

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Expression und
Regulation der Tumorsuppressorgene
H-rev107-1 und H-rev107-2 bei malignen
hämatopoetischen Zellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité

Universitätsmedizin Berlin

von
Christian Teutsch
aus Berlin

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Renate Arnold

2. Prof. Dr. med. B. Hertenstein

3. Prof. Dr. F. Hölzel

Datum der Promotion: 08.09.2004

Danksagung

Frau Professor Dr. med. Renate Arnold, Leiterin der Knochenmarktransplantation, Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Charite, Campus Virchow-Klinikum, danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. med. Oliver Rosen danke ich für die hervorragende Betreuung und den zahlreichen Ratschlägen bei der Planung und Durchführung der Arbeit.

Frau Hannelore Meyer danke ich für die gewissenhafte Einarbeitung in die Methodik und die Beratung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Thomas Martin danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Dr. rer. nat. Christine Sers und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhold Schäfer sowie ihrer Arbeitsgruppe für molekulare Tumorpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Charite, Campus Mitte, danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Dr. Leonid Karawajew, Universitätsklinikum Charite, Robert-Rössle-Klinik, Berlin-Buch, danke ich für die Überlassung der Patientenproben.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, deren Unterstützung und Verlässlichkeit mir die Fertigstellung dieser Arbeit sehr erleichtert haben.

1	Einleitung	12
1.1	Hämatopoese	12
1.2	Pathologie der Leukämien	14
1.3	Tumorsuppressorgene	16
1.3.1	H-rev107-1	16
1.3.2	H-rev107-2	17
1.4	Pharmakologische Beeinflussung der Genexpression	19
1.4.1	Interferon-alpha und Interferon-gamma	19
1.4.2	All- <i>trans</i> Retinsäure	20
1.4.3	Spezifische Inhibition der Signaltransduktion	21
2	Fragestellung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Chemikaliennachweis	24
3.1.1	Puffer und Medien	25
3.1.2	Ansetzen und Lagern der Wirkstoffe	26
3.2	Zellmaterial	26
3.2.1	Zelllinien	26
3.2.2	Primäre Leukämiezellen	28
3.3	Zellbiologische Methoden	30
3.3.1	Kultivierung der Zelllinien	30
3.3.2	Inkubationsversuche der Zelllinien	31
3.3.2.1	Inkubation mit IFN- α / γ und ATRA	32
3.3.2.2	Induktionskinetik von H-rev107-2	32

3.3.2.3	Inhibition der Signaltransduktion	33
3.3.3	Herstellung der Versuchskulturen der Patientenproben	33
3.3.3.1	Separation von CD34+ Zellen	34
3.3.4	Zellzahlbestimmung	35
3.3.5	Trypanblau-Vitalitätstest	35
3.3.6	Wachstumskinetik	35
3.4	Molekularbiologische Methoden	36
3.4.1	Isolation der gesamten zellulären RNS	36
3.4.2	Photometrische Quantifizierung der RNS	37
3.4.3	Qualitätssicherung der RNS	38
3.4.4	Isolation der mRNS aus gesamt-RNS	38
3.4.5	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	39
3.4.5.1	Primer	41
3.4.5.2	Thermocyclerprogramme	42
3.4.6	DNS-Elektrophorese	42
3.4.7	RNS-Elektrophorese	43
3.4.8	Northern-Blot-Hybridisierung	43
3.4.8.1	RNS-Transfer	43
3.4.8.2	Radioaktive Markierung der cDNS-Sonde (Nick-Translation)	44
3.4.8.3	Prähybridisieren und Hybridisieren der Membran	45
3.4.8.4	Waschen der Membran	45
3.4.8.5	Belichten und Entwickeln des Films	46

4	Ergebnisse	47
4.1	Molekularbiologische Ergebnisse	47
4.1.1	Expression von H-rev107-2 bei primären Leukämiezellen	47
4.1.2	Expression von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen	48
4.1.3	Regulation von H-rev107-2 bei primären Leukämiezellen	48
4.1.4	Regulation von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen (RT-PCR)	50
4.1.5	Regulation von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen (Northern-Blot-Hybridisierung)	53
4.1.6	Induktionskinetik von H-rev107-2 bei der Zelllinie NB-4	55
4.1.7	Beeinflussung der H-rev107-2-Expression durch Inhibition der, Signaltransduktion	56
4.1.8	Expression von H-rev107-1 bei primären Leukämiezellen	58
4.1.9	Expression von H-rev107-1 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen	58
4.1.10	Regulation von H-rev107-1 bei primären Leukämiezellen	59
4.1.11	Regulation von H-rev107-1 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen	60
4.2	Zellbiologische Ergebnisse	62
4.2.1	Wachstumskinetik der Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen	62
5	Diskussion	66
5.1	Die Expression von H-rev107-2 bei malignen hämatopoetischen Zellen	66
5.1.1	Die Regulation von H-rev107-2 durch IFN- α , IFN- γ und ATRA	68
5.1.2	Der Vergleich der H-rev107-2-Expression und des Wachstumsverhaltens der Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen	71

5.1.3	Die Einordnung von H-rev107-2 in die Signaltransduktion myeloischer Zellen	73
5.2	Die Expression und Regulation von H-rev107-1 bei malignen hämatopoetischen Zellen	76
5.2.1	Mögliche Ursachen der supprimierten H-rev107-1-Expression	77
5.2.2	Die Induktion von H-rev107-1 durch IRF1	79
5.3	Kritische Betrachtung der Methodik	81
5.4	Weiterführende Untersuchungen	82
6	Zusammenfassung	84

Abkürzungen

ACD-A	<i>Anticoagulant Citrate Dextrose Solution Formula A</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ATRA	All-trans Retinsäure (<i>all-trans retinoic acid</i>)
5-AZA	5'-Aza-2'-desoxyzytidin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNS	Komplementäre DNS
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
cpm	Maßeinheit für Radioaktivität (counts per minute)
d	Tag
dCTP	Desoxyzytidin-triphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ERK	Extrazellulär regulierte Kinase (Synonym: MAPK, Mitogen aktivierte Proteinkinase)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
fw	vorwärts (<i>forward</i>)
G3PDH	Glucose-3-Phosphatdehydrogenase
GAS	<i>IFN-γ activated site</i>
G-CSF	Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>)
h	Stunden
H-rev107	Nukleinsäureebene
H-REV107	Proteinebene
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRF1	<i>interferon regulatory factor 1</i>
ISG	<i>IFN stimulated gene</i>
ISRE	<i>IFN stimulated response element</i>
J.	Jahre
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
M	molar

m	männlich
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen aktivierte Proteinkinase-/ Extrazellulär regulierte Kinase-Kinase (Synonym: MAPKK, Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
MNZ	Mononukleäre Zellen
MSP	Magnetseparationspuffer
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNS	Boten- RNS
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
pB	Peripheres Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphat buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ph+	Philadelphia-Chromosom positiv
RARα	Retinsäurerezeptor alpha
RARE	<i>retinoic acid response elements</i>
RARRES3	<i>retinoic acid receptor responder 3</i>

RIG	<i>retinoid inducible gene</i>
RNase	Ribonuklease
rRNS	Ribosomale RNS
RPMI	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RXR	Retinsäurerezeptor X
SDS	Natriumdodezylsulfat
sec	Sekunden
SSC	Standard-Salz/ Zitrat (<i>standard saline citrate</i>)
STAT	<i>signal transductor and activator of transcription</i>
TIG3	<i>tazarotene induced gene 3</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	Trichostatin A
tRNS	Transfer RNS
U	Umdrehungen
UV	ultraviolet
V	Volt
w	weiblich

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Expression und Regulation der Tumorsuppressorgene H-rev107-1 und H-rev107-2 bei malignen hämatopoetischen Zellen. Dadurch sollen Erkenntnisse über eine mögliche Beteiligung beider Gene an der Regulation der Hämatopoese erlangt werden.

1.1 Hämatopoese

Bei der Hämatopoese entstehen im Knochenmark durch sich nicht erschöpfende Teilung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen myelo-poetische und lymphopoetische Stammzellen (siehe Abbildung 1.1). Aus den myelo-poetischen Stammzellen bilden sich durch Proliferation und Differenzierung fünf verschiedene Zellreihen: die erythropoetische (*burst forming units erythroid*, BFU-E), die thrombopoetische (*colony forming units megacaryocyte*, CFU-Meg), die myelo-monozytäre (*colony forming units granulo-monocyte*, CFU-GM), sowie die basophile (CFU-Baso) und eosinophile (CFU-Eo) Reihe. Ihren Namen verdanken die morphologisch nicht zu differenzierenden Zellen dieser Entwicklungsstufe ihrer Eigenschaft, *in vitro* charakteristische Kolonien zu bilden. Unter dem Einfluss von Zytokinen wie Erythropoetin, Thrombopoetin, den Kolonie-stimulierenden Faktoren und Interleukinen reifen die funktionellen Endzellen der jeweiligen Reihe aus (siehe Abbildung 1.1): Die Erythrozyten, Thrombozyten, Neutrophile, die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems sowie Basophile und Eosinophile. Die lymphopoetischen Stammzellen differenzieren sich unter dem Einfluss von Interleukinen, Tumornekrosefaktoren und Interferon-gamma (IFN- γ) zu den Zellen der B-Zell- und T-/ Natürliche Killer-Zellreihe. Bei erhöhtem Bedarf oder Zellumsatz kann die Proliferation innerhalb einer Zellreihe durch verstärkte Bildung der entsprechenden Zytokine gesteigert werden. So entsteht ein homöostatisches Gleichgewicht, welches die Zahl der reifen Blutzellen in einem bedarfsgerechten physiologischen Referenzbereich hält (Eaves, 1996).

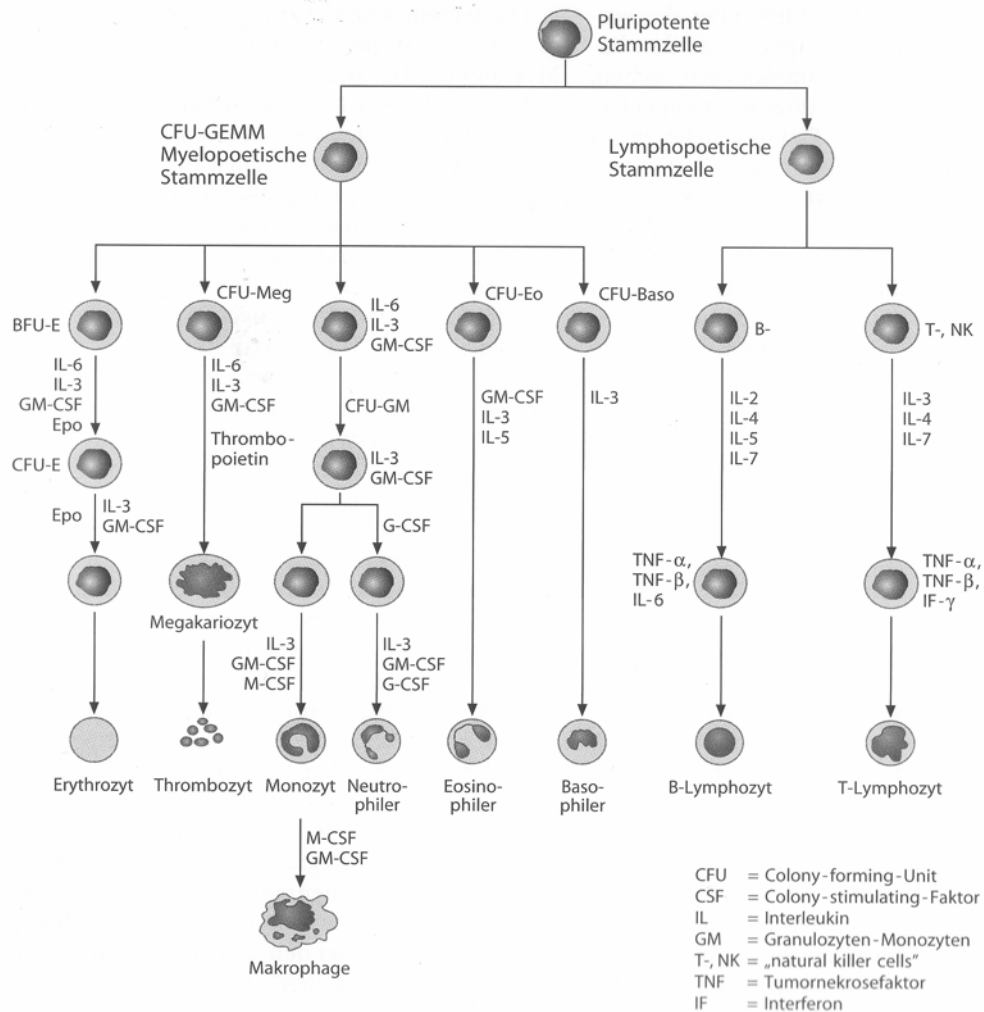


Abbildung 1.1: Die verschiedenen Zellreihen der Hämatopoese und die Zellreihen-spezifischen Wachstumsfaktoren (aus: Löffler H., Rastetter J., Atlas der klinischen Hämatologie, 5. Auflage, 1999, Springer Verlag)

Bei den komplexen Vorgängen der Hämatopoese kommt es zu einer ausgeglichenen Regulation von Differenzierung, Proliferation und programmiertem Zelltod, der so genannten Apoptose. Bei Deregulation dieses Gleichgewichts können sich im Sinne einer malignen Hämatopoese Leukämien entwickeln (Eaves, 1996).

1.2 Pathologie der Leukämien

Unter dem von Rudolf Virchow geprägten Begriff der Leukämie (weißes Blut) wird eine unkontrollierte Proliferation eines abnormen Zellklons des hämatopoetischen Systems verstanden. Leukämiezellen unterstehen weder den physiologischen Regulationsmechanismen von Zellwachstum und -differenzierung noch sind sie in der Lage, zu funktionellen Endzellen der entsprechenden Zellreihe heranzureifen (Schaefer, 1993). Von den für maligne Tumorzellen charakteristischen biologischen Eigenschaften treffen für Leukämiezellen folgende zu (Hanahan und Weinberg, 2000):

- die Unabhängigkeit gegenüber externen Wachstumssignalen
- die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- die Umgehung der Apoptose
- das unbegrenzte Vermehrungspotential

Dadurch verdrängt der Leukämiezellklon im Knochenmark die normalen hämatopoetischen Zellen. Es kommt zu einem Mangel an reifen Blutzellen mit der entsprechenden klinischen Symptomatik, insbesondere Infektanfälligkeit und Blutungsneigung. Zusätzlich können sich Leukämiezellen auch außerhalb ihrer normalen Bildungsstätten in Form leukämischer Organinfiltrate ausbreiten (Schaefer, 1993).

Diesen Eigenschaften der Leukämiezellen liegen erworbene genetische Veränderungen (Mutationen) zugrunde. Mittlerweile sind eine Vielzahl chromosomaler Veränderungen wie Translokationen oder Deletionen bekannt, die mit Leukämien assoziiert sind (Gilliland, 1998). Durch Translokationen entstehen Hybridgene, die chimäre Proteine exprimieren. Diese chimären Proteine besitzen oft onkogene Eigenschaften und spielen bei der Entstehung der jeweiligen Leukämie eine zentrale Rolle. So kommt es beispielsweise bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL) zu einer Fusion des Gens

des Retinsäurerezeptors alpha ($RAR\alpha$) und des Promyelozytenleukämie-Gens (PML, entsprechend der Translokation t(15/17)) bzw. des Promyelozytenleukämie-Zinkfinger-Gens (PLZF, Translokation t(11/17)). In myeloischen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass durch die Expression dieser Fusionsgene die Aktivierung von Retinsäuresensitiven Genen supprimiert und dadurch die granulozytäre Differenzierung unterbunden wird (Rousselot et al., 1994). Auch die Expression des chimären Proteins AML1-ETO, resultierend aus der für die AML-M2 typischen Translokation t(8/21), supprimiert die für die Wachstums- und Differenzierungskontrolle der hämatopoetischen Zellen notwendigen Retinsäuresignale (Ferrara et al., 2001).

Durch Deletionen kommt es zu einem Verlust genetischen Materials. So wird beispielsweise bei präleukämischen myelodysplastischen Syndromen und sekundären akuten myeloischen Leukämien häufig eine Deletion innerhalb des langen Arms des Chromosoms 5 (5q31.1) gefunden. Dabei geht das für den *Interferon regulatory factor 1* (IRF-1) kodierende Gen verloren (Willman et al., 1993), so dass IRF-1 seine Funktion bei der Differenzierung myeloischer Zellen nicht mehr ausüben kann (Abdollahi et al., 1991).

Diese Mutationen wurden auf der Ebene der DNS entdeckt. Im Gegensatz dazu werden bei expressionsgenetischen Untersuchungen auf RNS-Ebene zell-, gewebe- und tumorspezifische Genaktivitätsmuster aufgedeckt (Sager, 1997). Die APL bietet sich für diesen Untersuchungsansatz an, da bei dieser Leukämieentität die Differenzierungsblockade durch Behandlung mit pharmakologischen Konzentrationen von all-*trans* Retinsäure (ATRA) aufgehoben werden kann. So können durch den Vergleich der Genexpression bei APL-Zellen vor und nach der ATRA-induzierten Differenzierung die dafür notwendigen Gene identifiziert werden (Liu et al., 2000) (Altucci et al., 2001).

1.3 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene tragen zur Wachstumskontrolle von Zellen bei. Sie werden in zwei Klassen unterteilt: Klasse-I-Tumorsuppressorgene sind als Gene definiert, die auf DNS-Ebene durch Verlust oder Mutation ausfallen und dadurch nicht mehr ihre Funktion erfüllen (Lee, 1991). Als für die Hämatopoese relevantes Beispiel sei hier IRF-1 genannt (Willman et al., 1993). Klasse-II-Tumorsuppressorgene dagegen sind auf DNS-Ebene intakt. Charakteristisch für sie ist ein Funktionsverlust durch eine supprimierte Expression. Dieser Klasse gehören die in dieser Arbeit untersuchten Gene H-rev107-1 und H-rev107-2 an (Husmann et al., 1998), zwei Mitglieder einer neu beschriebenen Genfamilie (Hughes und Stanway, 2000) (Akiyama et al., 1999).

1.3.1 H-rev107-1

Bei H-rev107-1 handelt es sich um ein auf Chromosom 11q11-12 lokalisiertes Gen, dessen 966 Basenpaare großes mRNA-Transkript ein 18 kDa Protein aus 162 Aminosäuren kodiert.

H-rev107-1 wurde mit Hilfe einer Methode der Expressionsgenetik, dem Erstellen einer subtraktiven cDNA-Bibliothek zwischen H-Ras-transformierten und H-Ras-exprimierenden, aber phänotypisch nicht transformierten Rattenfibroblasten, isoliert. Die H-rev107-1-Expression war spezifisch für Fibroblasten, die gegenüber der Transformation durch das Onkoprotein H-RAS resistent waren. Zudem konnte gezeigt werden, dass in H-RAS-transformierten Fibroblasten die Transfektion eines H-rev107-1-exprimierenden Plasmids die Wiederherstellung des normalen Phänotyps bewirkt (Hajnal et al., 1994). Die daraufhin durchgeführten Untersuchungen der H-rev107-1-Expression an Rattengewebe zeigten, dass die meisten differenzierten Gewebe H-rev107-1 exprimierten, während in Zelllinien von Leber-, Nieren-, Pankreas- und Mamma-Karzinomen keine, in solchen von Kolon-Karzinomen nur sehr wenige H-rev107-1-Transkripte nachgewiesen wurden (Sers et al., 1997). Untersuchungen an humanen Geweben konnten diese Ergebnisse bestätigen (Husmann et al., 1998).

Hinweise auf die Regulation der H-rev107-1-Expression bei nicht hämatopoetischen Zellen gab eine Arbeit, die eine Induktion von H-rev107-1 in Rattenastrozyten durch IFN- γ fand (Kuchinke et al., 1995). Sers et al. zeigten in einer neueren Untersuchung, dass in Ovarial-Karzinomzellen der Transkriptionsfaktor IRF-1 die H-rev107-1-Expression induziert und H-REV107-1 an der antiproliferativen Wirkung von IFN- γ beteiligt ist (Sers et al., 2002).

Die Aminosäuresequenz von H-REV107-1 lässt bisher keine Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu. Mittels Western-Blot Untersuchungen wurden eine membranständige und eine zytoplasmatische Fraktion des H-REV107-1-Proteins nachgewiesen. Dies spricht für eine Regulation der Proteinaktivität über Translokation vom Zytosol in eine membranständige Position. In Transfektionsexperimenten wurde gezeigt, dass die Überexpression von H-REV107-1 das Wachstum von Zelllinien solider Tumore hemmt. Dabei ergaben sich Hinweise, dass der hydrophobe, für die Membranbindung verantwortliche C-Terminus zur proliferationshemmenden Wirkung von H-REV107-1 notwendig ist (Sers et al., 1997).

Die vorläufigen Untersuchungen der H-rev107-1-Expression in hämatopoetischen Zellen zeigten eine schwache Expression in CD34+ hämatopoetischen Stammzellen, aber eine deutlich stärkere Expression in verschiedenen Leukozytensubpopulationen (Martin, 2003).

1.3.2 H-rev107-2

Das Gen H-rev107-2 befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 11q23 und kodiert ein 164 Aminosäuren großes, ebenfalls membranständiges Protein. H-rev107-1- und H-rev107-2-Proteine sind zu 51 % homolog, dabei sind die 50 N-terminalen Aminosäuren zu 72 % identisch (Husmann et al., 1998). Der Vergleich der Nukleinsäuresequenz von H-rev107-2 mit der des Tumorsuppressorgens TIG3 (*tazarotene induced gene 3*)

(DiSepio et al., 1998) und RARRES3 (*retinoic acid receptor responder 3*) (Casanova et al., 2001) zeigte, dass es sich bei H-rev107-2, TIG3 und RARRES3 um synonyme Bezeichnungen handelt. Huang et al. isolierten aus Retinoid-behandelten Magen-Karzinomzelllinien ein RIG1 (*retinoid inducible gene 1*) bezeichnetes Gen (Huang et al., 2000). Es unterschied sich nur in drei Nukleinsäuren von der Nukleinsäuresequenz von H-rev107-2/TIG3/RARRES3, so dass die Autoren ebenfalls von einer synonymen Bezeichnung des Gens ausgingen.

H-rev107-2 wird in den Zellen der meisten differenzierten humanen Gewebearten deutlich (Husmann et al., 1998), in unterschiedlichen Tumorzelllinien dagegen nicht oder nur schwach exprimiert (DiSepio et al., 1998). DiSepio et al. fanden mit Hilfe der Methode der *differential display RT-PCR* heraus, dass H-rev107-2 in Zellkulturen benigner humaner Keratinozyten und *in vivo* bei Psoriasis-Zellen durch das Retinoid Tazarotene induziert wird. Diese Induktion ging mit verminderter Proliferation einher. Bei Untersuchungen von Mamma-Karzinomzelllinien korrelierte Wachstumshemmung durch Tazarotenebehandlung mit der Expression von H-rev-107-2, während bei Retinoid-resistenten Mamma-Karzinomzelllinien durch Tazarotene keine H-rev107-2-Induktion erzielt wurde. Daher wurde die Vermutung geäußert, dass H-rev107-2 am wachstumshemmenden Effekt von Retinoiden bei Mamma-Karzinomzellen beteiligt ist (DiSepio et al., 1998).

Durch seine Lokalisation auf dem Chromosomenabschnitt 11q23 ist H-rev107-2 von besonderem Interesse für die Hämatopoese. Dieser Chromosomenabschnitt ist oft bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen von Mutationen betroffen. Daher werden auf 11q23 neben dem gut beschriebenen MLL-Gen weitere Gene vermutet, deren normale Funktion bei der Hämatopoese für Proliferationskontrolle und Differenzierung notwendig ist (Tanaka et al., 2001). Vorläufige Ergebnisse bei hämatopoetischen Zellen zeigten eine schwache Expression von H-rev107-2 in CD34+ hämatopoetischen Stammzellen und eine starke Expression in den terminal differenzierten Zellen der myelo-monozytären und lymphatischen Zellreihen (Martin, 2003).

1.4 Pharmakologische Beeinflussung der Genexpression

1.4.1 Interferon-alpha und Interferon-gamma

Interferone sind körpereigene Zytokine, die eine zentrale Rolle bei der Regulation des Zellwachstums und des Immunsystems spielen. Sie werden in zwei Klassen eingeteilt: Typ-I-Interferone, zu denen das Interferon-alpha (IFN- α) zählt, und das Typ-II-Interferon IFN- γ . IFN- α wird vor allem von Leukozyten, IFN- γ von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen synthetisiert. Die Typ-I- und Typ-II-Interferone unterscheiden sich in der Art ihrer Rezeptoren und der von diesen gebundenen intrazellulären Signaltransduktionsproteinen (Stark et al., 1998).

Ihre biologische Wirkung erzielen Interferone nach Bindung an die zellmembranständigen Interferonrezeptoren der Zielzelle. Dadurch werden an der intrazellulären Rezeptordomäne gebundene Signalproteine aus der Janus-Kinasen (JAK) und der *signal transducer and activator of transcription-* (STAT) Familie aktiviert. Aktivierte STAT-Proteine bilden Dimere, die an spezifische Promotersequenzen der DNS binden und so die Expression so genannter Interferon-stimulierter Gene induzieren. IFN- α und IFN- γ besitzen Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Induktion bestimmter Gene (Stark et al., 1998). So wird IRF-1 von beiden Interferonen induziert, wobei IFN- γ bei malignen hämatopoetischen Zellen der stärkere Induktor ist (Pelicano et al., 1997).

Bisher konnte gezeigt werden, dass H-rev107-1 bei nicht hämatopoetischen Zellen durch IFN- γ induziert werden kann (Kuchinke et al., 1995) und an dessen antiproliferativer Wirkung beteiligt ist. Der Transkriptionsfaktor IRF-1 scheint bei der H-rev107-1-Induktion durch IFN- γ eine wichtige Rolle zu spielen (Sers et al., 1997). IFN- γ ist ein starker Inhibitor der Hämatopoese. *In vitro* hemmt es die Koloniebildung

von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Selleri et al., 1996). Die Wirkung von Interferonen auf die H-rev107-2-Expression wurde bisher nicht untersucht.

IFN- α hat sich klinisch zur Behandlung bestimmter maligner hämatologischer Erkrankungen wie der Haarzellenleukämie und der chronischen myeloischen Leukämie (CML) etabliert. Bei Patienten mit CML kann IFN- α zu einem geringen Prozentsatz zytogenetische und molekularbiologische Komplettremissionen induzieren (Bonifazi et al., 2001). Es erschien daher sinnvoll, den Effekt sowohl von IFN- γ als auch IFN- α auf die H-rev107-1 und H-rev107-2-Expression bei malignen hämatopoetischen Zellen zu untersuchen.

Da die antiproliferativen und differenzierenden Eigenschaften der Interferone auf Leukämiezellen *in vitro* durch Retinsäure synergistisch verstärkt werden (Pelicano et al., 1997), wurde in dieser Arbeit auch die Wirkung der Retinsäure allein und in Kombination mit Interferonen auf die H-rev107-1/-2-Expression untersucht.

1.4.2 **All-trans Retinsäure**

Die all-*trans* Retinsäure (ATRA) ist der durch Oxidation des Retinols (Vitamin A) gewonnene Prototyp der Retinoide. Die Retinoide übernehmen verschiedene regulierende Funktionen beim Zellwachstum und bei der Zelldifferenzierung ein (Hansen et al., 2000). Bei der Regulation der Myelopoese spielt die Retinsäure eine entscheidende Rolle (Labrecque et al., 1999) (Du et al., 1999).

ATRA wirkt als ein Transkriptionsfaktor, indem es im Zellkern an einen spezifischen Rezeptor, dem Heterodimer aus RAR α und dem Retinsäurerezeptor X, bindet und diesen dadurch aktiviert. Dieser Komplex bindet an bestimmte DNS-Sequenzen in Promoterregionen, so genannten *retinoic acid response elements* (RARE), und fördert die Expression Retinsäure-induzierter Gene (Hansen et al.). Sowohl in den Promoterregionen von H-rev107-2 (DiSepio et al., 1998) als auch von IRF-1 (Pelicano

et al., 1997) wurden RARE gefunden und es ist bekannt, dass ATRA in AML-Zellen IRF-1 induzieren kann (Matikainen et al., 1996). Der Effekt von ATRA auf die Expression der H-rev107-Gene wurde noch nicht untersucht. Sowohl in benignen als auch malignen epithelialen Zellen konnte aber durch das Retinoid Tazarotene eine mit Proliferationshemmung korrelierende Induktion von H-rev107-2 gezeigt werden (DiSepio et al., 1998). Klinisch hat sich ATRA ausschließlich zur Therapie der APL mit der Translokation t(15/17) etabliert. Bei diesen APL-Zellen können erst pharmakologische Konzentrationen von ATRA durch eine Veränderung der Genexpression zu einer Differenzierung der malignen Promyelozyten zu nicht mehr proliferierenden Granulozyten beitragen (Lin et al., 1998) (Grignani et al., 1998) (Liu et al., 2000) (Altucci et al., 2001).

1.4.3 Spezifische Inhibition der Signaltransduktion

Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Genexpression ist die spezifische Inhibition von Signaltransduktionswegen. So kann eine mögliche Beteiligung des jeweiligen Signalwegs bei der Regulation der Expression eines Gens untersucht werden (Hunter, 2000). Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit die Wirkstoffe PD098059 und AG490 eingesetzt.

PD098059 ist ein synthetischer Inhibitor der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-/ Extrazellulär-regulierten-Kinase-Kinase (MEK, auch MAPKK genannt) (Alessi et al., 1995). MEK ist Bestandteil des Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Wegs (MAPK-Weg) (siehe Abbildung 1.2). Dieser Signalweg übermittelt die Information diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren über membranständige Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder Zytokinrezeptoren zum Nukleus. Zu diesen für die Hämatopoese bedeutsamen Zytokinen zählen G-CSF, GM-CSF, IL-3 und EPO (Bittorf et al., 1994) (Rausch und Marshall, 1999). Dabei spielen die Rezeptortyrosinkinase-assoziierten membranständigen G-Proteine der RAS-Familie sowie die Zytokinrezeptor-gebunden Janus-Kinasen (JAK) eine wichtige Rolle. Die RAS-Proteine werden nach Bindung der Zytokine oder Wachstumsfaktoren an RTK aktiviert und binden RAF-1, wodurch dieses

Protein an die Membran transloziert wird. Dadurch wird RAF-1 aktiviert und phosphoryliert die MEK-Kinasen. Die wesentlichen Substrate dieser Enzyme sind die Extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK). Diese wiederum können im phosphorylierten Zustand Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-MYC oder c-JUN aktivieren oder den Tumorsuppressor p53 inaktivieren (Maschmeyer, 1997) (Hunter, 2000). AG490 beeinflusst als Inhibitor des Enzyms Januskinase 2 (JAK2) die Signaltransduktion verschiedener Zytokine (Meydan et al., 1996). Die Januskinasen, zu denen neben JAK2 auch JAK1 und die Tyrosinkinase 1 (TYK1) gehören, können im phosphorylierten Zustand sowohl den MAPK-Weg als auch den JAK/STAT-Signalweg aktivieren. JAK2 ist mit der zytoplasmatischen Domäne von Zytokinrezeptoren, z.B. des IFN- γ -, IL-3- und GM-CSF-Rezeptors, assoziiert (Lee und McCubrey, 2002). Die Expression von JAK2 ist für die Signaltransduktion von IFN- γ bei hämatopoetischen Zellen sowie für die proliferative Wirkung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen notwendig (Platanias und Fish, 1999).

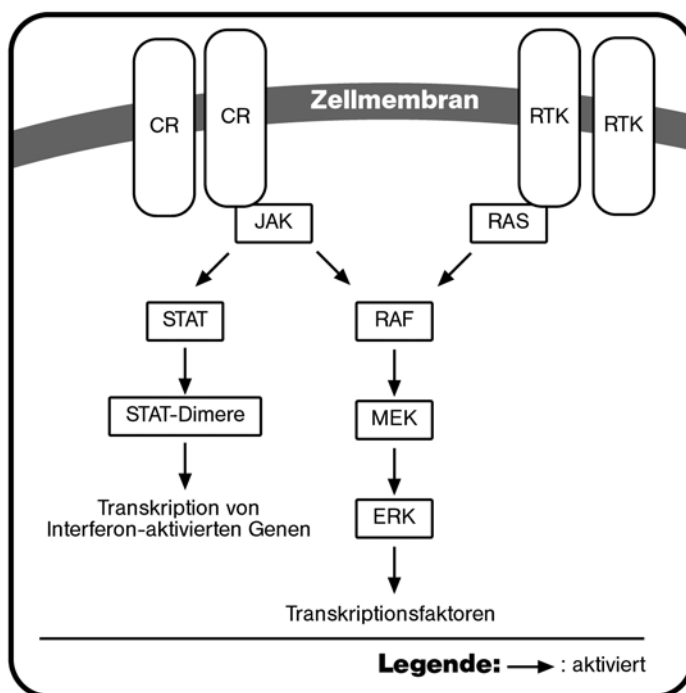


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über Zytokinrezeptoren (CR) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Modifiziert nach Maschmeyer, 1997, Lee, 2002, Stark, 1998.

2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expression und Regulation der beiden Tumorsuppressorgene H-rev107-1 und H-rev107-2 in Zellen akuter Leukämien. Dabei sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Kann die Expression von H-rev107-1 und H-rev107-2 in Leukämiezellen von Patienten mit akuten Leukämien sowie in verschiedenen etablierten Zelllinien hochmaligner hämatopoetischer Erkrankungen mittels der Methode der Reversen Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen werden?
- Kann eine Regulation der H-rev107-1- und H-rev107-2-Expression durch Inkubation mit Interferon- α , - γ (IFN- α / - γ) sowie mit all-trans Retinsäure (ATRA) in den Leukämiezellen von Patienten mit akuten Leukämien und in geeigneten Zelllinien hochmaligner hämatopoetischer Erkrankungen beobachtet werden? Aufgrund des bekannten Synergismus von Interferonen und ATRA, wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Kombinationen IFN- α / ATRA und IFN- γ / ATRA eingesetzt. Als Nachweismethode sollte hierbei ebenfalls die RT-PCR dienen.
- Können die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen der Zelllinien durch eine Wiederholung der Inkubationsexperimente mit anschließender Northern-Blot-Hybridisierung bestätigt werden? Mit Hilfe dieses Verfahrens sollte durch eine Induktionskinetik von H-rev107-2 auch die Frage beantwortet werden, nach welcher Inkubationszeit frühestens eine Induktion von H-rev107-2 erfolgt.
- Geht die Regulation der H-rev107-2-Expression mit einer Proliferationshemmung bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen einher?
- Ist eine direkte Beeinflussung der H-rev107-2-Expression nach Inhibition des MAPK- oder des JAK/STAT-Signalwegs durch die Wirkstoffe PD098059 und AG490 möglich? Können die beiden Signaltransduktionsinhibitoren die Wirkung von IFN- γ oder ATRA auf die H-rev107-2-Expression beeinflussen? Dies sollte zu einer besseren Einordnung von H-rev107-2 in die Signalkaskade beitragen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikaliennachweis

Alexis, Grünberg: AG490, PD098059

Amersham Pharmacia Biotech, UK: Nick-Translation Kit

Aronex Pharmaceuticals Inc, The Woodlands, USA: liposomales ATRA (Atragen®)

Baker, Deventer, Niederlande: Chloroform, Formaldehyd

BioTechZ, Berlin: Primer für H-rev107-1/-2 und G3PDH3

Biochrom, Berlin: Ficoll 400, FCS, RPMI 1640, Gentamycin

Boehringer Ingelheim, Biberach: IFN- γ (Imukin®)

Clontech, Palo Alto, USA: Hybridisierungs-Lösung (ExpressHyp®)

Fluka Chemie, Buchs, Schweiz: TrisHCl pH 7,5

Gibco BRL, Eggenstein: Agarose, DNS-Leiter, Trizol (TRIzol®)

Haemonetica, Massachusetts, USA: ACD-A

Merck, Darmstadt: Borsäure, DMSO, Ethanol, Formamid, HCl, Isopropanol, Na-Azetat, NaCl, NaOH, Trisbase, TÜRKS Lösung

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach: MACS MicroBeads CD34, MACS Blocking Reagent

New England Nuclear, Wien, Österreich: $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP

PAA Laboratories, Linz, Österreich: PBS

Qiagen, Hilden: DNS-Gelextraktionskit, mRNS-Isolationskit (Oligotex®)

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim: IFN- α (Roferon-A3®), RT-PCR-Kit (Titan® One Tube RT-PCR)

Serva, Heidelberg: Bromphenol-Blau, Ethidiumbromid, MOPS, SDS, Na-Zitrat

Sigma, Taufkirchen: DEPC, EDTA, Glycerol, Kaliumazetat, Mineralöl, pH-Standardlösung, Trypanblau, 0,4 %

Sigma, St. Louis, USA: BSA

3.1.1 Puffer und Medien

Ladepuffer, RNS-Elektrophorese: 0,35 ml DEPC-H₂O, 0,21 ml 10 x MOPS-Puffer, 0,35 ml Formaldehyd, 0,96 ml Formamid, 0,13 ml 80 % Glycerol, 2 µl Ethidiumbromid, ein Krümel Bromphenolblau; in Aliquots bei -80 °C gelagert

Ladepuffer, DNS-Elektrophorese: 0,25 % Bromphenol-Blau und 15 % Ficoll 400 *ad* aqua bidest.

Bindungspuffer, mRNS-Isolation: 20 mM TrisCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,2 % SDS *ad* aqua bidest.

5x TBE-Puffer, pH 8,2- 8,4: 54 g Trisbase, 27,5 g Borsäure, 4,65 g EDTA *ad* 1 l aqua bidest.

10x MOPS-Puffer, pH 7,0: 10,45 g MOPS, 2,05 g Na-Azetat, 1,85 g EDTA *ad* 500 ml aqua bidest., mit NaOH auf pH 7,0 titriert

20x Standard-Salz-/Zitrat-Puffer (SSC): 175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Zitrat *ad* 1 l aqua bidest., pH 7,2

Magnetseparations-Puffer (MSP): 0,5 % BSA, 0,6 % ACD-A *ad* PBS; entgast

Einfriermedium 1: 40 % FCS und 60 µg Gentamycin/ ml *ad* RPMI1640

Einfriermedium 2: 20 % DMSO und 60 µg Gentamycin/ ml *ad* RPMI1640

Zellkulturmedium: 10 %FCS und 60 µg Gentamycin/ ml *ad* RPMI1640

Waschlösung N1 (Northern-Blot): 0,1 % SDS *ad* 2x SSC

Waschlösung N2 (Northern-Blot): 0,1 % SDS *ad* 0,1x SSC

3.1.2 Ansetzen und Lagern der Wirkstoffe

Die Interferone wurden nach Herstellerangaben bei +4 °C gelagert. Das liposomale ATRA (Atragen®), das freundlicher Weise von der Firma Aronex Pharmaceuticals Inc, The Woodlands, USA, zur Verfügung gestellt worden war, wurde als Pulver bei +4 °C gelagert. Eine 1 mmol Stocklösung von ATRA wurde gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt, indem 16 mg Atragen in 5 ml RPMI durch 1minütiges Schütteln in Lösung gebracht wurde. ATRA wurde immer streng vor Lichteinstrahlung geschützt und die Stocklösung spätestens 24 h nach dem Ansetzen verworfen. Die Signaltransduktionsinhibitoren PD098059 und AG490 wurden in DMSO gelöst in Aliquots bei -20 °C gelagert. DMSO wurde in Vorversuchen auf eine eventuelle Wirkung auf die H-rev107-2-Expression untersucht. Es wurde keine Wirkung festgestellt (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.2 Zellmaterial

3.2.1 Zelllinien

Sechs der sieben Zelllinien (siehe

Tabelle 3.1) stammten aus der Sammlung der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie, Charite, Berlin-Mitte, von Dr. B. Flath. Die Zelllinie NB-4 wurde von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, bezogen.

Tabelle 3.1: Charakterisierung der in dieser Arbeit genutzten Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung
CEM	Diese Zelllinie stammt aus dem peripheren Blut eines 4 Jahre alten Mädchens mit akuter lymphoblastischer T-Zell-Leukämie (Foley, 1965).
Jurkat	Sie wurde aus dem peripheren Blut eines 14jährigen Jungen mit ALL isoliert (Schneider, 1977). Es handelt sich um lymphoblastische T-Zellen.
HL-60	Dies ist eine Zelllinie, deren Zellen einer akuten myeloblastischen Leukämie (AML-M2) entsprechen. Sie stammt aus dem peripheren Blut einer 35jährigen Frau mit AML (Collins et al., 1978).
NB-4	Die erste etablierte Zelllinie, welche die Translokation t(15;17) mit dem PML-RAR α -Fusionsprotein trägt. Sie stammt aus dem Knochenmark einer 23 Jahre alten Frau mit rezidivierter, ATRA-vorbehandelter akuter Promyelozytenleukämie (Lanotte et al., 1991).
U937	Eine monoblastische Zelllinie aus dem Pleuraerguss eines 37jährigen Manns mit histiozytärem Lymphom (Sundstrom und Nilsson, 1976). Sie wird in der Literatur als Modell einer akuten monoblastischen Leukämie genutzt (Dimberg et al., 2000) .
K562	Sie wurde aus dem Pleuraerguss einer 53jährigen Frau im Blastenschub bei CML gewonnen. Diese Zelllinie ist Philadelphia-Chromosom positiv (Lozzio und Lozzio, 1977).
Raji	Die Raji-Linie aus lymphoblastischen B-Zellen wurde 1963 aus einem Burkitt Lymphom des Unterkiefers eines 11jährigen Jungen isoliert (Pulvertaft, 1964). Raji-Zellen sind Epstein-Bar-Virus negativ.

3.2.2 Primäre Leukämiezellen

Die Proben aus mononukleären Zellen (MNZ) des Knochenmarks oder des peripheren Bluts stammten von Patienten mit Erstdiagnose AML bzw. ALL vor Therapiebeginn. Neben eigenen Proben wurden die meisten Proben von Herr Dr. L. Karawajew, Universitätsklinikum Charite, Campus Berlin-Buch, zur Untersuchung überlassen. Sämtliche Patientenproben waren immunphänotypisiert, enthielten $5-6 \times 10^7$ Zellen und einen Blastenanteil von 90- 100 %. Die Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten Merkmale der Patientenproben. Bei 10 Proben wurden die MNZ einer Separation der CD34+ Zellen unterzogen. Nur diese Zellen wurden dann untersucht. Ziel dieser Separation war es, einer Beeinflussung der Ergebnisse durch eventuell vorhandene Lymphozyten oder Monozyten vorzubeugen. Diese Zellpopulationen exprimierten die untersuchten Gene deutlich (Martin, 2003). Die Proben 12 und 14 enthielten einen Blastenanteil von 100 % und einen CD34+-Anteil von über 96 %. Hier wurden alle MNZ für die Untersuchung eingesetzt. Bei den Proben 8- 10 handelte es sich um CD34- AML-Zellen. Diese Proben wurden unsepariert untersucht, so dass hier eine eventuelle Beeinflussung der Ergebnisse durch Lymphozyten oder Monozyten möglich war.

Tabelle 3.2 Darstellung der für diese Arbeit relevanten Eigenschaften der untersuchten Patientenproben

Patient	Alter/Geschlecht	Krankheitsentität	Material	Blastenanteil	CD34	Separation:ja/nein
1	45 J./ m	AML	pB	> 90 %	?	ja
2	45 J./ w	AML-M4	KM	90 %	31 %	ja
3	48 J./ m	AML-M2	pB	90 %	86 %	ja
4	64 J./ m	AML-M1	pB	100 %	94 %	ja
5	64 J./ m	AML-M5	KM	90 %	31 %	ja
6	64 J./ w	AML-M4Eo	KM	> 90 %	17 %	ja
7	70 J./ w	AML-M2	KM	> 90 %	88 %	ja
8	69 J./ m	AML-M3	pB	95 %	1 %	nein
9	69 J./ m	AML-M5	KM	> 90 %	0 %	nein
10	67 J./ w	AML-M4	KM	> 90 %	0 %	nein
11	28 J./ m	c-ALL	pB	> 90 %	94%	ja
12	46 J./ w	c-ALL	KM	100 %	96%	nein
13	70 J./ m	c-ALL	KM	> 90 %	76%	ja
14	23 J./ w	c-ALL	KM	100 %	98%	nein
15	34 J./ w	c-ALL	pB	> 90 %	85%	ja

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellkulturen wurden in Brutschränken (Sanyo Electric, Japan) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Das Kulturmedium bestand aus 90 % RPMI/ 10 % FCS mit 60 µg/ ml Gentamycin. Zur Inaktivierung der Komplementfaktoren wurde das FCS vor Gebrauch für 30 min bei 56 °C inkubiert. Die Kulturen der Zelllinien wurden alle 2- 3 Tage im Volumenverhältnis von 1:2- 1:5 geteilt, d.h. ein Teil der Kultur wurde in der Kulturflasche belassen und mit 2 bis 5 Teilen frischem, auf 37 °C erwärmten Medium aufgefüllt. Vor und nach dieser Passage wurde die Zellkonzentration durch Zählung in der Neubauerzählkammer (Neubauer, Bad Blankenburg) bestimmt. Die Zellkonzentrationen lagen immer zwischen 0,5 und 2 x 10⁶ Zellen/ ml. Die Vitalität der Kulturen wurde durch lichtmikroskopische Begutachtung (Leitz Laborlux S, Leitz, Wetzlar) in der Kulturflasche und mittels Trypanblau-Färbung kontrolliert (siehe 3.3.5.). In regelmäßigen Abständen wurden Aliquots eingefroren. Dazu wurde die Zellsuspension mit ca. 5x 10⁶ Zellen 6 min bei 1000 U/ min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau), der Überstand dekantiert. Der Zelniederschlag wurde in 2 ml Einfriermedium (70 % RPMI/ 20 % FCS/ 10 % DMSO) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) überführt. Das Einfrieren erfolgte zuerst für 24 h in einer ca. 20 x 40 cm großen Styroporschachtel bei -80 °C und dann in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurde die Zellen für ca. 30 sec in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben, gefolgt von zweimaligem Waschen in 20 % FCS/ 80 % RPMI.

3.3.2 Inkubationsversuche der Zelllinien

Ziel dieser Experimente war, durch Inkubation der Zelllinien mit diversen Wirkstoffen die Expression der beiden H-rev107-Gene zu beeinflussen. Die Zellen eines Experiments entstammten aus derselben exponentiell wachsenden Stammkultur. Auf 1 ml Versuchskultur kam jeweils 1 μ l der Stocklösung des jeweiligen Wirkstoffs. Die Wirkstoffe wurden bei allen Versuchen in den angegebenen Endkonzentrationen eingesetzt.

Tabelle 3.3 Die eingesetzten Wirkstoffe und Konzentrationen

Wirkstoff	Konzentration
IFN- α	1000 U/ ml
IFN- γ	400 U/ ml
ATRA	1 μ M
PD098059	50 μ M
AG490	25 μ M

Die Kulturen wurden nach Zugabe der Wirkstoffe unverzüglich in den Brutschrank gestellt und diesem nur zur Weiterverarbeitung entnommen. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, 5 min mit 1000 U/ min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach einmaligem Waschen mit 10 ml auf 37 °C erwärmtem PBS, erneutem Zentrifugieren und Dekantieren, stand der Zelleniederschlag für die RNS-Isolation zur Verfügung.

3.3.2.1 Inkubation mit IFN- α / γ und ATRA

Es wurden Versuchskulturen mit einer Zelldichte von jeweils 5×10^5 Zellen/ ml Medium (bei den 24 h Inkubationen), bzw. 1×10^5 Zellen/ ml (bei den 72 h Inkubationen) angesetzt. Diese Versuchskulturen mit einem Volumen von 5 ml/ Ansatz wurden in 6-Loch-Platten verteilt. Den Ansätzen wurden dann die Wirkstoffe zugefügt, wobei immer ein Ansatz ohne Wirkstoffzugabe als Kontrolle diente. Zunächst wurden alle Zelllinien mit beiden Interferonen und ATRA sowie den Kombinationen IFN- α / ATRA und IFN- γ / ATRA inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen 24 h und 72 h. Mit der anschließend gewonnenen RNS wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Experiments dienen als Grundlage für die erneute 72 h Inkubation der AML-Zelllinien mit IFN- γ und ATRA. Mit der aus diesem Experiment gewonnenen RNS wurden Northern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt.

3.3.2.2 Induktionskinetik von H-rev107-2

Mit der Zelllinie NB-4 wurden drei Experimente zur Untersuchung der Induktionskinetik von H-rev107-2 durchgeführt. Dazu wurden die vier folgenden Kulturansätze mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ ml Medium hergestellt: Kontrolle ohne Wirkstoffzugabe, IFN- γ , ATRA, IFN- γ / ATRA. Diese Versuchskulturen mit einem Volumen von 5 ml/ Ansatz wurden in 6-Loch-Platten verteilt. Beim ersten Experiment wurden die Zellen nach 0,5 h, 1 h, 2 h und 6 h geerntet, bei den folgenden zwei Experimenten nach 1 h, 2 h, 4 h und 6 h. Mit der gewonnenen RNS wurden dann Northern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt.

3.3.2.3 Inhibition der Signaltransduktion

Um die Frage beantworten zu können, ob die Expression von H-rev107-2 durch Blockade von ERK2 durch PD098059 oder JAK2 durch AG490 beeinflusst werden kann, wurden die AML-Zelllinien für 24 h mit den Blockern allein inkubiert. Zusätzlich wurden die Inhibitoren mit den Substanzen IFN- γ und ATRA kombiniert, um eine eventuelle Beeinflussung der IFN- γ -/ ATRA-Wirkung zu zeigen. Dazu wurden Versuchskulturen mit einer Zelldichte von jeweils 5×10^5 Zellen/ ml Medium angesetzt. Diese Versuchskulturen mit einem Volumen von 5 ml/ Ansatz wurden in 6-Loch-Platten verteilt. Den Ansätzen wurden dann die Wirkstoffe zugefügt, wobei immer ein Ansatz ohne Wirkstoffzugabe als Kontrolle diente.

3.3.3 Herstellung der Versuchskulturen der Patientenproben

Die Patientenproben waren in flüssigem Stickstoff gelagert (Einfriermedium: 70% RPMI, 20% FCS, 10% DMSO) und wurden nach dem Protokoll der Zelllinien aufgetaut. Der erste Waschgang wurde mit Magnetseparationspuffer als Medium vollzogen. Ein Verklumpen der Zellen konnte so weitgehend verhindert werden. Zusätzlich wurde die Zellsuspension vor dem ersten Waschgang für 10 sec mit 1000 U/ min durch einen Zellfilter (35 μ m Cell Strainer, Falcon) zentrifugiert. Der zweite Waschgang wurde dann in 20 % FCS/ 80 % RPMI durchgeführt. Anschließend wurden die fünf Patientenproben, die nicht CD34+ separiert wurden, in 10 ml 10 % FCS/ 90 % RPMI resuspendiert, einer Vitalitätstestung mittels Trypanblau (siehe 3.3.5) unterzogen und gezählt. Je nach Zelldichte wurde nun so viel Medium hinzugefügt, dass die Zelldichte 2×10^6 Zellen/ ml nicht überschritt. Die Zellsuspension wurde nach erneutem Durchmischen gleichmäßig auf vier Kulturschalen einer 6 bzw. 12-Loch-Platte verteilt und über Nacht ohne Wirkstoffe im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden drei der vier Kulturansätze Wirkstoffe zugegeben und die Ansätze gut durchmischt: Kontrolle ohne Wirkstoffzugabe, IFN- γ , ATRA, IFN- γ / ATRA. Die Inkubationszeit mit

Wirkstoffen betrug 24 h. Das Vorgehen bei den 10 Patientenproben, die CD34+-separiert wurden, ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.3.3.1 Separation von CD34+ Zellen

Die Separation wurde mit Hilfe von MiniMACS-Separationssäulen (Separation Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und MACS MicroBeats (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Es handelte sich um eine positive Separation. Hierbei wurden Magnet-gekoppelte anti-CD34-Antikörper zur Bindung an CD34+-Zellen den Patientenproben zugegeben. Dann wurde diese Suspension auf die magnetischen Säulen gegeben und so CD34+ und CD34negative Zellen getrennt.

Die aufgetauten, gewaschenen Zellen wurden zunächst in 300 µl Magnetseparationspuffer (MSP) resuspendiert, mit 100 µl Blocking Reagent (humanes IgG zum Absättigen der Fc-Rezeptoren) und 100 µl anti-CD34 Antikörper versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen mit 9 ml MSP und Filtration durch einen Nylonfilter (Bottle Top Filter 0.22 µm, Falcon) zur Entfernung eventuellen Zelldetritus, wurden die Zellen auf die MiniMACS-Separationssäule gegeben. Zuvor wurde diese in einen Magneten (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gespannt und mit 500 µl MSP befeuchtet. Nach Durchlauf der Zellsuspension wurden 3x 500 µl MSP zum Waschen der Säule zugegeben. Die Säule wurde nun vom Magneten entfernt. Die anti-CD34-Antikörper gebundenen Zellen wurden mit 1 ml MSP aus der Säule gespült und mit einem Gefäß aufgefangen. Der MSP wurde nun abzentrifugiert und die CD34+ Zellen in 10 ml RPMI/ 10% FCS suspendiert, gründlich gemischt und auf vier Kulturschalen einer 12-Loch-Platte verteilt. Nach der Separation wurden die Zellen gezählt und die Vitalität durch Trypanblau-Färbung (siehe 3.3.5) getestet. Die separierten Zellen wurden nun genau wie die unseparierten Zellen weiterbehandelt (siehe 3.3.3). Um die Qualität der Separation sicherzustellen wurden bei Einführung der Methode Analysen mit einem *fluorescence activated cell sorter* (FACS) durchgeführt. Diese zeigten eine deutliche Anreicherung (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.3.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Suspensionskulturen mit einer 5ml-Pasteurpipette durch mehrmaliges Aufziehen verteilt. Ca. 0,5 ml wurden entnommen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach erneutem Durchmischen wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und alle 4 Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ ml} = (\text{gezählte Zellen/ 4}) \times 10^4$$

3.3.5 Trypanblau-Vitalitätstest

Zur Vitalitätstestung wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellen im Lichtmikroskop begutachtet. Tote Zelle färben sich blau an, vitale Zellen nicht. Die Vitalität der Zellen wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Vitalität (in \%)} = \text{Zahl der nicht angefärbten Zellen/ Gesamtzellen}$$

Bei den Zelllinien betrug der Anteil vitaler Zellen annähernd 100 %. Die primären Leukämiezellen hatten eine Vitalität von 70- 90 %. Die Zellen einer Probe hatten eine sehr niedrige Vitalität und wurden verworfen.

3.3.6 Wachstumskinetik

Um das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Zelllinien beschreiben zu können, wurden Wachstumskinetiken erstellt, die den Einfluss der Zusätze IFN- α , IFN- γ und ATRA sowie der Kombination von IFN- γ mit ATRA auf die Proliferation klären sollten. Dazu wurde die Zellkonzentration der Stammkultur bestimmt und so viel Volumen entnommen, dass in der Versuchskultur eine Konzentration von 5×10^4

Zellen/ml Medium vorhanden war. Nach Zugabe der Wirkstoffe wurde diese Versuchskultur auf eine 6-Loch-Platte verteilt. Zur Kontrolle wurde die Zellkonzentration vor und nach dem Verteilen bestimmt. Die Zellzahlen wurden zu den Zeitpunkten t_{0d} , t_{2d} , t_{4d} und t_{6d} bestimmt, entsprechend 0., 2., 4. und 6. Tag. Jeder Ansatz wurde 3fach durchgeführt und alle Ansätze 3fach gezählt. Aus diesen neun Werten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolation der gesamten zellulären RNS

Zur Gewinnung der gesamten zellulären RNS wurde die Chloroform-Phenol-Guanidinisoithiozyanat-Methode gewählt, wobei ein kommerziell hergestellter Extraktionspuffer verwendet wurde (TRIzol®, Life Technologies).

Die im folgenden angegebenen Mengen beziehen sich auf maximal 10^7 Zellen. Bestand der Zentrifugationsniederschlag aus mehr Zellen, wurden die Mengen proportional angepasst. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min 6 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und 1 ml TRIzol zum Zentrifugationsniederschlag gegeben, gut durchgemischt und in ein 2ml-Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) überführt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 5 min, wurden 0,2 ml Chloroform hinzu gegeben, das Röhrchen verschlossen und für ca. 15 sec geschüttelt. Nach weiteren 3 min Inkubation bei RT, wurde das Lysat bei 11.000 U/min 15 min zentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus Instruments, Hanau). Durch die Zugabe von Chloroform wurde das Lysat in eine organische und eine wässrige Phase getrennt. Die RNS befand sich in der oberen, wässrigen Phase. Von den ca. 0,6 ml Überstand wurden 0,5 ml vorsichtig abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Der Inhalt des Röhrchens wurde gut geschüttelt und für 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 11.000 U/ min) wurde das Isopropanol dekantiert. Die RNS am Boden des Röhrchens wurde nun mit 1 ml 75 % Ethanol versetzt, gut geschüttelt und erneut zentrifugiert (8 min, 9.500 U/ min). Anschließend wurde der Überstand vollständig abgehoben und das Sediment an der

Luft getrocknet. Das weitere Vorgehen hing davon ab, wofür die RNS benötigt wurde: Für die Northern-Blot-Hybridisierung wurde die RNS in 25 µl DEPC-H₂O gelöst, für die polyA-RNS-Separation zur anschließenden RT-PCR in 250 µl RNase-freiem H₂O (Qiagen, Hilden). Die RNS-Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Photometrische Quantifizierung der RNS

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNS für die Northern-Blot-Hybridisierung wurde mit einem UV-Photospektrometer (RNA/ DNA Calculator Gene Quant II, LKB Biochrom, England) durchgeführt. Die Absorption der RNS wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (Absorptionsmaximum der RNS) gemessen. Die Konzentration der RNS konnte dann unter Berücksichtigung der Verdünnung aus der gemessenen optischen Dichte (OD) berechnet werden. Die OD wurde in einer Präzisionsküvette (Suprasil, Hellma) mit der Schichtdicke $d = 1$ cm gemessen. Es gilt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg RNS/ ml}$$

$$c(\text{RNS}) = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = [\text{µg/ ml}]$$

Als Maß für die Verunreinigung mit Proteinen wurde der Quotient aus einer Messung bei 260 nm und 280 nm (Proteinabsorptionsmaximum) gebildet. Diese so genannte Ratio lag immer bei 1,6-1,8.

3.4.3 Qualitätssicherung der RNS

Zum Ausschluss einer Degradation der RNS wurden von jeder RNS-Probe 1 µg mit 3 µl MOPS-Ladepuffer versetzt und 2 min bei 90 °C denaturiert. Dann wurde die Mischung auf Eis gekühlt und in einem Ethidiumbromid-gefärbten RNS-Gel (siehe 3.4.7) aufgetrennt. Die Qualität der RNS war an den charakteristischen Banden der 28 S und 18 S ribosomalen RNS, die unter UV-Licht sichtbar sind, zu beurteilen.

3.4.4 Isolation der mRNS aus gesamt-RNS

Für die RT-PCR-Analysen wurde die mRNS mit Hilfe des Oligotex mRNS Midi Kit (Qiagen, Hilden) aus der gesamt-RNS isoliert. Die gesamt-RNS war in 250 µl RNase-freiem H₂O gelöst, mit 250 µl 2x Bindungspuffer (Binding-Buffer) und 15 µl Oligotex-Suspension versetzt und gut geschüttelt. Diese Suspension wurde für 3 min bei 65 °C, danach für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die polyAdenin-positive mRNS an polyThymidin-beschichtete Kunststoffpartikel (Oligotex Suspension, Qiagen, Hilden) zu binden. Danach wurde der Überstand nach Zentrifugation (13000 U/min, 2 min) verworfen. Der Zentrifugationsniederschlag wurde in 400 µl Waschpuffer (OW2) resuspendiert, auf eine Separationssäule (Small Spin Columns, Qiagen, Hilden) überführt und wiederum zentrifugiert (13000 U/ min, 30 sec). Dieser Waschvorgang zur Entfernung nicht gebundener RNS wurde zweimal durchgeführt. Die an der Separationssäule gebundene mRNS wurde nun mit 50 µl auf 70 °C erhitztem Lösungspuffer (Elution Buffer) abgelöst, und durch Zentrifugation (13000 U/ min, 30 sec) durch die Separationssäulen gefiltert. Die mRNS wurde bei -80 °C gelagert.

3.4.5 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (*reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) wurde mit dem Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche Diagnostics) durchgeführt. Hier erfolgen Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion im Einstufenverfahren. Jede RT-PCR-Reaktion wurde von einer Positiv- und einer Negativkontrolle begleitet: Als Positivkontrolle diente mRNA der Zelllinie CEM oder von Fibroblasten. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle von mRNA RNase-freies H₂O genommen. Die RT-PCR-Analysen der Zelllinien wurden pro Ansatz mit mRNA von ca. 10⁵ Zellen durchgeführt. Bei den Patientenproben war die Menge von der zur Verfügung stehenden Zellzahl abhängig. Maximal wurde mRNA von 10⁶ Zellen verwendet. Die quantitative Vergleichbarkeit innerhalb eines Experiments und die Sicherung der mRNA-Qualität wurden durch eine Ladungskontrolle gewährleistet. Hierzu wurde aus derselben mRNA-Menge wie für die H-rev107-1/-2-Analysen eine RT-PCR mit den für das Transkript des für das Enzym Glukose-3-Phosphat-Dehydrogenase-3 (G3PDH3) kodierenden Gens spezifischen Primern durchgeführt. Mit den so durchgeführten RT-PCR-Analysen sind semiquantitative Aussagen möglich (Ceol et al., 2001) (Del Prete et al., 1998). Die Ergebnisse sind den vier Kategorien „stark positiv“ (+++), „positiv“ (++) , „schwach positiv“ (+) und „negativ“ (-) zugeordnet worden. Es wurden nur die Ergebnisse innerhalb desselben Experiments miteinander verglichen.

Die mRNA, DEPC-H₂O und Primer des zu untersuchenden Gens wurden in ein 0,2 ml-Röhrchen (Multi Ultra Tubes, Merck Eurolab) pipettiert (Ansatz 1). Dieser Ansatz wurde bei 95 °C für 10 min denaturiert, dann sofort auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert.

Tabelle 3.4 Zusammensetzung des Ansatzes 1 für die RT-PCR-Analyse

Komponente	Konzentration	Volumen
Primer, vorwärts (fw)	0,5 μ M	2,5 μ l
Primer rückwärts (rev)	0,5 μ M	2,5 μ l
RNS	variabel	variabel
DEPC-H ₂ O	variabel	variabel
Gesamtvolumen Ansatz 1		31,4 μ l

Währenddessen wurde der Ansatz 2 mit RT-PCR-Puffer, MgCl₂, DTT, dNTP, RNase-Inhibitor und der Enzymmischung vorbereitet, gut gemischt und zum Ansatz 1 zugegeben. Nach erneutem Mischen wurde der PCR-Ansatz mit 50 μ l Mineralöl überschichtet, das Röhrchen in den Thermocycler (UNO-Thermoblock, Biometra biomedizinische Analytik, Göttingen) gestellt und die Reaktion gestartet. Die PCR-Produkte wurden bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.5 Zusammensetzung des Ansatzes 2 für die RT-PCR-Analyse

Komponente	Konzentration	Volumen
dNTPs	500 μ M	2,5 μ l
MgCl ₂	3 mM	3 μ l
DTT	5 mM	2,5 μ l
RNase-Inhibitor	4 U	0,1 μ l
RT-PCR-Puffer	1 x	10 μ l
Enzymmischung		0,5 μ l
Gesamtvolumen Ansatz 2		18,6 μ l

3.4.5.1 Primer

G3PDH:

Fw 5`-GGGGCGATGCTGGCGCTGAGT

Rev 5`-GGGGACACGGAAGGCCATGCC

PCR-Produkt: 451 bp

H-rev107-1:

Fw 5`-CTACGCAGCGAAATCGAGCC

Rev 5`-GTCATCGCTGACAGACAGTC

PCR-Produkt: 566 bp, Position: 359-924

H-rev107-2:

Fw 5-GAGATGGCTTCGCCACACC

Rev 5`-CAGTCTTGTTTCAATTAGATC

PCR-Produkt: 669 bp, Position 27-695

3.4.5.2 Thermocyclerprogramme

Die Thermocyclerprogramme für H-rev107-1/ -2 waren zuvor in unserer Arbeitsgruppe etabliert worden (Martin, 2003).

G3PDH3:

45 °C, 30 min; 94 °C, 2 min; 33 x (94 °C, 40 sec; 70 °C, 30 sec; 68 °C, 90 sec); 68 °C, 10 min

H-rev107-1/ -2:

45 °C, 30 min; 94 °C, 2 min; 33 x (94 °C, 40 sec; 56 °C, 30 sec; 68 °C, 90 sec); 68 °C, 10 min

3.4.6 DNS-Elektrophorese

5 µl des RT-PCR-Produktes wurden mit 2 µl DNS-Ladepuffer versetzt und in die Taschen eines 1 % Agarosegels pipettiert. Das Gel wurde wie folgt hergestellt: 37,5 ml 0,5 x TBE-Puffer und 375 mg Agarose wurden gemischt und dann im Wasserbad aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf 60 °C wurde 1 µl Ethidium-Bromid zugegeben und diese Lösung in einen 8 x 10 cm großen Gelträger (Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) gegossen, Taschenkämme eingehängt und das Gel bei Raumtemperatur fest werden lassen. Der Gelträger samt Gel wurde in das mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresebad (Electrophoresis Power Supply EPS200, Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) gestellt, die Kämme wurden entfernt und die Geltaschen mit dem PCR-Produkt/Ladepuffergemisch beschickt. Die Elektrophorese wurde bei 60 V für 75 min durchgeführt. Zur Kontrolle der Größe des PCR-Produkts wurde bei jeder Elektrophorese eine DNS-Leiter (Gibco BRL, Eggenstein) mit 100 Basenpaaren großen

Intervallen aufgetrennt. Das fertige Gel wurde unter UV-Licht (Transilluminator TI1, Biometra, Göttingen) fotografiert (Polaroid MP 14+, Polaroid, Cambridge, MA, USA).

3.4.7 RNS-Elektrophorese

Das 1 % Agarosegel für die RNS-Elektrophorese zur anschließenden Northern-Blot-Hybridisierung wurde wie folgt hergestellt: 180 ml Aqua bidest. und 2 g Agarose wurden im Wasserbad aufgekocht, auf 65 °C abgekühlt und 20 ml 10 x MOPS-Puffer, 10,75 ml Formaldehyd und 2,5 µl Ethidium-Bromid zugegeben, gut gemischt, in einen 20 x 20 cm großen Gelträger gegossen und die Kämme eingehängt. Nach dem Erkalten wurden die Taschen mit 10 µg RNS beschickt. Die RNS wurde zuvor im Volumenverhältnis von 1: 2 mit MOPS-Ladepuffer versetzt, 2 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in dem mit 1 x MOPS-Puffer gefüllten Elektrophoresebad für ca. 90 min bei 120 V. Das RNS-Elektrophoresegel für die Qualitätssicherung der gesamt-RNS wurde nach dem gleichen Rezept mit angepasstem Volumen in 8 x 10 cm großen Gelträgern hergestellt.

3.4.8 Northern-Blot-Hybridisierung

3.4.8.1 RNS-Transfer

Nach der RNS-Elektrophorese wurde das Gel 2 x 20 min in 5x SSC-Puffer gewaschen. In der Zwischenzeit wurden die Nylonmembran (Hybond®, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 5x Wortmanninpapier zurechtgeschnitten und der Blot aufgebaut: Eine vorher mit RNase Zap™ (Ambion, Austin, Texas, USA) gereinigte Wanne wurde mit 20x SSC-Puffer gefüllt, eine Plexiglasplatte wurde über die Wanne und ein Blatt Wortmanninpapier wiederum so auf die Plexiglasplatte gelegt, dass die Enden des Papiers in den SSC-Puffer reichten. Das Papier wurde mit dem Puffer benetzt, das gewaschene Gel mit der Unterseite nach oben aufgelegt. Die Nylonmembran wurde exakt auf das Gel und darauf 5x Wortmanninpapier gelegt. Die Seiten neben dem Gel wurden mit Plastikfolie abgedeckt, danach wurden ca. 10 cm

Saugpapier oben aufgelegt und mit einer Platte beschwert. Die RNS wurde so über Nacht aus dem Gel durch kapillare Saugwirkung auf die Membran transferiert. Unter UV-Licht wurden die Banden der ribosomalen RNS und die Geltaschen auf dem Blot markiert und ebenfalls die rechte obere Ecke abgeschnitten. Die RNS wurde für 3 min im UV-Cross-Linker (Hofer, San Francisco, USA) unter UV-Licht bei 120.000 J/ m² fixiert, in Folie geschweißt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

3.4.8.2 Radioaktive Markierung der cDNS-Sonde (Nick-Translation)

Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten cDNS-Sonde wurden die zu untersuchenden Transkripte sichtbar gemacht. Dazu wurde in die zum gesuchten Transkript komplementäre cDNS enzymatisch $\alpha^{32}\text{P}$ -markiertes Desoxy-Cytidintriphosphat (dCTP) eingebaut. Die DNS-Sonde für H-rev107-2 wurde aus Gelgereinigtem RT-PCR-Produkt hergestellt (DNS-Gelextaktionskit, Qiagen). Die RT-PCR wurde mit den oben genannten Primern und RNS der Zelllinie CEM durchgeführt. Die Konzentration der Sonden-cDNS wurde durch Gelelektrophorese mit einer quantitativen DNS-Leiter (Qiagen) bestimmt. Die Sonde für die Ladungskontrolle (28S RNS) wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. C. Sers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Charite, Berlin-Mitte, zur Verfügung gestellt. Aufgrund der erforderlichen Sicherheitsstandards wurden sämtliche Arbeitsschritte mit radioaktiven Isotopen ausschließlich im Isotopenlabor, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Charite, Berlin- Mitte, durchgeführt.

Zur radioaktiven Markierung der cDNS-Sonde wurde mit dem Nick-Translation Kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) folgende Sondenlösung hergestellt: 100 ng cDNS wurden mit 10 μl Enzym, 20 μl Puffer, 10 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (blau gefärbt) und 56 μl H₂O gemischt und 2 h bei 15 °C inkubiert. Zum Entfernen unspezifischer Radioaktivität wurden MicroSpin-Säulen (MicroSpin™ G-50 Columns, Amersham Pharmacia Biotech, UK) genutzt. Zuerst wurde der Säulinhalt gut gemischt und an der Sollbruchstelle der Verschluss abgebrochen. Dann wurde die Säule in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen gestellt und mit 3000 U/min die Flüssigkeit abzentrifugiert.

Daraufhin wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gestellt und die Sondenlösung genau auf die Mitte des Filters gegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 U/min für 2 min war die gereinigte Sonde farblos. Der blaue Farbstoff, als Indikator dafür, dass die Flüssigkeit durch den Filter gelaufen war, befand sich in der Säule. 1 µl Sonde wurde zu Aktivitätsmessung abgenommen, der Rest für 10 min bei 99 °C denaturiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Die spezifische Aktivität der Sonde wurde in einem Szintillationszähler (Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter, Wallac, Freiburg) in cpm (Counts per minute) gemessen. Zur Hybridisierung wurde bei H-rev107-2 $1-5 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung angestrebt, bei der 28S RNS unter 10^6 cpm/ml.

3.4.8.3 Prähybridisieren und Hybridisieren der Membran

Die Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech, Palo Alto, USA) wurde vor dem Gebrauch auf ca. 60 °C erhitzt und gerührt. Die Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre platziert, so dass die RNS-haltige Membranseite nach innen gewandt war. Je nach Größe der Membran und der gewählten Röhre wurden 10- 15 ml Hybridisierungslösung hinzu gegeben. In der Zwischenzeit wurde in DEPC-H₂O gelöste tRNS bei 65 °C 10 min denaturiert und zur Hybridisierungslösung gegeben, so dass eine Endkonzentration von 100 µg tRNS/ ml Hybridisierungslösung erreicht wurde. Die tRNS diente zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. Zum Prähybridisieren wurde die Röhre für 1 h bei 60 °C im Hybridisierungsofen unter ständigem Drehen inkubiert. Danach wurde die denaturierte Sonde in der gewünschten Menge zugesetzt und das Hybridisieren erfolgte für ca. 12 h bei 64 °C für H-rev107-2 und bei 60 °C für die 28S RNS.

3.4.8.4 Waschen der Membran

Es wurden zwei verschiedene Waschlösungen angesetzt: Lösung N1 bestand aus 2 x SSC/ 0,1 % SDS, Lösung N2 aus 0,1 x SSC/ 0,1 % SDS. Nach dem Hybridisierungsvorgang wurde die Hybridisierungslösung zuerst aus den Röhren

gegossen und Reste durch Schütteln mit N1 entfernt. Es folgten zwei Waschgänge bei Raumtemperatur über jeweils 30 min mit ca. 10 ml N1 unter ständigem Drehen im Hybridisierungssofen. Nach jedem Waschgang wurde die Aktivität des Blots gemessen und je nach Aktivität wurden 1-3 Waschgänge mit N2 bei 50 °C vollzogen. Die Aktivität der Blots betrug am Ende je nach Größe und Sonde 25-70 cpm. Die Blots wurden in Folie eingeschweißt und bei Raumtemperatur gelagert.

3.4.8.5 Belichten und Entwickeln des Films

Die Blots wurden in eine Filmkassette (Hypercassette™, Amersham International, Amersham, UK) geklebt, in der Dunkelkammer ein radiosensitiver Film (Hyperfilm™ MP, High performance autoradiography film, Amersham Pharmacia Biotech, UK) aufgelegt, bei dem zur Orientierung die rechte untere Ecke abgeknickt wurde, die Kassette verschlossen und zum Belichten bei -80 °C gelagert. Die Belichtungszeit betrug 1-7 Tage. Danach wurden die Filme mit Hilfe einer Entwicklermaschine (Hyperprocessor™, Amersham Life Science, USA) entwickelt und anschließend beschriftet.

4 Ergebnisse

4.1 Molekularbiologische Ergebnisse

4.1.1 Expression von H-rev107-2 bei primären Leukämiezellen

In acht der 15 Patientenproben waren H-rev107-2-Transkripte nachweisbar (4 von 10 AML, 4 von 5 ALL). Bei den CD34+ AML-Zellen waren nur zwei von 7 Proben positiv, während in CD34-negativen AML-Zellen (zwei von drei Proben) und in ALL-Zellen (4 von 5) der Anteil der positiven Proben höher war (siehe Abbildung 4.1). Bei der Beurteilung der CD34-negativen AML-Zellen (Proben 8- 10) ist zu beachten, dass hier keine Separation der leukämischen Blasten von eventuell vorhandenen Lymphozyten und Monozyten durchgeführt werden konnte.



Abbildung 4.1: Expression von H-rev107-2 bei primären Leukämiezellen (RT-PCR). Proben 1-7: CD34+ AML; Proben 8-10: CD34- AML; Proben 11-15: CD34+ ALL. Obere Zeile: H-rev107-2, untere Zeile: G3PDH

4.1.2 Expression von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen

Zwei lymphatische Zelllinien exprimierten H-rev107-2: Raji und CEM. Bei der Zelllinie Jurkat war eine grenzwertige Expression sichtbar. In den myeloischen Linien NB-4, U937, K562 und HL-60 war H-rev107-2-mRNS nicht nachweisbar (siehe Abbildung 4.2).

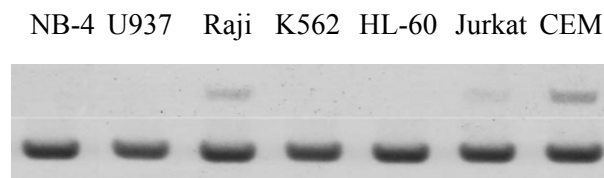


Abbildung 4.2: Expression von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen (RT-PCR). Obere Zeile: H-rev107-2, untere Zeile: G3PDH

4.1.3 Regulation von H-rev107-2 bei primären Leukämiezellen

In allen untersuchten 14 Proben wurde die Expression von H-rev107-2 durch IFN- γ induziert (siehe Tabelle 4.1 und Abbildung 4.3). Durch ATRA trat nur in fünf von 15 Proben eine H-rev107-2-Induktion auf, wobei die ALL-Proben mit drei von fünf stärker vertreten waren als die AML-Proben (zwei von zehn). Die induzierende Wirkung der Kombination von ATRA und IFN- γ im Vergleich mit der Kontrolle war ebenfalls deutlich. Ein additiver Effekt der Kombination war im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit IFN- γ allerdings nicht deutlich zu sehen.

Tabelle 4.1: Regulation von H-rev107-2 bei primären Leukämiezellen nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR). Eine verstärkte Expression im Vergleich zum Kontrollansatz ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Patientenprobe	Kontrolle	IFN- γ	ATRA	IFN- γ /ATRA
1	+	+++	++	+++
2	-	++	-	++
3	-	+	-	++
4	+	+++	+	++
5	-	+	-	+
6	-	+	-	++
7	-	+	-	+
8	+	++	+	++
9	-	++	+	+++
10	+	++	+	++
11	+	++	+	++
12	-	+	+	++
13	+	kein Material	++	+++
14	+	++	++	+++
15	+	+++	+	+++

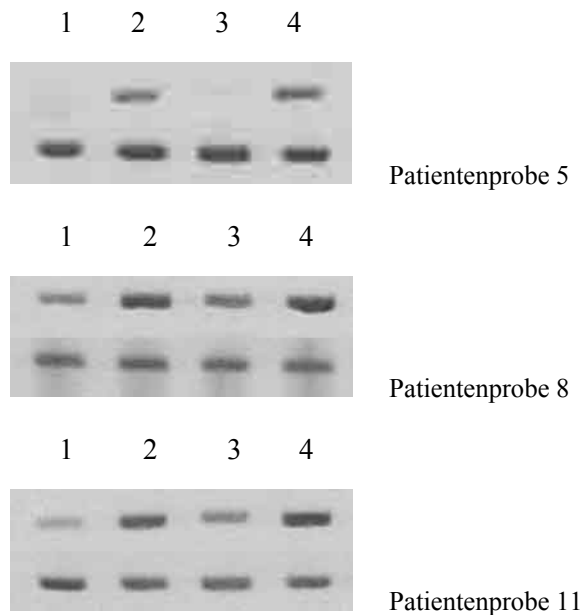


Abbildung 4.3: Exemplarische Darstellung der Regulation von H-rev107-2 bei den Patientenproben 1, 8 und 11 nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR). Die Patientenprobe 8 war eine APL. 1: Kontrolle, 2: IFN- γ , 3: ATRA. 4: IFN- γ / ATRA. Obere Zeile: H-rev107-2, untere Zeile: G3PDH

4.1.4 Regulation von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen (RT-PCR)

H-rev107-2 konnte in allen Zelllinien durch die eingesetzten Wirkstoffe induziert werden (siehe Tabelle 4.2). Bei den myeloischen Zelllinien U937, HL-60 und K562 war IFN- γ die wirksamste Einzelsubstanz, bei der APL-Zelllinie NB-4 war es ATRA. Dagegen hatte ATRA bei K562 und IFN- α bei NB-4 keinen Effekt auf die H-rev107-2-Expression (siehe Abbildung 4.4:). Bei den lymphatischen Zelllinien Raji und Jurkat zeigte die Kombination von ATRA und IFN- γ eine additive Wirkung.

Tabelle 4.2: Regulation von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR).

Zelllinie	Kontrolle	ATRA	IFN- α	IFN- γ	ATRA/IFN α	ATRA/IFN γ
U937	-	+	+	+++	++	+++
HL-60	+	++	+	+++	++	+++
NB-4	-	+++	-	+	+++	+++
K562	-	-	+	++	+	++
Raji	-	+	+	-	++	+++
Jurkat	-	+	++	++	+	+++
CEM	++	+++	+++	+++	+++	+++

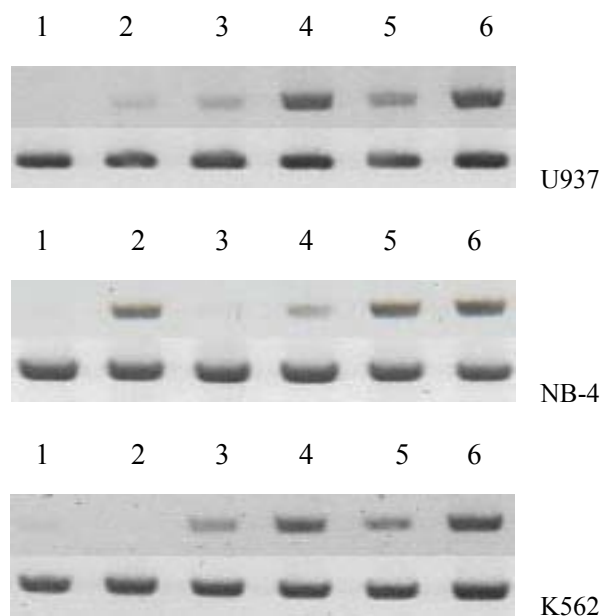


Abbildung 4.4: Exemplarische Darstellung der Regulation von H-rev107-2 bei den Zelllinien U937, NB-4 und K562 nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR). 1: Kontrolle, 2: ATRA, 3: IFN- α , 4: IFN- γ ; 5: IFN- α / ATRA, 6: IFN- γ / ATRA. Obere Zeile: H-rev107-2, untere Zeile: G3PDH

Die myeloischen Zelllinien wurden zusätzlich nach 72 h Inkubation mit den Wirkstoffen IFN- α / γ und ATRA untersucht. Auch nach 72 h Inkubation war eine deutliche Induktion von H-rev107-2 sichtbar (siehe Tabelle 4.3 und Abbildung 4.5). Bei HL-60, NB-4 und K562 entsprechen die Expressionsmuster denen nach 24 h-Inkubation. Bei NB-4 war die Induktion von H-rev107-2 im Unterschied zu H-rev107-1 durch ATRA nicht transient und auch nach 72 h Inkubation deutlich nachweisbar.

Tabelle 4.3: Regulation von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen nach 72 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR).

Zelllinie	Kontrolle	ATRA	IFN- α	IFN- γ	ATRA/IFN α	ATRA/IFN γ
U937	-	-	-	+	-	+
HL-60	-	+	-	++	+	+++
NB-4	-	++	-	+++	++	+++
K562	-	-	+	++	+	++

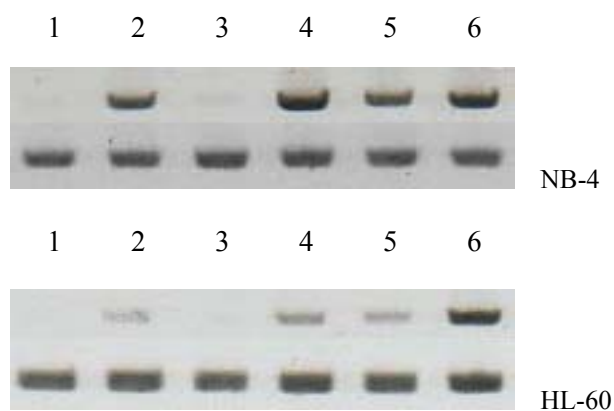


Abbildung 4.5: Exemplarische Darstellung der Regulation von H-rev107-2 bei den Zelllinien NB-4 und HL-60 nach 72 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR). 1: Kontrolle, 2: ATRA, 3: IFN- α , 4: IFN- γ ; 5: IFN- α / ATRA, 6: IFN- γ / ATRA. Obere Zeile: H-rev107-2, untere Zeile: G3PDH

4.1.5 Regulation von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen (Northern-Blot-Hybridisierung)

Nachdem in den RT-PCR-Analysen eine deutliche Induktion von H-rev107-2 durch IFN- γ und ATRA gezeigt werden konnte, wurden die drei AML- und die drei ALL-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit diesen Wirkstoffen mittels Northern-Blot-Hybridisierung untersucht.

Eine deutliche Induktion von H-rev107-2 war bei allen drei lymphatischen Zelllinien sowohl durch IFN- γ und ATRA allein, noch stärker durch die Kombination beider Wirkstoffe sichtbar (siehe Abbildung 4.6). Bei den Kontrollansätzen ließen sich H-rev107-2-Transkripte bei CEM und Raji nachweisen. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

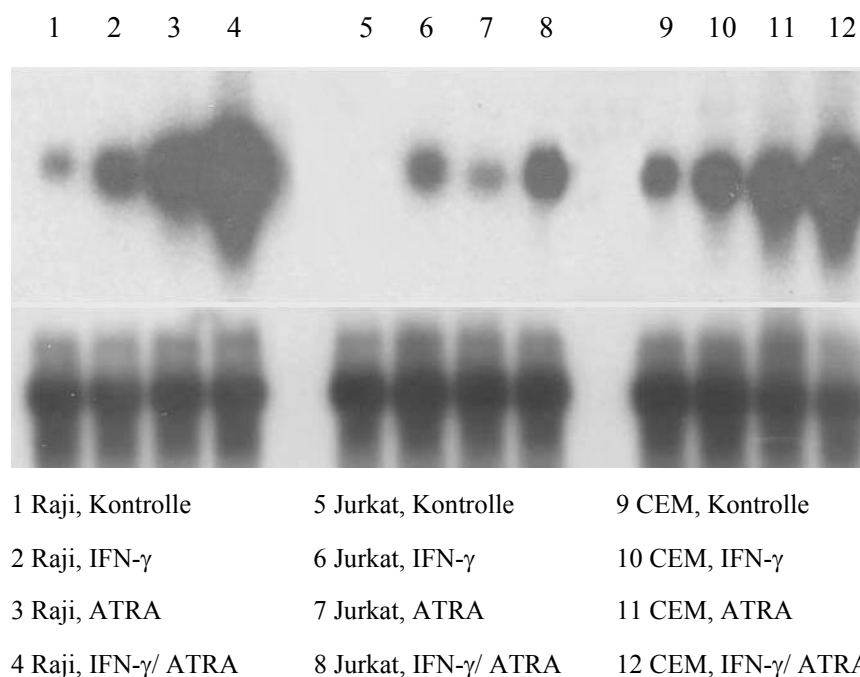


Abbildung 4.6: Regulation von H-rev107-2 bei den lymphatischen Zelllinien nach 72 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (Northern-Blot-Hybridisierung). Oben: H-rev107-2, unten: Ladungskontrolle (28s RNS). Dargestellt wurde ein repräsentatives Bild von zwei unabhängigen Experimenten.

Auch bei allen drei myeloischen Zelllinien war eine deutliche Induktion von H-rev107-2 durch IFN- γ sichtbar (siehe Abbildung 4.7). Die Induktion durch ATRA war bei der APL-Zelllinie stark, dagegen bei U937 und vor allem bei HL-60 schwächer. Eine deutliche additive Wirkung von IFN- γ und ATRA war bei NB-4 zu beobachten. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

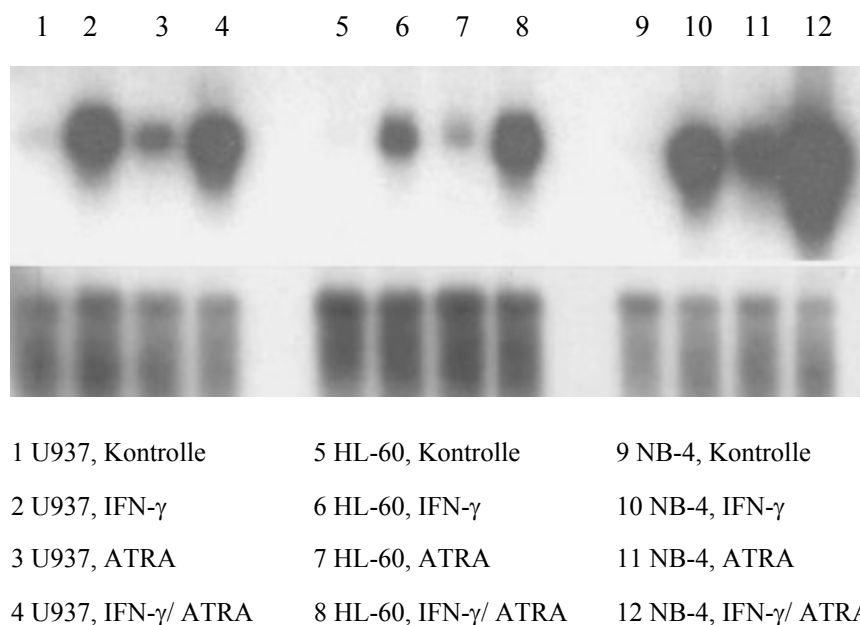


Abbildung 4.7: Regulation von H-rev107-2 bei den myeloischen Zelllinien nach 72 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (Northern-Blot-Hybridisierung). Oben: H-rev107-2, unten: Ladungskontrolle (28s RNS). Dargestellt wurde ein repräsentatives Bild von zwei unabhängigen Experimenten.

4.1.6 Induktionskinetik von H-rev107-2 bei der Zelllinie NB-4

Die Induktion von H-rev107-2 durch Inkubation mit IFN- γ und ATRA bei der APL-Zelllinie NB-4 war nach zwei Stunden noch nicht, jedoch nach sechs Stunden deutlich nachweisbar (siehe Abbildung 4.8). Die RNS-Qualität der Ansätze 11 und 15 war schlecht. Trotzdem war in Ansatz 15 die Induktion deutlich sichtbar. Dieses Experiment wurde noch zweimal mit den Untersuchungszeitpunkten 2 h, 4 h und 6 h durchgeführt. Auch hier war nach 2 h Inkubationszeit noch keine Expression sichtbar, nach 4 h eine schwache und nach 6 h eine deutliche. Die Fotos zu diesen Versuchen wurden aus Qualitätsgründen nicht abgebildet. H-rev107-2 wurde bei NB-4 also nach 4-6 h Inkubation mit IFN- γ oder ATRA induziert. Ein Unterschied zwischen diesen beiden Wirkstoffen wurde nicht beobachtet. Schon zu diesem frühen Zeitpunkt war ein additiver Effekt der Kombination beider Stoffe sichtbar.

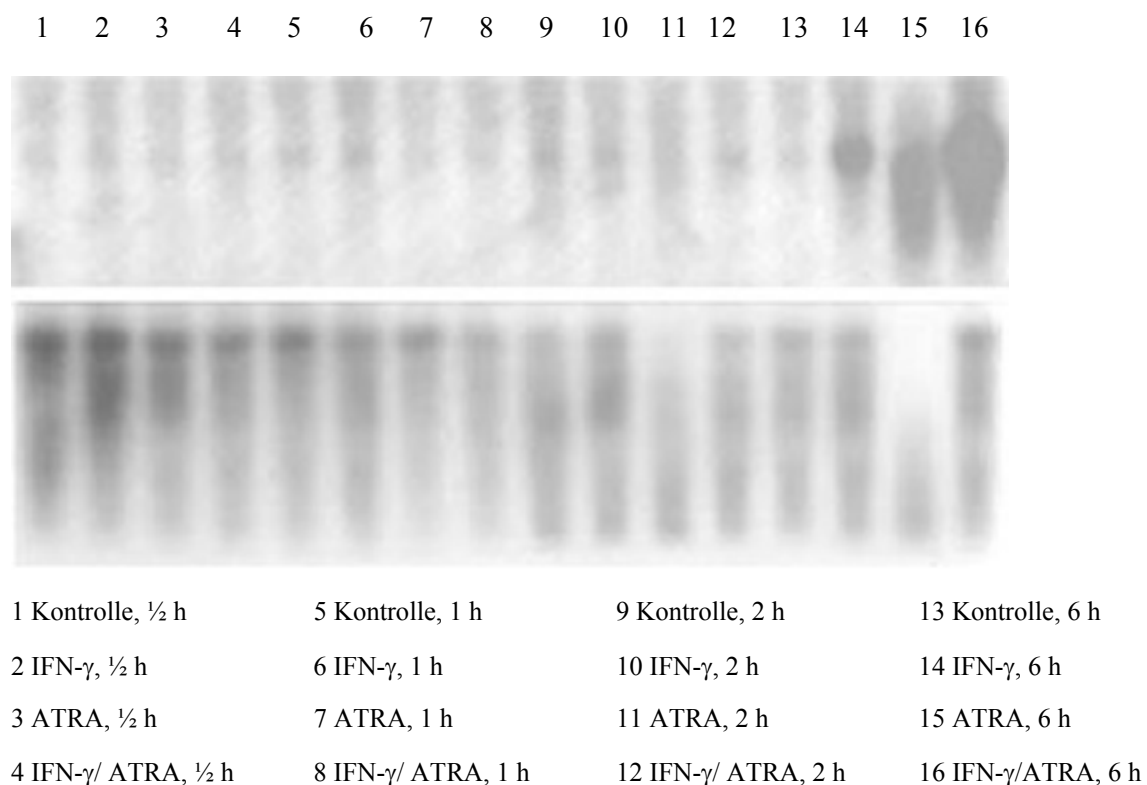


Abbildung 4.8: Induktionskinetik von H-rev107-2 bei der Zelllinie NB-4; die Zellen wurden nach der angegebenen Inkubationszeit geerntet und mittels Northern-Blot-Hybridisierung untersucht. oben: H-rev107-2; unten: 28s RNS

4.1.7 Beeinflussung der H-rev107-2-Expression durch Inhibition der Signaltransduktion

Die beiden Signaltransduktionsinhibitoren PD098059 und AG490 beeinflussten bei den drei AML-Zelllinien NB-4, HL-60 und U937 nicht die Induktion von H-rev107-2 durch IFN- γ und ATRA. Auch die alleinige Inkubation mit den Inhibitoren hatte keine Wirkung auf die H-rev107-2-Expression (siehe Abbildung 4.9, Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11). Bei NB-4 war eine additive Wirkung der Kombination von IFN- γ und ATRA sichtbar. Ansonsten bestätigten die Ansätze 1- 4 die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente.

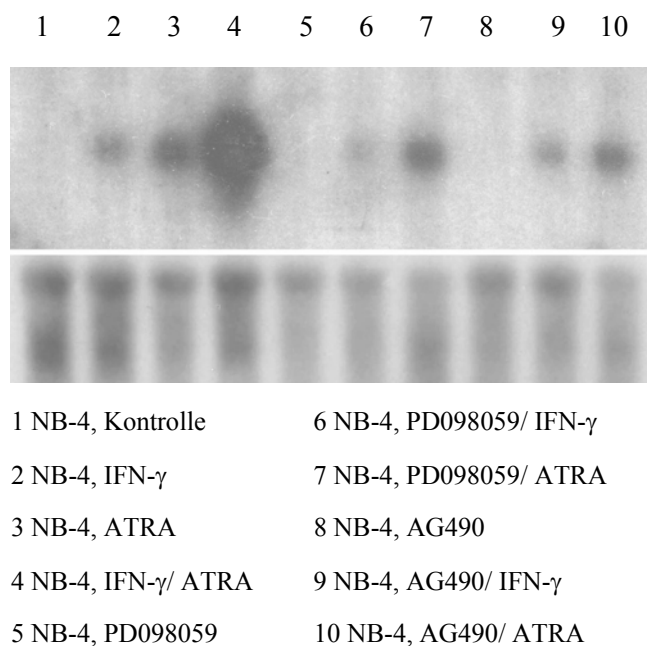
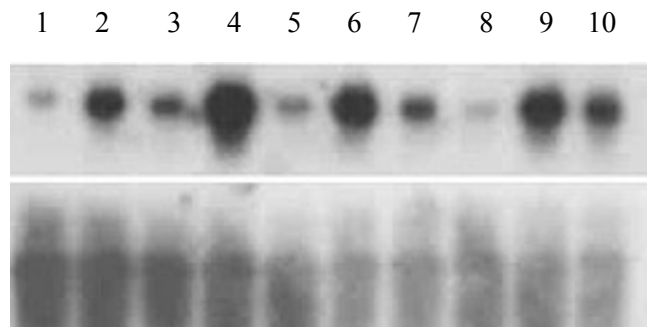
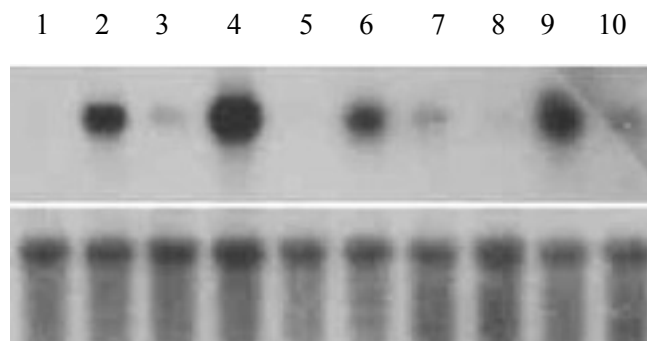


Abbildung 4.9: Regulation von H-rev107-2 bei der Zelllinie NB-4 nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (Northern-Blot-Hybridisierung). Oben: H-rev107-2; unten: 28s RNS; Repräsentatives Bild von zwei unabhängigen Experimenten.



1 HL-60, Kontrolle	6 HL-60, PD098059/ IFN- γ
2 HL-60, IFN- γ	7 HL-60, PD098059/ ATRA
3 HL-60, ATRA	8 HL-60, AG490
4 HL-60, IFN- γ / ATRA	9 HL-60, AG490/ IFN- γ
5 HL-60, PD098059	10 HL-60, AG490/ ATRA

Abbildung 4.10: Regulation von H-rev107-2 bei der Zelllinie HL-60 nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (Northern-Blot-Hybridisierung). Oben: H-rev107-2; unten: 28s RNS; Repräsentatives Bild von zwei unabhängigen Experimenten.



1 U937, Kontrolle	6 U937, PD098059/ IFN- γ
2 U937, IFN- γ	7 U937, PD098059/ ATRA
3 U937, ATRA	8 U937, AG490
4 U937, IFN- γ / ATRA	9 U937, AG490/ IFN- γ
5 U937, PD098059	10 U937, AG490/ ATRA

Abbildung 4.11: Regulation von H-rev107-2 bei der Zelllinie U947 nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (Northern-Blot-Hybridisierung). Oben: H-rev107-2; unten: 28s RNS; Repräsentatives Bild von zwei unabhängigen Experimenten.

4.1.8 Expression von H-rev107-1 bei primären Leukämiezellen

Acht Proben aus leukämischen Blasten von Patienten mit akuten Leukämien bei Erstdiagnose wurden mit Hilfe der RT-PCR auf eine H-rev107-1-Expression untersucht. Sechs Proben stammten von AML-, zwei von ALL-Patienten. Drei der AML-Proben waren CD34-negativ, die restlichen Proben enthielten CD34+ Blasten. Wie in Tabelle 4.4 dargestellt konnten bei keiner der acht Patientenproben H-rev107-1-Transkripte gefunden werden. Die Positivkontrollen waren deutlich positiv. Es wurden nur acht der 15 Patientenproben auf H-rev107-1 untersucht, da bei den übrigen sieben Proben das mRNA-Material nur für die Untersuchung von H-rev107-2 reichte. Die negativen Ergebnisse der Proben 8, 9 und 10 zeigten, dass es zu keinen falsch positiven Ergebnissen durch eventuell vorhandene Lymphozyten und Monozyten kam.

Tabelle 4.4: Expression von H-rev107-1 bei primären Leukämiezellen (RT-PCR)

Patientenprobe	1	2	4	8	9	10	12	14
H-rev107-1	-	-	-	-	-	-	-	-

4.1.9 Expression von H-rev107-1 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen

Bei der Untersuchung der Zelllinien mittels RT-PCR wurden in drei der sieben Zelllinien H-rev107-1-Transkripte gefunden (siehe Abbildung 4.12). Positiv waren K562, CEM und U937. Negativ waren HL-60, NB-4, Raji und Jurkat.

NB-4 U937 Raji K562 HL-60 Jurkat CEM

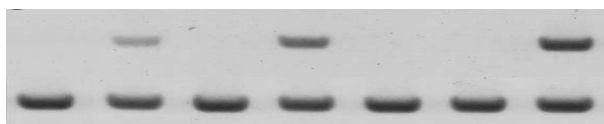


Abbildung 4.12: Expression von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen. Obere Zeile: H-rev107-1; untere Zeile: G3PDH

4.1.10 Regulation von H-rev107-1 bei primären Leukämiezellen

Bei keiner untersuchten Patientenprobe fand nach 24 h Inkubation eine Induktion durch die Wirkstoffe INF- γ , ATRA oder der Kombination ATRA/ IFN- γ statt (siehe Tabelle 4.5). Die parallel durchgeführten Positivkontrollen waren positiv.

Tabelle 4.5: Untersuchung der Regulation von H-rev107-1 bei primären Leukämiezellen nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen

Patientenprobe	Kontrolle	IFN- γ	ATRA	IFN- γ / ATRA
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
4	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
12	-	-	-	-
14	-	-	-	-

4.1.11 Regulation von H-rev107-1 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen

Eine schwache Induktion von H-rev107-1 erfolgte bei NB-4 durch ATRA und IFN- γ , sowie stärker durch die Kombination beider Substanzen. Bei K562 wurde die Expression durch beide Interferone verstärkt, während ATRA keinen Effekt erzielte (siehe Abbildung 4.13). Bei allen anderen Zelllinien fand keine Induktion von H-rev107-1 durch die eingesetzten Wirkstoffe statt (siehe Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Regulation von H-rev107-1 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR).

Zelllinie	Kontrolle	ATRA	IFN- α	IFN- γ	ATRA/IFN- α	ATRA/IFN- γ
U937	+	+	+	+	+	+
HL-60	-	-	-	-	-	-
NB-4	-	+	-	+	+	++
K562	+	+	++	++	++	+++
Raji	-	-	-	-	-	-
Jurkat	-	-	-	-	-	-
CEM	++	++	++	++	++	++

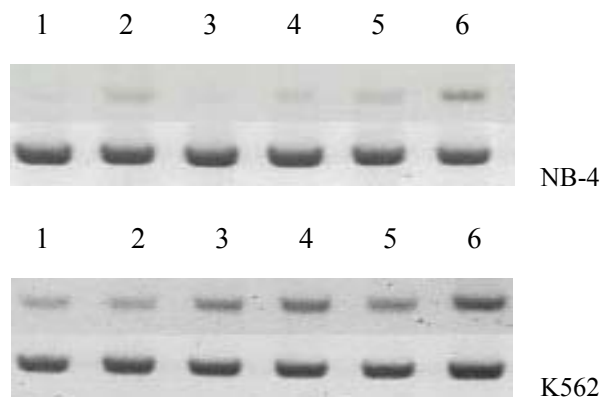


Abbildung 4.13: Exemplarische Darstellung der Regulation von H-rev107-1 bei den Zelllinien NB-4 und K562 nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR). 1: Kontrolle, 2: ATRA, 3: IFN- α , 4: IFN- γ ; 5: IFN- α / ATRA, 6: IFN- γ / ATRA. Obere Zeile: H-rev107-2, untere Zeile: G3PDH

Die H-rev107-1 nicht exprimierenden Zelllinien wurden nach 72 h Inkubation nochmals mittels RT-PCR untersucht. Auch nach 72 h Inkubation blieben die nach 24 h negativen Ansätze negativ. Bei NB-4 waren nur noch die Ansätze mit IFN- γ schwach positiv, ATRA zeigte keinen Effekt mehr (siehe Tabelle 4.7 und Abbildung 4.14). ATRA scheint bei NB-4 nur zu einer transienten H-rev107-1-Expression zu führen.

Tabelle 4.7: Regulation von H-rev107-1 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen nach 72 h Inkubation mit den angegebenen Wirkstoffen (RT-PCR)

Zelllinie	Kontrolle	ATRA	IFN- α	IFN- γ	ATRA/IFN- α	ATRA/IFN- γ
HL-60	-	-	-	-	-	-
NB-4	-	-	-	+	-	+
Raji	-	-	-	-	-	-
Jurkat	-	-	-	-	-	-

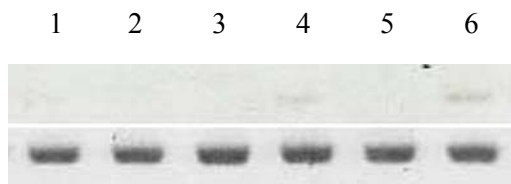


Abbildung 4.14 Exemplarische Darstellung der Regulation der H-rev107-1-Expression bei der Zelllinie NB-4 nach 72 h Inkubation (RT-PCR). 1: Kontrolle, 2: ATRA, 3: IFN- α , 4: IFN- γ , 5: IFN- α / ATRA, 6: IFN- γ / ATRA. Obere Zeile: H-rev107-1, untere Zeile: G3PDH

4.2 Zellbiologische Ergebnisse

4.2.1 Wachstumskinetik der Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen

Das Zellwachstum der lymphatischen Zelllinien CEM, Jurkat und Raji wurde durch IFN- γ oder ATRA nicht beeinflusst (siehe Abbildung 4.15, Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17). Bei der APL-Zelllinie NB-4 wirkten sowohl ATRA als auch IFN- γ proliferationshemmend. In der Kombination verstärkte sich dieser Effekt deutlich (siehe Abbildung 4.18). Bei HL-60 erzielte IFN- γ eine deutliche Proliferationshemmung. Eine synergistische Wirkung von IFN- γ und ATRA zusammen war nicht ersichtlich. ATRA hatte bei HL-60 keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten (siehe Abbildung 4.19). Beide Wirkstoffe zeigten bei U937 im Vergleich zur Kontrolle eine Wachstumshemmung (siehe Abbildung 4.20). Bei den drei myeloischen Zelllinien wurde auch der Effekt von IFN- α auf das Wachstumsverhalten untersucht. Nur bei U937 zeigte sich eine Hemmung, während bei NB-4 und HL-60 kein Effekt zu beobachten war. Bei dem Vergleich der Wachstumskinetik mit der H-rev107-2-Expression (siehe Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7) wurde deutlich, dass bei den AML-Zelllinien die Induktion von H-rev107-2 mit Wachstumshemmung assoziiert war. Dagegen ging bei den lymphatischen Zelllinien H-rev107-2-Induktion nicht mit Wachstumshemmung einher.

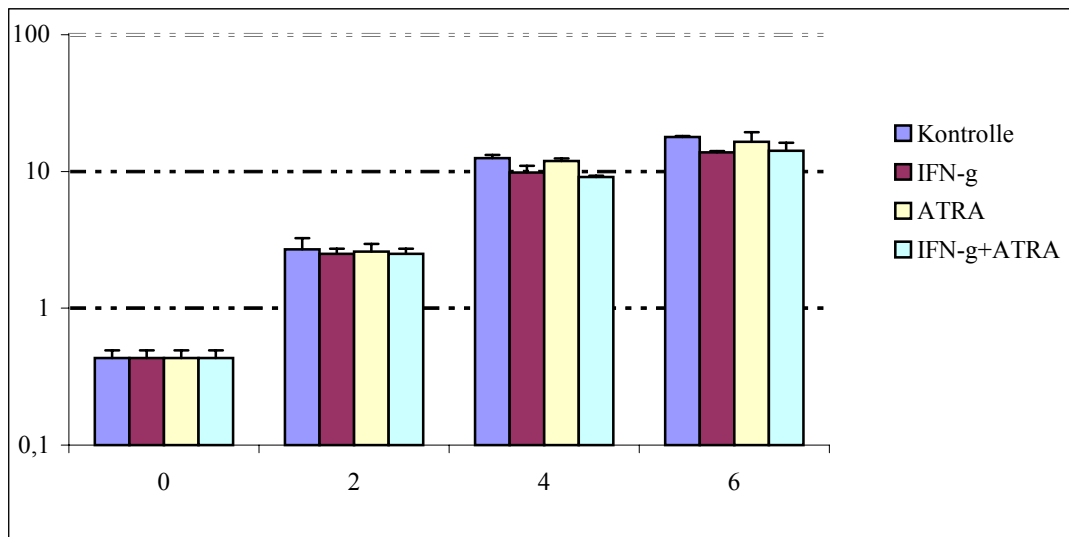


Abbildung 4.15: Wachstumskinetik der Zelllinie Raji (Burkitt-Lymphom); y-Achse: Zellzahl (x100.000/ml), x-Achse: Zeit (in d).

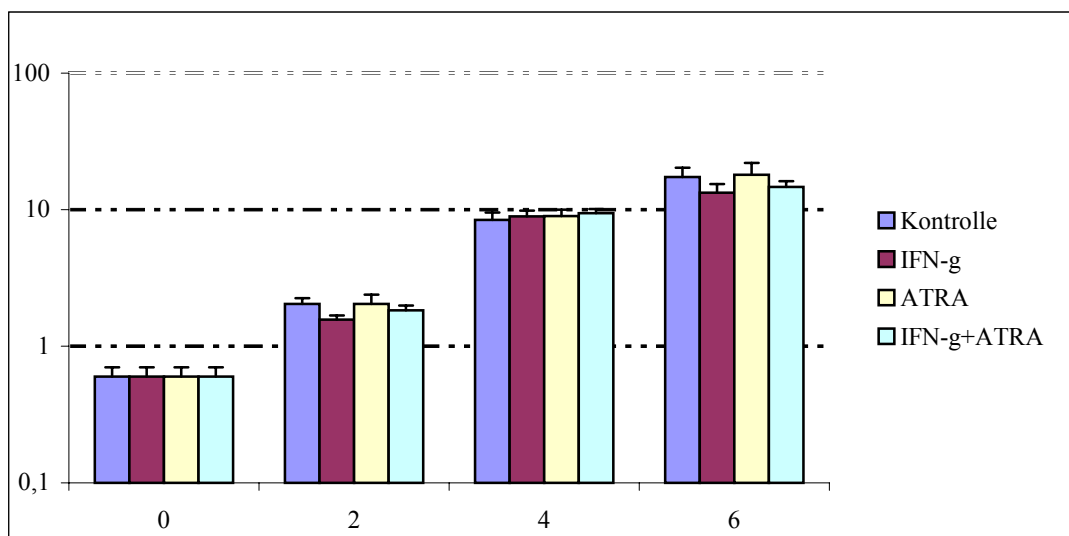


Abbildung 4.16: Wachstumskinetik der Zelllinie CEM (T-ALL); y-Achse: Zellzahl (x100.000/ml), x-Achse: Zeit (in d).

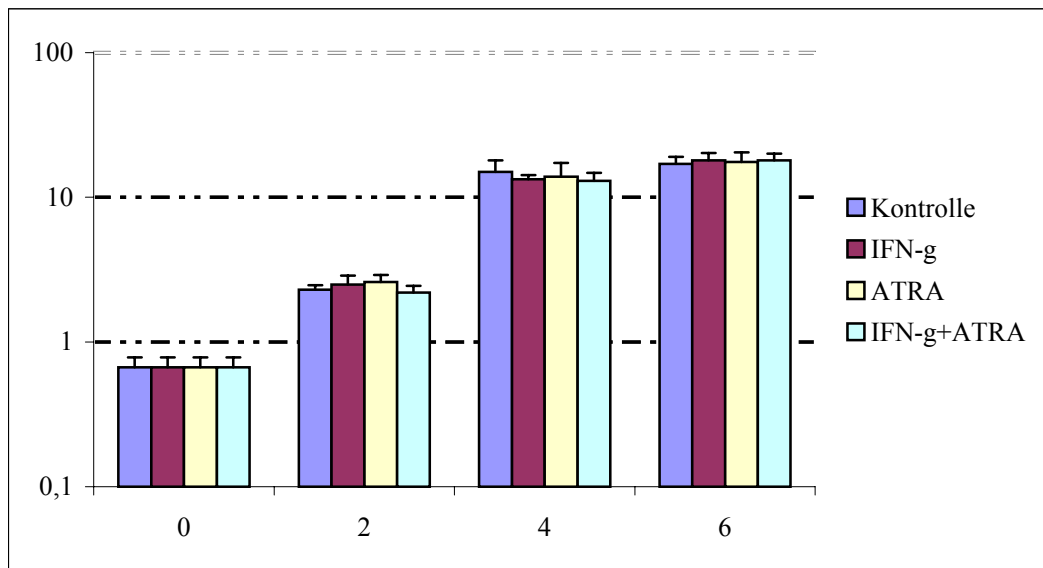


Abbildung 4.17: Wachstumskinetik der Zelllinie Jurkat (T-ALL); y-Achse: Zellzahl (x100.000/ml), x-Achse: Zeit (in d).

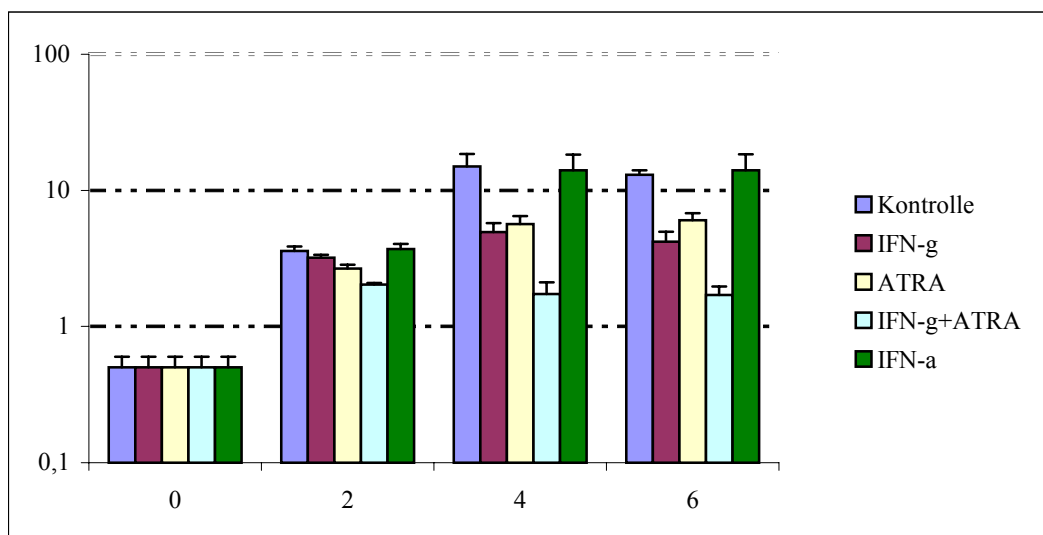


Abbildung 4.18: Wachstumskinetik der Zelllinie NB-4 (APL); y-Achse: Zellzahl (x100.000/ml), x-Achse: Zeit (in d).

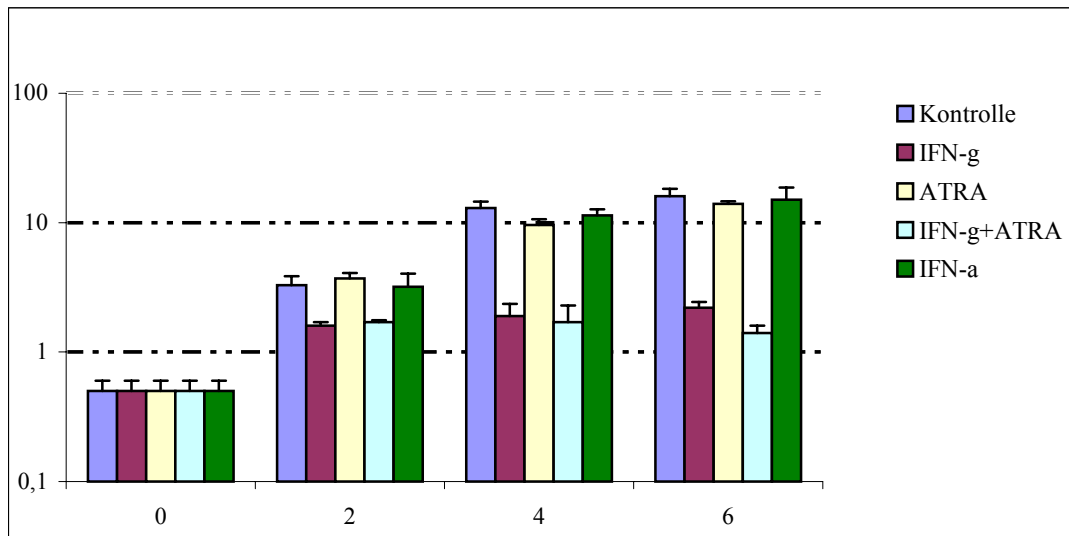


Abbildung 4.19: Wachstumskinetik der Zelllinie HL-60 (AML-M2); y-Achse: Zellzahl (x100.000/ml), x-Achse: Zeit (in d).

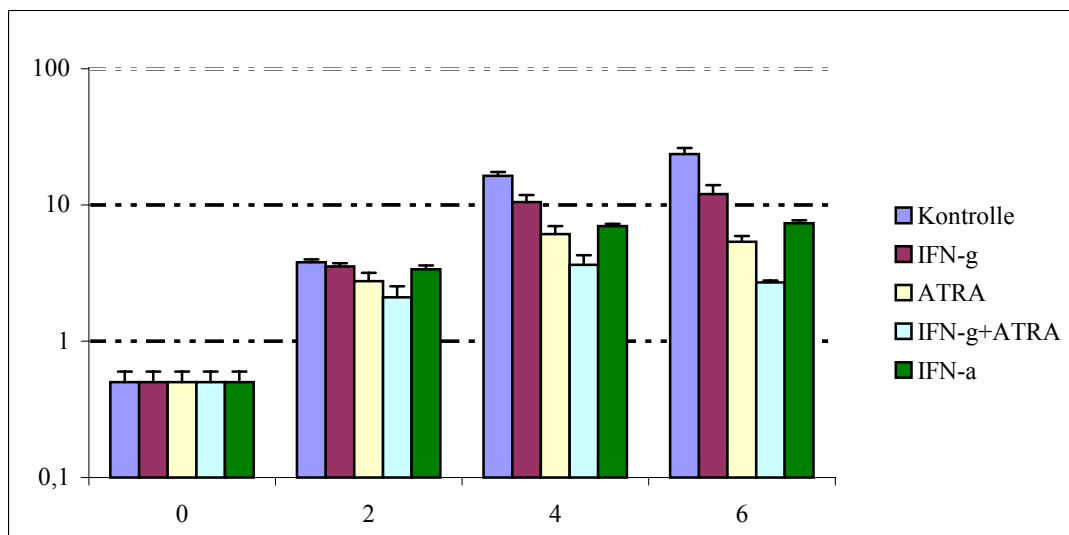


Abbildung 4.20: Wachstumskinetik der Zelllinie U937 (AML-M4); y-Achse: Zellzahl (x100.000/ml), x-Achse: Zeit (in d).

5 Diskussion

5.1 Die Expression von H-rev107-2 bei malignen hämatopoetischen Zellen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen akuter Leukämien fand sich bei dem überwiegenden Teil der myeloischen Zellen eine supprimierte Expression von H-rev107-2. In sechs von zehn AML-Patientenproben und drei von vier myeloischen Zelllinien konnten keine H-rev107-2-Transkripte nachgewiesen werden. Einen grenzwertigen Nachweis von H-rev107-2 fand sich allein bei der Zelllinie HL-60. Beim Vergleich der H-rev107-2-Expression der primären AML-Zellen ergab sich ein Trend zur stärkeren Suppression von H-rev107-2 bei CD34+ AML-Zellen gegenüber CD34negativen AML-Zellen. Bei den CD34negativen Patientenproben konnte vor der RT-PCR-Analyse allerdings keine Separation durchgeführt werden. Daher ist eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Lymphozyten oder Monozyten nicht auszuschließen. Nach Meinung des Autors dieser Arbeit ist dies zu vernachlässigen, da es bei der Untersuchung der H-rev107-1-Expression derselben Proben zu keinem falsch positiven Ergebnis kam. Zudem sind in der Literatur RT-PCR-Analysen von primären Leukämiezellen mit einem Blastenanteil von nur > 60 % beschrieben (Green et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit betrug der Blastenanteil dagegen mindestens 80 %. Bei den lymphatischen Zellen war die H-rev107-2-Expression ausgeprägter als bei den myeloischen. Nur in einer von fünf Patientenproben und einer von drei Zelllinien konnten keine H-rev107-2-Transkripte nachgewiesen werden.

DiSepio et al. untersuchten mittels Northern-Blot-Hybridisierung die Expression von H-rev107-2 diverser Zelllinien maligner Erkrankungen, darunter auch die in der vorliegenden Arbeit genutzten HL-60 (AML-M2), K562 (CML im Blastenschub) und Raji (Burkitt-Lymphom). Sie fanden nur bei Raji und bei der in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchten T-ALL-Zelllinie MOLT-4 eine schwache Expression von H-rev107-2, HL-60 und K562 zeigten keine Expression (DiSepio et al., 1998). Huang et al. wiesen bei HL-60 H-rev107-2-Transkripte nach (Huang et al., 2000). Auch in der vorliegenden

Arbeit war die Zelllinie HL-60 in vier Untersuchungen negativ und in zwei schwach positiv. Diese widersprüchlichen Ergebnisse bei HL-60 können mit einer unterschiedlichen Sensitivität bei der Northern-Blot-Hybridisierung durch Differenzen bei der Radioaktivität der cDNS-Sonde und bei der Dauer der Exposition des radiosensitiven Films erklärt werden. Es ist demnach wahrscheinlich, dass die Zelllinie HL-60 H-rev107-2 in einem geringen Maße exprimiert, so dass sie je nach Sensitivität der Analyse negativ oder schwach positiv für H-rev107-2 ist.

Da H-rev107-2 in seinen Promoterabschnitten so genannte *retinoic acid responsible elements* (RARE) besitzt (DiSepio et al., 1998), spricht die supprimierte Expression von H-rev107-2 bei den myeloischen Zelllinien und dem überwiegenden Teil der AML-Patientenproben für die Möglichkeit, dass der Retinsäuresignalweg in diesen Zellen unterbunden ist. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Störung des Retinsäuresignalwegs bei AML-Zellen nicht nur bei der APL sondern auch bei der AML-M2 mit der Translokation AML1-ETO auftritt und an deren Pathogenese beteiligt ist (Minucci, 2001). Dabei kommt es zur DNS-Hypermethylierung und zur verstärkten Histonedezetylierung. Die Folge ist die Expressionssuppression von Tumorsuppressoren (Di Croce et al., 2002).

Bei früheren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe war eine deutliche Expression von H-rev107-2 in mononukleären Zellen sowie in Granulozyten des peripheren Bluts und des Knochenmarks gefunden worden. Die Expression in den CD34+ hämatopoetischen Stammzellen war dagegen nur schwach gewesen (Martin, 2003). Daher wurde die Arbeitshypothese einer bei hämatopoetischen Zellen mit zunehmender Differenzierung verstärkten Expression von H-rev107-2 aufgestellt. Casanova et al. konnten diese Hypothese mit ihren Ergebnissen bestätigen (2002). Sie fanden keine Unterschiede beim Vergleich von der H-rev107-2-Expression normaler B-Lymphozyten mit der von B-CLL-Zellen von Patienten in frühen Krankheitsstadien. Dagegen war die Expression von H-rev107-2 bei B-CLL-Zellen in fortgeschrittenen Krankheitsstadien nach der Binet-Klassifikation deutlich vermindert, so dass die Suppression der H-rev107-2-Expression mit der Progression der B-CLL in Zusammenhang gebracht wurde

(Casanova et al., 2001). Weitere Daten über die Expression von H-rev107-2 bei hämatopoetischen Zellen liegen zurzeit nicht vor. In epidermalen Zellen wurde eine, verglichen mit normalen Epidermiszellen, schwächere H-rev107-2-Expression bei Psoriasis- und Basaliomzellen und eine fehlende Expression bei aggressiven Plattenepithel-Karzinomen gefunden (Duvic et al., 2000). Bei normalem Gewebe und Adenokarzinomen des Kolorektums korrelierte die Expression von H-rev107-2 positiv mit dem Differenzierungsgrad (Shyu et al., 2003). Die tumorsupprimierende Wirkung von H-rev107-2 scheint demnach sowohl bei hämatopoetischen wie auch bei epithelialen Zellen eine Rolle zu spielen.

5.1.1 Die Regulation von H-rev107-2 durch IFN- α , IFN- γ und ATRA

IFN- α konnte in der vorliegenden Arbeit H-rev107-2 bei den Zelllinien U937 (Akute monoblastische Leukämie), K562, Raji und Jurkat (T-ALL) nach 24 h Inkubation induzieren. Diese Induktion war schwächer als die durch IFN- γ . Bei den Zelllinien NB-4 (APL) und HL-60 trat keine Induktion durch IFN- α ein. Zudem war die Wirkung von IFN- α bei U937 und Raji nur transient, nach 72 h Inkubation war hier keine H-rev107-2-Expression mehr nachweisbar. Auch Higuchi et al. zeigten in vorläufigen Ergebnissen an epithelialen Tumorzelllinien, dass IFN- α H-rev107-2 schwächer induziert als IFN- γ (2001). In Bezug auf die Induktion anderer Tumorsuppressoren, wie z.B. IRF-1, wurde ebenfalls eine stärkere Wirkung von IFN- γ im Vergleich zu IFN- α bei AML-Zellen gefunden (Matikainen et al., 1996). Bei CD34+ hämatopoetischen Stammzellen konnte keine Induktion von H-rev107-2 durch IFN- α beobachtet werden (Martin, 2003).

IFN- γ induzierte in der vorliegenden Arbeit H-rev107-2 in allen untersuchten Proben primärer Leukämiezellen und Zelllinien der malignen Hämatopoese. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass H-rev107-2 auch in CD34+ hämatopoetischen Stammzellen gesunder Spender durch IFN- γ induziert wird (Martin, 2003). H-rev107-2 ist den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen zufolge bei malignen hämatopoetischen Zellen nicht nur ein Target des Reinsäuresignalwegs, sondern auch

des IFN- γ -Signalwegs. Die Regulation von H-rev107-2 durch IFN- γ ist in der Literatur bisher nur in vorläufigen Untersuchungen von Higuchi et al. beschrieben worden. Sie zeigten eine Induktion von H-rev107-2 durch IFN- γ bei einer nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinomzelllinie und einer Plattenepithel-Karzinomzelllinie. Zudem fanden sie mögliche *IFN- γ activated sites* (GAS) im H-rev107-2-Promoter (Higuchi et al., 2001).

IFN- γ ist ein starker Inhibitor der Hämatopoese. Selleri et al. zeigten, dass es *in vitro* die Koloniebildung von hämatopoetischen Vorläuferzellen hemmt. Eine pathologisch erhöhte Expression von IFN- γ scheint *in vivo* an der Entstehung von aplastischen Syndromen beteiligt zu sein. Dieser inhibitorische Effekt bei den hämatopoetischen Zellen kam durch Hemmung der Zellzyklusprogression und durch Apoptoseinduktion zustande (Selleri et al., 1996). IFN- γ -induziertes IRF-1 war für diesen antiproliferativen Effekt notwendig. Nachdem IRF-1 *in vitro* durch die retrovirale Transfektion einer Antisense-Oligonukleotidsequenz in der AML-Zelllinie KG1a und in primären AML-Zellen ausgeschaltet wurde, wirkte IFN- γ proliferationsfördernd (Sato et al., 1997).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, war eine Induktion von H-rev107-2 bei der APL-Zelllinie NB-4 nach 4 h Inkubation mit IFN- γ oder ATRA sichtbar. Vergleichbare Ergebnisse fanden Higuchi et al. bei Bronchial-Karzinomzellen, wo H-rev107-2 durch IFN- γ nach 4- 6 h Inkubation induziert wurde (Higuchi et al., 2001). Dies spricht dafür, dass H-rev107-2 kein so genanntes *immediate early gene* (Wang, 1998) ist und für seine Induktion die IFN- γ - oder ATRA-induzierte Proteinsynthese benötigt wird. Für das verwandte Gen H-rev107-1 gab es bei Ovarial-Karzinomzellen schon entsprechende Ergebnisse (Sers et al., 2002). Diese Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass H-rev107-1 direkt durch IRF-1 induziert wurde und an der Apoptoseinduktion durch IFN- γ beteiligt war. Da Matikainen et al. bei der Zelllinie NB-4 eine Induktion von IRF-1-Protein nach 2 h IFN- γ -Inkubation zeigen konnten (Matikainen et al., 1996), kommt zusammen mit den Ergebnissen der

vorliegenden Arbeit die Möglichkeit einer Induktion von H-rev107-2 durch den Transkriptionsfaktor IRF-1 in Betracht.

Durch ATRA konnte in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu IFN- γ die Expression von H-rev107-2 nur in zwei von zehn AML-Patientenproben induziert werden. Auch bei den myeloischen Zelllinien war mit Ausnahme der APL-Zelllinie NB-4 die H-rev107-2-Induktion durch ATRA deutlich schwächer als durch IFN- γ . Möglicherweise kann die Induktion von H-rev107-2 bei AML-Zellen durch die Koinkubation von ATRA mit dem DNS-Methyltransferase-Inhibitor 5-AZA oder dem Histonedezetylase-Inhibitor TSA verstärkt werden. Anhaltspunkte hierfür geben die Arbeiten von Minucci et al. (2001) und Di Croce et al. (2002). Bei der einzigen in der vorliegenden Arbeit untersuchten APL-Patientenprobe war ATRA nicht zur H-rev107-2-Induktion in der Lage. Das Ergebnis dieser Patientenprobe steht im Widerspruch zu den Ergebnissen bei der Zelllinie NB-4. Auch Green et al. fanden, dass es bei NB-4 durch ATRA zur IRF-1-Induktion kam, während dies bei primären APL-Zellen nicht der Fall war (1999). Dies verdeutlicht die Problematik bei der Übertragbarkeit von an Zelllinien erbrachten Ergebnissen auf primäre Tumorzellen. Green et al. führen unter anderem folgende Erklärungsmöglichkeit an: Zelllinien seien an die Bedingungen *in vitro* gewohnt. Sie wüchsen kontinuierlich in der Kultur und hätten einen höheren Anteil von sich teilenden Zellen als die relativ frisch aufgetauten primären Zellen (1999).

Die Ergebnisse der Northern-Blot-Hybridisierungen und der RT-PCR-Analysen in der vorliegenden Arbeit sprechen für eine additive Wirkung von IFN- γ und ATRA auf die Induktion von H-rev107-2 bei Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen. Ein so genannter *cross talk* zwischen ATRA und IFN- γ ist schon seit einiger Zeit bekannt (Chelbi-Alix und Pelicano, 1999). Die Kombination beider Wirkstoffe hat einen synergistischen Effekt auf die Induktion von IRF-1 (Matikainen et al., 1996), den *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) und STAT2 (Matikainen et al., 1997). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Gianni et al. bei den Zelllinien NB-4, HL-60 und U937 (Gianni et al., 1997). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte durch ATRA eine Induktion und Aktivierung von STAT-Proteinen, die eine zentrale Funktion bei der

IFN-Signaltransduktion einnehmen, zeigen. Zusätzlich fanden sie eine ATRA-induzierte IFN- α -Synthese bei den Zelllinien NB-4, HL-60 und U937 (Pelicano et al., 1997). Da im H-rev107-2-Promoter sowohl sogenannte RARE (DiSepio et al., 1998) als auch GAS (Higuchi et al., 2001) gefunden wurden, sind zwei Erklärungen für den additiven Effekt auf die H-rev107-2-Expression denkbar. Zum einen kommt die parallele Induktion durch ATRA und IFN- γ über getrennte Signalwege in Frage. Zum anderen könnte ATRA über eine Potenzierung des IFN- γ -Signalwegs die Induktion von H-rev107-2 durch IFN- γ verstärken.

5.1.2 Der Vergleich der H-rev107-2-Expression und des Wachstumsverhaltens der Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen

In der vorliegenden Arbeit ging die Induktion der H-rev107-2-Expression durch IFN- γ oder ATRA bei den AML-Zelllinien NB-4, HL-60 und U937 mit Wachstumshemmung einher. Kumar et. al fanden bei ihrer Arbeit bei NB-4 eine Wachstumshemmung durch IFN- γ und ATRA, die der in der vorliegenden Arbeit entsprach (Kumar und Korutla, 1995). Die Wachstumshemmung durch IFN- γ und ATRA bei diesen Zelllinien ging mit zunehmender Differenzierung entlang der granulozytären bzw. monozytären Reihe einher ((Lanotte et al., 1991) (Dimberg et al., 2000)). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bei der morphologischen Beurteilung der Zelllinie NB-4 nach ATRA-Inkubation beobachtet werden. Nach 8 Tagen Inkubation mit 1 μ m ATRA differenzierten sich die APL-Zellen zu Metamyelozyten und Stabkernigen (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine mit Wachstumshemmung korrelierende H-rev107-2-Induktion war bisher nur durch Retinoide bei Keratinozyten und Mamma-Karzinomzellen (DiSepio et al., 1998) sowie Magen-Karzinomzellen (Huang et al., 2000) beschrieben worden. In einer neueren Arbeit zeigten Huang et al. erstmals eine, wenn auch schwache direkte antiproliferative Wirkung von H-rev107-2 durch Transfektion eines H-rev107-2-exprimierenden Plasmids bei einer Zervix-Karzinomzelllinie. Die H-rev107-2-exprimierenden Zellen hatten ein um 20 % vermindertes Wachstum im Vergleich mit den Kontrollzellen. Dabei war der Anteil der Zellen in der S-Phase erniedrigt und der apoptotischer Zellen erhöht (Huang et al., 2002). Diese relativ geringe Wachstumshemmung ist eventuell

durch die komplexen genetischen Veränderungen einer von einem malignen soliden Tumor abstammenden Zelllinie zu erklären.

INF- α konnte bei den Zelllinien NB-4 und HL-60 weder das Wachstum hemmen noch H-rev107-2 induzieren. Bei U937 trat hingegen sowohl eine Wachstumshemmung als auch eine Induktion von H-rev107-2 durch IFN- α auf. Eine Resistenz der beiden Zelllinien NB-4 und HL-60 und eine Sensitivität bei U937 gegenüber IFN- α auf die Induktion Interferon-stimulierter Gene konnte bereits gezeigt werden (Matikainen et al., 1997). Da in der vorliegenden Arbeit einerseits bei keiner der untersuchten myeloischen Zelllinien Wachstumshemmung ohne Induktion von H-rev107-2 auftrat und auf andererseits fehlende Wachstumshemmung durch fehlende H-rev107-2-Induktion begleitet war, spricht dies für eine Beteiligung von H-rev107-2 bei der Regulation der Myelopoese.

Bei den lymphatischen Zelllinien trat eine H-rev107-2-Induktion ohne Wachstumshemmung ein. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der fehlenden Expression anderer Tumorsuppressoren. So wurde in dieser Arbeit auch die Expression von p21^{WAF1/CIP1} bei den Zelllinien untersucht. IFN- γ induzierte bei den myeloischen Zelllinien neben H-rev107-2 auch p21^{WAF1/CIP1}, dagegen konnte IFN- γ bei den T-ALL-Linien Jurkat und CEM keine p21^{WAF1/CIP1}-Induktion erzielen (Ergebnisse nicht dargestellt). p21^{WAF1/CIP1} spielt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation und verhindert als Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor den Übergang der G1- in die S-Phase (Hunter, 1993). Eine Induktion von p21^{WAF1/CIP1} erfolgt unter anderem über den Interferon-regulierten STAT1-Signalweg (Chin et al., 1996). Diese Induktion ist für eine antiproliferative Wirkung des IFN- γ notwendig (Chen et al., 2000).

5.1.3 Die Einordnung von H-rev107-2 in die Signaltransduktion myeloischer Zellen

Die vorliegende Arbeit zeigte eine Suppression des Klasse-II-Tumorsuppressorgens H-rev107-2 bei AML-Zelllinien. Diese Suppression konnte durch Behandlung der Zellen mit IFN- γ und ATRA, sowie bei U937 mit IFN- α aufgehoben werden. Dies ging mit Proliferationshemmung einher. Interferone und ATRA sind wachstumshemmende und differenzierungsfördernde Wirkstoffe, die in der Hämatologie mit Erfolg klinisch eingesetzt werden. Der Einsatzbereich beider Wirkstoffgruppen ist jedoch auf wenige Krankheitsentitäten begrenzt. So ist die Differenzierungstherapie mit ATRA bisher streng auf die APL mit der Translokation t(15/17) beschränkt. APL-Zellen mit der Translokation t(11/17) sind gegenüber der Monotherapie mit ATRA resistent (Lin et al., 1998) (Grignani et al., 1998). Ein besseres Verständnis der molekularen Veränderung bei hämatopoetischen Zellen im Verlauf der Leukämogenese ist zur Entwicklung neuer Therapieoptionen notwendig. Ein Beispiel hierfür ist der BCR-ABL-Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib zur Behandlung von Patienten mit BCR-ABL-positiven Leukämien (Lee und McCubrey, 2002). Die beiden Proteine MEK1 und JAK2 spielen bei der Weiterleitung proliferativer Signale als Mitglied des MAPK-Signalwegs (MEK1) bzw. als Zytokinrezeptor-gebundenes Signalmolekül (JAK2) eine wichtige Rolle (Winston und Hunter, 1995). Daher bilden beide Moleküle mögliche Ziele zur so genannten *targeted therapy* (Lee und McCubrey, 2002) (Miyamoto et al., 2001). Um weitere Anhaltspunkte zur Einordnung von H-rev107-2 in die Signaltransduktion zu erlangen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der spezifischen Inhibition von MEK1 und JAK2 auf die H-rev107-2-Expression untersucht.

Die H-rev107-2-Expression in den drei AML-Zelllinien NB-4, U937 und HL-60 wurde durch Inkubation mit dem MEK1-Inhibitor PD098059 nicht beeinflusst. Die Aktivität von MEK1 trägt offensichtlich nicht zur Suppression der H-rev107-2-Expression in AML-Zelllinien bei. Auch blieb die H-rev107-2-Induktion durch ATRA oder IFN- γ bei Koinkubation mit PD098059 unverändert. So scheint die MEK-Aktivität nicht an den

H-rev107-2-induzierenden ATRA/ IFN- γ -Signalwegen beteiligt zu sein (siehe Abbildung 5.1). Für eine Unabhängigkeit der H-rev107-2-Expression vom RAF/MEK/ERK-Signalweg sprechen auch vorläufige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe. Hier konnte gezeigt werden, dass H-rev107-2 bei CD34+ hämatopoetischer Stammzellen gesunder Spender nur durch IFN- γ , nicht aber durch G-CSF oder EPO induziert wird (Martin, 2003). G-CSF und EPO aktivieren bei hämatopoetischen Zellen den MAPK-Weg (Bittorf et al., 1994) (Rausch und Marshall, 1999), IFN- γ dagegen den JAK/STAT-Signalweg (Stark et al., 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass in der AML-Zelllinie KG1a IFN- γ nicht die MEK1-Aktivität beeinflusst (Sato et al., 1997).

Während die H-rev107-2-Expression bei den AML-Zelllinien von der MEK1-Aktivität unabhängig war, hat die Expression von H-rev107-2-Protein anscheinend selbst Einfluss auf die MAPK-Aktivität. Zu diesen Ergebnissen kamen Huang et al. bei Zervix- und Magen-Karzinomzellen. Sie erzielten durch ein H-rev107-2-exprimierendes Plasmid eine Aktivitätsminderung von 50- 88 % der MAPK-Substrate c-JUN, ELK1 und CHOP (Huang et al., 2002). Möglicherweise ist H-REV107-2-Protein ein negativer Regulator der MAPK-Signalkaskade (siehe Abbildung 5.1). Diese Vermutung ist gut mit der Tatsache in Einklang zu bringen, dass das zu 51 % homologe H-rev107-1 als ein Antagonist des, die MAPK-Signalkaskade aktivierenden Ras-Onkogens entdeckt wurde (Hajnal et al., 1994).

Der JAK2-Inhibitor AG490 beeinflusste ebenfalls nicht die H-rev107-2-Expression in den drei AML-Zelllinien NB-4, U937 und HL-60. Der Suppression von H-rev107-2 bei den AML-Zelllinien liegt offensichtlich nicht eine verstärkte JAK2-Aktivität zugrunde. Auch blieb die H-rev107-2-Induktion durch ATRA oder IFN- γ bei Koinkubation mit AG490 unbeeinflusst (siehe Abbildung 5.1). Die Phosphorylierung von JAK2 ist demnach nicht an den H-rev107-2-induzierenden ATRA/ IFN- γ -Signalwegen beteiligt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da die Expression von JAK2 für den IFN- γ -Signalweg bei hämatopoetischen Zellen essentiell ist (Parganas et al., 1998). In der

Übersichtsarbeit von Stark et al. wurde die Phosphorylierung von JAK2 für die Aktivierung des IFN- γ -Signalwegs als notwendig bezeichnet (Stark et al., 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dagegen für das Vorhandensein eines von der Phosphorylierung von JAK2 unabhängigen IFN- γ -Signalwegs.

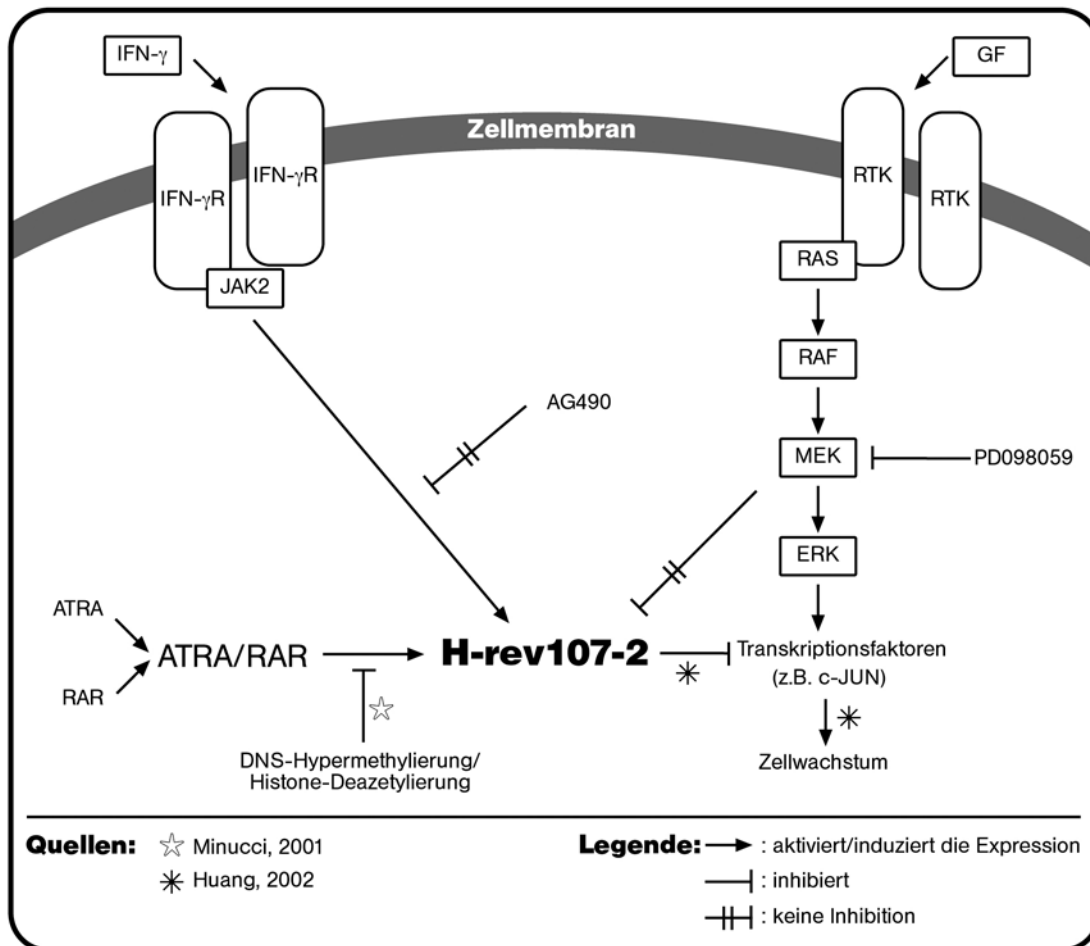


Abbildung 5.1: Basierend auf den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, hypothetische Einordnung von H-rev107-2 in die Signaltransduktion bei den myeloischen Zelllinien NB-4, HL-60 und U937. Mögliche Ursachen der schwachen ATRA-Wirkung bei HL-60 (Minucci, 2001) und die mögliche Funktion des H-REV107-2-Proteins (Huang et al., 2002) sind dargestellt. Abkürzungen: RAR: *retinoic acid receptor*; GF: *growth factor*; IFN- γ R: IFN- γ -Rezeptor.

5.2 Die Expression und Regulation von H-rev107-1 bei malignen hämatopoetischen Zellen

Als zweites Tumorsuppressorgen wurde in dieser Arbeit das zu H-rev107-2 51% homologe H-rev107-1 untersucht. In keiner der acht untersuchten primären Proben von Patienten mit akuten Leukämien wurden H-rev107-1-Transkripte gefunden. In den sieben etablierten Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen war H-rev107-1 bei vier Zelllinien (NB-4, HL-60, Jurkat, Raji) nicht exprimiert. Drei Zelllinien exprimierten H-rev107-1. Dabei handelte es sich mit CEM (T-ALL), K562 (CML im Blastenschub) und U937 (Akute monoblastische Leukämie) um Zelllinien von verschiedenartigen Krankheitsentitäten. Es ergab sich kein Hinweis für eine bevorzugte H-rev107-1-Expression bei malignen lymphatischen oder myeloischen Zelllinien. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben auch Hinweise für eine supprimierte Expression von H-rev107-1 bei Zellen akuter Leukämien. Die von Huang et al. gezeigte supprimierte Expression von H-rev107-1 bei der Zelllinie HL-60 konnte bestätigt werden (Huang et al., 2000). In der murinen Lymphom-Zelllinie WEHI7.1 wurde keine Expression von H-rev107-1 gefunden (Roder et al., 2002). Damit entspricht die Expression von H-rev107-1 bei Zellen der malignen Hämatopoese der von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen gesunder Spender. Sie ist dagegen schwächer als in terminal differenzierten Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen, wie RT-PCR-Analysen in unserer Arbeitsgruppe demonstrierten (Martin, 2003). Bei Northern-Blot-Hybridisierungen kommerzieller RNS-Blots gelang dagegen in gesunden hämatopoetischen Geweben (Leukozyten, Milz, Thymus) nur ein sehr schwacher Nachweis einer H-rev107-1-Expression (Husmann et al., 1998) (Siegrist et al., 2001). Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, ob diese differenten Resultate im gesunden hämatopoetischen Gewebe mit unterschiedlicher Sensitivität der Nachweismethode oder den verschiedenen nachgewiesenen Transkriptsequenzen zu erklären ist. In soliden Geweben hatten Husmann et al. eine Suppression von H-rev107-1 bei malignen Tumorgeweben im Vergleich zum gesunden Gewebe gefunden (Husmann et al., 1998). Zudem gelang der Nachweis einer abnehmenden H-rev107-1-Expression bei invasiven

Hodentumoren im Vergleich zu nicht invasiven Hodentumoren und gesundem Hodengewebe (Siegrist et al., 2001).

Die Expression von H-rev107-1 konnte in der vorliegenden Arbeit nur bei den Zelllinien NB-4 durch ATRA und IFN- γ , sowie bei K562 durch IFN- α und IFN- γ induziert werden. Bei den acht Patientenproben und den Zelllinien Raji, Jurkat und HL-60 trat keine Induktion ein. Huang et al. fanden ebenfalls mittels Northern-Blot-Hybridisierung durch ATRA keine Induktion von H-rev107-1 bei der Zelllinie HL-60. Die Autoren schlossen daraus, dass H-rev107-1 keine Funktion bei der ATRA-induzierten Wachstumshemmung einnimmt (Huang et al., 2000). Diese These kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Frage gestellt werden, da ATRA gerade bei der APL-Zelllinie NB-4 H-rev107-1 induzieren konnte. Die APL mit der Translokation t(15/17), deren Trägerin die Zelllinie NB-4 ist, spricht als einzige akute Leukämie klinisch auf ATRA an, während andere akute Leukämien ATRA-resistent sind (Fenaux und Degos, 1997). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten auch bei CD34+ hämatopoetischen Stammzellen gesunder Spender keine Induktion von H-rev107-1 durch IFN- γ , IFN- α und ATRA (Martin, 2003).

Zusammenfassend lässt der momentane Wissensstand offen, ob H-rev107-1 an der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen bei der Hämatopoese beteiligt ist. Möglicherweise übt H-rev107-1 diese Funktion eher in epithelalem Gewebe, H-rev107-2 dagegen in hämatopoetischem Gewebe aus. Hinweise hierfür geben die gewebespezifischen Expressionsmuster von H-rev107-1 und H-rev107-2 (Husmann et al., 1998).

5.2.1 Mögliche Ursachen der supprimierten H-rev107-1-Expression

Über die Ursachen einer supprimierten H-rev107-1-Expression wurde bisher nur von Roder et al. publiziert (Roder et al., 2002). Da die Datenlage hier so spärlich ist, muss hypothetisch angenommen werden, dass folgende Mechanismen an der geringen Expression von H-rev107-1 bei Zellen akuter Leukämien beteiligt sind: Roder et al.

konnten zeigen, dass die fehlende H-rev107-1-Expression bei der murinen Lymphom-Zelllinie WEHI7.1 durch Hypermethylierung einer CpG-reichen Region am 5'-Ende des H-rev107-1-Gens zustande kommt. Dagegen waren H-rev107-1-Transkripte in verschiedenen gutartigen murinen Geweben und in gutartigen Fibroblasten-Zelllinien nachweisbar. Bei diesen Zellen war die betreffende CpG-reiche Region unmethyliert (Roder et al., 2002). Die Hypermethylierung CpG-reicher DNS-Abschnitte führt zu einer Assoziation dieser DNS-Abschnitte mit so genannten Methyl-CpG-bindenden Proteinen und mit Repressorkomplexen, die eine Histonedezetylase-Aktivität besitzen. Dies führt zu einer Suppression der Transkription des betroffenen Gens (Ballestar und Wolffe, 2001) (Jones et al., 2001). Roder et al. konnten die Bindung zweier Methyl-CpG-bindender Proteine mit Histonedezetylase-Aktivität, MeCP2 und MBD2, am 5'-Ende des H-rev107-1-Gens zeigen. Die Behandlung der WEHI7.1-Zellen mit dem DNS-Methyltransferase-Inhibitor 5'-Aza-2'-desoxycytidin (5-AZA) konnte die Hypermethylierung und die MeCP2/ MBD2-Bindung am H-rev107-1-Gen vollständig aufheben und führte zur Expression von H-rev107-1. Auch die Inhibition der Histonedezetylase durch Trichostatin A (TSA) führte bei WEHI7.1-Zellen zu einer Expression von H-rev107-1 (Roder et al., 2002).

Die Ergebnisse von Roder et al. lassen die Vermutung zu, dass Methyl-DNS-gebundene Repressorkomplexe mit Histonedezetylase-Aktivität an der in der vorliegenden Arbeit gefundenen supprimierten Expression von H-rev107-1 bei Zellen akuter Leukämien beteiligt sind. Es stellt sich daher die Frage, weshalb ATRA bei der APL-Zelllinie NB-4, aber nicht bei der AML-M2-Zelllinie HL-60 H-rev107-1 induzieren konnte. Eine mögliche Antwort geben DiCroce et al. (2002). Sie konnten zeigen, dass das durch die Translokation t(15/17) entstehende Fusionsprotein PML-RAR α bei der Leukämogenese der APL zu einer DNS-Hypermethylierung sowie zu einer Assoziation der DNS mit Methyl-DNS-gebundenen Repressorkomplexen mit Histonedezetylase-Aktivität führt. Die Folge war die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die Retinsäure war hier zur Demethylierung dieser DNS-Abschnitte in der Lage, was zur Reexpression der Tumorsuppressorgene führte (Di Croce et al., 2002). Bei der AML-M2 mit der Translokation AML1-ETO ist Retinsäure dazu nicht in der Lage. Zu diesem Schluss

kamen Ferrara et al. in ihrer Arbeit, bei der sie den Unterschied von Retinsäure-sensitiven APL-Zellen und Retinsäure-resistenten AML-Zellen in Bezug auf die Signaltransduktion der Retinsäure untersuchten. Wie erwartet differenzierten sich nur die APL-Zellen durch Retinsäure in Richtung neutrophiler Granulozyten. Bei den AML-M2- und AML-M4-Zellen war Retinsäure allein dazu nicht in der Lage, dagegen aber die Kombination von Retinsäure und dem HDAC-Inhibitor TSA. Die Autoren vermuten daher, dass die Retinsäure-induzierte Transkription von Genen durch verstärkte HDAC-Aktivität bei AML-M2/ -M4-Blasten verhindert wird. Zudem führte die Expression des für die AML-M2 typischen Fusionsproteins AML1-ETO zu einer Inhibition des Retinsäure-Signalwegs. Auch dieses Phänomen konnte durch die Kombination von Retinsäure und TSA aufgehoben werden. Daher ergibt sich ein möglicher Therapieansatz durch die Kombination von ATRA mit dem HDAC-Inhibitor TSA (Minucci et al., 2001) (Ferrara et al., 2001).

Eine andere Arbeitsgruppe konnte indes zeigen, dass auch durch den demethylierenden Wirkstoff 5-AZA ATRA-resistente AML-Zellen gegenüber der differenzierenden Wirkung des ATRA sensibilisiert werden können. Auch dies war mit der Expression von Tumorsuppressorgen assoziiert, die zuvor durch ATRA bei diesen Zellen nicht induziert werden konnten. Es wurde daher die Möglichkeit dargestellt, mit der Kombination von 5-AZA und ATRA die Indikation für ATRA von der Behandlung der APL auf Hochrisiko-AML erweitern zu können (Niitsu et al., 2001).

5.2.2 Die Induktion von H-rev107-1 durch IRF1

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit der in dieser Arbeit festgestellten fehlenden Induktion von H-rev107-1 bei Zellen akuter Leukämien ist eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors *Interferon regulatory factor 1* (IRF-1) durch Onkoproteine wie Nucleophosmin/ B23 (Hsu und Yung, 2000).

In epithelialen Ovarialkarzinom-Zelllinien konnte H-rev107-1 durch Transfektion eines IRF-1-exprimierenden Plasmids induziert werden. Zusätzlich erzielte die Transfektion

eines H-rev107-1-exprimierenden Plasmids bei einer IFN- γ -sensitiven epithelialen Ovarialkarzinom-Zelllinie eine Proliferationshemmung, die der Proliferationshemmung durch IFN- γ entsprach. Es wurde daher die Vermutung geäußert, dass H-rev107-1-Expression an der antiproliferativen Wirkung des IFN- γ über den Transkriptionsfaktor IRF-1 beteiligt sei (Sers et al., 2002).

IRF-1 ist ein an der Regulation der Myelopoese beteiligter Transkriptionsfaktor (Abdollahi et al., 1991). Da IRF-1 oft bei AML- und präleukämischen MDS-Zellen deletiert ist (Willman et al., 1993), wird eine Beteiligung deregulierter IRF-1-Signale an der Leukämogenese diskutiert. Matikainen et al. zeigten in den AML-Zelllinien NB-4, HL-60 und U937 eine deutliche IRF-1-Induktion durch ATRA und IFN- γ (Matikainen et al., 1996). Da in der vorliegenden Arbeit bei HL-60 H-rev107-1 weder durch IFN- γ noch durch ATRA induziert werden konnte, scheint es bei dieser Zelllinie Mechanismen zu geben, welche eine Induktion (Sers et al., 2002) durch IRF-1 verhindert. Hsu et al. konnten zeigen dass in HL-60-Zellen die differenzierende Wirkung der Retinsäure durch Interaktion von IRF-1-Protein mit dem Protein Nucleophosmin/B23 aufgehoben wird. Die DNS-Bindung und die resultierende Aktivität als Transkriptionsfaktor von IRF-1 wird durch die Assoziation mit Nucleophosmin/ B23 unterbunden (Hsu und Yung, 2000). Kondo et al. fanden Nucleophosmin /B23 sowohl in primären Leukämiezellen als auch in Leukämie-Zelllinien überexprimiert (Kondo et al., 1997). Eine Möglichkeit ist demnach, dass die fehlende H-rev107-1-Expression und -Induktion durch IFN- γ oder ATRA in Zellen akuter Leukämien durch die Inaktivierung von IRF-1 durch Onkoproteine wie Nucleophosmin/B23 zustande kommt. Allerdings wurden in den Zelllinien U937 und K562 sowohl Nucleophosmin/ B23 (Kondo et al., 1997) als auch, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, H-rev107-1 exprimiert. Dies wiederum spricht für die Existenz einer IRF-1-unabhängigen Induktion von H-rev107-1.

5.3 Kritische Betrachtung der Methodik

H-rev107-1 und H-rev107-2 gehören zu den Klasse-II-Tumorsuppressoren (Husmann et al., 1998) (DiSepio et al., 1998), deren Expression häufig in Tumorzellen supprimiert ist. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern eine Zellpopulation „negativ“ in Bezug auf die mRNA der H-rev107-Gene sein kann. Ein negatives Ergebnis bedeutet in diesem Zusammenhang möglicher Weise eine zu geringe Sensitivität der Methode oder zu wenig eingesetztes RNS-Material. Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass beide H-rev107-Gene in Leukozyten des peripheren Bluts mittels RT-PCR konstant nachgewiesen werden, wenn mRNA-Material aus 10^5 Zellen eingesetzt und die PCR mit 33 Zyklen durchgeführt wird. Dies wurde daher als der Untersuchungsstandard bei allen Analysen beibehalten. Die Problematik liegt nun darin, dass weniger Zyklen eine geringere Sensitivität bedeuten, zu viele Zyklen aber die quantitative Aussagekraft der Ergebnisse schwächt. Wenn mit fortgeschrittener Zykluszahl die Menge an cDNA-Kopien hoch ist, werden diese nicht mehr streng exponentiell amplifiziert. Die Bedeutung der Zahl der Zyklen soll mit einem Beispiel verdeutlicht werden: Bei der Patientenprobe 12 wurde nach 24, 29 und 33 Zyklen jeweils die gleiche Menge PCR-Produkt von H-rev107-2 für die Elektrophorese eingesetzt (siehe Abbildung 5.2). Nach 24 Zyklen ist nur im IFN- γ / ATRA-Ansatz eine sehr schwache Bande sichtbar. Nach 29 Zyklen ist dieser Ansatz deutlich stärker positiv als der mit alleiniger ATRA-Inkubation. Der Kontroll- und IFN γ -Ansatz sind immer noch negativ. Nach 33 Zyklen ist die Stärke der IFN- γ / ATRA-Bande nur kaum von der nach 29 Zyklen zu unterscheiden. Der IFN- γ -Ansatz ist nun ebenfalls positiv und von der Stärke nicht vom schon nach 29 Zyklen positiven ATRA-Ansatz zu unterscheiden. Die Kontrolle bleibt negativ. Aber es ist nicht auszuschließen, dass sie nach 40 Zyklen auch positiv würde.

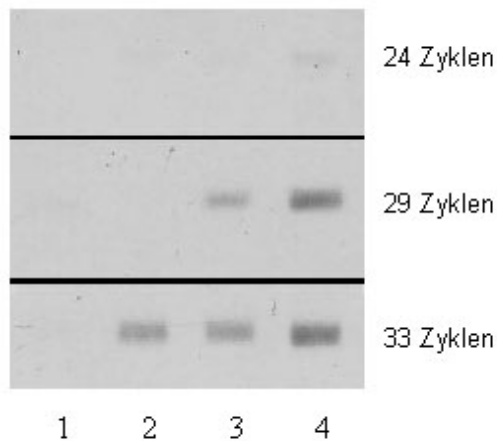


Abbildung 5.2: RT-PCR-Analyse von H-rev107-2 der Patientenprobe 12; Vergleich der Ergebnisse abhängig von der Zykluszahl; 1: Kontrolle; 2: IFN- γ ; 3: ATRA; 4: IFN- γ / ATRA

Trotz dieser möglichen Fehlerquelle zeigten sich keine Unterschiede von RT-PCR- und Northern-Blot-Analysen, so dass wir ebenso wie andere Autoren (Ceol et al., 2001) (Del Prete et al., 1998) die beschriebene RT-PCR für semiquantitativ aussagefähig halten.

5.4 Weiterführende Untersuchungen

Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse haben die Basis für weiterführende Untersuchungen gelegt. Im Einzelnen wäre Folgendes von Interesse:

- Die Untersuchung der H-REV107-2-Expression auf Proteinebene, z.B. mittels Western-Blot oder In-Situ-Hybridisierung. Die bisher zur Verfügung stehenden unpublizierten Antikörper erbrachten keine spezifischen Ergebnisse.
- Die Untersuchung, ob H-rev107-2 durch den Transkriptionsfaktor IRF-1 induziert wird.
- Ob die Induktion von H-rev107-2 und H-rev107-1 bei AML-Zellen durch die Koinkubation von ATRA mit dem DNS-Methyltransferase-Inhibitor 5-AZA oder dem Histonedeaazetylase-Inhibitor TSA verstärkt werden kann.
- Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass H-rev107-2 kein so genanntes *immediate early gene* ist und für seine Induktion die IFN- γ - oder ATRA-induzierte Proteinsynthese notwendig ist. Um diese Vermutung zu verifizieren, sollte die

Zelllinie NB-4 mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximidin inkubiert und anschließend auf eine H-rev107-2-Induktion durch IFN- γ oder ATRA untersucht werden.

- Die Ergebnisse bei den primären Leukämiezellen sollten durch eine größere Zahl von Patientenproben verifiziert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob ein signifikanter Unterschied von AML- zu ALL-Zellen und von CD34+-AML- zu CD34negativen AML-Zellen in Bezug auf die Expression von H-rev107-2 existiert.
- Die Induktion von H-rev107-1 und H-rev107-2 durch ATRA bei der APL-Zelllinie NB-4 sollte nun an primären APL-Zellen verifiziert werden.
- Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nur indirekte Rückschlüsse auf eine Funktion von H-rev107-2 in der Hämatopoese zu. Um direkte Beweise zu erlangen, muss nun die Methode des Gentransfers (Transfektion) genutzt werden. Durch die Transfektion eines H-rev107-2-exprimierenden Plasmids oder eines H-rev107-2-Antisense-Oligonukleotids, könnten der direkte Einfluss von H-rev107-2 auf das Wachstumsverhalten der AML-Zellen untersucht werden. Ein methodisches Problem liegt allerdings in der Transfektion bei myeloischen Zellen, sowohl mit viralen Vektoren, Lipofektion oder Elektroporation (Roddie et al., 2000) (Kusumawati et al., 1999).

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression und die Regulation der Tumorsuppressorgene H-rev107-1 und H-rev107-2 bei malignen hämatopoetischen Zellen untersucht. Dadurch sollten Hinweise auf eine Beteiligung beider Gene bei der Regulation der Hämatopoese gewonnen werden. Zuvor war gezeigt worden, dass H-rev107-1 und H-rev107-2 in den meisten gutartigen humanen Geweben deutlich exprimiert werden und die Expression in verschiedenen Zelllinien solider Tumore und primärer Tumorgewebe supprimiert ist. Für H-rev107-1 war bei Tumorzellen solider Gewebe eine Induktion durch Interferon-gamma (IFN- γ), für H-rev107-2 durch das Retinoid Tazarotene beschrieben. Es wurde die Vermutung einer Beteiligung beider Gene an den antiproliferativen und differenzierenden Effekten von IFN- γ und Retinoiden aufgestellt. Vorläufige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass beide Gene in terminal differenzierten Leukozyten stark exprimiert wurden. Dagegen war die Expression in CD34+ hämatopoetischen Stammzellen schwach.

In der vorliegenden Arbeit wurden in primären Blasten akuter Leukämien und in vier von sieben Zelllinien maligner hämatopoetischer Erkrankungen keine H-rev107-1-Transkripte mittels der Methode der Reversen Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen. Drei der sieben Zelllinien exprimierten H-rev107-1. Dabei gab es keinen Hinweis für eine bevorzugte Expression in lymphatischen oder myeloischen Zellen. Die Expression von H-rev107-1 konnte nur bei den Zelllinien NB-4 (akute Promyelozytenleukämie, APL) durch all-*trans* Retinsäure (ATRA) und IFN- γ sowie bei K562 (CML im Blastenschub) durch Interferon-alpha (IFN- α) und IFN- γ induziert werden. Bei den übrigen Zelllinien und bei den primären Zellen akuter Leukämien konnte die Suppression der H-rev107-1-Expression nicht durch ATRA, IFN- γ oder IFN- α aufgehoben werden.

Eine Expression von H-rev107-2 wurde in acht von 15 Patientenproben mittels RT-PCR gefunden. Die vier myeloischen Zelllinien NB-4, U937, HL-60 und K562 sowie die

Zelllinie Jurkat (T-ALL) waren H-rev107-2 negativ, die Zelllinien CEM (T-ALL) und Raji (Burkitt-Lymphom) exprimierten dagegen dieses Gen. In 14/14 Patientenproben und 7/7 Zelllinien wurde mittels RT-PCR-Analysen eine deutliche Induktion von H-rev107-2 durch IFN- γ gefunden. Die Induktion durch ATRA und IFN- α war schwächer und Zelllinien-spezifisch. Die stärkste Induktion durch ATRA erfolgte bei der APL-Zelllinie NB-4. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf eine additive Wirkung der Kombination von IFN- γ und ATRA.

Die deutliche Induzierbarkeit von H-rev107-2 durch IFN- γ und ATRA wurde durch die Wiederholung der Induktionsexperimente mit anschließender Northern-Blot-Hybridisierung bestätigt. Auch hier hatte IFN- γ einen stärkeren Effekt als ATRA. Ebenfalls wurde eine additive Wirkung der Kombination von IFN- γ und ATRA sichtbar. Am deutlichsten war dieser Effekt bei der Zelllinie NB-4. Eine mit der Zelllinie NB-4 durchgeführte Induktionskinetik offenbarte eine Induktion von H-rev107-2 nach 4- 6 h Inkubation mit IFN- γ oder ATRA, auch hier war ein additiver Effekt der Kombination IFN γ / ATRA sichtbar.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei den myeloischen Zelllinien die Induktion von H-rev107-2 durch ATRA und IFN- γ mit Wachstumshemmung assoziiert war. Bei den lymphatischen Zelllinien trat die H-rev107-2-Induktion durch ATRA und IFN- γ indessen ohne Wachstumshemmung auf.

Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von H-rev107-2 an der Regulation der Hämatopoese, insbesondere der Myelopoese. Bei AML-Zellen war die Expression von H-rev107-2 im Vergleich zu terminal differenzierten Granulozyten und Monozyten supprimiert. Diese Suppression konnte ausnahmslos durch Inkubation mit IFN- γ und, insbesondere bei einer APL-Zelllinie, durch ATRA aufgehoben werden. Sowohl IFN- γ als auch ATRA sind Regulatoren der Myelopoese in

Bezug auf Zellwachstum und Differenzierung. Möglicherweise ist die Induktion von H-rev107-2 an diesen Effekten von IFN- γ und ATRA bei AML-Zellen beteiligt.

Die Inhibition des Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Wegs (MAPK-Wegs) durch den MEK-Inhibitor PD098059 sowie die Inhibition des Zytokinrezeptor-gebundenen Signaltransduktors JAK2 durch den Wirkstoff AG490 hatte bei den untersuchten myeloischen Zelllinien keinen Einfluss auf die H-rev107-2-Expression. Auch wurde die Induktion von H-rev107-2 bei AML-Zellen durch IFN- γ oder ATRA nicht durch Koinkubation mit PD089059 oder AG490 beeinflusst. Im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist es möglich, dass H-REV107-2-Protein selbst ein negativer Regulator der MAPK-Signalkaskade ist. Diese Vermutung ist gut mit der Tatsache zu vereinbaren, dass das zu 51 % homologe H-rev107-1 als ein Antagonist des Ras-Onkogens entdeckt wurde. Zudem deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die Existenz eines von der Phosphorylierung von JAK2 unabhängigen IFN- γ -Signalweg bei AML-Zellen hin.

Literatur

- Abdollahi, A.; Lord, K. A.; Hoffman-Liebermann, B. und Liebermann, D. A. (1991): Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition, *Cell Growth Differ* 2 [8], Seite 401-7.
- Akiyama, H.; Hiraki, Y.; Noda, M.; Shigeno, C.; Ito, H. und Nakamura, T. (1999): Molecular cloning and biological activity of a novel Ha-Ras suppressor gene predominantly expressed in skeletal muscle, heart, brain, and bone marrow by differential display using clonal mouse EC cells, ATDC5, *J Biol Chem* 274 [45], Seite 32192-7.
- Alessi, D. R.; Cuenda, A.; Cohen, P.; Dudley, D. T. und Saltiel, A. R. (1995): PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo, *J Biol Chem* 270 [46], Seite 27489-94.
- Altucci, L.; Rossin, A.; Raffelsberger, W.; Reitmair, A.; Chomienne, C. und Gronemeyer, H. (2001): Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL, *Nat Med* 7 [6], Seite 680-6.
- Ballestar, E. und Wolffe, A. P. (2001): Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression, *Eur J Biochem* 268 [1], Seite 1-6.
- Bittorf, T.; Jaster, R. und Brock, J. (1994): Rapid activation of the MAP kinase pathway in hematopoietic cells by erythropoietin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3, *Cell Signal* 6 [3], Seite 305-11.
- Bonifazi, F.; de Vivo, A.; Rosti, G.; Guilhot, F.; Guilhot, J.; Trabacchi, E.; Hehlmann, R.; Hochhaus, A.; Shepherd, P. C.; Steegmann, J. L.; Kluin-Nelemans, H. C.; Thaler, J.; Simonsson, B.; Louwagie, A.; Reiffers, J.; Mahon, F. X.; Montefusco, E.; Alimena, G.; Hasford, J.; Richards, S.; Saglio, G.; Testoni, N.; Martinelli, G.; Tura, S. und Baccarani, M. (2001): Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders, *Blood* 98 [10], Seite 3074-81.
- Casanova, B.; de la Fuente, M. T.; Garcia-Gila, M.; Sanz, L.; Silva, A.; Garcia-Marco, J. A. und Garcia-Pardo, A. (2001): The class II tumor-suppressor gene RARRES3 is expressed in B cell lymphocytic leukemias and down-regulated with disease progression, *Leukemia* 15 [10], Seite 1521-6.
- Ceol, M.; Forino, M.; Gambaro, G.; Sauer, U.; Schleicher, E. D.; D'Angelo, A. und Anglani, F. (2001): Quantitation of TGF-beta1 mRNA in porcine mesangial cells by comparative kinetic RT/PCR: comparison with ribonuclease protection assay and in situ hybridization, *J Clin Lab Anal* 15 [4], Seite 215-22.
- Chelbi-Alix, M. K. und Pelicano, L. (1999): Retinoic acid and interferon signaling cross talk in normal and RA-resistant APL cells, *Leukemia* 13 [8], Seite 1167-74.
- Chen, B.; He, L.; Savell, V. H.; Jenkins, J. J. und Parham, D. M. (2000): Inhibition of the interferon-gamma/signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21WAF1 promoter region, *Cancer Res* 60 [12], Seite 3290-8.

- Chin, Y. E.; Kitagawa, M.; Su, W. C.; You, Z. H.; Iwamoto, Y. und Fu, X. Y. (1996): Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1, *Science* 272 [5262], Seite 719-22.
- Collins, S. J.; Ruscetti, F. W.; Gallagher, R. E. und Gallo, R. C. (1978): Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 [5], Seite 2458-62.
- Del Prete, D.; Forino, M.; Gambaro, G.; D'Angelo, A.; Baggio, B. und Anglani, F. (1998): A comparative kinetic RT/-PCR strategy for the quantitation of mRNAs in microdissected human renal biopsy specimens, *Exp Nephrol* 6 [6], Seite 563-7.
- Di Croce, L.; Raker, V. A.; Corsaro, M.; Fazi, F.; Fanelli, M.; Faretta, M.; Fuks, F.; Lo Coco, F.; Kouzarides, T.; Nervi, C.; Minucci, S. und Pelicci, P. G. (2002): Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor, *Science* 295 [5557], Seite 1079-82.
- Dimberg, A.; Nilsson, K. und Oberg, F. (2000): Phosphorylation-deficient Stat1 inhibits retinoic acid-induced differentiation and cell cycle arrest in U-937 monoblasts, *Blood* 96 [8], Seite 2870-8.
- DiSepio, D.; Ghosn, C.; Eckert, R. L.; Deucher, A.; Robinson, N.; Duvic, M.; Chandraratna, R. A. und Nagpal, S. (1998): Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [25], Seite 14811-5.
- Du, C.; Redner, R.; Cooke, M. und Lavau, C. (1999): Overexpression of Wild-Type Retinoic Acid alpha Recapitulates Retinoic Acid-Sensitive Transformation of Primary Myeloid Progenitors by Acute Promyelocytic Leukemia RARa-Fusion Gen, *Blood* 94 [2], Seite 793-802.
- Duvic, M.; Helekar, B.; Schulz, C.; Cho, M.; DiSepio, D.; Hager, C.; DiMao, D.; Hazarika, P.; Jackson, B.; Breuer-McHam, J.; Young, J.; Clayman, G.; Lippman, S. M.; Chandraratna, R. A.; Robinson, N. A.; Deucher, A.; Eckert, R. L. und Nagpal, S. (2000): Expression of a retinoid-inducible tumor suppressor, Tazarotene-inducible gene-3, is decreased in psoriasis and skin cancer, *Clin Cancer Res* 6 [8], Seite 3249-59.
- Eaves, Connie J. (1996): Myelopoiesis, Edwards S. Henderson, Andrew Lister, Mel F. Greaves, *Leukemia*, 6. Auflage, Seite 46-64, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Fenaux, P. und Degos, L. (1997): Differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia, *N Engl J Med* 337 [15], Seite 1076-7.
- Ferrara, F. F.; Fazi, F.; Bianchini, A.; Padula, F.; Gelmetti, V.; Minucci, S.; Mancini, M.; Pelicci, P. G.; Lo Coco, F. und Nervi, C. (2001): Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia, *Cancer Res* 61 [1], Seite 2-7.
- Foley, G. E. (1965), *Cancer* 18, Seite 522-529.
- Gianni, M.; Terao, M.; Fortino, I.; LiCalzi, M.; Viggiano, V.; Barbui, T.; Rambaldi, A. und Garattini, E. (1997): Stat1 is induced and activated by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells, *Blood* 89 [3], Seite 1001-12.

- Gilliland, D. G. (1998): Molecular genetics of human leukemia, *Leukemia* 12 Suppl 1, Seite S7-12.
- Green, W. B.; Slovak, M. L.; Chen, I. M.; Pallavicini, M.; Hecht, J. L. und Willman, C. L. (1999): Lack of IRF-1 expression in acute promyelocytic leukemia and in a subset of acute myeloid leukemias with del(5)(q31), *Leukemia* 13 [12], Seite 1960-71.
- Grignani, F.; De Matteis, S.; Nervi, C.; Tomassoni, L.; Gelmetti, V.; Ciocce, M.; Fanelli, M.; Ruthardt, M.; Ferrara, F. F.; Zamir, I.; Seiser, C.; Lazar, M. A.; Minucci, S. und Pelicci, P. G. (1998): Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia, *Nature* 391 [6669], Seite 815-8.
- Hajnal, A.; Klemenz, R. und Schafer, R. (1994): Subtraction cloning of H-rev107, a gene specifically expressed in H-ras resistant fibroblasts, *Oncogene* 9 [2], Seite 479-90.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer, *Cell* 100 [1], Seite 57-70.
- Hansen, L. A.; Sigman, C. C.; Andreola, F.; Ross, S. A.; Kelloff, G. J. und De Luca, L. M. (2000): Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy, *Carcinogenesis* 21 [7], Seite 1271-9.
- Higuchi, E.; DiSepio, D.; Nagpal, S.; Chandraratna, R.; Hong, W. und Lotan, R. (2001): Induction of the putative Tumor Suppressor TIG3 in Human Head and Neck and Lung Cancer Cell Lines by Interferons, 92 Annual Meeting, American Association of Cancer Research, New Orleans.
- Hsu, C. Y. und Yung, B. Y. (2000): Over-expression of nucleophosmin/B23 decreases the susceptibility of human leukemia HL-60 cells to retinoic acid-induced differentiation and apoptosis, *Int J Cancer* 88 [3], Seite 392-400.
- Huang, S. L.; Shyu, R. Y.; Yeh, M. Y. und Jiang, S. Y. (2000): Cloning and characterization of a novel retinoid-inducible gene 1(RIG1) deriving from human gastric cancer cells, *Mol Cell Endocrinol* 159 [1-2], Seite 15-24.
- Huang, S. L.; Shyu, R. Y.; Yeh, M. Y. und Jiang, S. Y. (2002): The retinoid-inducible gene I: effect on apoptosis and mitogen-activated kinase signal pathways, *Anticancer Res* 22 [2A], Seite 799-804.
- Hughes, P. J. und Stanway, G. (2000): The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation, *J Gen Virol* 81 Pt 1, Seite 201-7.
- Hunter, T. (1993): Braking the cycle, *Cell* 75 [5], Seite 839-41.
- Hunter, Tony (2000): Signalling - 2000 and Beyond, *Cell* 100, Seite 113-127.
- Husmann, K.; Sers, C.; Fietze, E.; Mincheva, A.; Lichter, P. und Schafer, R. (1998): Transcriptional and translational downregulation of H-REV107, a class II tumour suppressor gene located on human chromosome 11q11-12, *Oncogene* 17 [10], Seite 1305-12.
- Jones, P. L.; Sachs, L. M.; Rouse, N.; Wade, P. A. und Shi, Y. B. (2001): Multiple N-CoR complexes contain distinct histone deacetylases, *J Biol Chem* 276 [12], Seite 8807-11.
- Kondo, T.; Minamino, N.; Nagamura-Inoue, T.; Matsumoto, M.; Taniguchi, T. und

- Tanaka, N. (1997): Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity, *Oncogene* 15 [11], Seite 1275-81.
- Kuchinke, W.; Hart, R. P. und Jonakait, G. M. (1995): Identification of mRNAs regulated by interferon-gamma in cultured rat astrocytes by PCR differential display, *Neuroimmunomodulation* 2 [6], Seite 347-55.
- Kumar, R. und Korutla, L. (1995): Growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia NB-4 cells by interferons and all-trans retinoic acid: trans-modulation of inducible gene expression pathways, *Anticancer Res* 15 [2], Seite 353-60.
- Kusumawati, A.; Commes, T.; Liautard, J. P. und Widada, J. S. (1999): Transfection of myelomonocytic cell lines: cellular response to a lipid-based reagent and electroporation, *Anal Biochem* 269 [1], Seite 219-21.
- Labrecque, J.; Allan, J.; Chambon, P.; Iscove, N.; Lohnes, D. und Hoang, T. (1999): Impaired Granulocytic Differentiation In Vitro in Hematopoietic Cells Lacking Retinoic Acid Receptor alpha1 and gamma, *Blood* 92 [2], Seite 607-615.
- Lanotte, M.; Martin-Thouvenin, V.; Najman, S.; Balerini, P.; Valensi, F. und Berger, R. (1991): NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3), *Blood* 77 [5], Seite 1080-6.
- Lee, E. Y. (1991): Tumor suppressor genes: a new era for molecular genetic studies of cancer, *Breast Cancer Res Treat* 19 [1], Seite 3-13.
- Lee, J.T. und McCubrey, J.A. (2002): The Raf/MEK/ERK signal cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia, *Leukemia* 16 [4], Seite 486-507.
- Lin, R. J.; Nagy, L.; Inoue, S.; Shao, W.; Miller, W. H., Jr. und Evans, R. M. (1998): Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia, *Nature* 391 [6669], Seite 811-4.
- Liu, T. X.; Zhang, J. W.; Tao, J.; Zhang, R. B.; Zhang, Q. H.; Zhao, C. J.; Tong, J. H.; Lanotte, M.; Waxman, S.; Chen, S. J.; Mao, M.; Hu, G. X.; Zhu, L. und Chen, Z. (2000): Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, *Blood* 96 [4], Seite 1496-504.
- Lozzio, B. B. und Lozzio, C. B. (1977): Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia, *Int J Cancer* 19 [1], Seite 136.
- Martin, Thomas (2003): Dissertation in Vorbereitung
- Maschmeyer, G., Herrmann, F. (1997): Zytokine, hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Signaltransduktion, Ostendorf, P. C., Seeber, S., *Hämatologie/Onkologie* Seite 185-187, Urban und Schwarzenberg, München.
- Matikainen, S.; Ronni, T.; Hurme, M.; Pine, R. und Julkunen, I. (1996): Retinoic acid activates interferon regulatory factor-1 gene expression in myeloid cells, *Blood* 88 [1], Seite 114-23.
- Matikainen, S.; Ronni, T.; Lehtonen, A.; Sareneva, T.; Melen, K.; Nordling, S.; Levy, D. E. und Julkunen, I. (1997): Retinoic acid induces signal transducer and activator of transcription (STAT) 1, STAT2, and p48 expression in myeloid leukemia cells and enhances their responsiveness to interferons, *Cell Growth Differ* 8 [6], Seite 687-98.
- Meydan, N.; Grunberger, T.; Dadi, H.; Shahar, M.; Arpaia, E.; Lapidot, Z.; Leeder, J.

- S.; Freedman, M.; Cohen, A.; Gazit, A.; Levitzki, A. und Roifman, C. M. (1996): Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor, *Nature* 379 [6566], Seite 645-8.
- Minucci, S.; Nervi, C.; Lo Coco, F. und Pelicci, P. G. (2001): Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias?, *Oncogene* 20 [24], Seite 3110-5.
- Miyamoto, N.; Sugita, K.; Goi, K.; Inukai, T.; Lijima, K.; Tezuka, T.; Kojika, S.; Nakamura, M.; Kagami, K. und Nakazawa, S. (2001): The JAK2 inhibitor AG490 predominantly abrogates the growth of human B-precursor leukemic cells with 11q23 translocation or Philadelphia chromosome, *Leukemia* 15 [11], Seite 1758-68.
- Niitsu, N.; Hayashi, Y.; Sugita, K. und Honma, Y. (2001): Sensitization by 5-aza-2'-deoxycytidine of leukaemia cells with MLL abnormalities to induction of differentiation by all-trans retinoic acid and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3, *Br J Haematol* 112 [2], Seite 315-26.
- Parganas, E.; Wang, D.; Stravopodis, D. und Ihle, J. (1998): Jak2 Is Essential for Signaling through a Variety of Cytokine Receptors, *Cell* 93 [May 1], Seite 385-395.
- Pelicano, L.; Li, F.; Schindler, C. und Chelbi-Alix, M. K. (1997): Retinoic acid enhances the expression of interferon-induced proteins: evidence for multiple mechanisms of action, *Oncogene* 15 [19], Seite 2349-59.
- Platanias, L. C. und Fish, E. N. (1999): Signaling pathways activated by interferons, *Exp Hematol* 27 [11], Seite 1583-92.
- Pulvertaft, R. J. V. (1964): Cytology of Burkitt's Tumor, *Lancet* 1 [238], Seite 238-240.
- Rausch, O. und Marshall, C. J. (1999): Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation, *J Biol Chem* 274 [7], Seite 4096-105.
- Roddie, P. H.; Paterson, T. und Turner, M. L. (2000): Gene transfer to primary acute myeloid leukaemia blasts and myeloid leukaemia cell lines, *Cytokines Cell Mol Ther* 6 [3], Seite 127-34.
- Roder, K.; Latasa, M. J. und Sul, H. S. (2002): Silencing of the mouse H-rev107 gene encoding a class II tumor suppressor by CpG methylation, *J Biol Chem* 277 [7], Seite 7.
- Rousselot, P.; Hardas, B.; Patel, A.; Guidez, F.; Gaken, J.; Castaigne, S.; Dejean, A.; de The, H.; Degos, L.; Farzaneh, F. und et al. (1994): The PML-RAR alpha gene product of the t(15;17) translocation inhibits retinoic acid-induced granulocytic differentiation and mediated transactivation in human myeloid cells, *Oncogene* 9 [2], Seite 545-51.
- Sager, R. (1997): Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [3], Seite 952-5.
- Sato, T.; Selleri, C.; Young, N. S. und Maciejewski, J. P. (1997): Inhibition of interferon regulatory factor-1 expression results in predominance of cell growth stimulatory effects of interferon-gamma due to phosphorylation of Stat1 and Stat3, *Blood* 90 [12], Seite 4749-58.

- Schaefer, H.-E., Riede U.-N., Herbst E. W. (1993): Leukämien, Riede U.-N., Schaefer H.-E., Allgemeine und spezielle Pathologie, 3th. Auflage, Seite 544-552, Thieme, Stuttgart, New York.
- Schneider (1977), *Int. J. Cancer* 19, Seite 621-626.
- Selleri, C.; Maciejewski, J. P.; Sato, T. und Young, N. S. (1996): Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition, *Blood* 87 [10], Seite 4149-57.
- Sers, C.; Emmenegger, U.; Husmann, K.; Bucher, K.; Andres, A. C. und Schafer, R. (1997): Growth-inhibitory activity and downregulation of the class II tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors, *J Cell Biol* 136 [4], Seite 935-44.
- Sers, C.; Husmann, K.; Nazarenko, I.; Reich, S.; Wiechen, K.; Zhumabayeva, B.; Adhikari, P.; Schroder, K.; Gontarewicz, A. und Schafer, R. (2002): The class II tumour suppressor gene H-REV107-1 is a target of interferon-regulatory factor-1 and is involved in IFNgamma-induced cell death in human ovarian carcinoma cells, *Oncogene* 21 [18], Seite 2829-39.
- Shyu, R. Y.; Jiang, S. Y.; Chou, J. M.; Shih, Y. L.; Lee, M. S.; Yu, J. C.; Chao, P. C.; Hsu, Y. J. und Jao, S. W. (2003): RARRES3 expression positively correlated to tumour differentiation in tissues of colorectal adenocarcinoma, *Br J Cancer* 89 [1], Seite 146-51.
- Siegrist, S.; Feral, C.; Chami, M.; Solhonne, B.; Mattei, M. G.; Rajpert-De Meyts, E.; Guellaen, G. und Bulle, F. (2001): hH-Rev107, a class II tumor suppressor gene, is expressed by post-meiotic testicular germ cells and CIS cells but not by human testicular germ cell tumors, *Oncogene* 20 [37], Seite 5155-63.
- Stark, G. R.; Kerr, I. M.; Williams, B. R.; Silverman, R. H. und Schreiber, R. D. (1998): How cells respond to interferons, *Annu Rev Biochem* 67, Seite 227-64.
- Sundstrom, C. und Nilsson, K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937), *Int J Cancer* 17 [5], Seite 565-77.
- Tanaka, K.; Eguchi, M.; Eguchi-Ishimae, M.; Hasegawa, A.; Ohgami, A.; Kikuchi, M.; Kyo, T.; Asaoku, H.; Dohy, H. und Kamada, N. (2001): Restricted chromosome breakpoint sites on 11q22-q23.1 and 11q25 in various hematological malignancies without MLL/ALL-1 gene rearrangement, *Cancer Genet Cytogenet* 124 [1], Seite 27-35.
- Willman, C. L.; Sever, C. E.; Pallavicini, M. G.; Harada, H.; Tanaka, N.; Slovak, M. L.; Yamamoto, H.; Harada, K.; Meeker, T. C.; List, A. F. und et al. (1993): Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia, *Science* 259 [5097], Seite 968-71.
- Winston, L. A. und Hunter, T. (1995): JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone, *J Biol Chem* 270 [52], Seite 30837-40.