

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie der
GSF in Großhadern, der
Ludwig-Maximilians-Universität

Vorstand: Prof G.W. Bornkamm

**Regulation von Teilungswahrscheinlichkeit und Zellzyklusdauer
durch das Onkoprotein c-Myc**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Hölzel

aus

München

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

1. Berichterstatter: Prof. W. Hörz

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. R. Huss

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. Nelson
Prof. M. Schleicher

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. D. Eick

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	c-Myc wird in humanen Neoplasien vermehrt exprimiert.....	1
1.2	c-Myc induziert Tumore in transgenen Mäusen.....	2
1.3	Das c-Myc Onkoprotein.....	3
1.3.1	Das c-myc Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor.....	3
1.3.2	Biologische Funktionen von c-Myc.....	5
1.3.3	c-Myc-regulierte Zielgene.....	5
1.3.4	c-Myc und der Zellzyklus.....	8
1.4	Stand der Forschung - Die c-myc ^{-/-} Zelllinie Ho15.19.....	10
1.5	Fragestellungen und Zielsetzung.....	11
2.	Material und Methoden.....	13
2.1	Materialien.....	13
2.2	Methoden.....	13
2.2.1	Standardmethoden der Molekularbiologie.....	13
2.2.2	Northern-Blot Analyse.....	13
2.2.3	Western-Blot Analyse.....	14
2.2.4	Zellkultur.....	14
2.2.5	Immunfluoreszenz.....	14
2.2.6	Durchflußzytometrie zur Größenbestimmung von Zellen (FACS-Analyse).....	15
2.3	Etablierung der Zelllinien Smoxi-4 und TGR-1/MycER.....	15
2.3.1	Herstellung der LXSH-MycER Konstrukte.....	15
2.3.2	Etablierung der Zelllinie Smoxi-4 und Selektion von Einzelzellklonen.....	17
2.3.3	Funktionsprüfung von MycER durch Induktion von Apoptose und DNA Neusynthese.....	18
2.3.4	Überprüfung der Regulation von c-Myc Zielgenen in Smoxi-4.....	19
2.3.5	Etablierung der Zelllinie TGR-1/MycER aus TGR-1.....	20
2.4	Methodik und Analyse der Zeitrafferfilme einer Zellkultur.....	20
2.4.1	Aufbau der Lebendzellkammer und Aufnahme der Filme.....	21
2.4.2	Durchführung der Bildanalyse.....	22
2.4.3	Aufstellen von Stammbäumen mit Hilfe der Zeitrafferfilmen.....	22
2.4.4	Transformierung der Stammbaumdaten zur weiteren statistischen Auswertung.....	23

2.4.5	Definition biologischer Größen.....	25
2.4.6	Kontingenztafeln, Proliferationskurven, Mitose- und Apoptose-Index	26
2.4.7	Zensierungen.....	28
2.4.8	Kaplan-Meier Überlebenskurven für die Zellkultur	28
3.	Ergebnisse	31
3.1	Homogenitätsanalyse von c-myc^{-/-} und c-myc^{+/+} Zellkulturen mit Zeitrafferfilmen.....	31
3.1.1	c-myc ^{-/-} Zellen durchlaufen den Zellzyklus so schnell wie c-myc ^{+/+} Zellen.....	31
3.1.2	c-myc ^{-/-} Zellen haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit im Zellzyklus zu arretieren.....	33
3.1.3	Die Interpretation von Proliferationskurven - Ho15.19 und TGR-1 im Vergleich	37
3.1.4	c-myc ^{-/-} Zellen haben eine geringere Sättigungsdichte als c-myc ^{+/+} Zellen.....	39
3.1.5	Reguliert c-Myc Kontaktinhibition?.....	42
3.2	Konditionale Myc-Aktivität in Ho15.19 c-myc^{-/-} Zellen (Smoxi-4).....	42
3.2.1	Etablierung einer c-myc ^{-/-} Zelllinie mit konditional aktivierbarem MycER-System.....	42
3.2.2	Smoxi-4 erreichen nach MycER Aktivierung eine höhere Sättigungsdichte.....	44
3.2.3	MycER Aktivierung führt zu einem veränderten Zytoskelett	49
3.2.4	MycER Aktivierung verursacht eine defizitäre Aggregation von Fibronektin.....	51
3.2.5	MycER Aktivierung erhöht Teilungswahrscheinlichkeit ohne Einfluß auf Zellzykluslänge	53
3.2.6	MycER Aktivierung steigert zellulären Umsatz.....	56
3.2.7	Erhöhte Mitose- und Apoptoserate begünstigen Focusbildung in Smoxi-4.....	60
3.2.8	Ist c-Myc essentiell für das Überwinden der Kontaktinhibition?	61
3.2.9	Die Auswirkung von konditionaler Myc-Aktivität auf die Expression von c-Myc regulierten Genen in Smoxi-4.....	66
3.3	Das Myc/Max/Mad-Netzwerk	69
3.3.1	Der c-Myc-Antagonist Mad-1 reguliert Teilungswahrscheinlichkeit	69
3.3.2	Abschließende Bemerkungen zur Funktion des Myc/Max/Mad-Netzwerkes.....	75
4.	Diskussion.....	76
4.1	Neue Erkenntnisse durch die Analyse von Zeitrafferfilmen	76
4.2	Worin unterscheiden sich die bisherigen Experimente?	79
4.3	c-Myc reguliert Teilungswahrscheinlichkeit in transgenen Mäusen	81
4.4	c-Myc und die Regulation von Zielgenen.....	83
4.4	c-Myc führt zu effizienter Umsetzung mitogener Signale und erhält den aktiven Teilungsstatus von Zellen aufrecht.....	86

4.5	Was kann man mit Zeitrafferfilmen über Tumorentstehung lernen?	88
5.	Zusammenfassung.....	89
	Anhang A - Materialien.....	90
	Anhang B Statistische Daten der Bildanalyse.....	94
	Literaturverzeichnis.....	102
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	114
	Publikationen	116
	Lebenslauf.....	117
	Danksagung	118

1. Einleitung

Tumorentstehung auf molekularer Ebene zu verstehen ist der Ansatzpunkt für neue gezielte Therapien. Die Entwicklung des BCR-Abl Inhibitors STI571 zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie ist eines von vielen Beispielen aus der jüngsten Zeit (Druker et al. 1996, Kantarjian et al., 2002). Der rasante Wissenszuwachs auf dem Gebiet der molekularen Tumorpathologie in den letzten Jahren lässt hoffen, dass in naher Zukunft viele neue Medikamente die Therapie nachhaltig revolutionieren werden. Der Weg von der Zellkultur über das Tiermodell hin zum Patienten ist vielversprechend, impliziert aber eine enge und notwendige Kooperation von Grundlagenforschung und Klinik.

1.1 c-Myc wird in humanen Neoplasien vermehrt exprimiert

Nach heutiger Sichtweise wird Krebs als eine Krankheit definiert, die auf stufenweiser Akkumulation genetischer Veränderungen beruht (Lengauer et al, 1998). In vielen Tumoren findet sich eine deregulierte Expression der verwandten Onkogene c-myc, N-myc und L-myc. Amplifikationen von c-myc treten auf beim Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Zervixkarzinom, Ovarialkarzinom und Prostatakarzinom (Little et al., 1983, Escot et al., 1986; Munzel et al., 1991; Bieche et al., 1995; Berns et al., 1996, Pinion et al., 1991, Aoyama et al., 1998; Wang et al., 1999, Jenkins et al., 1997). Obwohl beim Kolonkarzinom ebenfalls beschrieben (Augenlicht et al., 1997), führen vor allem Mutationen im APC- β -catenin Signalweg zu deutlich erhöhten c-Myc Expressionen (He et al., 1998).

Eine Schlüsselrolle spielt c-Myc in der Entstehung von Lymphomen (Spencer und Groudine, 1991; Croce, 1993). Das c-myc Gen gelangt durch eine für das Burkitt-Lymphom charakteristische Translokation von seinem normalen Locus 8q24 unter die Kontrolle der regulatorischen Einheiten eines der drei Immunglobulin Gene auf Chromosom 2, 14 oder 22 (Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982; Adams et al., 1983; Marcu et al, 1983). Daraus resultiert eine konstitutive Erhöhung der normalerweise streng kontrollierten c-Myc Expression. Eine fehlerhafte Regulation der c-Myc Expression wird in vielen Modellen für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht (Sakamuro et al., 1999; Liu et al., 2001).

1.2 c-Myc induziert Tumore in transgenen Mäusen

Der direkte Zusammenhang zwischen c-Myc Expression und Tumorentstehung konnte in zahlreichen Tiermodellen gezeigt werden. Transgene Mäuse mit konstitutiver c-Myc Expression unter der Kontrolle eines Immunglobulin Enhancers entwickelten pre-B-Zell und B-Zell Lymphome (Adams et al., 1985). Die Jungtiere dieser transgenen Mäuse wiesen eine verringerte Zahl reifer B-Zellen auf, jedoch vermehrt proliferierende unreife B-Zellen (Langdon et al., 1986). Diese dauerhaft erhöhte Teilungsaktivität begünstigt folglich den Erwerb weiterer genetischer Veränderungen. In der Tat konnte in einer klinischen Studie bei einem Drittel von unbehandelten Patienten mit Burkitt-Lymphom Mutationen des Tumorsuppressor p53 nachgewiesen werden (Gaidano et al., 1991; Ichikawa et al., 1993; Nomdedeu et al., 1997). Ebenso konnten im Tiermodell durch gezielte c-Myc Überexpression in den Brustdrüsen Mammakarzinome induziert werden (Schoenenberger et al., 1988).

Ein weiterer jedoch nicht so häufiger Mechanismus in der Myc-assoziierten Tumorentstehung sind Mutationen im c-Myc Onkoprotein selbst (Bhatia et al., 1993; Albert et al., 1994). Dadurch wird c-Myc resistent gegenüber der inhibitorischen Wirkung des direkt interagierenden Tumorsuppressors p107 (Beijersbergen et al., 1994; Gu et al., 1994). Die Kreuzung von p107 knock-out Mäusen mit konstitutiv c-Myc exprimierenden Mäusen führte zur beschleunigten Entstehung von Lymphomen (LeCouter et al., 1998). Diese Experimente im Tiermodell zeigten auf elegante Weise die kumulativen Effekte von vermehrter Onkogen-Expression und Verlust von Tumorsuppressorfunktion.

Ein erstaunlicher Befund war die Reversibilität von c-Myc induzierten hämatopoetischen Neoplasien im Tiermodell (Felsher et al., 1999). Ein nur kurzeitiges Abschalten der c-Myc Expression in den malignen B-Zellen führte zu einer drastischen Reduktion des Tumors in den Mäusen. Diese Beobachtung ist eine hoffnungsvolle Aussicht für eine therapeutische Intervention mit der c-Myc Expression.

Erst kürzlich wurden Wirkstoffe entwickelt, die spezifisch die Wirkung von c-Myc blockieren (Berg et al., 2002). Das Onkoprotein c-Myc kann somit in der Zukunft ein Ansatzpunkt der gezielten Tumorthherapie werden. Im Falle des Burkitt-Lymphoms unterscheidet sich zusätzlich die mRNA des translozierten c-myc vom normalen c-myc Allel. Eine spezifischer Angriffspunkt ist somit gefunden und lässt auf eine Therapie z.B. mit siRNA hoffen. Die Funktionsweise von siRNA und deren potentielle Anwendung zu therapeutischen Zwecken wird derzeit intensiv erforscht.

1.3 Das c-Myc Onkoprotein

1.3.1 Das c-myc Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor

Das c-myc Gen besteht aus drei Exons und kodiert für ein 64 kDa Protein (Battey et al., 1983). Ferner wurde eine längere 67 kDa und eine verkürzte 45 kDa Form beschrieben (Hann et al., 1992; Spotts et al., 1997). Die Aminosäuresequenz des c-Myc Proteins legt die Zugehörigkeit zur Gruppe der basic region/helix-loop-helix/leucine zipper (bHLHZip) Transkriptionsfaktoren nahe. Im N-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne bestehend aus der Myc Box I und II (Kato et al., 1990). Über die basische Region (b, basic region) bindet c-Myc spezifisch an sogenannte E-Boxen der DNA mit der Konsensussequenz CACGTG (Blackwell et al., 1990, 1993; Prendergast et al., 1991). Die C-terminale HLHZip Domäne vermittelt die Dimerisierung mit dem Interaktionspartner Max (Blackwood und Eisenmann, 1991; Prendergast et al., 1991; Blackwood et al., 1992).

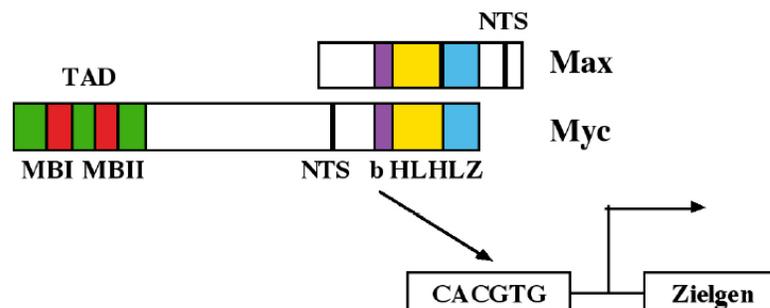


Abb.1 Die einzelnen Domänen von c-Myc und Max. c-Myc interagiert mit seinem Dimerisierungspartner Max und bindet an spezifische DNA-Sequenzen im Promotor von Zielgenen. MB I/MB II, Myc-Box I/II; NTS, Kerntranslokationssignal; TAD, Transaktivierungsdomäne; bHLHZip; basic region/helix-loop-helix/leucine zipper. (Abbildung modifiziert nach Dang et al., 1999)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die biologischen Funktionen von c-Myc die Dimerisierung mit Max notwendig ist (Amati et al., 1992, 1993). Im Gegensatz zu Max kann c-Myc keine Homodimere bilden, sondern nur Myc-Max Heterodimere. Weitere neue bHLHZip

Proteine wurden als Interaktionspartner von Max gefunden. Beschrieben sind bisher Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4, Mnt und Mga (Ayer et al., 1993; Zervos et al., 1993; Hurlin et al., 1995, 1997; Meroni et al. 1997; Hurlin et al., 1999). Als Max Dimerisierungspartner konkurrieren sie mit c-Myc um die Max-Bindung. Mad wird im Gegensatz zu c-Myc in differenzierten Zellen exprimiert (Ayer und Eisenmann, 1993; Larrson et al., 1994; Pulverer et al., 2000; Cultraro et al., 1997, Foley et al., 1998). Die ektopische Expression von Mad1 blockiert die onkogene Eigenschaft von c-Myc (Lahoz et al., 1994; Cerni et al., 1995; Chen et al., 1995; Queva et al., 1999). c-Myc und Mad haben demnach antagonistische Wirkungen. Das Verhältnis zwischen Myc-Max und Mad-Max Dimeren hat somit bedeutende Auswirkungen auf das Verhalten einer Zelle. Mit der Entdeckung des Max-like proteins (Mlx) und seinen Interaktionspartnern MondoA und WBSCR14 ergab sich eine weitere horizontale Ausdehnung des gesamten Myc/Max/Mad-Netzwerkes (Billin et al., 1999; Meroni et al., 2000; Billin et al., 2000; Cairo et al., 2001, Baudino et al., 2001). Die biologische Funktion dieser neu entdeckten Komponenten ist jedoch noch unklar. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich zusammenfassend ein Myc/Max/Mad Netzwerk von Transkriptionsfaktoren mit zentraler Bedeutung für die Biologie der Zelle (Lüscher, 2001; Grandori et al., 2000, Zhou et al., 2001). In Abb. 2 sind die bisher angesprochenen Proteininteraktionen des Myc/Max/Mad-Netzwerkes in einer Schemazeichnung zusammengefasst.

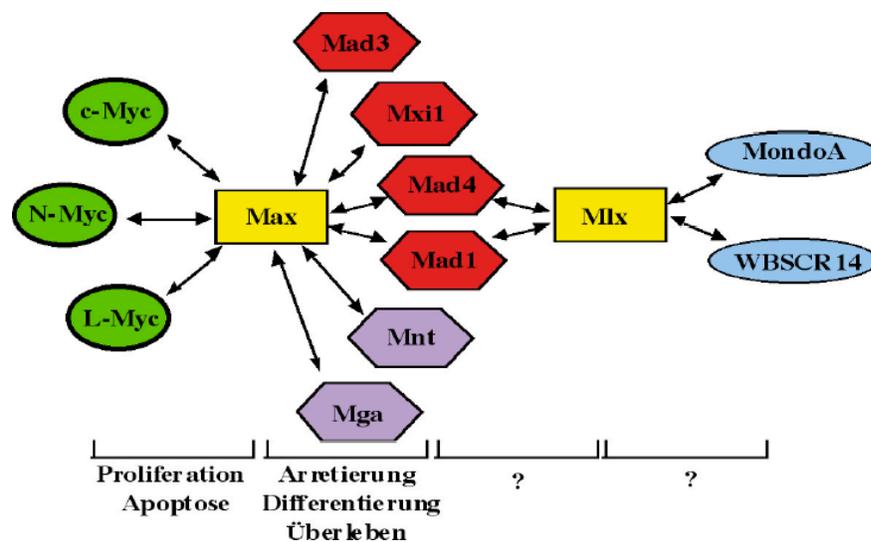


Abb. 2 Das Myc/Max/Mad-Netzwerk (Abbildung nach Lüscher, 2001). Max und Mlx bilden den Mittelpunkt eines Netzwerkes von Transkriptionsfaktoren. Die Myc-Onkoproteine konkurrieren mit den Mad-Proteinen um den Dimerisierungspartner Max.

1.3.2 Biologische Funktionen von c-Myc

Mitogene Stimulation durch Wachstumsfaktoren, c-Myc Expression und Proliferation korrelieren eng miteinander (Kelly et al., 1983; Armelin et al., 1984). Die Aktivierung von c-Myc in ruhenden Fibroblasten induziert DNA-Neusynthese und damit den Eintritt in den Zellzyklus (Eilers et al., 1991; Littlewood et al., 1995). In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren löst Myc-Aktivierung aber Apoptose aus (Evan et al., 1992). Dieser Vorgang kann durch Zugabe von bestimmten Wachstumsfaktoren wie IGF-1 oder PDGF verhindert werden (Harrington et al., 1994). Nach neuerer Auffassung sensibilisiert c-Myc die Zelle für Apoptose, was mit dem zeitlich verzögerten Auftreten der Apoptose nach Myc-Aktivierung gut vereinbar ist (Juin et al., 1999). c-Myc Expression verhindert ferner die Differenzierung von verschiedenen Zellen, wie Myoblasten, Adipozyten oder B-Zellen (Miner und Wold, 1991; Freytag et al., 1988; Thompson et al 1987). In epidermalen Stammzellen jedoch fördert die Überexpression von c-Myc die Differenzierung zu Keratinozyten (Gandarillas et al., 1997). Eine erhöhte Apoptoserate konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Biologische Funktionen von c-Myc und Mad sind also auch abhängig von der Zellart.

In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass c-Myc Zellwachstum induzieren kann, ohne eine Zellteilung herbeizuführen (Johnston et al., 1999; Schuhmacher et al., 1999; Iritani und Eisenman, 1999). Unter Zellwachstum wird hierbei die Zunahme des Protein- und rRNA Gehalts einer Zelle verstanden, was sich letztendlich auch im Volumen einer Zelle widerspiegeln sollte. Weiterhin wird c-Myc eine Rolle bei der Immortalisierung von Zellen über die Telomerase zugeschrieben (Wang et al., 1998, Greenberg et al., 1999). Zusammen mit dem Onkogen ras, einem Schlüsselprotein im mitogenen Ras-Raf-MAPK Signalweg, transformiert c-Myc primäre Fibroblasten in der Zellkultur (Land et al., 1983, 1986).

Wie aus dieser kurzen Aufstellung ersichtlich wird, ist die Wirkung von c-Myc sehr vielseitig oder erscheint es zumindest, da wir vielleicht die einzelnen Verbindungen noch nicht verstehen. Es stellt sich die Frage, wie ein einziges Protein diese verschiedenen Funktionen vermitteln kann. Als Transkriptionsfaktor beeinflusst c-Myc die Expression von Zielgenen und moduliert damit das Genexpressionsmuster der Zelle.

1.3.3 c-Myc-regulierte Zielgene

c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der bestimmte Gene induziert oder reprimiert. Für die Induktion der Genexpression nimmt man an, dass Myc-Max über Bindung an E-Boxen in den

Promotoren die Transkription steuert, wie mit Reporterengenkonstrukten gezeigt werden konnte (Kretzner et al., 1992; Gu et al., 1993). Nach derzeitiger Meinung rekrutiert Myc-Max über Bindung mit TRAPP Histon-Acetyl-Transferase-Komplexe (HAT) und über die Interaktion mit SNF5 den ATP abhängigen Chromatinremodellierungskomplex SWI/SNF (Cheng et al., 1999). Die HAT-Komplexe übertragen Acetylreste auf Histonseitenketten und lockern dadurch die Bindung von Nukleosom und umwickelter DNA (Kingston et al., 1999; Vignali et al., 2000). Nach einem Modell übt der SWI/SNF Komplex unter ATP-Verbrauch Torsionskräfte auf die um das Nukleosom gewundene DNA aus. Die Abschnitte auf der DNA werden nun zugänglicher für die Bindung von Proteinen. c-Myc rekrutiert somit Proteinkomplexe an den Promotor eines Gens und verändert dadurch die Chromatinstruktur, so dass die basalen Transkriptionskomplexe und weitere transaktivierende Faktoren mit erhöhter Wahrscheinlichkeit binden können (Abb. 3; McMahon et al., 1998).

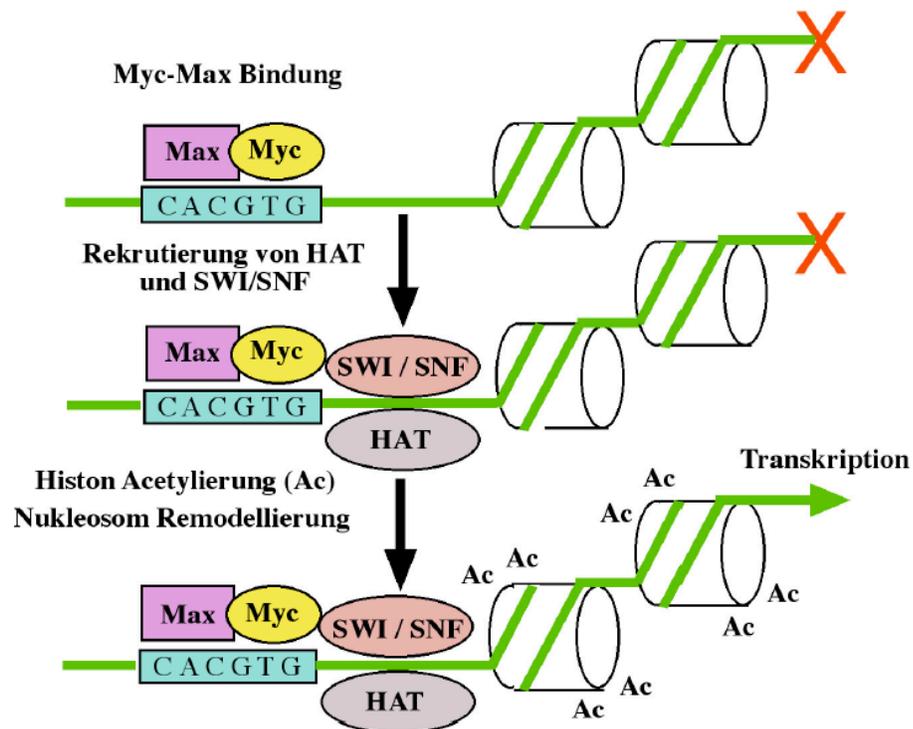


Abb.3 c-Myc rekrutiert Aktivität von Chromatin remodellierenden Komplexen an den Promoter von Genen und ermöglicht somit deren Transkription. HAT, Histon-Acetyl-Transferasen; SWI/SNF, ATP-verbrauchender Chromatin Remodellierungskomplex; Ac, Acetylgruppen an Histon-Seitenketten. (Abbildung nach Amati et al., 2001)

Interessanterweise rekrutieren Mad-Proteine Histon-Deacetylasen (HDAC) und reprimieren dadurch die Transkription durch Unzugänglichkeit der Promotorregion für weitere Faktoren (Knoepfler et al., 1999). Dieser Zusammenhang beschreibt sehr schön die antagonisierenden Wirkungen von c-Myc und Mad auf die Genexpression im Kontext des Chromatins (Amati et al., 2001; Frank et al., 2001; Bouchard et al., 2001). Für die c-Myc vermittelte Repression von Genen scheinen sogenannte Initiator Elemente (INR) in TATA-Box losen Promotoren eine wichtige Rolle zu spielen (Li et al., 1994; Mai et al., 1995; Lee et al., 1996; Philipp et al., 1994). Proteine wie TFII-I, YY-I und Miz-1 aktivieren INR-Promotoren, und c-Myc könnte durch Interaktion mit deren Transaktivierung interferieren, wie für Miz-1 am überzeugendsten gezeigt werden konnte (Peukert et al., 1997; Staller et al., 2001; Salghetti et al., 1999).

Für das Verständnis der biologischen Funktion von c-Myc ist vor allem die Identifizierung von c-Myc-regulierten Genen wichtig. Durch die Anwendung von cDNA Chips zur Identifizierung von c-Myc-regulierten Genen konnte in den letzten Jahren die Liste der potentiellen Gene beträchtlich erweitert werden (Coller et al., 2000; Schuhmacher et al., 2001; Guo et al., 2000). Das funktionelle Spektrum der bisher identifizierten Gene ist weit (Abb. 4).

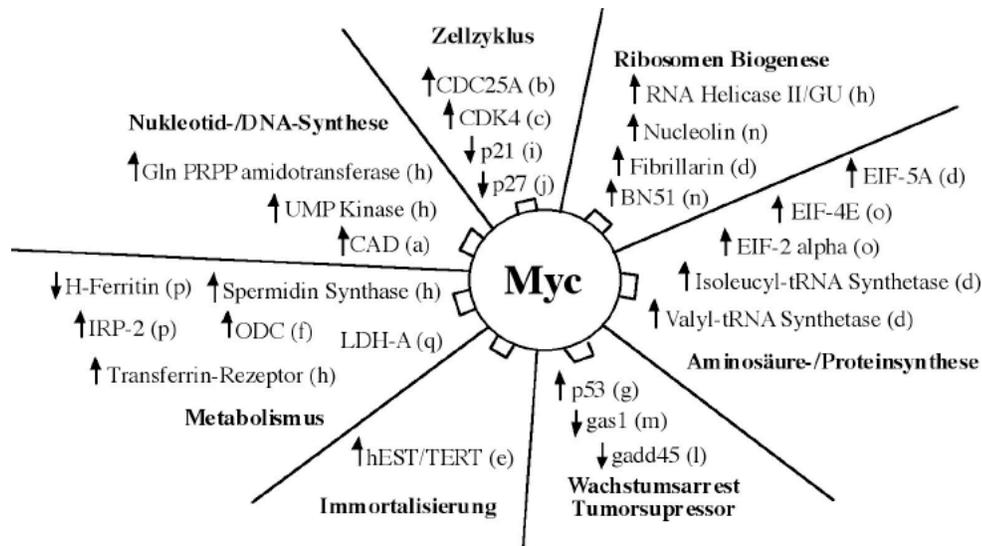


Abb. 4 Eine Auswahl von potentiellen Myc-regulierten Zielgenen. c-Myc greift an vielen Stellen in die Biologie der Zelle ein. Die Einteilung der Gene in verschiedene funktionelle Gruppen ist nur grob und unvollständig. Referenzen: (a) Miltenberger et al., 1995; (b) Galaktionov et al., 1996; (c) Hermeking et al., 2000; (d) Coller et al., 2001; (e) Wang et al., 1998; (f) Bello-Fernandez et al., 1993; (g) Reisman et al., 1993; (h) Schuhmacher et al., 2001; (i) Gartel et al., 2001; (j) Yang et al., 2001; (l) Marhin et al., 1997; (m) Lee et al., 1997; (n) Greasley et al., 2000; (o) Rosenwald et al., 1993; (p) Wu et al., 1999; (q) Shim et al., 1997. Ferner ist für c-Myc eine negative Autoregulation beschrieben (Penn et al., 1990).

Der tatsächliche Nachweis, dass es sich um ein direkt reguliertes Gen handelt, ist allerdings für die meisten Gene nicht vollbracht. Unter einem direkten Zielgen versteht man im allgemeinen, dass c-Myc am Promoter selbst bindet und die Expression des Gens steuert. Eine Gewichtung vorzunehmen fällt ebenfalls schwer und erscheint willkürlich. Eine wichtige Aufgabe wird sein, funktionelle Einheiten zu finden und deren Regulation anhand von Expressionsmustern in einen biologischen Kontext einzuordnen.

1.3.4 c-Myc und der Zellzyklus

Zellzyklusaktivierung durch c-Myc wurde intensiv untersucht. Die Zelle tritt aus der G1 Phase in die S-Phase über, in der die DNA-Neusynthese beginnt. Die Entscheidung für diesen Vorgang legt die Zelle am sogenannten Restriktionspunkt (R) fest (Pardee et al., 1989; Zetterberg et al., 1995). Für die S-Phase ist ein bestimmter Satz von Genen notwendig, deren Expression vor allem von den Transkriptionsfaktoren der E2F Familie abhängt (Weinberg 1995). E2F bindet als Heterodimer mit DP an die DNA und initiiert die Transkription wichtiger Gene für die S-Phase. Der Tumorsuppressor pRb und seine verwandten Proteine p107 und p130 binden E2F und verhindern somit die Transaktivierung von S-Phase Genen (Krek et al., 1993; Bandara et al., 1993; Helin et al., 1993). Durch Phosphorylierung können wiederum pRb, p107 und p130 inaktiviert werden. Dieser Vorgang wird durch Komplexe aus Zyklinen (Zyclin D, E, A) und Zyclin-abhängigen Kinasen (CDK4, CDK6, CDK2) vermittelt (Sherr et al., 1994; Weinberg 1995). Deren Funktion wird schließlich durch die zwei Familien von CDK-Inhibitoren p15, p16, p18, p19 und p21, p27, p57 negativ reguliert (Sherr und Roberts, 1995). Zur Übersichtlichkeit sind die Vorgänge in Abb. 5 schematisch veranschaulicht.

c-Myc greift nun in dieses komplexe Geflecht an verschiedenen Stellen ein. Zyclin E/CDK2-Aktivität wird durch c-Myc induziert und trotz inhibitorischer Signale aufrechterhalten. Dabei steht die Inaktivierung des CDK Inhibitors p27, und wohl auch p21 und p57, im Mittelpunkt. Es wurde das Modell eines durch c-Myc induzierten, aber noch unbekanntes p27 sequestrierenden Proteins entwickelt (Vlach et al., 1996, „X“ in Abb.5). Auf der anderen Seite könnte c-Myc aber auch über die Phosphorylierung von p27 dessen Degradation über den Ubiquitin-Proteasom Weg steigern (Steiner et al., 1995; Pagano et al., 1995; Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997). Möglicherweise tragen aber auch beide Effekte zur p27 Inaktivierung bei (Müller et al., 1997).

Erst kürzlich wurden für p27 und p21 auch die direkte transkriptionelle Reprimierung durch c-Myc selbst beschrieben (Yang et al., 2001; Gartel et al., 2001). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die transkriptionelle Induktion von Zyclin E, die vermutlich aber nicht direkt ist, obwohl sie ohne de

novo Proteinsynthese stattfindet (Perez-Roger et al., 1997). Letztendlich entscheidend wird die Menge an p27-freien aktiven Zyklin E/CDK2 Komplexen sein. Die Induktion der Zellzyklus Phosphatase CDC25A, die inhibitorische Phosphate von den CDK's entfernt, spielt möglicherweise eine Rolle (Galaktionov et al., 1996), konnte aber nicht in allen Systemen reproduziert werden (Pusch et al., 1997; Perez-Roger et al., 1997). Auch über Expression von CDK4 dürfte c-Myc positiv auf die Zellzyklusprogression einwirken (Hermeking et al., 2000, Schuhmacher et al.; 2001).

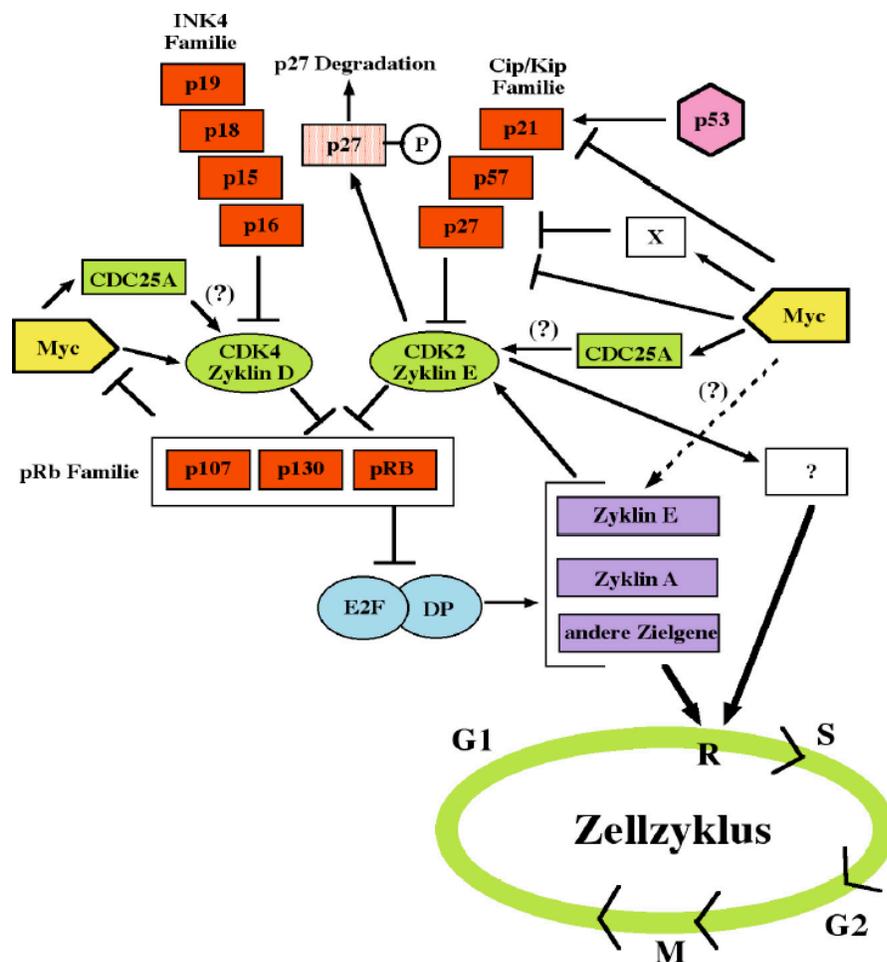


Abb. 5 c-Myc und der Zellzyklus. Das Schema zeigt das im Text angesprochene Modell der Zellzyklusregulation durch CDK's und deren Inhibitoren. Für c-Myc wurden bisher mehrere Möglichkeiten der Interaktion mit dem Zellzyklus beschrieben. Mit (?) bezeichnete Zusammenhänge sind publiziert, aber noch umstritten in ihrer Bedeutung. (X) steht für ein postuliertes, aber noch nicht identifiziertes Protein. (Abbildung nach Amati et al., 1998)

1.4 Stand der Forschung - Die c-myc^{-/-} Zelllinie Ho15.19

Die Analyse des Zellzyklus einer c-myc^{-/-} Zelle würde ein hervorragendes System sein, um die wirklich relevanten Mechanismen und Zielgene zu identifizieren. Die homozygote Keimbahndeletion von c-Myc erwies sich aber als letal um den Tag 9,5 (Davis et al., 1993). Durch homologe Rekombination gelang später die Inaktivierung beider c-myc Allele in einer somatischen Zelllinie ohne nachweisbare Expression von N-myc oder L-myc (Mateyak et al., 1997). Obwohl kompensatorische Mutationen und epigenetische Veränderungen nicht ausgeschlossen werden können, ist es interessant, dass die c-myc^{-/-} Ho15.19 Zellen proliferieren und vital bleiben.

Die Verdopplungszeit war mit 50h zwei- bis dreimal länger als bei der parentalen Zelllinie TGR-1. Phänotypisch waren die Zellen flach und ausgebreitet. Eine konstitutive Expression von c-Myc in den Ho15.19 (Zelllinie HoMyc3) machte die langsamen Verdopplungszeiten reversibel.

Der Gehalt an Proteinen und rRNA pro Zelle ergab keinen Unterschied zwischen c-myc^{+/+} und c-myc^{-/-} Zellen. Die Messung von Proteinneusynthese und Umsatz in einer proliferierenden Kultur wies eine 2-3mal verringerte Rate für die c-myc^{-/-} Zellen auf. In gleichem Maße akkumulierte die rRNA und die mRNA von GAPDH nach Serumstimulation einer ruhenden Kultur nur vermindert. Ein Vergleich der Zelldurchmesser trypsinierter Zellen ergab fast annähernd gleiche Größenverteilungen. Eine Reduktion der Zellgröße durch die Abwesenheit von c-Myc war demnach nicht ersichtlich.

Die Analyse der prozentualen Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen ergab 64% in G0/G1, 14% in S und 22% in G2 für Ho15.19 im Vergleich zu 41%, 46% und 13% für die TGR-1 Zellen. Basierend auf den Verdopplungszeiten der Proliferationskurven wurde die Länge der einzelnen Phasen berechnet. Für die c-myc^{-/-} Zellen ergab sich eine deutlich verlängerte Verweildauer in G0/G1 und G2, während die S Phase unverändert blieb. Wurde eine durch Serumentzug gehungerte Zellkultur mit Serum stimuliert, so begannen die Zellen verzögert mit DNA-Neusynthese. Zusammenfassend bestätigte die Ho15.19 Zelllinie eine wichtige Rolle für c-Myc in der G1 → S Progression. Neu hingegen war die Verzögerung in der G2 Phase.

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde die Expression der bis dahin veröffentlichten c-Myc-Zielgene untersucht (Bush et al., 1998). In exponentiell wachsenden Zellen waren nach Abgleich auf die Expression von GAPDH nur cad und gadd45 dereguliert im Vergleich zu den c-myc^{+/+} Zellen. Ferner war die Induktion von cad und die Repression von gadd45 nach Serumstimulation verringert und verlangsamt. Die anderen soweit publizierten c-Myc-regulierten Gene waren überraschend unverändert. Diese Ergebnisse konnten aber von anderen Arbeitsgruppen nicht

bestätigt werden (Frank et al., 2001). Der Versuch über Transfektion von cDNA Expressionsbibliotheken Gene zu identifizieren, die c-Myc Funktion ersetzen und den verlangsamten Wachstumsphänotyp aufheben könnten, resultierte in der wiederholten und alleinigen Isolierung von c-Myc und N-Myc (Berns et al., 2000). Auch potente virale Onkogene wie E1A und SV40 T-Antigen waren dazu nicht in der Lage. Auf der anderen Seite wurde über eine Verkürzung der Verdopplungszeiten durch CDK4 Expression berichtet (Hermeking et al., 2000).

Mit Hilfe von cDNA Chips wurde das Expressionsprofil von exponentiell wachsenden TGR-1 mit Ho15.19 global untersucht (Guo et al., 2000). Die Analyse der abweichenden Expressionen ergab eine Liste von knapp 200 Genen. Der größte Teil der in TGR-1 vermehrt exprimierten Gene ließ sich den Bereichen Stoffwechsel und ribosomale Proteine zuordnen. Viele der bis dahin publizierten Zielgene wurden nicht bestätigt.

Aus der Zusammenstellung der Literatur ist ersichtlich, dass die Analyse der *c-myc*^{-/-} Zellen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse geliefert hat. Gerade die Untersuchung der c-Myc-regulierten Zielgene erwies sich als ein verwirrendes Feld. Zumindest die mit 50 Stunden stark verlängerte Verdopplungszeit der *c-myc*^{-/-}Zellen erschien als gesicherte Tatsache. So scheint die Aussage gültig zu sein, dass c-Myc für ein schnelles Durchlaufen des Zellzyklus notwendig ist. Eine deutliche verlängerte G1-Phase wurde für diesen Sachverhalt verantwortlich gemacht. Gerade in der G1-Phase nimmt die Zelle an Masse in Form von Ribosomen und Proteinen zu. Weil sich für diese Makromoleküle gleichermaßen verlangsamte Syntheseraten ergaben, wurde folgendes Modell postuliert: Aufgrund eines Wachstumsdefekt können die *c-myc*^{-/-} Zellen in der G1 nur verlangsamt an Masse zunehmen. Erst ab einer kritischen Zellmasse wird die weitere Zellzyklusprogression bis zur Mitose fortgesetzt. Insgesamt resultiert eine deutlich verlangsamte Verdopplungszeit der *c-myc*^{-/-} Zellen (Mateyak et al. 1997).

Nach diesem Modell ist die Hauptfunktion von c-Myc eine Beschleunigung des Zellwachstums. Die Zellzyklusregulation findet nur indirekt über die G1-Phase statt. Diese Hypothese stellt natürlich viele der im Kap. 1.3.4 vorgestellten Arbeiten zur Zellzykluskontrolle durch c-Myc in Frage.

1.5 Fragestellungen und Zielsetzung

Die Interpretation der Verdopplungszeit, rRNA- und Protein-Syntheserate von *c-myc*^{-/-} Zellen beruht auf einer essentiellen Annahme: Die am Zuwachs einer Gesamtpopulation gemessene Verdopplungszeit trifft zu jeder Zeit auch für jede einzelne Zelle zu. Alle Zellen müssen also den

Zellzyklus in annähernd derselben Zeitspanne durchlaufen. Die Zellkultur muss also in sich homogen sein. Nur wenn dies zutrifft, ist eine Übertragbarkeit von Beobachtungen an der Gesamtpopulation auf die einzelnen Zellen zulässig. Folglich müssen für Aussagen zur Funktion von c-Myc in einer Zelle die oben genannten Bedingungen erfüllt sein. Was aber, wenn c-myc^{-/-} und c-myc^{+/+} Zellkulturen sich in ihrer Homogenität deutlich voneinander unterscheiden? Möglicherweise liegt hierin eine Erklärung für die bisher so widersprüchlichen Ergebnisse mit der c-myc^{-/-} Zelllinie. Aus diesen Überlegungen entstanden folgende Zielsetzungen für die vorgelegte Dissertation:

(1) Die Homogenität einer Population von c-myc^{-/-} und c-myc^{+/+} Zellen soll anhand von Einzelzellen analysiert werden. Dazu muss ein neuartiger Experimentansatz entwickelt werden. Mit Zeitrafferfilmen und einer statistischen Auswertung sollte das Teilungsverhalten von Einzelzellen mit der Gesamtpopulation verglichen werden.

(2) Weiterhin soll in c-myc^{-/-} Zellen ein regulierbares c-Myc exprimiert werden, um mit dieser neuartigen Zelllinie das Teilungsverhalten mit und ohne c-Myc-Aktivität unmittelbar zu untersuchen. Außerdem würde diese neue Zelllinie wegen des c-Myc-knock-out Hintergrundes erlauben, c-Myc-Funktion unter Anwesenheit von Serum zu untersuchen. Wachstumsfaktoren aus dem Serum induzieren das endogene c-Myc und überlagern damit durch eine hohe Hintergrundaktivität die konditionale c-Myc-Aktivität in herkömmlichen Zellsystemen.

(3) Die Analyse der Zellzyklusprogression von einzelnen Zellen soll auch in Abhängigkeit von der Expression des c-Myc-Antagonisten Mad1 untersucht werden. Die Ausweitung der Beobachtung auf das Myc/Max/Mad-Netzwerk soll so zu einer Verallgemeinerung der Ergebnisse führen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

siehe Anhang A

2.2 Methoden

2.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie

Die folgenden Standardmethoden wurden gemäß den in Sambrook et al., 2000, nachzulesenden Protokollen oder nach den Angaben der Hersteller durchgeführt: Polymerasekettenreaktion (PCR), Reverse Transkription, Restriktionsverdau, Ligation, Gelelektrophorese, Gelextraktion (Quiagen), Transformation kompetenter Bakterien, Isolierung von Plasmiden aus Bakterien (Miniprep, Maxiprep mit Quiagen-Kit).

2.2.2 Northern-Blot Analyse

Die RNA wurde isoliert mit PeqLab TriFast™ (Phenol-Extraktion) nach Protokoll des Herstellers. Für die elektrophoretische Auftrennung in einem 1%igen Agarose-Formaldehyd (3,7% w/v) Gel wurde in jede Spur 10 µg RNA in RNA-Formamid Ladepuffer aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1xMOPS verwendet. Die RNA wurde über Nacht mit 10xSSC und Zellstoff durch Wassersog auf eine Nylon N⁺ Membran (Amersham) transferiert und im Backofen bei 80°C für 2h fixiert. Die radioaktiven Northern Sonden wurden aus 25ng PCR-Produkt mit High Prime (Roche) und [³²P]dCTP (Amersham) hergestellt. Die markierten Sonden wurden mit Sephadex Nick Columns (Amersham) anschließend gereinigt und in 400 µl TE gesammelt. Die Effizienz der Markierung wurde durch Messung der Aktivität kontrolliert.

Hybridisiert wurde über Nacht bei 68°C in Church-Puffer. Die Filme (Kodak) wurden in einer Röntgenkassette (Amersham) mit Verstärkerfolie je nach Signalstärke bei -80°C exponiert. Zur quantitativen Auswertung wurde ein FUJI PhosphoImager mit Auswertungsprogramm verwendet.

2.2.3 Western-Blot Analyse

Die Zellen wurden zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und dann in Schindler-Puffer lysiert. Die Proteinfraction wurde als Überstand nach Zentrifugation bei 20000xg für 15 Minuten gewonnen. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BioRad Protein Assay (Bradford) bestimmt. Je 20µg Protein wurden pro Spur in Laemmli-Laufpuffer auf einem 7%-15%igen SDS-PAGE Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend in einem TRIS/Methanol Transferpuffer auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Unspezifische Bindungen wurden mit 5% Milchpulver für 1h blockiert. Der erste Antikörper wurde in PBS/0,1% Tween/1% BSA verdünnt und für 1h inkubiert, und ggf. nachher mit 0,02% Natriumacid eingelagert. Nach dreimaligem Waschen in PBS/0,1% Tween wurde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1h inkubiert (in 2,5% Milchpulver, Verdünnung nach Angaben des Herstellers). Nach erneutem Waschen erfolgte die Nachweisreaktion mit dem ECL-Kit von Amersham.

2.2.4 Zellkultur

Die Zelllinien Ho15.19, Smoxi, TGR-1, TGR-1/MycER wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) mit 8% Kälberserum (GIBCO) im Inkubator bei 8% CO₂ kultiviert. Die Zelllinie M47 wurde in RPMI-1640 (GIBCO) mit 8% Fötalem Kälberserum (Bioser) gehalten. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen passagiert, um ein konfluentes Wachstum der weiterführenden Kultur zu vermeiden.

Zur längeren Lagerung wurden die Zellen in DMEM oder RPMI-1640 mit 40% Serum und 10% Dimethylsulfoxid über Nacht bei -80°C eingefroren und dann weiter in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.5 Immunfluoreszenz

Die Fibroblasten wurden auf Deckgläschen angezogen und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (w/v in PBS pH 7.4) für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit PBS/0,1% Triton X-100 permeabilisiert, und über Nacht wurden mit PBS/10%FKS (fetales Kälberserum) unspezifische Bindungen blockiert. Der erste Antikörper wurde für 1h in

PBS/0,1% Triton/2% FKS bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten in PBS wurde mit dem zweiten Antikörper ebenfalls für 1h inkubiert. Phalloidin-FITC wurde zusammen mit dem zweiten Antikörper eingesetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurde mit 2µg/ml Höchst 33258 oder DAPI für 5 Minuten zur DNA-Kernfärbung inkubiert und wiederum zweimal mit PBS gewaschen. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper findet sich im Anhang A.

2.2.6 Durchflußzytometrie zur Größenbestimmung von Zellen (FACS-Analyse)

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA für 5-10 Minuten inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen gut abgerundet haben und in einer Einzelzellsuspension vorlagen. Dies wurde unterstützt durch mehrfaches Auf- und Abziehen mit einer Pasteur-Pipette. Die Zellen wurden resuspendiert in PBS/2%FKS mit 5mM EDTA. Danach wurden ca. 10⁶ Zellen vorsichtig mit 250xg für 5 Minuten zentrifugiert und in 1ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Der lineare FSC (forward scatter) wurde mit einem Becton Dickinson Durchflußzytometer bestimmt, und die Auswertung mit dem dazugehörigen Programm (Cell Quest) durchgeführt.

2.3 Etablierung der Zelllinien Smoxi-4 und TGR-1/MycER

Die Zelllinie Smoxi wurde aus Ho15.19 *c-myc*^{-/-} Rattenfibroblasten, die Zelllinie TGR-1/MycER aus den TGR-1 *c-myc*^{+/+} Rattenfibroblasten, durch stabile Transfektion mit einem LXSH-MycER Konstrukt etabliert. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden beschrieben.

2.3.1 Herstellung der LXSH-MycER Konstrukte

Der Vektor MK57 (zur Verfügung gestellt von Schröder T., GSF, München) codiert unter ZMV Promoter Kontrolle für das MycER Fusionsprotein. Um eine schwächere Expression zu erreichen, wurde das MycER Fragment in den retroviralen Vektor LXSH unter LTR Kontrolle kloniert. Der LXSH Vektor trägt außerdem ein Resistenzgen für Hygromycin B, um in Zellkultur

positive Klone zu selektionieren, sowie eine Ampicillin Resistenz für die Bakterienselektion. Das MycER Fragment kodiert für ein virales C3 Epitop, humanes c-Myc Exon 2 und 3, ein Hämagglutinin Epitop sowie die Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors. Die Hormonbindungsdomäne ist so verändert worden, dass sie sich nur durch 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) aktivieren lässt (Abb. 6). Eine mögliche Aktivierung durch im Serum enthaltenes Östrogen wurde so verhindert (Littlewood et al. 1995).

MYC-ER Fusionsprotein



Abb. 6 Schematischer Aufbau des verwendeten MycER Fusionsproteins. C3, virales Epitop C3; Myc, humanes c-Myc Exon 2 und 3; HA, Hämagglutinin-Epitop; ER, Hormonbindungsdomäne.

Aus dem Vektor MK57 wurde das MycER Konstrukt über einen HincII Restriktionsverdau (3249bp) und anschließend einen weiteren EcoRI Verdau als 2416bp großes Fragment in den retroviralen Vektor LXSH kloniert. Der erste HincII Verdau diente zur eindeutigen Fragmenttrennung im späteren EcoRI Verdau. Überhänge nach dem EcoRI Verdau im MycER Fragment wurden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt. Der LXSH Vektor wurde mit dem symmetrisch schneidenden Restriktionsenzym HpaI verdaut und Phosphate am 5' Ende wurden mit der alkalischen Phosphatase (CIP) entfernt.

Das MycER Fragment wurde mit der T4 DNA Ligase in den LXSH Vektor ligiert. Transformierte kompetente Bakterien wurden auf Ampicillin Agar Platten über Nacht kultiviert. Klone mit richtiger Orientierung des Fragments im Vektor wurden durch einen Doppelverdau mit SpeI und HindIII, bzw. einem Einzelverdau mit BamHI identifiziert. Zwei positive Klone wurden darauf in 400ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht kultiviert und am nächsten Tag die Plasmide mit dem QuiagenMaxiPrep-Kit isoliert.

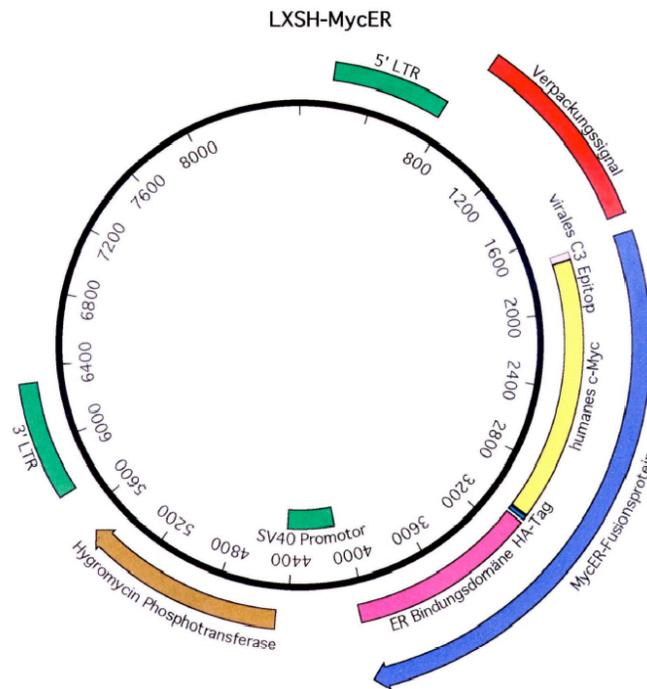


Abb. 7 Übersichtskarte des retroviralen Expressionsvektors LXSH-MycER (8,7kb).

2.3.2 Etablierung der Zelllinie Smoxi-4 und Selektion von Einzelzellklonen

Am Vortag wurden 10^5 Ho15.19 Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte in DMEM/10% Serum angezchtet. Das Medium wurde am nächsten Tag abgesaugt und die Zellen mit 1,5ml Optimem für 1h präinkubiert. Zur Transfektion wurden 300ng Plasmid DNA in 100 μ l Optimem mit 100 μ l, bestehend aus 96 μ l Optimem und 4 μ l Lipofectamin-Reagenz, gemischt und für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit Optimem auf 1ml aufgefüllt, und nach Aspiration der präinkubierten 1,5ml Optimem wurden die Zellen für 5h mit dem Transfektionsansatz inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde dieser durch DMEM/10% Serum ersetzt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen auf eine 100mm Schale umgesetzt und wiederum einen Tag später wurde mit der Selektion unter 150 μ g/ml Hygromycin B begonnen. Zur Vereinzlung wurden 100 Zellen pro 150mm Schale angezchtet und entstehende Einzelzellklone mit Klonierungsringen isoliert und weiter hochgezogen.

Die Expression des MycER Fusionsproteins wurde durch Immunodetektion im Western Blot mit den 9E10 anti-Myc und 3F10 anti-HA Antikörpern überprüft.

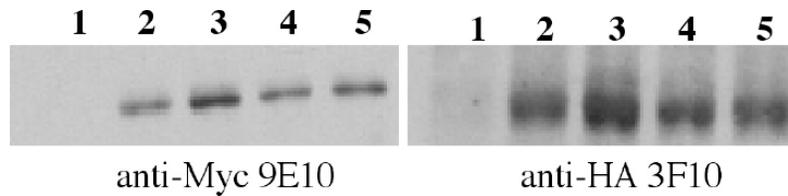


Abb. 8 Western-Blot Analyse der Expression des MycER-Fusionsproteins. Die Zellextrakte der Zellen wurden mit Schindler-Puffer gewonnen. Es wurden 20 µg Protein pro Spur aufgetragen und in einem 7,5% SDS-PAGE Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Immunodetektion erfolgte mit den Antikörpern anti-Myc 9E10 und anti-HA 3F10. Die Nummern bezeichnen die Lysate von den folgenden Zelllinien (1) *c-myc*^{-/-}; (2) Smoxi-6; (3) Smoxi-4; (4) Smoxi-1; (5) TGR/MycER-2. Die spezifischen Banden in 2-5 zeigt das MycER Fusionsprotein.

2.3.3 Funktionsprüfung von MycER durch Induktion von Apoptose und DNA Neusynthese

c-Myc induziert Apoptose in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren. Subkonfluente Smoxi Zellen verschiedener Klone wurden viermal mit PBS gewaschen und mit DMEM/0,25% Serum mit und ohne 100nM 4-OHT inkubiert. Alle Klone zeigten nach 2-3 Tagen in Anwesenheit von Tamoxifen deutlich vermehrt apoptotische Zellen.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Aktivierung von MycER zu DNA Neusynthese führt. Verschiedene Smoxi Klone wurden auf Deckgläschen angezogen, für 3 Tage unter 0% Serum gehungert und dann mit 100nM 4-OHT stimuliert. Als Referenz diente eine unstimulierte Kultur. Das Nukleotidanalogon BrdU wurde dem Medium für 30h hinzugefügt. Die Zellen wurden in 1:1 Methanol:Aceton für 2 Minuten fixiert. Eine 15 minütige Inkubation mit 37° warmer 2M HCL diente der DNA Denaturierung, um die Epitope des inkorporierten BrdU für den FITC-gekoppelten anti-BrdU Antikörper zugänglich zu machen. Mit 2 µg/ml DAPI wurde die DNA der Kerne gegengefärbt. Die Zahl der BrdU-positiven Zellen wurde in repräsentativen Gesichtsfeldern bestimmt. Für die getesteten Klone Smoxi-3 , 4 , 6, 9 und 11 ergab sich jeweils ein Anstieg von 10% (±5%) auf 35% (±5%). Diese Kontrollen sprechen für ein funktionales MycER-Fusionsprotein in Smoxi Zellen.

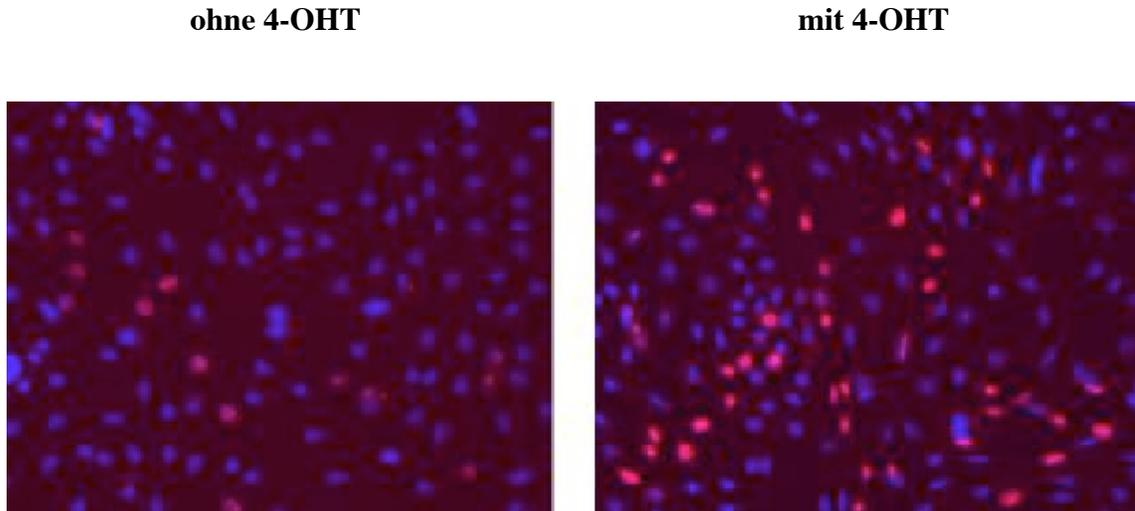


Abb. 9 BrdU-Einbau in Smoxi-4 Zellen nach MycER-Aktivierung. Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt von fixierten Zellen. Es stellen sich die Zellkerne dar. Der Farbstoff DAPI färbt alle Zellkerne im UV Licht blau. Rot kommen die Kerne zur Darstellung, in deren DNA BrdU eingebaut wurde. Der Antikörper anti-BrdU-FITC ist in der Falschfarbe rot statt grün dargestellt, um eine bessere Überlagerung mit den blau gefärbten Kernen (DAPI) zu ermöglichen. Nach Aktivierung sind deutlich mehr Zellkerne rot gefärbt.

2.3.4 Überprüfung der Regulation von c-Myc Zielgenen in Smoxi-4

Zur weiteren Überprüfung der Funktionalität wurde die Regulierbarkeit von c-Myc-Zielgenen anhand von ODC (Ornithin Decarboxylase) und Gadd45 überprüft. Serumgehungerte sowie nicht gehungerte konfluente Smoxi-4 Zellkulturen wurden mit 100nM 4-OHT stimuliert. Die Expression der Gene wurde im Northern Blot nach Standardmethode verifiziert. Rattenspezifische Sonden für ODC und Gadd45 wurden über PCR aus TGR-1 cDNA angefertigt und durch Restriktionsverdau überprüft. Der Northern-Blot in Abb. 10 zeigt eine Regulation von ODC durch MycER-Aktivierung.

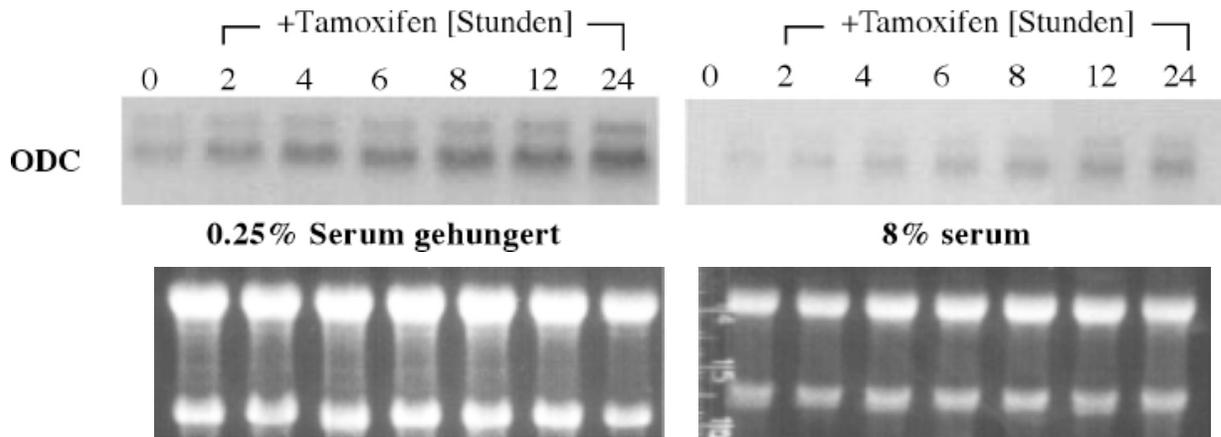


Abb. 10 Northern-Blot Analyse der Expression von ODC. 10 µg RNA wurden in jede Spur aufgetragen. Die RNA wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten mit Phenol extrahiert. Zur Hybridisierung wurde eine rattenspezifische Sonde verwendet. Als Ladekontrolle sind die Ethidiumbromid gefärbten Gele gezeigt. Nach Zugabe von 4-OHT ins Medium steigt die ODC Expression an.

2.3.5 Etablierung der Zelllinie TGR-1/MycER aus TGR-1

MycER-Fibroblasten sind gängige Modellsysteme in der Literatur. Aus TGR-1 wurde die Zelllinie TGR-1/MycER etabliert. Die Zellen wurden ebenso mit dem LXSH-MycER Vektor transfiziert. Mehrere Klone wurden auf stabile Expression des Fusionsproteins mit Western-Blot Analyse überprüft. Die Expression des für die Experimente verwendeten Klons TGR-1/MycER-2 ist in Abb. 8 gezeigt. Die Funktionelle Prüfung des MycER-Fusionsproteins ergab eine deutliche Induzierbarkeit von Apoptose. BrdU-Experimente wurden keine durchgeführt. Die Regulation der Gene ODC und Gadd45 wurde ebenfalls gezeigt.

2.4 Methodik und Analyse der Zeitrafferfilme einer Zellkultur

Zur Analyse des Teilungsverhaltens von einzelnen Zellen bedurfte es einer neuen Methodik. Herkömmliche Methoden beschränken sich auf das Auszählen von Zellkulturen und beschreiben nur die Gesamtpopulation. Die Aufnahme von Zeitrafferfilmen ermöglicht einen unmittelbaren

Einblick in die Zellkultur. Um aus den Beobachtungen auch darstellbare Ergebnisse zu erhalten, wurde eine systematische Auswertung entwickelt. Diese standardisierte Auswertung ermöglicht eine statistische Analyse des Teilungsverhaltens von Einzelzellen im Vergleich zur Gesamtpopulation.

2.4.1 Aufbau der Lebendzellkammer und Aufnahme der Filme

Die Zellen wurden mit gewünschter Zellzahl auf dem runden Bodendeckglas der späteren Lebendzellkammer angezüchtet. Die Zellkulturen waren ungefähr 30% konfluent. Bei dieser Dichte haben gewöhnliche Fibroblasten-Zellkulturen (z.B. TGR-1) optimale Wachstumsbedingungen. Am nächsten Tag wurde das Glasplättchen in eine LaCon G-522 Lebendzellkammer transferiert, die aus zwei durch einen Silikonring getrennten Deckgläschen in einem Metallgehäuse besteht. Über eine Spritze wurden ca. 2,5ml des ursprünglichen, bereits konditionierten Mediums infiltriert. Das Medium wurde mit 15mM Hepes gepuffert. Die Lebendzellkammer wurde durch eine weitere Vorrichtung mit Hilfe des Tempcontrol-37 konstant auf 37°C gehalten. Der Vergleich zu einer im Inkubator kultivierten Kontrollplatte ergab in den angegebenen Beobachtungszeiträumen keine Unterschiede.

Eine digitale CCD Kamera vom Typ Hamamatsu ORCA C-4795 gab die Bildinformationen an das Programm Openlab 2.1 (für Macintosh G4) von der Firma Improvision weiter. Die Bildgröße wurde auf 1024x1022 Bildpunkte mit 256 Graustufen eingestellt und so der gesamte von der Kamera aufgenommene Bereich dargestellt. Je nach Zelllinie wurde eine 50x, 80x oder 100x Vergrößerung verwendet (Ho15.19, Smoxi-4 ohne 4-OHT: 50X; Smoxi-4 mit 4-OHT, M47: 80X; TGR-1:100X). Die unterschiedlichen Vergrößerungen wurden aus Übersichtlichkeitsgründen gewählt.

Mit Hilfe der Funktion Flächenvermessung konnte die Konfluenz der Zellkultur des zu beobachtenden Ausschnitts bestimmt und verglichen werden. Somit war auch die Vergleichbarkeit von unterschiedlichen Vergrößerungen gegeben. Mit der Automationsfunktion erfolgte nun die computergesteuerte Aufnahme von Bildern alle 10 Minuten. Nach dem jeweiligen Beobachtungszeitraum von 72 Stunden bzw. 88 Stunden wurden die Filme im Openlab TIFF gespeichert.

2.4.2 Durchführung der Bildanalyse

Die Zellen des ersten Bildes wurden kontinuierlich als F0 Generation durchnummeriert, so dass alle Zellen eines untersuchten Bildausschnittes erfasst wurden und keine Vorselektion in Bezug auf ihre Lage stattfand. Zu jeder dieser Zellen erfolgte nun die Aufstellung eines Stammbaumes. Mit der Wiedergabefunktion des Openlab Programms konnten die Filme mit mehreren Bildern pro Sekunde in Zeitraffer abgespielt werden und damit die einzelnen Zellen verfolgt werden. Die jeweilige Zeit wurde in Stunden und Minuten des tatsächlichen Beobachtungszeitraumes angezeigt. Die Auswertungsfunktion des Programms ermöglichte das Setzen verschiedenartiger Marker wie Nummern und Quadrate, mit denen eine schnellere Orientierung und präzisere Auswertung gelang. So konnte z.B. durch Setzen eines Quadrates eine Mitose markiert werden, und nach dem Verfolgen der einen Tochterzelle die andere schnell wieder aufgefunden werden. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine präzise und zeitlich effiziente Bildanalyse auch von großen Stammbäumen über mehrere Generationen.

2.4.3 Aufstellen von Stammbäumen mit Hilfe der Zeitrafferfilmen

Für die Datenerhebung der Stammbäume wurden vier Ereignisse definiert, die mit der jeweiligen Zeit des Auftretens erfasst wurden. Die Teilung einer Zelle wurde mit „d“ bezeichnet, bezogen auf den Moment der totalen Abrundung einer sich teilenden Zelle. Nach der Teilung hefteten sich die beiden Tochterzellen wieder an und breiteten ihr Zytoplasma wieder aus. Mit „t“ wurde die Apoptose einer Zelle beschrieben, ersichtlich an Abrundung, Kontrasterhöhung und Ablösung. Eine Anheftung erfolgte nicht mehr. Darum wurden abgerundete Zellen für einige Stunden weiter beobachtet, um sie als eindeutig apoptotisch zu identifizieren. Häufig wurden sie von anderen Zellen aufgenommen und abgebaut. Befand sich eine Zelle am Ende des Beobachtungszeitraumes lebendig in Zellkultur, wurde ihr der Status „v“ vergeben.

Gelegentlich kam es vor, dass Zellen z.B. vorzeitig aus dem Bild herauswanderten. Auch aus Unübersichtlichkeit in sehr dichten Arealen mit vielen darüberliegenden apoptotischen Zellen konnten einige Zellen nicht sicher weiterverfolgt werden. In diesem Fall wurden die Zellen zensiert, kenntlich gemacht durch den Status „v“ mit der entsprechenden Zeit des Verschwindens. Die Zensierungszeit liegt immer vor dem Ende des Beobachtungszeitraumes. Wichtig ist, dass diese Zellen bis zu ihrem Austreten als lebendig gewertet werden. Auf den Aspekt der Zensierungen und wird im Kap. 2.4.8 noch genauer eingegangen. Mit dieser vorgenommenen Definition von Ereignissen lassen sich für jede Ausgangszelle der F0

Generation Stammbäume aufstellen. Die Ereignisse werden mit Status, Zeit und Generation erfasst. In Abb. 11 ist diese Vorgehensweise beispielhaft für einige Zellen gezeigt. Man sieht einige nummerierte Zellen, zu denen Stammbäume angefertigt wurden. Nach der Durchführung der Bildanalyse existiert für jede F0 Zelle des ersten Bildes ein Stammbaum. Das Wachstumsverhalten der untersuchten Zellkultur kann somit auf einzelne Zellen und deren Tochterzellen zurückgeführt werden. Um dieses zu Erreichen, müssen die primär erhobenen Daten jedoch erst der statistischen Auswertung zugänglich gemacht werden. Aus diesem Grund ist eine Datenstrukturierung unumgänglich, ohne die eine auf Algorithmen basierte Auswertung nicht greifen kann.

2.4.4 Transformierung der Stammbaumdaten zur weiteren statistischen Auswertung

Der zu einer Zelle aufgestellte Stammbaum enthält verschiedene Informationen: Die Nummer der F0 Mutterzelle, die Generationen der Tochterzellen, die Ereignisse definiert als Status d (Verdopplung), t (Apoptose) oder v (lebendig zum Beobachtungszeitpunkt oder frühzeitig zensiert) und die Zeitpunkte. Jede Zelle, d.h. auch alle Tochterzellen lassen sich folgendermaßen eindeutig definieren:

- Die Nummer der F0 Mutterzelle
- Die Generation der Zelle
- Zeitpunkt 1, entspricht für alle Tochterzellen dem Zeitpunkt ihres Entstehens; für F0 Mutterzellen dem Beobachtungsbeginn 0:0
- Zeitpunkt 2, Uhrzeit des Auftretens eines Ereignisses, beschrieben durch den
- Status (d, t oder v)

Ein Stammbaum kann auf diese Weise in Tabellenform gebracht werden (Abb. 12). Der erste Pfad eines Stammbaumes wird bis zum Ende verfolgt. Alle Tochterzellen werden in die Liste übertragen. Daraufhin wird immer zum nächsten Verzweigungspunkt zurückgegangen und dieser Pfad wieder zum Ende verfolgt. Dieses einfache Schema wurde für alle Stammbäume durchgeführt und lässt sich anhand von Abb. 12 nachvollziehen. Alle Stammbäume zusammen ergeben dann eine Liste, die systematisch durch Algorithmen ausgewertet werden kann.

Der gesamte Datensatz der Bildanalyse wurde in Form von Microsoft Excel v5.0 Tabellen erfasst und stand der Auswertung mit der Software SAS v6.0 zur Verfügung.

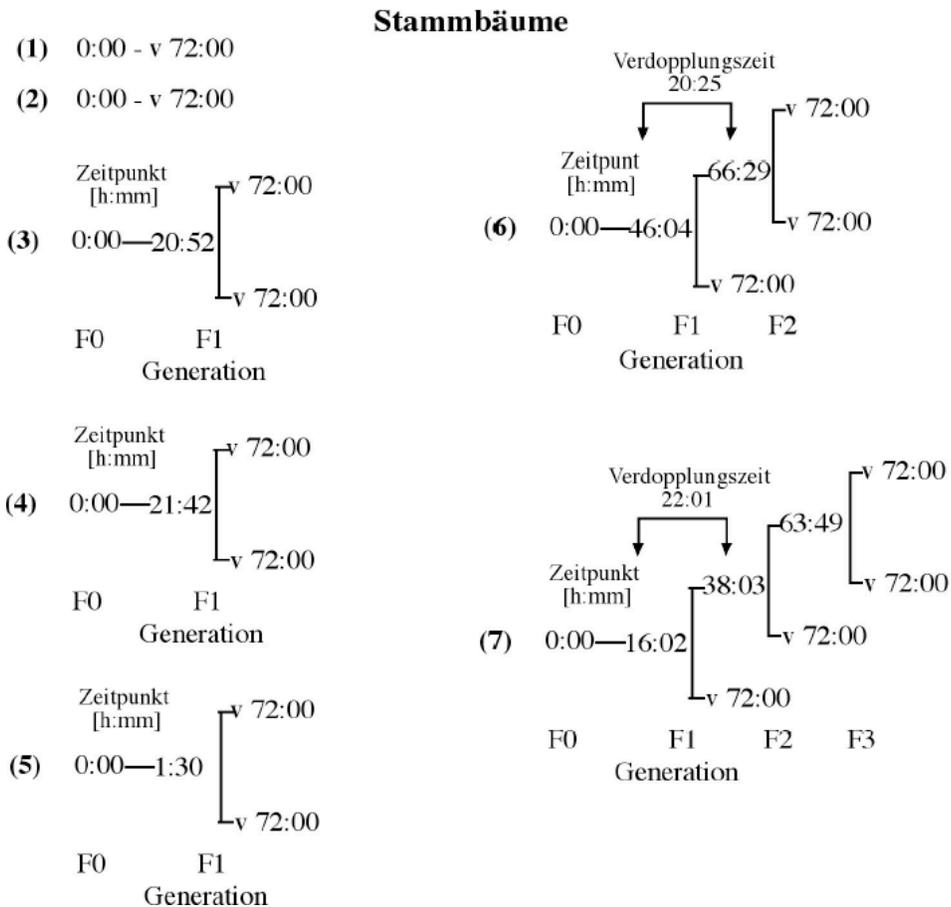
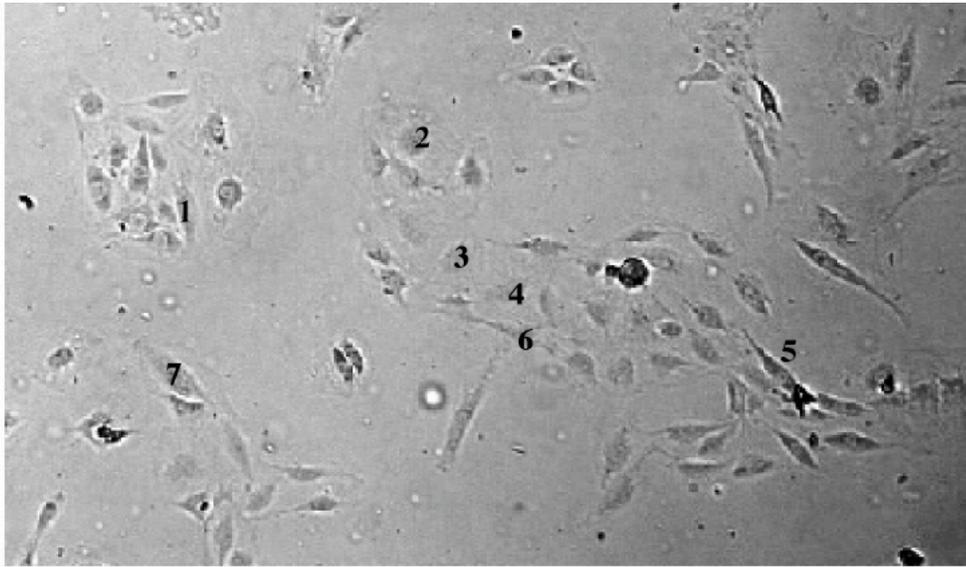


Abb. 11 Aufstellen von Stammbäumen zu den markierten Zellen der F0 Generation mit Hilfe von Zeitrafferfilmen, beispielhaft an einigen Zellen gezeigt. Weiterhin ist aufgezeigt, wie die individuelle Verdopplungszeit auf Einzelzellniveau anhand der intermitotischen Zeitintervalle bestimmt wird. Mit v 72:00 ist das Beobachtungsende festgelegt.

2.4.5 Definition biologischer Größen

Aus dieser Datenstrukturierung lassen sich nun eine Reihe von biologischen Größen ableiten, die für die Beschreibung des Wachstumsverhaltens von Zellen relevant sind.

Individuelle Verdopplungszeit: = Zeitpunkt 1 - Zeitpunkt 2 mit Status d
Geburtszeit: = Zeitpunkt 1
Apoptosezeit: = Zeitpunkt 2 mit Status t

Für jede dieser Größen lassen sich generationenspezifisch Häufigkeitsverteilungen mit Perzentilen und Extremwerten angeben. Im Ergebnisteil (siehe z.B. Kap. 3.1.1) sind Histogramme der Verdopplungszeiten dargestellt. Daraus lässt sich feststellen, wie z.B. die Verdopplungszeiten der einzelnen Zellen um ihren Medianwert streuen. Im Anhang B befinden sich zu den einzelnen Zeitrafferfilmen die Häufigkeitstabellen zu den obengenannten Größen.

A

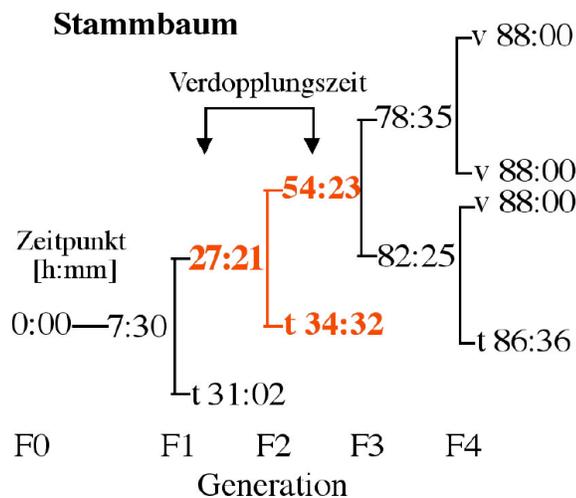


Abb. 12 A Struktur eines Stammbaumes zu einer Zelle der F0 Generation. Ereignisse (d, t, v) werden mit den entsprechenden Zeitpunkten notiert. Verzweigungen stellen Zellteilungen dar (d). Eine Zelle der F1 Generation mit den entstehenden Tochterzellen ist farblich hervorgehoben. In der Tabellenform des Stammbaumes (Abb. 12 B) sind diese Zellen ebenfalls hervorgehoben. Die Notierung des Stammbaumes in Tabellenform lässt sich so leicht nachvollziehen.

B

Generation	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Status
0	0:00	7:30	d
1	7:30	27:21	d
2	27:21	54:23	d
3	54:23	78:35	d
4	78:35	88:00	v
4	78:35	88:00	v
3	54:23	82:25	d
4	82:25	88:00	v
4	82:25	86:36	t
2	27:21	34:32	t
1	7:30	31:02	t

d=Verdopplung, v=lebendig oder Ausschluß, t=tot

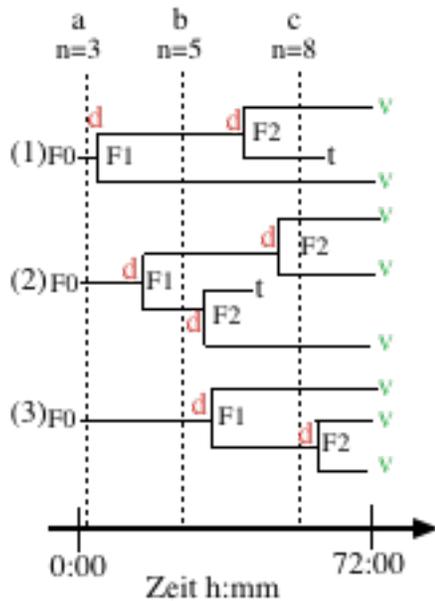
Abb. 12 B Transformation des Stammbaumes von Abb. 12 A in die entsprechende Tabellenform zur weiteren statistischen Auswertung. Die im Stammbaum hervorgehobenen Zellen sind auch in der Tabelle besonders markiert. Das System der Notierung und die Eindeutigkeit der Zuordnung lassen sich anschaulich nachvollziehen.

2.4.6 Kontingenztafeln, Proliferationskurven, Mitose- und Apoptose-Index

Die Aufstellung von Kontingenztafeln liefert eine übersichtliche Zusammenfassung des gesamten Datensatzes. Die Ereignisse werden generationsspezifisch mit ihrer absoluten Häufigkeit, als Gesamtprozentwert, sowie als Prozentwert bezogen auf die jeweilige Zeile bzw. Spalte angegeben. Generationsspezifische quantitative Aussagen über Mitosen und Apoptosen können daraus schnell abgeleitet werden. Im Anhang B sind die Kontingenztafeln zu den einzelnen Zeitrafferfilmen aufgelistet.

Weiterhin lässt sich zu jedem Zeitpunkt des Films die genaue Zellzahl bestimmen. Jeder Stammbaum beschreibt eine Art Vektor in der Beobachtungszeit (Abb. 13 A). Die Dauer zwischen Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 wird durch die jeweilige Länge des Vektors dargestellt. Stellt man sich nun die Stammbäume mehrerer Zellen untereinander vor, so lässt sich zu den Zeitpunkten a, b und c die jeweilige Zellzahl leicht abzählen. (Abb. 13 A).

A



B

Häufigkeit (n) Häufigkeit (%) % in Zeile % in Spalte	d	t	v	Summe
Generation	3	0	0	3
F 0	17,65 100,00	0,00 0,00	0,00 0,00	17,65
F 1	42,86 23,53 66,67	0,00 0,00 0,00	0,00 11,76 33,34	6 35,29
F 2	57,14 0 0,00 0,00	0,00 2 11,76 25,00	25,00 6 35,29 75,00	8 47,05
Summe	7 41,18	2 11,76	8 47,06	17 100,00

Abb. 13 (A) Darstellung der Stammbäume als Zeitvektoren. Die Dauer zwischen den Zeitpunkten wird durch die Vektorlänge angezeigt. Zu den Zeitpunkten a, b und c lässt sich somit durch Untereinanderschreiben der einzelnen Stammbäume die Zellzahl zu jedem Zeitpunkt leicht abzählen. (B) Entsprechende Kontingenztabelle zu den Daten aus Abb. 13 A.

Durch Anwendung eines Algorithmus wird der tabellarische Datensatz auf diese Weise abgefragt und die Zellzahl für die entsprechenden Zeitpunkte bestimmt. Damit lässt sich eine kontinuierliche Proliferationskurve aufzeichnen. Häufig ist die Angabe von als lebend gewerteten Zellen pro Zeitintervall praktischer, um z.B. die ebenfalls in diesem Intervall aufgetretenen Mitosen oder Apoptosen prozentual auf diese Gesamtzahl lebender Zellen im Zeitintervall beziehen zu können. Diese Angaben erlauben die Darstellung von Mitose- und Apoptoserate in kurzen Zeitintervallen von wenigen Stunden und damit eine dynamische Beschreibung der Aktivität einer Zellkultur. Eine entsprechende Kontingenztabelle enthält dann eine anschauliche Übersicht des Experiments (Abb. 13 B).

2.4.7 Zensierungen

In Kap. 2.4.3 wurde das Problem des Zensierens angesprochen, wenn Zellen z.B. vor Beobachtungsende aus dem Bild herauswandern. Bis zu dem Zeitpunkt des Austritts werden ihre Daten erfasst. Die Wachstumskurven sind im Gegensatz zu den anderen verwendeten Auswertungen von den Zensierungen betroffen. Die zensierten Zellen gehen der Gesamtpopulation ab, weil die aus ihnen entstehenden Tochterzellen nicht mehr erfasst werden. Der Anstieg der Wachstumskurve verzögert sich dadurch. Gerade in den Filmen von TGR-1 und Smoxi-4 mit 4-OHT mussten einige Zellen zensiert werden. Aus diesem Grund wurde auf die Darstellung der Wachstumskurven verzichtet. Es lässt sich jedoch der Zellverlust durch Zensierung gut abschätzen unter der Annahme, dass die zensierten Zellen sich so wie die nicht zensierten verhalten. Die korrigierte geschätzte Gesamtzellzahl am Ende diente vor allem zur Bestimmung der Verdopplungszeit der gesamten Zellkultur. Diese Daten wurden durch unabhängige und vergleichbare Wachstumsexperimente im Inkubator überprüft und bestätigt.

2.4.8 Kaplan-Meier Überlebenskurven für die Zellkultur

Die Kaplan-Meier Methode ist ein Standardverfahren in klinischen Studien zur Schätzung von Rezidiv- oder Überlebenszeiten. Es soll hier eine grobe Erläuterung der Methodik erfolgen, um deren Übertragbarkeit zur Beschreibung des Teilungsverhaltens einer Zellkultur zu verdeutlichen. Bei der Kaplan-Meier Methode wird die Zahl definierter Ereignisse (z.B. Tod durch Erkrankung) in einem Zeitintervall auf die Anzahl der in diesem Intervall unter Beobachtung stehenden Patienten bezogen (siehe Lehrbuch der Statistik; Glanz, 1998). Patienten werden zwar zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Studie aufgenommen und werden so bei einer festgelegten Studiendauer unterschiedlich lange beobachtet. Die Beobachtung erfolgt nun synchronisiert ab dem Eintreten in die Studie.

Für jedes Zeitintervall t_i wird die Überlebenswahrscheinlichkeit folgendermaßen geschätzt:

$$(1) P_i = \frac{n_i - k_i}{n_i} = 1 - \frac{k_i}{n_i}, \text{ wobei } n_i \text{ der Anzahl der zu Beginn des Zeitintervalls } t_i \text{ beobachteten}$$

Patienten entspricht. k_i gibt die Zahl der aufgetretenen Todesfälle (bzw. Ereignisse) an.

Der Schätzwert der Überlebenszeitkurve ergibt sich aus dem Produkt aller Wahrscheinlichkeiten:

(2) $S(t_j) = \prod \frac{n_i - k_i}{n_i}$, als Überlebenswahrscheinlichkeit bis zum Zeitpunkt t_j , für alle Zeitintervalle i bis einschließlich j

Ein Patient, der spät in die Studie aufgenommen wird und bei dem kein definiertes Ereignis eintritt, erreicht nach kurzer Zeit das Studienende. In der Kaplan-Meier Kurve wird er also wesentlich früher aus der Beobachtung genommen, ohne dass ein definiertes Ereignis eingetreten ist. Er wird zensiert auf Grund des Erreichens des Studienendes. Aus (1) und (2) ist ersichtlich, dass die Überlebenskurve nicht beeinflusst wird, weil mit $k_i=0$ sich für P_i der Wert 1 ergibt. Geht ein Patient z.B. durch Umzug oder andere nicht definierte Ereignisse einer Studie verloren, so wird er auch zensiert ohne Einfluss auf den Kurvenverlauf.

Die Zellkultur ist aber durch folgenden Unterschied charakterisiert: Bei einer Mitose existiert die Mutterzelle nicht mehr weiter, dafür aber ihre beiden Tochterzellen. Die Größe „verdopplungsfreies Überleben“ bezeichnet die Eigenschaft einer Zelle, vital ohne weitere Teilung in Zellkultur zu bleiben, also einen Ruhestatus. Apoptosen und Zensierungen beeinflussen den Kurvenverlauf für verdopplungsfreies Überleben daher nicht, verringern nur die Zahl unter Beobachtung stehender Zellen. Die zweite Größe „Apoptose-freies Überleben“ beschreibt den Zellverlust durch Apoptose einer Generation, ohne durch Mitosen oder Zensierungen beeinflusst zu werden. Diese Methode erlaubt es also, dass zeitliche Verhalten von Zellteilung und Apoptose unabhängig voneinander zu beschreiben. In zwei verschiedenen Experimenten können sich z.B. identische Kaplan-Meier-Kurven für „verdopplungsfreies Überleben“ ergeben, auch wenn die Apoptoseraten 0% und 50% sind.

2.4.9 Generationensynchronisierte Beobachtung

Mit der Kaplan-Meier Methode werden die Zellen vom Zeitpunkt ihres Entstehens an beobachtet (Abb. 14). Dieser Beobachtungsbeginn wird als Zeitpunkt 0 der Kaplan-Meier Kurven gesetzt. Die Zeitachse entspricht damit nicht der realen Beobachtungszeit aus dem Zeitrafferfilm, sondern der synchronisierten Beobachtungszeit aller Zellen einer Generation nach ihrem Entstehen. Für die F0 Muttergeneration ist eine solche Synchronisierung natürlich nicht möglich, da die Zellen vor Beobachtungsbeginn aus einer Teilung hervorgegangen sind. Ihre genaue Entstehungszeit ist somit unbekannt. Aus diesem Grund fallen die Kurven für verdopplungsfreies Überleben der F0 Generation auch gleich ab, während die Kurven der anderen Generationen dieses erst nach einer Mindestzeit zeigen, entsprechend der kürzesten individuellen Verdopplungszeit.

Die Zahl der unter Beobachtung stehenden Zellen einer Generation verringert sich laufend. Durch Erreichen eines der Ereignisse d, t oder v geht der Generation jeweils eine Zelle verloren. Am Ende einer Kaplan-Meier Kurve verbergen sich nur noch wenige Zellen hinter der Kurve. Die kleine Fallzahl am Ende kann beim Eintritt eines Ereignisses zu bizarren Knicken im Kurvenverlauf führen. Diese Verläufe sind natürlich nicht signifikant und werden deshalb häufig abgeschnitten. Im Anhang B.2.3 und B.2.4 finden sich die Rohdaten von Kaplan-Meier Kurven für zwei Zeitrafferfilme zur Veranschaulichung aufbereitet. Anhand der Zahlen kann man die gerade angesprochenen Sachverhalte exemplarisch nachvollziehen. Für die Berechnung der Kaplan-Meier Überlebensraten und deren graphischen Darstellung wurde das Programm SAS v.6.0 verwendet.

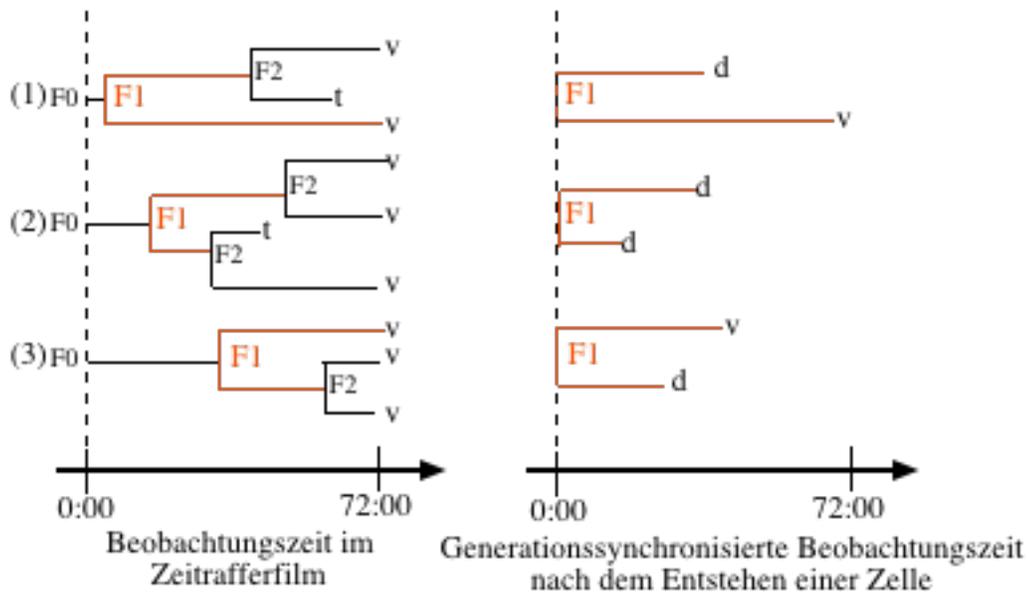


Abb. 14 Prinzip der generationensynchronisierten Beobachtung von Zellen mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode. Alle Zellen einer Generation (hier F1) werden gesammelt und von ihrer Entstehung an beobachtet. Die Zeitachse gibt somit die Zeit nach dem Entstehen an und ist verschieden von der tatsächlichen Beobachtungszeit des Zeitrafferfilms. Die Beobachtung endet mit dem Auftreten eines der definierten Ereignisse d, t oder v.

3. Ergebnisse

3.1 Homogenitätsanalyse von $c\text{-myc}^{-/-}$ und $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellkulturen mit Zeitrafferfilmen

Eine Kultur von $c\text{-myc}^{-/-}$ (Ho15.19) Zellen verdoppelt sich alle 50h (Mateyak et al., 1997), während die $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen (TGR-1) sich in 23h teilen. Liegt es nun nicht auf der Hand, dass sich auch die einzelnen Zellen in der jeweiligen Zeit verdoppeln? Wenn ja, dann ist c-Myc für eine schnelle Zellzyklusprogression notwendig und $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen benötigen mehr als doppelt so lang für den Zellzyklus. In Abwesenheit von c-Myc und natürlich auch N-Myc und L-Myc ist vor allem die G1 Phase stark verlängert (Mateyak et al., 1997). Die Neusynthese von Proteinen und rRNA, die hauptsächlich in der G1 Phase stattfindet, ist in Ho15.19 gleichermaßen reduziert wie die Verdopplungsdauer.

Anhand dieser Ergebnisse wurde folgendes c-Myc-Modell postuliert (Mateyak et al., 1997). Ohne c-Myc Expression sind die Zellen primär in ihrem Wachstum (G1 Phase) verlangsamt. Die verringerte Akkumulation von Makromolekülen wie rRNA und ribosomalen Proteinen verzögert den Eintritt in die S-Phase. Erst beim Erreichen einer bestimmten Größe beginnen die Zellen mit der DNA-Synthese und fahren mit der weiteren Zellzyklusprogression bis zur Mitose fort.

Das beschriebene c-Myc-Wachstumsmodell bietet eine neue interessante Sichtweise der biologischen Funktion des c-Myc-Onkoproteins, jedoch beruht es auf einer unumgänglichen Annahme: Alle Zellen einer $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellkultur sind teilungsaktiv und verdoppeln sich in der gleichen Zeitspanne im Bereich von 50h. $c\text{-myc}^{-/-}$ und $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellkulturen müssen also gleichermaßen homogen sein, wenn die Schlussfolgerungen richtig sind. Welche Konsequenzen hätte aber ein Unterschied in der Homogenität für die Interpretation der Experimente mit den $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen? Im Folgenden soll die Homogenität beider Zellkulturen analysiert und miteinander verglichen werden.

3.1.1 $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen durchlaufen den Zellzyklus so schnell wie $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen.

Die Homogenität einer Zellkultur kann nur mit Kenntnis des Teilungsverhaltens der einzelnen Zellen beurteilt werden. Eine Verdopplung der Zellzahl ist auf verschiedene Weise zu erreichen. Im einfachsten Fall teilen sich alle Zellen homogen in der gleichen Zeit. Die Verdopplungszeit von Zellkultur und Einzelzellen ist somit identisch. Ebenso ist denkbar, dass die

Verdopplungszeiten der einzelnen Zellen erheblich variieren. Die Verdopplungszeit der Zellkultur spiegelt nun nicht mehr die der Einzelzellen wieder. Ferner verlangsamt Zellverlust durch Apoptose die Verdopplungsrate einer Kultur im Vergleich zu den Einzelzellen. Die Verdopplungszeit einer Zellkultur kann somit eine sehr komplexe Größe sein, hinter der sich mehr verbirgt, als man auf den ersten Blick vermutet.

Trifft die Verdopplungszeit von 50h einer *c-myc*^{-/-} Zellkultur auch für die einzelnen Zellen zu? Ist die Kultur homogen und welche Rolle spielt die Apoptose? Antworten auf diese Fragen kann nur die Untersuchung des Teilungsverhaltens von Einzelzellen liefern.

Zu diesem Zweck wurden von Ho15.19 (*c-myc*^{-/-}) und TGR-1 (*c-myc*^{+/+}) Kulturen Zeitrafferfilme mit einer Beobachtungslänge von 72h angefertigt. Die Aufstellung und Auswertung von Stammbäumen erfolgte wie in Kap. 2.4 beschrieben. Von ursprünglich 198 bzw. 125 Zellen wurden alle in der Beobachtungszeit aufgetretenen Mitosen registriert und anhand der intermitotischen Zeitintervalle die Verdopplungszeiten der einzelnen Zellen bestimmt. Die prozentualen Häufigkeiten der beobachteten Verdopplungszeiten wurden in Histogrammen dargestellt (Abb. 15 A und B).

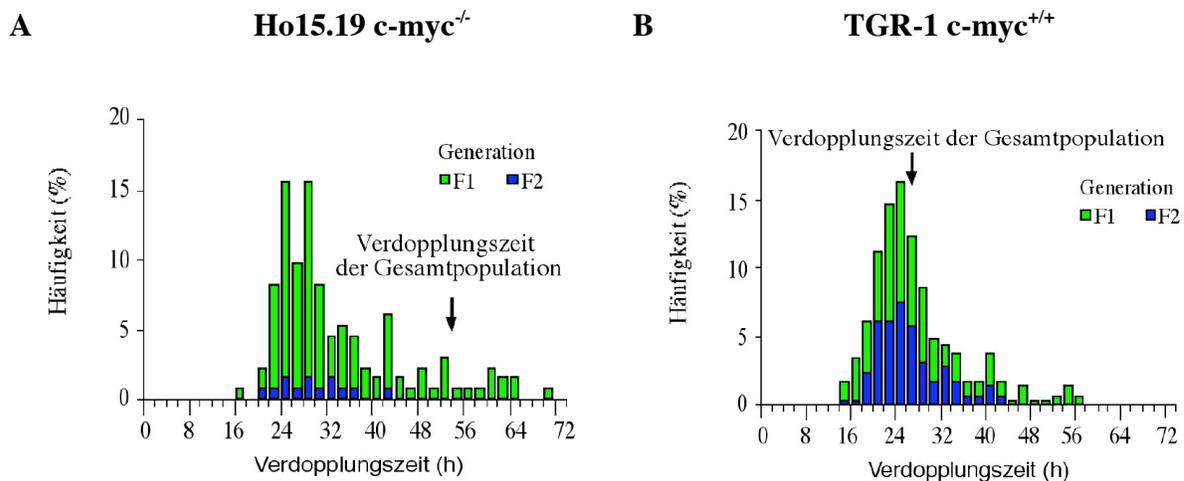


Abb. 15 Häufigkeitsverteilung der Verdopplungszeiten von Einzelzellen im Vergleich zur Verdopplungszeit der Gesamtpopulation. Die Häufigkeiten werden in Prozent angegeben und beziehen sich auf alle beobachteten Verdopplungen. Durch die unterschiedlichen Farben wird der prozentuale Anteil der Tochtergenerationen repräsentiert. Für Zellen der F0 Generation lässt sich keine Verdopplungszeit bestimmen, weil die erste Teilung vor Beobachtungsbeginn stattgefunden hat. **(A)** Ho15.19 (*c-myc*^{-/-}). Ausgegangen wurde von 198 Zellen der F0 Generation. Es wurden 135 Teilungen registriert **(B)** TGR-1 (*c-myc*^{+/+}). Ausgegangen wurde von 125 Zellen der F0 Generation. Es wurden 299 Teilungen registriert. Weitere Daten zu den Häufigkeitsverteilungen finden sich im Anhang B1.

Zur Überraschung zeigten die Ho15.19 *c-myc*^{-/-} Zellen das Maximum der Verteilung im Bereich zwischen 24 und 28 Stunden, jedoch verdoppelte sich die Gesamtpopulation, wie in der Literatur beschrieben in 52 Stunden. Im Falle der TGR-1 Zellen fiel das Häufigkeitsmaximum der individuellen Verdopplungszeiten mit der Verdopplungsdauer der Gesamtpopulation fast zusammen. Diese Untersuchung offenbarte für die Ho15.19 Zellen einen scheinbar widersprüchlichen Unterschied von Faktor zwei zwischen Häufigkeitsmaximum der individuellen Verdopplungszeiten (26 Stunden) und der Verdopplungsdauer der Gesamtpopulation (52 Stunden). Die Population von Ho15.19 (*c-myc*^{-/-}) Zellen ist also nicht homogen.

Die Apoptoserate der beiden Zelllinien war gleichermaßen gering. (Ho15.19: 3,98%; TGR-1: 3,15%; jeweils bezogen auf die Gesamtzahl aller als lebend gewerteten Zellen). Ein vermehrter Zellverlust durch Apoptose, der die Verdopplungsdauer der Ho15.19 Population derart verlängern würde, kommt demnach nicht in Frage. Aus diesem Grund muß ein großer Teil der Population nicht mehr teilungsaktiv sein.

In der Tat teilten sich 13% der *c-myc*^{-/-} Zellen (F0 Generation, in Abb. 15 nicht ersichtlich) überhaupt nicht und 58% der ersten Tochtergeneration (F1) zeigten keine weitere Mitose. Aber 50% der F1 Generation waren in den ersten 22 Stunden des Beobachtungszeitraumes von 72 Stunden aus der F0 Generation hervorgegangen. Dies weist auf eine abnehmende Teilungsaktivität hin. Bezeichnend war auch der geringe Anteil der F2 Generation an den Verdopplungszeiten von Ho15.19. Bei den TGR-1 Zellen teilten sich jeweils 95% der F0 bzw. F1 Generation. Die F2 Generation hat einen großen Anteil an den Verdopplungszeiten.

Es stellt sich die Frage, ob diese Heterogenität der Ho15.19 *c-myc*^{-/-} Zellen durch zwei sich getrennt verhaltenden Populationen zustande kommt, oder ob es sich um eine gemeinsame Eigenschaft aller Zellen handelt. Die Monoklonale Herkunft einer Zelllinie und ihre lange Kulturzeit in verschiedenen Labors sprechen für letzteres. Im Weiteren wird versucht, die Heterogenität einer *c-myc*^{-/-} Zellkultur als Folge einer gemeinsamen Eigenschaft der Zellen zu beschreiben.

3.1.2 *c-myc*^{-/-} Zellen haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit im Zellzyklus zu arretieren

Die Ergebnisse des vorigen Abschnitts legen nahe, dass ein großer Teil der *c-myc*^{-/-} Zellen nicht mehr teilungsaktiv ist. Ansonsten würde die Gesamtzahl der Zellkultur nicht so langsam zunehmen. Wann verlieren die Zellen ihre Teilungsaktivität? Gibt es dafür eine Regelmäßigkeit?

Die Bearbeitung dieser Fragen bedarf einer Auswertungsmethode, mit der sich die Teilungsaktivität von Zellen beschreiben lässt. Beginnt man mit der Beobachtung einer bestimmten Anzahl von Zellen (F0 Generation), so möchte man wissen, wie lange es dauert, bis sich alle geteilt haben. Umgekehrt kann man fragen, mit welcher Wahrscheinlichkeit Zellen bis zu einem gewissen Zeitpunkt ohne Teilung „überlebt“ haben. Diese Wahrscheinlichkeit kann man als „verdopplungsfreies Überleben“ definieren. Man dividiert die Zahl der zu einem Zeitpunkt lebenden Zellen durch die Ausgangszellzahl. Im zeitlichen Verlauf ergibt sich somit eine Überlebenskurve.

Für die Zellen der F0 Generation erscheint dieses Verfahren noch recht praktikabel, weil ihre Beobachtung zu einem gemeinsamen Zeitpunkt beginnt. Zellen der Tochtergenerationen entstehen aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Aus diesem Grund muss die gemeinsame Beobachtung der Tochterzellen einer Generation mit ihrem Entstehen beginnen. Zellen die früh aus einer Teilung hervorgehen, können noch lange beobachtet werden. Je später eine Zelle entstanden ist, desto weniger Beobachtungszeit steht für sie im Experiment zur Verfügung. Dies muss bei der Berechnung der Wahrscheinlichkeit für verdopplungsfreies Überleben berücksichtigt werden. Die oben angeführte einfache Quotientenrechnung ist hier unbrauchbar.

Für die Berechnung einer solchen Überlebenskurve ist die Kaplan-Meier Methode das geeignete Schätzverfahren (Kap. 2.4.9 und Lehrbuch der Statistik Stanton, 1998). Der Kurvenverlauf erlaubt Aussagen über die Teilungsaktivität einer Tochtergeneration. Ein starker Abfall spricht für einen großen Anteil proliferierender Zellen, während ein flacher Kurvenverlauf für viele teilungsinaktive Zellen spricht. Die Kaplan-Meier Methode wurde angewendet für eine Zellkultur von $c\text{-myc}^{-/}$ und $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen. Untersucht wurde für jede Generationen der zeitliche Verlauf der Größe „verdopplungsfreies Überleben“ in prozentualer Darstellung (Abb. 16).

Die Kaplan-Meier Kurven der Ho15.19 Zellen verlaufen mit zunehmender Tochtergeneration immer flacher (Abb. 16 A), d.h. die Wahrscheinlichkeit für eine $c\text{-myc}^{-/}$ Zelle eine weitere Mitose durchzuführen nimmt in höheren Tochtergenerationen deutlich ab.

Die Kurven der TGR-1 $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen zeigen dieses Verhalten im selben Beobachtungszeitraum nicht. Fast alle Zellen einer Generation werden sich auch erneut teilen. Wichtig ist, dass die Zeitrafferfilme unter gleichen Voraussetzungen gemacht werden und die Vergleichbarkeit gegeben ist. Somit hat die $c\text{-myc}^{-/}$ Zelle schon in nicht konfluenter Kultur eine viel höhere Wahrscheinlichkeit, die Population der aktiv proliferierenden Zellen zu verlassen und in einen Ruhestatus überzugehen. Von einer Tochtergeneration teilt sich demzufolge ein zunehmend geringerer Prozentsatz. Aus diesem Grund nimmt die Gesamtzahl der Population nur so langsam zu. Das Resultat ist eine heterogene Zellkultur aus teilungsaktiven und teilungsinaktiven Zellen.

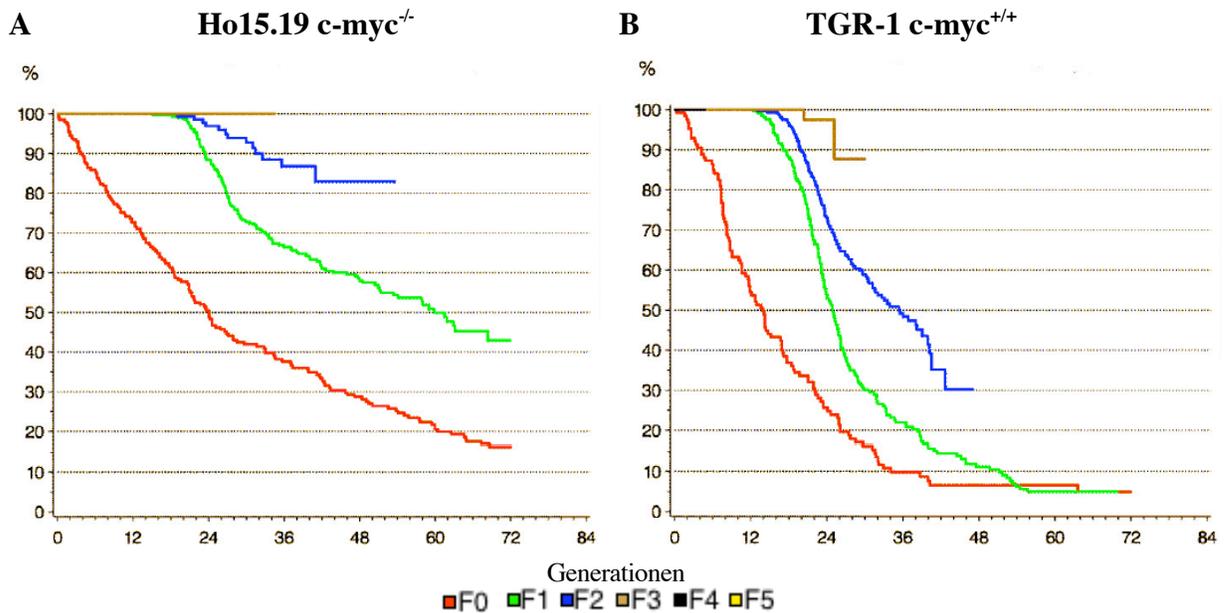


Abb. 16 Nach Generationen synchronisierte Kaplan-Meier Kurven für „verdopplungsfreies Überleben“. (A) $c\text{-myc}^{-/-}$ Ho15.19, (B) $c\text{-myc}^{+/+}$ TGR-1. Die Kurven der F0 Generationen von beiden Zelllinien fallen sofort ab, da der Zeitpunkt der ersten vorangegangenen Teilung unbekannt ist, d.h. vor Beginn des Zeitrafferfilmes stattgefunden hat, und somit eine generationenspezifische Synchronisation nicht möglich ist. Die Kurven der anderen Generationen beginnen mit dem Abfallen erst nach einer Zeitspanne, die der schnellsten beobachteten Zellteilung in der jeweiligen Generation entspricht. Die schnellste beobachtete Teilung ist somit in jeder Generation annähernd gleich. Zellen, die durch Apoptose der Population verloren gehen, wurden zum Zeitpunkt der Apoptose zensiert und beeinflussen den Kurvenverlauf nicht. Ho15.19 Zellen zeigen eine mit der Generation zunehmende Anfälligkeit für Zellzyklusarretierung. Fallzahlen der jeweiligen Generationen. Ho15.19: F0 (125), F1 (318), F2 (293), F3 (24); TGR-1: F0(125), F1 (236), F2 (384), F3 (244), F4 (4).

Wo finden sich in den Kaplan-Meier Kurven die überraschend schnellen Verdopplungszeiten der $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen wieder? Anhand des Kurvenabfall kann man ablesen, wie lange die Zellen nach ihrer vorherigen Teilung brauchen, bis sie wieder in die Mitose eintreten (Abb. 17 A). Der Kurvenabfall von Ho15.19 und TGR-1 beginnt zur gleichen Zeit, doch dann trennen sich die Kurven voneinander. Der Zellzyklus wird daher mit annähernd gleicher Kinetik durchlaufen, nur von prozentual weniger Zellen. Dies wird in Form von Histogrammen besonders deutlich (Abb. 17 B).

Würden sich wie ursprünglich angenommen alle $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen in 50h teilen, müsste sich der Sachverhalt wie die gestrichelten Linien in Abb. 17 darstellen. Die Kurve der $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen wäre im Vergleich zu TGR-1 lediglich nach rechts verschoben (Abb. 17 A).

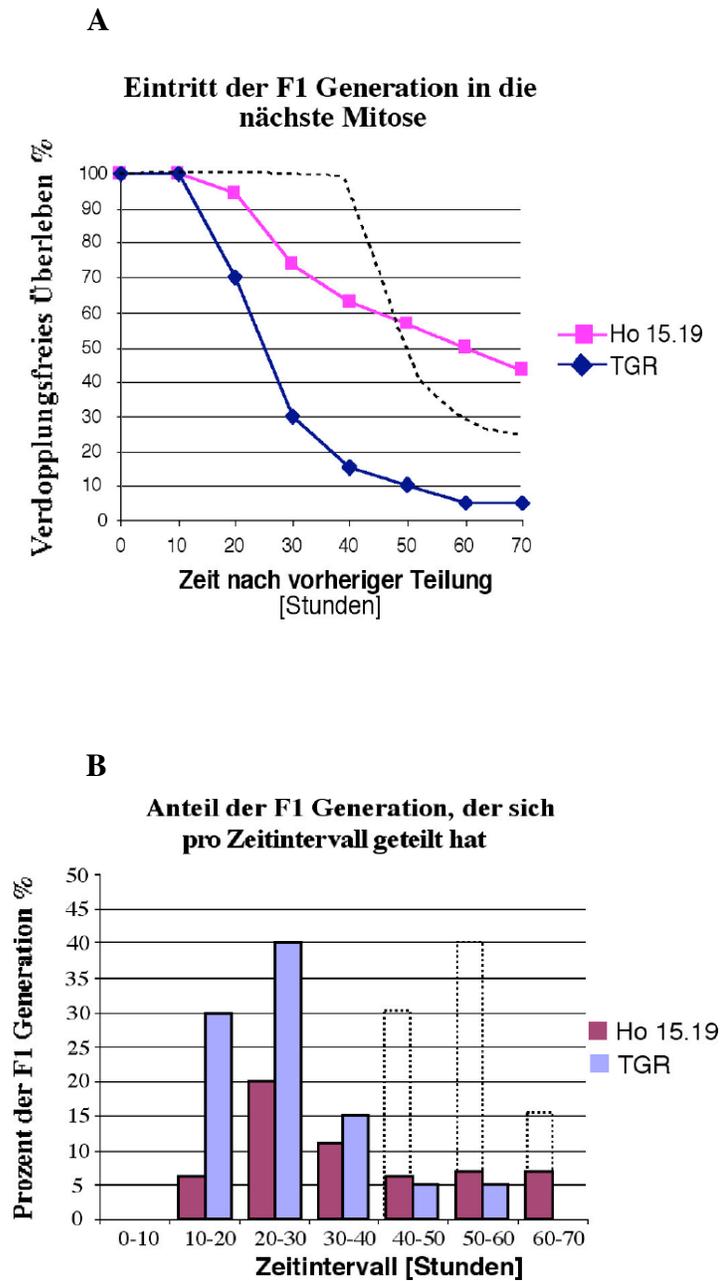


Abb. 17 (A) Eintritt der F1 Generation von Ho15.19 und TGR-1 in die nächste Mitose. Darstellung als Kaplan-Meier Kurven übernommen aus Abb. 16 (weiteres siehe dort). Die gestrichelte Kurve zeigt den Verlauf, der nach dem Modell von Mateyak et al. zu erwarten wäre. (B) Die prozentuale Abnahme der Kaplan-Meier Kurve (Abb. 17 A) wurde jeweils in Zeitintervallen von 10h bestimmt und als Histogramm dargestellt. Die gestrichelten Histogramme zeigen wieder das zu erwartende Ergebnis für die *c-myc*^{-/-} Zellen nach dem ursprünglichen Modell.

3.1.3 Die Interpretation von Proliferationskurven - Ho15.19 und TGR-1 im Vergleich

Proliferationskurven messen die Zunahme der Zellzahl und sind ein Standardexperiment. Generell wird davon ausgegangen, dass es sich um exponentielle Kurven handelt. Dies ist sicherlich für die Mehrzahl der Fälle richtig. Wenn aber in einer *c-myc*^{-/-} Zellkultur nur ein Teil der Folgegeneration teilungsaktiv bleibt, sollte das auch eine Auswirkung auf die Art der Proliferationskurve haben.

Betrachtet man zuerst einmal die Teilungsaktivität der Zellkulturen von Ho15.19 und TGR-1. Die in einem Zeitintervall von 4 Stunden aufgetretenen Mitosen werden in Relation zur Anzahl der in diesem Zeitintervall lebenden Zellen gesetzt. So kann man einen Proliferationsindex im zeitlichen Verlauf darstellen (Abb. 18). Während die TGR-1 Zellen Pulsationen zeigen, die dem Entstehen von Tochtergenerationen zugeordnet werden können, nimmt die Teilungsaktivität in der Population der *c-myc*^{-/-} Zellen kontinuierlich ab und weist kaum mehr generationsbedingte Pulsationen auf. Solche Pulsationen sind bei Proliferationsexperimenten im Inkubator für TGR-1 ebenfalls festgestellt worden und sind möglicherweise durch das Passagieren der Zellen bedingt. Allerdings handelt es sich nicht um eine richtige Synchronisation, wie man sie nach Serumstimulation von arretierten Zellen beobachtet. In diesem Falle treten in einem sehr engen Zeitfenster von wenigen Stunden nahezu alle Zellen in die Mitose ein.

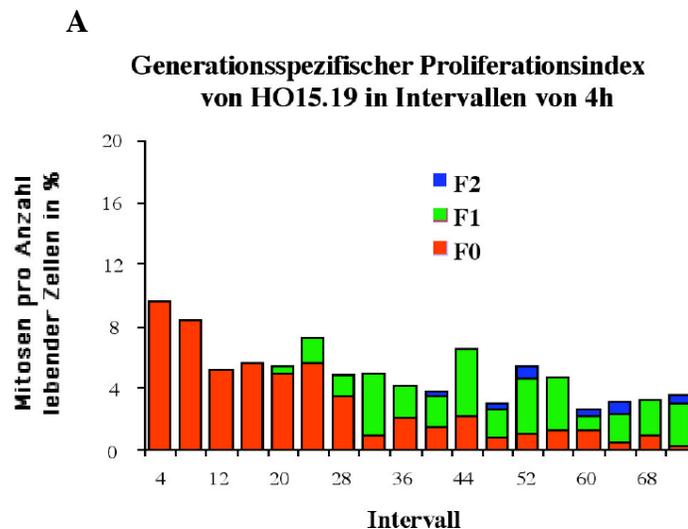


Abb. 18 A Proliferationsindex von Ho15.19. Weiters siehe Legende nächste Seite.

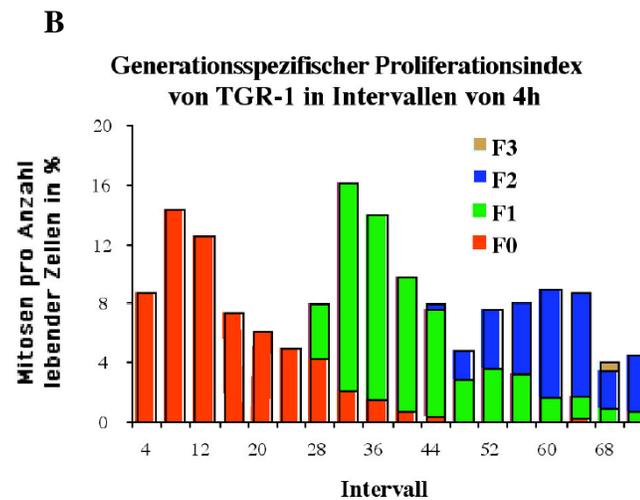


Abb. 18 A und B Proliferationsindex von Ho15.19 und TGR-1. Die Anzahl der Mitosen wurde auf die Zahl der lebenden Zellen im jeweiligen Zeitintervall bezogen. Die Häufigkeit der Mitosen ist prozentual nach ihrer Generationszugehörigkeit aufgeschlüsselt. TGR-1 $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen zeigen deutlicher Pulsationen als Ho15.19.

Wenn von einer Zellkultur prozentual immer weniger Zellen eine weitere Teilung durchlaufen, so nimmt die Gesamtzellzahl zwar weiterhin zu, aber nicht mehr exponentiell. Betrachtet man Proliferationskurven, so zeigen Ho15.19 $c\text{-myc}^{-/-}$ eher eine lineare Zunahme, während TGR-1 eine typische exponentielle log-Phase durchlaufen (Abb. 19, Mateyak et al., 1997). Bei log-Phasen von Proliferationskurven geht man normalerweise davon aus, dass sich alle Zellen mit derselben Zeit und Wahrscheinlichkeit teilen. Wie gezeigt, ist das im Falle von $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen gerade nicht der Fall.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Kultur von $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen kontinuierlich den Anteil teilungsinaktiver Zellen erhöht. Wenn die Kulturschale zugewachsen ist, findet man kaum noch mitotische Zellen. Passagiert man einen kleinen Teil dieser konfluenten Zellschicht in neue Kulturschalen, dann können sie aber wieder proliferieren. Dieses Experiment führt man regelmäßig beim fortlaufenden Kultivieren der Zelllinie durch, wenn die Zellen passagiert und mit neuem Kulturmedium versorgt werden. Der proliferationshemmende Einfluss von Zell-Zellkontakt bei Fibroblasten wird als Kontaktinhibition bezeichnet. Zeichnen sich die $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen vielleicht durch eine besondere Anfälligkeit für diese inhibierenden Signale aus, weil sie bereits in nicht konfluenter Kultur vermehrt arretieren?

Wenn ja, dann sollten sich $c\text{-myc}^{-/-}$ und $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen auch in der sogenannten Sättigungsdichte deutlich unterscheiden. Unter Sättigungsdichte versteht man ganz einfach die Zellzahl pro Fläche, die in einer konfluent gewachsenen Zellkultur erreicht wird. Die weitere Inkubation der Zellen

führt dabei zu keiner weiteren Steigerung, solange das Kulturmedium und Serum nicht erneuert werden.

Proliferationskurven von Ho15.19 und TGR-1

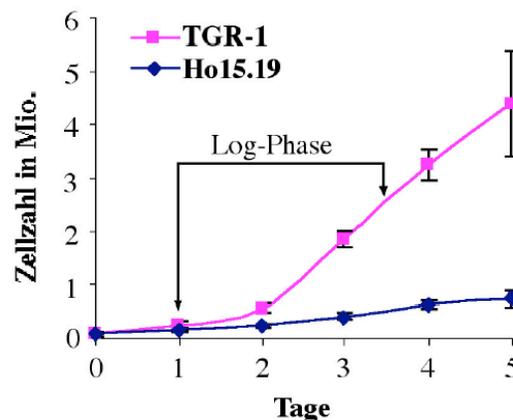


Abb. 19 Proliferationskurven von Ho15.19 und TGR-1. In 100mm Kulturschalen wurden täglich zur gleichen Uhrzeit die Zellen von drei Schalen trypsiniert und mit Hilfe einer Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden mit sehr geringer Dichte ausgesät. Die Zellzahl von Ho15.19 nimmt beinahe linear zu und weist kein richtiges exponentielles Wachstum auf. Es ist also davon auszugehen, dass die entstehenden Tochterzellen bereits im subkonfluenten Zustand arretieren. Die Populationsverdopplungsdauer von TGR-1 betrug in der exponentiellen log-Phase 21h. Für die Ho15.19 wurde eine Verdopplungszeit von 50h ermittelt.

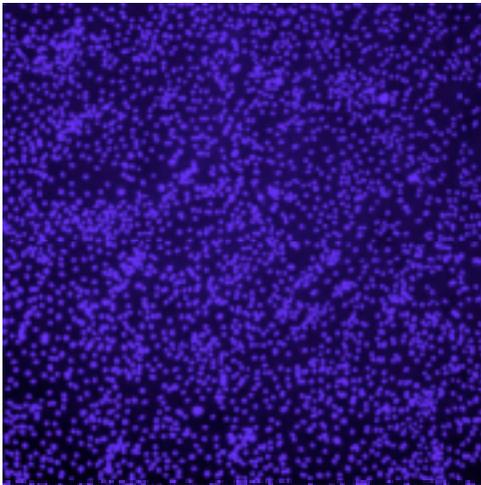
3.1.4 $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen haben eine geringere Sättigungsdichte als $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen

Über Zell-Zellkontakt werden proliferationshemmende Signale vermittelt. Wachstumsfaktoren im Serum regen die Zellen zur Teilung an. Bei einer bestimmten Zelldichte wirken die inhibierenden Signale des Zell-Zellkontaktes dominant über die mitogene Stimulation der Wachstumsfaktoren. Anhand der Zelldichte einer konfluenten Zellkultur kann man erahnen, wie stark eine Zelle auf Kontaktinhibition reagiert. Je geringer diese Sättigungsdichte ist, desto sensibler reagiert eine Zelllinie auf negative Signale. Als molekulare Ursache sind mehrere Szenarien möglich. Zum einen könnte die Zelle ineffektiv arbeiten bei der Umsetzung mitogener Signale, d.h. einer höheren Aktivierungsschwelle bedürfen. Andererseits könnte es der Zelle auch schwerer fallen,

inhibitorische Signale zu unterdrücken. Der Effekt ist letztendlich der gleiche. Gerade für Onkogene trifft diese Funktionscharakteristik zu, wenn z.B. durch ras-Expression Zellen unabhängig von Wachstumsfaktoren proliferieren können.

Die Sättigungsdichten von konfluenten *c-myc*^{-/-} und *c-myc*^{+/+} Zellkulturen sind in Abb. 20 A gezeigt. In den Mikroskopaufnahmen stellen sich die Kerne fixierter Zellen mit dem Farbstoff DAPI im UV-Licht blau dar. Ho15.19 haben eine deutlich niedrigere Sättigungsdichte.

Ho15.19 *c-myc*^{-/-}



TGR-1 *c-myc*^{+/+}

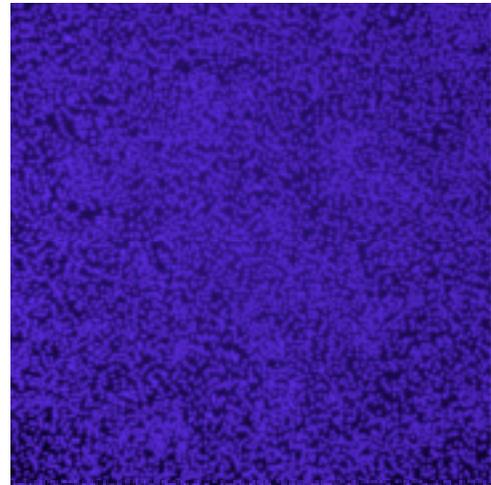


Abb. 20 A Konfluente Zellkulturen wurden mit Methanol fixiert. Die DNA des Zellkerns wurde durch Färbung mit dem UV Farbstoff DAPI dargestellt. Beide Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte bei gleicher Vergrößerung (50X). Die Zahl der Zellkerne pro Fläche ist in der *c-myc*^{-/-} Zellkultur deutlich geringer.

Diese Beobachtung ist deshalb interessant, weil sich die beiden Ziellinien Ho15.19 und TGR.1 in ihrem Zellvolumen nicht unterscheiden. Der Vergleich des Zellvolumens mit Hilfe der Durchflußzytometrie ergibt keine Unterschiede (Mateyak et al, 1997, siehe auch Abb. 20 B). Die Unterschiede in der Sättigungsdichte sind also nicht durch verschiedene Zellgrößen zu erklären.

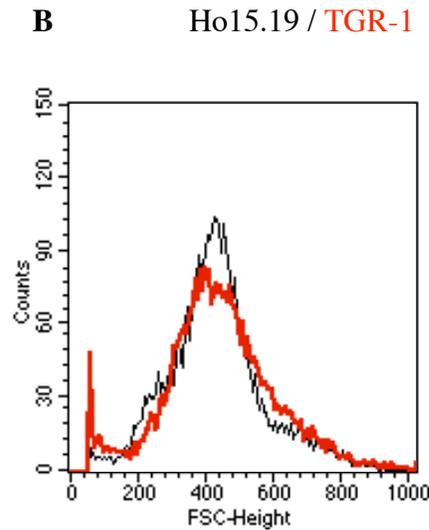


Abb. 20 B Bestimmung der Zellgröße von Ho15.19 und TGR-1 mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Der forward scatter (FSC) korreliert mit dem Durchmesser der Zelle und ist somit ein Maß für das Zellvolumen bzw. Größe. Die Zellen wurden von der Kulturschale mit Trypsin/EDTA abgelöst und als Einzelzellsuspension zur FACS-Analyse verwendet. Es zeigt sich kein Unterschied im FSC zwischen Ho15.19 und TGR-1.

Eine Kultur von Fibroblasten stellt die Proliferation beim Erreichen der Konfluenz ein. Dieses Phänomen wird Kontaktinhibition genannt. Durch die Induktion von CDK Inhibitoren wie p27 oder sogenannten „growth arrest“ Genen wie gas-1 oder gadd45 werden die Zellen im Zellzyklus arretiert, obwohl Wachstumsfaktoren im Medium enthalten sind. Onkogene wie c-Myc werden in primären Zellen durch Kontaktinhibition stark reprimiert und lassen sich nur durch einen Wachstumsfaktorpuls erneut induzieren. Transformierte Zellen, in denen c-Myc oder andere Onkogene überexprimiert sind, wachsen in Zellkultur zu einer höheren Dichte und arretieren nicht. Sie lösen sich von der Kulturschale ab. Die Aufhebung der Kontaktinhibition ist demnach ein wichtiges Merkmal für die Transformierung von adhären Zellen.

Für adhären Zellen ist wie im lebenden Organismus die Umgebung eine limitierende Größe. Viele Gewebe haben eine typische Zelldichte und in Tumoren wie z.B. Fibrosarkomen ist sie deutlich erhöht und dient der pathologischen Begutachtung als lang bekanntes Malignitätskriterium (Riede et Schaefer, 1995).

3.1.5 Reguliert c-Myc Kontaktinhibition?

Die bisher vorgestellten Ergebnisse ergaben, dass die Abwesenheit von c-Myc in Fibroblasten überraschenderweise nicht den Zellzyklus verlängert, sondern nur die mit der Zelldichte korrelierende Teilungswahrscheinlichkeit. Moduliert c-Myc also die Anfälligkeitsschwelle für Kontaktinhibition? Diese Frage kann aus den bisherigen Experimenten nicht unmittelbar beantwortet werden. Die c-myc Expression in TGR-1 nimmt bei zunehmender Konfluenz ab und lässt sich erst durch Zugabe von Wachstumsfaktoren erneut induzieren (Abb. 37). Eine kontinuierliche c-Myc-Aktivität ist deshalb nicht gewährleistet.

Mit einer regulierbaren Myc-Aktivität in den Ho15.19 Zellen könnte man diese biologisch interessante Frage ausgezeichnet untersuchen. Eine Beobachtung dieser Zelllinie mit und ohne c-Myc-Aktivität könnte dann interessante Ergebnisse liefern, die zum Verständnis der Rolle von deregulierter c-myc Expression in Tumorgewebe beitragen könnten. Der Schwerpunkt soll wiederum auf die Beobachtung von einzelnen Zellen gelegt werden.

3.2 Konditionale c-Myc-Aktivität in Ho15.19 c-myc^{-/-} Zellen (Smoxi-4)

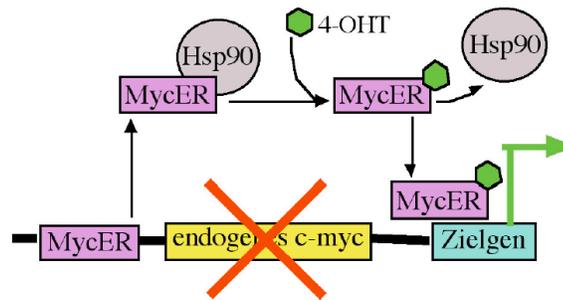
Im Methodenteil, Kap. 2.3, ist eine detaillierte Beschreibung zur Klonierung und Etablierung der Zelllinie Smoxi-4 gegeben. Hier werden nur kurz für das Verständnis wesentliche Funktionsprinzipien aufgeführt.

3.2.1 Etablierung einer c-myc^{-/-} Zelllinie mit konditional aktivierbarem MycER-System

c-myc^{-/-} Zellen wurden stabil mit dem retroviralen Vektor LXSH transfiziert, der für das durch 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) aktivierbare MycER Fusionsprotein kodiert (Eilers et al., 1991; Littlewood et al., 1995). Durch Zugaben von 4-OHT ins Kulturmedium wird die Bindung des MycER-Fusionsproteins an intrazelluläre Proteine wie Hsp90 aufgehoben. Das freie MycER ist nun biologisch aktiv und kann durch Bindung im Promoterbereich eines Gens dessen Transkription steuern (Abb. 21 A) Der ER-Anteil besteht aus einem um die Transaktivierungs- und DNA-Bindungsdomäne verkürzten Östrogenrezeptor. Auf diese Weise wird eine Genaktivierung durch den Östrogenrezeptoranteil des Fusionsproteins verhindert. Weiterhin

wurden einige Aminosäuren in der verbleibenden ER-Bindungsdomäne gezielt ausgetauscht, damit 4-OHT, nicht aber das im Serum enthaltene Östrogen eine Aktivierung auslösen kann (Littlewood et al., 1995). Bei der Selektion der Klone wurde darauf geachtet, dass die Zellen der neuen Zelllinie Smoxi in Abwesenheit von 4-OHT im Medium die Morphologie der ursprünglichen *c-myc*^{-/-} Zelllinie beibehalten haben. Man vermutet, dass eine zu starke Überexpression von MycER in der Zelle die Rückhaltkapazität der Zelle überschreitet und damit zu einer konstitutiven *c-Myc*-Aktivität führen kann. In der Tat gab es auch Klone, die bereits ohne Tamoxifen in ihrer Morphologie der TGR-1 *c-myc*^{+/+} Zelllinie ähnlich waren.

A



B

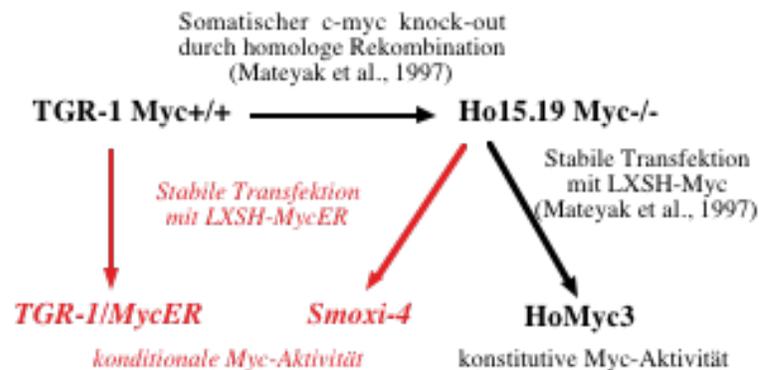


Abb. 21 (A) Schematische Darstellung des Funktionsprinzips von Smoxi. Anstelle des endogenen *c-Myc* wird ein MycER Fusionsprotein exprimiert, das ohne 4-OHT durch andere Proteine zurückgehalten wird und damit inaktiv ist. *c-Myc*-Aktivität kann durch die Zugabe von 4-OHT gesteuert werden. (B) Verwendete Zelllinien im Überblick. Die verwendeten Zelllinien TGR-1/MycER, Ho15.19, Smoxi-4 und HoMyc3 leiten sich alle von den Rattenfibroblasten TGR-1 ab. Smoxi und TGR-1/MycER wurden im Rahmen dieser Dissertation etabliert.

Es wurden mehrere Smoxi Zelllinien etabliert (Smoxi-1, 4, 6, 11) und die Experimente wurden mit dem repräsentativen Klon Smoxi-4 durchgeführt. Die Zugabe von 4-OHT zu Ho15.19 führte bei verschiedenen Konzentrationen (10nM-1000nM) weder zu morphologischen Veränderungen noch abweichenden Proliferationsraten.

Abb. 21 B gibt schließlich noch einen Überblick zu den in der Arbeit verwendeten Zelllinien. Alle Zelllinien leiten sich von den Rattenfibroblasten TGR-1 ab.

3.2.2 Smoxi-4 erreichen nach MycER Aktivierung eine höhere Sättigungsdichte

Die Sättigungsdichte liefert erste Hinweise, wie stark eine Zellkultur durch Kontaktinhibition in ihrer Proliferation gehemmt wird. In Abb. 20 A zeigt der Vergleich mit TGR-1, dass Ho15.19 Zellen bereits bei einer deutlich geringeren Sättigungsdichte ihre Proliferation einstellen. Hat c-Myc-Aktivität einen unmittelbaren Einfluss auf die Sättigungsdichte einer Zellkultur? Das Zellsystem Smoxi-4 ermöglicht nun die unmittelbare Untersuchung dieser Fragestellung. Eine Zellkultur von Smoxi-4 wurde in Anwesenheit von 4-OHT im Medium bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert (5 Tage). Als Referenz diente eine identische Kultur, jedoch ohne Zusatz von 4-OHT. Die Zellen wurden fixiert und die Sättigungsdichte nach Anfärbung der Zellkerne im Mikroskop beurteilt (Abb. 22).

Die MycER-Aktivierung führt zu einer deutlich erhöhten Sättigungsdichte (Abb. 22). In beiden Zellkulturen gibt es lokale Unterschiede in der Zelldichte. Diese lokalen Verdichtungen sind nicht erhaben. Es handelt sich also nicht um mehrschichtige Foci.

In der Verteilung von dichten und weniger dichten Arealen sind sich die beiden Kulturen durchaus ähnlich. Jedoch ist die absolute Zelldichte in der Kultur mit 4-OHT jeweils deutlich höher. Anhand der Vermessung einzelner Areale wurde ein Unterschied im Bereich vom Faktor 2-3 ermittelt. Durch Aktivierung von MycER lässt sich also die absolute Zelldichte von Smoxi-4 deutlich steigern.

Wenn die Zellzahl pro Fläche zunimmt, dann bleibt jeder einzelnen Zelle weniger Anhaftungsfläche. Zum Ausgleich müssen sich die Zellen mehr nach oben ausdehnen. Diese Überlegung ist richtig, solange sich am Volumen der Zellen nichts verändert. Würden die Zellen kleiner werden, dann bräuchten sie natürlich auch weniger Platz. Zur Kontrolle wurde deshalb das Zellvolumen von Smoxi-4 in Abhängigkeit von MycER-Aktivierung mit Durchflußzytometrie untersucht (Abb. 23). Auch nach mehrtägiger Aktivierung von MycER verändert sich das Volumen der Smoxi-4 Zellen nicht.

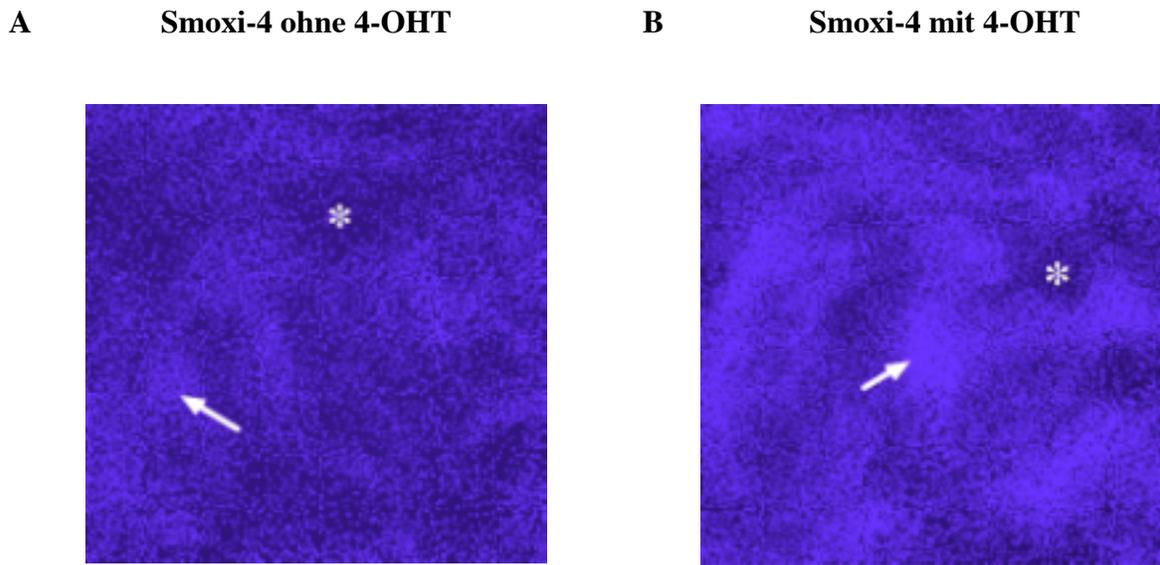


Abb. 22 Sättigungsdichte von Smoxi-4 in Abhängigkeit von MycER-Aktivierung durch 4-OHT. Die Zellkulturen wurden bei Erreichen der Konfluenz mit Methanol fixiert. Die DNA der Zellkerne wurde mit dem UV-Farbstoff DAPI dargestellt. Die Mikroskopbilder zeigen repräsentative Ausschnitte in 50X Vergrößerung. Es wurden jeweils mehrere Zellkulturen untersucht. Die weißen Pfeile zeigen auf Areale mit besonders hoher Zelldichte. Die Sternchen befinden sich in Regionen mit niedriger Zelldichte. (A) Smoxi-4 ohne 4-OHT (B) Smoxi-4 mit 4-OHT.

Smoxi-4 ohne 4-OHT / mit 4-OHT

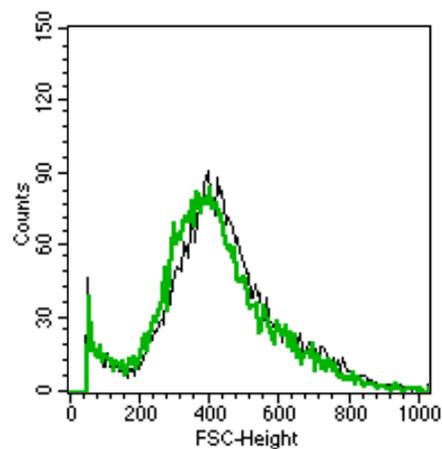


Abb. 23 B Bestimmung der Zellgröße von Smoxi-4 mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS). Der forward scatter (FSC) korreliert mit dem Durchmesser der Zelle und ist somit ein Maß für das Zellvolumen. Die Zellen wurden von der Kulturschale mit Trypsin/EDTA abgelöst und als Einzelzellsuspension zur FACS-Analyse verwendet. Es zeigt sich kein Unterschied im FSC nach fünftägiger Aktivierung von MycER.

Beanspruchen Smoxi-4 Zellen nach MycER-Aktivierung von Anfang an weniger Anheftungsfläche? Oder stellt sich dieser Phänotyp erst in einer konfluenten Zellkultur ein? Es könnte ja sein, dass die Zellen erst nachträglich zusammengedrängt werden.

Zeitrafferfilme von kleinen Zellkolonien sollten diese Frage klären (Abb. 24). Beim ersten Film wurde 4-OHT dem Kulturmedium zum Zeitpunkt 0h hinzugefügt. Erstaunlicherweise okkupieren die Zellen kaum neue Fläche (Abb. 24 A). Dementsprechend nimmt die Zelldichte deutlich zu. Bemerkenswert ist auch, wie der Umriss der ursprünglichen Kolonie weitgehend erhalten bleibt. Zum Vergleich ist eine Bildsequenz von Smoxi-4 ohne aktivierten MycER gezeigt (Abb. 24 B). Die kleine Kolonie breitet sich kontinuierlich in die Peripherie aus. Eine quantitative Auswertung von Zellzahl pro okkupierte Fläche ergibt nach MycER Aktivierung eine mit der Zeit zunehmende Zelldichte (Abb. 24 C).

A mit 4-OHT

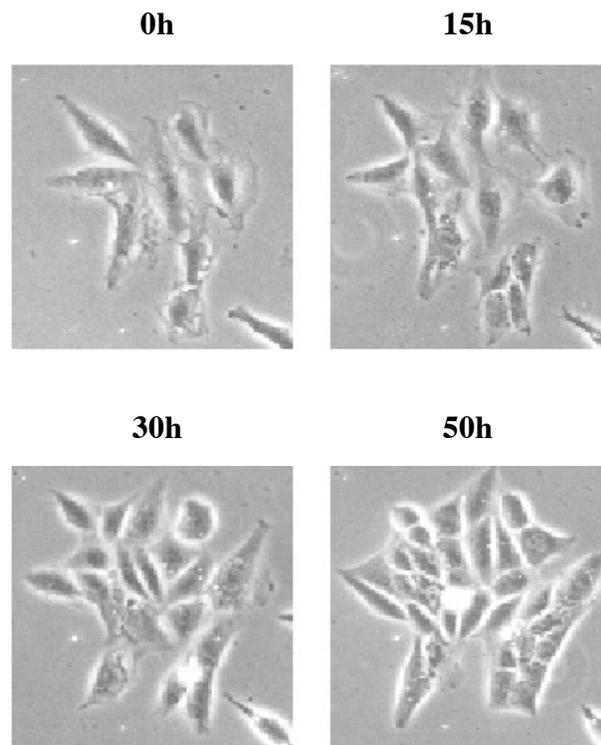


Abb. 24 (A) Beobachtung der Zelldichte einer kleinen Zellkolonie von Smoxi-4 nach 4-OHT Zugabe. Repräsentativer Ausschnitt aus einem Zeitrafferfilm zu verschiedenen Zeitpunkten. Weiteres siehe Legende nächste Seite.

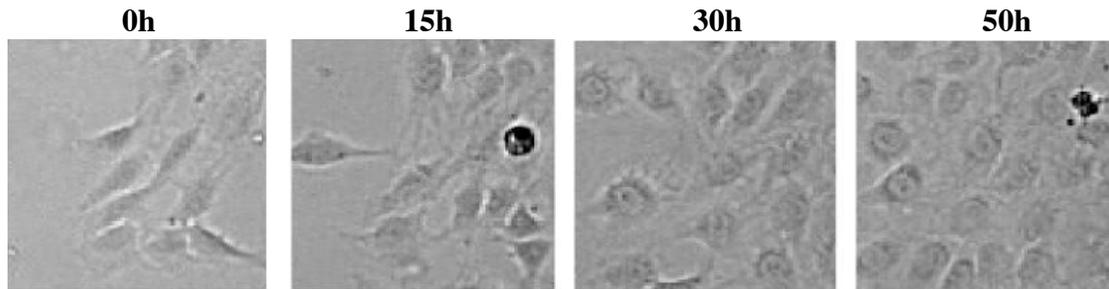
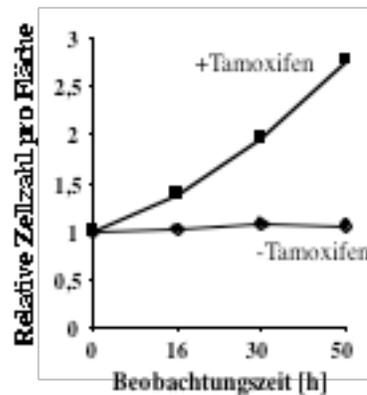
B ohne 4-OHT**C**

Abb. 24 Die Zelldichte von einzelnen kleinen Kolonien im zeitlichen Verlauf. Zwei Zellkolonien mit jeweils ca. 10 Zellen wurden über 50h in Zeitraffer beobachtet. (A) 4-OHT wurde zum Zeitpunkt 0h in einer Konzentration von 100nM hinzugegeben. Es wurde eine 100x Vergrößerung mit Phasenkontrast verwendet. (B) Ohne 4-OHT Zugabe. Es wurde eine 50x Vergrößerung verwendet. Die Bildgröße wurde nachträglich entsprechend angeglichen. (C) Die Zellzahl pro okkupierte Fläche (Zelldichte) ist im zeitlichen Verlauf dargestellt.

Innerhalb von 50 Stunden führt die Aktivierung von MycER zu einem völlig veränderten Proliferationsverhalten. Die Ausbreitung der Kolonie in die Umgebung wird eingestellt und dafür die Zelldichte auf der bereits okkupierten Fläche gesteigert. Im Gefolge dieser Veränderungen wandelt sich auch das Erscheinungsbild der Zellen. Das typische Bild von flach ausgebreiteten Fibroblasten wird verlassen und geht über in ein epitheloidartiges Kopfsteinplaster (Abb. 24 A). Zum Zeitpunkt 0h sind die Smoxi-4 Zellen morphologisch kaum von den Ho15.19 c-myc^{-/-} Zellen zu unterscheiden (Abb. 24 A, 25 A). Sie erscheinen beide flach

und ausgebreitet. Nach 50 Stunden ähneln die Smoxi-4 Zellen mehr der Zelllinie HoMyc3 (Abb. 24 A, 25 B). HoMyc3 exprimiert humanes c-Myc konstitutiv unter der Kontrolle eines retroviralen Promoters (Mateyak et al., 1997). So kann in Smoxi-4 innerhalb kürzester Zeit ein Phänotyp induziert werden, wie er sich auch bei konstitutiver Überexpression von c-Myc ergibt. Mit der Zelllinie HoMyc3 sollte gezeigt werden, dass der c-Myc knock-out Phänotyp von Ho15.19 durch c-Myc Expression reversibel gemacht werden kann (Mateyak et al., 1997). In der Tat ähneln sich HoMyc3 und TGR-1 sehr. TGR-1 erscheint jedoch lang gestreckter und wächst auch mehr in länglichen Formationen, die an fibromatöse Gewebiszüge erinnern.

Möglicherweise liegt eine unterschiedliche Regulation der c-Myc Expression zu Grunde. In TGR-1 wird sie vom endogenen Promoter reguliert, während in HoMyc3 ein retroviraler Promoter die Expression steuert. Natürlich waren die HoMyc3 Zellen aber auch im Laufe ihrer Entstehung vielen Selektionen ausgesetzt, so dass die Unterschiede im Phänotyp auch durch unbekannt genetische Veränderungen bedingt sein können.

A **c-myc^{-/-} Ho15.19**

B **HoMyc3**

C **c-myc^{+/+} TGR-1**

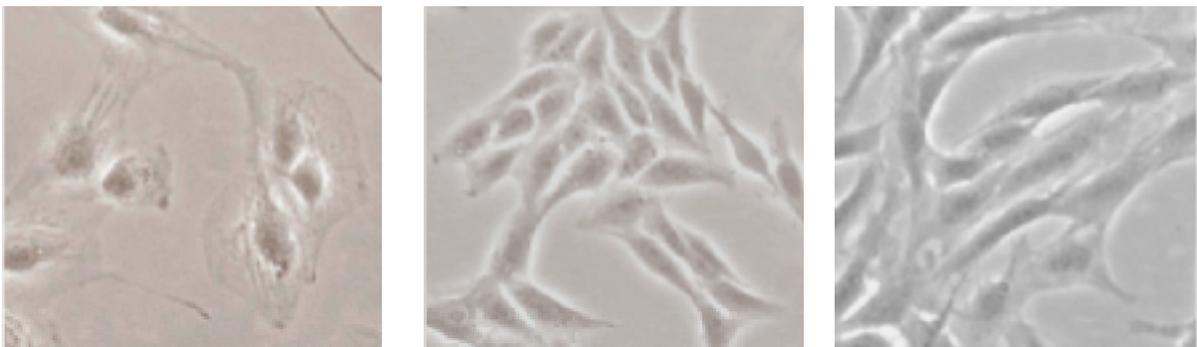


Abb. 25 Phasenkontrastaufnahmen in 160x Vergrößerung. Gezeigt sind folgende Zelllinien: (A) Ho15.19, (B) HoMyc3, (C) TGR-1. Ho15.19 zeigen einen weit ausgebreiteten Zytoplasmasaum um ihren Zellkern. Sie erinnern an Spiegeleier. HoMyc3 wachsen dicht gedrängt und haben einen epitheloiden Aspekt. Ihr Aussehen erinnert an Kopfsteinpflaster. TGR-1 wachsen ebenfalls dicht, erscheinen aber länglicher. Dadurch ergibt sich eine innere Struktur der Zellkultur, die an fibromatöse Gewebiszüge erinnert.

3.2.3 MycER Aktivierung führt zu einem veränderten Zytoskelett

Wie der Name schon sagt, hat das Zytoskelett eine wesentliche Bedeutung für die Morphologie einer Zelle. Ein Hauptbestandteil bildet dabei das Aktin. Dieses Protein kann zu sogenannten Stressfasern polymerisiert werden, die sich durch die ganze Zelle spannen. Diese Aktinfasern haben nicht nur statische Aufgaben, sondern dienen auch der Motilität und Signalweiterleitung (Bear et al., 2001; Waterman-Storer et al. 1999; Schoenwaelder et al., 1999). Die Aktinfasern münden in den Fokalkontakten, die aus einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen bestehen und Schnittstellen zwischen Zytoskelett und Signaltransduktion bilden (Geiger et al., 2001).

Im vorigen Abschnitt wurde der morphologische Wandel von Smoxi-4 Zellen nach MycER-Aktivierung in Phasenkontrastaufnahmen gezeigt. Welche Veränderungen zeigt das Zytoskelett? Ebenfalls 50 Stunden nach 4-OHT Zugabe wurden nicht konfluente Smoxi-4 Zellen fixiert und das Zytoskelett mit Immunfluoreszenz dargestellt. Verglichen wurden die Bilder mit Immunfluoreszenzfärbungen von unstimulierten Zellen (Abb. 26). Es handelt sich um die Überlagerung von drei Immunfluoreszenzfärbungen (siehe Legende Abb. 26).

Ein Geflecht von filigranen Aktinfasern (grün) zieht durch das Innere der unstimulierten Zellen. Viele Fasern entspringen in der Umgebung des Zellkernes (blau) und münden in Fokalkontakten (orange) oder verbinden zwei solche (Abb. 26 A). Nach 50 Stunden MycER-Aktivität ist das strukturierte Aktingerüst gänzlich verschwunden. Die extra etwas stärker vergrößerte Aufnahme zeigt nur noch eine schwache diffuse Aktinfärbung (Abb. 26 B). Durch die digitale Überlagerung leidet besonders die Auflösung der feinen Aktinfasern. Deshalb sind noch zwei weitere Abbildungen ohne Darstellung der Fokalkontakte gezeigt (Abb. 26 C, D).

Abgeflachte Zellen mit weit ausgebreitetem Zytoplasma werden von einem strukturierten Aktingerüst durchzogen. Nach MycER-Aktivierung bilden die Zellen zusammengedrückte Kolonien, die fast schon wie ein Synzytium erscheinen. Ihnen fehlt die innere Strukturierung der Aktinfasern. Bei verringerter Anheftungsfläche und unverändertem Volumen (Abb. 23 B) müssen sich die Zellen folglich in die Höhe ausgedehnt haben. Möglicherweise führen noch nicht charakterisierte Zielgene von c-Myc zur Auflösung des Aktingerüsts und zwingen die Zelle zur teilweisen Abrundung. Die Identifizierung dieser Zielgene bietet einen faszinierenden Ausblick für weitere Forschung. Zytoskelett und Migration von Zellen werden im Zusammenhang mit invasivem Wachstum und Metastasierung intensiv untersucht.

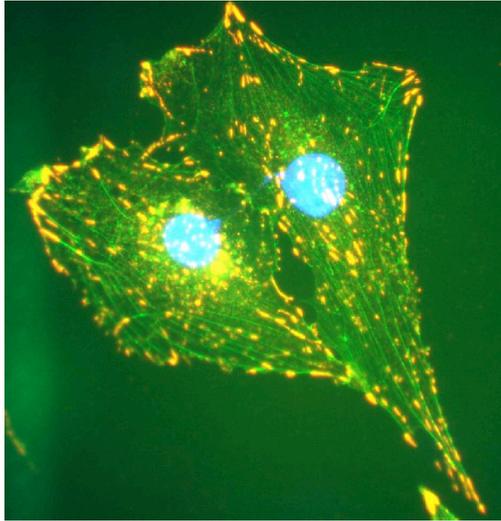
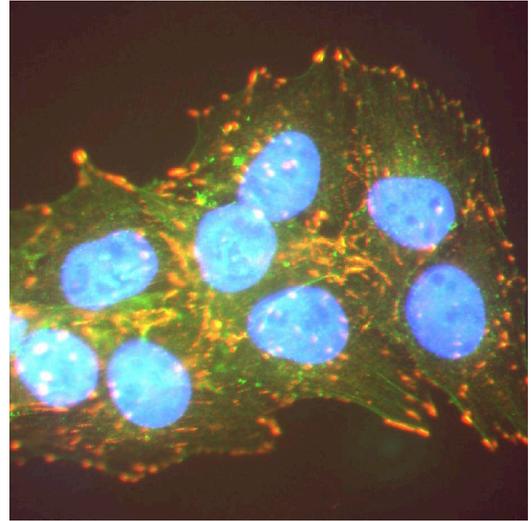
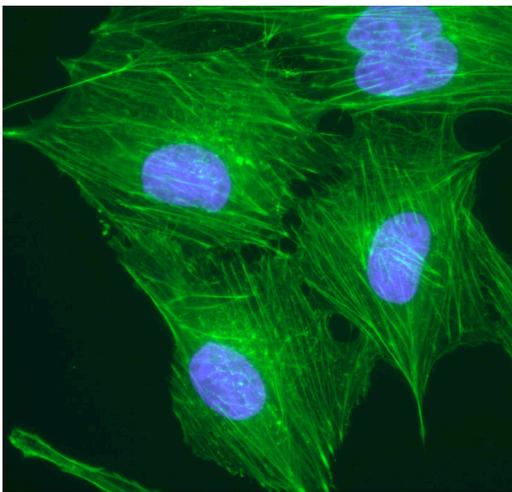
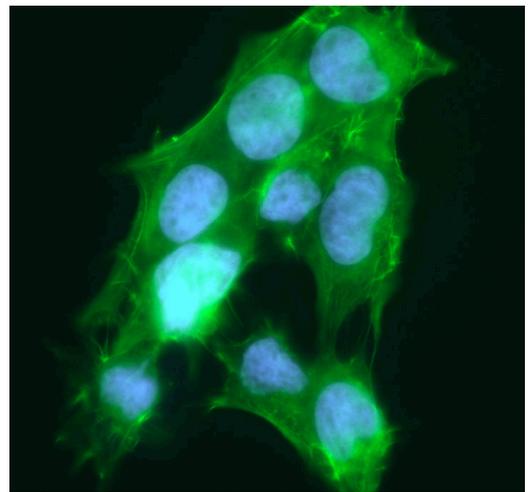
A Smoxi-4 ohne 4-OHT**B Smoxi-4 mit 4-OHT****C****D**

Abb. 26 Veränderungen des Zytoskeletts nach 50 Stunden MycER-Aktivierung. Die Zellen wurden mit 4% w/v Paraformaldehyd fixiert. Folgende Strukturen sind dargestellt: Aktin, Phalloidin-FITC (grün); Fokalkontakte anti-Vinculin Antikörper (rot, durch Überlagerung meistens orange); Zellkern, DAPI (blau). Die Abbildungen (A) und (B) sind Überlagerungen von Dreifachfärbungen. Vergrößerung 640x, wobei (B) nachträglich noch etwas vergrößert wurde. Die Abbildungen (C) und (D) sind Zweifachfärbungen. Die feinen Aktinfasern kommen besser zur Darstellung. Vergrößerung 640x. Der Ausschnitt wurde nachträglich verkleinert. (A) und (C) zeigen Smoxi-4 ohne 4-OHT. (B) und (D) zeigen Smoxi-4 mit 4-OHT.

3.2.4 MycER Aktivierung verursacht eine defizitäre Aggregation von Fibronectin

Bevor wieder das Teilungsverhalten der Zellen im Einzelnen analysiert wird, soll hier noch ein weiterer Einschub zur Morphologie der Zellen erfolgen. Zytoskelett und extrazelluläre Matrix stehen in enger funktioneller Beziehung. Fibronectin ist ein Protein der extrazellulären Matrix, das zu einem Geflecht von Fibrillen aggregiert wird. Wenn sich die MycER-Aktivierung so deutlich auf das Zytoskelett auswirkt, könnte sich auch ein Effekt auf die Aggregation von Fibronectin ergeben.

Für viele durch Onkogene transformierte Fibroblasten ist eine defizitäre Aggregation von Fibronectin beschrieben worden (Brenner et al., 2000). Zellkulturen von Smoxi-4 wurden passagiert und mit hoher Zelldichte neu angezüchtet. Ein Tag nach dem Passagieren wurden die Zellen fixiert und die Fibronectinfibrillen mit Immunfluoreszenz dargestellt. Ein Teil der Zellkulturen wurden einen Tag vor dem Passagieren mit 100nM 4-OHT stimuliert. Durch diesen Versuch sollte die Auswirkung von MycER-Aktivierung auf die Aggregation von Fibronectin untersucht werden (Abb. 27). Normalerweise lässt sich ein fein strukturiertes Geflecht von Fibronectinfibrillen anfärben (Abb. 27 A). Nach vorausgegangener MycER-Aktivierung wird ein solches Geflecht von Smoxi-4 Zellen nicht mehr ausgebildet (Abb. 27 B). Fibronectin befindet sich vielmehr in unstrukturierten Akkumulationen (weißer Pfeil).

Weiterhin ist der gleiche Versuch mit Ho15.19 und TGR-1 gezeigt. Beide Zelllinien bilden gut strukturierte Fibrillen aus (Abb. 27 C, D). Auch TGR-1 *c-myc^{+/+}* Zellen aggregieren Fibronectinfibrillen, obwohl sie *c-Myc* exprimieren. Beim Passagieren befinden sich die Zellen bis zur Adhäsion für einige Stunden in Suspension. In dieser Situation wird *c-Myc* stark reprimiert (Dike and Farmer, 1988). Smoxi-4 mit 4-OHT haben jedoch auch *c-Myc*-Aktivität in Suspension. In TGR-1 steht *c-Myc* unter der Kontrolle seines streng kontrollierten Promoters, während in Smoxi-4 ein Fusionsprotein überexprimiert wird. Smoxi ist also eher ein Modell zur *c-Myc*-Aktivierung in Tumorzellen

Es wurde bereits gezeigt, dass die Transkription von Fibronectin durch *c-Myc* reprimiert wird (Coller et al., 2000). Fibronectin ist im Serum jedoch so reichlich vorhanden, dass ein *c-Myc*-induzierter Fibronectinmangel wohl nicht die Ursache des eben gezeigten Defektes sein kann. Im Northern-Blot zeigen konfluente Smoxi-4 Zellen nach 4-OHT Zugabe eine Reprimierung der Fibronectin Expression (Abb. 28). Jedoch scheint diese Repression nur in Anwesenheit von Serum stattzufinden.

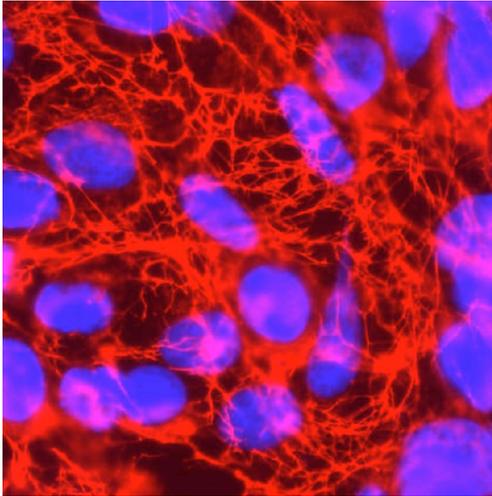
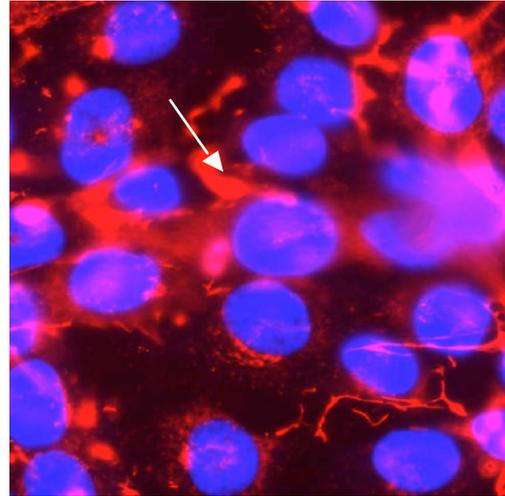
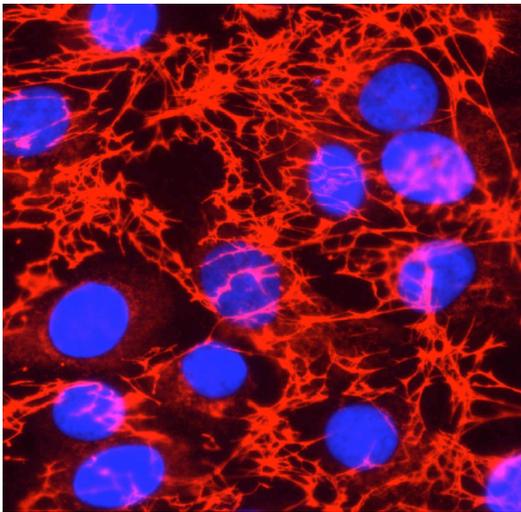
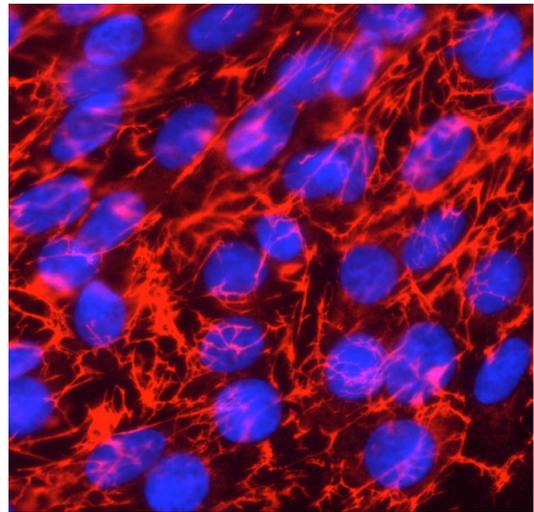
A Smoxi-4 ohne 4-OHT**B Smoxi-4 mit 4-OHT****C Ho15.19 c-myc^{-/-}****D TGR-1 c-myc^{+/+}**

Abb. 27 Aggregation von Fibronectinfibrillen. Zellkulturen von Smoxi-4, Ho15.19 und TGR-1 wurden passagiert und mit hoher Zelldichte neu angezchtet. Ein Tag nach dem Passagieren wurden die Zellen mit 4% w/v Paraformaldehyd fixiert und die Fibronectinfibrillen mit Immunfluoreszenz dargestellt. Ein Teil der Smoxi-4 Zellkulturen wurden einen Tag vor dem Passagieren mit 100nM 4-OHT stimuliert (B). Dargestellt sind: Fibronectin, anti-Fibronectin Antikörper (Cy3, rot); Zellkern, DAPI (blau). Der weiße Pfeil in (B) zeigt auf eine unstrukturierte Akkumulation von Fibronectin.

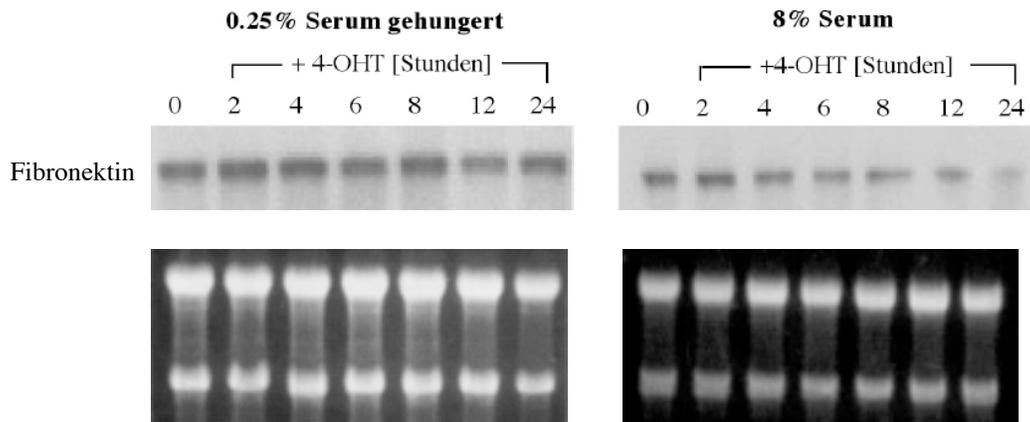


Abb. 28 Northern-Blot Analyse Fibronektin-Expression in Smoxi-4 nach MycER-Aktivierung. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA mit Phenol extrahiert und pro Spur 10 μ g RNA in 3,7%igen Agarose-Formaldehyd Gel aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer rattenspezifischen Sonde.

Möglicherweise steht die defizitäre Aggregation von Fibronektinfibrillen mit einer verminderten Expression von Oberflächenrezeptoren in Verbindung. So wurde eine Reprimierung von Integrinrezeptoren bereits beschrieben (Lopez-Rodriguez et al., 2000). Jedenfalls beeinflusst c-Myc das Zusammenspiel von Zelle und extrazellulärer Matrix und könnte sich damit auf Prozesse wie Infiltration und Metastasierung auswirken.

3.2.5 MycER Aktivierung erhöht Teilungswahrscheinlichkeit ohne Einfluß auf Zellzykluslänge

Die Untersuchung der Zelllinien Ho15.19 und TGR-1 endete in Kap. 3.1 mit dem Vergleich ihrer Sättigungsdichten. Die Analyse der Sättigungsdichten wurde dann mit Smoxi-4 aufgegriffen und fortgesetzt. Nach den Einschüben zur Morphologie von Smoxi-4 erfolgt nun die Auswertung des Teilungsverhaltens auf Einzelzellniveau.

Welchen Einfluss hat die konditionale MycER-Aktivierung auf die Zellzykluslänge von Smoxi-4? Mit Zeitrafferfilmen über 88 Stunden wurden Stammbäume von einer jeweils gleichen Ausgangszellzahl erfasst. Die Häufigkeiten der beobachteten Verdopplungszeiten von Einzelzellen sind in Abb. 29 dargestellt. Die verschiedenen Farben repräsentieren die jeweiligen Anteile der Tochtergenerationen. Eine deutliche Beschleunigung oder Verlangsamung der

Zellzyklusprogression nach 4-OHT Zugabe ist nicht erkennbar. Die Medianwerte der einzelnen Tochtergenerationen liegen recht nahe beieinander (Anhang B2). Lediglich erscheint die Verteilung mit 4-OHT nach rechts etwas verbreitert. Es treten vermehrt Verdopplungszeiten im Bereich von 30h bis 40h auf (Abb. 29, gestrichelte Linien). Durch verschiedene Farben ist der prozentuale Anteil der Tochtergenerationen aufgeschlüsselt. Hierbei lässt sich erkennen, dass mit MycER-Aktivität die höheren Generationen stärker vertreten sind (Abb. 29, vgl. Generation F3, braun). Die Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Generationen von Smoxi-4 mit 4-OHT laufen nach rechts bandförmig aus. Bei Smoxi-4 ohne 4-OHT schichten sie sich konzentrisch übereinander und wirken in Richtung längerer Verdopplungszeiten beschnitten. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Smoxi-4 Zellen unter c-Myc ihre Teilungsbereitschaft beibehalten. Die MycER-Aktivität kann eine Zelle auch dann noch zur Teilung veranlassen, wenn sie normalerweise arretieren würde.

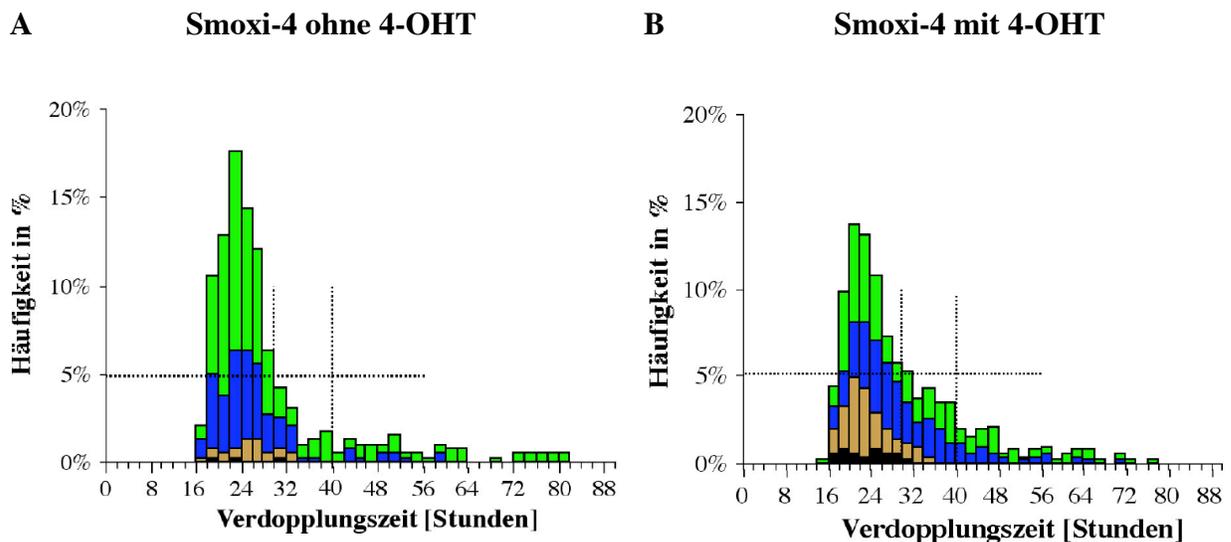


Abb. 29 Häufigkeitsverteilung der Verdopplungszeiten von Einzelzellen. Der Beobachtungszeitraum betrug 88h. Die Häufigkeiten werden in Prozent angegeben und beziehen sich auf alle beobachteten Verdopplungen. Durch die unterschiedlichen Farben wird der prozentuale Anteil der Tochtergenerationen repräsentiert. (A) Smoxi-4 ohne 4-OHT. Ausgegangen wurde von 206 Zellen der F0 Generation. Es wurden 397 Teilungen registriert (B) Smoxi-4 mit 4-OHT. Ausgegangen wurde von 214 Zellen der F0 Generation. Es wurden 502 Teilungen registriert. Weitere Daten finden sich im Anhang B2. Die Verdopplungszeit der Gesamtpopulation wurde nicht eingezeichnet (Begründung im nächsten Abschnitt Kap. 3.2.6). Repräsentation der Generationen ■ F0 ■ F1 ■ F2 ■ F3 ■ F4 ■ F5

Diese Hypothese lässt sich am besten mit der Kaplan-Meier Methode überprüfen. Mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode wurden, wie in Kap. 2.4.9 beschrieben, die Teilungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Generationen geschätzt. Generationenspezifische Kaplan-Meier Kurven für „verdopplungsfreies Überleben“ bestätigen den ersten Eindruck (Abb. 30). Fast alle Zellen der F0 Generation gehen in die Teilung, unabhängig von 4-OHT Zugabe (rote Kurve). Jedoch schon in der F1 Generation durchlaufen ohne c-Myc nur noch 77% der Zellen eine Teilung, während es unter c-Myc Aktivität noch 93% sind (grüne Kurve). Noch deutlicher wird dieses unterschiedliche Verhalten für die F2 und F3 Generationen (blaue und braune Kurve). Nur 38% der F2 und 17% der F3 Generation teilen sich weiter unter Abwesenheit von 4-OHT, jedoch 90% und 78% mit 4-OHT.

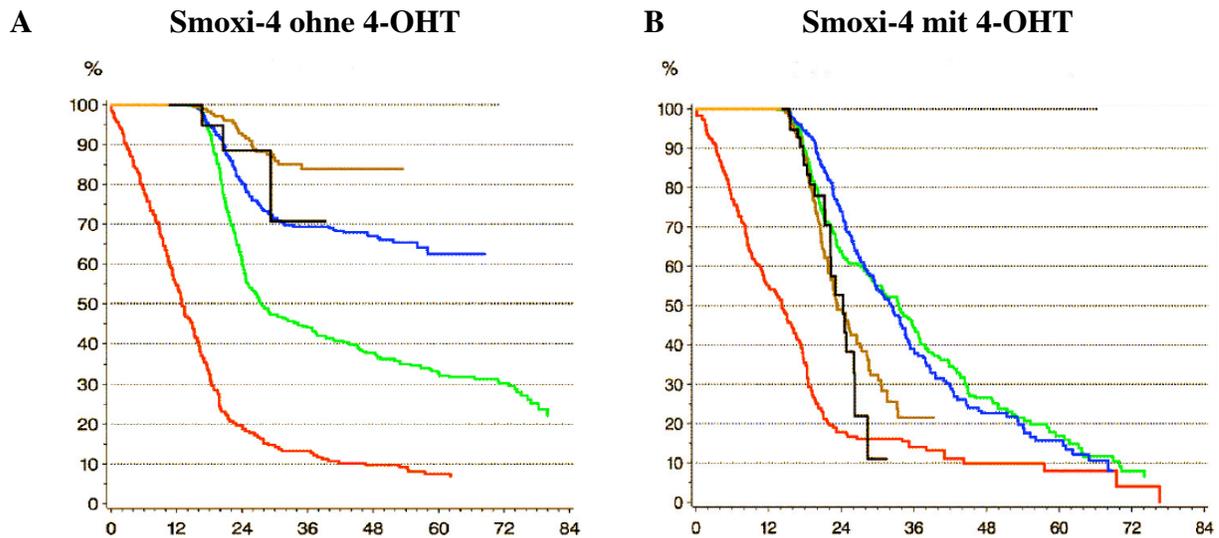


Abb. 30 Nach Generationen synchronisierte Kaplan-Meier Kurven für „verdopplungsfreies Überleben“. (A) Smoxi-4 ohne 4-OHT. (B) Smoxi-4 mit 4-OHT. Die Beobachtungszeit des Zeitrafferfilmes betrug 88h. Fallzahlen der jeweiligen Generationen. Smoxi-4 ohne 4-OHT: F0 (206), F1 (378), F2 (486), F3 (254), F4 (48), F5 (6); Smoxi-4 mit 4-OHT: F0(214), F1 (356), F2 (410), F3 (372), F4 (194), F5 (46). Generationen: ■F0 ■F1 ■F2 ■F3 ■F4 ■F5

Die erhöhte Teilungswahrscheinlichkeit von Smoxi-4 in Anwesenheit von 4-OHT hat Auswirkungen auf die Expression von bestimmten Zellzyklusproteinen. In Kap. 1.3.4 wurde auf die Bedeutung des CDK Inhibitors p27 hingewiesen (siehe auch Abb. 5).

Hohe Spiegel von p27 blockieren den Fortgang des Zellzyklus. Auf welche Weise c-Myc den Abbau von p27 bewirkt, war Gegenstand zahlreicher Arbeiten (siehe Kap. 1.3.4). Beim Auftreten

von Kontaktinhibition wird p27 induziert. Die Expression von p27 wurde in einer Smoxi-4 Zellkultur im Verlauf von Tagen beobachtet (Abb. 31, Tage -3, -2 und 0; am Tag 0 war die Kultur konfluent). In der konfluenten Zellkultur hat sich p27 deutlich angereichert (Tag 0). Eine anschließende MycER- Aktivierung in Smoxi-4 kann diesen Anstieg wieder rückgängig machen (Tag +2 und +3, ohne und mit 4-OHT). Die Zellen können die Zellzyklusblockade aufheben.

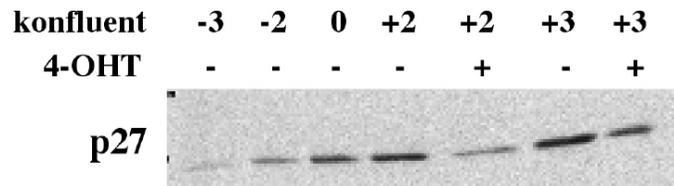


Abb. 31 Western-Blot Analyse der Expression des CDK Inhibitors p27. Eine Zellkultur von Smoxi-4 wurde über mehrere Tage ohne 4-OHT kultiviert. Nach dem Erreichen der Konfluenz (Tag 0) wurde die Kultivierung für drei weitere Tage mit und ohne 4-OHT fortgesetzt. An den angegebenen Tagen wurden die Proteine der Zellen extrahiert und mit Western-Blot Immunodetektion die p27 Expression untersucht (Antikörper: F8 anti-p27, Santa Cruz, 1:1000). Pro Spur wurden 20 μ g Proteinextrakt aufgetragen und in einem 15%igen SDS-PAGE Gel aufgetrennt.

Die Aktivierung von MycER in Smoxi-4 beeinflusst nicht die Zellzykluslänge. Der Hauptunterschied findet sich in der Teilungswahrscheinlichkeit. Die Ergebnisse der Experimente mit den Zelllinien Ho15.19 und TGR-1 führten zur gleichen Aussage. Die Expression von c-Myc reguliert die Proliferation einer Zellkultur über den Anteil teilungsaktiver Zellen. Die Zellzyklusprogression der einzelnen Zelle spielt dabei eine nebensächliche Rolle. Die biologische Relevanz dieses Prinzips wird in den weiteren Abschnitten verdeutlicht.

3.2.6 MycER Aktivierung steigert zellulären Umsatz

Der Blick durchs Mikroskop auf eine Zellkultur oder die Betrachtung eines histologischen Präparates sind Momentaufnahmen. Mit Proliferationsmarkern wie Ki-67 versucht man mehr über die Teilungsaktivität einer Zelle herauszufinden. Apoptotische Zellen können über TUNEL-Markierung (Terminale Deoxynukleotid Transferase) von DNA-Brüchen identifiziert werden. Wie aussagekräftig ist die Quantifizierung von Proliferation und Apoptose anhand so einer Momentaufnahme? Welche Vorteile bieten Zeitrafferfilme? In den beiden Zeitrafferfilmen von

Smoxi-4 (ohne und mit 4-OHT) stieg die Zellzahl von ~200 Zellen auf jeweils ~600 bis zum Ende an. Die Verdopplungszeit der Gesamtpopulation war somit nahezu identisch. Auf der anderen Seite teilten sich die Zellen unter c-Myc-Aktivität immer weiter (Abb. 30). Folglich musste die erhöhte Proliferationsrate durch vermehrte Apoptose kompensiert werden. In Abb. 32 wurde die relative Häufigkeit von Mitosen und Apoptosen im Verlauf von 88h verfolgt.

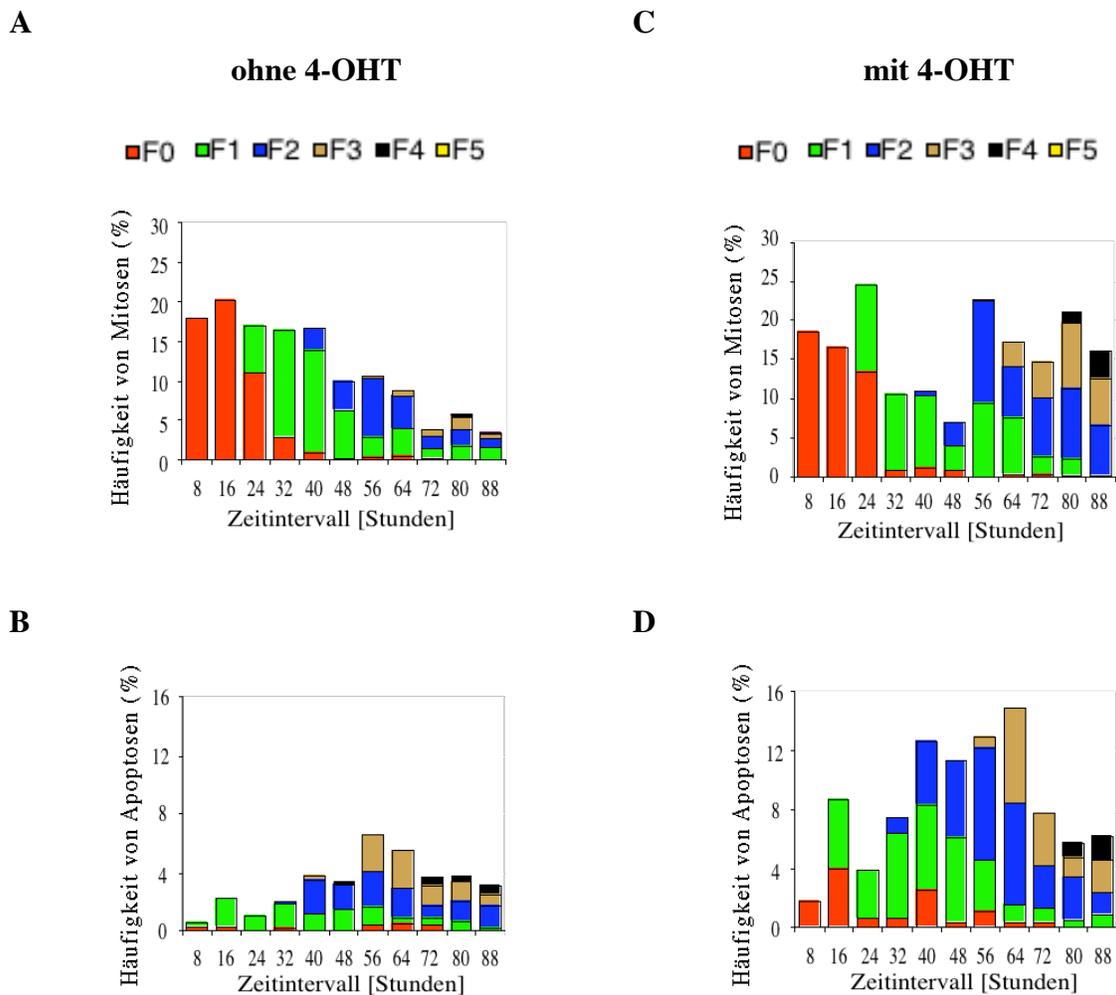


Abb. 32 Proliferations- und Apoptoserate von Smoxi-4 in Abhängigkeit von MycER-Aktivierung. Die Beobachtungszeit betrug 88h. Die Anzahl der Mitosen und Apoptosen wurde auf die Zahl der lebenden Zellen im jeweiligen Zeitintervall bezogen (8h Intervalle). Die Häufigkeit der Mitosen und Apoptosen sind prozentual nach ihrer Generationszugehörigkeit aufgeschlüsselt. (A, B) Proliferations- und Apoptoserate von Smoxi-4 ohne 4-OHT. (C, D) Proliferations- und Apoptoserate von Smoxi-4 mit 4-OHT.

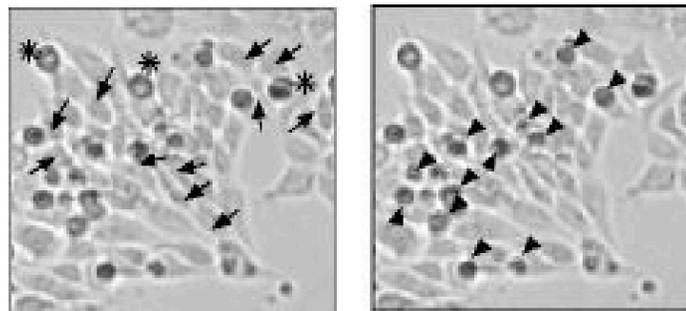
Die Häufigkeit von Mitosen nahm ohne 4-OHT von 17,8% auf 3,6% stetig ab (Abb. 32 A). MycER-Aktivierung hielt die Teilungsaktivität nach einem anfänglichen Abfall auf hohem Niveau. Im Vergleich zu 18,5% teilten sich im letzten 8h-Intervall fast unverändert 16,1% aller Zellen (Abb. 32 C). Apoptosen traten unter MycER-Aktivierung durchgehend doppelt so häufig auf. Im zeitlichen Verlauf glichen sich beide Kurven (Abb. 32 B, D). Daraus ergibt sich folgende bemerkenswerte Feststellung. Innerhalb von 88 Stunden sind nach c-Myc-Aktivierung 162 Zellen zusätzlich entstanden und durch Apoptose wieder verschwunden (Abb. 33 A). Hinter dem Anstieg der Zellzahl von 214 auf 548 Zellen verbirgt sich eine gewaltige Zahl von 351 apoptotischen Zellen, die sich nur vorübergehend in der Kultur befunden haben.

A

	Ohne 4-OHT	Mit 4-OHT
Zellzahl zu Beginn (0h):	206	214
Zellzahl nach 88h:	603	548
Apoptosen innerhalb von 88h:	189	351
Gesteigerter Umsatz von Zellen:		162

B

Smoxi-4 mit 4-OHT



Zellteilungen

Apoptotische Zellen

Abb. 33 (A) Gesteigerter Umsatz von Zellen nach MycER-Aktivierung. Aufgelistet sind die Zellzahl zu Beginn und nach 88 Stunden Beobachtung, sowie die Zahl der Apoptosen. Bei fast gleicher Anfangs- und Endzellzahl wurden nach MycER-Aktivierung deutlich mehr Apoptosen registriert. In der Tat muss die Endzellzahl und die Zahl der Apoptosen nach 4-OHT Zugabe noch nach oben korrigiert werden. Im Zeitrafferfilm mit 4-OHT mussten 53 Zellen mehr vorzeitig zensiert werden, vor allem im Zeitraum zwischen 40h und 80h. Die zensierten Zellen und ihre potentiellen Tochterzellen gehen der Endzellzahl somit verloren. Die Auswirkung ist aber gering. (B) Darstellung von Mitosen und Apoptosen in einem Ausschnitt des Zeitrafferfilmes. Zellen, die in den letzten 10h eine Mitose durchgeführt haben sind mit ganzen Pfeilen (□) markiert. Sternchen (*) zeigen Zellen die gerade eine Mitose durchführen. Pfeilspitzen (▶) weisen auf apoptotische Zellen hin.

Die vermehrte Apoptoserate von Smoxi-4 nach MycER-Aktivierung verzerrt die Verdopplungsdauer der Gesamtpopulation, weil die Zellzahl trotz hoher Teilungsaktivität nur langsam zunimmt. Aus diesem Grund wurde auf die entsprechende Angabe der Verdopplungszeiten der Gesamtpopulationen in Abb. 29 verzichtet.

Zur Veranschaulichung des gesteigerten Umsatzes von Zellen wurden in einem Film über 10 Stunden alle Mitosen und Apoptosen markiert (Abb. 33 B). Denkt man sich eine Überlagerung der beiden Bilder, so wird die Dynamik dieser Zellkultur offensichtlich. Die MycER-Aktivierung zwingt Smoxi-4 Zellen entweder zur Mitose oder Apoptose.

Die exakte Quantifizierung des zellulären Umsatzes ist für das Verständnis von Tumorstadium von großem Interesse. Krebs ist die Folge stufenweiser Akkumulation von genetischen Veränderungen (Lengauer et al, 1998). Durch Zellteilungen wird eine Mutation in einem Zellverband verbreitet und der Erwerb weiterer genetischer Veränderungen begünstigt. Solange die Zellen eine hohe Apoptoserate aufweisen, muss keine Größenzunahme erfolgen. Es kann sich also um kleinste unerkannte Herde handeln. Das Smoxi-4 Zellsystem simuliert solch einen Mikroherd. Die alleinige Aktivierung des Onkogens c-Myc setzt diesen Prozess in Gang.

Je höher die Generation einer Zelle nach einer gewissen Beobachtungszeit ist, desto mehr Teilungen hat sie in der Vergangenheit vollzogen. Die Generationszugehörigkeit der Zellen nach 88h Stunden Beobachtung ist eine anschauliches Beispiel dafür, wie unterschiedlich in zwei Zellkulturen die Ausbreitung und der Erwerb genetischer Mutationen durch Teilung und Apoptose begünstigt sein kann, obwohl die Zellzahl gleichermaßen zugenommen hat (Abb. 34).

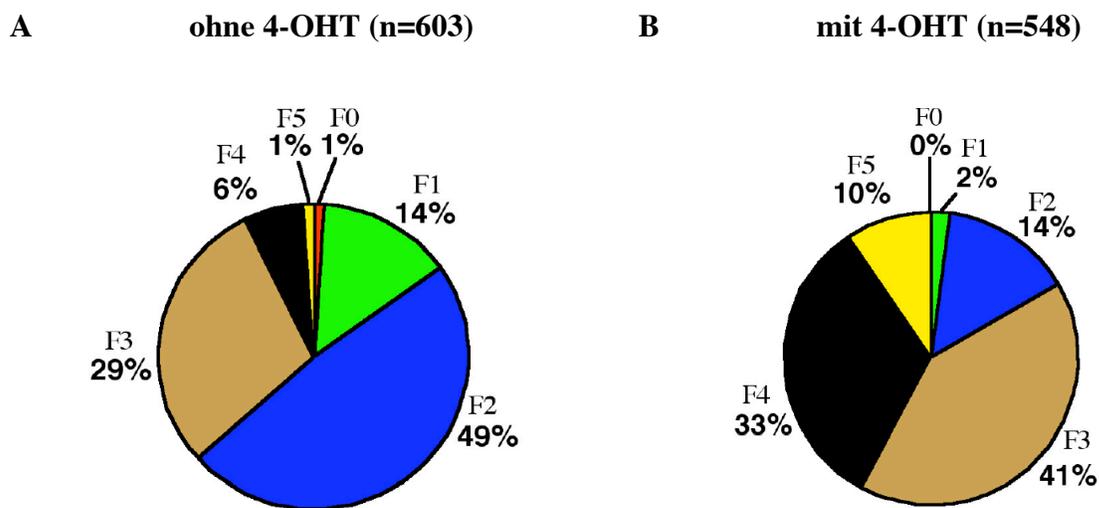


Abb. 34 Generationszugehörigkeit der Zellen nach einem Beobachtungszeitraum von 88h. Die prozentualen Anteile sind auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen am Beobachtungsendpunkt bezogen. (A) Smoxi-4 ohne 4-OHT (B) Smoxi-4 mit 4-OHT.

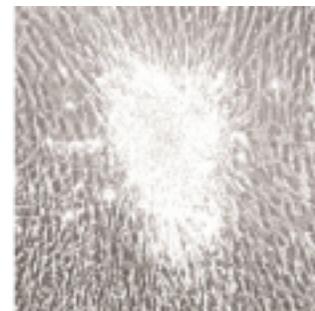
Ohne 4-OHT befanden sich 29% in der F3 Generation und nur 6% und 1 % in der F4 bzw. F5 Generation. MycER-Aktivierung bewirkte eine Verschiebung zu Gunsten der höheren Generationen. In der Tat gehörten 41% der Zellen zur F3, und sogar 33% und 10% zur F4 bzw. F5 Generation. Die Zellen haben demnach deutlich mehr Mitosen durchlaufen. In einem Zellverband irgendwo im Körper könnte sich eine primäre Läsion so über lange Zeit unbemerkt genetisch verändern. Erst eine weitere Mutation, die z.B. die Apoptose der Zellen außer Kraft setzt, würde dann zu einem expansiven malignen Wachstum führen.

3.2.7 Erhöhte Mitose- und Apoptoserate begünstigen Focusbildung in Smoxi-4

Welche Zellkulturexperimente könnten das oben beschriebene Tumormodell stützen? Wenn eine Smoxi-4 Kultur mit aktiviertem MycER die Sättigungsdichte erreicht, erscheint dieses in Zählexperimenten als Proliferationsstopp. In Wirklichkeit werden aber apoptotische Zellen ständig durch neue Zellen ersetzt. Zeitrafferaufnahmen einer bereits über 10 Tage konfluenten Smoxi-4 Zellkultur zeigen auch jetzt noch bei ständiger Anwesenheit von 4-OHT eine vierfach erhöhte Proliferationsrate (bezogen auf die untersuchte Fläche). In den Filmen kann man eindrücklich sehen, wie apoptotische Zellen von den anderen Zellen aufgenommen werden. Dieser Vorgang vollzieht sich innerhalb weniger Stunden. Bei einfachem Betrachten der Zellkultur durch ein Mikroskop unterschätzt man das Ausmaß der Apoptose erheblich.

Der Selektionsdruck für weitere transformierende Mutationen steigt, und so ist es nicht verwunderlich, dass Smoxi-4 Zellen unter Tamoxifen schon nach zwei Wochen zur Focusbildung neigen. Focusbildung ist ein Charakteristikum transformierter Zellen und in Fibroblasten häufig mit Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 oder Verlust von p19 ARF verbunden. Ohne Zusatz von Tamoxifen zum Medium war auch nach vier Wochen keine Focusbildung zu beobachten.

Abb. 35 Focusbildung von Smoxi-4 bei ständiger MycER-Aktivierung über 14 Tage. Smoxi-4 Zellen wurden in einer Kulturschale angezüchtet alle 3-4 Tage mit neuem Kulturmedium (mit 4-OHT) versorgt. Es wurden auch Zeitrafferfilme angefertigt und die Teilungsaktivität bestimmt. Zum Vergleich diente eine unstimulierte Kultur, die ansonsten identisch behandelt wurde. Die Mikroskopaufnahme im Phasenkontrast zeigt, wie die Zellen übereinander aus dem Niveau herauswachsen. Es bildet sich ein hell leuchtender Focus.



3.2.8 Ist c-Myc essentiell für das Überwinden der Kontaktinhibition?

Fehlende c-Myc Expression in Ho15.19 führt zu Zellzyklusarrest bei niedriger Sättigungsdichte. Primäre Fibroblasten (TGR-1) erreichen eine deutlich höhere Zelldichte, stellen ihre Proliferation aber schließlich ebenfalls ein. Die Expression des endogenen c-Myc wird stark reduziert, bzw. ist kaum mehr nachweisbar. Haben die Zellen ihre Teilungsfähigkeit endgültig verloren? Sicherlich nicht, denn die Zellen lassen sich nach dem Passagieren bei niedriger Zelldichte wieder kultivieren. Also besitzen die Zellen ihre Teilungsfähigkeit noch. Die inhibitorischen Signale eines konfluenten Zellverbandes müssen jedoch ausgesprochen dominant sein. Gibt es eine Möglichkeit, die Zellen trotzdem zu einer weiteren Teilung anzuregen? Primäre Fibroblasten eines konfluenten Zellverbandes treten im Rahmen einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren wieder in eine Mitose ein. Kurz nach einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren steigt die Expression von c-Myc um das Vielfache an, um bald darauf wieder abzufallen. Ist c-Myc wesentlich an der Reaktion auf Wachstumsfaktoren beteiligt, und wie wirkt sich seine Abwesenheit aus?

Ein einfacher Versuch sollte diese Frage untersuchen. Zellen wurden zu einer konfluenten Kultur gezüchtet. Die Wachstumsfaktoren im Medium dürften nun deutlich reduziert sein. Das Kulturmedium wurde aspiriert und durch neues ersetzt. Jetzt musste nur noch gezeigt werden, zu welchem Prozentsatz die Zellen erneut in eine Mitose eintreten. Durch die Zugabe von Colchicin wurden die Zellen an der Ausbildung der Teilungsspindel gehindert. Die Zellen konnten dadurch ihre Teilung nicht vollenden und stellten sich abgerundet dar. Im Phasenkontrast-Mikroskop erschienen abgerundete Zellen sehr hell und ließen sich leicht identifizieren. Inaktive Zellen blieben unbeeinflusst. Durch die Zugabe von Colchicin sammelt man alle mitotischen Zellen über die Zeit. Es handelt sich also um das Integral der Mitoserate. Dieser Versuchsansatz bietet trotz einer mehr qualitativen Aussage Vorteile. Die Beobachtung an der lebenden Zellkultur ermöglicht eine kontinuierliche Beobachtung in kurzen Zeitabständen an derselben Kultur. Es besteht also keine Gefahr, dass Effekte nach Serumstimulation nicht bemerkt werden, weil z.B. zu früh ausgewertet wird. Für eine grobe Quantifizierung wurde in einem weiteren Experiment auch eine Zählung vorgenommen.

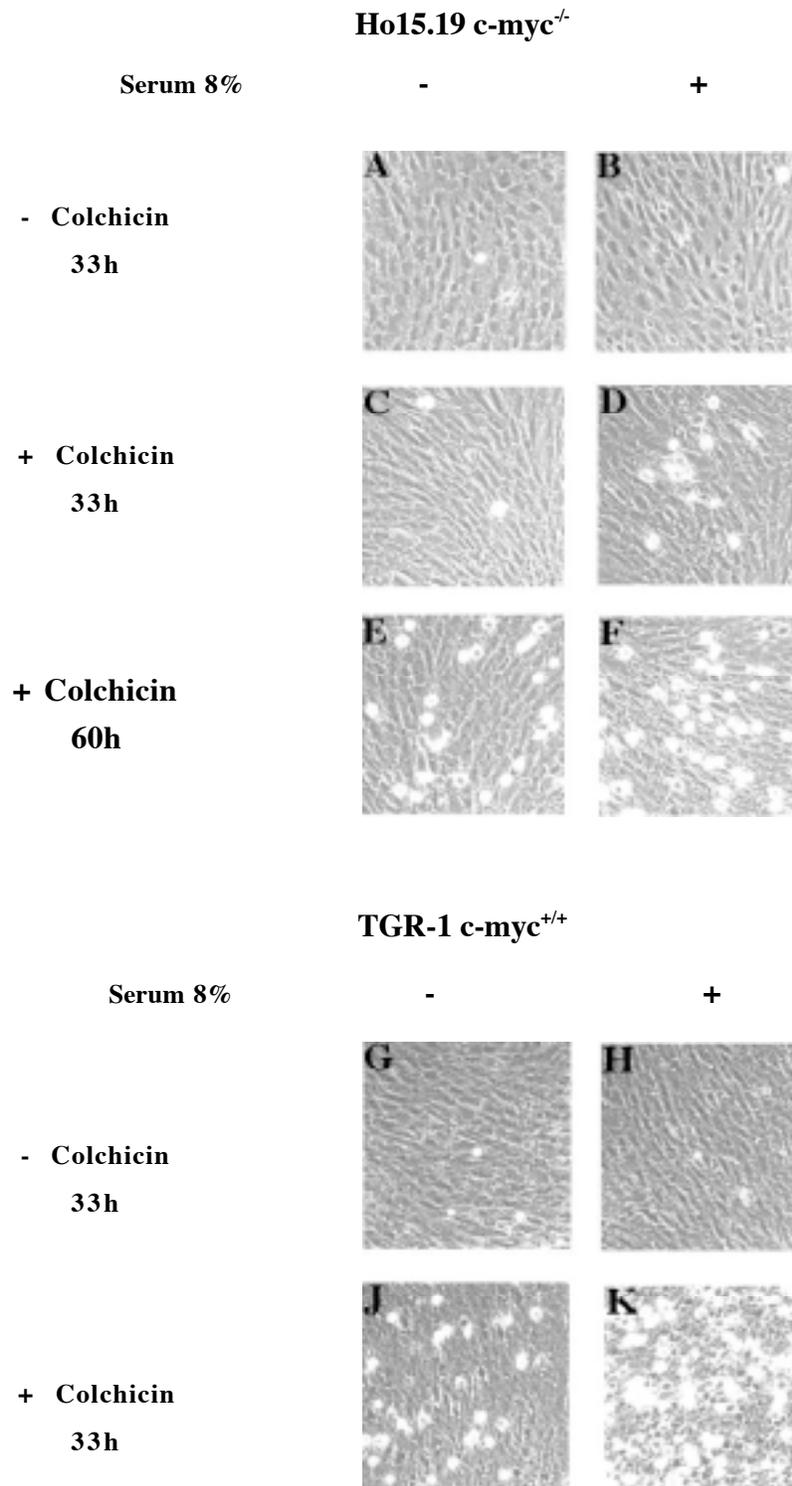
Die Zelllinien Ho15.19, Smoxi-4, TGR-1 und TGR-1/MycER ermöglichten nun, die Rolle von c-Myc für diesen Proliferationsschub näher zu beleuchten. Die unterschiedliche Expression von endogenem c-Myc und MycER in diesen Zellen erlaubte gezielte Fragen nach der Rolle von c-Myc-Funktionen. Die zentrale Frage dieses Experiments bestand darin, ob Smoxi-4 Zellen zum erneuten Eintritt in eine Mitose der zusätzlichen Aktivierung des MycER Fusionsproteins bedürfen.

	endogenes c-Myc	MycER
Ho15.19	-	-
Smoxi-4	-	+
TGR-1	+	-
TGR-1/MycER	+	+

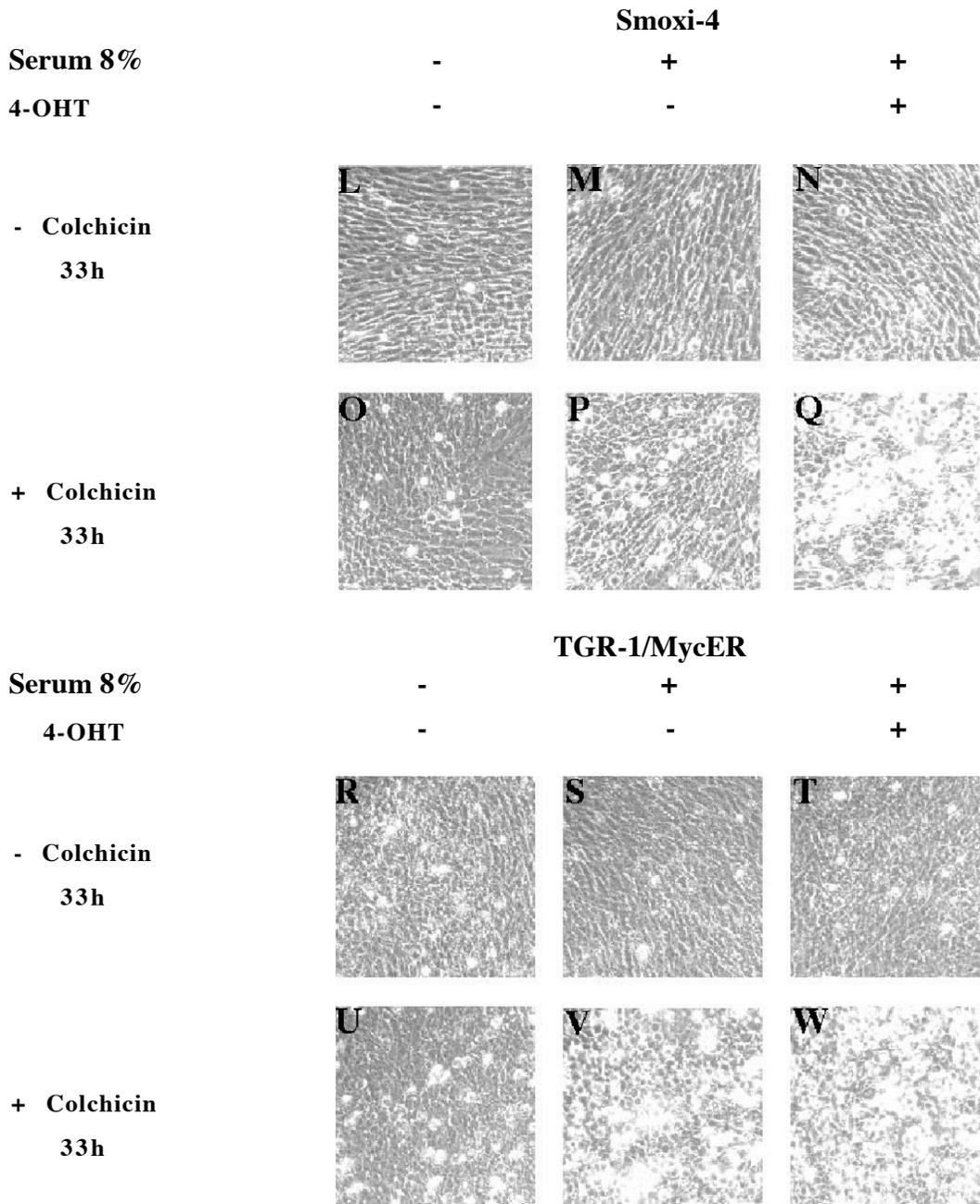
Bei allen Zelllinien wurde der Anteil mitotischer Zellen nach Serumstimulation mit einer unstimulierten Kultur verglichen. In Kulturen von Smoxi-4 und TGR-1/MycER wurde neben alleiniger Serumstimulation noch der Effekt einer zusätzlichen MycER-Aktivierung untersucht. Die Abb. 36 zeigt repräsentative Bildausschnitte der Mikroskopaufnahmen 33h nach Serumstimulation. Im folgenden Text werden die einzelnen Abbildungen besprochen. Hier nur einige allgemeine Vorbemerkungen. Die hell leuchtenden Punkte entsprechen abgerundeten mitotischen Zellen und stellen sich nur mit Colchicin Behandlung dar. Der Vergleich mit einer Colchicin unbehandelten Referenzkultur bestätigt diesen Effekt (vgl. z.B. Abb. 36 H, K). Ohne Colchicin erscheint die Kultur als intakte Zellschicht. Für alle Zelllinien sind im Folgenden die unstimulierten Kontrollkulturen gezeigt. Eine geringe Zahl abgerundeter Zellen in einer unstimulierten Zellkultur bedeutet eine geringe Teilungsaktivität. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für das jeweilige Stimulationsexperiment (Abb. 36 C, J, O, U).

Ho15.19 Zellen zeigten nur eine geringe Zahl mitotischer Zellen nach Stimulation im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (Abb. 36 C, D). Auch nach 60h unterschieden sich stimulierte und unstimulierte Kulturen nur wenig (Abb. 36 E, F). Der Proliferationsschub ist also nicht verzögert, sondern ausgeblieben. Die Kultur der TGR-1 Fibroblasten reagierte deutlich auf die Serumstimulation (Abb. 36 J, K). Eine große Zahl von abgerundeten Zellen stellt sich dar. Der Vergleich von Ho15.19 und TGR-1 legt nahe, dass der beobachtete Unterschied auf die fehlende c-Myc-Expression zurückzuführen ist. Bei fehlender Expression von c-Myc lassen sich durch Aktivierung mitogener Signalwege nur noch wenige Zellen zur Teilung anregen. Die effiziente Umsetzung einer solchen Stimulation wird blockiert. Die Zelllinie Smoxi-4 sollte es nun ermöglichen, diesen Effekt durch MycER-Aktivierung zu steuern. Wie bei Ho15.19 veranlasste die alleinige Serumstimulation nur wenige Zellen zu einer Mitose (Abb. 36 O, P). Die Teilungsaktivität nahm durch zusätzliche MycER-Aktivierung deutlich zu (Abb. 36 Q). Der Bildausschnitt ist zu einem großen Teil mit abgerundeten Zellen übersät.

Als Nebenbemerkung sei noch kurz auf die Abbildungen 36 L, M und N verwiesen. Das gleiche Experiment wie Abb. 36 O, P und Q ist hier ohne Colchicin Zugabe gezeigt. Die Bilder zeigen Kulturen, die einander sehr ähnlich sind. Der Metaphase-Block mit Colchicin filtert sehr eindrücklich die teilungsaktiven Zellen heraus. Das Colchicin Experiment stellt somit einen einfachen Weg dar, um die Mitoserate eines Zellverbandes in Kultur dynamisch zu untersuchen.

**Abb. 36 A-K**

Repräsentative Ausschnitte der Phasenkontrastaufnahmen von Ho15.19 und TGR-1 (100x Vergrößerung). Konfluente Zellkulturen wurden mit Serum stimuliert. Der Anteil mitotischer Zellen kommt in Anwesenheit von Colchicin durch helle Lichtreflexe zur Darstellung. Unstimulierte Zellen sowie Kulturen ohne Colchicin sind als Kontrollen gezeigt.

**Abb. 36 L-W**

Repräsentative Ausschnitte der Phasenkontrastaufnahmen von Smoxi-4 und TGR-1/MycER (100x Vergrößerung). Konfluente Zellkulturen wurden mit Serum oder Serum und 4-OHT stimuliert. Der Anteil mitotischer Zellen kommt in Anwesenheit von Colchicin durch helle Lichtreflexe abgerundeter Zellen zur Darstellung. Unstimulierte Zellen sowie Kulturen ohne Colchicin sind als Kontrollen gezeigt.

In Abb. 36 R-W wurde das gleiche Experiment mit der Zelllinie TGR-1/MycER durchgeführt. Wachstumsfaktoren induzieren endogene c-Myc Expression in TGR-1/MycER. Wie zu erwarten, stellte sich nach alleiniger Serumstimulation eine Vielzahl abgerundeter Zellen dar. (Abb. 36 U, V). Eine zusätzliche MycER-Aktivierung führte zu einem gleichen Effekt (Abb. 36 W). Gibt es einen Unterschied zwischen diesen beiden Situationen (Abb. 36 V, W)?

Eine mögliche Antwort bietet die Northern-Blot Analyse der endogenen c-Myc-Expression (Abb. 37). Das endogene c-Myc lässt sich durch Serum gut induzieren. Die Aktivierung von MycER führt aber zu einer Repression, so dass keine endogene c-Myc Induktion stattfindet. Die Autorepression von c-Myc an seinem eigenen Promoter ist in der Literatur gut beschrieben (Penn et al., 1990). Dies könnte bedeuten, dass bei Zugabe von 4-OHT das MycER-Fusionsprotein das endogene c-Myc durch Repression ersetzt, und seine Funktion übernimmt.

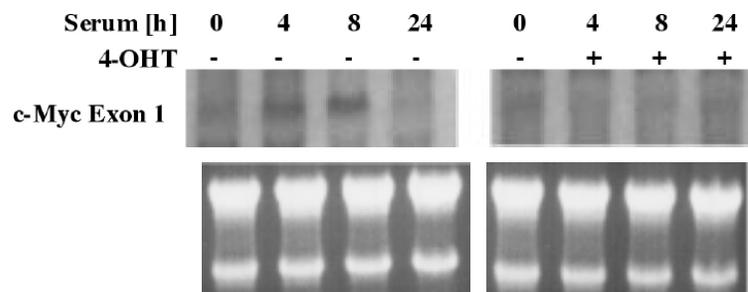


Abb. 37 Northern-Blot Analyse der endogenen c-Myc Expression in einer konfluenten TGR-1/MycER Zellkultur nach Serumstimulation. Die Zellkulturen wurden mit Serum alleine oder mit Serum und 100nM 4-OHT stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA mit Phenol extrahiert. Pro Spur wurden 10 μ g RNA aufgetragen und in einem 3,7% Formaldehyd-Agarose Gel aufgetrennt. Zur Ladekontrolle sind die Ethidiumbromid gefärbten Gele gezeigt. Um eine Kreuzhybridisierung mit dem MycER zu verhindern, wurde eine rattenspezifische c-Myc Exon1 Probe verwendet. Das MycER enthält nur die beiden kodierenden Exons 2 und 3 des humanen c-Myc. Der Northern-Blot zeigt also ausschließlich die Expression des endogenen c-Myc.

Die Abbildung 36 zeigt repräsentative Ausschnitte der Zellkultur. Wie bereits angedeutet erfolgte auch eine grobe Quantifizierung des Effektes. Das Bestimmen der Zunahme der Zellzahl war allerdings technisch sehr schwierig, weil eine extreme Genauigkeit gefordert ist. Da bei adhärennten Zellen für jeden Messwert eine unabhängige Zellkultur verwendet werden muss, beeinträchtigen Abweichungen in den einzelnen Kulturen den unmittelbaren Vergleich. Außerdem ist die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus einer konfluenten Fibroblasten-Zellschicht sehr problematisch, da z.B. aus toten Zellen ausgetretene DNA das Verklumpen stark fördert. Streuungen, die in anderen Zählexperimenten unerheblich sind, verhindern in diesem

Experiment eine exakte Auswertung. Die qualitativen Aussagen lassen sich jedoch ohne weiteres durch diese Quantifizierung bestätigen (Abb. 38). Die wichtigste Beobachtung dieser Experimente ist die Abhängigkeit des Proliferationsschubes in Smoxi-4 von der MycER Aktivierung. Die Zunahme der Zellzahl entspricht dann in etwa dem beobachteten Zuwachs bei TGR-1 (Abb. 38).

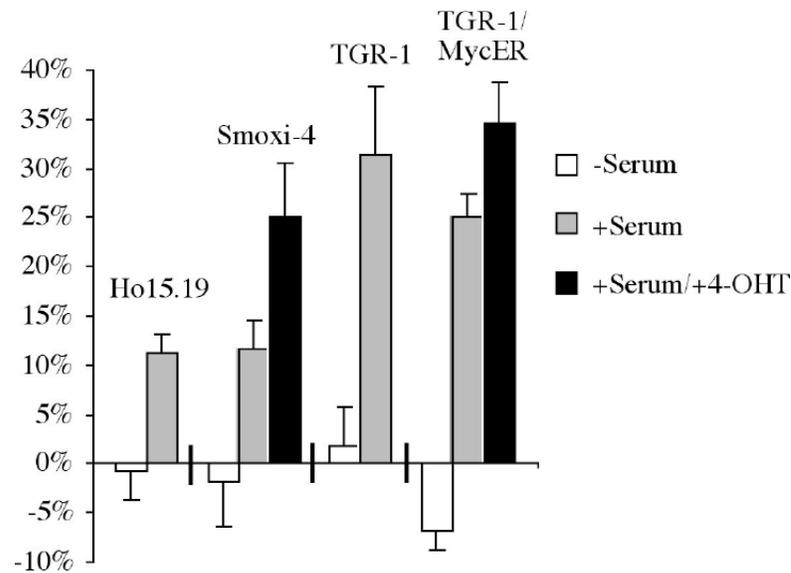


Abb. 38 Quantifizierung der Experimente von Abb. 36. Der Experimentaufbau wurde im Zusammenhang mit Abb. 36 bereits erläutert. Unmittelbar vor der Stimulation wurde die Zellzahl in Referenzkulturen bestimmt. Nach 33h wurde die Zellzahl unter der jeweiligen Bedingung (-Serum, +Serum, +Serum/+4-OHT) ermittelt. Die Veränderungen zum Vortag sind in Prozent angegeben. Es wurden jeweils vier unabhängige Ansätze ausgewertet. Zum Auszählen wurden die Zellen nach Waschen mit PBS mit Trypsin-EDTA inkubiert. Die Resuspension erfolgte in PBS/2%FKS/5mmEDTA. Es wurde auf die Herstellung einer Einzelzellsuspension geachtet. Mit Hilfe eines Coulter Counters wurde die Zellzahl bestimmt.

3.2.9 Die Auswirkung von konditionaler Myc-Aktivität auf die Expression von c-Myc regulierten Genen in Smoxi-4

Um Fibroblasten einer konfluenten Zellkultur effizient zu erneuter Teilung anzuregen, bedarf es der Expression von c-Myc. Ohne die Funktion dieses integrierenden Transkriptionsfaktors ist nur ein kleiner Teil der Kultur sensitiv gegenüber den Wachstumsfaktoren.

Anhand zweier bekannter Zielgene ODC (Ornithindecarboxylase) und Gadd45 („growth arrest“-Gen) wurde exemplarisch mit Northern-Blot Analyse untersucht, wie sich deren Expression in den Experimentansätzen von Abb. 36 verhält. ODC wird durch c-Myc induziert, Gadd45 reprimiert. Andererseits wurde in Ho15.19 bereits gezeigt, dass ODC und Gadd45 auch durch Wachstumsfaktoren in Abwesenheit von c-Myc reguliert werden (Bush et al., 1998; Abb. 39).

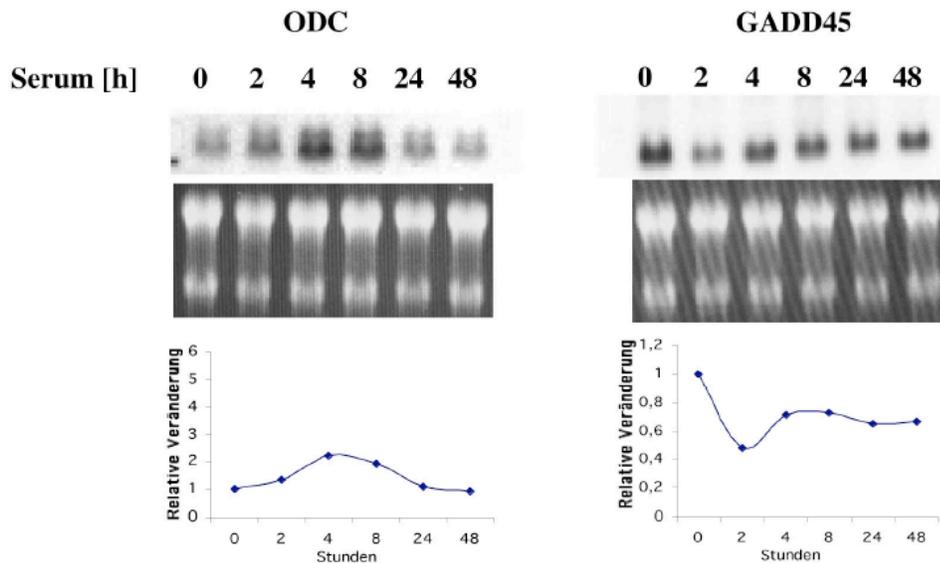


Abb. 39 Northern-Blot Analyse zur Regulation der c-Myc Zielgene ODC und GADD45 in der c-myc^{-/-} Zelllinie Ho15.19 nach Serumstimulation. Konfluente Zellkulturen wurden für die angegebene Zeit mit Serum stimuliert und die RNA mit Phenol extrahiert. Pro Spur wurden 10 µg RNA aufgetragen und in einem 3,7% Formaldehyd-Agarose Gel aufgetrennt. Zur Ladekontrolle sind die Ethidiumbromid gefärbten Gele gezeigt. Hybridisiert wurde mit rattenspezifischen cDNA Sonden. Die Quantifizierung der Expression erfolgte durch Auswertung der radioaktiven Signale mit dem PhosphoImager.

Für ODC ergab sich eine maximale Induktion um den Faktor 2,5 und für Gadd45 eine Repression um 0,5. Diese Veränderung sollte sich nun auch für Smoxi-4 ergeben, solange MycER nicht aktiviert wird. Mit der Zelllinie Ho15.19 wurden somit Referenzwerte erhoben, mit denen die Ergebnisse der Zelllinie Smoxi-4 verglichen werden können.

Die Northern-Blot Analyse wurde mit der Zelllinie Smoxi-4 gleichermaßen durchgeführt. Die Expression von ODC steigt nach alleiniger Serumstimulation auf das Dreifache an (Abb. 40). Dieser Wert entspricht der eben beschriebenen Induktion in Ho15.19. Die Aktivierung von

MycER in Smoxi-4 kann diese Induktion nun deutlich steigern (5,5fach). Für Gadd45 ergeben sich entsprechende Veränderungen.

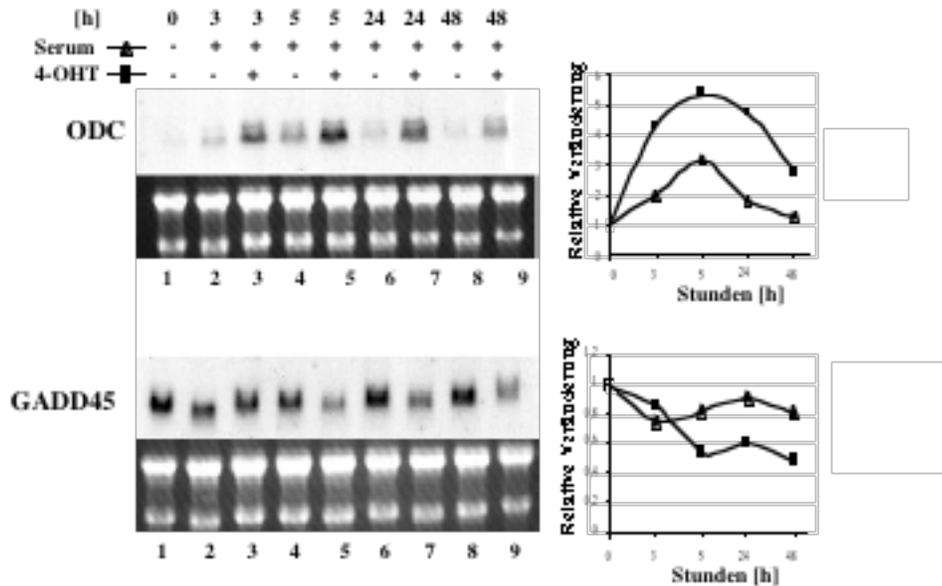


Abb. 40 Northern-Blot Analyse zur Regulation der c-Myc-Zielgene ODC und GADD45 in der Zelllinie Smoxi-4 nach Serumstimulation. Konfluente Zellkulturen wurden für die angegebene Zeit mit Serum bzw. Serum und 4-OHT stimuliert und die RNA mit Phenol extrahiert. Pro Spur wurden 10 µg RNA aufgetragen und in einem 3,7% Formaldehyd-Agarose Gel aufgetrennt. Zur Ladekontrolle sind die Ethidiumbromid gefärbten Gele gezeigt. Hybridisiert wurde mit rattenspezifischen cDNA Sonden. Die Quantifizierung der Expression erfolgte durch Auswertung der radioaktiven Signale mit dem PhosphoImager.

Welche Schlüsse kann man aus diesen exemplarisch durchgeführten Analysen der Genexpression von c-Myc-Zielgenen ziehen? Die meisten der bekannten c-Myc-regulierten Gene lassen sich in Ho15.19 auch durch Serumstimulation beeinflussen, sind also keine ausschließlichen c-Myc-Zielgene (Bush et al., 1998). Gemessen an der Expressionsstärke dieser Gene bewirkt c-Myc eine effiziente Umsetzung mitogener Stimuli. Die dauerhafte Myc-Aktivität, wie sie im Smoxi-Zellsystem möglich ist, stellt im weiteren Verlauf die Expression dieser Gene auf ein höheres bzw. niedrigeres Niveau ein (Abb. 40, 48h Werte). Spiegelt die unterschiedliche Zielgenexpression die Veränderung in jeder einzelnen Zelle wieder? Oder beobachten wir einfach nur mehr teilungsaktive Zellen? Auf diese Frage wird in der Diskussion näher eingegangen.

Für das Verständnis der Rolle von c-Myc bei der Tumorentstehung ist die Funktion der einzelnen c-Myc-regulierten Gene ein wichtiger Schritt. Bei den bisher üblichen Experimenten

mussten Fibroblasten mit dem MycER System durch Serumentzug arretiert werden, um die Expression des endogenen c-Myc zu unterdrücken. Die Zugabe von 4-OHT erfolgte dann zu den gehungerten Zellen. Mit dem Smoxi-4 System ist es nun möglich in Anwesenheit von Serum zu experimentieren. Auf diesem Weg könnte man nun wichtige regulierte Gene mit Hilfe von cDNA Chips identifizieren, die zur Aufhebung der Kontaktinhibition von wesentlicher Bedeutung sind und für deren Regulation c-Myc eine wesentliche, wenn nicht essentielle Rolle spielt.

3.3 Das Myc/Max/Mad-Netzwerk

3.3.1 Der c-Myc-Antagonist Mad-1 reguliert Teilungswahrscheinlichkeit

c-Myc ist Mitglied eines präzise regulierten Netzwerkes von Transkriptionsfaktoren, die mit dem gemeinsamen Bindungspartner Max dimerisieren (Abb. 2). Das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Heterodimeren wird z.B. durch mitogene Stimuli in Richtung Myc/Max verschoben. Dadurch werden inhibitorische Signale auf den Zellzyklus leichter überkommen. Betrachtet man eine Kultur, so erhöht sich dadurch die Teilungswahrscheinlichkeit der Zellen (siehe Kap. 3.1.2 und 3.2.5). Ist es im Gegenzug nun möglich, durch Verlagerung des Gleichgewichts zu Gunsten der antagonistischen Mad/Max Heterodimere die Teilungswahrscheinlichkeit einer Zelle zu senken, ohne dabei den Zellzyklus der einzelnen Zelle zu verlängern?

Für diese Untersuchung bedarf es demnach einer Zelllinie, in der sich die Expression von Mad regulieren lässt. Die Zelllinie M47 exprimiert unter der Kontrolle eines tet-off Systems humanes Mad1 (Gehring et al., 2000). Durch die Zugabe von Tetrazyklin ins Medium kann die Expression von Mad1 unterbunden werden. M47 ist aus der Osteosarkom Zelllinie UTA (einem Abkömmling der U2OS Osteosarkomzelllinie mit dem Tetrazyklin Transaktivator) etabliert worden. Ein Western Blot zeigt die Repression von Mad1 nach Zugabe von Tetrazyklin (Abb. 41). Die Wahl dieses Zellsystems begründet sich in seiner bereits erfolgten guten Charakterisierung (Gehring et al., 2000). Die Expression von Mad1 ließ sich zuverlässig in allen Zellen induzieren, wie es durch Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden konnte (Gehring et al., 2000). Die Zellen werden normalerweise in Anwesenheit von Tetrazyklin kultiviert, d.h. in Abwesenheit von Mad1. Um eine Mad1 Expression in den Zellen schon bei Beginn des Zeitrafferfilmes zu gewährleisten, wurde den Zellen bereits 96 Stunden vor Beginn der

Beobachtung das Tetrazyklin aus dem Medium entfernt. Nach diesem Zeitintervall kann man von einer Mad1 Expression in allen Zellen ausgehen.

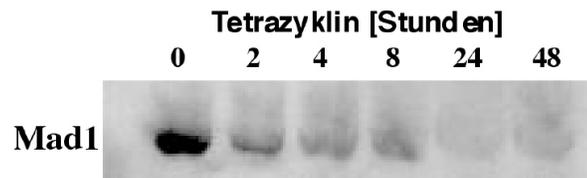


Abb. 41 Regulation des Mad1 Proteins in M47 Osteosarkomzellen nach Zugabe von Tetrazyklin. Mehrere Zellkulturen wurden ohne Tetrazyklin kultiviert. Daraufhin wurde 1000ng/ml Tetrazyklin ins Medium gegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden mit Schindler-Puffer Zellextrakte angefertigt. Je 20µg Protein wurden pro Spur aufgetragen und in einem 12% SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Die Immunodetektion erfolgte mit einem monoklonalen anti-Mad1 Antikörper (E. Kremmer, GSF, München). Die Expression des Mad1 Proteins fällt sehr schnell ab.

Die Auswirkung der Mad1 Expression auf die Zellzykluslänge wurde wiederum mit Zeitrafferfilmen untersucht (Abb. 42). Der Beobachtungszeitraum betrug 72 Stunden. Das Maximum der Verdopplungszeiten liegt in Abwesenheit von Mad1 zwischen 20h und 24h (Abb. 42 A). Die Expression von Mad1 bewirkt eine Verschiebung des Maximums um 6h in den Bereich zwischen 26h und 30h (Abb. 42 B). Jedoch liegt bei Mad1 Expression wie im Falle der *c-myc*^{-/-} Zellen die Verdopplungszeit der Gesamtpopulation deutlich entfernt vom Maximum der individuellen Verdopplungszeiten. Die Verlängerung der Populationsverdopplungsdauer von 31h auf 58h ist nicht durch eine entsprechende Verlangsamung der Einzelzelle verursacht, auch wenn es eine leichte Rechtsverschiebung gibt. Die Apoptoserate war in beiden Fällen mit 1,09% und 2,56% (mit und ohne Tetrazyklin) vernachlässigbar gering. Ein zahlenmäßig bedeutender Zellverlust durch Apoptose unter Mad1 Expression liegt also nicht vor. Es muss also unter Mad1 Expression eine heterogene Zellkultur von teilungsaktiven und teilungsinaktiven Zellen vorliegen. Für Ho15.19 wurde in Kap. 3.1 der gleiche Sachverhalt beschrieben. Die Abwesenheit von *c-Myc* oder die Expression von Mad1 verändern also das Teilungsverhalten einer Zellkultur ohne die Zellzykluslänge der einzelnen Zellen maßgeblich zu verändern.

Mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode sollten wiederum die Auswirkungen der Mad1 Expression auf die Teilungswahrscheinlichkeit der einzelnen Tochtergenerationen dargestellt werden (Abb. 43). In Abwesenheit von Mad1 Expression (Abb. 43A) haben die Zellen in jeder Tochtergeneration eine fast 100%ige Teilungswahrscheinlichkeit. Mad1 Expression jedoch zwingt einen großen Teil der Zellen bereits nach der ersten Teilung in den Zellzyklusarrest (Abb. 43B). Der Abstand der grünen F1 Kurve von der roten F0 Kurve beschreibt diesen Vorgang.

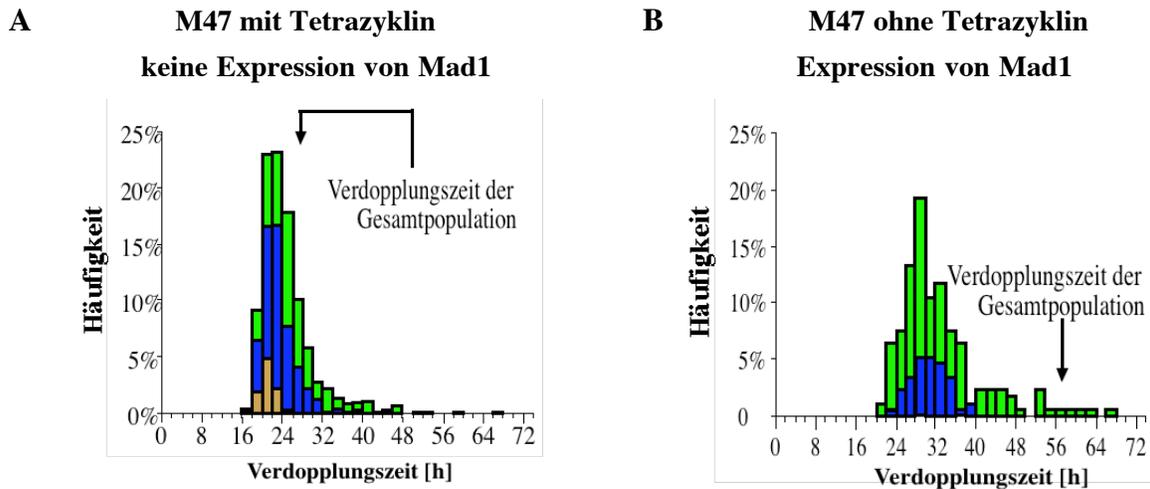


Abb. 42 Häufigkeitsverteilung der Verdopplungszeiten von Einzelzellen im Vergleich zur Verdopplungszeit der Gesamtpopulation. Die Häufigkeiten werden in Prozent angegeben und beziehen sich auf alle beobachteten Verdopplungen. Durch die unterschiedlichen Farben wird der prozentuale Anteil der Tochtergenerationen repräsentiert. Der Beobachtungszeitraum betrug 72 Stunden (A) M47 +Tetrazyklin. Ausgegangen wurde von 192 Zellen der F0 Generation. Es wurden 641 Teilungen registriert (B) M47 -Tetrazyklin. Ausgegangen wurde von 190 Zellen der F0 Generation. Es wurden 172 Teilungen registriert. Weitere Daten zu den Häufigkeitsverteilungen finden sich im Anhang B3. Generationen: ■ F0 ■ F1 ■ F2 ■ F3 ■ F4 ■ F5

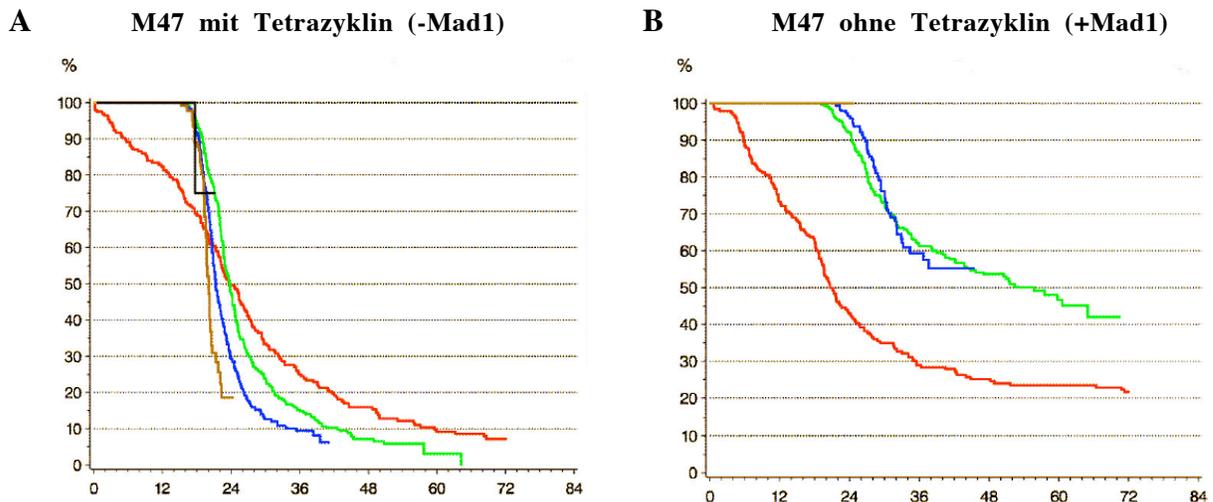


Abb. 43 Nach Generationen synchronisierte Kaplan-Meier Kurven für „verdopplungsfreies Überleben“. (A) M47 +Tetrazyklin (B) M47 -Tetrazyklin. Die Beobachtungszeit des Zeitrafferfilmes betrug 72h. Beide Filme wurden mit 80facher Vergrößerung aufgenommen. Tetrazyklin wurden den Zellen 96h vor Beobachtungsbeginn entzogen. Fallzahlen der jeweiligen Generationen. (A) M47 +Tetrazyklin: F0 (192), F1 (350), F2 (555), F3 (610), F4 (122), F5 (2); (B) M47 -Tetrazyklin: F0 (190), F1 (294), F2 (252), F3 (84). Generationen: ■ F0 ■ F1 ■ F2 ■ F3 ■ F4 ■ F5

Die Interpretation der blauen F2 Kurve in Abb. 43 B ist schwierig. Aufgrund geringer Fallzahl in F2 und begrenzter Beobachtungsdauer kann die Tendenz dieser Kurve nicht exakt bewertet werden.

Weiterhin auffällig sind die sich überschneidenden Kurven in Abb. 43 A. Es hat den Anschein, als ob die höheren Generationen schneller in die nächste Teilung eintreten als ihre Vorgängergeneration. Dies spiegelt sich wider in einem ansteigenden Mitoseindex in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraumes (Abb. 44A). In Zeitintervallen von 4 Stunden wurden alle Teilungen registriert und auf die jeweilige Gesamtzahl der Zellen bezogen. Die Zellen werden also im Verlauf teilungsaktiver. Im Gegensatz dazu nimmt unter Mad1 Expression der Mitoseindex kontinuierlich ab (Abb. 44B).

Viele der entstandenen Zellen arretieren im Zellzyklus, so dass der prozentuale Anteil von teilungsinaktiven Zellen in der Kultur ansteigt. Dadurch wird die Zunahme der Gesamtzellzahl verlangsamt. Die Zunahme der Zellzahl ist für beide Experimente in Abb. 45 dargestellt. Die „Proliferationskurve“ von M47 mit Mad1 Expression ist besser als eine Gerade zu beschreiben. Es handelt sich mehr um eine lineare als um eine exponentielle Zunahme. Beseitigt man durch Zugabe von Tetrazyklin den inhibitorischen Einfluss von Mad1, weisen die Zellen wieder eine exponentielle Zuwachsrate auf. Ausgehend von der gleichen Zellzahl erhält man am Ende fast dreimal so viele Zellen. Maßgeblich für die schnellere Zunahme ist nicht die Dauer der einzelnen Zellzyklusprogression, sondern die Teilungswahrscheinlichkeit der Zellkultur. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist die niedrige Apoptoserate dieser Osteosarkomzellen. Dadurch wird der exponentielle Zuwachs nicht gebremst, wie es in Smoxi-4 Zellen durch die hohe Apoptoserate der Fall war (Kap. 3.2.6).

Welche biologischen Erklärungen gibt es für die ansteigende Teilungsaktivität von M47 ohne Mad1 Expression? In der Arbeit von Gehring et al. wurde die Hypothese einer autokrinen Stimulation aufgestellt. Das Auswachsen von M47 Einzelzellklonen auf herkömmlichen Kulturschalen wurde durch Mad1 Expression geblockt. Die Zugabe eines konditionierten Kulturüberstandes von UTA Zellen (Vorläuferzellen von M47) zu Mad1 exprimierenden M47 Zellen führte zu normalem Auswachsen von Einzelzellklonen.

Dieser Befund legt den Verdacht einer autokrinen und parakrinen Stimulation durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren und Rezeptorexpression nahe. Die Identifizierung der wesentlichen Wachstumsfaktoren ist sicherlich ein lohnendes, aber schwieriges Ziel. Gerade die sehr geringen Konzentrationen dieser Faktoren bereiten heutzutage noch Schwierigkeiten bei ihrer Identifizierung.

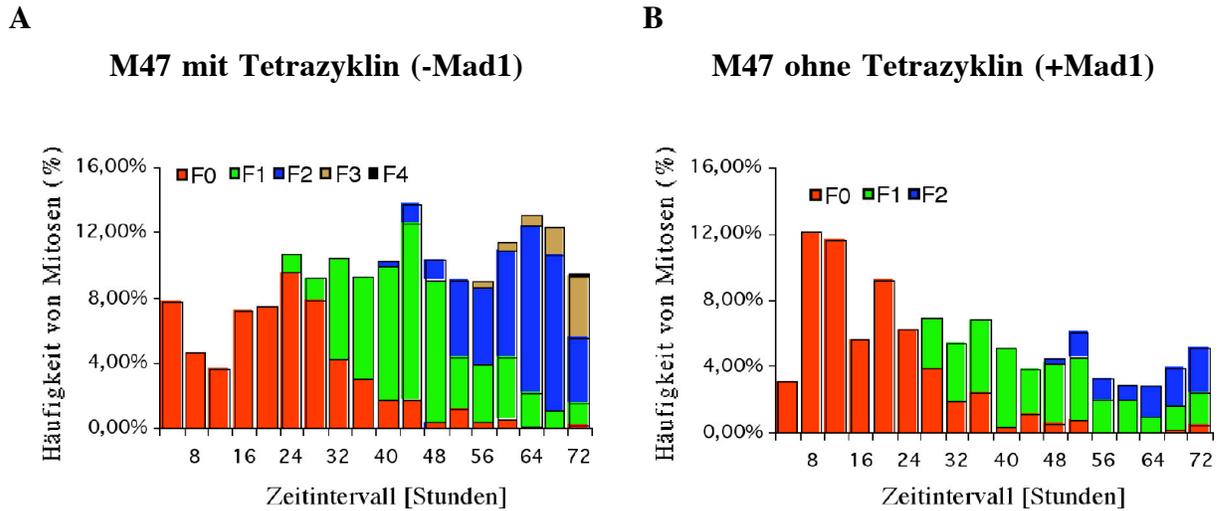


Abb. 44 Mitoseindex für M47 Zellen in Abhängigkeit von Mad1 Expression. Die Anzahl der beobachteten Mitosen in einem Zeitintervall von 4 Stunden wurde auf die jeweilige Gesamtzellzahl bezogen. (A) Ohne Mad1 bleibt der Mitoseindex auf hohem Niveau und nimmt sogar zu. (B) Unter Expression von Mad1 nimmt die Proliferationsaktivität über den Beobachtungszeitraum stetig ab (B). Die einzelnen Tochtergenerationen sind farbig dargestellt (siehe Legende in der Abbildung).

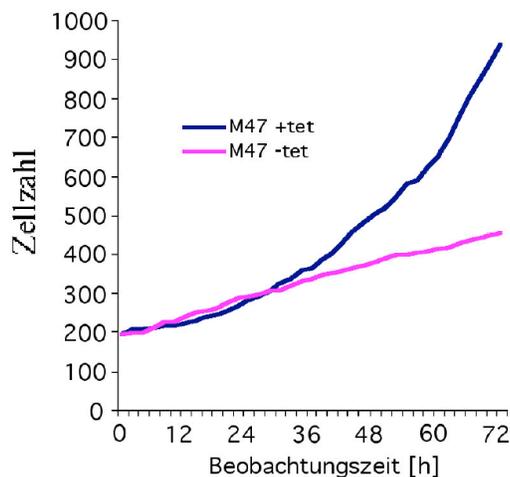


Abb. 45 Proliferationskurven von M47 mit (+tet) und ohne (-tet) Tetrazyklin. Der Zuwachs der Gesamtzellzahl wurde in 2 Stundenintervallen anhand der Zeitrasterfilme ermittelt. Deshalb erübrigt sich die Angabe von einzelnen Meßpunkten, wie sie in Zählexperimenten üblich ist. In Anwesenheit von Tetrazyklin ergibt sich ein exponentieller Zuwachs. Ohne Tetrazyklin verläuft der Zuwachs linear.

Der c-Myc-Antagonist Mad1 limitiert somit die Proliferation von Zellen unter restriktiven Bedingungen. Für das Auswachsen von Einzelzellkolonien ist die Eigenschaft auf limitiertem Raum zu proliferieren, von großer Bedeutung. Wie sich zeigt, steigern M47 Zellen unter Mad1 Expression im Verlauf die Zelldichte nur zögerlich und arretieren schneller im Zellzyklus (Abb. 46). Diese Tatsache macht es verständlich, dass die Expression von Mad1 auch das Auswachsen von Einzelzellklonen beeinträchtigen kann.

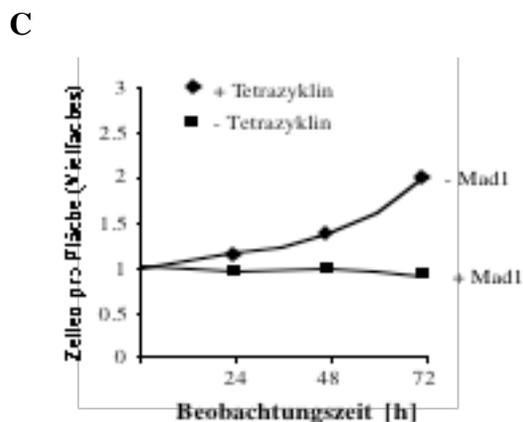
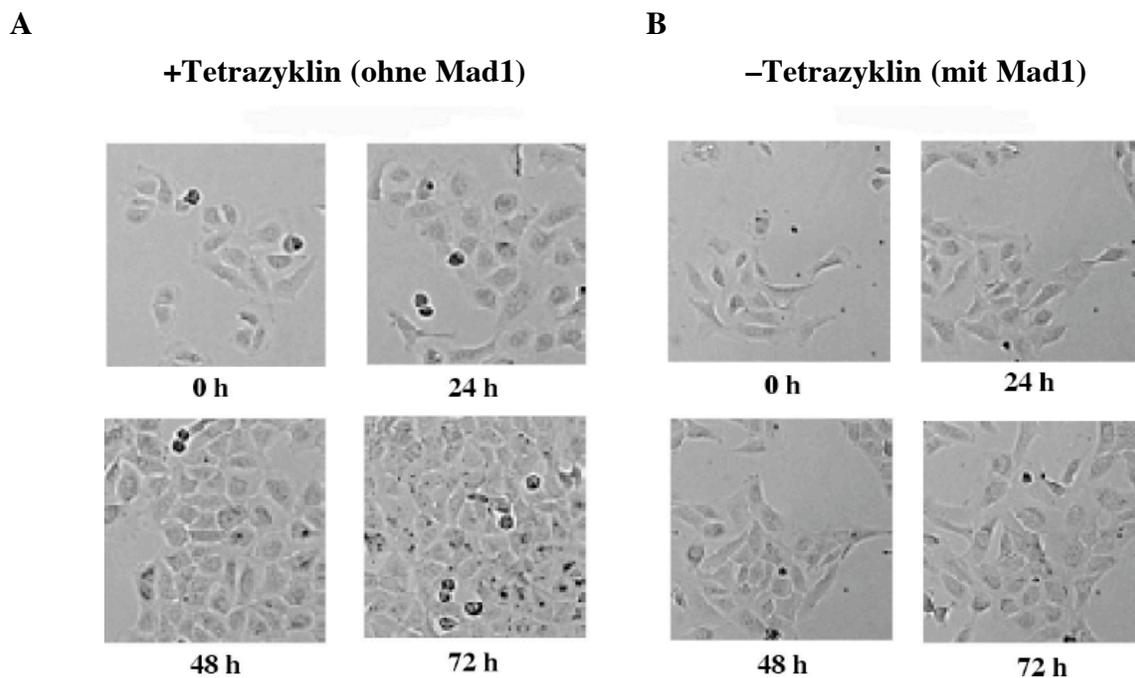


Abb. 46 Repräsentative Aufnahmen aus den Zeitrafferfilmen von M47 Osteosarkomzellen. (A) M47 +Tetrazyklin. (B) M47 -Tetrazyklin. (C) Quantitative Auswertung der Zunahme der Zelldichte in beiden Situationen. Unter Expression von Mad1 (ohne Tetrazyklin) steigern M47 Zellen ihre Anzahl pro Fläche nicht. Der vorhandene Platz wird zuerst durch die Zellen flächig aufgebraucht. Ohne Mad1 Expression wird die lokale Zelldichte von Anfang an erhöht (B).

3.3.2 Abschließende Bemerkungen zur Funktion des Myc/Max/Mad-Netzwerkes

Das Myc/Max/Mad-Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert also in den vorgestellten Modellsystemen das Wachstumsverhalten einer Zellkultur durch Regulation der Teilungswahrscheinlichkeit. Der Geschwindigkeit der Zellzyklusprogression einer einzelnen Zelle kommt dabei nur eine geringe Bedeutung zu. Diese Aussage konnte durch Experimente in voneinander unabhängigen Zellsystemen mit jeweils anderem Angriffspunkt im Myc/Max/Mad-Netzwerk demonstriert werden. In diesem Punkt lassen sich die Ergebnisse aus beiden Zellsystemen durchaus verallgemeinern.

Abnehmende Teilungswahrscheinlichkeit korreliert in den vorliegenden Experimenten mit der Zelldichte. Die Sensibilität für Kontaktinhibition ist somit eine wesentliche Einflussgröße für das Wachstumsverhalten von Zellkulturen. In diesem Punkt ist die Vergleichbarkeit etwas eingeschränkt. Lässt man eine Kultur von Ho15.19 und TGR-1 über längere Zeit wachsen, so scheinen sich festgelegte Sättigungsdichten einzustellen, die sich deutlich voneinander unterscheiden (Abb. 20). Im Falle von M47 ist in der Langzeituntersuchung der finale Unterschied der maximalen Sättigungsdichte mit und ohne Mad1 nicht sehr ausgeprägt. Die Mad1 exprimierenden Zellen benötigen dafür aber sehr viel länger, d.h. der Prozess läuft stark verzögert ab (Abb. 46), ist aber nicht völlig unterbunden. Hier gilt es zu beachten, dass M47 Osteosarkomzellen wie die Vorläufer Zelllinien UTA und U2OS defizient sind für den Tumorsuppressor pRb. Neben seiner Schlüsselrolle im Zellzyklus (Abb. 5) steuert er auch das Wachstum einer Zelle durch Kontrolle der ribosomalen rRNA-Synthese. Inwiefern die M47 Zellen mit Mad1 Expression vollständig arretierbar sind, ist fraglich. Der uneingeschränkte Vergleich beider Zellsysteme ist sicherlich nicht zulässig. Auf der anderen Seite ist es umso erstaunlicher, dass trotz eines $Rb^{-/-}$ Hintergrundes die Regulation der Teilungswahrscheinlichkeit durch das Myc/Max/Mad-Netzwerk in beiden Zellsystemen gleichermaßen stattfindet.

4. Diskussion

Die vorgelegte Dissertation untersuchte die Auswirkungen des Onkogens c-Myc auf das Teilungsverhalten von Zellen mit Hilfe einer neu entwickelten Methodik. Die Kombination von Zeitrafferfilmen und statistischer Auswertung wie der Kaplan-Meier-Methode ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Gleich zu Anfang soll auf die Frage nach der Berechtigung dieses arbeitsaufwendigeren Ansatzes eingegangen werden. Welche neuen Erkenntnisse gewinnt man im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden wie täglichem Auszählen von Zellkulturen?

4.1 Neue Erkenntnisse durch die Analyse von Zeitrafferfilmen

Die Analyse der Zeitrafferfilme kann die Gesamtverdopplungsdauer einer Zellkultur auf die Verdopplungszeiten seiner einzelnen Zellen zurückführen und Abweichungen durch präzise Erfassung von Teilungsaktivität und Apoptose erklären. Die Anwendung der Zeitrafferfilmanalyse auf die *c-myc*^{-/-} Zelllinie Ho15.19 und ihre parentale *c-myc*^{+/+} Zelllinie TGR-1 erbrachte überraschende Ergebnisse und verdeutlicht die Vorteile dieser unmittelbaren Beobachtungsweise.

Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von c-Myc in der Zelle nur die Teilungswahrscheinlichkeit senkt und nicht die Zellzyklusdauer verlängert (Kap. 3.1.1 und 3.1.2). Im Falle der untersuchten Fibroblasten korreliert dieses Arretierungsphänomen mit der Zelldichte (Kap. 3.1.4). Die Anfälligkeit der Ho15.19 Zellen für den Proliferationsstopp ist so ausgeprägt, dass dieses Phänomen sogar im subkonfluenten Zustand auftritt.

Diese Beobachtungen stellen zwei wesentliche Meinungen der Literatur zur c-Myc-Funktion in Frage: Ist c-Myc essentiell bzw. überhaupt notwendig für eine schnelle G1-S Progression und welche Rolle spielt c-Myc für das Wachstum (Massenzunahme) einer Zelle?

Allein die Tatsache, dass es einige *c-myc*^{-/-} Zellen gibt, die sich so schnell wie die Wildtyp Zellen teilen, widerlegt in dem untersuchten Zellsystem die essentielle Bedeutung. Nun sind diese schnellen *c-myc*^{-/-} Zellen keine statistische Randerscheinung sondern der Regelfall. Eine Zelle kann also auch ohne c-Myc den Zellzyklus schnell durchlaufen, und c-Myc ist für eine zügige Zellzyklusprogression demnach nicht notwendig. Die c-Myc-Menge in der Zelle trifft die Entscheidung, ob eine weitere Teilung vollzogen wird.

Die gleiche Argumentation lässt sich nun für den Aspekt des Wachstums führen. Die Zellen, die schnell durch den Zellzyklus laufen, haben offensichtlich kein Wachstumsproblem. Von den

arretierten Zellen wird man dementsprechend außer einer gewissen Umsatzaktivität wenig Zellwachstum erwarten. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu dem von Mateyak et al. aufgestellten Modell zur $c\text{-myc}^{-/}$ Zelllinie Ho15.19 (Abb. 47).

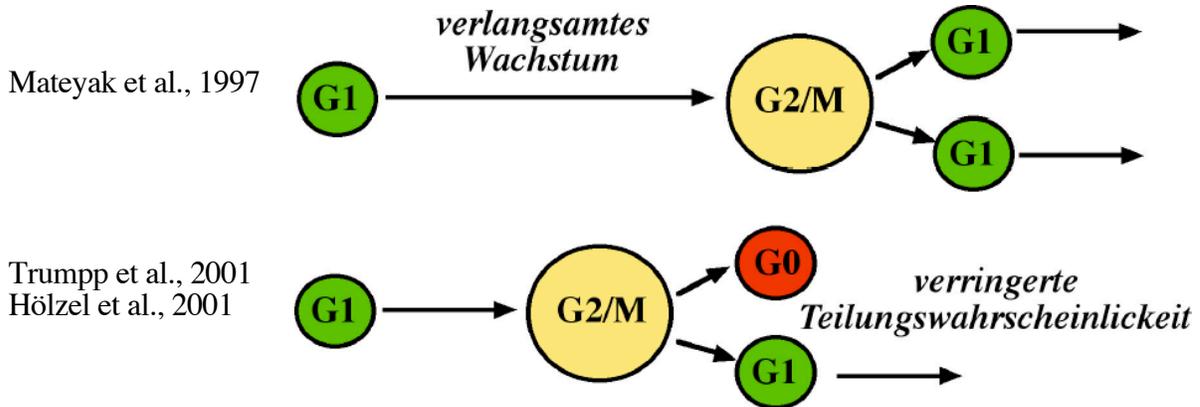


Abb. 47 Gegenüberstellung der beiden Modelle zur Beschreibung des $c\text{-myc}^{-/}$ Phänotyps. Das Modell von Mateyak et al., 1997, besagt, dass in $c\text{-myc}^{-/}$ Zellen die Massenakkumulation verlangsamt stattfindet und die Zellen deshalb erst nach einer verlängerten Wachstumsphase ihre kritische Masse für die nächste Zellteilung erreichen. Die Ergebnisse von Trumpp et al., 2001, und Hölzel et al., 2001, ergaben aber keinen Hinweis auf verlängerte Wachstumsphasen oder verlangsamte Zellzyklusprogressionen.

Das von Mateyak et al., 1997, formulierte Modell, beschreibt für den $c\text{-myc}^{-/}$ Phänotyp eine stark verlangsamte Wachstumsphase. Die Akkumulation der Makromoleküle wie Ribosomen findet nur verlangsamt statt, und die Zellen erreichen ihre kritische Masse erst verspätet. Alle Zellen teilen sich dann aber zwangsläufig. Untersucht man die Zellzyklus-Verteilung einer proliferierenden Kultur, so erwartet und erhält man eine große G0/G1-Fraktion (interpretiert als reine G1-Fraktion). Die G1 Phase muss demnach stark verlängert sein (31h, Mateyak et al., 1997).

Nach dem Modell von Trumpp et al. und Hölzel et al. stellt sich für eine Zelle die Frage, ob sie sich teilt oder nicht. $c\text{-Myc}$ trifft damit die Entscheidung, ob eine Zelle für eine weitere Teilung aktiviert wird oder nicht. Wenn sie sich teilt, dann finden die zellulären Prozesse wie Wachstum und DNA-Synthese unverändert statt. Entscheidend ist also das Überwinden einer Aktivierungsschwelle. Je höher der $c\text{-Myc}$ Spiegel, desto leichter wird die Schwelle überwunden.

Untersucht man die Zellzyklus-Verteilung einer proliferierenden Kultur so erwartet und erhält man wiederum eine große G0/G1-Fraktion (diesmal interpretiert als G0/G1-Fraktion mit großem G0-Anteil). Wie lang dauert die G1 Phase nun wirklich?

Wenn sich die Zellen innerhalb von 25h teilen können, muss die G1 Phase auch entsprechend schnell durchlaufen werden. Wo liegt nun das Problem bei der Bestimmung der Dauer einzelner Zellzyklusphasen? Die übliche Vorgehensweise mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist in Abb. 48 schematisch dargestellt.

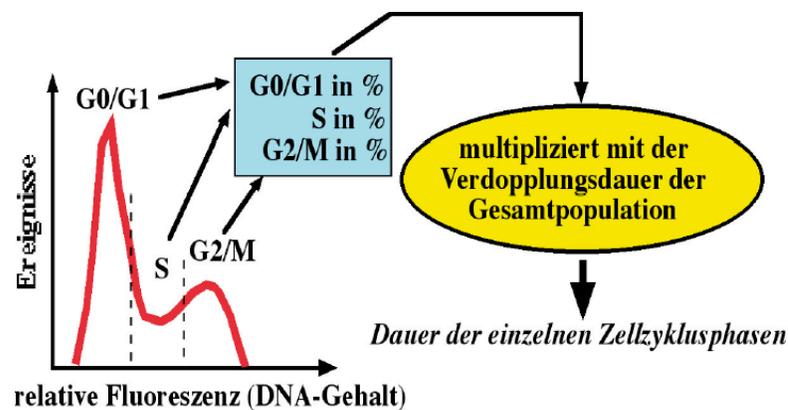


Abb. 48 Schematische Darstellung der üblichen Berechnungsweise der Dauer einzelner Zellzyklusphasen. Mit der Durchflußzytometrie wird mit einem DNA-Farbstoff (Propidium Iodid) der DNA-Gehalt der Zellen erfasst und die prozentuale Verteilung ermittelt. Der DNA-Gehalt korreliert mit den Zellzyklusphasen. Die Prozentwerte werden mit der Verdopplungszeit der Gesamtpopulation multipliziert und ergeben dann die entsprechende Dauer der einzelnen Phasen in Stunden.

Die Durchflußzytometrie ermittelt den DNA-Gehalt der untersuchten Zellen und die prozentualen Anteile in den entsprechenden Zellzyklusphasen. Die Prozentwerte multipliziert mit der Verdopplungsdauer der Gesamtpopulation ergeben dann die Verweildauer in der jeweiligen Phase. Diese Berechnung ist aber nur gültig, wenn alle Zellen teilungsaktiv sind und sich mit eng streuenden individuellen Verdopplungszeiten teilen (z.B. TGR-1, Abb. 16B). Für die *c-myc*^{-/-} Zellen ist dies gerade nicht der Fall (Abb. 16A). So besteht die G0/G1-Population tatsächlich aus teilungsaktiven (G1) und arretierten (G0) Zellen. Weichen also das Häufigkeitsmaximum der individuellen Verdopplungszeiten und die Verdopplungsdauer der Gesamtpopulation stark voneinander ab (Abb. 15), so ist diese Art der Berechnung von Zellzyklusphasen unzulässig.

4.2 Worin unterscheiden sich die bisherigen Experimente?

Wieso konnte bisher nicht gezeigt werden, dass die *c-myc*^{-/-} Zellen sich so schnell teilen können? Die Verdopplungsdauer einer proliferierenden Zellpopulation wurde soweit nur durch Auszählen oder intervallweises Fotografieren von Zellkulturausschnitten bestimmt (Mateyak et al., 1997). Eine derartige Auflösung, wie sie durch das unmittelbare Verfolgen einzelner Zellen möglich war, wurde jedoch nicht erreicht. Die in der Literatur beschriebene Gesamtverdopplungsdauer wurde in den Filmen bestätigt, und so beruht der Widerspruch auf der unzulässigen Übertragung von Beobachtungen der gesamten Zellkultur auf die Einzelzelle. Um die Zellzyklusdauer experimentell weiter zu ermitteln, wurden serumgehungerte Ho15.19 und TGR-1 Zellen mit Serum stimuliert und der Eintritt in die S-Phase anhand der DNA-Neusynthese gemessen. Dazu wurde die Inkorporation von radioaktivem ³H-Thymidin oder dem Nukleosid-Analogon BrdU in die neusynthetisierte DNA mit Szintillationszählung bzw. mit Immunfluoreszenz bestimmt.

Die Synchronisation der Zellen durch Kultivierung in niedriger Serumkonzentration (0.2% anstelle von 8%) versetzt die Zellen in die G0 Phase, einen Ruhezustand, der von der G1 Phase verschieden ist. Der Wiedereintritt einer Zelle aus der G0 Phase in den Zellzyklus stellt eine Situation dar, die nicht mit der G1-S Progression einer teilungsaktiven Zelle zu vergleichen ist. Nach einer Mitose besitzen die Zellen noch residuale CDK-Aktivität (Pusch et al., 1997), während diese in der G0 Phase völlig fehlt und sonstige Stoffwechselprozesse und Syntheseleistungen auf ein Minimum reduziert sind. Die Frage nach der *c-Myc*-Funktion muss also Kontext abhängig gestellt werden. Wenn man sich vor Augen hält, dass *c-Myc* physiologischerweise beim Wiedereintritt aus der G0 Phase deutlich höhere Spiegel erreicht als in proliferierenden Zellen, wird die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung ersichtlich (Abb. 49).

Einige Experimente von Mateyak et al. bezogen sich auf den Wiedereintritt in den Zellzyklus nach Serumstimulation (z.B. verlangsamte ³H-Thymidin- und BrdU-Inkorporation). Ausgehend von einer durch Serumentzug arretierten und damit einheitlichen Zellkultur ist die Interpretation dieser Experimente unproblematisch. Es erfolgte also ein Vergleich von Zellen die nach mitogener Stimulation sehr viel *c-Myc* exprimieren (TGR-1) mit Zellen ohne *c-Myc* (Ho15.19). Urteilt man nach dem Maximum der DNA-Neusynthese, ist die erste S-Phase nach Stimulation bei den meisten *Myc*^{-/-} Zellen deutlich verzögert (Mateyak et al., 1997). Die Zunahme BrdU-positiver Zellen (Beurteilung auf Einzelzellniveau!) war aber nicht ein rechtsverschobenes Abbild der steil verlaufenden TGR-1 Kurve, sondern vor allem ein deutlich abgeflachter Anstieg. Daraus kann man erkennen, dass es auch einige wenige Zellen gibt, die bereits sehr früh (wie *Myc*^{+/+} Zellen) in die S-Phase eingetreten seien müssen (persönliche Mitteilung von J. Sedivy). Diese

Experimente belegen die wichtige Rolle von c-Myc im Rahmen einer mitogenen Stimulation von Fibroblasten, wie sie z.B. nach Verletzungen im Bindegewebe stattfindet. Die beobachtete DNA-Inkorporationskinetik darf aber nicht auf eine proliferierende Kultur übertragen werden. Die generationsspezifische Synchronisierung mit der Kaplan-Meier Methode ermöglicht hingegen die exakte Untersuchung der Zellzyklusprogression einer proliferierenden Kultur (Abb. 16, 17). Die Bestimmung der Dauer einzelner Phasen ist jedoch auch dieser Methode nicht zugänglich. Wie hat man eine 2-3 fache verminderte Proteinsyntheserate einer proliferierenden $c\text{-myc}^{-/}$ Zellkultur im Vergleich zu $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen zu interpretieren (Mateyak et al., 1997)? Auf jeden Fall muss der große Anteil arretierter Zellen berücksichtigt werden. Man kann annehmen, dass die teilungsinaktiven Zellen deutlich weniger Protein-Neusynthese zeigen, z.B. wegen eines geringen Bedarfs an ribosomalen Proteinen. Die proliferierenden Zellen sind in ihrer Synthese hingegen unbeeinträchtigt. Sie müssen z.B. ihre Ribosomen verdoppeln, um die entstehenden Tochterzellen ausreichend zu versorgen. Wenn der Anteil an teilungsinaktiven Zellen in einer Kultur nicht mehr vernachlässigbar klein ist, resultiert die verminderte Syntheserate als logische Konsequenz.

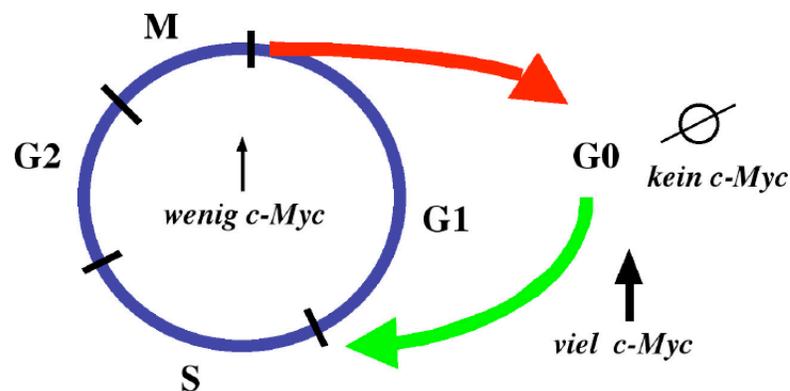


Abb. 49 Variationen der c-Myc-Spiegel in Abhängigkeit vom Zustand der Zelle. Die höchsten c-Myc-Mengen treten beim Wiedereintritt aus der G0 Phase in den teilungsaktiven Zustand auf. Diese übertreffen die normal anzutreffenden c-Myc-Mengen in proliferierenden Zellen bei weitem. In der G0 Phase ist praktisch kein c-Myc nachweisbar. Schemazeichnung nach Trumpp (persönliche Mitteilung).

4.3 c-Myc reguliert Teilungswahrscheinlichkeit in transgenen Mäusen

Sind alle gemachten Beobachtungen nur eine Eigenheit einer besonderen Zelllinie und welche Relevanz haben sie? Trumpp et al. entwickelten eine Reihe von transgenen Mäusen, in denen die c-Myc Allele entweder komplett entfernt wurden (Δ ORF) oder durch ein hypomorphes Wildtyp Allel (floxF) ersetzt wurden, das später über CRE-Rekombinase noch nachträglich entfernt werden konnte. Es ergab sich eine Reihe von transgenen Mäusen ($c\text{-myc}^{+/+}$, $c\text{-myc}^{+floxF/+}$, $c\text{-myc}^{\Delta\text{ORF}/+}$, $c\text{-myc}^{floxF/floxF}$, $c\text{-myc}^{\Delta\text{ORF}/floxF}$, $c\text{-myc}^{\Delta\text{ORF}/\Delta\text{ORF}}$) in denen die c-Myc Menge in angegebener Reihenfolge abnahm. Der homozygote Knock-out ($c\text{-myc}^{\Delta\text{ORF}/\Delta\text{ORF}}$) war wie bei Davis et al., 1993, zuvor beschrieben am Tag 9.5 letal. Vor allem die essentielle frühe Hämatopoese der erythropoiden und myeloiden Reihe im Dottersack fehlte und bot eine gute Erklärung für die Letalität mit Hinweis auf die Bedeutung von c-Myc für hämatologische Neoplasien. Für die anderen Mäuse zeigte sich eine mit abnehmenden c-Myc Spiegel reduzierte Körpergröße (Abb. 50).

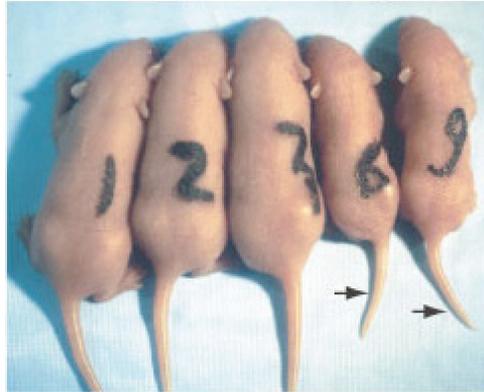


Abb. 50 Reduzierte c-Myc-Spiegel führen zu reduzierter Körpergröße in transgenen Mäusen (Abbildung aus Trumpp et al., 2001). Die Mäuse mit den Nummern 1, 2 und 3 sind $c\text{-myc}^{+/+}$ Wildtyp Mäuse. Die beiden kleineren Mäuse mit den Nummern 6 und 9 sind $c\text{-myc}^{\Delta\text{ORF}/+}$ Mäuse mit reduzierter c-Myc-Expression. Bemerkenswert sind auch die verkürzten Schwänze (Pfeile).

Erstaunlich war nun das Ergebnis der Analyse von einzelnen Organen. Die Größe der einzelnen Zellen in den verkleinerten Organen war nicht verringert, sondern nur die Anzahl, also Hypoplasie statt Hypotrophie. Hängt dieser Phänotyp mit einer verringerten

Teilungswahrscheinlichkeit zusammen? Aus den einzelnen Mäusen wurden T-Zellen isoliert und durch T-Zell-Rezeptorstimulation aktiviert. Nach Aktivierung nahmen die kleinen ruhenden T-Zellen an Größe zu. Die reine Wachstumsphase war von reduzierten c-Myc-Spiegeln nicht beeinträchtigt. Jedoch war der Prozentsatz der sich anschließend teilenden Zellen abhängig von c-Myc. Sowohl die Hypoplasie der Organe als auch das T-Zell Aktivierungsmodell zeigen, dass c-Myc die Teilungswahrscheinlichkeit von Zellen erhöht und dadurch die Körpergröße von Mäusen und anderen Mammalia bestimmen kann.

In der Fruchtfliege *Drosophila* führte die Reduktion des c-Myc Homologes dMyc zu einer an den Flügeln eindrucklich gezeigten Hypotrophie (Johnston et al., 1999). Als Erklärung könnte die geringe Homologie der beiden Myc-Proteine dienen, jedoch zeigten Trumpp et al., dass dMyc in Mausfibroblasten das entfernte c-Myc kompensieren kann. Trotz ihrer funktionalen Austauschbarkeit scheint die funktionelle Integration der Aktivität beider Homologe in *Drosophila* und Maus verschieden zu sein.

Die Fibroblasten aus c-myc^{floxN/floxN} Mäusen, denen durch CRE-Rekombinase anschließend beide hypomorphe c-myc Allele entfernt wurden, stellten ihre Proliferation ein. Anders ausgedrückt, die Teilungswahrscheinlichkeit wurde auf null gesenkt. Es ist aber auch denkbar, dass man in Zeitrafferaufnahmen vereinzelt Zellen findet, die sich normal teilen, die Teilungswahrscheinlichkeit im Gesamten jedoch so gering ist, dass sie sich mit der spontanen Apoptoserate die Waage hält. Die Etablierung einer Zelllinie war folglich nicht möglich. Wieso proliferieren dann aber Ho15.19? Schließlich handelt es sich um einen fundamentalen Unterschied. Die Frage nach genetischen Veränderungen dieser Zelllinie wird oft gestellt und kann leider noch nicht beantwortet werden. Es wird sehr interessant sein zu verstehen, welche Gene daran beteiligt sind, einer Zelle auch ohne c-Myc doch noch den Eintritt in den Zellzyklus zu ermöglichen. Ho15.19 c-myc^{-/-} Zellen dürften eine genetische Veränderung erfahren haben, die es ihnen ermöglicht, die Teilungswahrscheinlichkeit auf ein Mindestmaß anzuheben, um daraus eine Zellkulturlinie etablieren zu können. Diese Einschränkungen müssen sicherlich berücksichtigt werden, beeinflussen jedoch nicht die Aussagen zur Zellzyklusprogression. In dem bereits angesprochenen T-Zell Experiment von Trumpp et al. wurden die Tochtergenerationen indirekt über einen inkorporierten Fluoreszenzmarker verfolgt. Bei jeder Teilung wurde er gleichermaßen auf die Tochterzellen verteilt, so dass die detektierten Fluoreszenzsignale ihrer Intensität nach einzelnen Tochterzellgenerationen zugeordnet werden konnten. Die maximal erreichte Generation war von fallenden c-Myc-Spiegeln nicht beeinflusst, nur der Prozentsatz der dort angetroffenen Zellen. c-Myc ist somit essentiell für eine hohe Teilungswahrscheinlichkeit, die im Falle von Ho15.19 möglicherweise durch andere Mutationen zu einem geringen Grad kompensiert werden kann.

4.4 c-Myc und die Regulation von Zielgenen

Will man die Biologie von c-Myc und seine Auswirkungen auf die Tumorentstehung verstehen, kommt man schlecht an den c-Myc-regulierten Genen vorbei. Eigentlich hatte man sich mit der Anwendung von cDNA Chips und konditionalen Zelllinien wie z.B. Smoxi-4 oder P493-6 (Schuhmacher et al., 2001) schnelle entscheidende Fortschritte erhofft. Einerseits zeigte sich, dass die Gene sich alle im Bereich der 2-5fachen Induktion bewegen, was relativ wenig ist im Vergleich zu anderen Transkriptionsfaktoren (Eisenman, 2001; eigene Daten). Andererseits ist die Zahl der potentiellen Gene so groß geworden, dass die Fokussierung auf wenige Schlüsselgene schwierig ist. Auch der Genexpressionsvergleich der *c-myc*^{-/-} Zelllinie Ho15.19 mit TGR-1 sorgte für Verwirrung. In den ersten Studien vor Anwendung der cDNA Chip Technologie waren bis auf CAD und GADD45 die meisten der bis dahin bekannten Gene nicht dereguliert (Bush et al., 1998). Die Arbeit von Guo et al. führte diesen Vergleich mit der cDNA Chip Technologie durch und ergab eine Liste von ca. 200 potentiellen Genen.

Aus den Beobachtungen der Zeitrafferfilme ergibt sich wiederum das Problem, wie man die proliferierende Kultur von Ho15.19 und TGR-1 diesmal im Hinblick auf die Expression von Genen vergleichen will. Vereinfachend kann man davon ausgehen, dass es jeweils ein bestimmtes Genexpressionsmuster in arretierten und proliferierenden Zellen gibt. Schwankungen, wie zum Beispiel durch die unterschiedlichen Zellzyklusphasen bedingt, seien der Einfachheit halber zu vernachlässigen. In einer proliferierenden Kultur von Ho15.19 ergibt sich eine Überlagerung beider Muster, verursacht durch arretierte Zellen. Für TGR-1 erhält man hingegen fast vollständig das Proliferationsmuster. Aus dieser Überlegung wird klar, dass man beim anschließenden Genvergleich viele Kandidatengene herausfiltert, die vielleicht nur Ausdruck einer proliferierenden Zelle sind, aber in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit c-Myc stehen. Die gleichen Überlegungen gelten auch für die herkömmlichen Abgleichmethoden (rRNA Gehalt und GAPDH-Expression). Gerade bei schwachen Expressionsunterschieden wird der Vergleich sehr schwierig. Abb. 51 veranschaulicht die Problematik schematisch.

Welche Auswege gibt es? Zum einen bietet sich zur Genidentifizierung die Verwendung von konditionalen Zellsystemen wie Smoxi-4 und P493-6 (Schuhmacher et al., 2001) an. Der Vorteil besteht in der einheitlichen Ausgangslage einer einzigen Zelllinie und der kurzen c-Myc-Induktionszeit. So konnte dann auch in proliferierenden Smoxi-4 Zellen eine deutliche Geninduktion von c-Myc-regulierten Genen erreicht werden. Eine indirekte Validierung bietet dann ferner die Serumstimulation von *c-myc*^{-/-} und *c-myc*^{+/+} Zellen. Von den Rahmenbedingungen des Experiments ist die Serumstimulation von gehungerten Zellen am einheitlichsten, da sich fast alle

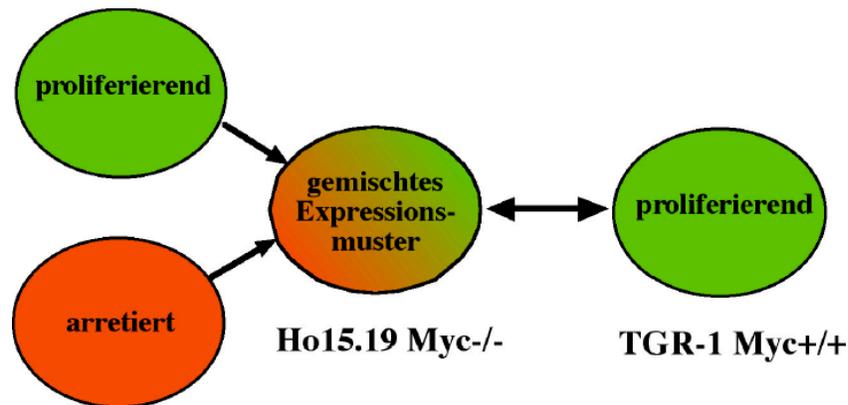


Abb. 51 Dieses Schema veranschaulicht die angesprochene Problematik eines Genexpressionsvergleichs von $c\text{-myc}^{-/-}$ und $c\text{-myc}^{+/+}$ Zellen. Die Überlagerung der Expressionsmuster von arretierten und proliferierenden Zellen ergibt bei den $c\text{-myc}^{-/-}$ Zellen ein Mischbild. Der Expressionsvergleich verliert seine Spezifität für $c\text{-Myc}$ -regulierte Gene.

Zellen in G0 befinden. Viele der $c\text{-Myc}$ -induzierten Gene zeigten in Ho15.19 einen langsamen Anstieg, erreichten aber nach 24h das gleiche Expressionsniveau wie in TGR-1. In TGR-1 Zellen zeigte die Zielgenexpression ihr Maximum zwischen 8h und 16h, während $c\text{-Myc}$ selbst bereits nach 3h-4h sein Maximum erreichte. In Ho15.19 fehlte demzufolge dieses frühe $c\text{-Myc}$ -getriebene Maximum (Bush et al., 1998). Dieser Sachverhalt sei beispielhaft an der Expression des $c\text{-Myc}$ -induzierten Gens Fibrillarin gezeigt (Abb. 52, Coller et al., 2000). Das $c\text{-Myc}$ -getriebene Expressionsmaximum zwischen 8 und 16h Stunden kann damit als indirektes Kriterium verwendet werden.

Ein weiterer sehr eleganter und zukunftsweisender Ansatz ist die Chromatin-Immunpräzipitation. Durch $c\text{-Myc}$ -spezifische Antikörper wird endogenes $c\text{-Myc}$, durch Formaldehyd kovalent am Promoter seines Zielgens fixiert, und das entsprechende Chromatinfragment präzipitiert. Durch eine PCR-Reaktion erfolgt der spezifische Nachweis des Promoterfragments. Der Vergleich von TGR-1 und Ho15.19 wurde bereits erfolgreich für einige Zielgene durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass tatsächlich die Präsenz von $c\text{-Myc}$ am Promoter des Gens gezeigt wird. Die Chromatin-Immunpräzipitation könnte somit zukünftig als Methode der Wahl zum Nachweis direkter $c\text{-Myc}$ -regulierter Gene betrachtet werden (Frank et al., 2001).

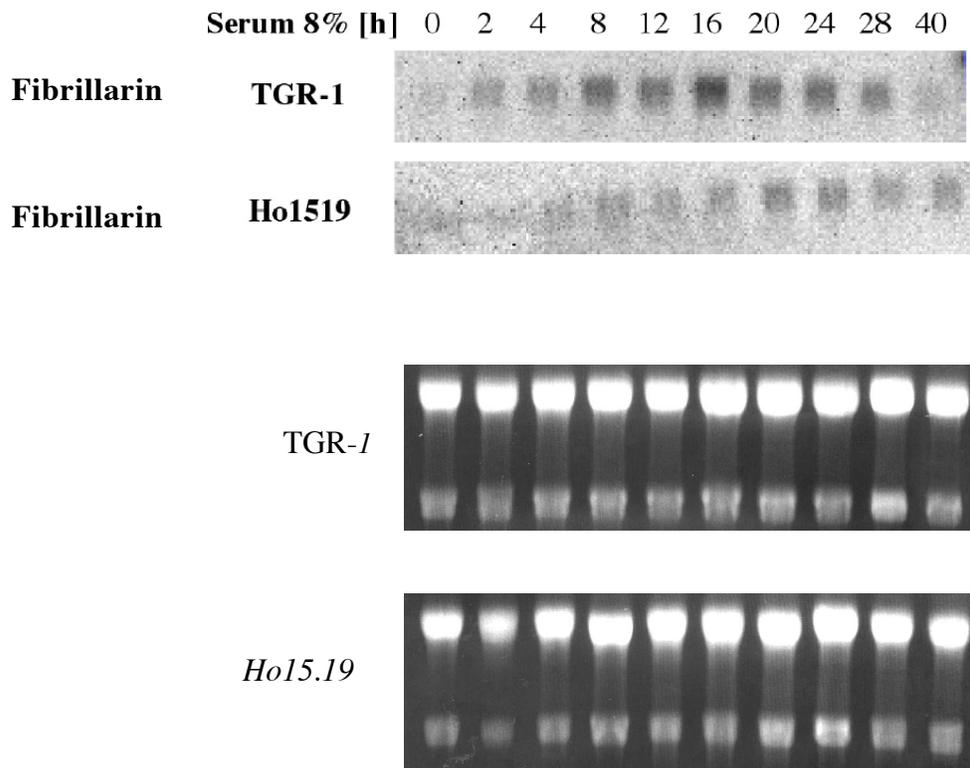


Abb. 52 Northern-Blot Analyse der Expression von Fibrillarin in TGR-1 und Ho15.19 nach Serumstimulation. Zellkulturen wurden für die angegebene Zeit mit Serum stimuliert und die RNA mit Phenol extrahiert. Pro Spur wurden 10 µg RNA in einem 3,7% Formaldehyd-Agarose Gel aufgetrennt. Zur RNA Ladekontrolle sind die Ethidium Bromid gefärbten Gele gezeigt. Hybridisiert wurde mit einer rattenspezifischen cDNA Sonde für Fibrillarin. Fibrillarin Expression durchläuft in TGR-1 ein frühes Maximum, während in Ho15.19 ein kontinuierlicher Anstieg zu sehen ist. Dieses c-Myc-getriebene frühe Maximum kann als indirekter Hinweis auf c-Myc-Regulation eines Genes gewertet werden.

Abschließend sei hier noch eine weitere Überlegung zur Regulation von Zielgenen angebracht. Die vorgelegte Arbeit hat einen Schwerpunkt auf die Beobachtung der einzelnen Zelle gesetzt. Bei der Analyse der Genexpression fertigen wir durch die Isolierung der RNA aus einer Vielzahl von Zellen wiederum nur einen Querschnitt an. In der Tat wären verschiedene Auswirkungen von c-Myc-Aktivität auf die Genexpression denkbar:

- (1) Die Expression nimmt in allen Zellen um den gleichen Faktor zu.
- (2) Das Gen wird nur in einigen aktivierten Zellen stark exprimiert
- (3) Eine Kombination aus (1) und (2).

Welche dieser Möglichkeiten ist zutreffend? Die Klärung dieser Frage wird sicherlich keine leichte Aufgabe sein, zumal die c-Myc-bedingten Induktionen im Vergleich zu anderen Transkriptionsfaktoren leider sehr gering sind, dafür die Zahl der Gene sehr groß (Eisenman et al., 2001). Gegebenenfalls sind auch Unterschiede für verschiedene Gene zu erwarten. Für die Beschreibung eines direkten c-Myc Zielgens sollte wohl aber Definition (1) zutreffen. Abb. 53 stellt die Möglichkeiten (1) und (2) graphisch gegenüber.

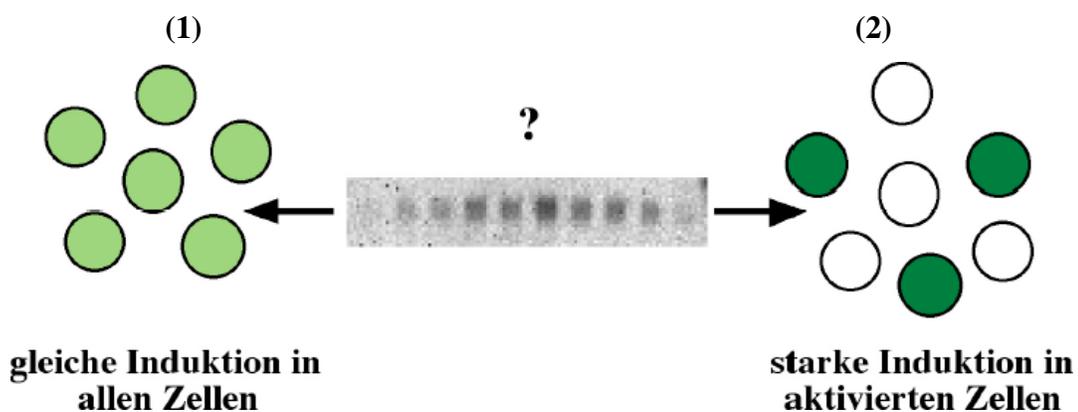


Abb. 53 Graphische Darstellung der beiden Expressionsschemata (1) und (2) (siehe Text). (1) Eine ansteigende Expression kann Ausdruck einer gleichmäßig erhöhten Expression in allen Zellen sein (links). (2) Andererseits besteht die Möglichkeit eines Alles oder Nichts Prinzips in wenigen Zellen. (3) Als dritte, aber nicht eingezeichnete Variante besteht natürlich eine Kombination aus (1) und (2).

4.4 c-Myc führt zu effizienter Umsetzung mitogener Signale und erhält den aktiven Teilungsstatus von Zellen aufrecht

Eine verminderte c-Myc-Expression führt in der Maus zu hypoplastischen Organen (Trumpp et al., 2001). Die Größe der einzelnen Zellen ist dabei unverändert. Zellteilung und Größenwachstum sind also eng miteinander gekoppelt. Entscheidend für die spätere Größe ist somit die Anzahl teilungsaktiver Zellen in einem sich entwickelnden Organ. Über c-Myc kann der Organismus die Teilungsaktivität seiner Zellen regulieren. Ist die Funktion von c-Myc auf den Zellzyklus beschränkt? Eine sich teilende Zelle muss sich vergewissern, dass ein

ausreichendes Wachstum stattgefunden hat. Die Wachstumskontrolle hat somit einen permissiven Charakter für den Zellzyklus im Sinne einer Verkehrsampel, die nur grünes Licht gibt, wenn die Versorgung der zukünftigen Tochterzellen gewährleistet werden kann. Die Aktivierung von MycER in Rat1a Fibroblasten führte nicht zu einem früheren Eintritt die S-Phase, bezogen auf Zellgröße (Pusch et al., 1997). Trotz hoher CDK2-Aktivität in der frühen G1 Phase gelang es nicht, die Zellteilung vom Wachstum zu entkoppeln mit kleineren Zellen als Folge. Auf der anderen Seite ist es aber durch Myc-Aktivierung möglich, Wachstum in Abwesenheit von Zellteilung zu induzieren (Schuhmacher et al., 1999). Ist dieses Phänomen nur eine Eigenheit von den verwendeten konditionalen Zellsystemen und den dabei auftretenden sehr hohen c-Myc-Mengen?

Es ist natürlich möglich, dass diese Wachstumsinduktion von c-Myc in physiologischeren Systemen wie den transgenen Mäusen von Trumpp et al., 2001, keine Rolle spielt. Auf der anderen Seite ist es natürlich auch unmöglich zu beweisen, dass c-Myc in diesen Mäusen überhaupt keinen Einfluss auf das Wachstum hat. Nimmt man also die Wachstumsfunktion von c-Myc zur Kenntnis und schränkt sie erstmal auf hohe c-Myc-Spiegel ein, so ist die Eigenschaft auf jeden Fall in Tumoren relevant. Es würde aber auch sehr viel Sinn machen, dass c-Myc in physiologischer Weise für eine Koordinierung von Zellzyklus und Wachstum sorgt. c-Myc könnte somit eine integrierende Funktion zwischen Zellzyklus und Wachstum haben (Abb. 54).

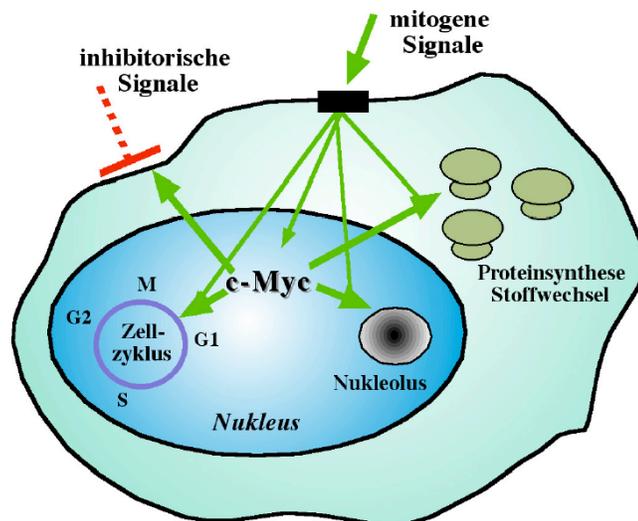


Abb. 54 Mögliche Koordinierung von Zellzyklus und Wachstum durch c-Myc. Mitogene Stimuli werden über c-Myc effizient umgesetzt und verstärken die direkten mitogenen Aktivierungswege. Außerdem hemmt c-Myc inhibitorische Signale, die auf die Zelle einwirken (z.B. durch Kontaktinhibition vermittelt).

Die bereits angesprochene funktionale Vielfalt der potentiellen c-Myc-regulierten Gene (Abb. 4) würde diese Überlegung unterstützen. Vielleicht ergibt die funktionale Analyse vieler dieser c-Myc-Zielgene aus dem Wachstumsbereich (z.B. rRNA Synthese) auch noch viel mehr Hinweise, wie in einer Zelle das Zellwachstum und der Zellzyklus interagieren. Möglicherweise gilt dann die hier noch so streng vorgenommene Trennung als längst überholt.

4.5 Was kann man mit Zeitrafferfilmen über Tumorentstehung lernen?

Natürlich ist die von einer Kamera beobachtete Zellkultur noch weit entfernt von dem, was in einem Tumorgewebe passiert, einem komplexen Gefüge aus mehreren Zelltypen und extrazellulärer Matrix. Die mannigfaltigen Wechselwirkungen eröffnen neue Ebenen der Komplexität. Die genaue Bilanzierung von Apoptosen und Mitosen in einer Einzelzellschicht haben gezeigt, wie durch eine einzige onkogene Läsion (c-Myc) in einem definierten Areal die Aktivität der Zellen deutlich zunehmen kann, ohne einer vergrößerten Fläche zu bedürfen. In der statischen Beobachtung ist dieses dynamische „Innenleben“ kaum zu erahnen. Gerade die Aufnahme der apoptotischen Zellen durch lebendige Nachbarzellen fand bisher wenig Berücksichtigung trotz seiner enormen Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass sich primäre Zellen durch die Aufnahme von apoptotischen Restkörpern, z.B. von c-Myc transformierten Zellen, ebenfalls transformieren lassen (Bergsmedh et al., 2001). Dieses als horizontaler Transfer bezeichnete Phänomen war bisher nur von Bakterien bekannt. Auch wenn eine onkogen veränderte Zelle durch Apoptose beseitigt wird, ist dieser genetische Schaden nicht zwangsläufig aus der Welt geschafft. Das Zusammenspiel von erhöhter Mitose- und Apoptoserate fördert also nicht nur durch gesteigerten Zellumsatz die Entstehung von weiteren maligneren Mutationen, sondern auch den horizontalen Gentransfer.

Es ist also davon auszugehen, dass im Körper in kleinsten Läsionen diese Vorgänge stattfinden, ohne durch Größenwachstum auffällig zu werden. Irgendwann akkumulieren genetische Veränderungen und entwickeln sich zu einem malignen Tumor. Es ist eine Herausforderung an die molekulare und bildgebende Diagnostik, diese Keimzellen von späteren malignen Tumoren frühzeitig ausfindig zu machen.

5. Zusammenfassung

In der vorgelegten Dissertation wurde die Rolle des onkogenen Transkriptionsfaktors c-Myc für eine schnelle Zellzyklusprogression untersucht. Der Stand der Forschung zu Beginn der Arbeit legte nahe, dass ohne die Expression von c-Myc eine Zelle nur verzögert den Teilungszyklus durchlaufen kann (Mateyak et al., 1997). Mit Hilfe eines neuen Experimentansatzes konnte gezeigt werden, dass diese Beobachtung korrigiert werden muss. Die Analyse der Zellzyklusprogression von einzelnen Zellen mit Hilfe von Zeitrafferfilmen ergab, dass c-myc^{-/-} Zellen in gleicher Zeit die Teilung durchführen wie c-myc^{+/+} Zellen. Das Aufstellen von Stammbäumen zu den einzelnen Zellen ebnete den Weg zu einer umfassenden statistischen Auswertung. Mit der Kaplan-Meier Methode gelang eine detaillierte Beschreibung des beobachteten Sachverhaltes. c-myc^{-/-} und c-myc^{+/+} Zellkulturen unterschieden sich vor allem in ihrer Teilungswahrscheinlichkeit und nicht in der Zellzyklusdauer der einzelnen Zellen. In Abwesenheit von c-Myc-Expression wurde ein großer Teil der Zellen nach erfolgter Teilung inaktiv. Der Anteil teilungsinaktiver Zellen akkumuliert und ließ die Gesamtzahl der Population deutlich langsamer ansteigen.

Dieses Ergebnis konnte durch die Generierung einer neuen Zelllinie weiter untermauert werden. Die Expression eines MycER Fusionsproteins in c-myc^{-/-} Zellen (Smoxi-4) ermöglichte die wahlweise Aktivierung des MycER Proteins durch Zugabe von Tamoxifen (4-OHT). Eine unmittelbare Untersuchung der Auswirkung von c-Myc-Aktivität in einer einzigen Zelllinie war dadurch möglich. Zeitrafferfilme und deren Auswertung bestätigten die bereits gemachten Ergebnisse. Durch die Verwendung der publizierten Osteosarkomzelllinie M47 (Gehring et al., 2000) konnten die Beobachtung weiter verallgemeinert werden. In diesen Zellen ließ sich die Expression des c-Myc-antagonistisch wirkenden Transkriptionsfaktors Mad1 durch Zugabe von Tetrazyklin steuern. Der Antagonist Mad1 senkte vor allem die Teilungswahrscheinlichkeit der Zellen.

Zusammenfassend ergibt sich daraus der Vorschlag eines neuen Modells. Die Expression von c-Myc in einer Zelle beeinflusst vor allem die Entscheidung, ob sie in einen weiteren Zellzyklus eintritt oder nicht. Der Geschwindigkeit der Zellzyklusprogression kommt dabei nur eine untergeordnete Rolle zu. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von Restriktionspunkten und Aktivierungsschwellen bei der Kontrolle der Zellteilung durch c-Myc. Die erhöhte Apoptose- und Mitoserate von Smoxi-4 Zellen zeigte auf anschauliche Weise, wie durch eine einzige onkogene Läsion (c-Myc) die Entstehung weiterer Mutationen begünstigt werden kann.

Anhang A - Materialien

A.1 Chemikalien und Zellkulturmedien

Nicht aufgeführte Posten wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, bezogen.

[α - ³² P]dCTP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml)	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Acrylamid	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Agarose Elektrophorese Reinheitsgrad	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Ammoniumpersulfat	<i>Merk Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Ampicilin	<i>Merk Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Bromdesoxyuridin	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
DNA-Größenstandards	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
dNTPs	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Ethidium Bromid	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Fötales Kälberserum (FKS)	<i>Bioser, Buenos Aires, Argentinien</i>
Hygromycin B	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Kälberserum	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
L-Glutamin	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Lipofektamin	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Optimem I-Medium	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Penicillin-Streptomycin (1kU/ml-10mg/ml)	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Protein-Molekulargewichtsstandards	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
RPMI 1640-Medium	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Trypsin-EDTA	<i>GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	<i>Merk Eurolab GmbH, Darmstadt</i>

A.2 Verbrauchsmaterialien und verwendete Kits

BioRad Protein Assay Kit	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
ECL™ Kit	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
High Prime Labeling Kit	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
Hybond-N+ Nylonmembran	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Immobilon-P PVDF-Membran	<i>Millipore GmbH, Eschborn</i>
Nap™ 5 Sephadex G-25 Säulen	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
peqGOLD TriFast	<i>PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>

Qiagen Gel Extraction Kit 50	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
Qiagen Plasmid Maxi Kit 100	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>

A.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Lysozym	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
MMLV- Reverse Transkriptase	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Pfu DNA Polymerase	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Proteinase K (20 U/mg)	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
Restriktionsendonukleasen	<i>New England Biolabs GmbH, Schwalbach</i>
RNase A (50 U/mg)	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
T4-DNA Polymerase	<i>New England Biolabs GmbH, Schwalbach</i>
T4-DNA-Ligase	<i>New England Biolabs GmbH, Schwalbach</i>
Taq-DNA-Polymerase	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Taq-DNA-Polymerase	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>

Für die Enzyme wurden die von den Firmen mitgelieferten Puffer nach Firmenprotokoll verwendet.

A.4 Antikörper

Auflistung der verwendeten Antikörper und der eingesetzten Konzentrationen (WB: Western-Blot Analyse; IF: Immunfluoreszenz)

9E10 anti-Myc (WB 1:1000)	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA</i>
Anti-Bromdesoxyuridin-FITC (IF 1:10)	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
Anti-Firbronectin (F-3648) (IF 1:400)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Anti-Mad1 (Überstand)	<i>Elisabeth Craemer, GSF, München</i>
Anti-Vinculin (V-4505) (IF 1:400)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
F8 anti-p27 (WB 1:1000)	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA</i>
3F10 anti-HA (WB 1:1000)	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
Phalloidin FITC (P-5282) (IF 1::200)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>

A.5 Primer für rattenspezifische cDNA Sonden

Primer wurden von *Metabion GmbH, Planegg-Martinsried*, mit HPLC Reinigung bezogen.

5'-Fibronectin	:	5'-TTC CTG CGC CAA CCA ATC TGA AGT TCA C-3'
3'-Fibronectin	:	5'-TGC CAT GAT ACC AGC AAG GAG TTG GGT G-3'
5'-Gadd45	:	5'-ATG ACT TTG GAG GAA TTC TCG GCC GCA G-3'
3'-Gadd45	:	5'-TCT GCA AAG TCA TCT CCT AGC CCT CCT G-3'
5'-c-Myc Exon 1	:	5'-TCG CTG TAG TAA TTC CAG CGA GAG AC-3'
3'-c-Myc Exon 2	:	5'-CCA CCT CCC AAA GGA AAT TCA GC TTC-3'
5'-ODC	:	5'-CTG CCA TAT CCT CGA TGA AGG TTT CAC-3'
3'-ODC	:	5'-CAT TGA AAG TAG AAG CAG CAG CAA CAG TG-3'
5'-p53	:	5'-CTG GAT AAC TGT CAT GGA GGA TTC ACA G-3'
3'-p53	:	5'-CAG GAT GCA GAG GCT GTC AGT CTG AGT C-3'
5'-Fibrillarin	:	5'-CGA GTT TCA GTT CTT CGC CTT G-3'
3'-Fibrillarin	:	5'-TTA CGC AGT TGA GTT CTC CCA CCG-3'

Gen	Zugriffsnummer	Position	Größe
Fibronectin	NM_019143	5642-6248	607bp
Gadd45	L32591	19-691	673bp
c-Myc Ex.1	Y00396	2171-2561	391bp
ODC	M19157	453-1618	1166b
p53	X13058	11-1215	1205bp
Fibrillarin	NM_007991	628-1018	412bp

Die Probe für c-Myc Exon1 wurde aus genomischer TGR-1 Ratten DNA mit PCR generiert.
Für die anderen Sonden wurde Smoxi-4 cDNA verwendet.

A.6 Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer (10x)	30% (w/v) Glycerol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau ;
Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris; 192mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS, RT
Laemmli-Probenpuffer (2x)	100 mM Tris/HCl pH 6,8 200 mM Dithiothreitol (DTT) 20% (w/v) Glycerin ; 4% (w/v) SDS; 0,02% (w/v) Bromphenolblau
LB-Medium	1% (w/v) Baktotrypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid ; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ · 6H ₂ O ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄

M-STET-Puffer (Miniprep)	1% Triton X-100; 50mM Na-EDTA ; 5% Sucrose 50mM Tris/HCl pH 8,0
Western Strip-Puffer	100 mM β -ME, 2% SDS, 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7
TAE-Puffer (DNA-Gelelektrophorese)	40 mM Tris/Essigsäure pH 7,8 ; 10 mM Natriumacetat ; 1 mM Na-EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 ; 1 mM Na-EDTA
SSC 20X pH7.0	3 M NaCl 0,3 M Na Citrat
Schindler Zellextrakt Puffer	0,5% NP-40; 50mM Tris/Cl pH 8,0; 10%Glyzerol 0,1mM EDTA pH 8,0; 150mM - 300mM NaCL; 100 μ M Na ₃ VO ₄ 1mM DTT 100 μ M PMSF 25mM NaF 5mM Na Pyrophosphat
Church-Puffer	0,4M Na ₂ HPO ₄ 0,1 M Na ₂ H ₂ PO ₄ 1mM EDTA 7% SDS
RNA Formamid Ladepuffer	0,1% Bromphenolblau 5 μ g/ml Ethidium Bromid 1X MOPS Puffer 5,6% Formaldehyd 50% Formamid
10X MOPS Puffer	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer	25 mM Tris ; 20 mM Glycin ; 20% (w/v) Methanol

Anhang B Statistische Daten der Bildanalyse

In allen folgenden Zeitangaben sind die Minutenanteile dezimalisiert.

B.1 Zeitrafferfilm von Ho15.19 und TGR-1

B.1.1 Kontingenztafeln Ho15.19/TGR-175

		Ho15.19 Myc +/- Status						TGR-1 Myc +/- Status			
Häufigkeit (n)						Häufigkeit (n)					
Häufigkeit (%)						Häufigkeit (%)					
% in Zeile						% in Zeile					
% in Spalte		d	t	v	Summe	% in Spalte		d	t	v	Summe
Generation		158	14	26	198	Generation		115	8	2	125
F0		20,28	1,80	3,34	25,42	F0		12,09	0,84	0,21	13,14
		79,80	7,07	13,13				92,00	6,40	1,60	
		53,92	45,16	5,71				27,78	26,67	0,39	
F1		122	12	184	318	F1		175	10	45	230
		15,66	1,54	23,62	40,82			18,40	1,05	4,73	24,19
		38,36	3,77	57,68				76,09	4,35	19,57	
		41,64	38,71	40,44				42,27	33,33	8,88	
F2		13	5	221	239	F2		122	12	214	348
		1,67	0,64	28,37	30,68			12,83	1,26	22,50	36,59
		5,44	2,09	92,47				35,06	3,45	61,49	
		4,44	16,13	48,57				29,47	40,00	42,21	
F3		0	0	24	2	F3		2	0	242	244
		0,00	0,00	3,08	3,08			0,21	0,00	25,45	25,66
		0,00	0,00	100,00				0,82	0,00	99,18	
		0,00	0,00	5,27				0,48	0,00	47,73	
Summe		293	31	455	779	F4		0	0	4	4
		37,61	3,98	58,41	100,00			0,00	0,00	0,42	0,42
								0,00	0,00	100,00	
								0,00	0,00	0,79	
						Summe		414	30	507	951
								43,53	3,15	53,31	100,00

B.1.2 Häufigkeitsverteilungen Ho15.19/TGR-1

Geburtszeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 1								
Ho15.19 c-myc ^{-/-}					TGR-1 c-myc ^{+/+}			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F0	198	0,00	0,00	0,00	125	0,00	0,00	0,00
F1	318	18,32	0,12	98,62	230	12,05	0,33	63,60
F2	239	47,52	18,50	71,80	348	38,08	24,23	70,62
F3	24	56,27	37,50	71,97	244	59,43	42,07	71,28
F4	-	-	-	-	4	67,28	67,28	67,28

Apoptosezeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 2 mit Status t=tot								
Ho15.19 c-myc ^{-/-}					TGR-1 c-myc ^{+/+}			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F0	14	35,00	3,00	70,00	8	33,00	23,00	66,00
F1	12	48,00	20,00	71,00	10	31,00	23,07	44,75
F2	5	45,00	35,00	68,12	12	44,92	36,58	67,12
F3	0	-	-	-	0	-	-	-
F4	0	-	-	-	0	-	-	-

Verdopplungszeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 2-Zeitpunkt 1 mit Status d=Verdopplung								
Ho15.19 c-myc ^{-/-}					TGR-1 c-myc ^{+/+}			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F1	122	27,35	15,22	68,33	175	23,77	12,35	55,72
F2	13	26,84	19,00	40,95	122	23,53	13,02	42,72
F3	0	-	-	-	2	20,37	20,37	25,22
F4	0	-	-	-	0	-	-	-

B.2 Zeitrafferfilm von Smoxi-4 ohne und mit 4-OHT

B.2.1 Kontingenztafeln Smoxi-4

Smoxi-4 ohne 4-OHT					
Häufigkeit (n) Häufigkeit (%) % in Zeile % in Spalte	Status				
	d	t	v	Summe	
	Generation	189	10	7	206
	F0	13,72	0,73	0,51	14,95
		91,75	4,85	3,40	
	32,25	5,29	1,16		
F1	243	49	86	378	
	17,63	3,56	6,24	27,43	
	64,29	12,96	22,75		
	41,47	25,93	14,26		
F2	127	70	289	486	
	9,22	5,08	20,97	35,27	
	26,13	14,40	59,47		
	21,67	37,04	47,93		
F3	24	52	178	254	
	1,74	3,77	12,92	18,43	
	9,45	20,47	70,08		
	4,10	27,51	29,52		
F4	3	8	37	48	
	0,22	0,58	2,69	3,48	
	6,25	16,67	77,08		
	0,51	4,23	6,14		
F5	0	0	6	6	
	0,00	0,00	0,44	0,44	
	0,00	0,00	100,00		
	0,00	0,00	1,00		
Summe	586	189	603	1378	
	42,53	13,72	43,76	100,00	

Smoxi-4 mit 4-OHT					
Häufigkeit (n) Häufigkeit (%) % in Zeile % in Spalte	Status				
	d	t	v	Summe	
	Generation	175	39	0	214
	F0	11,03	2,46	0,00	13,49
		81,78	18,22	0,00	
	25,47	11,11	0,00		
F1	206	117	27	350	
	12,99	7,38	1,70	22,07	
	58,86	33,43	7,71		
	29,99	33,33	4,93		
F2	186	124	100	410	
	11,73	7,82	6,31	25,85	
	45,37	30,24	24,39		
	27,07	35,33	18,25		
F3	97	59	216	372	
	6,12	3,72	13,62	23,46	
	26,08	15,86	58,06		
	14,12	16,81	39,42		
F4	23	12	159	194	
	1,45	0,76	10,03	12,23	
	11,86	6,19	81,96		
	3,35	3,42	29,01		
F5	0	0	46	46	
	0,00	0,00	2,90	2,90	
	0,00	0,00	100,00		
	0,00	0,00	8,39		
Summe	687	351	548	1586	
	43,32	22,13	34,55	100,00	

B.2.2 Häufigkeitsverteilungen Smoxi-4

Geburtszeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 1								
Smoxi-4 ohne 4-OHT					Smoxi-4 mit 4-OHT			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F0	206	0,00	0,00	0,00	214	0,00	0,00	0,00
F1	378	12,23	0,05	62,15	350	11,00	0,07	76,53
F2	486	35,62	17,38	87,70	410	37,37	16,18	80,92
F3	254	52,30	32,43	85,53	372	67,23	37,20	87,93
F4	48	72,33	48,80	84,87	194	75,08	54,55	87,93
F5	6	82,00	77,68	86,37	46	82,75	74,08	87,93

Apoptosezeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 2 mit Status t=tot								
Smoxi-4 ohne 4-OHT					Smoxi-4 mit 4-OHT			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F0	10	55,48	5,55	70,00	39	18,10	3,67	67,68
F1	49	38,64	3,38	82,00	117	36,70	9,83	86,93
F2	70	55,00	29,60	86,87	124	54,55	26,35	86,77
F3	52	60,00	39,12	86,70	59	64,15	54,00	87,77
F4	8	77,68	66,67	87,00	12	80,92	73,58	87,27
F5	0	-	-	-	0	-	-	-

Verdopplungszeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 2-Zeitpunkt 1 mit Status d=Verdopplung								
Smoxi-4 ohne 4-OHT					Smoxi-4 mit 4-OHT			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F1	243	22,98	14,03	79,97	206	23,68	13,35	74,08
F2	127	22,61	15,20	57,93	186	26,02	14,52	68,08
F3	24	23,38	15,02	34,90-	97	20,53	14,52	33,38
F4	3	18,61	16,68	29,22	23	21,28	15,35	28,37
F5	0	-	-	-	0	-	-	-

B.2.3 Rohdaten der Kaplan-Meier Methode für Smoxi-4 ohne 4-OHT

Smoxi-4													
Kaplan-Meier Methode (Generationspezifische Analyse)													
<i>ohne 4-OHT</i>													
Beobachtungszeit nach Geburt													
Stunden	0	12	24	36	48	60	72	84					
Generation F0													
Zellen unter Beobachtung	206	111	40	26	19	12	7	7					
Verdopplungen	0	93	71	13	7	4	1	0	Verdopplungen	189			
Apoptosen	0	2	0	1	0	3	4	0	Apoptosen	10	lebendig	zensiert	
Lebendig oder zensiert	0	0	0	0	0	0	0	0	Lebendig/zensiert	7	7	0	
										Summe	206		
Generation F1													
Zellen unter Beobachtung	378	365	212	144	109	87	48	4					
Verdopplungen	0	0	138	58	20	13	6	8	Verdopplungen	243			
Apoptosen	0	12	13	4	10	3	4	3	Lebendig/zensiert	49	lebendig	zensiert	
Lebendig oder zensiert	0	1	2	6	5	6	29	33	Summe	86	82	4	
										378			
Generation F2													
Zellen unter Beobachtung	486	427	301	207	140	22	0						
Verdopplungen	0	0	76	40	6	5	0	Verdopplungen		127			
Apoptosen	0	26	23	9	8	3	1	Apoptosen		70	lebendig	zensiert	
Lebendig oder zensiert	0	59	27	45	53	110	21	Lebendig/zensiert		289	283	6	
										Summe	486		
Generation F3													
Zellen unter Beobachtung	254	193	146	71	16	0							
Verdopplungen	0	0	12	12	0	0	Verdopplungen		24				
Apoptosen	0	36	9	7	0	0	Apoptosen		52	lebendig	zensiert		
Lebendig oder zensiert	0	25	26	56	16	0	Lebendig/zensiert		178	173	5		
										Summe	254		
Generation F4													
Zellen unter Beobachtung	48	31	9	2	0								
Verdopplungen	0	0	2	1	0	Verdopplungen		3					
Apoptosen	0	6	1	1	0	Apoptosen		8	lebendig	zensiert			
Lebendig oder zensiert	0	11	19	5	0	Lebendig/zensiert		37	37	0			
										Summe	48		
Generation F5													
Zellen unter Beobachtung	6	0											
Verdopplungen	0	0	Verdopplungen		0								
Apoptosen	0	0	Apoptosen		0	lebendig	zensiert						
Lebendig oder zensiert	0	6	Lebendig/zensiert		6	6	0						
										Summe	6		

Aufbereitete Darstellung der Rohdaten der Kaplan-Meier Kurve für Smoxi-4 ohne 4-OHT. Es ist ersichtlich, wie sich im Verlauf der Zeit die Ausgangszellzahl in einer Generation verringert („Zellen unter Beobachtung“). Die jeweiligen Ereignisse, die zum Verlassen der Generation geführt haben sind zahlenmäßig aufgeschlüsselt. In den höheren Generationen (F4, F5) ist auffällig, dass viele Zellen mit dem Ereignis „lebendig oder zensiert“ die Beobachtung nach kurzer Zeit verlassen. Zellen dieser Generationen entstehen im Vergleich zu Zellen der F1 oder F2 Generation bezogen auf die wahre Beobachtungszeit erst viel später. Die Beobachtung einer Zelle, die erst 10 Stunden vor Beobachtungsende aus einer Teilung hervorgegangen ist, wird somit „frühzeitig“ abgebrochen.

B 2.4 Rohdaten der Kaplan-Meier Methode für Smoxi-4 mit 4-OHT

Smoxi-4												
Kaplan-Meier Methode (Generationspezifische Analyse)												
mit 4-OHT												
Beobachtungszeit nach Geburt												
	0	12	24	36	48	60	72	84				
Generation F0												
Zellen unter Beobachtung	214	105	32	19	9	3	1	0				
Verdopplungen	0	93	69	6	4	1	1	1	Verdopplungen	175		
Apoptosen	0	16	4	7	6	5	1	0	Apoptosen	39	lebendig	zensiert
Lebendig oder zensiert	0	0	0	0	0	0	0	0	Lebendig/zensiert	0	0	0
									Summe	214		
Generation F1												
Zellen unter Beobachtung	350	305	170	98	40	17	6	1				
Verdopplungen	0	0	104	46	35	12	8	1	Verdopplungen	206		
Apoptosen	0	38	26	25	21	6	1	0	Apoptosen	117	lebendig	zensiert
Lebendig oder zensiert	0	7	5	1	2	5	2	4	Lebendig/zensiert	27	11	16
									Summe	350		
Generation F2												
Zellen unter Beobachtung	412	327	190	65	33	14	0					
Verdopplungen	0	0	73	76	25	7	5		Verdopplungen	186		
Apoptosen	0	55	40	24	3	2	0		Apoptosen	124	lebendig	zensiert
Lebendig oder zensiert	0	30	24	25	4	10	9		Lebendig/zensiert	100	69	33
									Summe	410		
Generation F3												
Zellen unter Beobachtung	372	211	53	3	0							
Verdopplungen	0	0	74	23	0				Verdopplungen	97		
Apoptosen	0	42	14	3	0				Apoptosen	59	lebendig	zensiert
Lebendig oder zensiert	0	119	70	24	3				Lebendig/zensiert	216	197	19
									Summe	372		
Generation F4												
Zellen unter Beobachtung	194	100	11	0								
Verdopplungen	0	0	16	7					Verdopplungen	23		
Apoptosen	0	9	3	0					Apoptosen	12	lebendig	zensiert
Lebendig oder zensiert	0	85	70	4					Lebendig/zensiert	159	157	2
									Summe	194		
Generation F5												
Zellen unter Beobachtung	46	4	0									
Verdopplungen	0	0	0						Verdopplungen	0		
Apoptosen	0	0	0						Apoptosen	0	lebendig	zensiert
Lebendig oder zensiert	0	42	4						Lebendig/zensiert	46	46	0
									Summe	46		

Für allgemeine Erläuterungen zu den Kaplan-Meier Kurven und den Besonderheiten bei der Anwendung auf die Zellkultur siehe Anhang B.2.3.

B.3 Zeitrafferfilm von M47 mit und ohne Tetrazyklin

B.1.1 Kontingenztafeln M47

M47 mit Tetrazyklin					M47 ohne Tetrazyklin				
Status					Status				
Häufigkeit (n)					Häufigkeit (n)				
Häufigkeit (%)					Häufigkeit (%)				
% in Zeile					% in Zeile				
% in Spalte	d	t	v	Summe	% in Spalte	d	t	v	Summe
Generation	176	5	11	192	Generation	147	6	37	190
F0	9,61	0,27	0,60	10,49	F0	17,93	0,73	4,51	23,17
	91,67	2,60	5,73			77,37	3,16	19,47	
	21,54	25,00	1,11			46,08	28,57	7,71	
F1	277	9	64	350	F1	126	5	163	294
	15,13	0,49	3,50	19,12		15,37	0,61	19,88	35,85
	79,14	2,57	18,29			42,86	1,70	55,44	
	33,90	45,00	6,44			39,50	23,81	33,96	
F2	303	5	247	555	F2	46	10	196	252
	16,55	0,27	13,49	30,31		5,61	1,22	23,90	30,73
	54,59	0,90	44,50			18,25	3,97	77,78	
	37,09	25,00	24,85			14,42	47,62	40,83	
F3	60	1	549	610	F3	0	0	84	84
	3,28	0,05	29,98	3,32		0,00	0,00	10,24	10,24
	9,84	0,16	90,00			0,00	0,00	100,00	
	7,34	5,00	55,23			0,00	0,00	17,50	
F4	1	0	121	122	Summe	319	21	480	820
	0,05	0,00	6,61	6,66		38,90	2,56	58,54	100,00
	0,82	0,00	99,18						
	0,12	0,00	12,17						
F5	0	0	2	2					
	0,00	0,00	0,11	0,11					
	0,00	0,00	100,00						
	0,00	0,00	0,20						
Summe	817	20	994	1831					
	44,62	1,09	54,29	100,00					

B.1.2 Häufigkeitsverteilungen M47

Geburtszeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 1								
M47 mit Tetrazyklin					M47 ohne Tetrazyklin			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F0	192	0,00	0,00	0,00	190	0,00	0,00	0,00
F1	350	22,37	0,15	68,58	294	18,15	0,63	71,22
F2	555	44,22	21,02	71,92	252	44,18	24,15	71,83
F3	610	62,40	37,72	71,92	84	62,20	47,35	70,98
F4	122	68,75	51,05	71,92	0	-	-	-
F5	2	71,75	71,75	71,75	0	-	-	-

Apoptosezeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 2 mit Status t=tot								
M47 mit Tetrazyklin					M47 ohne Tetrazyklin			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F0	5	51,50	31,00	63,00	6	49,03	12,80	60,00
F1	9	42,05	23,00	71,92	5	52,75	50,18	68,05
F2	5	43,72	32,53	60,73	10	53,35	31,00	70,67
F3	1	56,57	56,57	56,57	0	-	-	-
F4	0	-	-	-	0	-	-	-
F5	0	-	-	-	0	-	-	-

Verdopplungszeit								
Häufigkeitsverteilung für Zeitpunkt 2-Zeitpunkt 1 mit Status d=Verdopplung								
M47 mit Tetrazyklin					M47 ohne Tetrazyklin			
Generation	Fallzahl	Median	Min	Max	Fallzahl	Median	Min	Max
F1	277	22,87	16,22	64,25	126	28,03	19,20	64,95
F2	303	20,77	15,68	39,53	46	28,37	21,68	37,65
F3	60	19,37	15,28	22,35	0	-	-	-
F4	1	17,68	17,68	17,68	0	-	-	-
F5	0	-	-	-	0	-	-	-

Literaturverzeichnis

A

Adams, J. M., Gerondakis, S., Webb, E., Corcoran, L. M., and Cory, S. (1983). Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1982-6.

Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-8.

Albert, T., Urlbauer, B., Kohlhuber, F., Hammersen, B., and Eick, D. (1994). Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene* 9, 759-63.

Amati, B., Dalton, S., Brooks, M. W., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1992). Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359, 423-6.

Amati, B., Brooks, M. W., Levy, N., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233-45.

Amati, B., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *Embo J* 12, 5083-7.

Amati, B., Frank, S. R., Donjerkovic, D., and Taubert, S. (2001). Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* 1471, M135-45.

Aoyama, C., Peters, J., Senadheera, S., Liu, P., and Shimada, H. (1998). Uterine cervical dysplasia and cancer: identification of c-myc status by quantitative polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 7, 324-30.

Armelin, H. A., Armelin, M. C., Kelly, K., Stewart, T., Leder, P., Cochran, B. H., and Stiles, C. D. (1984). Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* 310, 655-60.

Augenlicht, L. H., Wadler, S., Corner, G., Richards, C., Ryan, L., Multani, A. S., Pathak, S., Benson, A., Haller, D., and Heerdt, B. G. (1997). Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer Res* 57, 1769-75.

Ayer, D. E., Kretzner, L., and Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-22.

Ayer, D. E., and Eisenman, R. N. (1993). A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev* 7, 2110-9.

B

Bandara, L. R., Buck, V. M., Zamanian, M., Johnston, L. H., and La Thangue, N. B. (1993). Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *Embo J* 12, 4317-24.

- Batley, J., Moulding, C., Taub, R., Murphy, W., Stewart, T., Potter, H., Lenoir, G., and Leder, P. (1983). The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* *34*, 779-87.
- Baudino, T. A., and Cleveland, J. L. (2001). The Max network gene mad. *Mol Cell Biol* *21*, 691-702.
- Bear, J. E., Krause, M., and Gertler, F. B. (2001). Regulating cellular actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 158-66.
- Beijersbergen, R. L., Hijmans, E. M., Zhu, L., and Bernards, R. (1994). Interaction of c-Myc with the pRb-related protein p107 results in inhibition of c-Myc-mediated transactivation. *Embo J* *13*, 4080-6.
- Bello-Fernandez, C., Packham, G., and Cleveland, J. L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 7804-8.
- Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M. J., Spetz, A. L., and Holmgren, L. (2001). Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6407-11.
- Berns, E. M., Klijn, J. G., Smid, M., van Staveren, I. L., Look, M. P., van Putten, W. L., and Foekens, J. A. (1996). TP53 and MYC gene alterations independently predict poor prognosis in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* *16*, 170-9.
- Berns, K., Hijmans, E. M., Koh, E., Daley, G. Q., and Bernards, R. (2000). A genetic screen to identify genes that rescue the slow growth phenotype of c-myc null fibroblasts. *Oncogene* *19*, 3330-4.
- Bhatia, K., Spangler, G., Gaidano, G., Hamdy, N., Dalla-Favera, R., and Magrath, I. (1994). Mutations in the coding region of c-myc occur frequently in acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas. *Blood* *84*, 883-8.
- Bieche, I., and Lidereau, R. (1995). Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *14*, 227-51.
- Billin, A. N., Eilers, A. L., Queva, C., and Ayer, D. E. (1999). Mlx, a novel Max-like BHLHZip protein that interacts with the Max network of transcription factors. *J Biol Chem* *274*, 36344-50.
- Billin, A. N., Eilers, A. L., Coulter, K. L., Logan, J. S., and Ayer, D. E. (2000). MondoA, a novel basic helix-loop-helix-leucine zipper transcriptional activator that constitutes a positive branch of a max-like network. *Mol Cell Biol* *20*, 8845-54.
- Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* *250*, 1149-51.
- Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., and Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* *13*, 5216-24.
- Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* *251*, 1211-7.
- Blackwood, E. M., Luscher, B., and Eisenman, R. N. (1992). Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev* *6*, 71-80.

Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc- dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15, 2042-7.

Brenner, K. A., Corbett, S. A., and Schwarzbauer, J. E. (2000). Regulation of fibronectin matrix assembly by activated Ras in transformed cells. *Oncogene* 19, 3156-63.

Bush, A., Mateyak, M., Dugan, K., Obaya, A., Adachi, S., Sedivy, J., and Cole, M. (1998). c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed c- Myc targets. *Genes Dev* 12, 3797-802.

C

Cairo, S., Merla, G., Urbinati, F., Ballabio, A., and Reymond, A. (2001). WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum Mol Genet* 10, 617-27.

Cerni, C., Bousset, K., Seelos, C., Burkhardt, H., Henriksson, M., and Luscher, B. (1995). Differential effects by Mad and Max on transformation by cellular and viral oncoproteins. *Oncogene* 11, 587-96.

Chen, J., Willingham, T., Margraf, L. R., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A., and Nisen, P. D. (1995). Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells. *Nat Med* 1, 638-43.

Cheng, S. W., Davies, K. P., Yung, E., Beltran, R. J., Yu, J., and Kalpana, G. V. (1999). c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet* 22, 102-5.

Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., and Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260-5.

Croce, C. M. (1993). Molecular biology of lymphomas. *Semin Oncol* 20, 31-46.

Cultraro, C. M., Bino, T., and Segal, S. (1997). Function of the c-Myc antagonist Mad1 during a molecular switch from proliferation to differentiation. *Mol Cell Biol* 17, 2353-9.

Cultraro, C. M., Bino, T., and Segal, S. (1997). Regulated expression and function of the c-Myc antagonist, Mad1, during a molecular switch from proliferation to differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol* 224, 149-58.

D

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C., and Croce, C. M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824-7.

Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R., and Bradley, A. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7, 671-82.

Dike, L. E., and Farmer, S. R. (1988). Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6792-6.

Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2, 561-6

E

Eilers, M., Schirm, S., and Bishop, J. M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *Embo J* 10, 133-41.

Eisenman, R. N. (2001). Deconstructing myc. *Genes Dev* 15, 2023-30.

Escot, C., Theillet, C., Lidereau, R., Spyrtos, F., Champeme, M. H., Gest, J., and Callahan, R. (1986). Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4834-8.

Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-28.

F

Felsher, D. W., and Bishop, J. M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 4, 199-207.

Foley, K. P., McArthur, G. A., Queva, C., Hurlin, P. J., Soriano, P., and Eisenman, R. N. (1998). Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation. *Embo J* 17, 774-85.

Frank, S. R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* 15, 2069-82.

Freytag, S. O. (1988). Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct predifferentiation state in G0/G1. *Mol Cell Biol* 8, 1614-24.

G

Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J. Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E. W., Magrath, I. T., Knowles, D. M., and Dalla-Favera, R. (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5413-7.

Galaktionov, K., Chen, X., and Beach, D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511-7.

Gandarillas, A., and Watt, F. M. (1997). c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* 11, 2869-82.

Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4510-5.

Gehring, S., Rottmann, S., Menkel, A. R., Mertsching, J., Krippner-Heidenreich, A., and Luscher, B. (2000). Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1. Repression of Fas-induced caspase-8 activation. *J Biol Chem* 275, 10413-20.

Geiger, B., and Bershadsky, A. (2001). Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 13, 584-92.

Glantz S.A.. *Biostatistik* (4. Auflage). (1998). Deutsche Ausgabe herausgegeben von Heinecke A., Köpcke W. McGraw Hill. ISBN 3-89028-410-8

Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-99.

Greasley, P. J., Bonnard, C., and Amati, B. (2000). Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* 28, 446-53.

Greenberg, R. A., O'Hagan, R. C., Deng, H., Xiao, Q., Hann, S. R., Adams, R. R., Lichtsteiner, S., Chin, L., Morin, G. B., and DePinho, R. A. (1999). Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18, 1219-26.

Gu, W., Cechova, K., Tassi, V., and Dalla-Favera, R. (1993). Opposite regulation of gene transcription and cell proliferation by c-Myc and Max. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2935-9.

Gu, W., Bhatia, K., Magrath, I. T., Dang, C. V., and Dalla-Favera, R. (1994). Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science* 264, 251-4.

Guo, Q. M., Malek, R. L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N. H., Dang, C. V., and Liu, E. T. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res* 60, 5922-8.

H

Hann, S. R., Sloan-Brown, K., and Spotts, G. D. (1992). Translational activation of the non-AUG-initiated c-myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation. *Genes Dev* 6, 1229-40.

Harrington, E. A., Bennett, M. R., Fanidi, A., and Evan, G. I. (1994). c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo J* 13, 3286-95.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-12.

Helin, K., Harlow, E., and Fattaey, A. (1993). Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 13, 6501-8.

Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C. V., Sedivy, J. M., Eick, D., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2229-34.

Hölzel, M., Kohlhuber, F., Schlosser, I., Holzler, D., Luscher, B., and Eick, D. (2001). Myc/Max/Mad regulate the frequency but not the duration of productive cell cycles. *EMBO Rep* 2, 1125-32.

Hurlin, P. J., Queva, C., Koskinen, P. J., Steingrimsson, E., Ayer, D. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Eisenman, R. N. (1995). Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *Embo J* 14, 5646-59.

Hurlin, P. J., Queva, C., and Eisenman, R. N. (1997). Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes Dev* 11, 44-58.

Hurlin, P. J., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Eisenman, R. N. (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *Embo J* 18, 7019-28.

I

Ichikawa, A., Hotta, T., and Saito, H. (1993). Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 11, 21-5.

Iritani, B. M., and Eisenman, R. N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13180-5.

J

Jenkins, R. B., Qian, J., Lieber, M. M., and Bostwick, D. G. (1997). Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 57, 524-31.

Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N., and Gallant, P. (1999). *Drosophila* myc regulates cellular growth during development. *Cell* 98, 779-90.

Juin, P., Hueber, A. O., Littlewood, T., and Evan, G. (1999). c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 13, 1367-81.

K

Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoellner, U., Talpaz, M., Druker, B., Goldman, J., O'Brien, S. G., Russell, N., Fischer, T., Ottmann, O., Cony-Makhoul, P., Facon, T., Stone, R., Miller, C., Tallman, M., Brown, R., Schuster, M., Loughran, T., Gratwohl, A., Mandelli, F., Saglio, G., Lazzarino, M., Russo, D., Baccarani, M., and Morra, E. (2002). Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 346, 645-52.

Kato, G. J., Barrett, J., Villa-Garcia, M., and Dang, C. V. (1990). An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol* 10, 5914-20.

Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., and Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35, 603-10.

Kingston, R. E., and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13, 2339-52.

Knoepfler, P. S., and Eisenman, R. N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-50.

Krek, W., Livingston, D. M., and Shirodkar, S. (1993). Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science* 262, 1557-60.

Kretzner, L., Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1992). Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature* 359, 426-9.

L

Lahoz, E. G., Xu, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1994). Suppression of Myc, but not E1a, transformation activity by Max-associated proteins, Mad and Mxi1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5503-7.

Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.

Land, H., Chen, A. C., Morgenstern, J. P., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1986). Behavior of myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 6, 1917-25.

Langdon, W. Y., Harris, A. W., Cory, S., and Adams, J. M. (1986). The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice. *Cell* 47, 11-8.

Larsson, L. G., Pettersson, M., Oberg, F., Nilsson, K., and Luscher, B. (1994). Expression of mad, mxi1, max and c-myc during induced differentiation of hematopoietic cells: opposite regulation of mad and c-myc. *Oncogene* 9, 1247-52.

LeCouter, J. E., Kablar, B., Hardy, W. R., Ying, C., Megeney, L. A., May, L. L., and Rudnicki, M. A. (1998). Strain-dependent myeloid hyperplasia, growth deficiency, and accelerated cell cycle in mice lacking the Rb-related p107 gene. *Mol Cell Biol* 18, 7455-65.

Lee, L. A., Dolde, C., Barrett, J., Wu, C. S., and Dang, C. V. (1996). A link between c-Myc-mediated transcriptional repression and neoplastic transformation. *J Clin Invest* 97, 1687-95.

Lee, T. C., Li, L., Philipson, L., and Ziff, E. B. (1997). Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12886-91.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-9.

Li, L. H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D., and Ziff, E. B. (1994). c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *Embo J* 13, 4070-9.

Little, C. D., Nau, M. M., Carney, D. N., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1983). Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306, 194-6.

Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G., and Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 1686-90.

Liu, J., Akoulitchev, S., Weber, A., Ge, H., Chuikov, S., Libutti, D., Wang, X. W., Conaway, J. W., Harris, C. C., Conaway, R. C., Reinberg, D., and Levens, D. (2001). Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum. *Cell* 104, 353-63.

Lopez-Rodriguez, C., Delgado, M. D., Puig-Kroger, A., Nueda, A., Munoz, E., Leon, J., Bernabeu, C., and Corbi, A. L. (2000). c-Myc inhibits CD11a and CD11c leukocyte integrin promoters. *Eur J Immunol* 30, 2465-71.

Luscher, B. (2001). Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* 277, 1-14.

M

Mai, S., and Martensson, I. L. (1995). The c-myc protein represses the lambda 5 and TdT initiators. *Nucleic Acids Res* 23, 1-9.

Marcu, K. B., Harris, L. J., Stanton, L. W., Erikson, J., Watt, R., and Croce, C. M. (1983). Transcriptionally active c-myc oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B-cell neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 519-23.

Marhin, W. W., Chen, S., Facchini, L. M., Fornace, A. J., Jr., and Penn, L. Z. (1997). Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene* 14, 2825-34.

Mateyak, M. K., Obaya, A. J., Adachi, S., and Sedivy, J. M. (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* 8, 1039-48.

McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., and Cole, M. D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-74.

Meroni, G., Reymond, A., Alcalay, M., Borsani, G., Tanigami, A., Tonlorenzi, R., Nigro, C. L., Messali, S., Zollo, M., Ledbetter, D. H., Brent, R., Ballabio, A., and Carrozzo, R. (1997). Rox, a novel bHLHZip protein expressed in quiescent cells that heterodimerizes with Max, binds a non-canonical E box and acts as a transcriptional repressor. *Embo J* 16, 2892-906.

Meroni, G., Cairo, S., Merla, G., Messali, S., Brent, R., Ballabio, A., and Reymond, A. (2000). Mlx, a new Max-like bHLHZip family member: the center stage of a novel transcription factors regulatory pathway? *Oncogene* 19, 3266-77.

Miltenberger, R. J., Sukow, K. A., and Farnham, P. J. (1995). An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. *Mol Cell Biol* 15, 2527-35.

Miner, J. H., and Wold, B. J. (1991). c-myc inhibition of MyoD and myogenin-initiated myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 11, 2842-51.

Muller, D., Bouchard, C., Rudolph, B., Steiner, P., Stuckmann, I., Saffrich, R., Ansorge, W., Huttner, W., and Eilers, M. (1997). Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene* 15, 2561-76.

Munzel, P., Marx, D., Kochel, H., Schauer, A., and Bock, K. W. (1991). Genomic alterations of the c-myc protooncogene in relation to the overexpression of c-erbB2 and Ki-67 in human breast and cervix carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 117, 603-7.

N

Nomdedeu, J. F., Lete, I., Baiget, M., Lasa, A., Estivill, C., Rubiol, E., Badell, I., Pardo, N., Cubells, J., Mateu, R., Brunet, S., Bordes, R., and Soler, J. (1997). Mutational analysis of p53 in 16 cases of acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 82, 550-4.

P

Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-5.

Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-8.

Penn, L. J., Brooks, M. W., Laufer, E. M., and Land, H. (1990). Negative autoregulation of c-myc transcription. *Embo J* 9, 1113-21.

Perez-Roger, I., Solomon, D. L., Sewing, A., and Land, H. (1997). Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* 14, 2373-81.

Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J* 16, 5672-86.

Philipp, A., Schneider, A., Vasrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K., and Eilers, M. (1994). Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol Cell Biol* 14, 4032-43.

Pinion, S. B., Kennedy, J. H., Miller, R. W., and MacLean, A. B. (1991). Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 337, 819-20.

Prendergast, G. C., and Ziff, E. B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251, 186-9.

Prendergast, G. C., Lawe, D., and Ziff, E. B. (1991). Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* 65, 395-407.

Pulverer, B., Sommer, A., McArthur, G. A., Eisenman, R. N., and Luscher, B. (2000). Analysis of Myc/Max/Mad network members in adipogenesis: inhibition of the proliferative burst and differentiation by ectopically expressed Mad1. *J Cell Physiol* 183, 399-410.

Pusch, O., Bernaschek, G., Eilers, M., and Hengstschlager, M. (1997). Activation of c-Myc uncouples DNA replication from activation of G1- cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 15, 649-56.

Q

Queva, C., McArthur, G. A., Ramos, L. S., and Eisenman, R. N. (1999). Dwarfism and dysregulated proliferation in mice overexpressing the MYC antagonist MAD1. *Cell Growth Differ* 10, 785-96.

R

Reisman, D., Elkind, N. B., Roy, B., Beamon, J., and Rotter, V. (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ* 4, 57-65.

Riede U.N, Schaefer H.E. (1995). Allgemeine und Spezielle Pathologie (4.Auflage). Thieme Verlag. ISBN 3-13-683304-X

Rosenwald, I. B., Rhoads, D. B., Callanan, L. D., Isselbacher, K. J., and Schmidt, E. V. (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 α in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6175-8.

S

Sakamuro, D., and Prendergast, G. C. (1999). New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene* 18, 2942-54.

Salghetti, S. E., Kim, S. Y., and Tansey, W. P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *Embo J* 18, 717-26.

Sambrook J., Russel D. *Molecular Cloning – A laboratory manual*. Third Edition (2001) CSHL Press. ISBN 0-87969-577-3

Schoenenberger, C. A., Andres, A. C., Groner, B., van der Valk, M., LeMeur, M., and Gerlinger, P. (1988). Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *Embo J* 7, 169-75.

Schoenwaelder, S. M., and Burridge, K. (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11, 274-86.

Schuhmacher, M., Staeger, M. S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U. H., Bornkamm, G. W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9, 1255-8.

Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzels, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H., and Eick, D. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.

Sheaff, R. J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. M., and Clurman, B. E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 11, 1464-78.

Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-5.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-63.

Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., and Dang, C. V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6658-63.

Spencer, C. A., and Groudine, M. (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 56, 1-48.

Spotts, G. D., Patel, S. V., Xiao, Q., and Hann, S. R. (1997). Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol* 17, 1459-68.

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392-9.

Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J., and Eilers, M. (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *Embo J* *14*, 4814-26.

T

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 7837-41.

Thompson, C. B., Humphries, E. H., Carlson, L. M., Chen, C. L., and Neiman, P. E. (1987). The effect of alterations in myc gene expression on B cell development in the bursa of Fabricius. *Cell* *51*, 371-81.

Trumpp, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G. R., and Bishop, J. M. (2001). c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* *414*, 768-73.

V

Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* *20*, 1899-910.

Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D., and Amati, B. (1996). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *Embo J* *15*, 6595-604.

Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* *16*, 5334-44.

W

Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D., and Hannon, G. J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* *12*, 1769-74.

Wang, Z. R., Liu, W., Smith, S. T., Parrish, R. S., and Young, S. R. (1999). c-myc and chromosome 8 centromere studies of ovarian cancer by interphase FISH. *Exp Mol Pathol* *66*, 140-8.

Waterman-Storer, C. M., and Salmon, E. (1999). Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 61-7.

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* *81*, 323-30.

Wu, K. J., Polack, A., and Dalla-Favera, R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* *283*, 676-9.

Y

Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsur, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D. W., Hofmann, C. S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L. P., and Sonenshein, G. E. (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* *20*, 1688-702.

Z

Zervos, A. S., Gyuris, J., and Brent, R. (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72, 223-32.

Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K. G. (1995). What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 7, 835-42.

Zhou, Z. Q., and Hurlin, P. J. (2001). The interplay between Mad and Myc in proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol* 11, S10-4.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

4-OHT	4-Hydroxy Tamoxifen
Abb.	Abbildung
Abl	zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-abl (Abelson murine leukemia)
APC	Tumorsuppressor, mutiert in adenomatosis polyposis coli
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	Protein des breakpoint cluster region-Gens
bHLHZip	Strukturdomäne, basic helix-loop-helix leucine zipper
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
CAD	Carbamoyl Phosphat Synthetase 2
CDC25A	Zellzykluskinase, cell division cycle 25A
CDK	Zyclin abhängige Kinase, cyclin dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA
c-Myc	zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-myc (Myelocytomatosis)
c-myc ^{-/-}	Knock-out des endogenen c-myc Gens
c-myc ^{+/+}	Wildtyp für das endogene c-myc Gen
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff
d.h.	das heißt
dMyc	c-Myc Homolog der Fruchtfliege Drosophila
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DP	Transkriptionsfaktor DP, E2F Dimerisierungspartner
E1A	Onkogen des Adenovirus
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
ER	Östrogenrezeptor, estrogen receptor
et al.	et alias
F1	erste Tochtergeneration
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflußzytometrie
FITC	Fluoreszein
FKS	Fötale Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreuung, forward scatter
GADD45	Growth arrest and DNA damage inducible gene 45
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GAS-1	Growth arrest specific protein-1
HA	Hämagglutinin-Epitop des Influenzavirus
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HCL	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
Ho15.19	c-myc knock-out Zelllinie
HoMyc3	c-myc knock-out Zelllinie mit konstitutiv exprimierten c-Myc
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IGF-1	Insulin like growth factor-1
INR	Initiator element
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ki-67	Antigen erkannt durch monoklonalen Antikörper Ki-67
Log	logarithmisch
LTR	Retroviraler Promoter, long terminal repeat
M47	Osteosarkomzelllinie mit konditional regulierbarem Mad1

Mad	Mitotic arrest and differentiation Protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Max	Max Protein, Dimerisierungspartner von Myc
Mga	Max gene associated
Miz-1	Myc-interacting zing finger protein 1
Mlx	Max like protein
Mnt	Max binding protein
MondoA	Mlx interacting protein
mRNA	Messenger RNA
Mxi1	Max interacting protein
MycER	Fusionsprotein aus c-Myc und Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors
NTS	Kerntranslokationssignal, nuclear translocation signal
ODC	Ornithin Deacetylase
ORF	Offenes Leseraster, open reading frame
p107, p130	Tumorsuppressor der Rb-Familie
p15, p16	CDK Inhibitoren
p18, p19	CDK Inhibitoren
p19 ARF	Tumorsuppresor
p21, p27	CDK Inhibitoren
P493-6	B-Zelllinie mit konditional regulierbarem c-Myc
p53	Tumorsuppressor Protein p53
p57	CDK Inhibitor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
pRb	Tumorsuppressor, deletiert in Retinoblastomen
Raf	Serin-Threonin Protein Kinase
Ras	zelluläres Homolog, des viralen Onkogens (Rous sarcoma virus)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
Smoxi-4	c-myc knock-out Zelllinie mit MycER-Fusionsprotein
SNF5	Transkriptionsfaktor SNF5
SV40	Simian virus 40
SWI/SNF	Chromatin-Modellierungskomplex
TAD	Transaktivierungsdomäne
TFII-I	Transkriptionsfaktor für RNA Polymerase II
TGR-1	c-myc Wildtyp Fibroblasten
TRAPP	Myc interagierendes Protein der ATM/PI3K-Familie
TUNEL	TdT-mediated dUTP-X nick end labeling
U2OS	Osteosarkomzelllinie
UTA	U2OS Zelllinie mit Tetrazyklin-Transaktivator
UV	Ultraviolette Strahlung
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen, weight per volume
WBSCR14	Williams-Beuren-Syndrom Gen Chromosom 14
YY-1	Transkriptionsfaktor Yin-Yang-1
z.B.	zum Beispiel
ZMV	Zytomegalievirus

Publikationen**Wesentliche Anteile dieser Dissertation wurden publiziert in:**

Hölzel M, Kohlhuber F, Schlosser I, Hölzel D, Lüscher B, Eick D (2001). Myc/Max/Mad regulate the frequency but not the duration of productive cell cycles. *EMBO Rep* 2, 1125-32.

Weitere Publikationen:

Schuhmacher M, Kohlhuber F, **Hölzel M**, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, Bornkamm GW, Laux G, Polack A, Weidle UH, Eick D (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.

Hölzel M, van Diest PJ, Bier P, Wallisch M, Hoatlin ME, Joenje H, de Winter. FANCD2 protein is expressed in proliferating cells of human tissues that are cancer-prone in Fanconi Anemia. *J Pathol.* 2003 Oct;201(2):198-203

Schlosser I, **Hölzel M**, Münseer M, Burtscher H, Weidle UH, Eick D. Regulation of rRNA processing by c-Myc. (*im Druck bei Nucleic Acid Research*)

Lebenslauf

Michael Christian Hölzel

geboren: 1.03.1976 in München/Pasing

Vater: Prof. Dr. Dieter Hölzel,
Institut für Epidemiologie und Informationsverarbeitung (IBE), LMU München

Mutter: Renate Hölzel, geb. Hübner, Studium der Pharmazie

Bruder: Peter Michael Hölzel, Medizinstudent imPJ

Tabellarische Übersicht zur Schulzeit und Studienlaufbahn

1982	Einschulung, Grundschule in der Kleinfeldstraße, Germering
1986	Max-Born-Gymnasium, Germering
1991/92	Halbjähriger Besuch einer High School in Longview, USA
1995	Abitur, Note 1,3
1995/96	Zivildienst im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München
1996	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität München für den Studiengang Humanmedizin
1997/98	ERASMUS Auslandssemester in Alicante, Spanien
Mai 1998	Sprachzeugnis „Diploma basico“, spanisches Kulturinstitut Instituto Cervantes
Sept.1998	Physikum, Note 1,0
April 1999	Famulatur im Krankenhaus „Hospital General de Cuernavaca Dr. G. Parres“ in Cuernavaca, Mexico
Aug.1999	1. Staatsexamen, Note 1,0
Okt.1999	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
April 2001	Dreimonatiger Forschungsaufenthalt am National Cancer Institute, Bethesda, USA.
März 2002	2. Staatsexamen , Note 1,6
April 2002	PJ, Innere Medizin, Harvard Medical School, Boston
Aug. 2002	PJ, Pathologie, Freie Universität, Amsterdam
Nov. 2002	PJ, Chirurgie, LMU-München, Chirurgische Klinik in der Nußbaumstraße
April 2003	3. Staatsexamen, Note 1,0, Gesamtnote 1,3
Juli 2003	Beginn des AiP in der Medizinischen Klinik III in Großhadern

Danksagung

Besonderer Dank gilt **Frau Renate Eckel** und **Prof. Dieter Hölzel** vom Institut für Epidemiologie und Informationsverarbeitung der LMU für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung der Zeitrafferfilme.

Weiterhin möchte ich **John Sedivy** von der University of Providence, Rhode Island, USA für die Bereitstellung der Zelllinien Ho15.19, HoMyc3 und TGR-1 danken.

Ebenfalls möchte ich **Prof. B. Lüscher** vom Institut für Biochemie in Aachen für die Bereitstellung der Osteosarkomzelllinie M47 und für das kritische Lesen der Publikation danken.

Für die große Unterstützung möchte ich mich bei meinem Institutsleiter **Prof. Georg W Bornkamm** bedanken.

Für die technischen Tipps und Tricks möchte ich mich ganz besonders bei **Gerhard Laux** und **Markus Conrad** bedanken.

Für die fantastische Zeit am NIH möchte ich **Dr. David Levens** vom Laboratory of Pathology am National Cancer Institute ganz herzlich danken.

Herzlicher Dank sei an alle aus meiner Arbeitsgruppe gesagt, für all den Spaß im und außerhalb des Labors: **Robert Chapman, Martin Schlee, Christoph Lux, Manuela Horndasch, Isabel Schlosser, Marino Schuhmacher**.

Vielen Dank auch noch an meinen Post-Doc **Franz Kohlhuber**, der mir am Anfang im Labor das Laufen beigebracht hat.

Weiterhin herzlichen Dank an meinen Biochemie Seminarleiter **Prof. Wolfram Hörz** für die langjährige Unterstützung und Vermittlung an die GSF.

Zum Schluss ganz besonderen Dank an meinen Gruppenleiter **Prof. Dirk Eick** für die intensive Betreuung bei der Arbeit, sowie für die Unterstützung meines Aufenthaltes am NIH. Außerdem möchte ich mich für das hervorragende Arbeitsklima sehr herzlich bedanken.