

## Abstract

---

While *c-myc* often contributes to the generation of B-cell transformation, its transgenic overexpression alone does not lead to full transformation of B-lineage cells. Synergistically acting second genes must cooperate. In this thesis I screened for and investigated such second genes that cooperate with *c-myc* in B-cell transformation. Here, I followed fetal liver-derived mouse preB1-cells continuously overexpressing doxycycline-controlled *c-myc* and either *bcl-xL* (*c-myc/bcl-xL*) or preB1-cell-derived cDNA-libraries (*c-myc/cDNAlibr*) at different stages of differentiation.

*In vitro* overexpression of *c-myc/bcl-xL* allows the differentiation of preB1 to resting IgM<sup>+</sup> immature B-cells. Additionally, timed CpG-stimulation of these oncogene-overexpressing preB1 or immature B-cells generates either preB1-like, or MHCII<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> mature or IgM-secreting B-cell stages *in vitro*, indicating that CpG can fix the differentiation at distinct developmental stages. Furthermore, all these different cell lines are clonable by single cell sorting. After transplantation of GFP<sup>+</sup> *c-myc-bcl-xL*-overexpressing preB1-cells into immunodeficient Rag1<sup>-/-</sup> mice, GFP<sup>+</sup> preB-cells, mature B-cells, and IgM- and IgA-secreting plasmablasts and plasma cells expand. Within 2 months, the plasmablasts, as the most prominent cell stage, have expanded around 10<sup>4</sup>-fold in bone marrow and spleen, before the mice die around 70 days after transplantation, indicating that the host accelerates and selectively develops these plasma cell malignancies.

By overexpression of *c-myc* and cDNA-library one double *c-myc/cDNAlibr*-expressing cell line was found in less than 5x10<sup>6</sup> library-transduced preB-cells surviving and expressing a cDNA-library-derived transcript *in vitro*. This transcript was identified as a shortened form of the *Exosc1* gene, encoding the RNA exosome complex component CSL4. Transplantations of double *c-myc/Exosc1* short-form- or *c-myc/Exosc1* full-length-transgenic cells into Rag1<sup>-/-</sup> mice resulted in survival, differentiation to CD19<sup>+</sup>CD93<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>CD5<sup>low/-</sup>CD11b<sup>+</sup> mature B1-cells and, surprisingly, also vigorous expansion *in vivo*. Strikingly, after transplantations of *c-myc/cDNAlibr* preB1-cells the frequencies of double-transgenic preB-cells and their differentiated progeny, expanding *in vivo* to heterogeneous phenotypes, was at least 10-fold higher than *in vitro*. In a first analysis *Ptprecap*, *Cacybp*, *Ndufs7*, *Rpl18a* and *Rpl35a* were identified. This again suggests a strong influence of the host on B-cell transformation.

# Zusammenfassung

---

Das Onkogen c-myc wird häufig mit der Entstehung von malignen B-Zellen in Zusammenhang gebracht. Zur vollständigen B-Zelltransformation reicht jedoch die Überexpression von c-myc allein nicht aus. Hierfür werden zusätzliche, synergistisch funktionierende Gene benötigt. In dieser Arbeit untersuchte ich die Differenzierung von murinen preBI-Zellen, die kontinuierlich Doxyzyklin-kontrollierte Formen von GFP, c-myc und entweder bcl-xL (c-myc/bcl-xL) oder cDNS Bibliotheken (c-myc/cDNSBib), die aus normalen preBI-Zellen erstellt wurden, überexprimierten.

Die *in vitro* Überexpression von c-myc/bcl-xL induziert die Differenzierung von preBI zu ruhenden IgM<sup>+</sup> unreifen B-Zellen. Die zusätzliche Stimulation mit CpG dieser Onkogen überexprimierenden zu bestimmten Zeiten ermöglicht die Generierung von preBII-ähnlichen, MHCII<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> reifen oder IgM-sezernierenden B-Zell Stadien *in vitro*, und deutet darauf hin, dass CpG die Differenzierung an bestimmten Entwicklungsstadien fixieren kann. Desweiteren können die Zellen durch Einzelzellsortierung kloniert werden. Nach Transplantation der GFP<sup>+</sup> c-myc/bcl-xL überexprimierenden preBI-Zellen in Rag<sup>-/-</sup> Mäuse, expandierten GFP<sup>+</sup> preBI-, reife B-Zellen und IgM- und IgA-sezernierende Plasmablasten und Plasmazellen. Nach 2 Monaten, wurden hauptsächlich Plasmablasten im Knochenmark und der Milz detektiert, bevor die Mäuse durchschnittlich 70 Tage nach Transplantation verstarben. Beides deutet darauf hin, dass der Wirt die Entstehung von bösartigen Plasmazellerkrankungen selektiv begünstigt und beschleunigt.

Durch die Überexpression von c-myc und der cDNSBib wurde unter  $5 \times 10^6$  transgenen Zellen eine einzige Zellpopulation gefunden, die unter Differenzierungsbedingungen zwar überlebte, jedoch nicht proliferierte. Diese Zelllinie exprimierte ein Gen, das aus der cDNS-Bibliothek stammt. Es wurde als eine kurze Transkriptionsvariante des Exosc1 Gens identifiziert, die für das Protein Exosom Komponente CSL4 kodiert. Nach Transplantationen von c-myc und kurzen Exosc1 bzw. langen Exosc1 doppel-transgenen Zelllinien in Rag1<sup>-/-</sup> Tiere, überlebten diese nicht nur, sondern expandierten und differenzierten zu reifen B1-Zellen *in vivo*. Dieses Ergebnis führte eine *in vivo* Transplantationsanalyse für Transformations-kooperierende Gene in der cDNS-Bibliothek nach sich. Die Frequenzen der *in vivo* transformierten, c-myc/cDNSBib-überexprimierenden Zellen war mindestens 10-fach höher als *in vitro*. Im Gegensatz zu den c-myc/Exosc1-Zelllinien, wurde in den c-myc/cDNSBib-transplantierten Rezipienten heterogene Phänotypen inklusive reife B1-Zellen, Plasmablasten und Plasmazellen detektiert. In einzelnen Mäusen, die mit je  $5 \times 10^6$  c-myc/cDNSBib-transduzierten Zellen transplantiert wurden, konnten jeweils mehrere Gene gefunden werden, die aus der cDNS-Bibliothek stammten. In einer ersten Analyse wurden die Gene *Ptprcap*, *Cacybp*, *Ndufs7*, *Rpl18a* und *Rpl35a* identifiziert. Diese Ergebnisse deuten erneut darauf hin, dass der Wirt einen starken Einfluss auf die B-Zelltransformation *in vivo* hat.