

## 5 Diskussion

Die Charakterisierung der Expression und Regulation der verwandten Gene H-rev107.1- und H-rev107.2 in primären humanen hämatopoetischen Zellen war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

### 5.1 H-rev107.1 in der Hämatopoese

#### 5.1.1 Differenzierungsabhängige Expression von H-rev107.1 in der Hämatopoese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von H-rev107.1 in allen Proben mononukleärer Blut- und Knochenmarkszellen gesunder Spender nachgewiesen. Vergleichbare Analysen der Expression des H-rev107.1-Gens in primären humanen mononukleären Zellen wurden bisher nie durchgeführt. Gewebeexpressionsanalysen des H-rev107.1-Gens mit kommerziell verfügbaren RNA-Proben als Northernblot-Hybridisierungen zeigten eine verbreitete Expression des H-rev107.1-Gens in gesunden humanen Geweben, wie Dün- und Dickdarm, Milz, Pankreas, Niere und Leber, Skelett- und Herzmuskel, Lunge und Gehirn sowie Ovar, Testes und Plazenta (Husmann et al., 1998).

Die untersuchten mononukleären Zellen sind eine heterogene Zellpopulation. Deshalb wurden im weiteren unterschiedlich differenzierte Zellen mittels spezifischer Anti-CD-Antikörper isoliert und untersucht. Nach den Ergebnissen kann vermutet werden, dass H-rev107.1 in CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Gegensatz zur Gesamtpopulation mononukleärer Zellen nicht exprimiert wird. Unspezifisch positive Banden für H-rev107.1 in den Experimenten mit CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen könnten als Kontamination mit differenzierten Zellen gewertet werden. Die angereicherten und analysierten primären humanen CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen sind eine Subpopulation mononukleärer Zellen mit geringem Differenzierungsgrad und hohem Proliferationspotential. Die fehlende Expression des Tumorsuppressorgens H-rev107.1 in CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen könnte eine Rolle bei der Erhaltung des undifferenzierten und proliferationsfähigen Status dieser Zellpopulation spielen.

Diese Hypothese wird durch bisherige Untersuchungen an neoplastischen Zellen unterstützt. Es gibt verschiedene Belege sowohl für die fehlende Expression von H-rev107.1 in Tumorzelllinien als auch seine Funktion als Tumorsuppressorgen (Husmann et al., 1998; Siegrist et al., 2001; Sers et al., 2002). Husmann et al. zeigten durch Transfektion der humanen Leberzellkarzinomlinie SK-HEP1 mit H-rev107.1, dass eine Expression des H-rev107.1-Gens nicht vereinbar mit der

Proliferation dieser Zellen ist. Sie stellten die Hypothese auf, dass eine Voraussetzung für die permanente Proliferation von Gewebe die Unterdrückung der H-rev107.1-Expression ist (Husmann et al., 1998). Untersuchungen primären humanen Gewebes außerhalb von Zelllinienmodellen zeigten einen fehlenden Nachweis der H-rev107.1-Expression in entdifferenzierten Ovariakarzinomen im Vergleich zu korrespondierenden gesunden Geweben (Sers et al., 2002).

Die nach der vorliegenden Arbeit vermutete fehlende Expression von H-rev107.1 in hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen könnte für eine physiologische wachstumshemmende Rolle des Gens sprechen. Untersuchungen während physiologischer Differenzierungsprozesse wurden bisher nur von Siegrist et al. durchgeführt. Die Autoren beobachteten in der Spermatogenese eine selektive Expression von H-rev107.1 in runden Spermatozyten, einem fortgeschrittenen postmeiotischen Differenzierungsstadium (Siegrist et al., 2001).

Neben CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurde in der vorliegenden Arbeit auch differenzierte Subpopulationen mononukleärer Zellen auf die Expression von H-rev107.1 untersucht. Das beobachtete Expressionsmuster lässt keine spezifischen Aussagen zu. Die Variabilität der H-rev107.1-Expression in CD45RO<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>- und CD14<sup>+</sup>-Zellen war auffällig hoch. Trotz einer gewissen Differenzierung besitzen diese Zellen weiterhin ein starkes Proliferationspotential. Die variable Expression in diesen Subpopulationen könnte somit als Ausdruck weiterhin bestehender unterschiedlicher Differenzierungs- und Proliferationszustände der angereicherten Zellen sein. Aufgrund der stärkeren Induzierbarkeit von H-rev107.2 wurden weitergehende Untersuchungen an durch Doppelmarkierung charakterisierten Subpopulationen wegen des großen erforderlichen Blutvolumens nicht mit H-rev107.1 durchgeführt.

### **5.1.2 Fehlende Regulierbarkeit von H-rev107.1 in der Hämatopoese**

In der vorgelegten Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob die Expression des Tumorsuppressors H-rev107.1 in der Hämatopoese durch ausgewählte Substanzen regulierbar ist. IL2 und IFN $\gamma$  wurden in Versuchen mit differenzierten Subpopulationen mononukleärer Zellen als starke immunomodulatorische Zytokine verwendet. Die Expression des H-rev107.1-Gens in den untersuchten CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>-, CD45RO<sup>+</sup>- und CD56<sup>+</sup>-Zellen änderte sich nicht spezifisch.

Bei humanen CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, die keine Expression von H-rev107.1 zeigten, wurde versucht die Expression des Gens durch verschiedene Substanzen zu induzieren. Experimente mit IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und EPO sowie ATRA blieben ohne Hinweis auf eine regulierende Wirkung. Schwache H-rev107.1-Banden in 2 von 8 Experimenten mit IFN $\gamma$  können nicht als spezifisch angesehen werden. Außerdem wurden der MAPK/ERK-Inhibitor PD95059, der p38-MAPK-Inhibitor SB202190 und der Janus-Kinasen-Inhibitor AG490 eingesetzt. Sie hatten keinen spezifischen Einfluss auf die Expression des H-rev107.1-Gens in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Allerdings hob AG490 in Kombination mit IFN $\gamma$  in einem der beiden Versuche, die eine Induktion durch IFN $\gamma$  zeigten, diese auf. Die fehlende Regulierbarkeit der H-rev107.1-Expression durch wachstumsregulierende oder immunomodulatorische Substanzen lässt vermuten, dass diese in der gesunden Hämatopoese unabhängig von der Expression des Tumorsuppressorgens H-rev107.1 wirken.

Zur Regulation der H-rev107.1-Expression in nicht-hämatopoetischen Geweben sind verschiedene Faktoren bekannt. Induzierend wirken IFN $\gamma$ , ATRA und der Transkriptionsfaktor IRF1. Die Induzierbarkeit der H-rev107.1-Expression durch IFN $\gamma$  wurde an Ovarialkarzinomzelllinien gezeigt (Sers et al., 2002). Versuche mit Rattenastrozytenzelllinien erbrachten gleiche Ergebnisse. IFN $\gamma$  induzierte dort die Expression des zum humanen H-rev107.1 homologen H-rev107-Gens (Kuchinke et al., 1995). Die Abhängigkeit der IFN $\gamma$  induzierten H-rev107.1-Expression von dem Transkriptionsfaktor IRF1 wurde an den humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien A27/80 und OVCAR-3 beschrieben (Sers et al., 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass ATRA die H-rev107.1-Expression in der Plattenepithelkarzinomzelllinie SqCC/Y1 induzieren konnte (Higuchi et al., 2003). Die Induktion des Tumorsuppressorgens H-rev107.1 wirkt in Tumorzelllinien wachstumshemmend. Ovarialkarzinomzelllinien zeigten eine Abnahme der Koloniebildung nach IFN $\gamma$ -induzierter Expression von H-rev107.1 (Sers et al., 2002). Die Transfektion der Leberzellkarzinomlinie SK-HEP1 mit einem H-rev107.1-Vektor führte zur Wachstumshemmung der Zellen (Husmann et al., 1998). Transfektionsexperimente mit gleichem Ergebnis liegen für das homologe Rattengen H-rev107 in den H-ras-transformierten Zelllinie FE-8 und ANR4 vor (Sers et al., 1997).

Auf hämatopoetische CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wirken die H-rev107.1-induzierenden Zytokine IFN $\gamma$  und ATRA wachstumshemmend (Platanias et al., 1999; Yu et al., 1999; Young et al., 1997; Hansen et al., 2000). Die wachstumshemmende Wirkung von IFN $\gamma$  in CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen

benötigt die Expression des Transkriptionsfaktors IRF1 (Sato et al., 1995). H-rev107.1 wird als mögliches proliferationshemmendes IRF1-Zielgen diskutiert (Sers et al., 2002). IRF1 ist ein Inhibitor der Zellproliferation und kann als Tumorsuppressorgen bei Leukämien und myelodysplastischen Syndromen betroffen sein (Romeo et al., 2002; Willman et al., 1993). Neben Interferonen kann auch ATRA die IRF1-Expression induzieren. Dies wurde durch Experimente zum sogenannten Crosstalk zwischen Interferonen und Retinolsäure bei der Promyelozytenleukämie gezeigt (Chelbi-Alix et al., 1999).

Zusammenhänge der Wachstumshemmung durch  $\text{INF}\gamma$ , ATRA und IRF1 mit der Induktion der H-rev107.1-Expression wurden in Tumorzelllinien gezeigt. Gleichzeitig sind die wachstumshemmenden Eigenschaften von  $\text{INF}\gamma$ , ATRA und des Transkriptionsfaktors IRF1 in der Hämatopoese bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnten aber weder Interferone, noch ATRA in hämatopoetischen  $\text{CD34}^+$ -Vorläuferzellen H-rev107.1 induzieren. Somit kann die bei Tumorzelllinien beschriebene Rolle des H-rev107.1 in der gesunden Hämatopoese nicht beobachtet werden.

Für die maligne Hämatopoese zeigte Teutsch vereinzelt eine Induzierbarkeit von H-rev107.1. Induziert wurde das Gen in der Zelllinie NB4 (Promyelozytenleukämie) durch  $\text{INF}\gamma$  und ATRA, sowie in der Zelllinie K562 (CML im Blastenschub) durch  $\text{INF}\gamma$  und  $\text{INF}\alpha$ . In den Zelllinien Raji, Jurkat und HL60, sowie Proben von 8 primären myeloischen Leukämien konnte keine Regulation beobachtet werden (Teutsch, 2003).

Die fehlende Induzierbarkeit der H-rev107.1-Expression in der Hämatopoese kann folgende Erklärung haben:

Mögliche Faktoren der Hemmung der H-rev107.1-Expression sind mitogene ras-Signale und Hypermethylierungen des Genpromotors. Das Ratten-H-rev107 ist in H-ras-transformierten Zellen suppremiert (Hajnal et al., 1994). Die Hemmung des ras-Onkogen-nachgeschalteten MAP/ERK-Signalweges durch PD98059 führte in einer Ratten-Ovarialkarzinom-Zelllinie und der menschlichen PA1-Teratokarzinom-Zelllinie zur Expression der vorher unterdrückten Gene H-rev107 (Ratte) und H-rev107.1 (Mensch) (Sers et al., 2002). Der Einsatz der MAPK-Inhibitoren PD95059 und SB202190 in der vorgelegten Arbeit wies nicht auf einen Einfluss des ras-Signalweges auf die Regulation der H-rev107.1-Expression in hämatopoetischen  $\text{CD34}^+$ -Zellen hin.

In der Hämatopoese spielen Hypermethylierungen des H-rev107.1-Promotors möglicherweise eine Rolle für die fehlende Expression und Induzierbarkeit in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Methylierungen sogenannter CpG-Inseln des homologen Rattengens H-rev107 und die damit verbundene Unterdrückung seiner Expression wurden an der Lymphomzelllinie WEHI 7.1 beschrieben (Roder et al., 2002). CpG-Hypermethylierung zur Transkriptionshemmung tumorsuppressiver Gene können regelmäßig in der Entstehung und Progression akuter und chronischer Leukämien beobachtet werden (Melki et al., 1999; Zion et al., 1994; Esteller et al., 2001). Außerdem kommen sie während der embryonalen Entwicklung und zur physiologischen Genregulation vor (Bird, 2002). In der in physiologischen Hämatopoese werden Änderungen des DNA-Methylierungsgrades zur Steuerung der Proliferation und Differenzierung der einzelnen Linien beschrieben (Mizuno et al., 2001). Das linienspezifische Myeloperoxidasegen wird zum Beispiel durch CpG-Methylierung in den Stammzellen unterdrückt und während der Differenzierung durch Demethylierung aktiviert (Lubbert et al., 1991). Sakashita et al. zeigten, dass der Methylierungsgrad des Tumorsuppressors p15 und seine damit umgekehrt korrelierende Expression mit einem hohem Proliferationsgrad gesunder hämatopoetischer Stammzellen einhergeht (Sakashita et al., 2001). Mizuno et al. fanden eine allgemeine Überaktivität DNA-methylierender Enzyme, sogenannter DNMTs (*de novo methyltransferase*), in CD34<sup>+</sup>-Knochenmarkszellen (Mizuno et al., 2001).

Die epigenetische Expressionshemmung durch CpG-Methylierung gilt im Gegensatz zur Genregulation durch Transkriptionsfaktoren wie IRF1 als stabile Transskriptionskontrolle (Bird, 2002). Dies könnte erklären, warum in der vorgelegten Arbeit keine spezifische Induktion von H-rev107.1 durch IRF1-induzierenden Interferone und ATRA oder die MAPK-Hemmer gezeigt werden konnte. Durch Hypermethylierungen des H-rev107.1-Gens könnten auch die variablen Expressionsmuster differenzierter Subpopulationen mononukleärer Zellen beeinflusst sein, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden. Mizuno et al. zeigten eine erhöhte Aktivität DNA-methylierender Enzyme, DNMTs, in aktivierten T-Zellen (Mizuno et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Variabilität der H-rev107.1-Expression in CD45RO<sup>+</sup>-Zellen und anderen Zellpopulationen könnte mit Methylierung des Promotors zusammenhängen.

Zusammengefasst zeigen die vorgelegten Ergebnisse die differenzierungsabhängige Expression des H-rev107.1 in der Hämatopoese. Die Untersuchungen an CD34<sup>+</sup>-Zellen lassen eine fehlende

Expression vermuten. Mononukleäre Blutzellen exprimieren das Gen. Die wachstumshemmende Wirkung der Expression von H-rev107.1 und des homologen Rattengens H-rev107 wurde von anderen durch Transfektions- und Induktionsexperimente an malignen Zelllinien gezeigt (Sers et al., 1997; Husmann et al., 1998; Sers et al., 2002). Eine mögliche Rolle von H-rev107.1 bei der Proliferations- oder Differenzierungsregulation in der Hämatopoese ist offen. Die fehlende Induzierbarkeit durch bekannte wachstumsregulierende Substanzen spricht dagegen. Allerdings könnte H-rev107.1 durch Hypermethylierung relativ konstant reguliert sein und in der Hämatopoese durch Demethylierung seines Promotors induziert werden. Solche Methylierungsänderungen sind zur Steuerung von Differenzierung und Proliferation in hämatopoetischen Zellen bekannt.

In der vorgelegten Arbeit wurden zusätzliche Untersuchungen zur H-rev107.1-Expression in der malignen Hämatopoese an 5 Zelllinien hämatologischer Neoplasien durchgeführt. In den Leukämiezelllinien Jurkat (T-ALL) und HL60 (AML-M2) lies sich keine Expression nachweisen. CEM (T-ALL), K562 (CML im Blastenschub) und U937 (Akute monoblastäre Leukämie) dagegen exprimierten das H-rev107.1-Gen. Die fehlende H-rev107.1-Expression in der HL-60-Linie bestätigt die Veröffentlichung von Huang et al. (Huang et al., 2000). Ergänzend seien neuere Regulationsversuche mit diesen Zelllinien erwähnt, die eine Induktion in der Zelllinie NB4 durch IFN $\gamma$  und ATRA, sowie in der Zelllinie K562 durch IFN $\gamma$  und IFN $\alpha$  zeigten (Teutsch, 2003). Blut und Knochenmarkproben von Patienten mit chronisch-myeloischen Leukämien, die in der vorgelegten Arbeit untersucht wurden, zeigten alle eine Expression des H-rev107.1-Tumorsuppressorgens. In Primärmaterial akuter Leukämien fand Teutsch keine H-rev107.1-Expression. Induktionsversuch mit IFN $\gamma$ , ATRA und der Kombination beider Substanzen zeigten keine Regulation (Teutsch, 2003). Die Ergebnisse in der malignen Hämatopoese zeigten nicht klar, ob H-rev107.1 als Tumorsuppressor dort im Gegensatz zur physiologischen Hämatopoese eine Bedeutung hat.

## 5.2 H-rev107.2 in der Hämatopoese

### 5.2.1 Differenzierungsabhängige Expression von H-rev107.2 in der Hämatopoese

In der vorgelegten Arbeit wurde die physiologische Expression des H-rev107.2-Gens in hämatopoetischen Zellen mittels RT-PCR analysiert. Die Gesamtpopulation der mononukleären Zellen aus primärem peripherem Blut und Knochenmark exprimiert H-rev107.2. Frühere Northernblotuntersuchungen an verschiedenen Geweben bestätigen dies. H-rev107.2 wird in Leukozyten des peripheren Blutes exprimiert, so wie in Dick- und Dünndarm, Ovarien, Prostata, Thymus, Milz, Nieren, Leber und Lunge (Husmann et al., 1998; Di Sepio et al., 1998).

Spezifische Subpopulationen der mononukleären Zellen wurden mittels magnetischer Anti-CD-Antikörper selektiert. Primäre humane CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen exprimieren das Tumorsuppressorgen H-rev107.2-Gen nicht. Unspezifisch schwach positive Banden bei den Versuchen mit angereicherten CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen könnten Kontaminationen mit differenzierten Zellen abbilden. Die fehlende Expression von H-rev107.2 in CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen hängt möglicherweise mit dem undifferenzierten und proliferationsfähigen Charakter dieser Population zusammen.

H-rev107.2 wurde in verschiedenen Veröffentlichungen als proliferationshemmendes und differenzierungsförderndes Gen charakterisiert. Die fehlende Expression von H-rev107.2 wurde bisher in humanen Tumorzelllinien, Tumoren und nicht-neoplastischen hyperproliferativen Geweben beschrieben (DiSepio et al., 1998; Duvic et al., 2000; Huang et al., 2000; Casanova et al., 2001; Huang et al., 2002). Bei der Magenkarzinomzelllinie SC-MI CL23 wurde eine positive Korrelation zwischen der Expression des Gens und zunehmender Zelldichte in Kultur demonstriert (Huang et al., 2000). Wachstumshemmende und proapoptische Eigenschaften von H-rev107.2 wurden außerdem nach Transfektion der Tumorzelllinien HtTA und TSGH9201 mit H-rev107.2-Vektoren beschrieben (Huang et al., 2002). Bei Untersuchungen der H-rev107.2-Expression in primären humanen hämatologischen Neoplasien wurde eine Expressionshemmung des H-rev107.2-Gens in B-CLL-Zellen fortgeschrittener Stadien gefunden, während Zellen früher Stadien das Gen exprimierten (Casanova et al., 2001). Die Hochregulation der H-rev107.2-Expression bei zunehmender Differenzierung wurde an gesunden humanen Epidermiszellen gezeigt (Duvic et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden außer CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen differenzierte Subpopulationen mononukleärer Zellen auf ihre H-rev107.2-Expression hin untersucht. Es zeigte sich kein spezifisches Expressionsmuster. CD19<sup>+</sup>-Zellen zeigten eine hohe Variabilität der H-rev107.2-Expression. Es bestand dabei keine negative oder positive Korrelation zwischen der Expression von H-rev107.1 und H-rev107.2 in den untersuchten Zellen. Zur Untersuchung der H-rev107.2-Expression während verschiedener Aktivitätszuständen der differenzierten mononukleären Zellen wurde ein orientierendes Experiment durchgeführt, das richtungsweisenden Charakter haben könnte. Nach der Separation von CD4<sup>+</sup>-Zellen und CD19<sup>+</sup>-Zellen mittels magnetischer Antikörper wurden die Populationen mit einem zweiten Antikörper fluoreszenzmarkiert und im FACS sortiert. Auf diese Weise wurden aufgereinigte Subpopulationen von CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>-Zellen (naive/ruhenden T-Helfer-Zellen) und CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>-Zellen (aktivierte/Gedächtnis T-Helfer-Zellen) sowie CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>-Zellen (B-Gedächtniszellen) und CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>-Zellen (naive B-Zellen) definiert und mittels RT-PCR auf die Expression von H-rev107.2 untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine fehlende Expression von H-rev107.2 in CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>-Zellen und CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>-Zellen.

Die Charakteristika von CD45RO<sup>+</sup>- und CD45RA<sup>+</sup>-Zellen wurden von Mackay beschrieben. CD45RO<sup>+</sup>-Zellen reagieren schneller auf Antigenstimulation und zeigen eine höhere Bereitschaft zur Proliferation als CD45RA<sup>+</sup>-Zellen. CD45RA<sup>+</sup>-Zellen stellen eine ruhende Fraktion mit längerer Lebenszeit und träger Antwort auf Stimulation dar (Mackay, 1994). Die CD27<sup>-</sup>-B-Zellen werden als naive Zellen mit einem geringen Grad an somatischer Hypermutationen der Leichtkettenregion beschrieben. Sie reifen in den Keimzentren der Lymphknoten zu CD27<sup>+</sup>-Zellen (Nagumo et al., 2002). Von Klein et al. wurden vergleichende Microarray-Hybridisierungen mit RNA naiver und reifer B-Zellen durchgeführt. Diese Transkriptionsanalyse zeigte, dass die meisten proliferationssteuernden Gene in beiden Populationen gleichsinnig reguliert sind. Allerdings zeigte sich in den naiven im Vergleich zu den reifen Zellen eine Herunterregulation Apoptose-induzierender Gene (Klein et al., 2003). In Anbetracht der von Huang et al. beschriebenen antiproliferativen und proapoptotischen Wirkungen der H-rev107.2-Expression (Huang et al., 2002) könnte die fehlende Expression in CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>-Zellen möglicherweise eine Ursache für die hohe Proliferationsbereitschaft sein. In CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>-Zellen wäre eine negative Regulierung der Apoptose durch Expressionshemmung von H-rev107.2 vorstellbar.



### 5.2.2 Induktion von H-rev107.2 durch IFN $\gamma$

Die Untersuchungen zur Regulierbarkeit des H-rev107.2-Gens zeigten eine deutliche Induzierbarkeit durch IFN $\gamma$  in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Die bislang unbekannte IFN $\gamma$ -Induzierbarkeit des H-rev107.2-Gens wird im folgenden diskutiert.

Zunächst wurden differenzierte Subpopulationen mononukleärer Zellen nach Inkubation mit den Immunomodulatoren IL2 und IFN $\gamma$  untersucht. Analysen der H-rev107.2-Expression zeigten keine spezifische Regulation. Ein Hinweis auf die IFN $\gamma$ -Induzierbarkeit der H-rev107.2-Expression zeigte sich bei CD19<sup>+</sup>-Zellen (vgl. Tabelle 4-13).

Die Expression des H-rev107.2-Gen in CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen wurde nach Inkubation mit Substanzen untersucht, die regulierend in der Hämatopoese wirken oder in der Regulation von H-rev107.2 eine Rolle spielen. Insbesondere wurde ATRA eingesetzt, da H-rev107.2 mehrfach als retinoidinduziertes Gen beschrieben wurde (DiSepio et al., 1998; Huang et al., 2000). Die Expression von H-rev107.2 wurde in allen Ansätzen mit CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen durch IFN $\gamma$  induziert. Außer durch IFN $\gamma$  konnte keine spezifische Regulation der H-rev107.2-Expression durch die eingesetzten Substanzen gefunden werden. Auch ATRA zeigte keine spezifische Induktion des Gens.

Die IFN $\gamma$ -Induzierbarkeit der H-rev107.2-Expression wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Lediglich bei dem verwandten Gen H-rev107 war eine Induktion durch IFN $\gamma$  bekannt (Kuchinke et al., 1995). Diese wurde inzwischen auch für das humane H-rev107.1 gezeigt (Sers et al., 2002). In Folge der vorgelegten Arbeit konnte in der malignen Hämatopoese die Induktion des H-rev107.2-Gens durch IFN $\gamma$  in den Zelllinien U937, HL-60, NB-4, Raji, Jurkat und CEM, sowie in 14 primären akuten Leukämien zeigen (Teutsch, 2003). Nicht dargestellt, aber zu erwähnen, sind auch Ergebnisse der vorgelegten Arbeit, die auf eine IFN $\gamma$ -Induktion der H-rev107.2-Expression in Knochenmarksstromakulturen hinweisen. IFN $\gamma$  gilt als starker Inhibitor der Hämatopoese. In vitro wurde die Hemmung der Koloniebildung in allen Reihen gezeigt. Außerdem wird eine pathologisch erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion bei Patienten mit aplastischen Anämien gefunden (Selleri et al., 1996). Allerdings werden auch wachstumsstimulierende Effekte des IFN $\gamma$  beschrieben. Die Wirkung ist von verschiedenen Co-Faktoren abhängig. Für die wachstumshemmenden Effekte des IFN $\gamma$  in CD34<sup>+</sup>-Zellen scheint

der Transkriptionsfaktor IRF1 notwendig zu sein (Sato et al., 1995). Nach Ausschaltung von IRF1 durch Transfektion einer Antisense-Sequenz zeigte IFN $\gamma$  sogar proliferationsfördernde Effekte (Sato et al., 1997). Die Expression des Klasse-II-Tumorsuppressorgen H-rev107.2 hat eine an unterschiedlichen Geweben beschriebene antiproliferative Wirkung (DiSepio et al., 1998; Duvic et al., 2000; Huang et al., 2000; Casanova et al., 2001; Huang et al., 2002). H-rev107.2 trägt als ein Zielgen von IFN $\gamma$  möglicherweise zu den wachstumshemmenden Effekten des IFN $\gamma$  in hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bei. In der malignen Hämatopoese konnte Teutsch eine Korrelation der IFN $\gamma$ -induzierten Expression von H-rev107.2 mit der Wachstumshemmung der Zelllinien NB-4, HL60 und U937 nachweisen (Teutsch, 2003).

Die Hypothese einer Vermittlung wachstumshemmender IFN $\gamma$ -Signale über die Induktion des H-rev107.2-Gens in hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Zellen muss im Zusammenhang mit der bekannten Retinoid-Induktion des Gens in nicht-hämatopoetischen Geweben und der malignen Hämatopoese diskutiert werden. Bisher konnte eine Korrelation der retinoidinduzierten H-rev107.2-Expression mit der Wachstumshemmung in Magenkarzinomzelllinien und einer Mammakarzinomzelllinie gezeigt werden (Huang et al., 2000; DiSepio et al., 1998). Außerdem konnte die antiproliferative Wirkung von Retinoiden in Keratinozyten in vivo mit der Induktion von H-rev107.2 in korreliert werden (DiSepio et al., 1998). Teutsch konnte für die maligne Hämatopoese eine Induktion von H-rev107.2 durch ATRA in den Zelllinien U937, HL-60, NB-4, Raji, Jurkat und CEM, sowie in 5 primären akuten Leukämien zeigen. Bei den Zelllinien NB4 und U937 korrelierte die Expression mit einer Wachstumshemmung. Außerdem ließen sich synergistisch Effekte von IFN $\gamma$  und ATRA bezüglich der Induktion des H-rev107.2-Gens beobachten, bei der Zelllinie NB4 auch bezüglich der wachstumshemmenden Wirkung.

Synergistische Wirkungen von Retinoiden und Interferonen zeigten sich in Forschungen mit Zelllinien akuter Leukämien. Die zellbiologischen Grundlagen betreffen verschiedene Signaltransduktionsproteine des Interferonsignalwegs. Die intrazelluläre Signaltransduktion nach Stimulation mit IFN $\gamma$  kann vereinfacht wie folgt beschrieben werden: Nach Bindung von IFN $\gamma$  an seinen Rezeptor werden JAKs aktiviert. Diese führen zur Phosphorylierung von STATs, die als dimere Transkriptionfaktoren an GAS-Elemente in Gen-Promoterregionen binden. Dadurch werden Gene wie zum Beispiel IRF1 aktiviert (Stark et al., 1998). Von Matikainen et al. wurde gezeigt, dass Retinoide IRF1 hochregulieren können (Matikainen et al., 1996). Dies geschieht durch direkte Bindung an GAS-Elemente im IRF1-Promotor (Pelicano et al., 1997). Eine andere

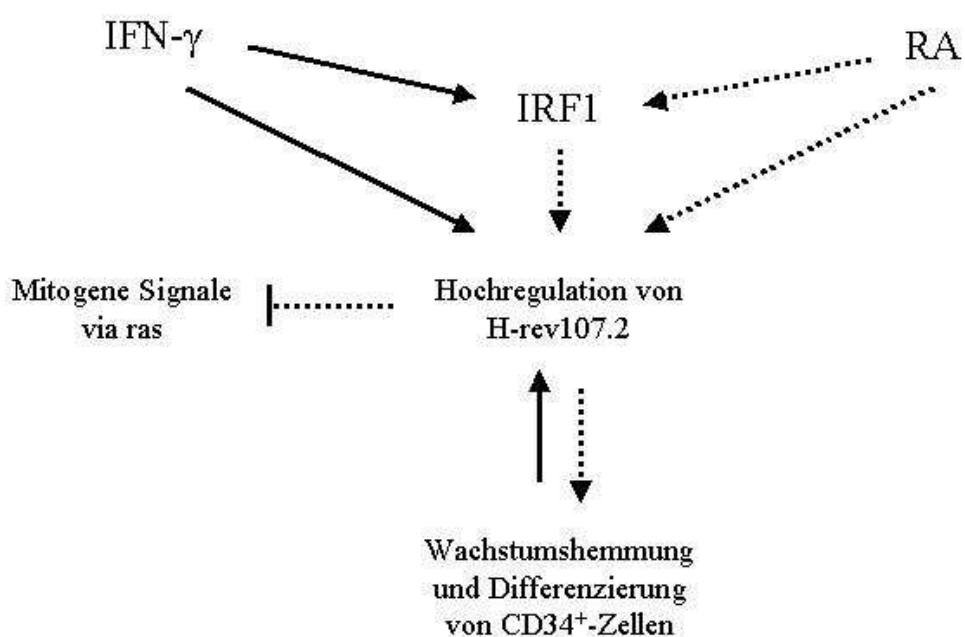
Wechselwirkung zwischen Retinoiden und Interferonen betrifft STAT1, das durch Retinoide induziert wird (Gianni et al., 1997).

Zu IRF1 und STAT1 in der Wachstumskontrolle hämatopoetischer Zellen durch IFN $\gamma$  ist folgendes bekannt: Die Aktivierung von IRF1 ist notwendig für die wachstumshemmende Wirkung von IFN $\gamma$  in hämatopoetischen Vorläuferzellen (Sato et al., 1995). Die Frage ob zur Wachstumshemmung von hämatopoetischen Zellen durch IFN $\gamma$  die Aktivierung von STAT1 notwendig ist, wird widersprüchlich beantwortet. In der pro-B-Zelllinie BA/F3 wirkt IFN $\gamma$  wachstumshemmend. Asao et al. zeigten, dass die Hemmung von STAT1 in diesen Zellen zur Wachstumsstimulation durch IFN $\gamma$  führt (Asao et al., 2000). Im Gegensatz dazu beschrieben Sato et al. bei CD34<sup>+</sup>-Zellen, dass die Aktivierung von STAT1 zur Wachstumsstimulation durch IFN $\gamma$  führt (Sato et al., 1997).

Nach den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit ist H-rev107.2 ein IFN $\gamma$ -Zielgen. Seine Induktion durch Retinoiden war bekannt. Für ausgewählte Zelllinien der malignen Hämatopoese konnte ein Synergismus von IFN $\gamma$  und ATRA bei der Induktion der H-rev107.2-Expression und einer Wachstumshemmung in vitro gezeigt werden (Teutsch, 2003). IFN $\gamma$  wirkt in der Hämatopoese über die Induktion von IRF1 wachstumshemmend (Sato et al., 1995). IRF1 kann auch durch Retinoide induziert werden. Die Induktion von IRF1 gilt deshalb als eine Grundlage der synergistischen Wirkungen beider Substanzen (Matikainen et al., 1996). Das mit H-rev107.2 verwandte H-rev107.1-Gen wird als antiproliferatives Zielgen des IRF1 beschrieben (Sers et al., 2002). IRF1 könnte hypothetisch auch bei der Induktion von H-rev107.2 durch IFN $\gamma$  in der Hämatopoese eine Rolle spielen.

Auf Grundlage der vorgelegten Ergebnisse und bisherigen Veröffentlichungen zu H-rev107.2 wird im folgenden ein mögliches Regulationsmodell des Gens in der Hämatopoese entworfen. Die vorgelegte Arbeit zeigte eine differenzierungsabhängige Expression von H-rev107.2 in der Hämatopoese. Aufgrund seiner bekannten tumorsuppressiven Eigenschaften könnte es eine Rolle bei der Differenzierung oder Wachstumskontrolle hämatopoetischer Zellen spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass IFN $\gamma$  die Expression von H-rev107.2 induziert. Dies weist auf eine wachstumsregulierende Funktion des Gens in der Hämatopoese hin. Aus anderen Arbeiten ist folgendes bekannt: Retinoide induzieren die Expression von H-rev107.2 in epithelialen Geweben und Karzinomen (DiSepio et al., 1998; Huang et al., 2000).

Die Induktion von H-rev107.2 durch Retinoide ist inzwischen von Teutsch auch an ausgewählten Zelllinien und primären Zellen der malignen Hämatopoese beschrieben. ATRA wirkt dort synergistisch mit Interferonen (Teutsch, 2003). Daneben wurde die Hemmung des mitogenen ras-Signalweges durch die Expression von H-rev107.2 vermutet. Transfektionsexperimente mit einem H-rev107.2-Vektor zeigten eine verminderte Aktivität der ras-nachgeschalteten Signaltransduktionsproteine ERK, JNK und p38-MAPK in der Karzinomlinie HtTA (Huang et al., 2002). Abbildung 5-1 zeigt ein mögliches Regulationsmodell der Expression von H-rev107.2 in der Hämatopoese.



**Abbildung 5-1:** Regulationsmodell des H-rev107.2-Tumorsuppressorgens: H-rev107.2 ist Zielgen von IFN $\gamma$ . CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimieren das Gen im Gegensatz zu differenzierten mononukleären Zellen nicht. In ausgewählten malignen Zellen können außerdem Retinoiden (RA) H-rev107.2 induzieren. Möglicherweise wird es durch den Transkriptionsfaktor IRF1 reguliert. Seine Expression hemmt mitogene ras-Signale in Zelllinien solider Tumoren.

In das gezeigte Regulationsmodell gingen Ergebnisse aus Untersuchungen mit malignen hämatologischen Zelllinien und nicht-hämatopoetischen Zellen ein. Für die physiologische Hämatopoese ist das Modell denkbar und könnte als Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen gelten. In der vorliegenden Arbeit finden sich bereits Widersprüche zu dem gezeigten Regulationsmodell. ATRA konnte H-rev107.2 in CD34<sup>+</sup>-Zellen nicht induzieren. Die wachstumshemmende Synergismen von Interferonen und Retinoiden sowie deren molekulare Grundlagen sind insbesondere aus Untersuchungen zur Promyelozytenleukämie bekannt. Auch

die in Folge von Teutsch durchgeführten Experimente zeigten diesen Synergismus am deutlichsten in der Promyelozytenleukämie NB4. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Wachstumshemmung und der Induktion des H-rev107.2-Gens gezeigt werden. Die Zelllinie NB4 trägt die Translokation t(15/17), welche den Retinolsäurerezeptor betrifft. Möglicherweise induziert ATRA die Expression von H-rev107.2 nur in hämatopoetischen Zellen, deren Retinolsäuresignalweg gestört ist. Eine andere Erklärung der fehlenden ATRA-Induktion in CD34<sup>+</sup>-Zellen könnte in der Verwendung von liposomalem ATRA in den Untersuchungen zur malignen Hämatopoese sein, das bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung stand (Teutsch, 2003).

Zusätzliche Untersuchungen fanden in der vorgelegten Arbeit an Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen und primären CML-Proben statt. Die untersuchten T-ALL-Linien CEM und Jurkat exprimierten das H-rev107.2-Gen, die Zelllinien HL60 (AML-M2), K562 (CML im Blastenschub) und UB937 (monoblastische Leukämie) nicht. Die Ergebnisse zu HL60 und K562 wurden bereits von DiSepio et al. beschrieben (DiSepio et al., 1998). Allerdings fanden Huang et al. eine Expression in HL60-Zellen (Huang et al., 2000). Auch Teutsch kam bei der Analyse der Zelllinie zu widersprüchlichen Ergebnissen (Teutsch, 2003). Eventuell spielt die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten PCRs und Northernblots hier eine Rolle. Möglicherweise exprimiert die HL60-Zelllinie das Gen schwach. In allen primären humanen CML Proben, die in der vorgelegten Arbeit analysiert wurden, war H-rev107.2 exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigten primäre Zellen akuter Leukämien in der Mehrzahl der Fälle eine fehlende H-rev107.2-Expression. Wie erwähnt lässt sich H-rev107.2 in den untersuchten Zelllinien und primären Proben akuter Leukämien durch IFN $\gamma$  und ATRA induzieren. Außerdem wurde eine Korrelation mit der Wachstumshemmung der Zelllinien NB4 und U937 mit der induzierten H-rev107.2-Expression beschrieben (Teutsch, 2003). Möglicherweise spielt H-rev107.2 als wachstumshemmendes Gen in der Hämatopoese eine Rolle als Tumorsuppressor bei akuten Leukämien.

### 5.3 Zur Methode

In der vorgelegten Arbeit wurden semiquantitative RT-PCRs zur Analyse der Genexpression eingesetzt. Durch die hohe Sensibilität, die mit einer RT-PCR erreicht werden kann, genügen geringe Mengen an Probenmaterial. Allerdings kann bei semiquantitativen RT-PCR-Analysen das Ergebnis auf Grund unterschiedlicher Leistungsfähigkeit der Amplifikation verfälscht werden. Verschiedene Punkte waren deshalb zu beachten, um die Ergebnisse aussagekräftig zu machen. Die theoretische exponentielle Zuwachsrate der PCR wird in der Praxis nicht erzielt, sondern erreicht allmählich ein Plateau. Deshalb wurden nicht mehr als 33 Zyklen verwendet. Außerdem erfolgte eine interne Standardisierung mit Hilfe einer konstant exprimierten Housekeepingsequenz, dem GAPDH-Transkript (Lottspeich et al., 1998). Mehrere Arbeiten zeigten, dass GAPDH unabhängig vom Zeitpunkt und der experimentellen Manipulation konstant exprimiert wird. Allerdings gibt es Berichte, dass es große interindividuelle Unterschiede in der GAPDH-Expression zu finden sind und das Gen durch zahlreiche Wirkstoffe, unter Ihnen auch Retinoide, reguliert wird (Bustin, 2000).

Es ist zu bemerken, dass zur Analyse von Expressionsdifferenzen der Northernblot, der auf Amplifikationsschritte verzichtet, als überlegene Methode anzusehen ist (Lottspeich et al., 1998). Allerdings war es nicht möglich, die für Northernblotanalysen benötigte Menge an mRNA aus dem primären Probenmaterial zu gewinnen. Dazu wäre eine wesentlich größere Menge an Ausgangsmaterial notwendig gewesen. Zum einen ist zu bedenken, dass die verwendeten CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Knochenmarks- und Blutproben gesunder Knochenmark- und PBSC-Spender gewonnen wurden. Zum anderen wurde mit der Separation der Subpopulationen mittels Anti-CD-Antikörper ein kostenaufwendiges Verfahren eingesetzt, das begrenzte Zellzahlen der einzelnen Subpopulationen lieferte. Die ausreichende Genauigkeit der semiquantitativen Aussagen des verwendeten RT-PCR-Standards wurde im eigenen Labor bereits durch Northernblot-Vergleiche belegt (Teutsch, 2003). Aussagen zur Expression der Gene auf Translationsebene waren nicht möglich, da kein Antikörper für Westernblots zur Verfügung stand.

## 5.4 Weiterführende Untersuchungen

Die vorgelegte Arbeit gab eine Übersicht der Expression der Gene H-rev107.1 und H-rev107.2 in der Hämatopoese. Außerdem wurden Möglichkeiten der Regulation der Gene untersucht. Die vorgestellten Ergebnisse ermöglichen eingehender Untersuchungen.

Ein denkbarer Ansatz wäre die genauere Analyse der differenzierungsabhängigen Expression von H-rev107.1 und H-rev107.2 durch Selektion von Subpopulationen mittels Antikörper-Doppelmarkierung oder anderen Methoden wie Zellgewinnung aus Methylzellulosekulturen.

Weiterhin zu untersuchen ist, ob zur Hemmung der Expression des H-rev107.1-Gens in physiologischen hämatopoetischen Zellen CpG-Methylierungen vorkommen.

Außerdem bleibt zu analysieren ob H-rev107.2 wie das verwandte H-rev107.1 ein direktes Zielgen von IRF1 ist.

Um die Funktionen von H-rev107.1 und H-rev107.2 in hämatopoetischen Zellen zu untersuchen sollten Transfektionsexperimente unternommen werden.