

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
am Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die differenzierungsabhängige Expression der Klasse-II-Tumorsuppressorgene H-rev107.1
und H-rev107.2 in der Hämatopoese und die Induktion von H-rev107.2 durch Interferon- γ**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Martin
aus Gerolzhofen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Arnold
2. Prof. Dr. med. M. Theobald
3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Bunjes

Datum der Promotion: 15.12.2006

Inhalt

Inhalt.....	3
Danksagung.....	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Hämatopoese	10
1.1.1 Physiologie der Hämatopoese	10
1.1.2 Immunzytologie	12
1.2 Maligne Hämatopoese.....	14
1.2.1 Molekulare Pathologie	14
1.2.2 Tumorsuppressorgene und ihre Klassifikation.....	16
1.2.3 Pharmakologische Steuerung der Genexpression	17
1.2.4 Therapeutische Bedeutung der Molekularpathologie	18
1.3 H-rev107.1.....	20
1.4 H-rev107.2.....	22
2 Fragestellung	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 Nachweis der Chemikalien, Biochemikalien und Reaktionskits	25
3.1.2 Puffer und Medien.....	26
3.1.3 Lösung und Konzentrationen der eingesetzten Wirkstoffe	26
3.1.4 Primäres menschliches Material.....	27
3.1.5 Zelllinien	27
3.2 Zellbiologische Methoden.....	28
3.2.1 Isolation mononukleärer Zellen	28
3.2.2 Einfrieren, Lagern und Auftauen von Zellen	29
3.2.3 Separation von Subpopulationen.....	29
3.2.4 Kurzzeitkultur von MNC und deren Subpopulationen	30
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	32
3.3.1 Gewinnung von totaler zellulärer RNA	32
3.3.2 Gewinnung von mRNA.....	32
3.3.3 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	33
3.3.4 Elektrophorese.....	36

3.3.5	Reinigung von RT-PCR-Produkten	36
3.3.6	Restriktionsverdau.....	36
3.3.7	Darstellung der RT-PCR-Ergebnisse	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Expression von H-rev107.1 in der Hämatopoese.....	38
4.1.1	Expression von H-rev107.1 in mononukleären Zellen des Blutes und Knochenmarks.....	38
4.1.2	Expression von H-rev107.1 in CD34 ⁺ -Vorläuferzellen	38
4.1.3	Expression von H-rev107.1 in CD3 ⁺ -, CD4-, CD14 ⁺ -, CD19 ⁺ -, CD45RO ⁺ - und CD56 ⁺ -Zellen	39
4.2	Regulation der Expression von H-rev107.1 in der Hämatopoese	41
4.2.1	Regulation von H-rev107.1 in CD34 ⁺ -Vorläuferzellen	41
4.2.2	Regulation von H-rev107.1 in ausgewählten Subpopulationen.....	43
4.3	Zusätzliche Untersuchungen zu H-rev107.1	44
4.3.1	Expression von H-rev107.1 in Zelllinien hämatologischer Neoplasien.....	44
4.3.2	Expression von H-rev107.1 in CML-Zellen	44
4.4	Expression von H-rev107.2 in der Hämatopoese.....	46
4.4.1	Expression von H-rev107.2 in mononukleären Zellen des Blutes und Knochenmarks.....	46
4.4.2	Expression von H-rev107.2 in CD34 ⁺ -Vorläuferzellen	46
4.4.3	Expression von H-rev107.2 in CD3 ⁺ -, CD4-, CD14 ⁺ -, CD19 ⁺ -, CD45RO ⁺ - und CD56 ⁺ -Zellen	47
4.4.4	Expression von H-rev107.2 in CD4 ⁺ /CD45RA ⁺ -, CD4 ⁺ /CD45RO ⁺ -, CD19 ⁺ /CD27 ⁺ - und CD19 ⁺ /CD27 ⁻ -Zellen	48
4.5	Regulation der Expression von H-rev107.2 in der Hämatopoese	49
4.5.1	Regulation von H-rev107.2 in CD34 ⁺ -Vorläuferzellen	49
4.5.2	Regulation von H-rev107.2 in ausgewählten Subpopulationen.....	51
4.6	Zusätzliche Untersuchungen zu H-rev107.2	52
4.6.1	Expression von H-rev107.2 in Zelllinien hämatologischer Neoplasien.....	52
4.6.2	Expression von H-rev107.2 in CML-Zellen	52
5	Diskussion	54
5.1	H-rev107.1 in der Hämatopoese.....	54
5.1.1	Differenzierungsabhängige Expression von H-rev107.1 in der Hämatopoese	54
5.1.2	Fehlende Regulierbarkeit von H-rev107.1 in der Hämatopoese	55

5.2	H-rev107.2 in der Hämatopoese.....	60
5.2.1	Differenzierungsabhängige Expression von H-rev107.2 in der Hämatopoese	60
5.2.2	Induktion von H-rev107.2 durch IFN γ	62
5.3	Zur Methode.....	67
5.4	Weiterführende Untersuchungen.....	68
6	Zusammenfassung.....	69
	Literaturverzeichnis.....	70
	Lebenslauf	78
	Erklärung.....	79

Danksagung

Der Autor dankt Frau Prof. Dr. med. Renate Arnold für die Überlassung des Themas und die Unterstützung dieser Arbeit, sowie Herrn Dr. med. Oliver Rosen für die wissenschaftliche Anregung und Betreuung.

Daneben gilt sein Dank Frau Hannelore Meier für die technische Einführung in das Labor und Herrn Christian Teutsch für den fruchtbaren Meinungsaustausch.

Frau Monika Blasi, Frau Katharina Schmidt, Frau Tisa Küttler und Herrn Dr. med. Bastian Grande dankt er für das Korrekturlesen.

Zuletzt sei Frau Dr. med. Katharina Leeder und den Eltern des Autors für die moralische Begleitung gedankt.

Abkürzungsverzeichnis

AA	-	<i>amino acids</i> (Aminosäuren)
ALL	-	Akute lymphatische Leukämie
AML	-	Akute myeloische Leukämie
ATRA	-	<i>all-trans retinoic acid</i> (All-trans Retinolsäure)
bp	-	Basenpaare
BSA	-	Bovines Serumalbumin
CD	-	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	-	<i>complementary DNA</i> (Komplementär-DNA)
CML	-	Chronisch myeloische Leukämie
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	-	<i>de novo methyltransferase</i>
DTT	-	Dithiothreitol
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	-	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EPO	-	Erythropoetin
FACS	-	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> (Fluoreszenzaktivierter Zellsorter)
FCS	-	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
fw	-	<i>forward</i> (vorwärts)
g	-	Erdbeschleunigung
GAPDH	-	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate- dehydrogenase</i> (Glukose-3-Phosphatdehydrogenase)
GAS	-	<i>interferon-γ-activated site</i> (Interferon- γ aktivierte Stelle)
G-CSF	-	<i>granulocyte-colony stimulating faktor</i> (Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor)
IFN	-	Interferon
IL	-	Interleukin
IMDM	-	Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium
IRF	-	<i>interferon regulatory faktor</i> (Interferon-regulierender Faktor)
JAK	-	Janus-Kinase

kb	-	Kilobasen
kD	-	Kilodalton
KM	-	Knochenmark
KMT	-	Knochenmarktransplantation
LOX	-	Lysyloxidase
MAPK	-	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MEK	-	MAPK/ERK
MNC	-	<i>Mononuclear cells</i> (Mononukleäre Zellen)
mRNA	-	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
n. u.	-	nicht untersucht
n. v.	-	nicht verwertbar
NK	-	NK-Zellen: Natürliche Killerzellen
pB	-	Peripheres Blut
PBS	-	<i>Phosphat buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PBSC	-	<i>periphäre blood stemcells</i> (Periphere Blutsammzellen)
PCR	-	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI3K	-	Phosphoinositol-3-Kinase
RA	-	<i>retinoic acid</i> (Retinolsäure)
RARRES	-	<i>retinoic acid receptor responder</i> (Retinolsäurerezeptorresponder)
rev	-	<i>reverse</i> (rückwärts)
RIG	-	<i>retinoid inducible gene</i> (Retinoid-induzierbares Gen)
RNA	-	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	-	Reverse Transkription
SDS	-	<i>sodiumdodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
STAT	-	<i>signal transducer and activator of transkription</i> (Signaltransduktor und Aktivierer der Transkription)
TGF	-	<i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
TIG	-	<i>tazarotene induced gene</i> (Tazaroten-induziertes Gen)
U	-	<i>Units</i> (Einheiten)
vgl.	-	Vergleiche

Anmerkung: In der Molekularbiologie werden Abkürzungen und Akronyme oft als eigene Termini verwendet, ohne dass diese jemals voll ausgeschrieben werden. Diese Praxis führt dazu, dass sich in einem Begriff sogar mehrere Abkürzungsgenerationen verstecken können, z.B. ist

MEK aus MAPK (*mitogen-activated kinase*) und ERK (*extracellular signal responsive kinase*) zusammengesetzt (Singh et al., 1999). Auf die Auflistung dieser Abkürzungen wurde teilweise verzichtet, ebenso auf die Kürzel der Zelllinien. Außerdem werden übliche chemische und physikalische Abkürzungen wie NaCl (Natriumchlorid) oder ml (Milliliter) nicht aufgeführt.