *GE Healthcare UK limited*

Anti-mouse IgG, HRP conjugated, *GE Healthcare UK limited*

2.8.3 Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Ly-6G (Gr-1)	PE	RB6-8C5	<i>eBioscience</i>
CD4	PE-Cy5	GK1.5	<i>eBioscience</i>
CD8a	PE-Cy5	53-6.7	<i>eBioscience</i>
CD11b	APC-eFluor 780	M1/70	<i>eBioscience</i>
CD45R (B220)	PE-Cy7	RA3-6B2	<i>eBioscience</i>
CD45	eFluor 450	30-F11	<i>eBioscience</i>
CD166 (ALCAM)	PE	eBioALC48	<i>eBioscience</i>
TER-119	eFluor 450	TER-119	<i>eBioscience</i>
CD31	APC	390	<i>eBioscience</i>
CD117 (c-Kit)	PE	2B8	<i>eBioscience</i>
Ly-6A (Sca-1)	PE-Cy7	D7	<i>eBioscience</i>
lineage (CD3e, B220, Ter119, Gr1, CD11b)	biotinisiert		<i>eBioscience</i>
anti-human CD184 (CXCR4)	PE	12G5	<i>BD Pharmingen</i>
anti-human CD45	eFluor 450	HI30	<i>eBioscience</i>
anti-human CD138	PE-Cy7	DL-101	<i>eBioscience</i>
IgG2a, κ Isotype Control	PE	G155-178	<i>BD Pharmingen</i>

2.9 Kits

Lineage cell depletion Kit, mouse	<i>Miltenyi Biotec</i>
CD45 MicroBeads, mouse	<i>Miltenyi Biotec</i>
CD45R (B220) MicroBeads, mouse	<i>Miltenyi Biotec</i>
Qiagen® HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	<i>Qiagen</i>
Qiagen® HiSpeed® Plasmid Mini Kit	<i>Qiagen</i>
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen</i>
Omniscript RT	<i>Qiagen</i>
Qiaschredder	<i>Qiagen</i>
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	<i>Invitrogen</i>
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>

2.10 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

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

2.11 Enzyme

PfuTurbo DNA-Polymerase	<i>Stratagene</i>
Quick Ligase	<i>New England BioLabs</i>
Shrimp Alkaline Phosphatase	<i>Promega</i>
Taq-Polymerase	<i>Invitrogen</i>

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

2.12 Chemikalien, Medien und Supplement

α-MEM	<i>Gibco</i>
2-Mercaptoethanol, 50 mM	<i>Invitrogen</i>
5-Fluoruracil	<i>Medac</i>
ACK-Lysepuffer	<i>Gibco</i>
Acrylamid/Bisacrylamid, 30 %	<i>Sigma-Aldrich</i>

Agarose NEEO ultra quality Roti®Garose	<i>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>
Bovine Serumalbumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Collagenase Typ I	<i>Worthington</i>
Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail)	<i>Roche</i>
Deionisiertes Wasser	<i>Braun</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Riedel-de Haën</i>
dNTP Mix, 10 mM	<i>Fermentas</i>
Deoxyribonuclease I (DNase)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	<i>Invitrogen</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Invitrogen</i>
Erdnussöl	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ethanol	<i>Riedel-de Haën</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Roth</i>
Ethylenglycolbistetraessigsäure (EGTA)	<i>Roth</i>
Fetales Kälber Serum (FCS)	<i>PAA Laboratories GmbH</i>
Fetales Kälber Serum Gold	<i>PAA Laboratories GmbH</i>
Ficol (Biocoll) Separation Solution	<i>Biochrom AG</i>
Formalin (4 %)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Glycin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Hank's Buffered Salt Solution, 10x (HBSS)	<i>Gibco</i>
Heparin (Natrium 25000)	<i>ratiopharm</i>
HEPES	<i>Sigma-Aldrich</i>
Horse Serum (HS)	<i>PAA</i>
Iscorve'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>
D-Luciferin; Natriumsalz	<i>AAT Bioquest</i>
Magensiumchlorid (MgCl ₂)	<i>Merck</i>
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	<i>Roth</i>
Methanol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>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>
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>
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>
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>
Tamoxifen	<i>Sigma-Aldrich</i>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	<i>Roth</i>
Trockenmilchpulver	<i>Fluka</i>

Trypanblau 0,4 %	<i>Invitrogen</i>
Trypsin-EDTA-Lösung, 10 x	<i>Gibco</i>
Tween 20	<i>Roth</i>

2.13 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>
Transwellkammer	<i>Corning</i>
Whatman [®] Papier	<i>Biometra</i>
Zellkulturflaschen	<i>Greiner Bio-One GmbH</i>
Zellkulturschalen	<i>TPP</i>
Zellsieb	<i>BD Bioscience</i>

2.14 Geräte und technisches Zubehör

-20°C Gefrierschrank (Liebherr Premium)	<i>Liebherr Hausgeräte GmbH</i>
4°C Kühlschranks (Liebherr Premium)	<i>Liebherr Hausgeräte GmbH</i>
-80°C Gefrierschrank	<i>Sanyo</i>
Analysewaage	<i>Kern</i>
Bakterieninkubator (Infors HAT Minitron)	<i>Infors GmbH</i>
Bestrahlungseinheit	<i>Gulmay</i>
Brutschrank (Heraeus Hera cell 240)	<i>Heraeus</i>
Durchflusszytometer (Cyan ADP Lx P9)	<i>Cytomation; Beckman Coulter</i>
Durchflusszytometer (MoFlo)	<i>Cytomation; Beckman Coulter</i>
Durchflusszytometer (Aria)	<i>Becton Dickinson</i>
Filmentwickler (Hyperprocessor)	<i>Amersham Life Science</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>
NanoDrop 2000c	<i>Thermo Scientific</i>
PTC 200 thermal cycler	<i>Bio-Rad</i>
Thermal cycler Bioer GeneTouch	<i>Biozym Scientific GmbH</i>
Photometer (SmartSpec™ PLUS)	<i>Bio-Rad</i>
Pipetboy Integra	<i>Integra Biosciences AG</i>
Real time PCR machine (StepOnePlus™)	<i>Applied Biosystems</i>
SDS-Gelelektrophoresekammer (Multigel Long)	<i>Biometra GmbH</i>
Sezierbesteck	<i>Fine Science Tools GmbH</i>
SONOPLUS Homogenisator (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	<i>Scil</i>
Wasserbad	<i>Grant</i>
Zählkammer (Neubauer)	<i>LO-Laboroptik</i>

2.15 Softwareprogramme

FlowJo	TreeStar Inc.
Graph Pad Prism	GraphPad Software Inc.
Microsoft Excel	Microsoft Inc.
Microsoft Power Point	Microsoft Inc.
Microsoft Word	Microsoft Inc.
Adobe Acrobat	Adobe Systems Software Ireland Ltd.
Vector NTI	Invitrogen
SimplePCI	Hamamatsu Corporation

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Während des Klonierungsvorgangs wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet, um das gewünschte Gen zu amplifizieren und mit den benötigten Restriktionsschnittstellen zu versehen. Als Matrize wurden Vektoren benutzt, die das Zielgen beinhalteten. Die entworfenen Primer codierten die Sequenz einer anzuhängenden Restriktionsschnittstelle und enthielten mindestens 12 Basen der Anfangs- oder Endsequenz des zu vervielfältigenden Gens. Die Primer wurden so gewählt, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen besaßen (55 °C – 61 °C), einen GC-Gehalt von 40 - 60 % und keine Selbsthomologie aufwiesen. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5 °C unter der Schmelztemperatur gewählt, um eine effiziente Anlagerung der Primer zu gewährleisten, jedoch unspezifische Bindungen 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 der vollständigen Dissoziation der DNA-Stränge. Im zweiten Schritt wird der Amplifizierungszyklus, welcher sich aus den Teilschritten 'Dissoziation', 'Hybridisierung' sowie 'Strangverlängerung' zusammensetzt, 40-mal wiederholt, um eine ausreichende DNA-Menge für die weiteren Versuche zu erhalten. Der anschließende dritte Schritt dient der Vollendung aller begonnenen Strangverlängerungen. Der finale Schritt

gewährleistet die Stabilität der DNA bis zur Beendigung des Programms. Die PCR-Programme wurden je nach Produkt individuell variiert. Vor allem die Zeiten der Dissoziation sowie der Strangverlängerung wurden der Länge der Matrize angepasst (ca. 1 sek/10 Basen).

PCR-Programm (für CXCR4): 95 °C 2 min
 95 °C 15 sek (Dissoziation)
 55 °C 1 min (Hybridisierung) } 40 x
 72 °C 1,5 min (Verlängerung)
 72 °C 10 min
 4 °C bis zum manuellen Stopp

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für eine gründliche Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese mit 10x DNA-Probenpuffer (*Qiagen*) versetzt und auf ein ethidiumbromidhaltiges (0,5 µg/ml, *Carl Roth*), 1 % iges Agarosegel mit NaB-Puffer (0,01 M Di-Natriumtetraborat (*Sigma-Aldrich*)) aufgetragen. Die angelegte Spannung von 200 Volt teilte die negativ geladenen DNA-Moleküle größenabhängig auf.

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 dem Agarosegel erfolgte mit dem „Qiaquick® Gel Extraction Kit“ von *Qiagen* nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde, je nach gewünschter Konzentration, mit Aqua dest. eluiert und anschließend für den Restriktionsverdau angewendet. Alternativ wurde die DNA bei -20 °C eingefroren und bis zum Gebrauch gelagert.

3.1.4 Restriktionsenzymverdau

Um die korrekte Orientierung des PCR-Produktes im Zielvektor zu gewährleisten, wurden für die Klonierung am 5'- und 3'-Ende des PCR-Produktes unterschiedliche Restriktionsschnittstellen angefügt. Damit eine 100%-ige Effizienz gewährleistet werden konnte, wurden die Restriktionsverdau der aufgereinigten DNA und des Zielvektors separat durchgeführt. Für einen vollständigen Verdau wurde die DNA eine Stunde bei 37 °C unter Zugabe der entsprechenden Endonukleasen und des passenden Puffers inkubiert. Nach der Restriktion wurde die DNA mit Hilfe des „Qiaquick® DNA Purifikation Kit“ von *Qiagen* aufgereinigt, mit Aqua dest. eluiert sowie direkt dephosphoryliert oder bei -20 °C eingelagert.

Restriktionsansatz: 28 µl PCR-Produkt

1 µl Enzym 1

1 µl Enzym 2

3,3 µl Puffer

3.1.5 Dephosphorylierung

Um die Religation des Zielvektors zu vermeiden, wurde die Dephosphorylierung des linearisierten Plasmids vorgenommen. Zu diesem Zweck 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.

Dephosphorylierungsansatz: 10 µl Vektor-DNA

0,5 µl SAP

1 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 Konzentration 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 Aqua dest.
5 µl 2x Ligationspuffer
0,5 µl Quick T4 DNA-Ligase
auf 10 µl mit Aqua dest. auffüllen

3.1.7 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben

Bei einer Zellanzahl höher als 1×10^5 wurde die mRNA zur Bestimmung der Expressionsaktivität der Zellen mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kit“ von *Qiagen* nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Für die Homogenisierung wurde der „Qiagen® QIAshredder“ von *Qiagen* verwendet oder, bei einer Zellzahl unter 1×10^6 Zellen, das im RLT-Puffer gelöste Zellpellet für eine Minute gevortext. Um eine bessere Aufreinigung zu erzielen wurde der vom Hersteller empfohlene DNase-Verdau durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde anschließend direkt bei der reversen Transkription angewendet oder bei -80 °C eingelagert. Die RNA-Gewinnung erfolgte mittels, in Stickstoff schockgefrorener, Proben.

3.1.8 Reverse Transkription zur Generierung von cDNA

Für die Generierung komplementärer cDNA wurde zunächst die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt. Bei der anschließenden cDNA-Synthese wurde je ein 1 µg RNA pro Reaktion eingesetzt. Zur Durchführung des Synthesevorgangs wurde das „Qiagen® Omniscript RT Kit“ von *Qiagen* mit Oligo(dT)-Primern (*Invitrogen*) und RNase Out (*Invitrogen*) nach Angaben des Herstellers verwendet. 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: 1 µg RNA in 12 µl RNase-freiem Wasser
 2 µl 10x Puffer RT
 2 µl dNTPs
 2 µl oligo-dT (1:5 Verdünnung)
 1 µl RNase out (1:4 Verdünnung)
 1 µl Reverse Transkriptase

3.1.9 Quantitative RT-PCR

Die Real Time PCR (RT-PCR) ist eine Methode, um den Expressionslevel eines Gens zu bestimmen. Hierbei wird die Anzahl der Zyklen gemessen bis die amplifizierte DNA ein definiertes Level erreicht hat. 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. Hierfür wurde die cDNA aus den reversen Transkriptions-Versuchen angewendet und mit Hilfe eines Applied Biosystems 7900HT analysiert. Die Messungen erfolgten in doppelter bzw. dreifacher Ausführung; zur Quantifizierung wurde auf das Kontrollgen Ubiquitin normiert.

Reaktionsansatz: 15,6 µl Power Sybr Green PCR Master Mix
 0,5 µl ROX
 1 µl Primer (forward und reverse, jeweils 10 µM)
 1,8 µl cDNA
 8 µl H₂O

Programm: 95 °C 1 min
 95 °C 15 sek }
 60 °C 1 min } 40 x
 95 °C 15 sek }
 60 °C 1 min } Schmelzkurve
 95 °C 15 sek }

3.2 Bakterielle Arbeiten

3.2.1 Transformation

Bakterien, die man chemisch oder physikalisch behandelt, so dass ihre Zellwände durchlässig werden, nennt man kompetente Bakterien. Diese Organismen sind besser in der Lage exogene, zirkuläre DNA aufzunehmen als konventionelle Bakterien. Die kompetenten Bakterien – im Falle der vorliegenden Versuche sind dies chemokompetente *E.coli* – wurden bei -80 °C gelagert und langsam auf Eis aufgetaut. Der letzte Schritt sollte dazu dienen die Wirkung des Hitzeschocks (aufgrund des deutlichen Temperaturunterschieds) zu verstärken und daraus resultierend die Transformationsrate erhöhen, da die rekombinanten DNA-Moleküle dadurch verstärkt von den Zellen aufgenommen werden können. Unter dem Begriff der Transformation versteht man einen Prozess, bei dem exogenes, genetisches Material von Bakterien aufgenommen, inkorporiert und exprimiert wird. Zu den chemokompetenten Bakterien wurde der Ligationsansatz oder ein bereits bestehendes Plasmid (1 µg) zugegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde 45 sek bei 42 °C durchgeführt, danach ruhte der Ansatz für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert. Im folgenden Schritt wurden, je nach erwarteter Effizienz, Teile des Ansatzes auf einer vorgewärmten LB-AMP-Platte ausgestrichen. Die anschließende Inkubation bei 37 °C erfolgte über Nacht.

3.2.2 Plasmid-Präparation

Um die Anzahl einzelner Zellklone zu erhöhen und daraus resultierend die erhaltene Plasmid-DNA zu vervielfachen 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 gewünschter Menge wurden 5 ml (Mini-Präparation) oder 200 ml (Maxi-Präparation) angeimpft. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des „Qiagen® Spin Miniprep Kit“ oder des „Qiagen® HiSpeed® Plasmid Maxi Kit“ von *Qiagen* nach den Herstellerangaben. Die DNA wurde mit Aqua dest. eluiert und die Konzentrationen anschließend photometrisch bestimmt. Danach 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.

3.2.3 Sequenzierung

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

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Ein Goldstandard zur Analyse von Proteinleveln in Zelllysaten ist die SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). SDS ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert und somit linearisiert. Außerdem gibt es der Proteinkette eine negative Ladung. Die denaturierten sowie negativ geladenen Proteine werden auf dem Polyacrylamidgel mit Hilfe eines elektrischen Feldes getrennt, da sie zur positiven Elektrode wandern. Dadurch erfolgt eine Auftrennung der Proteine je nach Größe. Kleine Proteine können weiter in das Gel einwandern, während größere Proteine im oberen Teil verbleiben. Die Konzentration der Acrylamide im Gel bestimmt die Größe der Mikroporen. Folgend werden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert (Westernblot). Auf dieser können dann, mittels Primärantikörper gegen Oberflächenstrukturen, bestimmte Proteine ermittelt werden. Ein sekundärer Peroxidase-konjugierter Antikörper bindet an den Primärantikörper, wodurch es zu einer chemischen Reaktion mit einhergehender Lumineszenz kommt. Die Lumineszenzstärke wiederum ist direkt proportional zur Proteinmenge.

Für die Zellyse wurden in Stickstoff schockgefrorene Zellpellets in eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Durch die anschließende Sonifizierung wurden die Zellen aufgebrochen und die Proteine durch eine folgende Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, 4 °C) von den Zelltrümmern getrennt.

Die Trennung der nukleären von der cytosolischen Fraktion erfolgte indem man die Zellpellets für 5 min auf Eis in 100 µl Puffer A inkubierte und anschließend

für 5 Sek bei 13.000 rpm abzentrifugierte. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und stellte die cytosolische Fraktion dar. Das im Eppendorfgefäß verbliebene Pellet wurde erneut mit 100 µl Puffer A gewaschen und das Gemisch anschließend nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Im folgenden Schritt wurde das Pellet mit 100 µl Puffer B resuspendiert und sonifiziert. Danach wurde die Suspension für 1 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben, wodurch man die nukleäre Fraktion erhielt.

Die Proteinkonzentration wurde, unter Verwendung des „Protein Assay“ von *BioRad*, photometrisch bestimmt. Die Proteinlysate wurden bei -80 °C gelagert. Pro Ansatz wurden 20 - 50 µg Protein eingesetzt, welche auf ein einheitliches Volumen (bis 32 µl) gebracht und mit 5 x SDS-Probenpuffer (1 x eingesetzt) versetzt wurden. Die fertigen Ansätze wurden dann 5 min auf 95 °C erhitzt, anschließend auf Eis inkubiert und zur Sammlung der Flüssigkeit abzentrifugiert.

3.3.2 SDS-Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot

Die Proteinlysate wurden anschließend auf das zuvor gegossene Gel (10 - 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. Erfolgte die Proteinauftrennung über Nacht, so wurde nach dem Einlaufen der Proben in das Gel eine Spannung von 30 Volt angelegt. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch einen Nasstransfer auf PVDF-Membranen (0,45 µm, Millipore) 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).

3.3.3 Immunhistochemische Proteinbestimmung

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese, zum Abblocken unspezifischer Reaktionen, für 1 h 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 (in 5 % Milch oder 5 % BSA) inkubiert. Dreimaliges Waschen mit PBST (10 min) und die anschließende Inkubation mit dem Zweitantikörper (in 5 % Milch/ 5 % BSA) für 45 min folgten. Vor dem Entwickeln wurde die Membran erneut gewaschen (2 x 10 min PBST, 20 min PBS). Die Entwicklerlösungen „Super Signal West“ (Pico, Dura und Femto) von *Pierce* wurden zur Detektion der Proteine verwendet.

3.4 Zellbiologische Methoden

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

3.4.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Die murine, myeloische Zelllinie 32D wurde 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, weswegen die Kultur alle 2 – 3 Tage auf eine Dichte von 1×10^5 bzw. 2×10^4 Zellen/ml reduziert wurde.

Die humanen Multiple-Myelomzelllinien RPMI 8226 und U-266 (10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin) ebenso wie die humanen AML-Zelllinien Molm-13, MV4-11 sowie THP-1 wurden in angereichertem RPMI-Medium (20 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Sie wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml ausplattiert. Die humanen Burkitt-Lymphomzelllinien Daudi und Raji wurden ebenfalls im RPMI-Medium (20 % FCS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol) kultiviert. Die humane, diffus großzellige B-Zelllymphom-

Zelllinie OCI-Ly10 wurde in IMDM mit 20 % humanem Frischplasma, 1 % Heparin (Natrium 25.000), 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung und 0,1 % 2-Mercaptoethanol kultiviert.

3.4.2 Kultivierung von adhärennten 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 einer 80 %-igen Konfluenz durch Trypsinierung von der Zellkulturflasche gelöst und im Verhältnis 1:10 gesplittet.

Die Phoenix-E-Zellen wiederum wurden nach dem Auftauen mit einer Zellzahl von 5×10^6 in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche ausgesät und nach etwa 24 h wieder auf diese Zellzahl reduziert. Da Phoenixzellen sehr empfindlich sind, wurden diese maximal 1 min lang trypsiniert.

Die Stromazelllinie EL08-1D2 wurde auf, mit 0,1 %-iger Gelatine behafteten, Zellkulturschalen ausgesät und bei annähernd vollständiger Konfluenz, durch Trypsinierung im Verhältnis 1:10 gesplittet.

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Anzahl an lebenden Zellen wurde mittels einer Neubauer Zählkammer und 0,5 %-iger Trypanblaulösung bestimmt. Hierzu wurde die Zellsuspension mit der Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 verdünnt und ein kleiner Tropfen davon in die Zählkammer eingebracht. Da tote Zellen den Trypanblau-Farbstoff absorbieren färben sie sich blau. Lebende Zellen hingegen besitzen eine intakte Zellmembran, wodurch der Farbstoff nicht ins Zytosol gelangen kann und die Zellen folglich unter dem Mikroskop in einem hellen Weiß erscheinen. Die, in zwei Quadranten befindlichen ungefärbten, lebenden Zellen wurden gezählt und mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die vorliegende Zellanzahl annäherungsweise abschätzen zu können.

3.4.4 Herstellung von Retroviren und die retrovirale Infektion

Die Transfektion beschreibt einen Prozess bei dem exogenes Erbmateriale in eukaryotische Zellen eingebracht werden soll. Phoenix-E-Zellen wurden mit der kationischen, liposomalen Substanz LipofectaminTM 2000 (Life Technologies) transfiziert, wodurch die DNA mit Hilfe von Liposomen in die Zellen eingebracht wurde. Die kationischen Lipide bilden eine kompakte Struktur mit der negativ geladenen DNA. Bedingt durch ihre positive Ladung und ihre lipophile Struktur interagieren diese Komplexe mit der negativ geladenen sowie hydrophoben Zellmembran und können somit durch Phagozytose in die Zelle gelangen.

Für die Transfektion der Phoenix E-Zellen wurden am Vorabend 2×10^6 Zellen pro 6 cm-Kulturschale ausplattiert. Im nächsten Schritt wurde pro Zellkulturschale ein Gemisch aus jeweils 10 µg der einzubringenden Plasmid-DNA und 500 µl Opti-MEM® I Reduced Serum Medium angesetzt, welches vor der Zugabe zu den Zellen zunächst 5 min bei Raumtemperatur inkubiert werden musste. Nach Ablauf dieses Zeitintervalls wurde jeder Zellansatz mit der LipofectaminTM 2000/Plasmid-DNA-Emulsion versehen und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde das Medium von den Phoenix-E-Zellen abgenommen und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Um ein Abschwemmen der schwach adhärenen Phoenixzellen zu verhindern, wurde der Lipofectaminansatz anschließend sehr vorsichtig auf die Zellen aufgetragen. Nach einer Inkubationseinheit von 4 - 6 h im Brutschrank wurde das Medium erneut abgenommen und durch 3 ml frisches Medium ausgetauscht.

Die Phoenix-E-Zelllinie enthält Informationen, welche für die Codierung struktureller Gene benötigt werden, die ihrerseits die Bildung infektiöser Viruspartikel bewirken. Die eingebrachte Plasmid-DNA wird in komplementäre RNA transkribiert, in die Viruspartikel verpackt und anschließend in das Medium abgegeben.

Der retrovirale Überstand wurde nach 12, 24 und 36 h abgenommen, durch einen Zellfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, um eventuell abgelöste Phoenix-E-Zellen auszuschließen - und unter Zugabe von 8 µg/ml Polybren direkt auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Polybren ist ein kationisches Polymer, das die Infektionseffizienz erhöht. Charakteristisch für Retroviren ist das Enzym

Reverse Transkriptase, welches die Virus-RNA in DNA transkribiert. Die DNA kann folglich in das Genom, von sich teilenden Zellen, integriert werden. Für die Infektion adhärenter Zellen wurden diese am Vortag mit einer geringen Zelldichte ausplattiert, um den Vorgang der Proliferation, die Voraussetzung retroviraler Infektion, zu gewährleisten [153]. Bei der Infektion von primären Knochenmarkzellen hingegen wurden Mäuse 4 Tage vor der Knochenmarksentnahme mit 5-FU behandelt (siehe Kapitel 3.5.3). 5-FU tötet aktive, zirkulierende Zellen und eliminiert somit den Vorläuferpool sowie alle sich teilenden hämatopoetischen Zellen [154, 155]. Lediglich die ruhenden HSC verbleiben und werden aktiviert, d.h. werden zur Teilung angeregt, um das hämatopoetische System zu regenerieren. 4 Tage nach der 5-FU-Injektion ist das Knochenmark reich an sich teilenden Vorläuferzellen, die kultiviert und mit Zytokinen zur weiteren Zellteilung angeregt werden können. Für die retrovirale Infektion wurden etwa 5×10^5 Knochenmarkzellen in 500 μ l BBMM mit 2 ml Retrovirus in Polybren versetzt. 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 Suspensionszelllinien wurden mit 1200 rpm für 1 h bei 32 °C zentrifugiert. Die Infektionseffizienz der Zellen wurde am nächsten Tag, nach der letzten Infektion, durchflusszytometrisch bestimmt.

3.4.5 Selektion der Virus-Verpackungszelllinie

Phoenix-E-Zellen tragen Plasmide mit den Genen *gag*, *pol* und *env* in sich, welche für die Virusproduktion bedeutsam sind. Die Gene *gag* und *pol* befinden sich beide auf einem Vektor, welcher zusätzlich eine Hygromycin-B-Resistenz trägt. Das Expressionsplasmid, das für *env* kodiert, beinhaltet zusätzlich eine Resistenz für das Diphtherietoxin. Durch eine regelmäßige Selektion der Zellen kann gewährleistet werden, dass diese *gag*, *pol* und *env* exprimieren. Die Selektion fand in einem Zeitraum von 7 Tagen und unter der Zugabe von 300 μ g/ml Hygromycin B sowie 1 μ g/ml Diphtherietoxin statt. Die Zellen wurden täglich auf 5×10^6 Zellen/75 cm²-Flasche gesplittet. Nach Absetzen des Selektionsmediums wurden die Zellen zwischen Passage 4 und 10 für die Virusproduktion verwendet.

3.4.6 Zellsort und Oberflächenfärbung für Durchflusszytometrie

Durch Markierung zellspezifischer Oberflächenantigene mit fluorochromen Antikörpern (Antikörperliste in Kapitel 2.7.2) können Zellen immunphänotypisch bestimmt werden. Dafür wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen eingesetzt, welche anschließend 15 min lang mit den Antikörpern in FACS-Puffer auf Eis und unter Lichtausschluss inkubiert wurden. Das anschließende Waschen mit 1 ml FACS-Puffer entfernte überschüssige, nicht gebundene Antikörper. Bei Bedarf, wurde ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der ebenfalls in FACS-Puffer 15 min lang auf Eis inkubiert wurde. Um tote Zellen aus den Analysen ausschließen zu können, wurden die gefärbten Zellen für die durchflusszytometrische Messung in FACS-Puffer mit $1 \mu\text{g/ml}$ PI (*Invitrogen*) aufgenommen und auf dem CyAn ADP Lx P9 analysiert. Der folgende Zellsort wurde am MoFlo Legacy 14 Farbenzellsorter oder am Aria durchgeführt.

3.5 Grundlegende tierexperimentelle Techniken

3.5.1 Haltung und Verpaarung der Mäuse

Die Haltung der Tiere erfolgte in einzelbelüfteten Mäusekäfigen. Als Nahrung erhielten die Versuchstiere autoklaviertes Futter der Firma *Altromin* sowie autoklaviertes Trinkwasser ad libitum. Die Unterbringung der Mäuse erfolgte in speziell konzipierten und ausgestatteten Tierhaltungsräumen. Um einer Kontamination durch infektiöse Erreger vorzubeugen, den Hygienestandard sowie eine artgerechte Haltung zu gewährleisten, wurde auf eine personenlimitierte Zutrittskontrolle, die Pflege bzw. Versorgung der Tiere durch ausgebildete Versuchstierpfleger, eine kontinuierliche Klimatisierung und einen Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h mit Dämmerphase geachtet. Das Hygienemanagement erfolgte gemäß den Empfehlungen der FELASA.

3.5.2 Markierung und Genotypisierung der Mäuse

Die Markierung der gezüchteten Mäuse erfolgte 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 in Gewebe-Lysepuffer mit 200 µg/ml Proteinase K über Nacht bei 50 °C verdaut. Am folgenden Tag wurde das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert, das Lysat wurde gevortext und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die Genotypisierung wurde mit Hilfe einer PCR durchgeführt, bei der, für die Tiere spezifische Sequenzen, amplifiziert wurden. Die Genotypisierung für Eµ-*Myc* wurde mit der Taq-Polymerase von *Qiagen* durchgeführt. dNTPs wurden von der Firma *Fermentas* bezogen.

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 10 x Puffer

5 µl 5 x Q-Solution

0,7 µl dNTPs (10 mM pro Nukleotid)

0,5 µl Taq-Polymerase

11,3 µl Wasser

PCR-Programm:

4 min 94 °C

1 min 94 °C

90 sek 62 °C } 33 x

2 min 72 °C

7 min 72 °C

4 °C bis zum manuellen Stopp

Das Eµ-*Myc* hat eine Größe von 813 bp.

3.5.3 Knochenmarkstransplantation

Zur Anreicherung primärer Stammzellen wurde den Spendertieren das Uracil-Analogon 5-FU von *Medac* verabreicht. Hierfür wurde ihnen 4 Tage vor der Knochenmarkentnahme pro Gramm Körpergewicht 150 µg 5-FU in HF2+-Puffer intraperitoneal injiziert. Am vierten Tag wurden die Mäuse durch zervikale

Dislokation getötet und die Knochen wurden präparativ entfernt. Die Entnahme des Knochenmarks erfolgte, wie in Kapitel 3.5.8 beschrieben, unter einer Sterilbank. Bei sofortiger Nutzung des KM wurde mit Hilfe von dem ACK-Lysepuffer eine Erythrozytenlyse für 10 min auf Eis durchgeführt. Alle verwendeten Puffer waren steril und auf 4 °C gekühlt.

Für die retrovirale Infektion der primären Zellen mussten diese zunächst prästimuliert werden; dieser Vorgang erfolgte über Nacht unter Zugabe von Prästimulationsmedium. Die hinzugefügten Wachstumsfaktoren sorgten für die Anregung der Zellteilung primärer Stammzellen, welche für die retrovirale Infektion ausschlaggebend sind.

Die retrovirale Transduktion fand, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, statt. 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 neues Medium überführt und schlussendlich wieder dem Ansatz zugeführt.

Vor der Transplantation wurden die 6 - 8 Wochen alten Empfängertiere mit einer Dosis von 850 rad (8,5 Gy) für C57Bl/6-Mäuse bestrahlt. Durch diese myeloablative Bestrahlung wurde gewährleistet, dass die folgende Hämatopoese von den Transplantaten ausging. Vor der Transplantation konnten sich die Tiere für 24 h Stunden von der Bestrahlung erholen. Die Transplantation der Virusinfizierten Zellen geschah nach der durchflusszytometrischen Bestimmung der transgenen Anteile und der 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 hervorgerufen wurde und damit eine erleichterte Injektion möglich war. Um durch die Transplantation ausgelöste Infektionen zu vermeiden, wurde dem Trinkwasser der Tiere 2 Wochen lang Ciprofloxacin (2 mg/100 ml) zugegeben.

3.5.4 Überwachung transplanteder Tiere

Die Überwachung der Mäuse erfolgte täglich durch eine Kontrolle des Befindens und wöchentlichen bis monatlichen Blutentnahmen. Letztere wurden mit

Rekonstitution des Systems nach 14 - 21 Tagen begonnen und mittels einer Punktion der Wange durchgeführt. Das Vollblut wurde am „VetABC-Blood-Counter“ vermessen und die Zellen nach zweimaliger Erythrozytenlyse mit ACK-Lysepuffer (10 min auf Eis) durchflusszytometrisch bestimmt. Bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes wurden die Tiere getötet und analysiert.

3.5.5 Applikation von Tamoxifen

Um MycER in den infizierten sowie transplantierten Knochenmarkzellen zu aktivieren, wurde 9 Wochen nach der Transplantation Tamoxifen (*Sigma*), gelöst in Erdnussöl, beziehungsweise Erdnussöl allein für die Kontrollversuche, täglich den Tieren über einen Zeitraum von 4 Tagen mit einer Dosis von 1 mg/Tag intraperitoneal injiziert.

3.5.6 Organaufbereitung transplantierte Mäuse

Die Organe erkrankter Mäuse wurden auf pathologische Veränderungen hin untersucht. Dafür wurden die Organe nach Eröffnung des Abdomens sowie des Thorax entfernt und gewogen. Die Milzen wurden unter Zuhilfenahme eines Spritzenkolbens durch ein 100-µm Sieb gepresst. Die Knochen von Femur sowie Tibiae der hinteren Extremitäten wurden auf beiden Seiten eröffnet und das Knochenmark wurde mittels HF2+-Puffer durch eine Spritze herausgespült. Das aus den Milzen gewonnene Zelllysate wurde homogenisiert und durch einen 30 µm-Spitzfilter gepresst. Nachdem die Zellen für 5 min bei 300 g herunterzentrifugiert wurden, begann die 5-minütige Lyse der Erythrozyten unter Zugabe von ACK-Erythrozytenlysepuffer der Firma *Gibco*. Anschließend wurden die Zellen erneut herunterzentrifugiert und in HF2+-Puffer aufgenommen. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen aufgefangen und vermessen. Daraufhin wurde es ebenfalls einer Erythrozytenlyse unterzogen (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.

Um Zellen der hämatopoetischen Nische im Knochenmark besser zu isolieren, wurden die Knochen nach dem Herausspülen des Knochenmarks in 2 - 3 Stücke geschnitten und 2 – 3 x kurz gemörsert. Die erhaltenen Knochensplitter wurden danach mit PBS über einem 100 µm Sieb in ein Falcon gewaschen. Im Anschluss wurden 3 mg/ml Collagenase und 15 µg/ml DNase zu jeweils 2 ml PBS pro Well eines 6-Well Formats gegeben. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und der Ansatz 45 min lang bei 37 °C und 110 rpm inkubiert, damit sich die Nischenzellen an den Knochenwänden lösen konnten. Anschließend wurden die Zellen wiederum zweimal mit PBS und einmal mit HF2+ Puffer über einem Zellsieb gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellen für 5 min bei 300 g herunterzentrifugiert, resuspendiert und gezählt.

3.6 Transkriptomanalyse

Für die Genexpressionsanalyse wurden die isolierten KM-Zellen mit Hilfe der Antikörper CD45-APC-Cy7 und Ter119-pb (siehe Kapitel 3.4.6) gefärbt. Am Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene wurden die GFP-, CD45-, Ter119- Zellen, welche für die RNA-Isolierung verwendet wurden (Kapitel 3.1.7), aufgereinigt. Die so gewonnene RNA wurde daraufhin für die Genexpressionsanalyse auf einem Affymetrix Mouse Gene ST 1.0 Oligonukleotidarray verwendet. Die Analyse des Arrays wurde von der Expression Core Facility am Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene durchgeführt. Die Rohdaten wurden mittels R und Bioconductor [156] auf Qualität analysiert.

3.7 Bioinformatische Auswertung

Für den Zwei-Wege-Vergleich wurde der Limma [157] t-statistische Ansatz mit der Benjamini-Hochberg multiplen Testkorrektur [158] verwendet, um die „differentially expressed genes“ (DEGs) von den normalisierten Genen zu unterscheiden. Gene wurden als unterschiedlich exprimiert definiert, wenn sie eine Expression von $-1 \geq \log_2FC \geq 1$ und $P \leq 0,05$ (nicht auf multiple Tests korrigiert) aufwiesen. Das hierarchische Clustering der DEGs sowie die daraus resultierende Darstellung in

Form einer Heatmap wurden mittels des Computerprogramms R und dessen Anwendung gplots durchgeführt [156].

Die biochemischen Signalweginformationen wurden mittels der ConsensusPath-Datenbank (<http://consensuspathdb.org>) [159] gewonnen. Hierbei handelt es sich um eine integrative Datenbank mit 4.601 aufgeführten biochemischen Signalwegen im *Homo sapiens*, gewonnen aus 32 öffentlichen Quellen, wie beispielsweise KEGG [160] Reactome [161], Wikipathways [162] und NetPath [163].

Protein-Protein-Interaktionen (PPI) wurden ebenfalls von der ConsensusPathDB (<http://consensuspathdb.org>) [159] gewonnen. Für die Netzwerkanalyse wurde das Netzwerkmodul der Datenbank benutzt.

3.8 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden Femora aus *GFP*-, *Myc-GFP*- und *MycER*-Mäusen in 4 % Formalin fixiert. Die 4 – 5 µm dicken, histologischen Schnitte wurden in der Pathologieabteilung von Dr. Martina Rudelius angefertigt, gefärbt und ausgewertet. Hierzu wurden die Femora zunächst in Paraffin eingebettet und der fertige Paraffin-Block anschließend mit einem Rotationsmikrotom geschnitten. Daraufhin wurden die Schnitte deparaffiniert, mit Hämatoxylin sowie Eosin gefärbt und dehydriert. Es wurden jeweils 3 unabhängige Gesichtsfelder von zwei Personen, bei einer 40-fachen Vergrößerung, ausgewertet.

3.9 Statistische Auswertungsverfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Student's t-Test (Graph Pad Prism R Version 5 und 6). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM aufgeführt. In Experimenten mit ≥ 3 Gruppen wurde der ANOVA-Test verwendet um signifikante Unterschiede festzustellen. Unterschiede zwischen den einzelnen Experimentalgruppen werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$, das heißt wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % liegt.

4 Ergebnisse

4.1 MYC-Überexpression induziert eine letale myeloproliferative Erkrankung

Wissenschaftliche Publikationen haben gezeigt, dass eine *Myc*-Überexpression eine myeloide Erkrankung mit den Charakteristika einer Myeloproliferation bzw. einer akuten myeloischen Leukämie verursacht [164, 165]. Um festzustellen welche Veränderungen in der Mikroumgebung zu finden sind, die durch das tumorzelliinterne Onkoprotein MYC hervorgerufen werden, wurde das *Myc*-Leukämie/ Myeloproliferationsmodell etabliert (Abb. 4a). Zu diesem Zweck wurden Knochenmarkszellen (KM) von 5-FU behandelten Spendermäusen mit Retroviren infiziert. Diese Retroviren enthielten Genabschnitte, die entweder das Fusionsprotein *Myc-GFP* oder die Leervektorkontrolle *GFP* – abhängig von der Aktivität eines konstitutiv aktiven Promotors – kodierten. Wurde nun syngenen Empfänger-mäusen, die zuvor letal bestrahlt worden sind, das *Myc-GFP*-KM transplantiert, so resultierte dies in einem schnellen Beginn der letalen Leukämie/ Myeloproliferation mit einer mittleren Latenz von 28 Tagen. Von den *GFP*-Kontrollmäusen hingegen verstarb keine einzige (Abb. 4b) während der Beobachtungsperiode. Die MYC-induzierte Krankheit war charakterisiert durch eine massive Leukozytose, die vor allem durch eine Vermehrung der Mono- und Granulozyten- im peripheren Blut sowie im KM gekennzeichnet war (Abb. 4c-e). Des Weiteren zeigten die *Myc-GFP*-Mäuse eine stark ausgeprägte Splenomegalie (Milzvergrößerung) (Abb. 4f), verursacht durch GFP+ Zellen mit hohem MYC-Level (Abb. 4g-h).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die MYC-Überexpression in einem retroviralen KM-Transduktions-Transplantationsmodell in einem schnellen Beginn einer myeloproliferativen Krankheit, mit Charakteristika einer AML, resultiert.

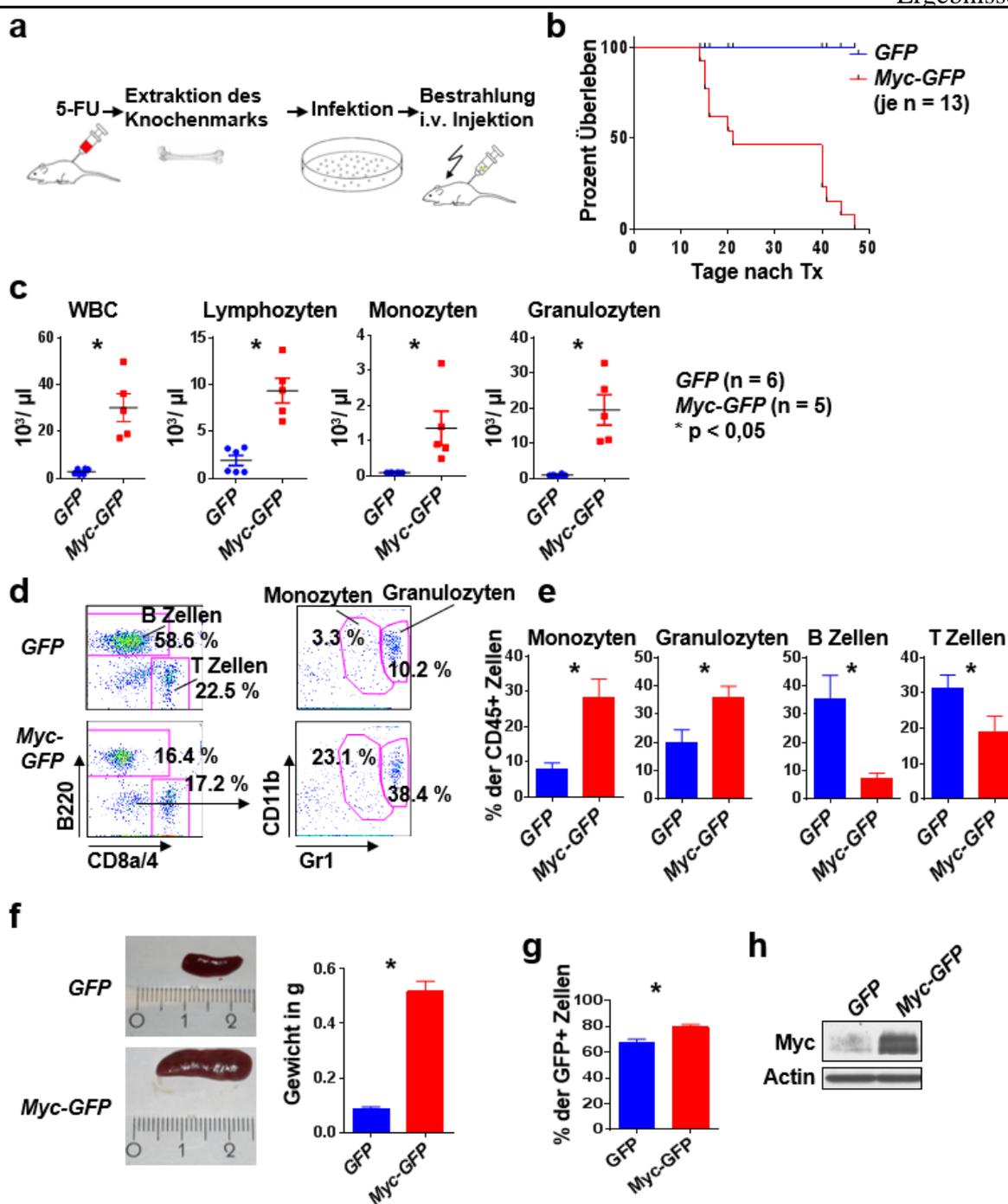


Abbildung 4: Myc-Überexpression induziert eine myeloproliferative Erkrankung in Mäusen.

(a) Schema des Transplantationsmodells. Das KM der Spendermäuse wurde mit 5-FU 4 Tage vor der Entnahme mobilisiert. Die ausgespülten KM-Zellen wurden dann *in vitro* mit einem GFP- oder Myc-GFP-Retrovirus infiziert. Letal bestrahlten Empfängertieren wurden i. v. das infizierte KM transplantiert. Zudem wurden diese nach Ausbruch der Krankheit analysiert. (b) Überlebenskurve der angegebenen Genotypen. Mäuse, die mit dem Myc-GFP infizierten KM versehen worden waren, starben deutlich früher als die GFP-Kontrollen. (c) WBC-, Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozyten-Anzahl im peripheren Blut der Myc-GFP- und GFP-Mäuse nach Ausbruch der Krankheit. (d) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse des peripheren Blutes für die

genannten Oberflächenmarker. Es wurden nur die CD45+ und GFP+ Zellen in die Analyse einbezogen. (e) Quantifizierung der Monozyten-, Granulozyten-, B- und T-Zellenfrequenz im peripheren Blut. (f) Links: Repräsentatives Bild der unterschiedlichen Milzgröße bei einer *GFP* Kontroll- und einer *Myc-GFP*-Maus. Rechts: Quantifizierung der Milzgewichte (g) Prozentsatz an GFP+ Zellen in der Milz von den angegebenen Genotypen nach Ausbruch der Krankheit. (h) Repräsentativer Immunoblot der MYC-Expression in den Milzen bei den aufgeführten Genotypen. Es werden jeweils die Mittelwerte \pm SEM gezeigt. Das * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$.

4.2 Das konditionale MycER-Modell in hämatopoetischen Zellen

4.2.1 MycER kann *in vitro* aktiviert werden

Es sollte die Hypothese überprüft werden, ob MYC spezifische Veränderungen in der Mikroumgebung verursacht. Diese Onkogen-induzierten Änderungen könnten günstige Bedingungen für eine Tumorpersistenz, trotz effektiver Elimination der wesentlichen Tumormasse durch eine Therapie, hervorrufen. Durch eine voll ausgeprägte Leukämie, mit massiver KM-Infiltration, kommt es zu gravierenden Modifikationen in der KM-Zusammensetzung. Dies kann dazu führen, dass etwaige Zell-Zell-Interaktionen mit der Mikroumgebung nicht detektiert werden können. Um dieses Szenario zu umgehen sollte ein konditionales *Myc*-Onkogenmodell etabliert werden, bei dem der Zeitpunkt und die Dauer der MYC-Aktivität frei wählbar ist. Dieses System sollte die Rekrutierung der hämatopoetischen Nische durch transformierte, maligne Leukämiezellen simulieren, um die einzelnen Veränderungen der Tumorumgebung schrittweise nachvollziehen und deren fördernde Wirkung für die Tumorprogression analysieren zu können. Die Entscheidung fiel auf das induzierbare MycER System, da hier die Kriterien zutrafen [152, 166]. In diesem System ist MYC an einen synthetischen Östrogenrezeptor gebunden. Das MycER-Fusionsprotein wird konstitutiv exprimiert, aber es liegt, gebunden an Hitzeschockproteine, wie HSP90, inaktiv im Zytosol vor. Durch die Zugabe von Tamoxifen, das in der Leber zum aktiven 4-Hydroxytamoxifen umgebaut wird, wird die transkriptionelle Aktivität von MYC aktiviert, da das Fusionsprotein von den Hitzeschockproteinen entlassen wird und in den Nukleus translozieren kann [167] (Abb. 5).

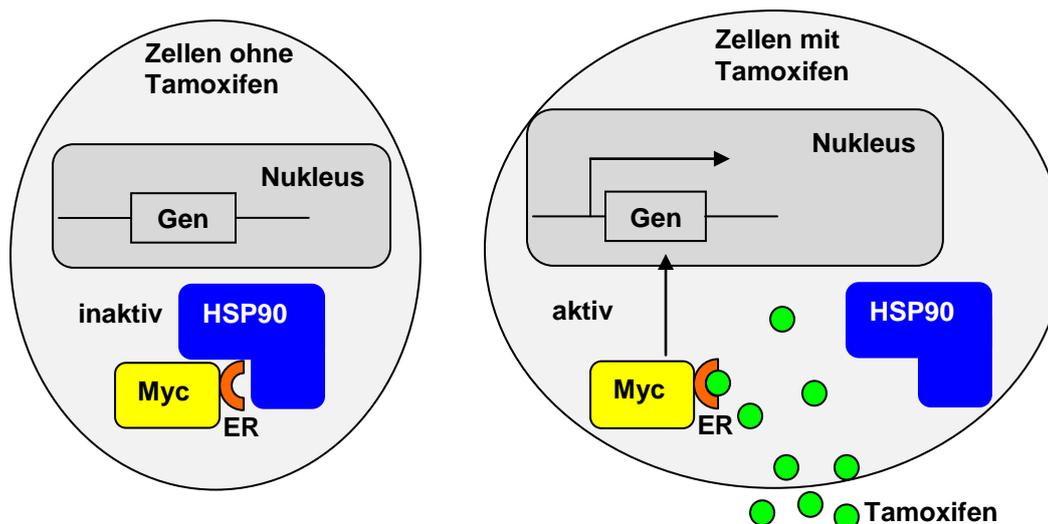


Abbildung 5: Modell der Regulation von MycER.

In Abwesenheit des Liganden Tamoxifen (grüne Kreise) ist das chimäre Fusionsprotein MycER an das Hitzeschockprotein HSP90 gebunden und kann nicht in den Nucleus einwandern. Nach der Zugabe von Tamoxifen dissoziiert HSP90 und MycER kann in den Nucleus translozieren. Dort reguliert es, als Transkriptionsfaktor, die Expression der Zielgene.

Um das MycER-GFP-System auf seine Funktionalität sowie dessen Eignung als Simulationsmodell zur Untersuchung des Einflusses der prämaligen Leukämiezellen auf Nischenzellen hin zu testen, wurden zunächst *in vitro* Co-Kultur-Versuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden myeloische 32D Zellen mittels des retroviralen Transduktionsmodells mit dem Leervektor, *Myc-GFP* oder *MycER* infiziert und die GFP+ Zellen gesortet. Anschließend wurde die MycER-Aktivität mittels 4-Hydroxytamoxifen (4-HT), der aktiven Form von Tamoxifen, induziert. Es ist notwendig, 4-HT bei Zellkulturen einzusetzen, da Tamoxifen üblicherweise im Organismus in der Leber zur aktiven Form umgebaut wird [168]. Der Immunoblot der 32D Zellen mit der GFP-Kontrolle sowie dem *MycER* zeigte, dass das endogene MYC und das größere Fusionsprotein sowohl mit als auch ohne 4-HT-Behandlung vorhanden waren (Abb. 6a). Es konnte nicht festgestellt werden, ob MycER aktiviert worden war, da es konstitutiv exprimiert und translatiert wird. Erst durch eine Lokalisationsänderung in Richtung Nucleus kann MycER seine Aktivität als Transkriptionsfaktor entfalten. Aus diesem Grund wurde die nukleäre Fraktion der Zelllysate von der zytosolischen getrennt (Abb. 6b). Das aktivierte Fusionsprotein konnte nur in der nukleären Fraktion nach

der Zugabe mit 4-HT detektiert werden, nicht aber in der nukleären Fraktion der nicht aktivierten Probe. Um die Funktionalität des MycER-Systems weiter zu testen, wurde sowohl das Expressionslevel von Myc hinsichtlich einer vorliegenden Überproduktion mit Hilfe einer qPCR untersucht als auch die Tatsache, ob das etablierte Zielgen *Ornithindecaboxylase (Odc)* [169] transkribiert wird. Die Aktivierung von MycER resultierte in einem signifikanten Anstieg des *Odc* mRNA-Levels nach der Behandlung mit 4-HT. Die *Myc*-Expression war sowohl mit als auch ohne Behandlung mit 4-HT, wie vermutet, erhöht, da die Aktivität auf Protein- und nicht auf der transkriptionellen Ebene reguliert wird (Abb. 6c).

Es bleibt festzuhalten, dass das konditionale MycER-System in der Zellkultur aktivierbar war. Nach Zugabe von 4-HT translozierte das Fusionsprotein MycER in den Nukleus und aktiviert die Transkription des Zielgens *Odc*.

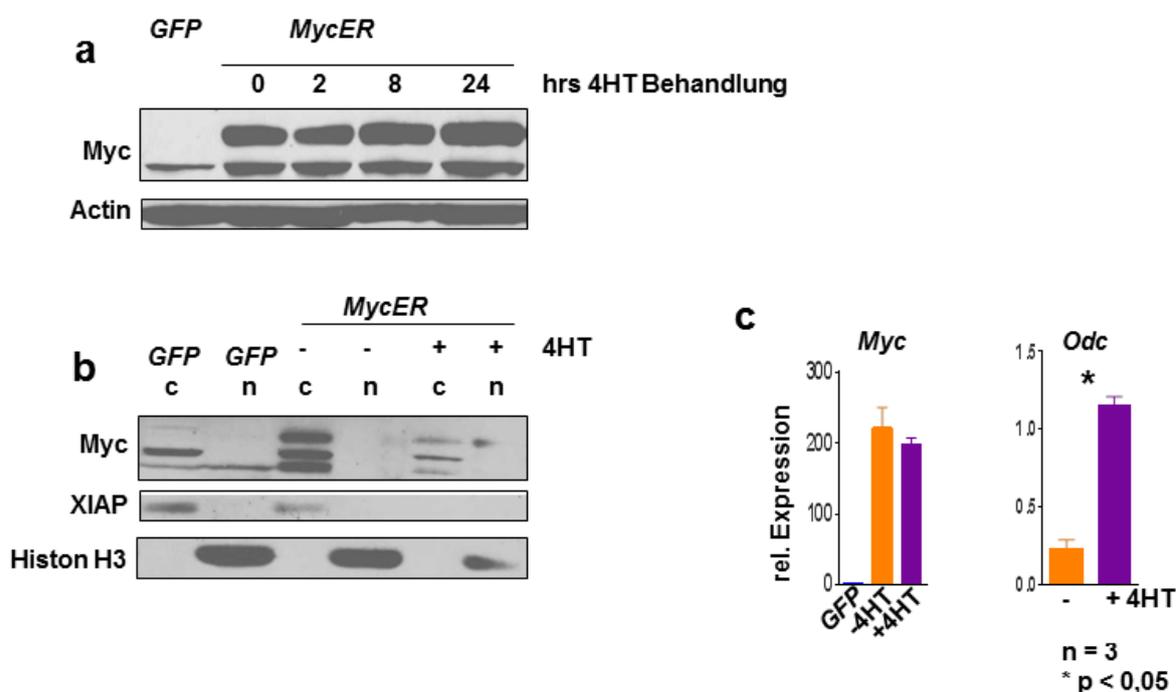


Abbildung 6: MycER kann *in vitro* aktiviert werden.

(a) Repräsentativer Immunoblot hinsichtlich einer Überexpression des Fusionsproteins MycER in unbehandelten sowie mit 4-HT-behandelten 32D-Zellen, im Vergleich zu den mit *GFP*-infizierten Kontrollzellen. Die angegebenen Zeitpunkte zeigen die Behandlungsdauer an. (b) Repräsentativer Immunoblot von MYC in 32D-Zellen mit den genannten Genotypen, aufgetrennt nach cytosolischer (c) und nukleärer (n) Fraktion. Die MycER infizierten 32D-Zellen wurden für 24 Stunden mit 4-HT behandelt. XIAP diente als Marker für die cytosolische, Histone H3 für die nukleäre Fraktion. (c) Quantifizierung der *Myc*- und *Odc*-Expression in den genannten Proben. Gezeigt ist das relative

Expressionslevel, verglichen mit der GFP-Kontrolle. Die Werte geben den Mittelwert \pm SEM an. $n = 3$ und * bedeutet $p < 0,05$.

4.2.2 MYC-Überexpression reguliert das Transkriptom von Stromazellen

MYC steht im Verdacht spezifische Modifikationen in der Zell-Mikroumgebung zu verursachen. Zu diesem Zweck sollte die Interaktion der hämatopoetischen Zellen mit ihrer Mikroumgebung näher analysiert werden. Dazu wurde eine Co-Kultur von den *GFP*-, *Myc-GFP*-, oder *MycER*-infizierten 32D Zellen, mit den unterstützenden, murinen Stromazellen EL08-1D2 (weiterhin als EL08 bezeichnet), durchgeführt [139]. Diese Co-Kultur wurde ausschließlich mit *GFP*+, das heißt infizierten, 32D Zellen angefertigt. Anschließend wurde die *MycER*-Aktivität durch die Zugabe von 4-HT für 24 Stunden induziert. Daraufhin wurden die EL08- von den 32D-Zellen, mittels CD45 Microbeads, getrennt (Abb. 7a). Die Überprüfung der Aufreinigungsgenauigkeit mit Hilfe der Durchflusszytometrie zeigte, dass die CD45- EL08 Zellen lediglich mit einem Prozentsatz von 0,6 % CD45+ 32D Zellen verunreinigt waren (Abb. 7b).

Von den aufgereinigten EL08-Zellen aus der Co-Kultur mit *GFP*- oder *Myc-GFP*-infizierten 32D-Zellen wurde die RNA isoliert und dazu genutzt eine Transkriptomanalyse durchzuführen. 39 Gene, die signifikant ($p < 0,05$) und differentiell (\log_2 fold change (FC) $\geq 1,0$ oder $\leq -1,0$) (DEGs) in den EL08 aus der Co-Kultur mit *Myc-GFP* 32D exprimiert wurden, waren in der *Myc*-Kohorte hochreguliert. In Abb. 7c sind diejenigen Gene dargestellt, deren fold change bei $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$ lag. Um einen Überblick über die Signalwege zu bekommen, welche durch *Myc*-überexprimierende hämatopoetische Zellen in den Stromazellen reguliert wurden, erfolgte eine Netzwerkanalyse. Hierbei wurden die Protein-Protein-Interaktionen (PPI) durch die Ingenuity System Software dargestellt, wobei nur hoch vertrauliche, binäre Interaktionen und die Knoten mit einem z-Wert von ≥ 10 verwendet wurden (Abb. 7d). Diese Analyse zeigte eine Beteiligung von Genen, die im Netzwerk der Zellentwicklung und -proliferation beteiligt sind. Vor allem waren Gene beteiligt, die eine Rolle bei der zellulären Entwicklung, der Proliferation und dem zellulären Wachstum spielen. So wurde die Expression von *Rac2*, *Nod1* und *Jun* hochreguliert.

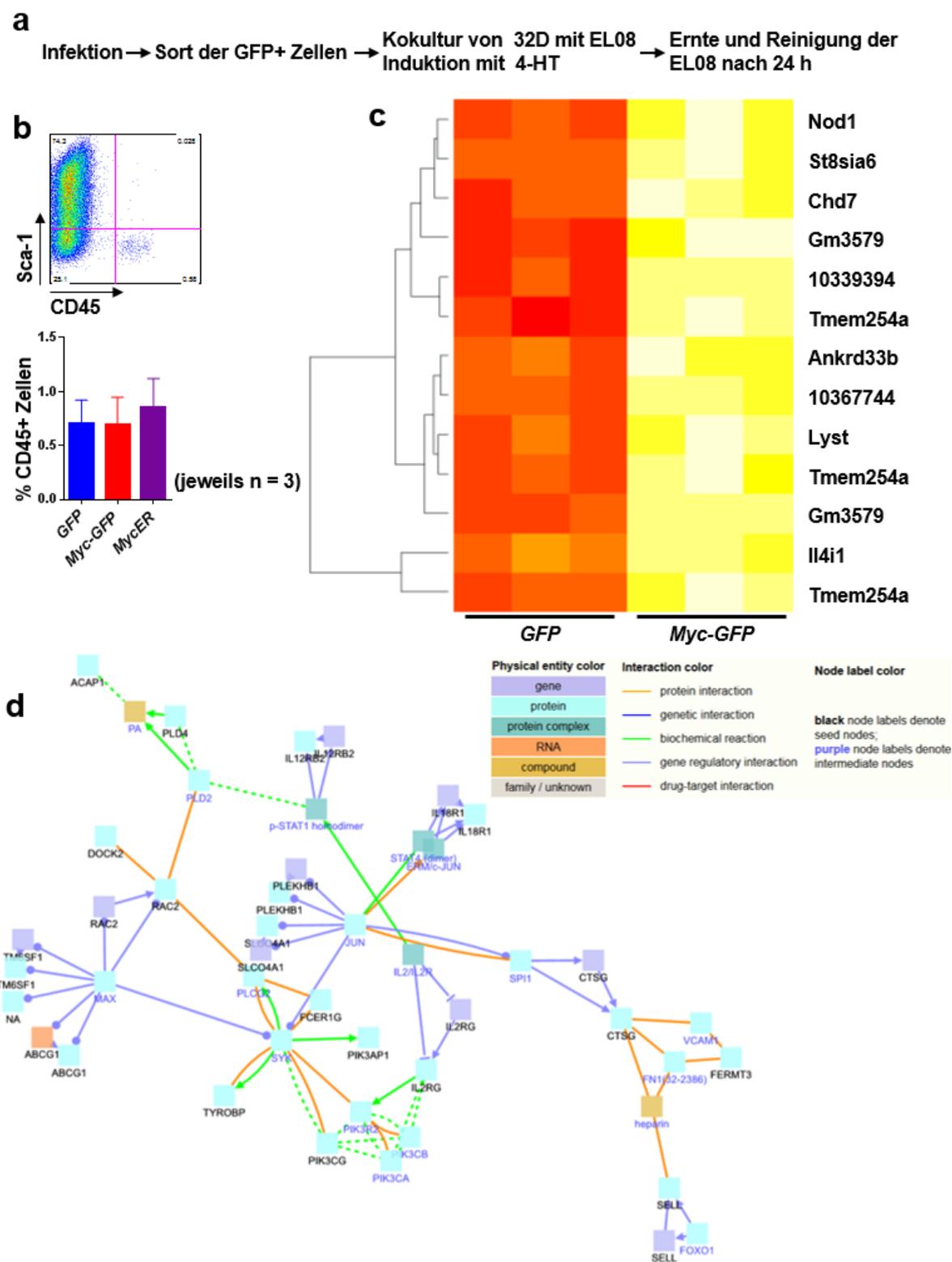


Abbildung 7: MYC-Überexpression reguliert das Transkriptom von Stromazellen *in vitro*.

(a) Schema der Etablierung einer Kokultur von 32D Zellen infiziert mit *MycER*, *Myc-GFP* oder *GFP* und EL8-Stromazellen. Nur die GFP+, infizierten Zellen wurden auf die Stromazellen gesetzt und die *MycER*-Aktivität für 24 Stunden mit 4-HT induziert. Anschließend wurden die Zellen mittels CD45-Mikrobeads getrennt. (b) Oben: Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse der

EL08-Zellen nach der Aufreinigung mit CD45-Mikrobeads. Unten: Quantifizierung dieser Aufreinigung. Gezeigt werden die genannten Genotypen der 32D-Zellen. (c) Heatmap der signifikanten ($p < 0,05$), differenziell (\log_2 fold change (FC) $\geq 2,0$ oder $\leq -2,0$) exprimierten Gene (DEGs) in den EL08-Zellen nach dem Versuchsschritt der Co-Kultur mit *GFP*- oder *Myc-GFP*-infizierten 32D-Zellen. Der gelbe Bereich zeigt eine Hochregulation dieser Gene an. (d) Netzwerk der hochregulierten DEGs. Die Protein-Protein-Interaktionen (PPI) wurden durch die Ingenuity System Software dargestellt, wobei nur hoch vertrauliche, binäre Interaktionen und Knoten mit einem z-Wert von ≥ 10 verwendet wurden. Die Werte geben den Mittelwert \pm SEM an. $n = 3$ und * bedeutet $p < 0,05$.

4.3 Das konditionale MycER-Modell in transplantierten Knochenmarkszellen

4.3.1 Stabile Rekonstitution des blutbildenden Systems in Mäusen mit transplantierten MycER-Knochenmarkszellen

Um das konditionale Modell ebenfalls hinsichtlich seines Einflusses auf Nischenzellen durch prä-maligne Leukämiezellen hin zu testen, wurde erneut das retrovirale Transduktions-Transplantationsmodell zur Generierung von MycER-chimären Mäusen verwendet. Die transplantierten Tiere zeigten eine stabile Rekonstruktion der Zellzahlen im peripheren Blut (Abb. 8a). Die *MycER*-Mäuse wiesen geringere Zellzahlen im peripheren Blut als die *GFP*-Kontrollen auf. Diese Tatsache könnte auf eine gewisse Durchlässigkeit des Systems, auch ohne Anwesenheit von Tamoxifen, hindeuten. Allerdings waren die Werte immer noch im Normbereich von $5 - 15 \times 10^3/\mu\text{l}$. Wichtig für den Beweis für die Funktionalität des konditionalen Modells war, dass mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen wurde, dass es zu keinen statistisch signifikanten Änderungen der Leukozytenpopulationen im peripheren Blut (Abb. 8b, c) oder im KM (Abb. 8d, e) kam. Außerdem ergab die histopathologische Analyse der KM-Schnitte von *MycER*- und *GFP*-Kontrollmäusen keine großen Unterschiede bezüglich der Zelldichte (Abb. 8f). Um die MycER-Expression zu überprüfen, wurde Milzgewebe mittels eines Immunoblots untersucht. Dieser wies die erwartete MycER-Expression auf (Abb. 8g).

Die Ergebnisse zeigen, dass Mäuse, die mit MycER infiziertem KM transplantiert wurden, eine Restabilisierung des blutbildenden Systems, ohne große Abnormitäten und ohne Anzeichen einer Myeloproliferation, in der Abwesenheit von Tamoxifen aufwiesen. MycER wurde jedoch exprimiert.

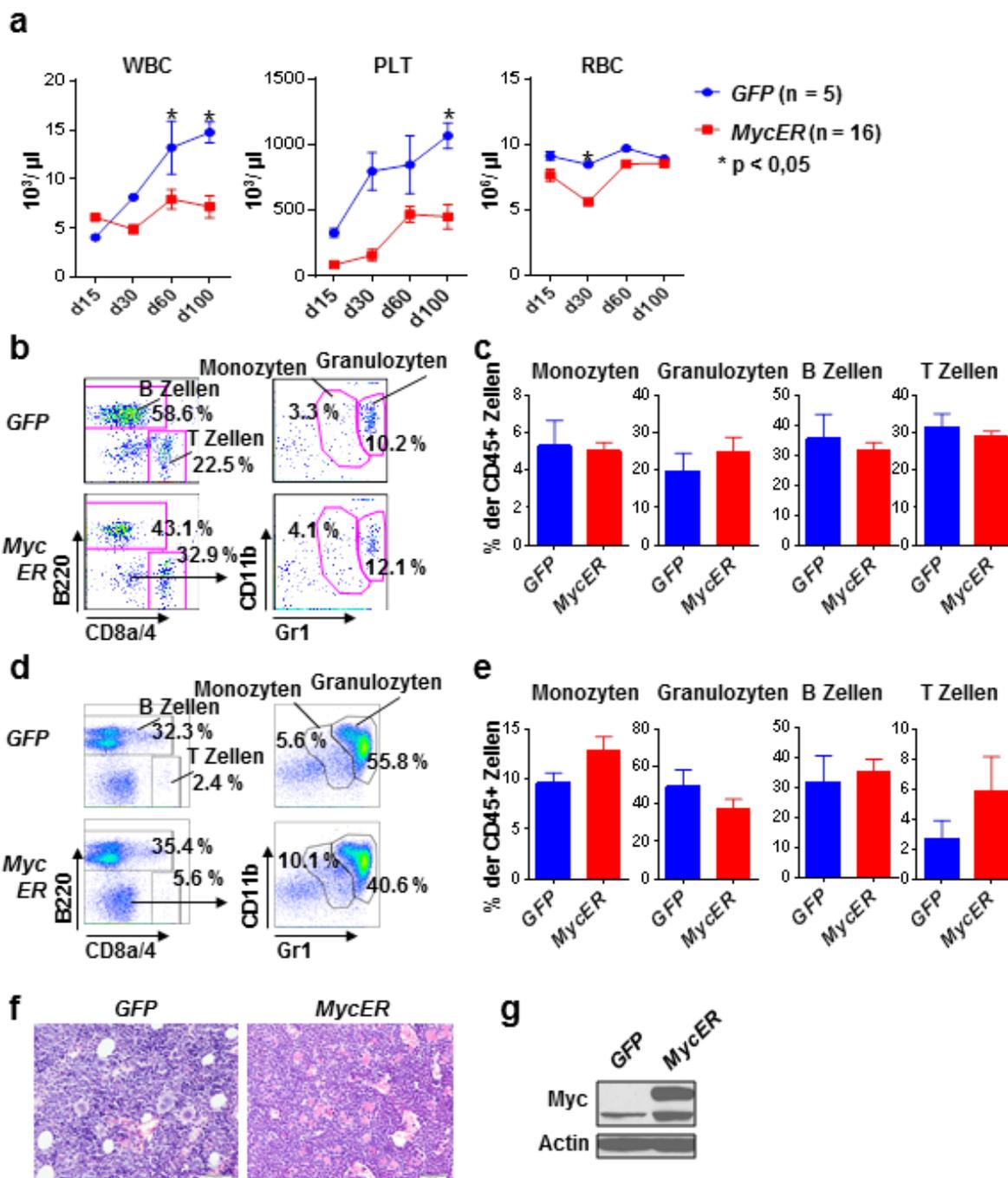


Abbildung 8: Stabile Rekonstitution von konditionalem MycER-KM in Empfänger-mäusen.

(a) Periphere Blutzellzahlen der *GFP*- und *MycER*-Empfänger-mäuse zu den angeführten Zeitpunkten nach der Transplantation. (b) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse des peripheren Blutes für die angegebenen Oberflächenmarker. Es wurden nur die CD45+ und GFP+

Zellen in die Analyse miteinbezogen. (c) Quantifizierung der genannten Zelltypen im peripheren Blut 100 Tage nach der Transplantation. (d) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse des KM für die genannten Oberflächenmarker. Es wurden nur die CD45+ und GFP+ Zellen in die Analyse miteinbezogen. (e) Quantifizierung der Monozyten-, Granulozyten-, B- und T-Zellfrequenzen im KM 100 Tage nach der Transplantation. (f) H&E gefärbte KM-Schnitte von *GFP*- und *MycER*-Mäusen. (g) Repräsentativer Immunoblot für die MYC-Expression in der Milz 100 Tage nach der Transplantation. Die Werte geben den Mittelwert \pm SEM an. * bedeutet $p < 0,05$.

4.3.2 *In vivo* MYC-Aktivierung resultiert in einer MYC-Zielgentranskription

Nachfolgend wurde die *MycER*-Aktivierung *in vivo* überprüft. Neun Wochen nach der Transplantation sowie nach einer stabilen Reetablierung der GFP+ Hämatopoese (Abb. 9a), wurden die *MycER*-Mäuse mit Tamoxifen (Tam) oder der Trägersubstanz (peanut oil, PO) vier Tage lang behandelt. Diese Tiere wurden anschließend euthanasiert und deren Organe entnommen. Die Analyse der B220+ aufgereinigten B-Zellen aus der Milz, mittels Durchflusszytometrie, zeigte eine GFP-Positivität von 80 % (Abb. 9b). Um die Funktionalität des *MycER*-Systems *in vivo* zu analysieren, wurde die Induktion der etablierten MYC-Zielgene *Ornithindecaboxylase* (*Odc*) und *Carbamoylphosphatsynthetase 2* (*Cad*) überprüft [169, 170]. Die Aktivierung von *MycER* resultierte in einer signifikanten Induktion des *Odc*- und *Cad*-mRNA-Levels, während das *Myc*-mRNA-Level, sowohl in den PO-behandelten als auch in den mit Tamoxifen aktivierten Tieren, stark erhöht war (Abb. 9c). Somit konnte gezeigt werden, dass die *MycER*-Aktivierung erfolgreich war und das Protein überexprimiert wurde. Um die Effekte der MYC-Aktivierung auf die Hämatopoese zu untersuchen, wurden die Zellzahlen des peripheren Bluts bestimmt und die Hämatopoese im KM analysiert. Eine MYC-Aktivierung durch Tamoxifen führte nicht zu einer Veränderung der Blutzellzahlen oder der Zusammensetzung der Leukozytensubpopulationen (Abb. 9d, e). Zudem konnten bezüglich der Tamoxifen- und PO-Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen festgestellt werden (Abb. 9f, g). In der Literatur wird berichtet, dass die Überexpression von MYC zu einer Blockierung der Selbsterhaltung der HSC sowie der Expansion der MPP führt [48]. Dieser Wirkungsmechanismus konnte mittels der vorliegenden Versuche nicht beobachtet bzw. bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass MycER mittels des Transduktion-Transplantationmodells erfolgreich überexprimiert und durch Zugabe von Tamoxifen über eine Zeitspanne von 4 Tagen aktiviert werden konnte. Diese kurzzeitige Aktivierung genügte jedoch nicht, um eine signifikante Auswirkung auf die Hämatopoese zu haben.

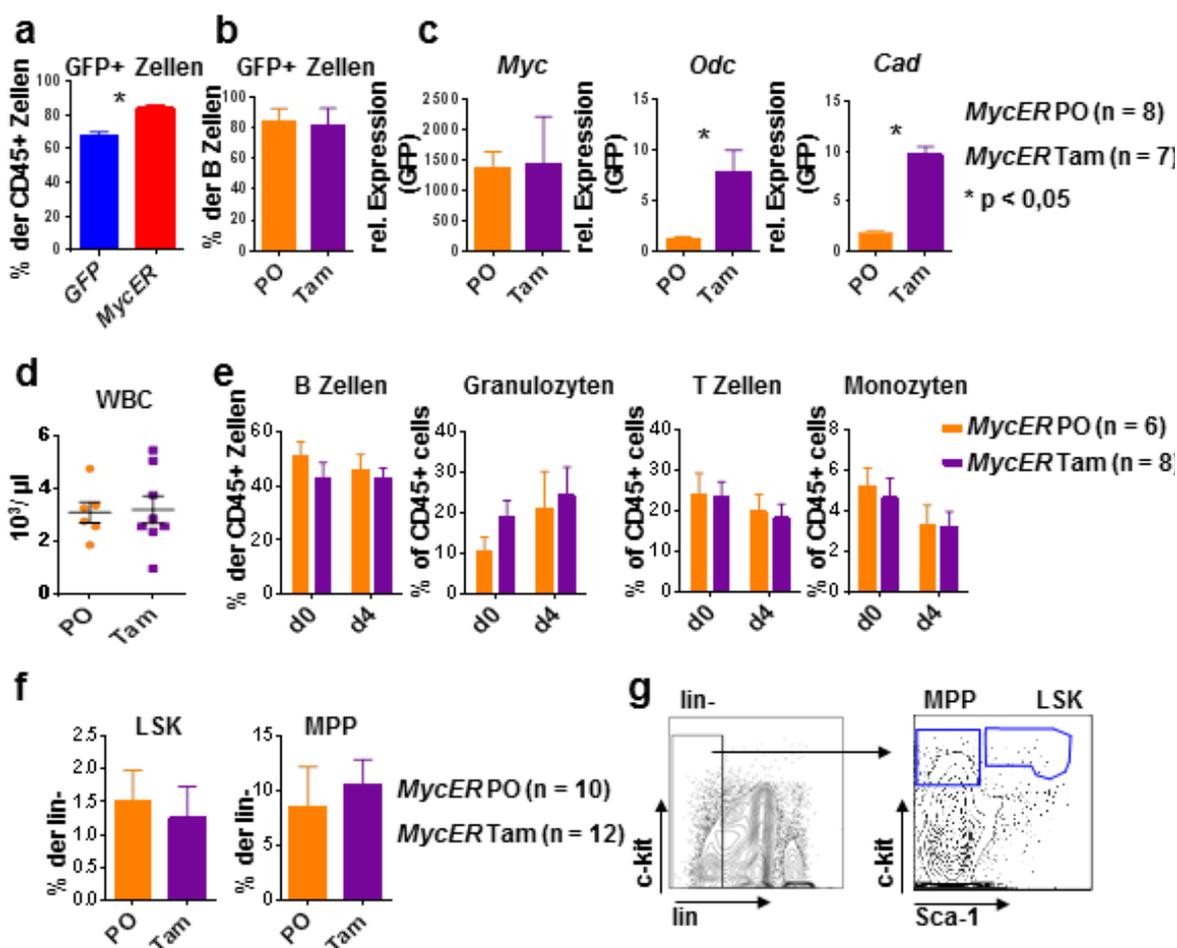


Abbildung 9: Die konditionale MYC-Aktivierung resultiert in einer Zielgenexpression *in vivo*.

(a) Durchflusszytometrie des peripheren Bluts. Gezeigt ist der Prozentsatz an GFP+ Leukozyten neun Wochen nach der Transplantation des KM mit den genannten Genotypen. (b) Prozentsatz an GFP+ B-Zellen in der Milz von *MycER*-Mäusen, die mit Tamoxifen oder mit dem Trägermedium (PO) über eine Zeitspanne von 4 Tagen behandelt wurden. (c) B220+ B-Zellen aus der Milz von Tamoxifen- oder PO-behandelten *MycER*-Mäusen wurden auf die Expression der genannten Transkripte hin untersucht. Gezeigt ist die relative Expression verglichen mit der von *GFP*-Kontrollmäusen. (d) Anzahl der WBC im peripheren Blut der PO- und Tamoxifen-behandelten *MycER*-Mäuse. (e) Quantifizierung (mittels Durchflusszytometrie) der genannten Zelltypen im peripheren Blut nach der Aktivierung von MycER. d0: vor der Behandlung; d4: nach 4-tägiger Behandlung mit Tamoxifen oder PO. (f) Frequenz der HSPC-Subpopulationen LSK und MPP im KM der Tamoxifen- oder PO-behandelten *MycER*-Mäuse. (g) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse der KM-Zellen, welche für die Lineagemarker (Ter119, CD11b, B220,

Gr-1 und CD3e), c-Kit und Sca-1 gefärbt wurden. Die Werte geben den Mittelwert \pm SEM an. * bedeutet $p < 0,05$.

Um die Auswirkungen einer langfristigen MycER-Aktivierung zu testen, erhielten die Mäuse ab der neunten Woche nach der Transplantation spezielles tamoxifenhaltiges statt normales Futter, bis Symptome einer myeloproliferativen Erkrankung festzustellen waren. Durchschnittlich war dies 28 Tage nach der Gabe des tamoxifenhaltigen Futters der Fall, während keines der Kontrolltiere, egal ob GFP-transplantiert oder MycER-transplantiert, ohne Tamoxifengabe im Beobachtungszeitraum verstarb (Abb. 10a). Die MycER-Mäuse zeigten, wie bereits in Abbildung 8a dargestellt, eine geringere Anzahl an WBC, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut. Jedoch stieg das Level an WBC, Monozyten und Granulozyten nach der Langzeitbehandlung mit Tamoxifen an - teilweise sogar über das Niveau der GFP-Kontrollmäuse hinaus - an (Abb. 10b). Jener erste Hinweis konnte auch durch eine Analyse des KM erhärtet werden. Diese ergab einen signifikanten Anstieg der Granulozyten und Monozyten, wie dies auch bei der Myc-GFP induzierten Krankheit zu beobachten war (Abb. 10c, d). Des Weiteren wiesen die Tiere eine massive Splenomegalie auf (Abb. 10e). Zudem war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zusammensetzung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mit den unbehandelten Tieren zu erkennen (Abb. 10f). Die beobachteten Vorgänge gingen mit einer stabilen Wiederherstellung der GFP+ Hämatopoese einher (Abb. 10g).

Resümierend kann man feststellen, dass auch die Langzeitbehandlung mit Tamoxifen bei den MycER Mäusen eine myeloproliferative Erkrankung, mit ähnlichen Symptomen sowie einer vergleichbaren Latenz wie bei den Myc-GFP-Mäusen, verursacht. Diese Symptome konnten nicht in den unbehandelten MycER-Mäusen beobachtet werden. Der Umstand, dass in den kurzzeitig mit Tamoxifen behandelten Mäusen keine Anzeichen einer Myeloproliferation zu erkennen waren, ist möglicherweise auf die Euthanasierung bereits nach 4 Tagen zurückzuführen. Diese Zeitspanne genügt vermutlich nicht, damit sich eine dektektierbare myeloproliferative Erkrankung manifestieren kann. Somit war das konditionale MycER-System dafür geeignet, um den regulatorischen Einfluss der MYC-induzierten, malignen Transformation von

HSPC auf die KM-Mikroumgebung in den ersten Phasen der Nischenrekrutierung zu untersuchen. Dies könnte Anhaltspunkte liefern, auf welche Art und Weise die Nischenzellen entstehende Leukämiezellen unterstützen und bestehende Tumorzellen vor einer chemischen Behandlung zu schützen.

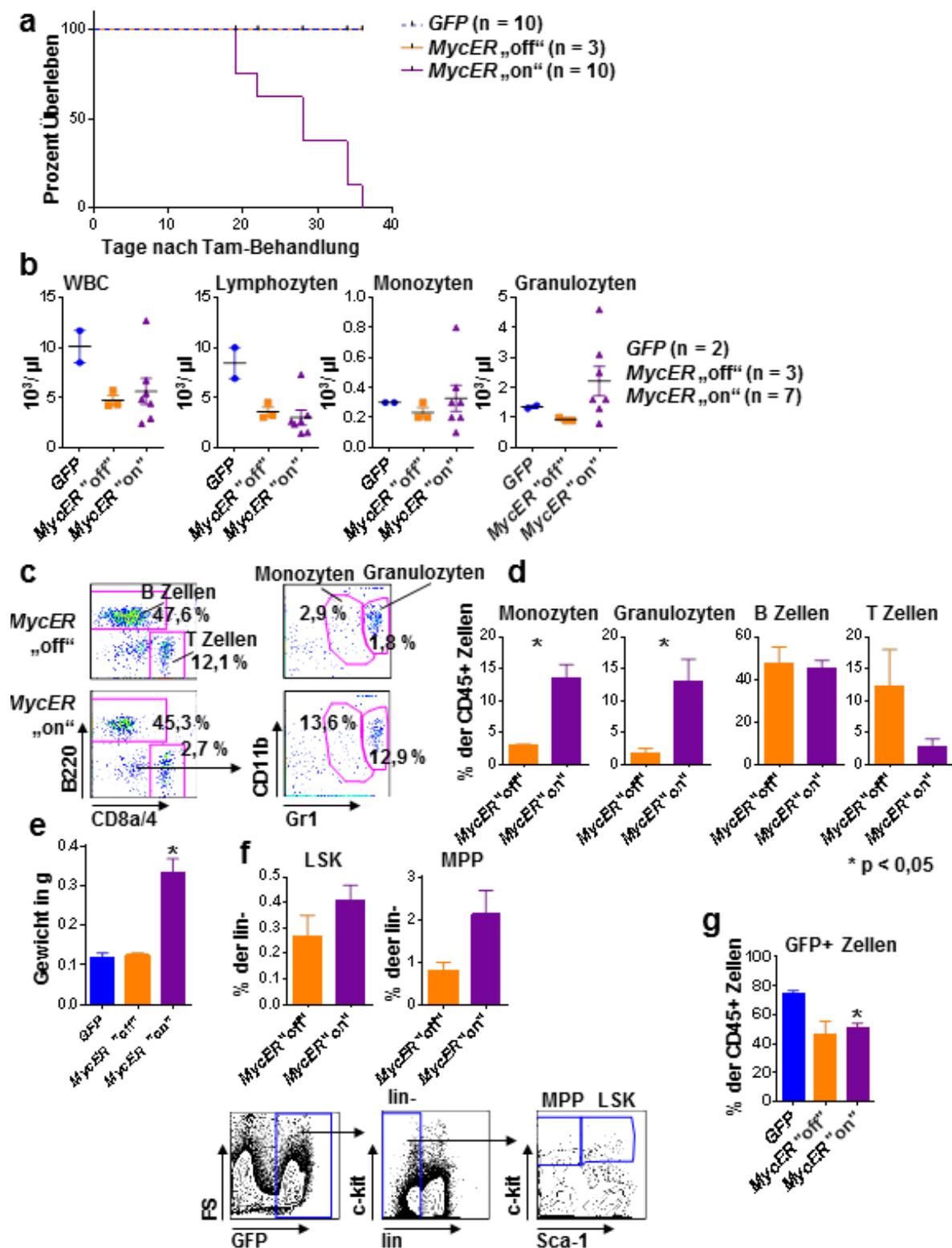


Abbildung 10: Langzeit-Aktivierung von MycER induziert eine myeloproliferative Erkrankung in den Mäusen.

(a) Überlebenskurve der angegebenen Genotypen. Mäuse, die mit dem *MycER*-infizierten KM transplantiert und mit Tamoxifen behandelt worden sind (*MycER* „on“), starben früher als die Kontrollen *GFP* und *MycER* ohne Behandlung (*MycER* „off“). (b) WBC-, Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozytenanzahl im peripheren Blut der *GFP* und *MycER* Mäuse nach Ausbruch der Krankheit. (c) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse des KM für die genannten Oberflächenmarker. Es wurden nur die CD45+ und GFP+ Zellen in die Analyse einbezogen. (d) Quantifizierung der Monozyten-, Granulozyten-, B- und T-Zellfrequenzen im KM. (e) Quantifizierung der Milzgewichte bei den genannten Genotypen. (f) Oben: Frequenz der HSPC-Subpopulationen LSK und MPP im KM der unbehandelten oder mit tamoxifenhaltigen Futter behandelten *MycER* Mäuse. Unten: Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse hierzu. (g) Durchflusszytometrie des peripheren Blutes. Gezeigt ist der Prozentsatz der GFP+ Leukozyten des KM nach Ausbruch der Erkrankung mit den genannten Genotypen. Es werden jeweils die Mittelwerte \pm SEM gezeigt. * zeigt einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$.

4.4 Einfluss der MYC-Expression in den HSPC auf die KM-Mikroumgebung

4.4.1 MYC-Expression in den HSPC reguliert die Zusammensetzung der Nische

Nachfolgend sollten (potentiell) auftretende Veränderungen der KM-Mikroumgebung während des präleukämischen Stadiums mithilfe des *MycER-in-vivo*-Modells untersucht werden. Zur Durchführung dieser Analysen wurde das vaskuläre Kompartiment gewählt, da dieses als erstes mit den *MycER*+ Zellen in Kontakt kommt. Zudem konnte dieser Abschnitt der hämatopoetischen Mikroumgebung der ohne Kollagenasebehandlung isoliert werden. Diese Tatsache war von großer Wichtigkeit, da ein Kollagenaseverdau eine Veränderung des Transkriptoms mit sich ziehen würde und folglich zu einer Verfälschung der Ergebnisse bei der Transkriptomsuntersuchung führen würde. Um das sinusoidale Kompartiment zu studieren, wurden die nicht hämatopoetischen KM-Zellen als CD45- Ter119- GFP- Population aus dem KM isoliert. Endosteale Nischenzellen gingen dabei kaum in die Analyse ein, da sie, bedingt durch die nicht durchgeführte Kollagenasebehandlung, weiterhin am Knochen anhefteten. Durch die Färbung mit CD31 (PECAM-1), ALCAM (CD166) und Sca-1 konnten EC, OBC

und MSC differenziert werden (Abb. 11a) [171]. Die größte Population war die CD31⁺ ALCAM⁻ Sca-1⁻ EC-Population. Im ausgewaschenen KM repräsentierten die CD31⁻ ALCAM⁺ Sca-1⁻ OBC-Population und die CD31⁻ ALCAM⁻ Sca-1⁺ Population, welche die MSC beinhaltet [171], die weniger stark vertretenen Subpopulationen. Bei den OBC und MSC konnten keine signifikanten Unterschiede, hinsichtlich der Populationsgröße, zwischen den *GFP*-Kontrollmäusen und den *MycER*-Mäusen, die mit PO oder Tamoxifen behandelt wurden, festgestellt werden (Abb. 11b). Die Anzahl an CD31⁺ EC war in den *GFP* Kontrolltieren, im Vergleich zu den *MycER*/ Tam-Mäusen, signifikant größer. Diese Reduktion der EC-Population war ein anhaltender Effekt, der auch in erkrankten *Myc-GFP*- und Langzeit-Tamoxifen-behandelten *MycER*-Mäusen zu beobachten war (Abb. 11c, d). Hierzu wurden Schnitte der Femora von Mäusen, mit den aufgeführten Genotypen, auf CD31 gefärbt und quantitativ ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass die CD31⁺ EC-Population sowohl in den konstitutiv MYC überexprimierenden *Myc-GFP*- als auch in den Tamoxifen-behandelten *MycER*-Mäusen reduziert war, jedoch nicht in den *MycER*-Kontrolltieren, die lediglich mit PO behandelt wurden. Der reduzierende Effekt war in den Tamoxifen-behandelten Tieren umso stärker, desto länger *MycER* aktiviert war.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine kurze Aktivierung des *MycER* in den hämatopoetischen Zellen zu einer Aktivierung der MYC-Zielgene, allerdings nicht zu einer detektierbaren Modifikation der Hämatopoese, der MSC oder des OBC-Kompartiments führt. Die *MycER*-Aktivierung resultierte hingegen in einer Reduktion der EC, sowohl bei kurzer als auch bei längerfristiger MYC-Aktivität.

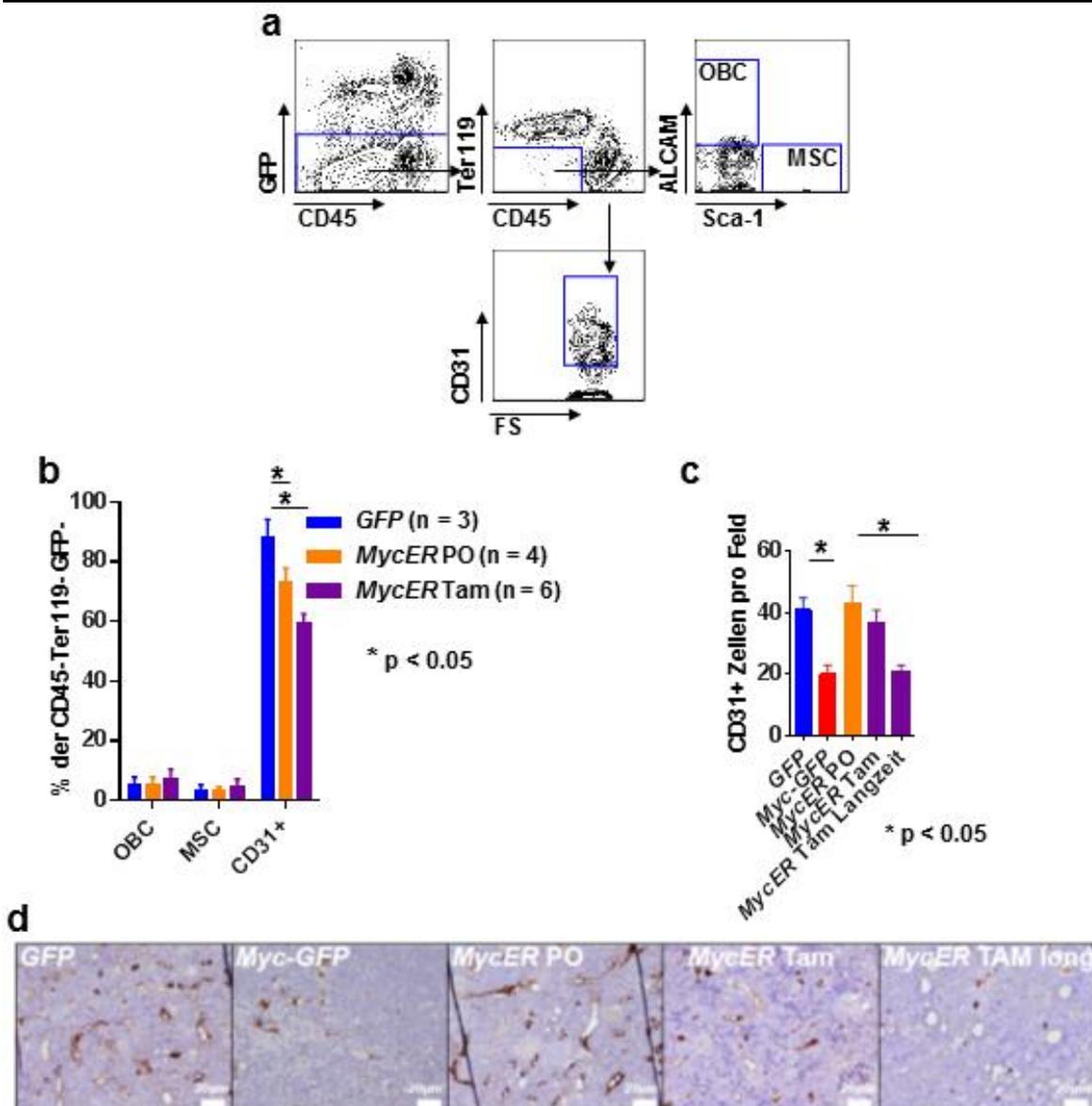


Abbildung 11: Analyse der KM-Mikroumgebung.

(a) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse der Zellen aus der KM-Mikroumgebung neun Wochen nach der Transplantation. (b) Zusammensetzung der KM-Mikroumgebung: ALCAM+ Sca-1- (OBC), ALCAM- Sca-1+ (MSC) und CD31+ (EC) Populationen. (c, d) KM-Schnitte sortiert nach den jeweiligen Genotypen und den verschiedenen zugegebenen Behandlungsdetergenzien (*MycER* Langzeit bedeutet Tamoxifenbehandlung bis zum Ausbruch der Erkrankung; jeweils $n = 3$). Die Schnitte wurden mittels Immunohistochemie, in drei verschiedenen Feldern, auf die Anwesenheit von CD31+ -Zellen hin, analysiert. (c) Durchschnittliche Zellzahl pro Gesichtsfeld bei 200x Vergrößerung. Die Berechnung erfolgte durch die Multiplikation der optisch erfassten Zellzahlen bei 200-facher Vergrößerung hoch Energiefeld \pm SEM. (d) Repräsentative Bilder der genannten Genotypen und der verschiedenen Behandlungsindikationen. Weiße Balken: 20 μ m. Die Werte geben den Mittelwert \pm SEM an. * bedeutet $p < 0,05$.

Es sollte die Hypothese einer MYC spezifischen Veränderung der Mikroumgebung überprüft werden. Diese Onkogen-induzierte Modifikation könnte günstige Bedingungen für eine Tumorpersistenz, trotz effektiver Elimination der wesentlichen Tumormasse durch Therapiemaßnahmen, schaffen. Aus diesem Grund wurden die zellulären Veränderungen innerhalb der hämatopoetischen Nische vor und nach Ausbruch einer myeloproliferativen Erkrankung in den *MycER*-Mäusen analysiert. Bei den *Myc-GFP*- Mäusen erfolgte die Untersuchung nach Ausbruch der Erkrankung. Die *MycER*-Mäuse wurden mit PO oder Tam i.p. kurzfristig, über einen Zeitraum von vier Tagen, behandelt oder solange mit Tamoxifen gefüttert, bis sie Symptome einer leukämischen Erkrankung zeigten. Anschließend wurden die Nischenpopulationen untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die CD45- Ter119- nicht-hämatopoetische Population in den GFP- Zellen – den endogenen, nicht infizierten Zellen – bei den *Myc*- und den *MycER*-transplantierten Tieren, die langfristig mit Tamoxifen behandelt wurden, stark vergrößert war (Abb. 12a, b). Diese Tiere entwickelten zudem eine myeloproliferative Erkrankung. In diesen Mäusen waren die EC (GFP- CD45- Ter119- CD31+), ebenso wie in den nur kurzfristig mit Tamoxifen behandelten Tieren, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, signifikant verringert. Darüber hinaus waren in den langzeitbehandelten *MycER*-Mäusen die OBC signifikant heruntergesetzt und die MSC-Population erhöht (Abb. 12c).

Resümierend bleibt festzuhalten, dass die Aktivität von MYC in den hämatopoetischen Zellen deren Nische beeinflusste. Dabei verschoben sich die Anteile der einzelnen Zellpopulationen umso stärker, desto länger das Onkogen MYC in den hämatopoetischen Zellen aktiv war. Die ersten Effekte konnten in der vaskulären Nische bei den EC beobachtet werden.

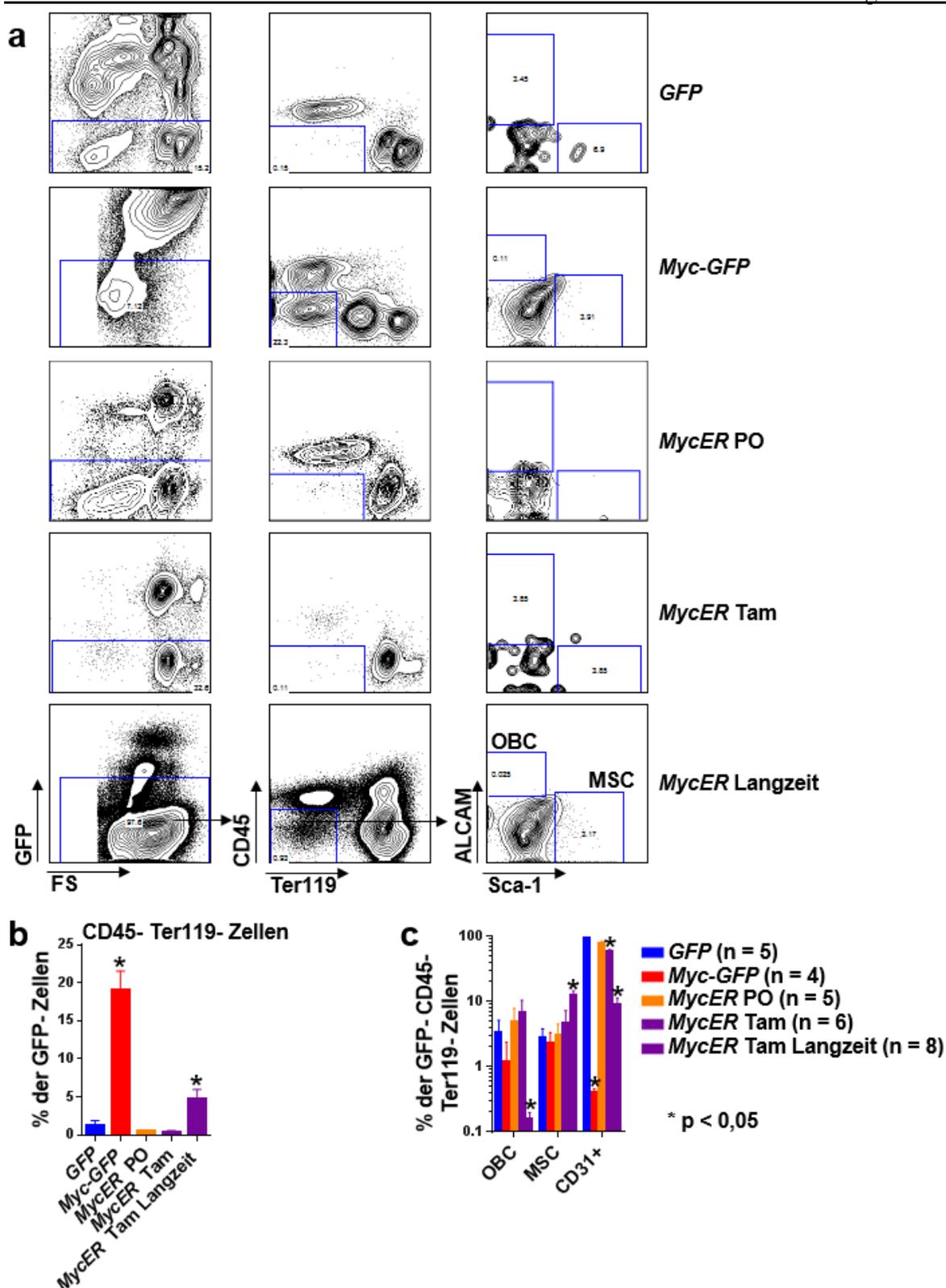


Abbildung 12: MYC reguliert die Zusammensetzung der KM-Mikroumgebung.

(a) Repräsentative Durchflusszytometrieanalysen der genannten Genotypen sortiert nach den jeweils vorgenommenen Behandlungsmaßnahmen. (b) Zusammensetzung der KM-Mikroumgebung in den genannten Genotypen unter Berücksichtigung der unterschiedlich zugegebenen Behandlungssubstanzen: nicht-hämatopoetische Zellen CD45- Ter119-.

(c) Zusammensetzung der KM-Mikroumgebung in den genannten Genotypen unter Berücksichtigung der vorgenommenen Behandlungsmaßnahmen: ALCAM⁺ Sca-1⁻ (OBC), ALCAM⁻ Sca-1⁺ (MSC) und CD31⁺ (EC) Populationen. Die Werte geben den Mittelwert \pm SEM an. * bedeutet $p < 0,05$.

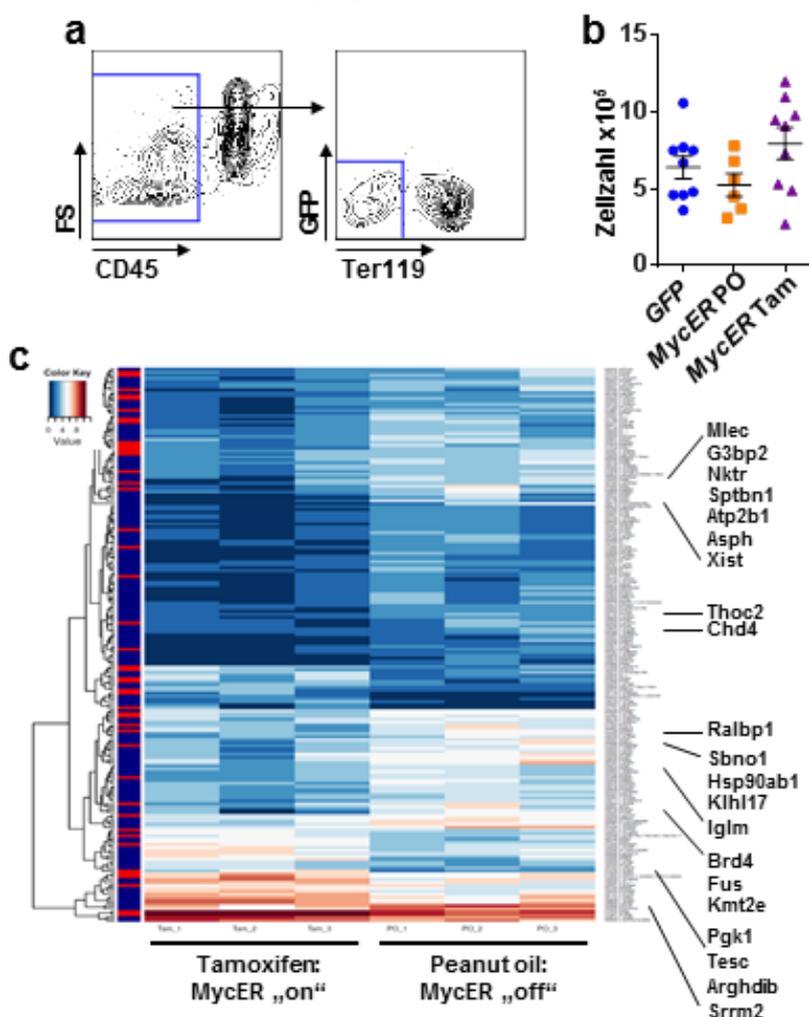
4.4.2 MYC-Expression in den HSPC verursacht transkriptionelle Änderungen in den EC

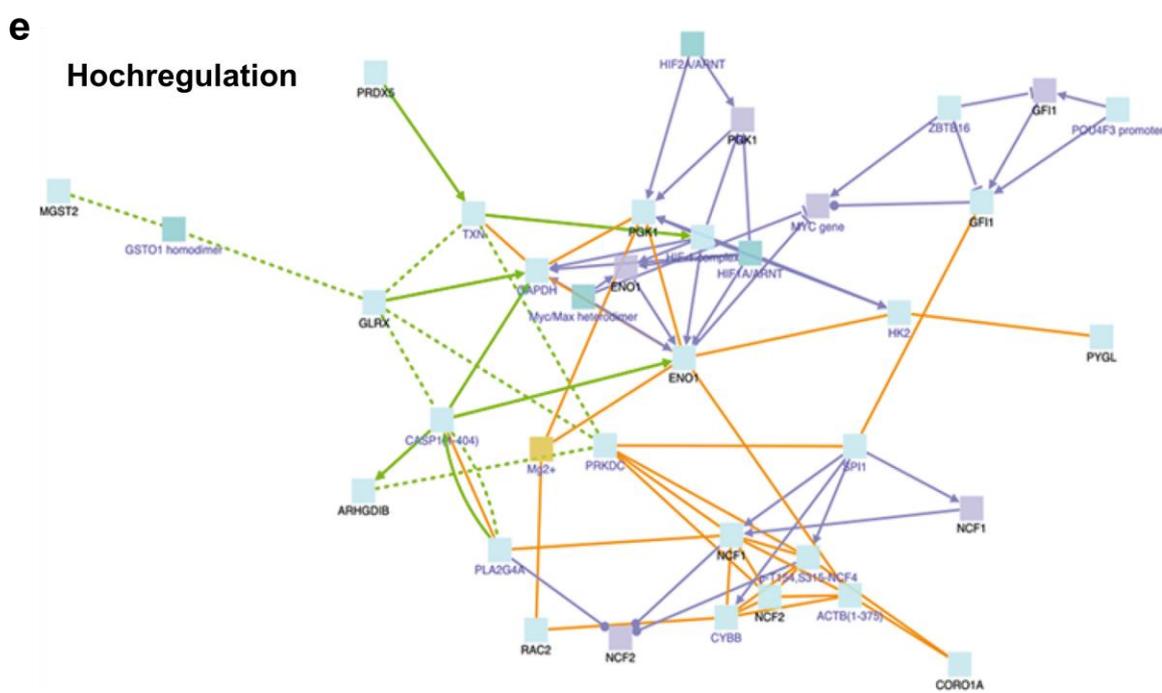
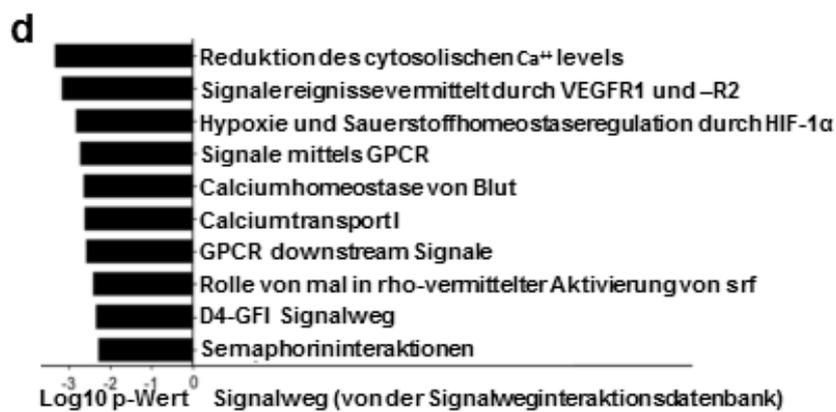
Da die EC (GFP⁻ CD31⁺ CD45⁻ Ter119⁻) durch die Aktivität von MYC in den hämatopoetischen Zellen, wie in den vorherigen Versuchen gezeigt, beeinflusst werden, sollte nun der Einfluss des Gens ebenfalls im Transkriptom der EC untersucht werden. Hierzu wurden die EC von Tamoxifen-behandelten MycER-Mäusen und von PO-Kontrollmäusen gesortet (Abb. 13a, b) und eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Gene, die in den EC der Tamoxifen-behandelten *MycER*-Mäuse im Gegensatz zu der PO-behandelten Gruppe signifikant ($p < 0,05$) und differentiell (\log_2 fold change (FC) $\geq 1,0$ oder $\leq -1,0$) exprimiert (DEGs) wurden, werden in der Heatmap in Abb. 13c (und in den Tabellen A1 und A2 im Anhang) dargestellt. 34 dieser differentiell exprimierten Gene in den EC, die durch die MYC-Aktivität in den HSPC reguliert wurden, waren in der Tamoxifen-behandelten Kohorte hochreguliert, während 194 Gene herunterreguliert waren. Das hierarchische Clustering der DEGs zeigte eine klare Trennung der PO- und Tamoxifen-behandelten MycER-Tiere (Abb. 13c). Es wurde eine Enrichmentanalyse [159] durchgeführt um die überrepräsentierten Signalwegkategorien herauszustellen (Abb. 13d, Tabelle A3 im Anhang). Die DEGs zeigten, dass die MYC-Aktivierung (MycER Zellen, Tamoxifenbehandlung) den Glukosemetabolismus und die Hypoxiesignale in den Zellen der Mikroumgebung hochregulierte (Abb. 13e), während die Aktivierung von MYC den VEGFR-Signalweg, die Kalziumbeseitigung und den GTPase-RhoB-Signalweg herunterregulierte (Abb. 13f). Weiterhin zeigte die Analyse, dass die Transkriptions-Translationsmaschinerie, die Histondemethylierung und die Angiogenese im Endothel signifikant runterreguliert waren. Durch eine Netzwerkanalyse der Proteininteraktionen der DEGs konnte eine starke Herunterregulation der Verbindungen zu Csnk2a2 und den

Polycombkomplexgenen sowie eine Hochregulation der Anzahl der Verbindungen zu Pgk1 und Eno1 sichtbar gemacht werden (Abb. 13e, f).

EC spielen verschiedenste Rollen innerhalb des KM. Sie sekretieren beispielsweise SDF-1 (CXCL12), wodurch die HSPC in der KM-Mikroumgebung gehalten werden oder durch den CXCR4-CXCL12-Signalweg aus der Zirkulation im peripheren Blut dorthin wandern [45, 46, 123]. Eine Durchsicht der Genliste aus der Transkriptomanalyse ergab, dass sich weder SDF-1 noch CXCR4 unter den DEGs befanden.

Zusammen zeigen die Daten, dass bereits die kurze Aktivierung eines Onkogens, im vorliegenden MYC, in den hämatopoetischen Zellen, nicht nur zelluläre sondern auch transkriptionelle Modifikationen in der Mikroumgebung hervorrufen. Dabei wurden auch Prozesse beeinflusst, die typischerweise bei Krebserkrankungen verändert sind [69, 172], wie beispielsweise der Glukosemetabolismus und die Angiogenese.





Physical entity color	Interaction color	Node label color
gene	protein interaction	black node labels denote seed nodes;
protein	genetic interaction	purple node labels denote intermediate nodes
protein complex	biochemical reaction	
RNA	gene regulatory interaction	
compound	drug-target interaction	
family / unknown		

f

Runterregulation

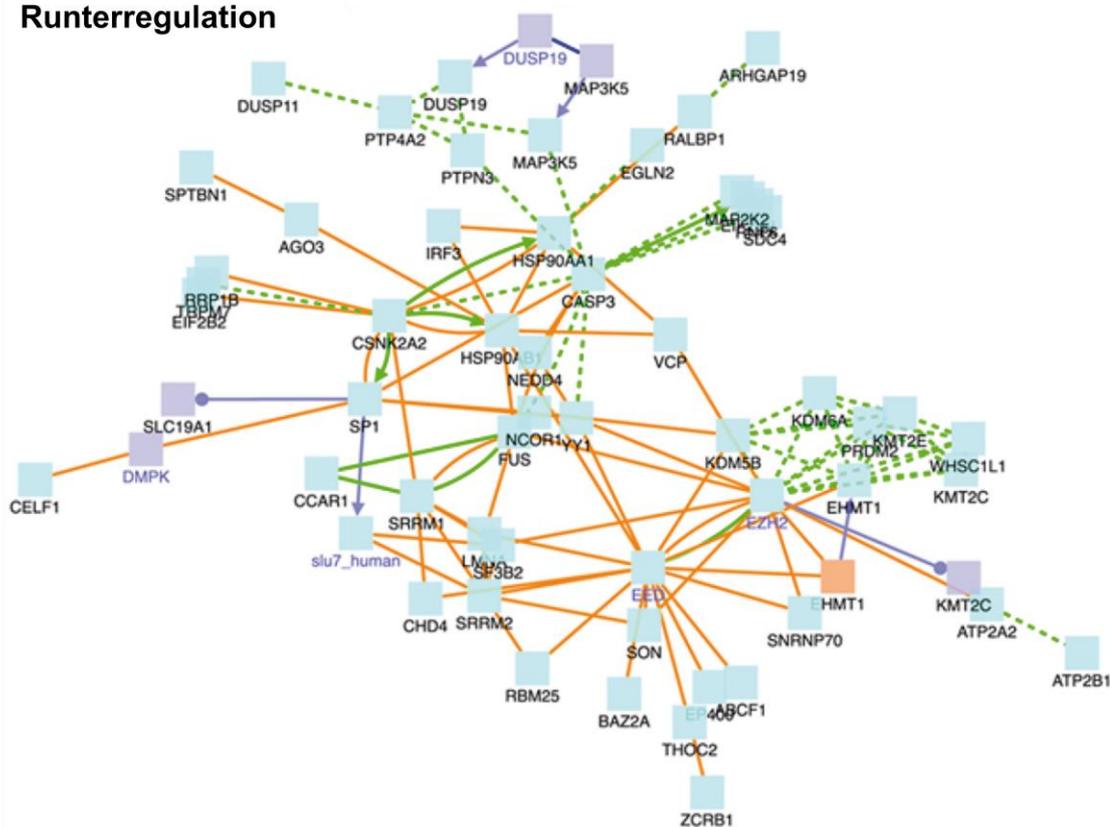


Abbildung 13: MYC verursacht transkriptionelle Änderungen in den EC der KM-Mikroumgebung.

(a) Repräsentativer durchflusszytometrischer Sort der CD45- Ter119- GFP- Zellen für die Transkriptomanalyse. (b) Die totalen Zellzahlen (GFP- CD45- Ter119-), durch die im Zuge des Sorts erhaltenen Zellen lag bei $6,7 \times 10^5$ Zellen in allen drei gezeigten Empfängergruppen. (c) Heatmap der signifikant ($p < 0,05$) differenziell (\log_2 fold change (FC) $\geq 1,0$ oder $\leq -1,0$) exprimierten Gene (DEGs) in den nicht-hämatopoetischen EC des KMs von *MycER*-Mäusen, die mit PO oder Tamoxifen behandelt wurden. Dargestellt sind die 21 am stärksten regulierten Gene. (d) Signalwegenreicht der DEGs (e) Netzwerk der hochregulierten DEGs: Die Protein-Protein-Interaktionen (PPI) wurden mittels des „induzierten Netzwerkmoduls“ von der ConsensusPathDB Datenbank (<http://consensuspathdb.org>) dargestellt, wobei nur hoch vertrauliche, binäre Interaktionen und Knoten mit einem z-Wert von ≥ 10 verwendet wurden. (f) Ähnliche Netzwerkanalyse für die herunterregulierten DEGs, mit einem Knoten-z-Wert von ≥ 40 .

4.5 MYC reguliert die Expression von CXCR4

4.5.1 In humanen Zelllinien kann kein direkter Zusammenhang zwischen der CXCR4- und der MYC-Expression festgestellt werden

Zur Untersuchung der Hypothese einer MYC spezifischen Initiierung von Veränderungen der hämatopoetischen Nische, wurde die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4, der eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung von Nischen- sowie hämatopoetischen Zellen spielt und darüber hinaus mit einer negativen Heilungsprognose assoziiert wird, einer detaillierten Analyse unterzogen.

Im weiteren Verlauf sollte getestet werden, ob und in welchem Umfang ein Zusammenhang zwischen der MYC- und der CXCR4-Expression besteht. Um einen ersten Eindruck bezüglich dieses potentiellen Zusammenhangs und dessen Art der Gestaltung zu bekommen, wurden verschiedene humane Leukämiezelllinien, unter anderem die Burkitt Lymphomzelllinien Raji sowie Daudi, die diffus großzelligen B-Zell-Lymphomlinien OCI-Ly10 sowie SUDHL6 und die MM-Zelllinie RPMI 8226/s, auf die Expression von *MYC*- und *CXCR4*-Transkripten hin untersucht (Abb. 14a). Die *CXCR4*-Expression konnte in den einzelnen Zelllinien unabhängig von dem Vorhandensein von *MYC*-mRNA nachgewiesen werden. Die Überprüfung der Expression beider Proteine der angeführten Zelllinien mithilfe eines Immunoblots ergab ebenfalls keinen direkten Zusammenhang (Abb. 14b). Im Zuge des Vergleichs der qPCR- mit den Immunoblotdaten, welcher Rückschlüsse vom *MYC*-mRNA-Level auf die Proteinkonzentration erlaubte, zeigte sich zudem, dass hohe Transkriptlevel in einer Zelllinie nicht unbedingt eine hohe CXCR4-Proteinexpression zur Folge haben. Selbiges bestätigten die, mittels Durchflusszytometrie durchgeführten Untersuchungen: eine einfache Schlussfolgerung von der CXCR4-Expression im Immunoblot auf die Expression auf der Zelloberfläche ist nicht durchführbar (Abb. 14c). Die Analyse der CXCR4-Promotorregion ergab zudem, dass keine E-Box – die Bindungssequenz für den Heterodimerkomplex von MYC und MAX – vorhanden ist [173]. Erst in Verbindung mit MAX kann MYC an die DNA binden und die Transkription seiner Zielgene regulieren.

Schlussfolgernd zeigen die Daten, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der CXCR4- und MYC-Expression in den untersuchten humanen Zelllinien gab. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass CXCR4 höchstwahrscheinlich vielfältig posttranslational reguliert wird, da keine Rückschlüsse von dem Transkriptlevel auf die Proteinkonzentration sowie die Expression auf der Zelloberfläche gezogen werden konnten.

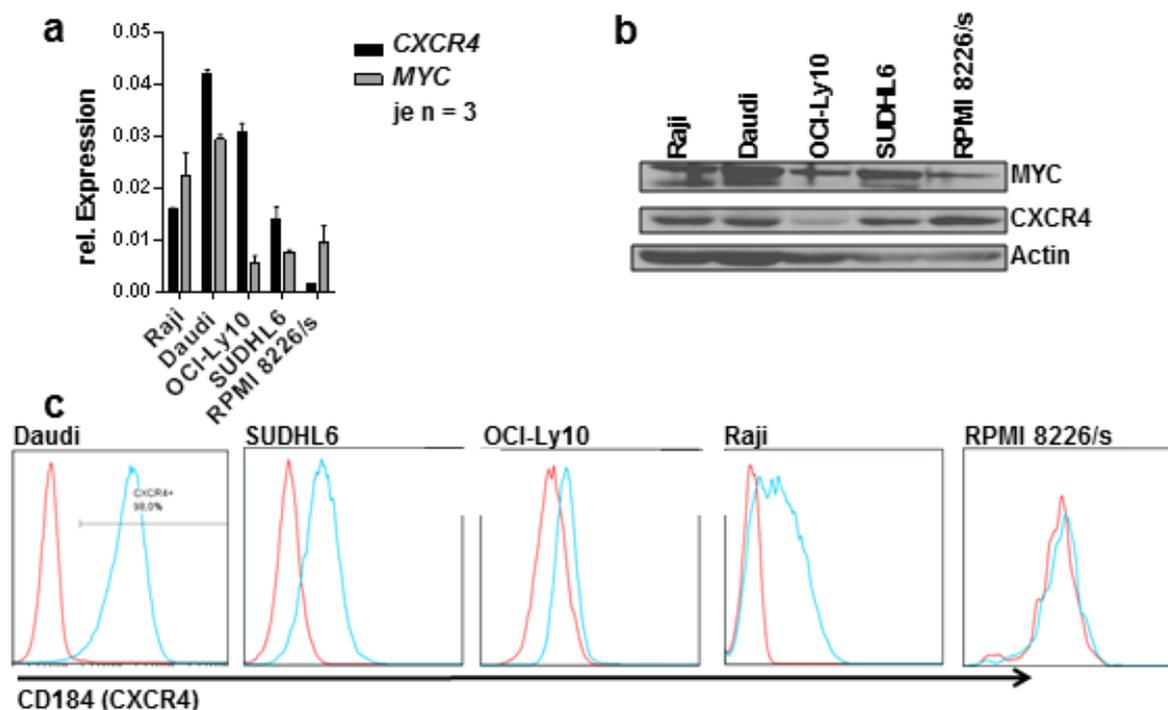


Abbildung 14: Die MYC- und CXCR4-Analyse in verschiedenen humanen Zelllinien zeigt keine Korrelation der Expression.

(a) Die aufgeführten humanen Zelllinien wurden auf die Expression der angegebenen Transkripte hin untersucht. Gezeigt ist die relative Expression. (b) Repräsentativer Immunoblot der MYC- und CXCR4-Expression bei den angeführten Zelllinien. (c) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse der dargestellten Zelllinien. In Rot ist jeweils die Isotyp-Kontrolle und in Blau die Färbung mit dem CD184 (CXCR4)- Antikörper gezeigt. Es sind die Mittelwerte \pm SEM angegeben.

4.5.2 MYC-Überexpression steigert die Expression von CXCR4 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*

Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von MYC zu einer AML zu einem myeloproliferativen Syndrom führt (Abb. 4). Deshalb sollte im nächsten Schritt ein möglicher Zusammenhang der MYC- und CXCR4-Expression in MYC überexprimierenden Zellen untersucht werden. Inwieweit und in welchem Ausmaß

die Expression von MYC in den untersuchten humanen Zelllinien aus Abb. 14, im Vergleich zu Wildtypzellen, hochreguliert war konnte nicht bestimmt werden, da keine Vergleichsproben zur Verfügung standen. Allerdings war bei Zellen deren MYC-Expressionslevel mit dem von Kontrollzellen verglichen werden konnte, eine Hochregulation des *CXCR4*-Transkripts zu erkennen. Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls bei den Versuchen mit der humanen Zelllinie P493-6, bei der die MYC-Expression durch die Zugabe von Tetracyclin ausgeschaltet werden kann [174], festgestellt werden. In diesem Fall führte die MYC-Überexpression zum Anstieg der *CXCR4*-Expression (Abb. 15a). Zudem wurden aus Milzgewebe isolierte B-Zellen von E μ -Myc-Mäusen [175] untersucht. Bei diesen Tieren wird das *Myc*-Gen durch den, für die Codierung des konstitutiven Teils der leichten Kettenenhancer von Antikörpern verantwortlichen, Promotor reguliert und folglich konstitutiv in B-Zellen exprimiert. Die E μ -Myc positiven Tiere – sowohl die bereits erkrankten (malign genannt) als auch die Mäuse im 'Krankheitsvorstadium' (bezeichnet als prämalig) – wurden mit Wildtypgeschwistertieren verglichen. Der Anstieg von MYC in den prämaligen sowie malignen, isolierten B-Zellen führte genauso, wie bei den vorherigen Versuchen, zum Anstieg der *CXCR4*-Expression (Abb. 15b). Die Untersuchung verschiedener E μ -Myc- und λ -Myc-Lymphomzelllinien – diese überexprimieren ebenfalls MYC konstitutiv in den B-Zellen -, mittels Durchflusszytometrie ergab, dass alle, in diesem Zuge untersuchten diese Zelllinien CXCR4 auf ihrer Zelloberfläche tragen (Abb. 15c).

Um zu überprüfen, ob eine erhöhte MYC-Expression in den hämatopoetischen Zellen eine Auswirkung auf umgebende Zellen hat, wurden Co-Kulturen mit EL08 durchgeführt. Die Stromazellen EL08, die zusammen mit P493-6 Zellen als Co-Kultur über eine Zeitspanne von für 24 Stunden angesetzt wurden, zeigten keine Änderung hinsichtlich ihrer SDF-1 (CXCL12)-Expression (Abb. 15a). Jedoch war das SDF-1-Niveau in den EL08 bei den Versuchen mit den E μ -Myc+ B-Zellen signifikant reduziert (Abb. 15b).

Zudem sollte der Einfluss der MYC-Überexpression auf CXCR4 auch *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurde das KM der *GFP*-, der *Myc-GFP*- und der *MycER*-transplantierten Mäuse, die bis zum Ausbruch der Erkrankung tamoxifenhaltiges Futter erhielten, auf die Expression von CXCR4, mittels Durchflusszytometrie, hin untersucht. Die Analyseverfahren zur Untersuchung der

CXCR4-Expression beschränkten sich auf die Durchflusszytometrie, da es sich bei dem CXCR4-Protein um die aktive Form auf der Zelloberfläche handelt. Zunächst mussten die GFP⁻ von den GFP⁺ Zellen unterschieden werden, da die GFP⁻ Zellen kein MYC oder MycER überexprimieren. Somit konnten in einem einzigen Tier sowohl Zellen mit MYC-Überexpression als auch mit endogenem MYC-Level betrachtet werden. Die GFP⁺ Zellen, d.h. die infizierten Zellen, zeigten in den MYC-überexprimierenden Tieren – *Myc-GFP und MycER* „on“ – ebenfalls einen starken Anstieg von CXCR4 im Durchflusszytometer (Abb. 15d). Dies war in den GFP-Kontrollmäusen nicht der Fall. Hier war die CXCR4-Expression in den GFP⁻ Zellen sogar signifikant stärker ausgeprägt als in den GFP⁺ Zellen. Als Referenzwert für alle Proben wurde die als CXCR4⁺ gewertete Population, innerhalb der GFP⁻ Zellpopulation der GFP-transplantierten Mäuse, - verwendet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine verstärkte Expression von MYC, d.h. eine starke Überexpression im Vergleich zum normalen endogenen Level, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im konstitutiven Myc-GFP- sowie im längerfristig aktivierten MycER-Modell zur Hochregulation der CXCR4-Expression führte.

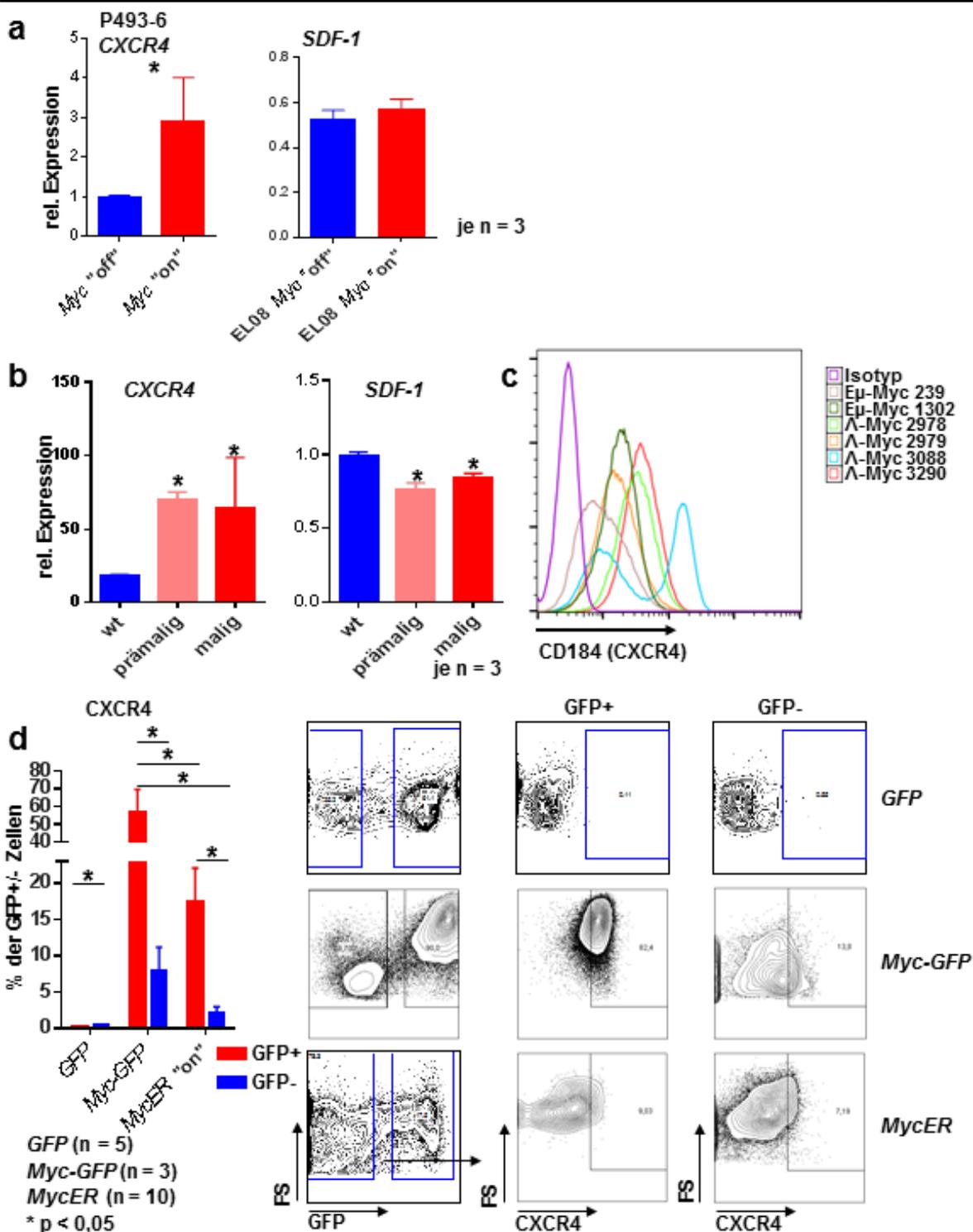


Abbildung 15: MYC-Überexpression reguliert die Expression von CXCR4.

(a) P493-6 und EL08 wurden nach 24 Stunden gemeinsamer Kultivierung mit und ohne Tetracyclinbehandlung auf die Expression der genannten Transkripte hin untersucht. Gezeigt ist das relative CXCR4-Expressionslevel (ohne Tetracyclinbehandlung) verglichen mit dem Niveau bei einer Tetracyclinbehandlung, d.h. *Myc* „on“ wurde *Myc* „off“ gegenübergestellt. (b) B220+ B-Zellen aus der Milz von Eμ-Myc Mäusen und EL08 wurden nach 24-stündiger Co-Kultur auf die Expression

der genannten Transkripte hin untersucht. Gezeigt wird die relative Expression verglichen mit den Wildtypproben. (c) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse von den gezeigten E μ - bzw. λ -Myc Lymphomzelllinien. (d) Links: Quantitative Analyse der CXCR4-Expression in GFP- (blau) und GFP+ (rot) Zellen der genannten Mauslinien. Rechts: Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse hierzu. Als Referenz für die CXCR4+ Population wurde die Zellpopulation in den GFP- Zellen der GFP-Mäuse herangezogen. Die Werte geben den Mittelwert \pm SEM an. * bedeutet $p < 0,05$.

4.5.3 Konditionale MycER-Aktivierung *in vivo* resultiert in einer myeloid-spezifischen CXCR4-Expression

Um die Abhängigkeit der CXCR4-Expression von MYC weiter *in vivo* zu testen, wurden *MycER*-Mäuse, die während des Langzeitversuchs tamoxifenhaltiges Futter erhielten, herangezogen. Die GFP+ KM-Zellen, d.h. die MycER-exprimierenden Zellen wurden mit GFP- Zellen gegenübergestellt, um Unterschiede bzw. Übereinstimmungen des MYC-Einflusses auf die CXCR4-Expression innerhalb eines Tieres festzustellen. Aus diesem Vorgang heraus wurden dann die CD45+ Leukozyten auf ihre CXCR4-Expression untersucht. Diese Analyse wurde ebenfalls in den Granulozyten, Monozyten, B- und T-Zellen vorgenommen (Abb. 16a). In den GFP+ CD45+ KM-Zellen konnte nach Ausbruch der Krankheit, mittels Durchflusszytometrie, eine stärkere CXCR4-Expression festgestellt werden als in den GFP- CD45+ Zellen (Abb. 16b). Auch in den GFP+ Granulozyten und Monozyten konnte eine signifikant stärkere CXCR4-Expression detektiert werden als in den GFP- Vergleichspopulationen. Bei den B- und T-Zellen war dies jedoch nicht der Fall (Abb. 16c).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine verstärkte MYC-Expression im konditionalen *in vivo*-MycER-Modell auch eine verstärkte CXCR4-Expression bedingt. Dieser Zusammenhang ist nur bei deutlicher Überexpression von MYC in den GFP+ Zellen gegeben. Die verstärkte CXCR4-Expression in transformierten malignen Zellen – wie in diesem Fall in den Granulozyten und Monozyten – ist von statistischer Signifikanz.

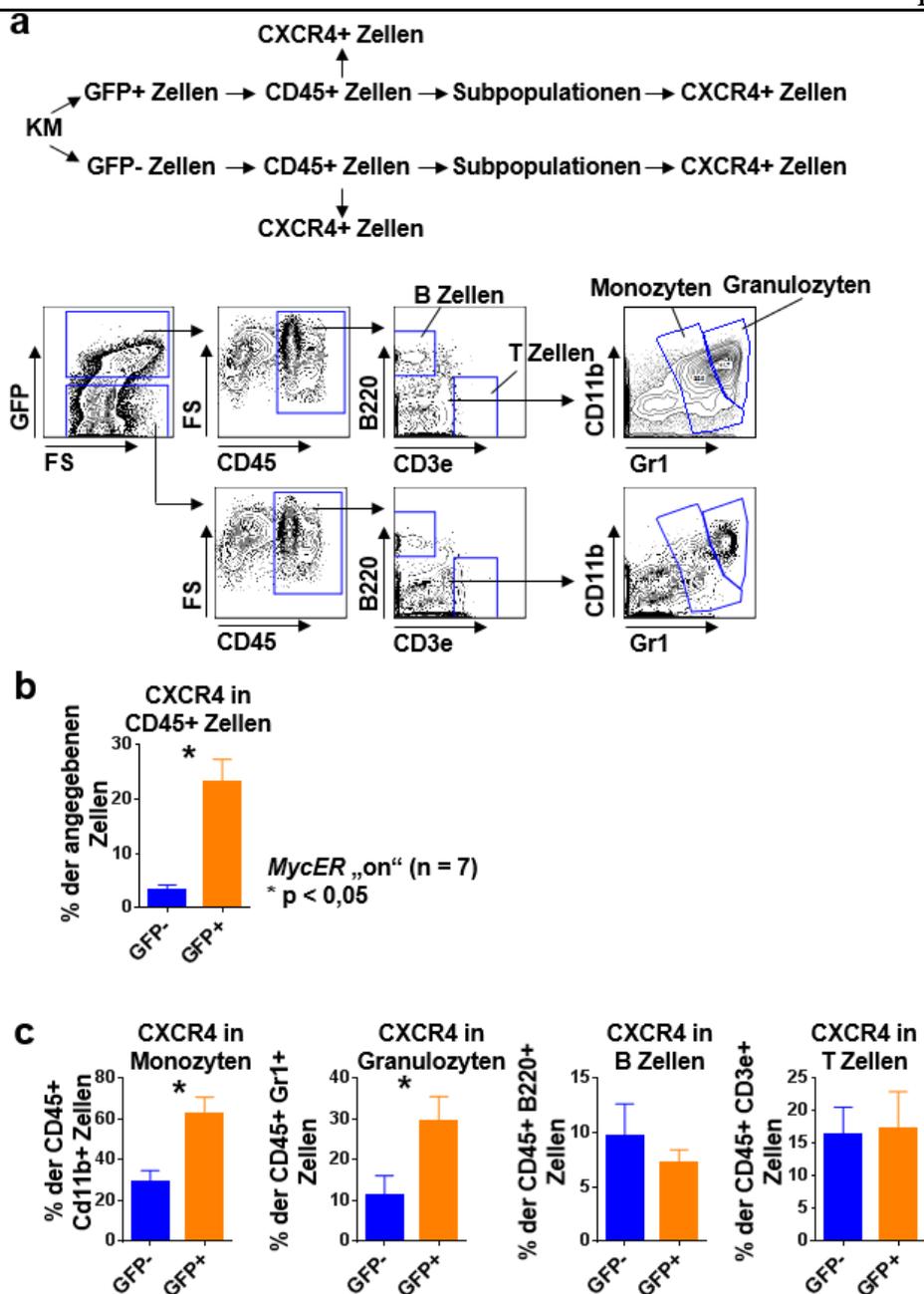


Abbildung 16: Die MYC-Aktivierung *in vivo* zeigt eine stärkere CXCR4-Expression in Granulozyten und Monozyten.

(a) Oben: Schema zur Analyse der KM-Zellen. Unten: Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse der Zellen aus dem KM der *MycER* „on“-Mäuse nach Ausbruch der Erkrankung. Die Zellen wurden nach GFP+ und GFP- Zellen aufgetrennt. Beide Populationen wurden anschließend auf CD45+ Zellen analysiert. Diese wurden wiederum auf ihre CXCR4-Expression hin untersucht (b) und nochmals in die jeweiligen Zellgruppen Granulozyten, Monozyten, B- und T-Zellen unterteilt. Diese einzelnen Subpopulationen wurden ebenfalls auf eine CXCR4-Expression hin analysiert (c). (b) Analyse der CXCR4-Expression in den CD45+ KM-Zellpopulationen. GFP- Zellen wurden mit den GFP+ Zellen verglichen. (c) Analyse der CXCR4-Expression in den genannten KM-Zellpopulationen. GFP- Zellen wurden jeweils mit den GFP+ Zellen verglichen. Die Werte geben den Mittelwert \pm SEM an. * bedeutet $p < 0,05$.

5 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern Leukämiezellen nach ihrer malignen Transformation beginnen die hämatopoetische Nische zu rekrutieren und somit Veränderungen in der hämatopoetischen Mikroumgebung bewirken, die eine Tumorprogression begünstigen, indem sie die Tumorzellen vor (chemischen) Therapiemaßnahmen schützen. Es konnte gezeigt werden, dass genetisch veränderte, hämatopoetische Zellen bereits nach kurzer Zeit – innerhalb weniger Tage, den Aufbau und die Zusammensetzung ihrer unmittelbaren Umgebung verändern. So kam es zur Reduktion der EC-Anzahl in der vaskulären Nische. Durch diese Modifikationen in der Nischenzusammensetzung wurden bei anhaltender Proliferation der malignen Leukämiezellen auch andere Zellpopulationen der hämatopoetischen Nische beeinflusst bzw. auf diese eingewirkt. Die genauere Untersuchung des CXCR4-CXCL12-Signalweges ergab, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 primär in malignen Zellen, jedoch nicht in den nicht transformierten hämatopoetischen Zellen und den Zellen der Mikroumgebung verstärkt exprimiert wurde. Die vermehrte Expression von CXCR4 in den transformierten Zellen könnte unter anderem an dem Prozess beteiligt sein, wie diese Zellen ihre Mikroumgebung beeinflussen. Die durchgeführte Transkriptomanalyse von angereicherten EC-Zellen des KMs zeigte weitere Veränderungen der Mikroumgebung, auch auf transkriptioneller Ebene, die weitere Hinweise lieferten, in welcher Art und Weise sie die malignen Zellen unterstützen und protektieren könnten.

5.1 MycER-Aktivierung *in vitro* induziert eine Stressantwort in co-kultivierten Stromazellen

Tumore hängen nicht nur von intrinsischen, genetischen Modifikationen, sondern zudem von extrinsischen Veränderungen in der Mikroumgebung des Tumors ab. Um mithilfe eines *in vivo* Modells Veränderungen in der Nischenzusammensetzung und der Regulation von etwaigen Genen der

Mikroumgebung zu beobachten, wurde *Myc* (ein Modellonkogen), das in HSPC exprimiert werden kann, gewählt. Die stetige Überexpression von *Myc* resultierte schnell in einer myeloproliferativen Erkrankung mit Splenomegalie (Kapitel 4.1). Durch die massive Proliferation von Mono- und Granulozyten im KM, wäre es schwierig gewesen, zu analysieren inwiefern einzelne Nischenzellpopulationen verändert werden, um folglich residierende Leukämiezellen zu beschützen und deren Wachstum zu begünstigen. Aus diesem Grund wurde das konditionale *MycER*-Modell verwendet, da bei diesem der Aktivierungszeitpunkt und die Dauer der MYC-Aktivierung selbst bestimmt werden konnten. Die Überexpression des konditionalen *MycER* in einer myeloischen Zelllinie führte zu einer Translokation des Fusionsproteins in den Nukleus und zur Transkription des Zielgens *Odc* (Kapitel 4.2.1). Eine Co-Kultur mit Stromazellen führte zu einer Veränderung der Transkription dieser Zellen und gibt einen Hinweis darauf, dass bereits nach 24 Stunden die umgebenden Zellen schon von sich entwickelnden Leukämiezellen beeinflusst werden. Vor allem waren Gene beteiligt, die eine Rolle bei der zellulären Entwicklung, der Proliferation und dem zellulären Wachstum (Kapitel 4.2.2) spielen. So wurde die Expression von *Rac2*, welches bei der Phagozytose, Sekretion und Zellpolarisation beteiligt ist [176], hochreguliert. Dies könnte ein erster Hinweis auf die Veränderung der Zell-Zell-Interaktionen sein. Zudem wurde die Expression von *Nod1* in den Stromazellen hochreguliert. NOD1 bei der Immunantwort beteiligt und die Stimulation von NOD1 resultiert in der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg in Knochenmark-Stromazellen bei verschiedenen malignen, hämatologischen Erkrankungen, wie CLL oder ALL, aktiviert ist [125]. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in den Stromazellen könnte eine Voraussetzung für das Überleben der malignen, hämatopoetischen Zellen sein. Auch *Jun* wurde in den Stromazellen hochreguliert. Dieses Gen ist bei der Stressantwort, der Zellzyklusprogression [177, 178], der Angiogenese [179] und der Tumorentstehung beteiligt und reduziert darüber hinaus die Apoptose [180]. Im Zusammenspiel könnte dies die Proliferation der malignen Zellen in der Umgebung der veränderten Stromazellen durch Progression der Zellteilung, durch Herabsetzung der Zellsterblichkeit und durch bessere Versorgung mit Nährstoffen begünstigen.

5.2 Das *in vivo* MycER-Modell verursacht lediglich eine Myeloproliferation nach dauerhafter Aktivierung

Es wurde gezeigt, dass Mäuse, die mit konditionalem *MycER*-infiziertem KM transplantiert wurden, eine stabile Entwicklung dieser Zellen zeigten. Dies ging ohne signifikante Änderungen in der Zusammensetzung des KMs, im Vergleich zu *GFP*-Kontrollmäusen, einher. Es konnte zudem kein Hinweis auf eine Myeloproliferation festgestellt werden, welcher belegen würde, dass das System ohne Tamoxifen-Behandlung keine signifikante MYC-Aktivität aufweist (Kapitel 4.3.1). Das konditionale *MycER*-Modell erlaubte eine kurze Aktivierung von MYC, welche in der Transkription der gezeigten MYC-Zielgene *Odc* und *Cad* resultierte. Von Bedeutung ist, dass diese kurze MYC-Aktivierung nicht in einer Myeloproliferation endete.

Studien zeigten, dass die Überexpression von MYC in den HSPC in einer Hemmung der HSC-Selbsterneuerung und in einer Expansion der MPP resultiert [48]. Dies konnte weder in den Tamoxifen-behandelten *MycER*-Mäusen, noch in den mit PO behandelten Tieren festgestellt werden. Vermutlich dürfte die viertägige MYC-Aktivierung für das Hervorrufen dieses Effekts zu kurz gewesen sein. Andere Untersuchungen ergaben, dass die Behandlung mit Tamoxifen die Apoptose in der MPP-Population sowie eine verstärkte Proliferation in den HSC induziert [181]. Die kurzfristige Behandlung mit Tamoxifen, die hier zur Anwendung kam, hatte allerdings keine signifikanten Effekte auf die HSPC-Populationen. Dies lag vermutlich an der relativ kurzen Dauer der Tamoxifenbehandlung. Jedoch kann ohne weitere Untersuchungen keine endgültige Aussage hinsichtlich der Ursache für die nicht veränderten HSPC-Populationen getroffen werden. Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass eine kurze, konditionale Aktivierung von MYC das hämatopoetische System im KM nicht änderte, weshalb sich dieses Modell dafür eignet, präleukämische Änderungen in der KM-Mikroumgebung, ohne störende Effekte durch maligne Transformationen, zu untersuchen (Kapitel 4.3.2).

Die stetige Aktivierung des konditionalen *MycER* mittels tamoxifenhaltigem Futters resultierte zügig in einer myeloproliferativen Erkrankung mit Splenomegalie (Kapitel 4.3.2). Diese Erkrankung war vor allem im Blutbild nicht so deutlich

ausgeprägt wie bei der konstitutiven Überexpression von *Myc*, die mittlere Latenz bis zum Ausbruch der Krankheit betrug jedoch in beiden Fällen 28 Tage. Somit konnte belegt werden, dass es sich bei der Aktivierung von MycER über eine Zeitspanne von lediglich vier Tagen tatsächlich um ein präleukämisches Modell handelte, da auch das MycER-Modell zu einer myeloproliferativen Erkrankung führte, sofern die Aktivität lange genug anhielt. Auch die HSPC-Populationen in der Langzeitbehandlung wurden betrachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass es zu einem nicht signifikanten Anstieg in beiden Populationen kam. Hier lässt sich vermuten, dass die MYC-Effekte, die den Rückgang der LSKs und den Anstieg der MPPs bewirken [48] und die Effekte des Tamoxifens – die Proliferation der LSKs und die Apoptose der MMPs [181] – sich gegenseitig aufgehoben haben.

5.3 *In vivo* MYC-Aktivierung verursacht einen Rückgang der EC mit transkriptioneller Änderung

Um die MYC-induzierten Änderungen in der KM-Mikroumgebung zu analysieren, wurde die EC-angereicherte CD45- Ter119- GFP- nicht hämatopoetische Population der Empfängermäuse erforscht. Experimente ergaben, dass die *MycER* Mäuse, die mit Tamoxifen aktivierte hämatopoetische Zellen hatten, weniger EC im KM aufwiesen (Kapitel 4.4). Die EC spielen verschiedenste Rollen innerhalb des KM. Sie sekretieren SDF-1 (CXCL12), was die HSPC in der KM-Mikroumgebung hält oder sie aus der Zirkulation im peripheren Blut durch den CXCR4-CXCL12-Signalweg dorthin wandern lässt [45, 46, 123]. Außerdem erlaubt das fenestrierte Endothel den HPC in den Blutstrom zu wechseln. Zudem wurde gezeigt, dass das sinusoidale Endothel und die es umgebenden Lepr+ Nestin^{dim} perivaskulären Zellen die aktiv zirkulierenden HSC durch die Sekretion des Stammzellfaktors (SCF) erhalten [55]. Ruhende HSC finden sich eher nahe von EC, die von Nestin+ Zellen umgeben sind [182]. Für MM konnte gezeigt werden, dass sich dort spezifische Endothelzellen befinden. Ob diese sich aus gesunden Endothelzellen durch die Aktivität der Tumorzellen entwickeln oder nicht, konnte nicht gezeigt werden [183]. Die Reduktion der EC in den präleukämischen Mäusen könnte eine der ersten Änderungen sein, die zur Okkupierung der Mikroumgebung

führen. Diese, durch die Tumorzellen gebildete Umgebung unterstützt dann beispielsweise das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen [125].

Darauffolgend wurden die MYC-induzierten Effekte auf die Nische in den diversen Stadien der proliferativen Erkrankung genauer betrachtet. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass MYC die oben genannten Veränderungen in der Nischenzusammensetzung nicht nur bei kurzfristiger Aktivierung induziert, sondern auch bei Langzeit- bzw. konstitutiver Überexpression (Kapitel 4.4). Resümierend kann belegt werden, dass die Aktivität von MYC in den hämatopoetischen Zellen ihre Nische beeinflusst. Dies ist wahrscheinlich abhängig von der Dauer der MYC-Aktivität und beginnt bei den EC unter Einfluss der prämaligen Tumorzellen und setzt sich dann im weiteren Verlauf der Erkrankung auch auf die anderen Zellen der Mikroumgebung fort. Der Einfluss, den man bei den langzeitbehandelten *MycER*-Mäusen mit Blick auf den OBC und MSC beobachten konnte, könnte auch auf die Wirkung von Tamoxifen zurückzuführen sein. Die MYC- und die Tamoxifeneffekte lassen sich dabei in diesem Versuch nicht voneinander trennen. Sie sind aber wohl auf die Überexpression von MYC zurückzuführen, da Reduktion der EC-Population auch in den *Myc-GFP*-Mäusen beobachtet werden konnte.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die prämaligen Zellen die KM-Mikroumgebung schon sehr früh während der Leukämogenese transformieren. Deshalb wurde eine Transkriptomanalyse der Nischenzellen, angereichert mit EC durchgeführt. Die Untersuchung der am stärksten vertretenen Signalwege durch die DEGs zeigte, dass verschiedenste Signalwege an den frühen Veränderungen im Transkriptom der EC beteiligt sind. Vor allem die Rho-Subfamiliesignalwege, die Transkriptom-Translatationsmaschinerie, die Angiogenese und die Sauerstoffhomöostase sind durch die Anwesenheit von MYC-überexprimierenden Zellen reguliert. Obwohl die verstärkte Angiogenese ein Merkmal von Krebserkrankungen ist [69], waren die präleukämischen Änderungen durch eine reduzierte Anzahl von EC, durch reduzierte VEGFR1 und -2 Signale und durch eine erhöhte Expression der HIF-1-Zielgene *Pgk1* und *Eno1* in den CD31+ CD45- Ter119- Zellen gekennzeichnet. Da das VEGFR-Signal die Proliferation, das Überleben und die Migration von EC induziert [184, 185], ist es wahrscheinlich, dass die Inhibition dieses Signalwegs in einer Reduktion der

Proliferation und einem Anstieg der Apoptose resultierte. Zusätzlich zu diesen Signalwegen findet man eine reduzierte Expression der RhoGEF *Arghef12* (auch bekannt als *Larg*), *Rac2*, *Rhob* und seines Effektors *Diaph1*, welche in der Faserbildung und Zellmobilität [186, 187], im vaskulären Austausch [188], der Transkription und im Zellzyklus [189] beteiligt sind (Kapitel 4.4). Dies legt die Vermutung nahe, dass die MYC-überexprimierenden präleukämischen Zellen auch durch diesen Weg die Umgestaltung des vaskulären Netzwerks beeinflussten. Die Regulation dieser frühen Ereignisse in der leukämischen Transformation durch die konditionale Expression von MYC zeigt, dass für entstehende Tumorzellen ein wichtiger Angriffspunkt zur Umprogrammierung ihrer Mikroumgebung nicht nur bei den mesenchymalen, sondern auch den endothelialen Zellen der Nische liegt. Allerdings könnte die reduzierte EC-Dichte im KM, welche man in der Leukämie nach anhaltender MYC-Aktivierung mittels Tamoxifenbehandlung sehen konnte, auch einfach eine Folge der massiven Expansion der malignen Hämatopoese sein. Dies sind nur erste Hinweise, darauf, dass auch die endothelialen Zellen der Nische eine Rolle in der Umgestaltung der Mikroumgebung von Leukämiezellen spielen. Für eine genauere Untersuchung dieses Sachverhaltes wären weitere Experimente, wie die Überprüfung der Transkriptomdaten mittels qPCR und *in vivo* Untersuchungen durch mutagene Mausstämmen nötig.

Die Genexpression von CXCR4 und SDF-1 waren nicht signifikant unterschiedlich reguliert zwischen MYC-überexprimierenden und nicht überexprimierenden Mäusen. Dies könnte daran liegen, dass noch keine maligne Transformation der hämatopoetischen Zellen stattgefunden hat (Kapitel 4.3.2), während eine erhöhte CXCR4-Expression erst in erkrankten Mäusen festgestellt werden konnte und hier auch nur in den malignen Granulozyten und Monozyten, nicht aber in den gesunden T- und B-Zellen (Kapitel 4.5). Auch haben Co-Kulturen von MYC-überexprimierenden Zellen zwar ergeben, dass die CXCR4-Expression in den hämatopoetischen Zellen ebenfalls anstieg, dies aber nicht immer eine Änderung der SDF-1 Expression in den Stromazellen zur Folge hatte (Kapitel 4.5). Es könnte also sein, dass der CXCR4-CXCL12-Signalweg durch die Überexpression von MYC in hämatopoetischen Zellen nur auf der Seite von CXCR4 in hämatopoetischen Zellen nicht aber auf der Seite von SDF-1 in den umgebenden

Zellen beeinflusst wird. Da in der Transkriptomanalyse nur die Zellen der vaskulären Nische betrachtet worden sind, konnte keine Änderung der CXCR4-Expression verzeichnet werden, da dieser nur in den hämatopoetischen Zellen zu finden gewesen wäre. Auch eine veränderte SDF-1 Expression konnte nicht beobachtet werden, da diese wohl, wenn überhaupt, nur bei massiver MYC-Überexpression auftrat. Dies war in diesem präleukämischen Modell nicht der Fall.

Zusammenfassend bilden diese Daten ein *in vivo* Modell mit einem konditionalen Onkogen, das Anzeichen auf präleukämische Schritte gibt, die die KM-Umwandlung, die Reduzierung der EC-Anzahl, die Mobilität und die Antwort auf Hypoxie betreffen. Durch MYC-Expression wird die Transkription der Zielgene in den hämatopoetischen Zellen reguliert. In dieser Arbeit wurde dies für die Gene *Odc* und *Cad* gezeigt, allerdings werden in etwa 15 % aller Gene durch MYC reguliert. Dies könnte zur Folge haben, dass extrazelluläre Signale an die Mikroumgebung der präleukämischen Zellen gesandt werden, was sich sowohl auf die Veränderung der Zusammensetzung der Nische, wie die Reduktion der EC-Anzahl, als auch die Genexpression dieser Zellen auswirkt. Die Vermutung liegt nahe, dass durch ein Wechselspiel aus intrinsischen und extrinsischen Signalen die mutierten hämatopoetischen Zellen dazu getrieben werden, vermehrt den myeloischen Weg einzuschlagen, was zu einer vermehrten Granulozyten- und Monozytenexpansion führt (Abb. 17). Die Analysen bestätigen die Beteiligung der EC des KMs bei frühen präleukämischen Änderungen in der Nische und liefern Gründe für eine weitere Erforschung der endothelialen Angriffspunkte für eine Nischen-abhängige Therapie. So könnten beispielsweise Co-Kulturen von HSPC mit EC durchgeführt werden, wobei in den EC die gefundenen Gene herabreguliert werden, um so deren Auswirkungen auf die HSPC zu untersuchen. Auch könnten Mausmodelle generiert werden, in denen spezifisch die gefundenen Gene in den EC ausgeschaltet werden, um zu erforschen, wie diese sich auf die HSPC, die Hämatopoese und die restlichen Nischenzellen auswirken.

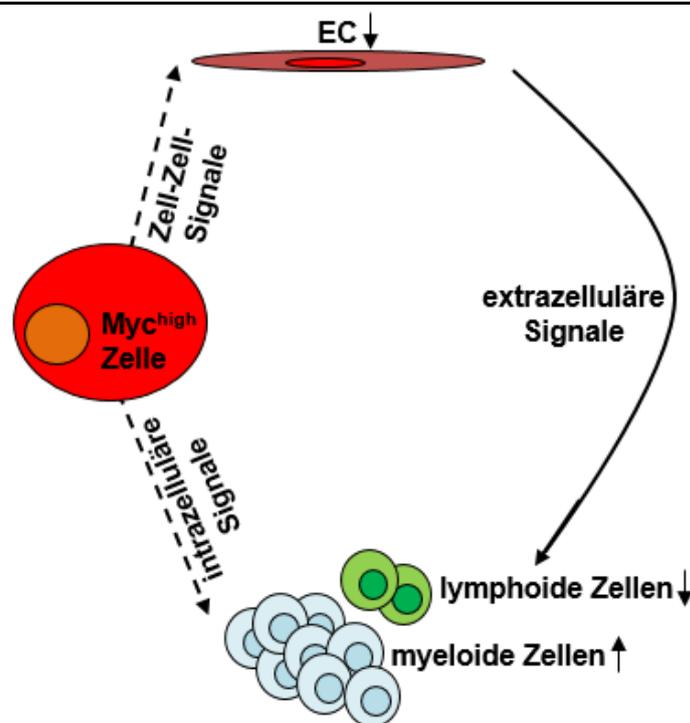


Abbildung 17: Modell der Interaktion von Myc exprimierenden Zellen und der Mikroumgebung.

Durch die MYC-Überexpression in HSPC ändert sich das Transkriptom dieser Zellen, das sowohl die intra- als auch die extrazellulären Signale betrifft. Somit wird beispielsweise die Anzahl der EC heruntergesetzt und auch das Transkriptom der umgebenden Nischenzellen wird beeinflusst. Dies wiederum hat zusammen mit den intrinsischen Signalen einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung, in diesem Fall zugunsten der myeloiden Linie, der HSPC.

5.4 MYC beeinflusst die CXCR4-Oberflächenexpression

Tumorerkrankungen sind durch genetische Veränderung in der Tumorzellpopulation, sowie durch Störungen in der Tumormikroumgebung charakterisiert [172]. In vielen Tumorerkrankungen ist trotz einer effektiven Reduktion der Tumormasse durch gängige Chemotherapie oder gezielt wirksame neue Medikamente eine komplette Eradikation und somit langfristige Kuration nicht möglich. Eine wichtige Signalachse in der Wechselwirkung zwischen den Nischenzellen und den HSC ist der CXCR4-CXCL12-Signalweg. Es wurde für die diversen Tumorerkrankungen gezeigt, dass CXCR4-Expression ein schlechter Prognosefaktor ist [136, 190].

Das MYC-Onkogen wird in circa 70 % aller Tumorerkrankungen überexprimiert. Zahlreiche Untersuchungen lassen mutmaßen, das MYC nicht nur zellintrinsische

Funktionen erfüllt und unter anderem für einen Stammzellphänotyp essentiell verantwortlich ist, sondern auch in der Interaktion der MYC-exprimierenden Zelle mit der Umgebung eine bedeutsame Rolle spielt [1, 98, 105]. In der vorliegenden Arbeit wurde belegt, dass dies unter anderem für die Interaktion mit den EC der Fall sein könnte (Kapitel 4.4). Außerdem wurde gezeigt, dass die Überexpression von MYC in HSPC-KM-Zellen zu einer AML-ähnlichen Erkrankung führte (Kapitel 4.3.2). Auch in der AML ist die Prognose für die meisten Patienten immer noch schlecht. Die KM-Mikroumgebung liefert Signale, die das Überleben der AML-Zellen trotz Behandlung sicherstellen könnte. Dies wird durch eine große Anzahl von Zytokinen, Chemokinen und Integrinen vermittelt. Ein Beispiel hierfür ist der CXCR4-CXCL12-Signalweg. So ist die Überexpression von CXCR4 ein negativer Prognosefaktor in der AML [136].

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen MYC und CXCR4 Expression besteht, wurden verschiedene humane Zelllinien auf die Expression dieser Gene beziehungsweise Proteine hin getestet. Es konnte kein direkter Zusammenhang festgestellt werden (Kapitel 4.5.1). CXCR4 wird durch verschiedene Wege reguliert. Die Expression kann sowohl auf der transkriptionellen wie auch auf der Proteinebene geregelt werden. Allerdings liegt CXCR4 nicht immer in der Plasmamembran vor, sondern kann auch internalisiert werden. Daraufhin wird es entweder über Ubiquitinierung degradiert oder kann zurück an die Plasmamembran recycelt werden [120]. Diese Prozesse könnten dafür verantwortlich sein, dass man keine Rückschlüsse von der CXCR4-Expression, beispielsweise mittels qPCR oder Immunoblot, auf dessen Präsenz an der Oberfläche schließen kann (Kapitel 4.5.1).

Andere Studien konnten aufzeigen, dass der Transkriptionsfaktor Yin-Yang-1 (YY1) ein Repressor der CXCR4-Expression ist [191]. Dieser wird wiederum von MYC inhibiert, indem MYC und YY1 direkt aneinander binden [192-194]. Durch die Überexpression von MYC wird mehr YY1 gebunden, damit kann YY1 nicht mehr die Expression von CXCR4 inhibieren, mittels dessen die Expression von CXCR4 hochreguliert wird. Allerdings führt die vermehrte Expression von MYC auch zur gesteigerten Bindung an MAX, wodurch die freien MYC-Proteine, die YY1 binden könnten, abgepuffert werden [195] (Abb. 18). Dies könnte zur Folge haben, dass kein direkter Zusammenhang in den Zelllinien

feststellbar war. Weitere Versuche mit der Überexpression von MYC in verschiedenen Zellen ergaben, dass durch vermehrtes MYC auch die CXCR4 Expression gesteigert war (Kapitel 4.5.2). Dieser direkte Zusammenhang zwischen MYC und CXCR4 Expression kann wohl nur dann beobachtet werden, wenn MYC im starken Überfluss vorhanden ist und nicht mehr durch MAX-Bindung abgefangen werden kann. Das war bei den gewollt genetisch veränderten MYC-überexprimierenden hämatopoetischen Zellen jeweils der Fall, aber nicht unbedingt bei jeder untersuchten Zelllinie.

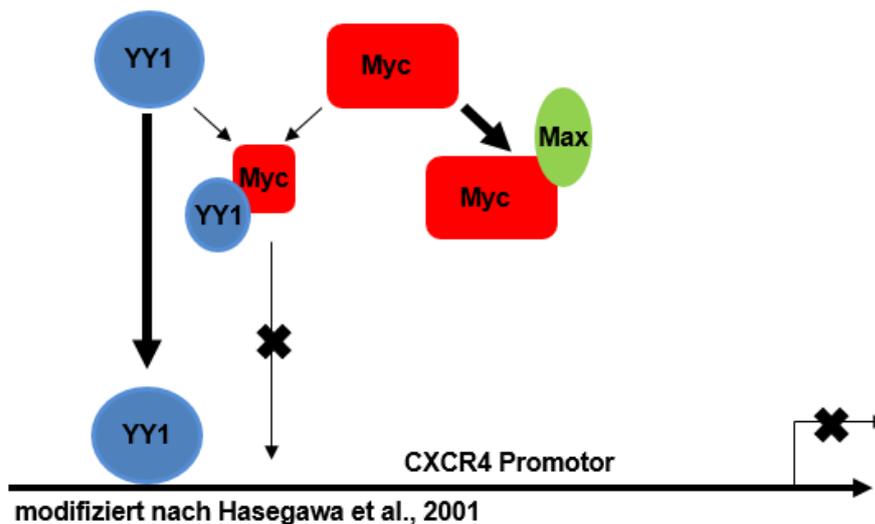


Abbildung 18: Modell des Mechanismus vom Zusammenhang von MYC- und CXCR4-Expression

Vermehrte Komplexbildung von MYC mit MAX resultiert in einer geringeren Komplexierung von YY1. Somit ist mehr freies YY1 im Umlauf, das an den CXCR4-Promotor binden kann und damit die Expression von CXCR4 hemmt.

Um den Einfluss der MYC-Expression in den hämatopoetischen Zellen auf die Mikroumgebung im CXCR4-CXCL12-Signalweg zu testen, wurden Co-Kulturen mit EL08 Stromazellen durchgeführt. Teilweise wurde die CXCL12 (SDF-1) Expression in den Stromazellen bei diesen Co-Kulturversuchen herabgesetzt. Dieser Effekt konnte von Colmone et al. Auch *in vivo* nachgewiesen werden [124]. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen Schritt, wie sich die Leukämiezellen die endogene Nische zu Eigen machen und so die normalen hämatopoetischen Zellen verdrängen. Diese tragen weniger CXCR4 auf ihrer Zelloberfläche und werden durch das verringerte CXCL12 damit

weniger effektiv in der Nische gehalten als die Leukämiezellen, die eine vermehrte CXCR4-Expression aufweisen.

Der Zusammenhang von MYC-Überexpression und gesteigerter CXCR4-Expression konnte auch im Mausmodell beobachtet werden. Je stärker MYC aktiv war, desto mehr CXCR4 wurde auf der Oberfläche exprimiert. Man konnte dies auch an den einzelnen Mäusen beobachten, deren MYC-exprimierende Zellen (GFP+ Zellen) mehr CXCR4 zeigten als deren GFP-Zellen. Allerdings wurden mutmaßlich auch die benachbarten GFP- Zellen der *Myc-GFP* und *MycER* Mäuse beeinflusst mehr CXCR4 zu exprimieren, was der Vergleich mit den *GFP* Mäusen zeigte, in denen die CXCR4-Level deutlich niedriger waren als in den *Myc-GFP* oder *MycER* Mäusen. Der Anstieg der CXCR4-Expression konnte auch in den *MycER*-exprimierenden Leukozyten nachgewiesen werden. Dieser Anstieg konnte vor allem in den Granulozyten und Monozyten beobachtet werden, also genau in jenen Populationen, die durch die vermehrte MYC-Aktivität zur Proliferation angeregt werden und so zur myeloproliferativen Erkrankung führen. Zum einen verdeutlicht dies noch einmal, dass die Überexpression von MYC auch die Expression von CXCR4 induziert. Zum anderen ergaben die Daten aus der Transkriptomanalyse mit den vaskulären Nischenzellen keine signifikante Regulation der *CXCR4*-Expression in diesen Zellen. Somit bezog sich die CXCR4-Regulation nur auf die krankhaft veränderten hämatopoetischen, nicht aber auf die Umgebungszellen. Es waren auch nur diejenigen Zellen von der Hochregulation der CXCR4-Expression betroffen, die ursächlich für das Krankheitsbild sind, nämlich Granulozyten und Monozyten. Es könnte sein, dass hauptsächlich die krankhaft veränderten Zellen in der Nische verweilen oder nach der Zirkulation im Blutkreislauf dorthin zurückkehren und in dieser Mikroumgebung vor Therapeutika geschützt werden. Außerdem besitzen diese genetisch veränderten Zellen einen Vorteil gegenüber nicht mutierten HSPC, da sie durch das vermehrte CXCR4 verstärkt in der hämatopoetischen Nische gehalten werden und somit gesunde HSPC verdrängen können.

Die durch das Onkogen *Myc* transformierten malignen Zellen beeinflussen ihre Mikroumgebung wahrscheinlich durch Chemokine, Zytokine und andere extrazelluläre Signalmoleküle. Eines davon könnte der Chemokinrezeptor CXCR4 sein. Die Vermutung liegt nahe, dass dieser, auf noch unbekanntem Weg, von

vielen verschiedenen Onkogenen induziert wird, da er in verschiedenen Malignomen ein schlechter Prognosefaktor ist [136, 190]. Hier konnte nun gezeigt werden, dass auch das Onkogen MYC die Expression von CXCR4 spezifisch in transformierten Zellen, nicht aber in nicht malignen und Zellen der Mikroumgebung, antreibt.

5.5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde dargelegt, dass das induzierbare *in vivo* MycER Transfektions-Transplantationsmodell dafür geeignet ist, als AML-ähnliches Leukämiemodell zur Untersuchung prämaligener Veränderungen in der Mikroumgebung der hämatopoetischen Zellen zu dienen. Dabei erfolgt eine myeloproliferative Erkrankung erst durch langanhaltende MYC-Aktivierung. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Onkogen MYC die Expression von CXCR4 spezifisch in den malignen Zellen, jedoch nicht signifikant in den nichttransformierten Zellen und ebenso wenig in den Zellen der Mikroumgebung, ansteigen lässt. Erste genauere Untersuchungen der Mikroumgebung in diesem AML-ähnlichen *in vivo* Modell konzentrierten sich auf die vaskuläre Nische, da sich zeigte, dass die Anzahl der EC sank, wahrscheinlich durch den Einfluss der prämaligen Leukämiezellen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung zeigte sich, dass auch andere Zellpopulationen der Nische reduziert wurden oder gegenteilig sogar vermehrt vorhanden waren. Auch das Transkriptom der mit EC angereicherten Zellen der hämatopoetischen Nische wurde verändert. Die Regulation dieser frühen Ereignisse in der leukämischen Transformation durch die konditionale Expression von MYC lässt vermuten, dass ein wichtiger Angriffspunkt der Tumorzellen nicht nur in den mesenchymalen, sondern auch in den endothelialen Zellen der Nische liegt. Deshalb könnte dieses konditionale *in vivo* MycER Modell helfen, die Veränderungen der einzelnen Nischenzellpopulationen nach erfolgter onkogen-induzierter maligner Transformation der hämatopoetischen Zellen genauer zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
2. Pietras, E.M., M.R. Warr, and E. Passegue, *Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells*. J Cell Biol, 2011. **195**(5): p. 709-20.
3. Weissman, I.L., D.J. Anderson, and F. Gage, *Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 387-403.
4. Ema, H., et al., *Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2979-87.
5. Bowie, M.B., et al., *Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2808-16.
6. Palis, J., et al., *Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse*. Development, 1999. **126**(22): p. 5073-84.
7. Medvinsky, A., S. Rybtsov, and S. Taoudi, *Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions*. Development, 2011. **138**(6): p. 1017-31.
8. Cumano, A. and I. Godin, *Ontogeny of the hematopoietic system*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 745-85.
9. Medvinsky, A. and E. Dzierzak, *Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region*. Cell, 1996. **86**(6): p. 897-906.
10. Gekas, C., et al., *The placenta is a niche for hematopoietic stem cells*. Dev Cell, 2005. **8**(3): p. 365-75.
11. Samokhvalov, I.M., N.I. Samokhvalova, and S. Nishikawa, *Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1056-61.
12. Rhodes, K.E., et al., *The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 252-63.
13. de Bruijn, M.F., et al., *Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta*. Immunity, 2002. **16**(5): p. 673-83.
14. Dzierzak, E. and N.A. Speck, *Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 129-36.
15. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
16. Laird, D.J., U.H. von Andrian, and A.J. Wagers, *Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease*. Cell, 2008. **132**(4): p. 612-30.
17. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.

18. Miyamoto, K., et al., *Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(1): p. 101-12.
19. Tothova, Z., et al., *FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress*. Cell, 2007. **128**(2): p. 325-39.
20. Shizuru, J.A., R.S. Negrin, and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hemolymphoid system*. Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 509-38.
21. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1068-74.
22. Okada, S., et al., *In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells*. Blood, 1992. **80**(12): p. 3044-50.
23. Osawa, M., et al., *In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Lin(low/-) hemopoietic stem cells*. J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3207-14.
24. Christensen, J.L. and I.L. Weissman, *Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14541-6.
25. Muller-Sieburg, C.E., et al., *Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1302-9.
26. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
27. Foudi, A., et al., *Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 84-90.
28. Wilson, A., et al., *Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1118-29.
29. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-72.
30. Muller-Sieburg, C.E., et al., *Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4111-8.
31. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
32. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
33. Domen, J. and I.L. Weissman, *Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate*. Mol Med Today, 1999. **5**(5): p. 201-8.
34. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 93-106.
35. Ohlstein, B., et al., *The stem cell niche: theme and variations*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 693-9.
36. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
37. Lo Celso, C. and D.T. Scadden, *The haematopoietic stem cell niche at a glance*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 21): p. 3529-35.

38. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
39. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
40. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
41. Brozowski, J.M., M.J. Billard, and T.K. Tarrant, *Targeting the molecular and cellular interactions of the bone marrow niche in immunologic disease*. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. **14**(2): p. 402.
42. Mendelson, A. and P.S. Frenette, *Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration*. Nat Med, 2014. **20**(8): p. 833-46.
43. Kunisaki, Y., et al., *Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence*. Nature, 2013. **502**(7473): p. 637-43.
44. Adams, G.B., et al., *Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor*. Nature, 2006. **439**(7076): p. 599-603.
45. Wilson, A., et al., *Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 64-75.
46. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
47. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.
48. Wilson, A., et al., *c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. Genes Dev, 2004. **18**(22): p. 2747-63.
49. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. Science, 2006. **311**(5769): p. 1880-5.
50. Kollet, O., et al., *Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 657-64.
51. Ito, K., et al., *Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells*. Nat Med, 2006. **12**(4): p. 446-51.
52. Hosokawa, K., et al., *Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(3): p. 578-83.
53. Rafii, S., et al., *Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium*. Leuk Lymphoma, 1997. **27**(5-6): p. 375-86.
54. Mercier, F.E., C. Ragu, and D.T. Scadden, *The bone marrow at the crossroads of blood and immunity*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(1): p. 49-60.
55. Ding, L., et al., *Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 457-62.
56. McCarthy, K.F., G.D. Ledney, and R. Mitchell, *A deficiency of hematopoietic stem cells in steel mice*. Cell Tissue Kinet, 1977. **10**(2): p. 121-6.
57. Zlotnik, A., A.M. Burkhardt, and B. Homey, *Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(9): p. 597-606.

58. Jacobson, O. and I.D. Weiss, *CXCR4 chemokine receptor overview: biology, pathology and applications in imaging and therapy*. Theranostics, 2013. **3**(1): p. 1-2.
59. Lapidot, T., A. Dar, and O. Kollet, *How do stem cells find their way home?* Blood, 2005. **106**(6): p. 1901-10.
60. Vagima, Y., et al., *Pathways implicated in stem cell migration: the SDF-1/CXCR4 axis*. Methods Mol Biol, 2011. **750**: p. 277-89.
61. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
62. Tachibana, K., et al., *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 591-4.
63. Rebel, V.I., et al., *Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14789-94.
64. Kollet, O., A. Dar, and T. Lapidot, *The multiple roles of osteoclasts in host defense: bone remodeling and hematopoietic stem cell mobilization*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 51-69.
65. Ara, T., et al., *Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 257-67.
66. Avecilla, S.T., et al., *Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 64-71.
67. Rossi, L., et al., *Less is more: unveiling the functional core of hematopoietic stem cells through knockout mice*. Cell Stem Cell, 2012. **11**(3): p. 302-17.
68. Brenet, F., et al., *TGFbeta restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy*. J Exp Med, 2013. **210**(3): p. 623-39.
69. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
70. Blank, U., et al., *Smad7 promotes self-renewal of hematopoietic stem cells*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4246-54.
71. Yamazaki, S., et al., *Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells*. Embo j, 2006. **25**(15): p. 3515-23.
72. Yamazaki, S., et al., *TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation*. Blood, 2009. **113**(6): p. 1250-6.
73. Yamazaki, S., et al., *Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche*. Cell, 2011. **147**(5): p. 1146-58.
74. Karlsson, G., et al., *Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 467-74.
75. Gordon, K.J. and G.C. Blobe, *Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(4): p. 197-228.

76. Rao, T.P. and M. Kuhl, *An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more*. *Circ Res*, 2010. **106**(12): p. 1798-806.
77. Peifer, M. and P. Polakis, *Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus*. *Science*, 2000. **287**(5458): p. 1606-9.
78. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: p. 781-810.
79. Woll, P.S., et al., *Wnt signaling promotes hemat endothelial cell development from human embryonic stem cells*. *Blood*, 2008. **111**(1): p. 122-31.
80. Kaldis, P. and M. Pagano, *Wnt signaling in mitosis*. *Dev Cell*, 2009. **17**(6): p. 749-50.
81. Nygren, M.K., et al., *Wnt3A activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines*. *Br J Haematol*, 2007. **136**(3): p. 400-13.
82. Willert, K. and K.A. Jones, *Wnt signaling: is the party in the nucleus?* *Genes Dev*, 2006. **20**(11): p. 1394-404.
83. Fleming, H.E., et al., *Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(3): p. 274-83.
84. Zhao, C., et al., *Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(6): p. 528-41.
85. Scheller, M., et al., *Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(10): p. 1037-47.
86. Kirstetter, P., et al., *Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(10): p. 1048-56.
87. Sugimura, R., et al., *Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche*. *Cell*, 2012. **150**(2): p. 351-65.
88. Abrahamsson, A.E., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta missplicing contributes to leukemia stem cell generation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(10): p. 3925-9.
89. Muller-Tidow, C., et al., *Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(7): p. 2890-904.
90. Wang, Y., et al., *The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML*. *Science*, 2010. **327**(5973): p. 1650-3.
91. Grandori, C., et al., *The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. **16**: p. 653-99.
92. Baudino, T.A. and J.L. Cleveland, *The Max network gone mad*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(3): p. 691-702.
93. Dang, C.V., *c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(1): p. 1-11.
94. Bernard, S. and M. Eilers, *Control of cell proliferation and growth by Myc proteins*. *Results Probl Cell Differ*, 2006. **42**: p. 329-42.

95. Pelengaris, S., M. Khan, and G.I. Evan, *Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression*. Cell, 2002. **109**(3): p. 321-34.
96. Dang, C.V., et al., *The c-Myc target gene network*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(4): p. 253-64.
97. Meyer, N. and L.Z. Penn, *Reflecting on 25 years with MYC*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 976-90.
98. Boxer, L.M. and C.V. Dang, *Translocations involving c-myc and c-myc function*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5595-610.
99. Liu, J. and D. Levens, *Making myc*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **302**: p. 1-32.
100. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
101. Nilsson, J.A. and J.L. Cleveland, *Myc pathways provoking cell suicide and cancer*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9007-21.
102. Davis, A.C., et al., *A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice*. Genes Dev, 1993. **7**(4): p. 671-82.
103. Baudino, T.A., et al., *c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression*. Genes Dev, 2002. **16**(19): p. 2530-43.
104. Ben-Porath, I., et al., *An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 499-507.
105. Kim, J., et al., *An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells*. Cell, 2008. **132**(6): p. 1049-61.
106. Wong, D.J., et al., *Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(4): p. 333-44.
107. Knoepfler, P.S., *Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(1): p. 18-21.
108. Walkley, C.R., et al., *A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1097-110.
109. Renstrom, J., et al., *How the niche regulates hematopoietic stem cells*. Chem Biol Interact, 2010. **184**(1-2): p. 7-15.
110. Raaijmakers, M.H., et al., *Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia*. Nature, 2010. **464**(7290): p. 852-7.
111. Kode, A., et al., *Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts*. Nature, 2014. **506**(7487): p. 240-4.
112. Ratajczak, M.Z., K. Serwin, and G. Schneider, *Innate immunity derived factors as external modulators of the CXCL12-CXCR4 axis and their role in stem cell homing and mobilization*. Theranostics, 2013. **3**(1): p. 3-10.
113. Zlotnik, A., *Chemokines and cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(9): p. 2026-9.
114. Balkwill, F., *The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(3): p. 171-9.

115. Ara, T., et al., *A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4649-55.
116. Burger, J.A. and A. Peled, *CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 43-52.
117. Cojoc, M., et al., *Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis*. Onco Targets Ther, 2013. **6**: p. 1347-61.
118. Spoo, A.C., et al., *CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia*. Blood, 2007. **109**(2): p. 786-91.
119. Burger, J.A. and T.J. Kipps, *CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1761-7.
120. Busillo, J.M. and J.L. Benovic, *Regulation of CXCR4 signaling*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(4): p. 952-63.
121. Burger, J.A., et al., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2655-63.
122. Damiano, J.S., et al., *Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1658-67.
123. Lane, S.W., D.T. Scadden, and D.G. Gilliland, *The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities*. Blood, 2009. **114**(6): p. 1150-7.
124. Colmone, A., et al., *Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1861-5.
125. Lutzny, G., et al., *Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo*. Cancer Cell, 2013. **23**(1): p. 77-92.
126. Campo, E., et al., *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications*. Blood, 2011. **117**(19): p. 5019-32.
127. Vannucchi, A.M., P. Guglielmelli, and A. Tefferi, *Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(3): p. 171-91.
128. Cozzio, A., et al., *Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3029-35.
129. Krivtsov, A.V., et al., *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 818-22.
130. Huntly, B.J., et al., *MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors*. Cancer Cell, 2004. **6**(6): p. 587-96.
131. Small, D., *FLT3 mutations: biology and treatment*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 178-84.
132. Lutz, C., et al., *Identifying leukemia stem cells--is it feasible and does it matter?* Cancer Lett, 2013. **338**(1): p. 10-4.

133. Doan, P.L. and J.P. Chute, *The vascular niche: home for normal and malignant hematopoietic stem cells*. *Leukemia*, 2012. **26**(1): p. 54-62.
134. Konopleva, M.Y. and C.T. Jordan, *Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(5): p. 591-9.
135. Kremer, K.N., et al., *Osteoblasts protect AML cells from SDF-1-induced apoptosis*. *J Cell Biochem*, 2014. **115**(6): p. 1128-37.
136. Mannelli, F., et al., *CXCR4 expression accounts for clinical phenotype and outcome in acute myeloid leukemia*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014.
137. Oster, S.K., et al., *The myc oncogene: Marvelously Complex*. *Adv Cancer Res*, 2002. **84**: p. 81-154.
138. Greenberger, J.S., et al., *Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(10): p. 2931-5.
139. Oostendorp, R.A., et al., *Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity*. *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1183-9.
140. Littlefield, J.W., *NIH 3T3 cell line*. *Science*, 1982. **218**(4569): p. 214-6.
141. Pear, W.S., et al., *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(18): p. 8392-6.
142. Matsuoka, Y., et al., *Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1967. **125**(4): p. 1246-50.
143. Chang, H., et al., *p53 mutations, c-myc and bcl-2 rearrangements in human non-Hodgkin's lymphoma cell lines*. *Leuk Lymphoma*, 1995. **19**(1-2): p. 165-71.
144. Epstein, A.L., et al., *Biology of the human malignant lymphomas. IV. Functional characterization of ten diffuse histiocytic lymphoma cell lines*. *Cancer*, 1978. **42**(5): p. 2379-91.
145. Nadkarni, J.S., et al., *Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas*. *Cancer*, 1969. **23**(1): p. 64-79.
146. Klein, E., et al., *Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines*. *Cancer Res*, 1968. **28**(7): p. 1300-10.
147. Pulvertaft, J.V., *CYTOLOGY OF BURKITT'S TUMOUR (AFRICAN LYMPHOMA)*. *Lancet*, 1964. **1**(7327): p. 238-40.
148. Lange, B., et al., *Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines*. *Blood*, 1987. **70**(1): p. 192-9.
149. Quentmeier, H., et al., *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines*. *Leukemia*, 2003. **17**(1): p. 120-4.
150. Matsuo, Y., et al., *Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)*. *Leukemia*, 1997. **11**(9): p. 1469-77.
151. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. *Int J Cancer*, 1980. **26**(2): p. 171-6.

152. Littlewood, T.D., et al., *A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(10): p. 1686-90.
153. Miller, D.G., M.A. Adam, and A.D. Miller, *Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4239-42.
154. Lerner, C. and D.E. Harrison, *5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation*. Exp Hematol, 1990. **18**(2): p. 114-8.
155. Van Zant, G., *Studies of hematopoietic stem cells spared by 5-fluorouracil*. J Exp Med, 1984. **159**(3): p. 679-90.
156. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
157. Smyth, G.K., *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004. **3**: p. Article3.
158. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. Journal of the Royal Statistical Society Series B Methodological 1995. **57**: p. 289–300
159. Kamburov, A., et al., *The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D793-800.
160. Kanehisa, M., et al., *KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D109-14.
161. Milacic, M., et al., *Annotating cancer variants and anti-cancer therapeutics in reactome*. Cancers (Basel), 2012. **4**(4): p. 1180-211.
162. Kelder, T., et al., *WikiPathways: building research communities on biological pathways*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D1301-7.
163. Kandasamy, K., et al., *NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways*. Genome Biol, 2010. **11**(1): p. R3.
164. Luo, H., et al., *c-Myc rapidly induces acute myeloid leukemia in mice without evidence of lymphoma-associated antiapoptotic mutations*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2452-61.
165. Kratzat, S., et al., *Cks1 is required for tumor cell proliferation but not sufficient to induce hematopoietic malignancies*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37433.
166. Blyth, K., et al., *Sensitivity to myc-induced apoptosis is retained in spontaneous and transplanted lymphomas of CD2-mycER mice*. Oncogene, 2000. **19**(6): p. 773-82.
167. Pratt, W.B., *Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts*. Mol Cell Endocrinol, 1990. **74**(1): p. C69-76.
168. Whitfield, J., T. Littlewood, and L. Soucek, *Tamoxifen administration to mice*. Cold Spring Harb Protoc, 2015. **2015**(3): p. 269-71.
169. Bello-Fernandez, C., G. Packham, and J.L. Cleveland, *The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7804-8.

170. Bush, A., et al., *c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed c-Myc targets*. Genes Dev, 1998. **12**(24): p. 3797-802.
171. Nakamura, Y., et al., *Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells*. Blood, 2010. **116**(9): p. 1422-32.
172. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
173. Seitz, V., et al., *Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e26837.
174. Schuhmacher, M., et al., *Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division*. Curr Biol, 1999. **9**(21): p. 1255-8.
175. Harris, A.W., et al., *The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells*. J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 353-71.
176. Nieborowska-Skorska, M., et al., *Rac2-MRC-cll-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors*. Blood, 2012. **119**(18): p. 4253-63.
177. Wisdom, R., R.S. Johnson, and C. Moore, *c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms*. Embo j, 1999. **18**(1): p. 188-97.
178. Schreiber, M., et al., *Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent*. Genes Dev, 1999. **13**(5): p. 607-19.
179. Vleugel, M.M., et al., *c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer*. Hum Pathol, 2006. **37**(6): p. 668-74.
180. Eferl, R., et al., *Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53*. Cell, 2003. **112**(2): p. 181-92.
181. Sanchez-Aguilera, A., et al., *Estrogen signaling selectively induces apoptosis of hematopoietic progenitors and myeloid neoplasms without harming steady-state hematopoiesis*. Cell Stem Cell, 2014. **15**(6): p. 791-804.
182. Kunisaki, Y., et al., *Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence*. Nature, 2013. **502**(7473): p. 637-+.
183. Jakob, C., et al., *Angiogenesis in multiple myeloma*. Eur J Cancer, 2006. **42**(11): p. 1581-90.
184. Puca, A., G. Russo, and A. Giordano, *Properties of mechano-transduction via simulated microgravity and its effects on intracellular trafficking of VEGFR's*. Oncotarget, 2012. **3**(4): p. 426-34.
185. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2003-12.
186. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
187. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
188. Niedergang, F. and P. Chavrier, *Regulation of phagocytosis by Rho GTPases*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **291**: p. 43-60.

-
189. Narumiya, S. and S. Yasuda, *Rho GTPases in animal cell mitosis*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(2): p. 199-205.
 190. Alsayed, Y., et al., *Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2708-17.
 191. Moriuchi, M., et al., *USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5986-92.
 192. Shrivastava, A., et al., *Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1889-92.
 193. Shrivastava, A., et al., *YY1 and c-Myc associate in vivo in a manner that depends on c-Myc levels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10638-41.
 194. Zhao, J.H., et al., *Direct association of YY-1 with c-Myc and the E-box binding protein in regulation of glycophorin gene expression*. Oncogene, 1998. **17**(8): p. 1009-17.
 195. Hasegawa, A., et al., *Transcriptional down-regulation of CXC chemokine receptor 4 induced by impaired association of transcription regulator YY1 with c-Myc in human herpesvirus 6-infected cells*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1125-31.

7 Abkürzungsverzeichnis

µg	10 ⁻⁶ Gramm
µl	10 ⁻⁶ Liter
µM (µmol/l)	10 ⁻⁶ Mol/Liter
µmol	10 ⁻⁶ Mol
4-HT	4-Hydroxytamoxifen
5-FU	5-Fluoruracil
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
BBMM	Basales Knochenmarkmedium (<i>basal bone marrow medium</i>)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin, Celsius
CAD	<i>carbamoyl-phosphate synthetase 2</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFU	<i>Colony forming unit</i>
c-Kit	Stammzellfaktorrezeptor
CLP	Gemeinsamer lymphoider Vorläufer (<i>common lymphoid progenitor</i>)
cm	Zentimeter
CMP	Gemeinsamer myeloider Vorläufer (<i>common myeloid progenitor</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCR	CXC-Motiv-Rezeptor
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EC	Endothelzellen (<i>endothelial cells</i>)

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediamintetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethyleneglycoltetraacetic acid</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FS	<i>forward scatter</i>
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage colony stimulating factor</i>
GMP	Granulozyten-Monozyten-Vorläufer (<i>granulocyte-monocyte-progenitor</i>)
Gy	Gray (1 Gy = 1 J/kg)
h	human, Stunde (<i>hour</i>)
HBSS	<i>Hank´s Buffered Salt Solution</i>
HCL	Salzsäure
H&E	Hämatoxylin Eosin
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonische Säure
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor-1alpha
HS	<i>horse serum</i>
HSC	hämatopoetische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
HSPC	Hämatopoetischen Stamm-/ Vorläuferzelle (<i>hematopoietic stem-/ progenitor cell</i>)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium</i>
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare

KCl ₂	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KM	Knochenmark
LB	Luria-Bertani
lin	Lineagemarker
log	logarithmisch
LSK	lin- Sca-1+ c-Kit+ Zelle
LT-HSC	Langlebige hämatopoetische Stammzelle (<i>long-term repopulating HSC</i>)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	murin
mA	Milliampere
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufer (<i>megakaryocyte-erythrocyte progenitor</i>)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MIG	MSCV-IRES-GFP
min	Minute
ml	Milliliter
mM	10 ⁻³ Mol/Liter
MPP	multipotenter Vorläufer (<i>multipotent progenitor</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	mesenchymale Stromazelle (<i>mesenchymal stroma cell</i>)
mSCF	muriner Stammzellfaktor (<i>murine stem cell factor</i>)
MSCV	<i>murine stem cell virus</i>
Myc	Myelocytomaosis Onkogen, c-Myc
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure (<i>Non-essential amino acid</i>)
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
nM	10 ⁻⁹ Mol/Liter
NP40	Tergitoltyp NP-40
OBC	Osteoblast (<i>osteoblastic cell</i>)
ODC	<i>ornithindecaboxylase</i>

p	Phosphorilierung
P/S	Penicillin/ Streptavidin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	peripheries Blut
PBS	<i>Dulbecco´s phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	pondus Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PLT	Bluttplättchen
PMSF	Phenylmethylysulphonylfluorid
PO	Erdnussöl (<i>peanut oil</i>)
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidifluorid
RBC	rote Blutzellen (<i>red blood cells</i>)
Rev	entgegengesetzt (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
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
RT-PCR	<i>Real Time PCR</i>
Sca-1	Stem cell antigen-1
SCF	Skp1-Cullin-F-box
SDF-1	<i>stroma cell derived factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
sek	Sekunde
SEM	Standardabweichung (<i>standard error of the mean</i>)
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SS	<i>side scatter</i>
ST-HSC	Kurzlebige hämatopoetische Stammzelle (<i>short-term repopulating HSC</i>)
Strep	Streptavidin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat Puffer

Tam	Tamoxifen
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
Ubi	Ubiquitin
WBC	weiße Blutzellen (white blood cells)
wt	Wildtyp
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
α	Alpha
β	Beta
β -Catenin	Beta-Catenin
λ	Gamma

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Hierarchischer Aufbau der Hämatopoese	4
Abbildung 2:	HSC Nischenmodell in der Maus	7
Abbildung 3:	Modell für die Regulation der Hämatopoese durch MYC-Überexpression	11
Abbildung 4:	Myc-Überexpression induziert eine myeloproliferative Erkrankung in Mäusen.	50
Abbildung 5:	Modell der Regulation von MycER.	52
Abbildung 6:	MycER kann in vitro aktiviert werden.	53
Abbildung 7:	MYC-Überexpression reguliert das Transkriptom von Stromazellen in vitro.	55
Abbildung 8:	Stabile Rekonstitution von konditionalem MycER-KM in Empfängermäusen.	57
Abbildung 9:	Die konditionale MYC-Aktivierung resultiert in einer Zielgenexpression in vivo.	59
Abbildung 10:	Langzeit-Aktivierung von MycER induziert eine myeloproliferative Erkrankung in den Mäusen.	62
Abbildung 11:	Analyse der KM-Mikroumgebung.	64
Abbildung 12:	MYC reguliert die Zusammensetzung der KM-Mikroumgebung.	66
Abbildung 13:	MYC verursacht transkriptionelle Änderungen in den EC der KM-Mikroumgebung.	70
Abbildung 14:	Die MYC- und CXCR4-Analyse in verschiedenen humanen Zelllinien zeigt keine Korrelation der Expression.	72
Abbildung 15:	MYC-Überexpression reguliert die Expression von CXCR4.	75
Abbildung 16:	Die MYC-Aktivierung in vivo zeigt eine stärkere CXCR4-Expression in Granulozyten und Monozyten.	77
Abbildung 17:	Modell der Interaktion von Myc exprimierenden Zellen und der Mikroumgebung.	85
Abbildung 18:	Modell des Mechanismus vom Zusammenhang von MYC- und CXCR4-Expression	87

9 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 Prof. Dr. Ulrich Keller für die Möglichkeit, dieses interessante Thema in seiner Forschungsgruppe zu bearbeiten.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Wester für die freundliche Bereitschaft, die Dissertation als Zeitprüfer zu betreuen.

Außerdem möchte ich Herrn PD Dr. Robert Oostendorp danken, der mich mit seinen kritischen und konstruktiven Einwänden immer wieder weitergebracht hat.

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 anzufertigen.

Allen Mitgliedern der AG Keller möchte ich für die gemeinsame Zeit, die freundliche Atmosphäre und ihre Hilfe 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.

Außerdem möchte ich allen danken, die für mich viel Zeit und Mühe geopfert haben, um (hoffentlich) all meine Fehler zu korrigieren. Das wäre vor allem Franziska Walz, Miriam Lenk und Doris und Christian Franke.

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 und mir Stärke und Rückhalt gegeben habt. Ich habe euch lieb.

10 Anhang: Genlisten Transkriptomanalysen

Tabelle A 1: Hochregulierte DEGs (signifikant ($p < 0.05$) differential (\log_2 fold change (FC) ≥ 1.0) exprimierte Gene) mit deren Symbol, Gennamen, und fold change zwischen peanut oil (PO) und Tamoxifen (Tam) behandelten isolierten KM-Proben.

Symbol	Gename	p-Wert	FC
Tesc	tescalcin	0,04400	2,57333
Fam129a	family with sequence similarity 129, member A	0,04315	2,16667
Ffar2	free fatty acid receptor 2	0,00521	1,90667
Arhgdib	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	0,01740	1,88000
Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1	0,04537	1,86000
Cotl1	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	0,00878	1,85667
Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	0,00783	1,82000
Pygl	liver glycogen phosphorylase	0,01824	1,75333
Slfn2	schlafen 2	0,00490	1,74000
Mgst2	microsomal glutathione S-transferase 2	0,02885	1,61000
Tgfb1	transforming growth factor, beta induced	0,04219	1,59000
Cotl1	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	0,00527	1,53667
Sh3bgrl3	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein-like 3	0,03733	1,52000
Laptm5	lysosomal-associated protein transmembrane 5	0,02015	1,40000
Coro1a	coronin, actin binding protein 1A	0,03980	1,37333
2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	0,03172	1,32333
Laptm5	lysosomal-associated protein transmembrane 5	0,00461	1,27667
Gfi1	growth factor independent 1	0,04728	1,26333
Atp2a3	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous	0,00725	1,21000
Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	0,00739	1,17667
Zfp46	zinc finger protein 46	0,02393	1,17333
Ms4a3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3	0,03504	1,17000
Fbxo36	F-box protein 36	0,04160	1,16333
Tmem51	transmembrane protein 51	0,04491	1,15667
Cgrrf1	cell growth regulator with ring finger domain 1	0,00298	1,13000
Rac2	RAS-related C3 botulinum substrate 2	0,04185	1,11667
Glrx	glutaredoxin	0,03923	1,11333
Gpi1	glucose phosphate isomerase 1	0,01920	1,07333
Apcdd1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	0,02157	1,05667
Eno1	enolase 1. alpha non-neuron	0,02763	1,04000
Ncf2	neutrophil cytosolic factor 2	0,04989	1,03667
Tgfb1	transforming growth factor, beta induced	0,04905	1,02333
Svs5	seminal vesicle secretory protein 5	0,01434	1,02000
Prdx5	peroxiredoxin 5	0,03071	1,00000

Tabelle A 2: Herrunterregulierte DEGs (signifikant ($p < 0.05$) differential (\log_2 fold change (FC) ≥ 1.0) expremierte Gene) mit deren Symbol, Gennamen, und fold change zwischen peanut oil (PO) und Tamoxifen (Tam) behandelten isolierten KM-Proben.

Symbol	Genname	p-Wert	FC
Cyr61	cysteine rich protein 61	0,03022	-3,44333
Son	Son DNA binding protein	0,03417	-3,12333
2010309G21Rik	RIKEN cDNA 2010309G21 gene	0,02091	-2,98333
Cyr61	cysteine rich protein 61	0,04818	-2,82667
Chd4	chromodomain helicase DNA binding protein 4	0,00353	-2,72000
Kmt2e	lysine (K)-specific methyltransferase 2E	0,02461	-2,71667
Ighm	immunoglobulin heavy constant mu	0,02630	-2,55000
Dcn	decorin	0,02404	-2,52333
Mlec	malectin	0,03708	-2,49000
Nktr	natural killer tumor recognition sequence	0,02509	-2,47667
Atp2b1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	0,00382	-2,35000
Sptbn1	spectrin beta, non-erythrocytic 1	0,01909	-2,28000
Xist	inactive X specific transcripts	0,00071	-2,25000
Asph	aspartate-beta-hydroxylase	0,01158	-2,25000
G3bp2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	0,01646	-2,23667
Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2	0,00546	-2,19000
Brd4	bromodomain containing 4	0,01224	-2,18000
Foxp1	forkhead box P1	0,02885	-2,16000
Klhl17	kelch-like 17	0,00920	-2,14667
Sbno1	sno, strawberry notch homolog 1 (Drosophila)	0,01937	-2,14667
Fus	fused in sarcoma	0,03340	-2,03000
Diap1	diaphanous homolog 1 (Drosophila)	0,00060	-1,96333
Dusp11	dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)	0,00060	-1,96000
Csnk2a2	casein kinase 2. alpha prime polypeptide	0,00269	-1,96000
Casp3	caspase 3	0,03293	-1,95333
Nfix	nuclear factor I/X	0,01536	-1,94667
Abcf1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	0,02804	-1,86667
Ptp4a2	protein tyrosine phosphatase 4a2	0,04394	-1,85333
Stt3b	STT3. subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog B (S. cerevisiae)	0,00147	-1,82333
Prdm2	PR domain containing 2. with ZNF domain	0,03479	-1,81000
Malat1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	0,00073	-1,80333
Hsp90ab1	heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	0,00300	-1,80000
Fkbp2	FK506 binding protein 2	0,02156	-1,80000
Atp2a2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	0,04075	-1,80000

1700100M05Rik	RIKEN cDNA 1700100M05 gene	0,01235	-1,78667
Celf1	CUGBP, Elav-like family member 1	0,01975	-1,78667
Ammecr1l	AMME chromosomal region gene 1-like	0,01309	-1,77000
Zzef1	zinc finger, ZZ-type with EF hand domain 1	0,00775	-1,75000
Vcp	valosin containing protein	0,02493	-1,75000
Scaf4	SR-related CTD-associated factor 4	0,00752	-1,74000
Oraov1	oral cancer overexpressed 1	0,00546	-1,72333
Nrp2	neuropilin 2	0,03201	-1,71667
Evi5	ecotropic viral integration site 5	0,00616	-1,71000
C78339	expressed sequence C78339	0,04843	-1,71000
AA415437	expressed sequence AA415437	0,03652	-1,70000
Lpin2	lipin 2	0,00571	-1,68667
Thoc2	THO complex 2	0,00006	-1,68333
Tsta3	tissue specific transplantation antigen P35B	0,04861	-1,67333
Pisd-ps3	phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	0,04594	-1,66667
Cp	ceruloplasmin	0,01610	-1,65667
H2-M3	histocompatibility 2. M region locus 3	0,02685	-1,65667
Srrm1	serine/arginine repetitive matrix 1	0,00457	-1,64333
Ermp1	endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	0,01092	-1,64333
Rab10	RAB10. member RAS oncogene family	0,00380	-1,61667
Eif2b2	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta	0,00426	-1,61333
Lmna	lamin A	0,03872	-1,60333
Hsp90aa1	heat shock protein 90. alpha (cytosolic), class A member 1	0,03162	-1,59667
Fam104a	family with sequence similarity 104. member A	0,03173	-1,58000
Usp10	ubiquitin specific peptidase 10	0,01414	-1,57333
Susd2	sushi domain containing 2	0,03972	-1,56333
Ehmt1	euchromatic histone methyltransferase 1	0,02611	-1,55333
Nfix	nuclear factor I/X	0,02429	-1,55000
Arhgef12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	0,00941	-1,53333
Celf1	CUGBP, Elav-like family member 1	0,02384	-1,51333
Snord104	small nucleolar RNA, C/D box 104	0,00485	-1,50333
Cbfa2t3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2. translocated to, 3 (human)	0,00562	-1,50000
Tor1aip2	torsin A interacting protein 2	0,02865	-1,50000
Ankrd11	ankyrin repeat domain 11	0,02503	-1,48667
1200014J11Rik	RIKEN cDNA 1200014J11 gene	0,02913	-1,48333
Comt	catechol-O-methyltransferase	0,04111	-1,48333
Irf3	interferon regulatory factor 3	0,04617	-1,47333
Limd1	LIM domains containing 1	0,04774	-1,47333
Rrp36	ribosomal RNA processing 36 homolog (S. cerevisiae)	0,02007	-1,45000
Ccar1	cell division cycle and apoptosis regulator 1	0,03061	-1,45000

Atxn2	ataxin 2	0,02865	-1,44333
Zcchc3	zinc finger, CCHC domain containing 3	0,02949	-1,43667
Tmem41b	transmembrane protein 41B	0,00108	-1,41667
Snrnp70	small nuclear ribonucleoprotein 70 (U1)	0,01810	-1,41667
Map2k2	mitogen-activated protein kinase kinase 2	0,03163	-1,41333
Mtdh	metadherin	0,00649	-1,40667
Sf3b2	splicing factor 3b, subunit 2	0,01448	-1,40333
Trpm7	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	0,03309	-1,40000
Vegfc	vascular endothelial growth factor C	0,02911	-1,39667
Grem1	gremlin 1	0,04150	-1,39000
Sdc4	syndecan 4	0,00401	-1,37333
BC023829	cDNA sequence BC023829	0,01503	-1,37333
Ttc28	tetratricopeptide repeat domain 28	0,03465	-1,37333
1600020E01Rik	RIKEN cDNA 1600020E01 gene	0,04051	-1,37333
Hectd1	HECT domain containing 1	0,00662	-1,37000
Map3k5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	0,03119	-1,35667
Tmem41b	transmembrane protein 41B	0,00014	-1,35333
Dancr	differentiation antagonizing non-protein coding RNA	0,01597	-1,35333
Rnf26	ring finger protein 26	0,04024	-1,35333
Tor1b	torsin family 1. member B	0,01521	-1,34000
Glg1	golgi apparatus protein 1	0,01951	-1,34000
Ep400	E1A binding protein p400	0,04312	-1,32333
Med13l	mediator complex subunit 13-like	0,00730	-1,32000
5430434G16Rik	RIKEN cDNA 5430434G16 gene	0,04009	-1,30667
Wipi1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	0,03506	-1,30333
Lpcat1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	0,02074	-1,30000
Chd4	chromodomain helicase DNA binding protein 4	0,01293	-1,29667
Rrp1b	ribosomal RNA processing 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	0,03321	-1,29333
Smc6	structural maintenance of chromosomes 6	0,02523	-1,28667
Prrc2c	proline-rich coiled-coil 2C	0,00690	-1,28333
Cnn3	calponin 3. acidic	0,01637	-1,28000
Scarb1	scavenger receptor class B, member 1	0,02153	-1,27667
Steap3	STEAP family member 3	0,02956	-1,27667
C730029A08Rik	RIKEN cDNA C730029A08 gene	0,03873	-1,27667
AI480624	expressed sequence AI480624	0,01217	-1,27333
Ppp1r16a	protein phosphatase 1. regulatory (inhibitor) subunit 16A	0,04064	-1,27333
Atxn7l3b	ataxin 7-like 3B	0,03147	-1,27000
Ncor1	nuclear receptor co-repressor 1	0,01222	-1,26333
Gltp	glycolipid transfer protein	0,01798	-1,26000
Map4	microtubule-associated protein 4	0,04048	-1,25667
Whsc1l1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (human)	0,02880	-1,25333

Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1	0,04475	-1,25333
Ralbp1	ralA binding protein 1	0,01326	-1,25000
Phf3	PHD finger protein 3	0,04037	-1,25000
Atp8a1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1	0,02148	-1,24667
Hps1	Hermansky-Pudlak syndrome 1 homolog (human)	0,03075	-1,24333
Cryzl1	crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1	0,03363	-1,24000
Zcrb1	zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1	0,04278	-1,24000
Ermp1	endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	0,03136	-1,23333
Tbl2	transducin (beta)-like 2	0,04373	-1,23000
Baz2a	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A	0,01985	-1,22667
Idua	iduronidase, alpha-L-	0,00868	-1,22333
Rnf6	ring finger protein (C3H2C3 type) 6	0,01319	-1,22333
Scaf4	SR-related CTD-associated factor 4	0,00006	-1,21333
Dusp19	dual specificity phosphatase 19	0,00945	-1,21000
Vezf1	vascular endothelial zinc finger 1	0,00666	-1,20667
Atp13a1	ATPase type 13A1	0,03119	-1,18667
Kdm5b	lysine (K)-specific demethylase 5B	0,02000	-1,18333
Sp1	trans-acting transcription factor 1	0,03100	-1,18333
Bfar	bifunctional apoptosis regulator	0,03020	-1,18000
Dpagt1	dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) acetylglucosaminophosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)	0,03196	-1,18000
Tnrc18	trinucleotide repeat containing 18	0,01847	-1,17333
Mrpl38	mitochondrial ribosomal protein L38	0,00779	-1,17000
Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	0,00908	-1,17000
Rbm25	RNA binding motif protein 25	0,02906	-1,17000
Dtx2	deltex 2 homolog (Drosophila)	0,04380	-1,17000
Rexo4	REX4. RNA exonuclease 4 homolog (S. cerevisiae)	0,03339	-1,16333
6330416G13Rik	RIKEN cDNA 6330416G13 gene	0,01263	-1,16000
Ppox	protoporphyrinogen oxidase	0,04869	-1,15667
Rnf166	ring finger protein 166	0,01181	-1,15333
Atxn7l3b	ataxin 7-like 3B	0,01754	-1,15333
Slc19a1	solute carrier family 19 (folate transporter), member 1	0,04752	-1,14000
Urgcp	upregulator of cell proliferation	0,01356	-1,13667
Mgat1	mannoside acetylglucosaminyltransferase 1	0,02586	-1,13333
Dnajc3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	0,00031	-1,13000
Hsp90b1	heat shock protein 90. beta (Grp94), member 1	0,00039	-1,13000
Tchp	trichoplein, keratin filament binding	0,01933	-1,12667
Chmp7	charged multivesicular body protein 7	0,02450	-1,12667
Tmem167	transmembrane protein 167	0,03701	-1,12667
Zfp445	zinc finger protein 445	0,00258	-1,12333
Synj1	synaptojanin 1	0,00019	-1,11000

Rhob	ras homolog gene family, member B	0,04246	-1,11000
Psm11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	0,00123	-1,10333
Usp40	ubiquitin specific peptidase 40	0,01008	-1,10333
Wars	tryptophanyl-tRNA synthetase	0,03170	-1,10333
Nedd4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	0,03961	-1,09667
Arhgap19	Rho GTPase activating protein 19	0,00730	-1,09333
Ago3	argonaute RISC catalytic subunit 3	0,02144	-1,09000
Yeats2	YEATS domain containing 2	0,04608	-1,08667
Rab10	RAB10. member RAS oncogene family	0,00009	-1,08333
Uckl1	uridine-cytidine kinase 1-like 1	0,00712	-1,08000
Nisch	nischarin	0,03075	-1,08000
Mettl1	methyltransferase like 1	0,01822	-1,07667
Tcf25	transcription factor 25 (basic helix-loop-helix)	0,01151	-1,07333
Arih2	ariadne homolog 2 (Drosophila)	0,01746	-1,07333
Yy1	YY1 transcription factor	0,04336	-1,07333
Fads1	fatty acid desaturase 1	0,01717	-1,06667
Polg	polymerase (DNA directed), gamma	0,00164	-1,06333
Pigo	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O	0,04172	-1,06333
Luc7l3	LUC7-like 3 (S. cerevisiae)	0,01453	-1,06000
Sec62	SEC62 homolog (S. cerevisiae)	0,01846	-1,05667
Kdm6a	lysine (K)-specific demethylase 6A	0,04892	-1,05667
Ptpn3	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	0,03997	-1,05000
Fam132a	family with sequence similarity 132. member A	0,04508	-1,05000
Larp7	La ribonucleoprotein domain family, member 7	0,03798	-1,04667
Ccn1	cyclin L1	0,00382	-1,04333
Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	0,02295	-1,04333
Masp1	mannan-binding lectin serine peptidase 1	0,02341	-1,03000
Pigq	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q	0,02982	-1,03000
Eif2s2	eukaryotic translation initiation factor 2. subunit 2 (beta)	0,03403	-1,03000
Nif3l1	Ngg1 interacting factor 3-like 1 (S. pombe)	0,02803	-1,02667
Kmt2c	lysine (K)-specific methyltransferase 2C	0,03487	-1,02333
Egln2	EGL nine homolog 2 (C. elegans)	0,02450	-1,02000
Hras1	Harvey rat sarcoma virus oncogene 1	0,01771	-1,01000
Rnf126	ring finger protein 126	0,04235	-1,01000
Zfp692	zinc finger protein 692	0,00780	-1,00667
Sass6	spindle assembly 6 homolog (C. elegans)	0,01174	-1,00667
LOC100505027	uncharacterized LOC100505027	0,01456	-1,00667
Sacm1l	SAC1 (suppressor of actin mutations 1. homolog)-like (S. cerevisiae)	0,02778	-1,00667
Lrp10	low-density lipoprotein receptor-related protein 10	0,03175	-1,00667

Tabelle A 3: Enriched Signalwege

Signalweg	p-Wert	DEGs innerhalb des Signalwegs
Reduction of cytosolic Ca ⁺⁺ levels	0,00049	ATP2B1;ATP2A2;ATP2A3
Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2	0,00075	HRAS;NEDD4;HSP90AB1;MAP2K2;VEGFC;HSP90AA1;NRP2
Hypoxic and oxygen homeostasis regulation of HIF-1-alpha	0,00157	EGLN2;SP1;ENO1;HSP90AA1;CP;PGK1
Signaling by GPCR	0,00200	ARHGEF12;RAC2;HRAS;MAP2K2;HSP90AA1;FFAR2;RHOB
Platelet calcium homeostasis	0,00243	ATP2B1;HSP90AA1;MAP2K2;ATP2A2;ATP2A3
calcium transport I	0,00263	ATP2A2;ATP2A3
GPCR downstream signaling	0,00283	ARHGEF12;RAC2;MAP2K2;HSP90AA1;FFAR2;RHOB
role of mal in rho-mediated activation of srf	0,00411	MAP2K2;HRAS;DIAPH1
Ion transport by P-type ATPases	0,00453	ATP2B1;ATP8A1;ATP2A2;ATP2A3
d4gdi signaling pathway	0,00539	ARHGDIB;CASP3
Semaphorin interactions	0,00557	HSP90AB1;RHOB;ARHGEF12;RAC2;HSP90AA1
Estrogen signaling pathway - Homo sapiens (human)	0,00619	SP1;HRAS;HSP90B1;HSP90AB1;MAP2K2;HSP90AA1
Protein processing in endoplasmic reticulum - Homo sapiens (human)	0,00649	VCP;HSP90B1;DNAJC3;HSP90AB1;SEC62;HSP90AA1;STT3B;MAP3K5
glycolysis	0,00695	ENO1;GPI;PGK1
caspase cascade in apoptosis	0,00695	LMNA;ARHGDIB;CASP3
Cross-presentation of particulate exogenous antigens (phagosomes)	0,00711	NCF2;NCF1
Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse	0,00780	RHOB;ARHGEF12;RAC2
gluconeogenesis	0,00780	ENO1;GPI;PGK1
RalA downstream regulated genes	0,00905	RAC2;RALBP1
RAF/MAP kinase cascade	0,01119	MAP2K2;HRAS
VEGF ligand-receptor interactions	0,01119	NRP2;VEGFC
VEGF and VEGFR signaling network	0,01119	NRP2;VEGFC
hiv-1 nef: negative effector of fas and tnf	0,01198	LMNA;ARHGDIB;CASP3;MAP3K5
keratinocyte	0,01198	MAP2K2;SP1;HRAS;MAP3K5

differentiation		
regulation of splicing through sam68	0,01353	MAP2K2;HRAS
Signaling by VEGF	0,01353	NRP2;VEGFC
Sema4D in semaphorin signaling	0,01419	RHOB;ARHGEF12;RAC2
fmlp induced chemokine gene expression in hmc-1 cells	0,01419	NCF2;HRAS;MAP2K2
Antigen processing-Cross presentation	0,01419	NCF2;NCF1;HLA-G
Signaling by Rho GTPases	0,01506	ARHGEF12;RAC2;RALBP1;ARHGDIB;RHOB;ARHGAP19
Rho GTPase cycle	0,01506	ARHGEF12;RAC2;RALBP1;ARHGDIB;RHOB;ARHGAP19
mapkinase signaling pathway	0,01528	MAP2K2;SP1;HRAS;MAP3K5
Cardiovascular Gene	0,01555	NCF2;NCF1;FOXP1;YY1;ATP2A2;PRDX5; HLA-G;HSP90B1;MGST2;PPOX;DPAGT1;EIF2B2; NCOR1;ANKRD11;DCN;MGAT1;GPAM;ABCF1;ASPH; MAP3K5;HSP90AB1;ARHGDIB;VEZF1;LPCAT1;EIF2S2; LRP10;IDUA;GREM1;SP1;EVI5;COMT;WARS;FADS1; PIGQ;TBL2;VEGFC;TGFB1;ATP2B1;LMNA;CP;CSNK2A2; NRP2;IRF3;POLG;SBNO1;CASP3;CNN3;MAP2K2; MED13L;SCARB1;SDC4;PIGO;HSP90AA1;PTPN3; SLC19A1
Prostate cancer - Homo sapiens (human)	0,01583	HSP90AB1;HSP90AA1;HRAS;HSP90B1;MAP2K2
L-dopa degradation	0,01651	COMT
L-dopa degradation - 11	0,01651	COMT
rho cell motility signaling pathway	0,01681	NCF2;DIAPH1;RALBP1
EGF-EGFR Signaling Pathway	0,01739	RALBP1;SP1;HRAS;NEDD4;MAP2K2;SYNJ1;ATXN2
MEK activation	0,01877	MAP2K2;HRAS
RAF phosphorylates MEK	0,01877	MAP2K2;HRAS
colanic acid building blocks biosynthesis	0,01877	TSTA3;GPI
RAF activation	0,01877	MAP2K2;HRAS
SREBP signalling	0,01910	SP1;SCARB1;GPAM;YY1
ErbB4 signaling events	0,01969	NEDD4;NCOR1;CBFA2T3
HIF-2-alpha transcription factor network	0,01969	SP1;EGLN2;PGK1
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	0,01969	MAP2K2;CASP3;MAP3K5
HGF	0,01969	MAP2K2;HRAS;RAC2
melanocyte development and pigmentation pathway	0,02167	MAP2K2;HRAS
GRB2 events in EGFR signaling	0,02167	MAP2K2;HRAS

Oncostatin M Signaling Pathway	0,02232	MAP2K2;HRAS;CYR61;CASP3
AGE-RAGE pathway	0,02346	SP1;NCF1;CASP3;DIAPH1
CDC42 signaling events	0,02444	NCF2;NCF1;CYR61;DIAPH1;RALBP1;HRAS;ARHGEF12; ARHGDI
Regulation of CDC42 activity	0,02444	NCF2;NCF1;CYR61;DIAPH1;RALBP1;HRAS;ARHGEF12; ARHGDI
FAS pathway and Stress induction of HSP regulation	0,02448	LMNA;ARHGDI;CASP3
trefoil factors initiate mucosal healing	0,02448	MAP2K2;HRAS;CASP3
HIF-1-alpha transcription factor network	0,02464	SP1;CP;ENO1;PGK1
Fanconi-bickel syndrome	0,02473	ENO1;GPI
SHC1 events in EGFR signaling	0,02473	MAP2K2;HRAS
Glycogenesis, Type VII. Tarui disease	0,02473	ENO1;GPI
Cori Cycle	0,02473	GPI;PGK1
phosphorylation of mek1 by cdk5/p35 down regulates the map kinase pathway	0,02473	MAP2K2;HRAS
Sema3A PAK dependent Axon repulsion	0,02796	HSP90AB1;HSP90AA1
double stranded rna induced gene expression	0,02796	EIF2S2;DNAJC3
Regulation of RAC1 activity	0,02900	NCF2;ARHGEF12;CYR61;DIAPH1;RALBP1;NCF1; ARHGDI
Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	0,02985	HSP90AA1;SCARB1;HSP90B1
Regulation of RhoA activity	0,03055	NCF2;ARHGEF12;CYR61;DIAPH1;RALBP1;NCF1; ARHGDI
C-MYC pathway	0,03120	GPAM;GFI1;SP1;ENO1;HSP90AA1;MTDH
hypoxia-inducible factor in the cardiovascular system	0,03135	HSP90AA1;ASPH
MAP kinase cascade	0,03135	MAP2K2;HRAS
Bisphosphonate Pathway, Pharmacodynamics	0,03135	HRAS;RAC2
cadmium induces dna synthesis and proliferation in macrophages	0,03135	MAP2K2;HRAS
human cytomegalovirus and map kinase pathways	0,03135	SP1;MAP2K2
N-Glycan biosynthesis	0,03177	STT3B;DPAGT1;MGAT1

ascorbate recycling (cytosolic)	0,03275	GLRX
GDP-L-fucose biosynthesis I (from GDP-D-mannose)	0,03275	TSTA3
RAC1 signaling pathway	0,03298	NCF2;ARHGEF12;CYR61;DIAPH1;RALBP1;NCF1; ARHGDIB
SHC-related events triggered by IGF1R	0,03489	MAP2K2;HRAS
Mucopolysaccharidosis VI. Sly syndrome	0,03489	PYGL;GPI
Glycogenosis, Type III. Cori disease, Debrancher glycogenosis	0,03489	PYGL;GPI
Metabolism of folate and pterines	0,03489	COMT;SLC19A1
tnfr1 signaling pathway	0,03489	LMNA;CASP3
Glycogenosis, Type IV. Amylopectinosis, Anderson disease	0,03489	PYGL;GPI
Glycogenosis, Type VI. Hers disease	0,03489	PYGL;GPI
Glycogen synthetase deficiency	0,03489	PYGL;GPI
Starch and Sucrose Metabolism	0,03489	PYGL;GPI
Sucrase-isomaltase deficiency	0,03489	PYGL;GPI
Beta3 integrin cell surface interactions	0,03579	CYR61;SDC4;TGFB1
Triglyceride Biosynthesis	0,03579	GPAM;LPIN2;LPCAT1
GPCR ligand binding	0,03671	FFAR2;HSP90AA1;MAP2K2
nfat and hypertrophy of the heart	0,03789	HRAS;ATP2A2;ATP2A3
Glycolysis Gluconeogenesis	0,03789	ENO1;GPI;PGK1
RAGE	0,03789	MAP2K2;HRAS;NCF1
Signaling by constitutively active EGFR	0,03858	HSP90AA1;HRAS
RhoA signaling pathway	0,03914	NCF2;ARHGEF12;CYR61;DIAPH1;RALBP1;NCF1; ARHGDIB
conversion of glucose to acetyl CoA and entry into the TCA cycle	0,04006	ENO1;GPI;PGK1
Axon guidance	0,04427	ARHGEF12;RAC2;HRAS;HSP90AB1;MAP2K2; HSP90AA1;RHOB; CSNK2A2;NRP2
HS-GAG degradation	0,04638	SDC4;IDUA
Signaling by Leptin	0,04638	MAP2K2;HRAS
SOS-mediated signalling	0,04638	MAP2K2;HRAS

sprouty regulation of tyrosine kinase signals	0,04638	MAP2K2;HRAS
ras signaling pathway	0,04638	HRAS;RALBP1
NGF	0,04638	MAP2K2;HRAS
SHC1 events in ERBB4 signaling	0,04638	MAP2K2;HRAS
Grb2 events in EGFR signaling	0,04638	MAP2K2;HRAS
N-Glycan biosynthesis - Homo sapiens (human)	0,04693	STT3B;DPAGT1;MGAT1
AndrogenReceptor	0,04702	CASP3;SP1;HSP90B1;RNF6;HSP90AA1;NCOR1
Enzymatic degradation of Dopamine by monoamine oxidase	0,04873	COMT
Enzymatic degradation of dopamine by COMT	0,04873	COMT
dopamine degradation - 11	0,04873	COMT
anthrax toxin mechanism of action	0,04873	MAP2K2
Synthesis of PIPs at the ER membrane	0,04873	SACM1L
glutathione redox reactions II	0,04873	GLRX
Chondroitin sulfate/dermatan sulfate metabolism	0,04934	DCN;SDC4;IDUA
Developmental Biology	0,04997	ARHGEF12;RAC2;MED13L;HRAS;HSP90AB1;MAP2K2;NRP2;HSP90AA1;RHOB;CSNK2A2;NCOR1