

# 1 Einleitung

Gegenstand dieser Arbeit sind die Klasse-II-Tumorsuppressorgene H-rev107.1 und H-rev107.2. Ziel war eine systematische Untersuchung ihrer Expression in hämatopoetischen Zellen. Als Nachweismethode wurde die RT-PCR mit spezifischen Primern verwendet, Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, *reverse transkription-polymerase chain reaction*.

## 1.1 Hämatopoese

### 1.1.1 Physiologie der Hämatopoese

Das gesunde Knochenmark bildet etwa  $1-5 \times 10^9$  Erythrozyten und  $1-5 \times 10^9$  Leukozyten pro Stunde aus Vorläuferzellen. Neben der fortwährenden Erneuerung der zellulären Blutbestandteile muss das hämatopoetische System besonderen Anforderungen bei Entzündungsreaktionen, Hypoxie oder Blutverlusten gerecht werden (Williams, 2000).

Die Hämatopoese lässt sich mit Hilfe eines Stammbaums darstellen (Abbildung 1.1). Aus einer pluripotenten undeterminierten Stammzelle entwickeln sich zunächst Stammzellen mit eingeschränkter Pluripotenz, dann determinierte Stammzellen. Determinierte Stammzellen unterscheiden sich morphologisch nicht und werden funktionell durch ihre Fähigkeit differenziert, in vitro spezifische hämatopoetische Kolonien zu bilden. Sie werden als „koloniebildende Einheit“ bezeichnet, *colony forming unit* (CFU), in der Erythropoese auch *burst forming unit* (BFU). Als Zusatz bekommen sie ein Kürzel der jeweiligen Reihe. Es werden beschrieben: BFU-E, CFU-E, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Eo, CFU-Bas, CFU-DC, CFU-Mast-Cells. Daraus entwickeln sich die Vorläuferzellen der einzelnen Reihen, die sich morphologisch unterscheiden lassen und schließlich folgende differenzierte Zellen: Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen inklusive der dendritischen Zellen der Haut, Lymphozyten, Plasmazellen und Mastzellen (Böcker et al., 1996, Abbildung 1-1).

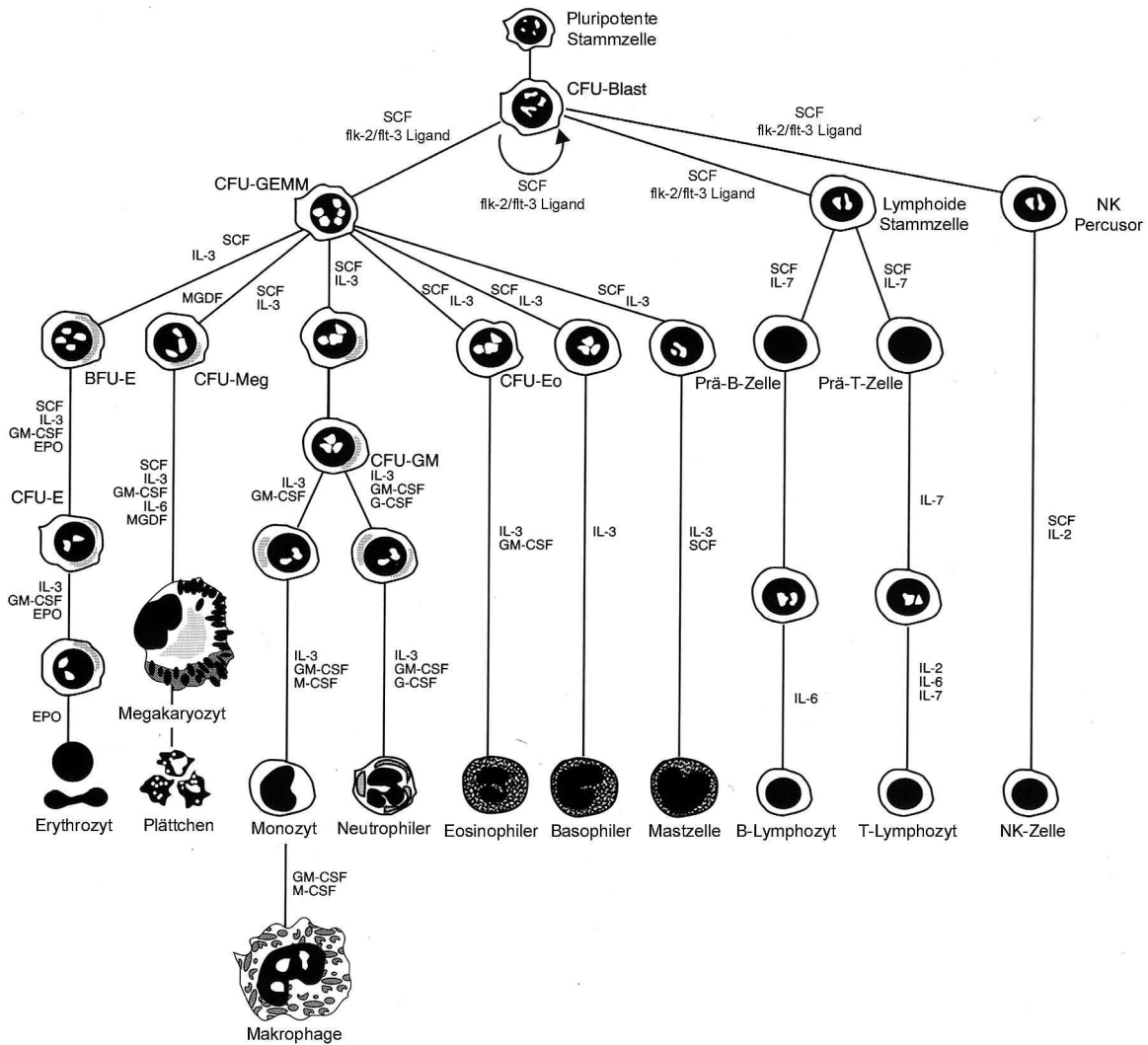


Abbildung 1-1: Der Hämatopoetische Stammbaum (modifiziert nach Reiffers et al., 1999).

Bei der Teilung hämatopoetischer Stammzellen werden diese nicht verbraucht. Eine Tochterzelle bleibt als Stammzelle erhalten, die andere beginnt zu differenzieren (Whetton et al., 1998). Die nachfolgende Entwicklung und Expansion unterliegen einer komplexen Steuerung von Proliferation, Differenzierung und Apoptose, die nur bruchstückhaft verstanden ist (Lee et al., 2000). Eine wichtige Rolle wird der sogenannten hämatopoetischen Mikroumgebung (*hematopoietic microenvironment*) zugeschrieben. Sie beinhaltet die Zellen des Knochenmarkstromas, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Osteoblasten, die extrazelluläre Matrix des Knochenmarks und hämatopoetisch wirksame Zytokine.

Die Elemente der Mikroumgebung nehmen über die Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle der hämatopoetischen Zellen Einfluss auf deren Entwicklung. Die Transduktion der verschiedenen Signale, die das Zellwachstum steuern, erfolgt durch Proteine und andere Second-Messenger, die

ein Netzwerk von Reaktionskaskaden bilden (Abbildung 1-2). Es resultieren Änderungen in der zellulären Genexpression, die zu den unterschiedlichen Eigenschaften und Phänotypen der hämatopoetischen Zellen führen. Häufen sich Mutationen an vulnerablen Punkten dieses Systems, kann dies eine dauerhafte Störung der Wachstumsregulation bewirken. Es entstehen Neoplasien oder aplastisches Syndrome (Verfaillie, 2000).

### 1.1.2 Immunzytologie

Immunzytologische Charakteristika können neben morphologischen und funktionellen Kriterien, wie die Fähigkeit zur Bildung von spezifischen Kolonien, herangezogen werden, um hämatopoetische Zellen anhand ihres Differenzierungsgrades zu unterscheiden. Grundlage dafür bildet das CD-System (*cluster of differentiation*). Es basiert auf dem Expressionsnachweis zellulärer Antigene mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Klinische Bedeutung hat das CD-System bei der Diagnostik und der Klassifikation von Leukämien und Lymphomen. Außerdem ermöglichen diese Methoden eine Trennung gesunder Blutzellen in definierte Untergruppen, für die bestimmte Markerantigene bekannt sind. Eine frühe Übersichtsarbeit zur Separation von hämatopoetischen Zellen mit Hilfe ihrer Oberflächenantigene gaben Civin et al. (Civin et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit wurden magnetische Antikörper (MACS MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gegen definierte CD-Moleküle verwendet, um hämatopoetische Vorläuferzellen getrennt auf die Expression der Tumorsuppressorgene hin zu untersuchen.

Es wurden Anti-CD34-Antikörper zur Separation der frühen lymphohämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen eingesetzt. Determinierte Zellen verlieren das CD34-Epitop im Laufe der Differenzierung (Krause et al., 1996; Nishio et al., 1999). Außerdem wurden verschiedene Subpopulationen der mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit der gleichen Methode separiert. Es konnten dadurch CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (Saito et al., 1997) und CD19<sup>+</sup>-B-Zellen (Sato et al., 1999) getrennt untersucht werden. Weiterhin wurden die Untergruppen der CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Lymphozyten (Piatier-Tonneau et al., 1999) der CD45RO<sup>+</sup>-T-Gedächtniszellen (Sewell et al., 1999) der CD14<sup>+</sup>-Makrophagen (Goyert et al., 1999) und der CD56<sup>+</sup>-NK-Zellen (Poggi et al., 1999) mit Hilfe der jeweiligen Marker isoliert und untersucht. Es können auch Antikörperkombinationen zur Selektion spezifischer Subpopulationen eingesetzt werden. In der vorgelegten Arbeit wurden in einem orientierenden Experiment CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen in aktivierte/Gedächtnis- (CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) und naive/ruhende-T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>)

getrennt (Sewell et al., 1999). Ebenso wurden B-Zellen als B-Gedächtniszellen ( $CD19^+/CD27^+$ ) und naive B-Zellen ( $CD19^+/CD27^-$ ) definiert (Kobata et al., 1999).

## 1.2 Maligne Hämatopoese

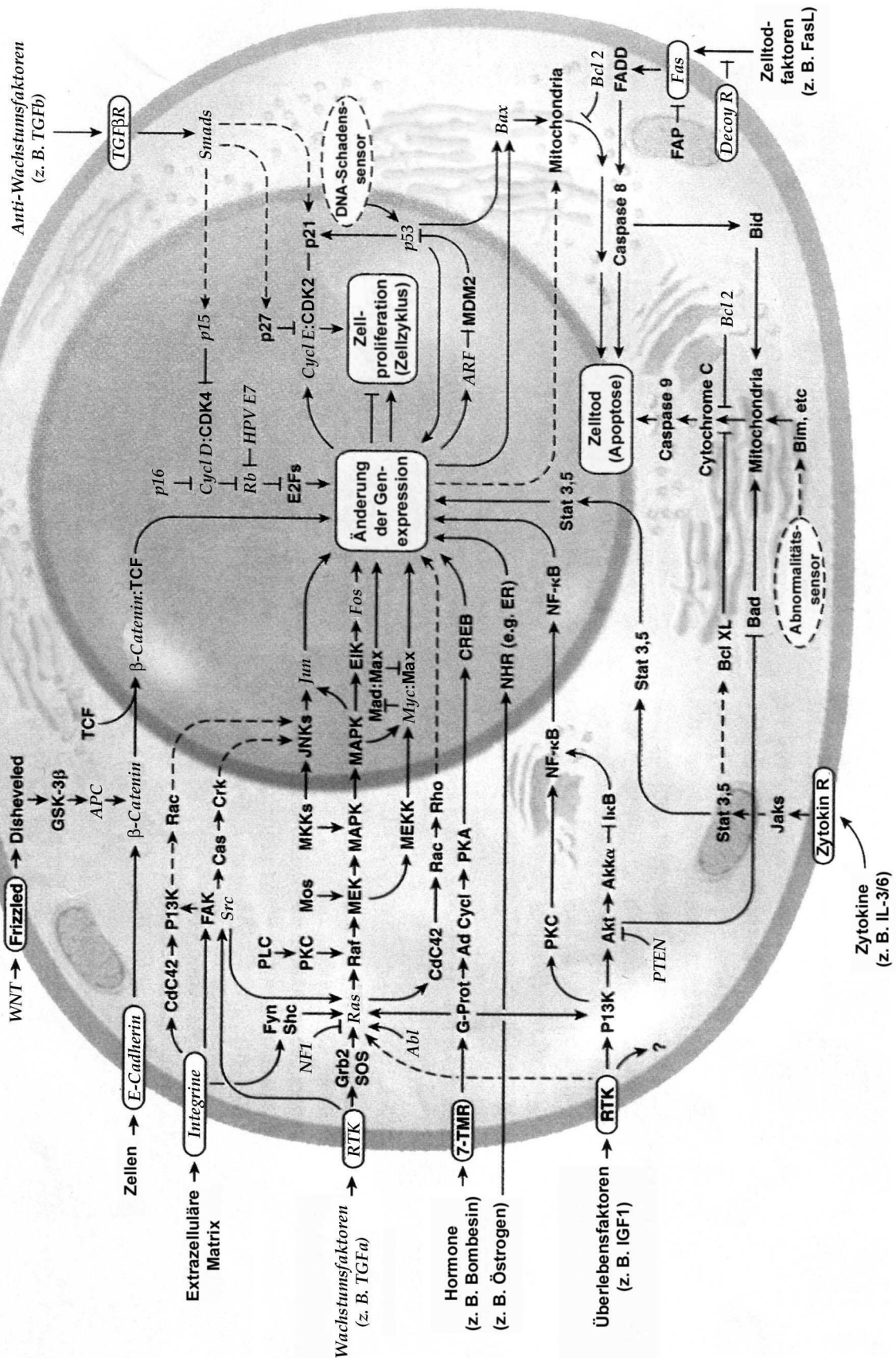
### 1.2.1 Molekulare Pathologie

Die hämatologischen Neoplasien werden in chronische und akute Leukämien und Lymphome eingeteilt. Man nimmt an, dass sie von Stammzellen ausgehen, die sich durch genetische Mutationen den hämatopoetischen Steuerungsmechanismen entzogen haben (Le Beau et al., 2000). Definitionsgemäß ist jede maligne Neoplasie ein Klon von Zellen, der sich durch folgende Eigenschaften auszeichnet (Hanahan et al., 2000):

- Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen,
- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen,
- Umgehung der Apoptose,
- unbegrenztes Vermehrungspotenzial,
- Anregung der Angiogenese,
- Gewebeinfiltration und Metastasierung.

Die zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen sind entweder angeboren oder erworben. Die betroffenen Gene werden in Onkogene und Tumorsuppressorgene unterteilt. Gene, die das Wachstum in normalen Zellen fördern, werden als Protoonkogene bezeichnet. Durch Mutationen aktiviert fördern sie die Entstehung einer malignen Neoplasie und werden zu Onkogenen. Im Gegensatz dazu werden Gene, die durch ihre Expression malignes Wachstum hemmen, als Tumorsuppressorgene bezeichnet.

Onko- und Suppressorgene kodieren Proteine. Diese kontrollieren das zelluläre Wachstum auf verschiedenen Ebenen. Sie reagieren wie Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Signaltransduktionsproteine, Transkriptionsfaktoren oder Schlüsselproteine der Wachstumshemmung und Apoptose (Rosenberg et al., 2000). Einen Überblick über die Schlüsselstellen der zellulären Wachstumsregulation und ihre Störung durch bekannte Onko- und Suppressorgene zeigt Abbildung 1-2.



**Abbildung 1-2:** Überblick über die zellulären Signaltransduktion: Kursiv dargestellt sind Elemente, die bekanntermaßen in Neoplasien funktionell verändert sind (modifiziert nach Hunter, 2000).

Das Klasse-II-Tumorsuppressorgene H-rev107, das homologe Rattengen des in dieser Arbeit untersuchten menschlichen H-rev107.1, wurde ursprünglich bei vergleichenden Untersuchungen an H-ras-Onkogen-transformierten Zellen und ihren Revertanten gefunden. Als Revertanten werden Zellen bezeichnet, die malignen Zelllinien entstammen und das Wachstumsverhalten gesunder Zellen zeigen (Hajnal et al., 1994). Ras-Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung von wachstumsregulierenden Signalen. Da es sich vorwiegend um mitogene Signale handelt, sind die ras-Gene wichtige Protoonkogen. Die ras-Proteinfamilie hat drei Mitglieder: H-ras, K-ras und N-ras (Shields et al., 2000). Tumorsuppressorgene, die eine Reversion von H-ras-transformierten Zellen induzieren, wie H-rev107, besitzen Funktionen abwärts der ras-Funktion: In der anschließenden Kaskade, auf Ebene der Transkriptionskontrolle oder durch Hemmung onkogener Proteine (Schäfer, 1994).

### **1.2.2 Tumorsuppressorgene und ihre Klassifikation**

Das Konzept der Tumorsuppressorgene wurde Ende der 60er Jahre entwickelt. Malignes Wachstum wurde bei Hybridisierung von malignen mit nichtmalignen Zellen unterdrückt. Bei malignen Zellen unter den Nachkommen der nichtmalignen Hybriden, konnten chromosomale Verluste gefunden werden (Harris et al., 1969). Man stellte folgende These auf: Während der Entstehung maligner Tumoren gehen bestimmte Suppressorgene verloren, die bei Wiedereinführung in das Genom zur Wiederherstellung eines normalen Phänotyp führen. Bei erneutem Verlust dieser Gene zeigen die Zellen wieder malignes Wachstum.

1991 wurden von Sam W. Lee und seinen Mitarbeitern zwei Klassen von Tumorsuppressorgen eingeführt: Tumorsuppressorgene, die im Genom des malignen Klons durch Verlust, bzw. Mutation ausfallen, gehören zur Klasse I. Dagegen werden Tumorsuppressorgene, die durch Unterdrückung ihrer Expression funktionslos, genomisch jedoch intakt sind, der Klasse II zugerechnet. Beiden Tumorsuppressorgenklassen gemeinsam ist die Unterdrückung maligner Phänotypen, wenn sie in den Zellen exprimiert werden (Lee et al., 1991).

Die Klasse-I-Tumorsuppressorgene entsprechen der ursprünglichen Vorstellung von verlorenen, bzw. mutierten Genen in malignen Zellen, wie sie bereits Ende der sechziger Jahre formuliert wurde. Um Klasse-I-Tumorsuppressorgene zu identifizieren muss das Genom maligner Klone nach solchen Verlusten und Mutationen durchsucht werden (Sager, 1997). Klassische, auf diesem Weg entdeckte, Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastomagen (RB), das schon

Anfang der 70er Jahre gefunden wurde und als Paradigma der Gruppe gilt, und p53, dass in fast 50% der menschlichen Neoplasien mutiert ist (Rosenberg et al., 2000).

Klasse-II-Tumorsuppressorgene sind nicht mutiert, sondern ihre Expression ist unterdrückt. Sie sind Teil des Expressionsmusters der neoplastischen Zelle. Um Klasse-II-Gene zu finden, sucht man deshalb nach spezifischen Expressionsänderungen im malignen Klon, zum Beispiel auf Ebene der mRNA. Geeignete Methoden sind differenzielles Klonen, subtraktive Hybridisierung und Differential Display, mit denen relativ schnell Kandidatengene gefunden werden können. Die Beeinflussung der Expression von genomisch intakten Klasse-II-Tumorsuppressorgen bietet einen therapeutischen Ansatz, der einfacher zu verwirklichen sein könnte als die Substitution der Funktion mutierter Klasse-I-Tumorsuppressorgene (Sager, 1997).

Ein einzelnes Gen kann beiden Tumorsuppressorklassen angehören. Dasselbe Tumorsuppressorgen könnte seine Funktion in einem Fall durch Mutation und in einem anderen durch Expressionsblock verlieren (Lee et al., 1991). Als Beispiel sei BRCA1 angeführt, ein „Mammakarzinom-Gen“, das bei familiär gehäuften Fällen mutiert ist, also die Rolle eines Klasse-I-Suppressors spielt. Bei sporadischen Fällen von Brustkrebs weist es selten Mutationen auf. Allerdings wurde eine Herunterregulation des intakten BRCA1-Gen bei solchen Tumoren beobachtet. Dies spricht dafür, dass es hier die Funktion eines Klasse-II-Suppressors besitzt (Sager, 1997).

### 1.2.3 Pharmakologische Steuerung der Genexpression

Onkogene und Tumorsuppressorgene können durch pharmakologischen Einfluss auf ihre zelluläre Expression charakterisiert werden. Um Einblick in die Rolle der zu untersuchenden Tumorsuppressorgene in der Hämatopoese und bei der Signaltransduktion zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zytokine, Signaltransduktionsinhibitoren sowie all-trans-Retinolsäure (ATRA) eingesetzt. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, ein weites Spektrum von Substanzen zu verwenden, die in der Vermittlung von Signalen in der Hämatopoese eine Rolle spielen. Weitere Auswahlkriterien waren die klinische Relevanz der Substanzen, ihr Einfluß auf die Zellproliferation oder ein bekannter Effekt auf eines der zu untersuchenden Tumorsuppressorgene. Es wurden folgende Wirkstoffe verwendet:

- Granulozytenkoloniestimulierender Faktor (G-CSF): Proliferation- und Differenzierungsfaktor insbesondere der neutrophilen Reihe (Murakami et al., 1998).



- Erythropoetin (EPO): Proliferations- und Differenzierungsfaktor in der Erythropoese (Ibelgauf, 1999).
- Interleukin-2 (IL-2): immunologischer Regulator (v. a. Aktivator), Proliferationsfaktor von T- und B-Lymphozyten (Gaffen et al., 1998).
- All-trans-Retinolsäure (ATRA): Differenzierungsförderndes Retinoid, Proliferationshemmer, Wirksamkeit bei der akuten Promyelozytenleukämie in klinischen Studien nachgewiesen (Hansen et al., 2000). Bekannt war, dass H-rev107.2 durch Retinoide induziert wird (DiSepio et al., 1998; Huang et al., 2000). In einer neueren Veröffentlichung wird eine Induktion der H-rev107.1-Expression durch ATRA beschrieben (Higuchi et al., 2003).
- Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), Typ1-Interferon, Hemmer des Zellzyklus, antivirale Wirkung, Antitumoraktivität, Medikament bei der Haarzelleukämie und der CML (DeMaeyer et al., 1998).
- Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Typ2-Interferon, Immunomodulator, Wachstumshemmer, Differenzierungsförderer (DeMaeyer et al., 1998). Bekannt war, dass das Rattengen H-rev107 wird durch IFN $\gamma$  induziert (Kuchinke et al., 1995). In einer neueren Veröffentlichung wird die Induktion des menschlichen H-rev107.1 durch IFN $\gamma$  beschrieben (Sers et al., 2002).
- PD98059, spezifischer Hemmer der ras-Protoonkogen-abhängigen MAPK/ERK-Signalkaskade, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren aktiviert wird und vor allem mitogene Signale transduziert (Dudley et al., 1995). In einer neueren Veröffentlichung wird die Induktion von H-rev107.1 durch PD98059 beschrieben (Sers et al., 2002).
- SB202190, spezifischer Hemmer der p38-MAPK-Signalkaskade, die durch zellulären Stress und proinflammatorische Zytokine aktiviert wird (Wilson et al., 1997).
- AG490, spezifischer Hemmer der Januskinasen (JAKs) in der Signalkaskade verschiedener Zytokine, wie zum Beispiel Interferone (Meydan et al., 1996).

#### 1.2.4 Therapeutische Bedeutung der Molekularpathologie

Durch das Verständnis der zellulären Fehlregulation auf molekularer Ebene eröffnen sich neue Möglichkeiten von Therapie und Prognose maligner Neoplasien. Ein Beispiel ist die All-trans-Retinolsäure(ATRA)-Therapie der Promyelozytenleukämie, einer Subgruppe der AML, bei welcher der Retinolsäurerezeptor durch Translokation der Chromosomen 15 und 17 fehlexprimiert ist. Durch therapeutische ATRA-Dosen wird die gestörte Funktion wiederhergestellt. Das therapeutische Prinzip besteht dabei in einer Induktion der

Differenzierung der Zellen und unterscheidet sich deshalb grundlegend von den zytotoxischen Chemotherapeutika (Lin et al., 2000).

Ein weiteres Beispiel für neue Therapieansätze bieten die Philadelphia-Chromosom-positiven Leukämien. Das Philadelphia-Chromosom resultiert aus einer balancierten Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 und führt zu dem Fusionsgen *bcr/abl*. Das kodierte Protein besitzt gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität und spielt eine entscheidende Rolle in der pathologischen Signaltransduktion bei der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) und der Philadelphia-Chromosom-positiven ALL (Salesse et al., 2000). Zur Therapie wird Imatinib (STI571) eingesetzt, das direkt gegen die *bcr/abl*-Tyrosinkinase gerichtet ist (Thiesing et al., 2000).

Ein anderes Ziel neuer Substanzen ist der in soliden Tumoren überexprimierte *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Baselga, 2002). Die wichtigsten EGFR-nachgeschalteten Signalwege über *ras/MEK* und *PI3K* steuern die zelluläre Proliferation und Apoptose. Unter den zur Verfügung stehenden Signalweg-Inhibitoren ist der Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib (ZD1839) hervorzuheben, der an der intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne des EGFR ansetzt und in Studien zur Behandlung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome und anderer solider Tumore Erfolge zeigte (Herbst et al., 2002).

Diese Beispiele lassen die Hoffnung zu, weitere Schlüsselproteine identifizieren zu können, um zukünftig gezieltere Therapien als die konventionelle Chemotherapie einzusetzen. So wäre eine antiproliferative Therapie mit minimaler Toxizität für gesunde Zellen möglich. Weitere Erwartungen gibt es in Bezug auf die prognostische Relevanz bestimmter zellulärer Pathomechanismen und die damit verbundene Auswahl an Therapien. Bisherige klinische Beobachtungen könnten besser verstanden oder vorhergesagt werden, zum Beispiel das unterschiedliche Ansprechen auf die Interferontherapie bei CML (Druker et al., 2001). Bestimmte Onkogene dienen bereits als diagnostische und prognostische Marker. Zum Beispiel ist die Expression des *myc*-Onkogen in kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit einem schlechten Ansprechen auf Chemotherapie verbunden (Rosenberg et al., 2000).

### 1.3 H-rev107.1

Das menschliche Klasse-II-Tumorsuppressorgen H-rev107.1 ist auf Chromosom 11q11-12 lokalisiert. Seine 966 bp lange mRNA-Sequenz kodiert ein 18 kD-Protein aus 162 Aminosäuren (Husmann et al., 1998).

Das Ratten-H-rev107 wurde bei vergleichenden Expressionsanalysen von engverwandten Ratten-Fibroblastenzelllinien gefunden. Um gezielt nach neuen Tumorsuppressorgenen zu suchen, wurden normale Zellen, H-ras-Onkogen-transformierte neoplastische Zellen und phänotypische Revertanten dieser Zellen verglichen. Mit der Methode der subtraktiven und differentiellen Hybridisierung wurde nach mRNA-Sequenzen gesucht, die bei den neoplastischen Zellen spezifisch unterexprimiert sind. Das bedeutet die mRNA sollte in normal wachsenden Zellen und vor allem den Revertanten neoplastischer Zellen nachzuweisen sein, während sie in neoplastischen Zellen fehlte. Durch diese Analysen wurden neben H-rev107 (Hajnal et al., 1994) zwei weitere Tumorsuppressorgenkandidaten identifiziert, RIL (Kiess et al., 1995) und LOX (Hajnal et al., 1993).

Bei den untersuchten Revertanten kann trotz des normalen Wachstumsverhaltens weiterhin das H-ras-Onkogen nachgewiesen werden. Es wird deshalb von H-ras-transformationsresistenten Zellen gesprochen. Die Resistenz wird mit der wiederhergestellten Expression der gefundenen Gene in Verbindung gebracht. Diese wurden deshalb als neue Klasse-II-Tumorsuppressorgenkandidaten betrachtet. In der Folge wurde für H-rev107 gezeigt, dass seine Expression in verschiedenen Ratten-Tumorzelllinien unterdrückt ist, während korrespondierende differenzierte Gewebe das Gen exprimieren. Transfektionsexperimente demonstrierten, dass die Expression des H-rev107-Gens malignes Wachstum hemmt (Sers et al., 1997).

Das Suppressorgen H-rev107 wurde ursprünglich an Rattenzelllinien und experimentellen Tumoren untersucht. Es hat eine 83% Übereinstimmung mit der humanen Form des Gens H-rev107.1. Hinweise für das Vorliegen eines humanen Klasse-II-Tumorsuppressorgens brachten vergleichende Analysen von gesunden Geweben, Tumoren und Zelllinien. Transfektionsexperimente mit H-rev107.1-Vektoren zeigten einen antiproliferativen Effekt der H-rev107.1-Expression. In gesunden differenzierten Geweben ergaben Screeninguntersuchungen eine verbreitete Expression des H-rev107.1-Gens (Husmann et al., 1998). Detaillierte Untersuchungen an hämatopoetischen Zellen oder hämatologischen Neoplasien lagen nicht vor.

Zur Regulation des H-rev107.1-Gens gibt es mehrere Hinweise. Die Expression von H-rev107 kann in Rattenastrozyten durch Interferon $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) heraufreguliert werden (Kuchinke et al., 1995). In der Folge wurde die Induktion durch Interferon $\gamma$  auch für das humane H-rev107.1 beschrieben. Außerdem ist H-rev107.1 ein Zielgen des Transkriptionsfaktor IRF1. Dieser wird unter anderem durch Interferone und Retinoide gesteuert. (Sers et al., 2002). Die Induktion von H-rev107.1 durch das Retinoid ATRA wird in einer weiteren Veröffentlichung beschrieben (Hiugchi et al., 2003). Interferon $\gamma$  und ATRA wirken in der Hämatopoese wachstumshemmend (DeMaeyer et al., 1998; Hansen et al., 2000), ebenso IRF1, das als Tumorsuppressor bei Leukämien mutiert sein kann (Willman et al., 1993). Dies könnte auf wachstumshemmende Funktionen des H-rev107.1-Gens bei hämatopoetischen Zellen hinweisen. Experimente zur Regulation von H-rev107.1 in der Hämatopoese waren bislang nicht veröffentlicht.

Die Wirkweise des kodierten H-rev107-Proteins ist unbekannt. Westernblots und Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine Lokalisation des Proteins in drei zellulären Kompartimenten: dem Zytoplasma, der Plasmamembran und dem Kern. Für eine Membranassoziation des Proteins spricht der hydrophobe C-Terminus. Diese scheint für die Funktion wichtig zu sein, da die Transfektion maligner Zellen mit H-rev107-Vektoren, bei denen das membranbindende Ende fehlt, weit weniger tumorsuppressiv wirksam sind. Da H-rev107 die Reversion H-ras-transformierter Zellen bewirkt, wurde vermutet, dass es in der ras-abhängigen Kaskade wirkt (Sers et al., 1997). Kürzlich wurde das H-rev107.1-Protein entwicklungs geschichtlich der NlpC/P60-Enzymfamilie zugeordnet. Die Autoren vermuten, H-rev107.1 könnte als Acyltransferase an der Modifikation von Membrankomponenten beteiligt sein (Anantharaman et al., 2003).

Das H-rev107.1-Gen gehört zu einer Genfamilie. Durch cDNA-Datenbankvergleiche wurde das nah verwandte H-rev107.2-Gen gefunden (vgl. 1.4; Husmann et al., 1998). Außerdem besteht Verwandtschaft zu einem weiteren Tumorsuppressorgenkandidaten, A-C1 (Akiyama et al., 1999), einem Enzym des All-trans-Retinol-Stoffwechsels, LRAT, sowie viralen und bakteriellen Genen (Hughes et al., 2000; Anantharaman et al., 2003).

## 1.4 H-rev107.2

H-rev107.2 gehört zur H-rev107 Genfamilie. Die cDNA-Sequenzen von H-rev107.2 und H-rev107.1 sind zu 65% identisch. Auf Basis des Aminosäurevergleichs sind sie zu 51% identisch, die 50 terminalen Aminosäuren stimmen zu 72% überein (Husmann et al., 1998). Das humane Klasse-II-Tumorsuppressorgen H-rev107.2 liegt auf dem Chromosomenabschnitt 11q23. Seine mRNA-Sequenz hat 1.0 kb Länge, das Protein besteht aus 216 AA (Husmann et al., 1998).

H-rev107.2 ist identisch mit den unabhängig beschriebenen Tumorsuppressorgen TIG3 (*tazarotene-induced gene 3*) (DiSepio et al., 1998) und RARRES3 (*retinoic acid responder 3*) (Casanova et al., 2001). Daneben wurde ein weiteres Suppressorgen beschrieben, RIG1 (*retinoid-induced gene 1*), das sich von H-rev107.2 lediglich durch drei Nukleinsäuren unterscheidet (Huang et al., 2000). Da es wahrscheinlich ist, dass es sich bei H-rev107.2/TIG3/RARRES3 und RIG1 um dasselbe Tumorsuppressorgen handelt, werden die Bezeichnungen in dieser Arbeit als Synonym betrachtet.

H-rev107.2 wird in den meisten differenzierten Geweben exprimiert. Gehirn, Hoden und Pankreas zeigten in Gewebeexpressionsscreenings keine Expression von H-rev107.2 (Husmann et al., 1998). Außerdem wurde von DiSepio et al. gezeigt, dass H-rev107.2 in normalen, aber weder in korrespondierenden neoplastischen Zelllinien, noch in einigen Primärtumoren exprimiert ist. Darunter waren auch Lymphomproben, sowie einige Zelllinien hämatologischer Neoplasien: HL-60 (akute Promyelozyten Leukämie) und K-562 (chronisch myeloische Leukämie) zeigten gar keine Expression, MOLT-4 (T-Zell akute lymphoblastische Leukämie) und Raji (B-Zell Burkitt Lymphom) nur eine geringe im Vergleich zu normalen Leukozyten. Die Autoren konnten die Expression von H-rev107.2 außerdem direkt mit der retinoidinduzierten Wachstumshemmung einer Mammakarzinomzelllinie korrelieren (DiSepio et al., 1998).

Kürzlich wurden von Huang et al. Transfektionsexperimente mit H-rev107.2-Expressionsvektoren durchgeführt, die antiproliferative und Apoptose-induzierende Effekte an einer Magenkarzinomzelllinie zeigten (Huang et al., 2002). Casanova et al. brachten eine Unterdrückung der H-rev107.2-Expression mit dem Fortschreiten chronischer B-Zell-Leukämien in Verbindung (Casanova et al., 2001). Andere Autoren zeigten eine fehlende Expression des Tumorsuppressorgen H-rev107.2 in den hyperproliferativen Epidermiszellen bei Psoriasis vulgaris (Duvic et al., 2000).

H-rev107.2 und H-rev107.1 befinden sich auf dem langen Arm des Chromosom 11. H-rev107.2 ist auf dem Chromosomenabschnitt 11q23 lokalisiert (Husmann et al., 1998). Dieser Abschnitt gilt in der Kanzerogenese als kritischer Punkt. Dort findet man andere Tumorsuppressorgene, wie ATM, RDX und FDX1. Mutationen von 11q23 sind bei Leukämien, Lymphomen sowie anderen Malignomen zu finden (Stilgenbauer et al., 1996; Zhu et al., 2000).

Die Expression des H-rev107.2-Gens wird durch Retinoide induziert (DiSepio et al., 1998; Huang et al., 2000). Die antiproliferative und differenzierende Wirkung der Retinoide ist mehrfach beschrieben (Hansen et al., 2000). In der Hämatologie werden Retinoide zur Therapie der Promyelozytenleukämie eingesetzt (Lin et al., 2000).

Die wachstumshemmende Aktivität von H-rev107.2 analog zu H-rev107.1 hängt von einer C-terminalen hydrophoben Region ab. Es wurde vermutet, dass die Membranbindung die Funktion reguliert. H-rev107.2 ist perinukleär lokalisiert, was wichtig für die tumorsuppressive Funktion zu sein scheint (Deucher et al., 2000). Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die antiproliferative Wirkung des H-rev107.2 mit der Hemmung ras-nachgeschalteter MAPK-Signalwege einhergeht (Huang et al., 2002).