

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
(Department) Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Expression des Leukotrien-Rezeptors CysLT1  
bei der akuten myeloischen und lymphatischen Leukämie  
und Wirkung seines Liganden auf Aktinpolymerisation und  
Chemotaxis**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Christina Rether**

**aus**

**Pforzheim**

**2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Möhle

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. T. Haferlach

*Meinem Großvater*

Teile dieser Arbeit sind unter folgendem Titel veröffentlicht:

Rether C., Hengstebeck S., Xingkui X., Böhmler A., Kanz L., Seitz G., Möhle R. (2006):

The G-protein-coupled receptor CysLT1 is expressed in acute myeloid leukemia mediating cell migration and survival.

Abstract # 1933, 2006 Annual Meeting of the American Society of Hematology Abstracts.

## Inhalt

### I Einleitung

1. Die Hämatopoese.....S.2  
SDF-1 und sein Rezeptor CXCR4.....S.6  
Leukotriene und der Leukotrienrezeptor CysLT1.....S.7
2. Leukämien.....S.12
3. Ziele der Arbeit.....S.24

### II Material und Methoden

1. Chemikalien, Enzyme und Seren.....S.25
2. Kits.....S.26
3. Gebrauchswaren.....S.26
4. Lösungen.....S.26
5. Sonstige Lösungen.....S.27
6. Geräte.....S.28
7. Anreicherung der leukämischen Zellen.....S.29
8. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....S.30
9. Messung der Fluoreszenz am Durchflusszytometer (FACS).....S.30
10. Einfluss von Leukotrien D<sub>4</sub> auf das Zytoskelett.....S.31
11. Real-time Polymerase-Kettenreaktion.....S.32
12. Chemotaxis-Assay.....S.36
13. Statistische Analyse.....S.38
14. Patientencharakterisika.....S.39

### III Ergebnisse

1. RT-PCR-Analyse der CysLT1- mRNA-Expression in humanen AML-  
und ALL-Zellen.....S.40
2. LTD<sub>4</sub>-induzierte Aktinpolymerisation bei akut leukämischen Zellen....S.41
3. Funktionelle Untersuchung zur Wirkung von LTD<sub>4</sub> auf das  
migratorische Verhalten von akut leukämischen Zellen.....S.45

### IV Diskussion.....S.48

### V Literatur.....S.53

# **I Einleitung**

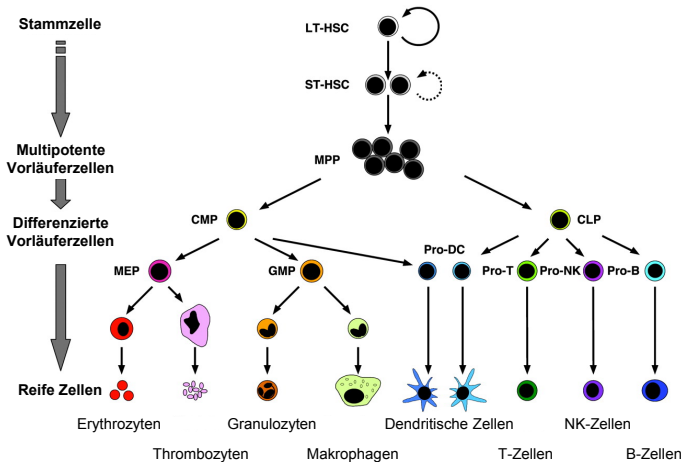
## **1. Die Hämatopoese**

Die Blutbildung findet beim gesunden Erwachsenen in nur circa 30% des Knochenmarks, dem so genannten roten Mark, statt. Dieses befindet sich in den flachen Knochen des Kopfes, des Beckens, sowie der Rippen, in den Wirbelkörpern und in den proximalen Anteilen der langen Röhrenknochen. Während der Embryonalentwicklung bilden sich in der dritten Woche im Dottersack und in der ebenfalls aus mesodermalen Zellen entstandenen Aorta-Gonado-Mesonephros-Region Zellinseln mit hämatopoetischer Aktivität (mesoblastische Hämatopoese). Es wird angenommen, dass mesodermale Zellen während der Gastrulation in beide Regionen einwandern und dort parallel den Beginn der Hämatopoese initiieren (duales Stammzellmodell; Godin et al., 1995). In der sechsten Woche wandern die hämatopoetischen Zellen in Leber und Milz aus (hepatolienale Hämatopoese) (Yoder & Palis, 2001). Erst ab dem fünften Fetalmonat übernimmt das Knochenmark den überwiegenden Teil der Blutbildung (medulläre Hämatopoese). Beim Neugeborenen wird zunächst in fast allen Knochen Blut gebildet. Mit dem weiteren Knochenwachstum wandelt sich dann das rote Knochenmark in den Diaphysen der langen Knochen in fettzellhaltiges gelbes Knochenmark um (Schiebler et al., 1999).

Dieser embryologische Hintergrund macht verständlich, dass sich das rote Mark beim Erwachsenen bei chronisch erhöhtem Zellbedarf auf Kosten des gelben Fettmarks auszudehnen vermag und selbst in Leber und Milz wieder Blut gebildet werden kann (extramedulläre Hämatopoese).

Die Hämatopoese umfasst zum einen die Myelopoese, zum anderen die Lymphopoese und die Erythropoese. Alle peripheren Blutzellen stammen dabei von wenigen pluripotenten Stammzellen ab. Diese besitzen die Fähigkeit zur Selbstreplikation mit Bildung von Tochterstammzellen und können sich in alle Richtungen der Hämatopoese differenzieren. Über mehrere Zwischenstufen, bei denen die Pluripotenz zunehmend eingeschränkt wird, entstehen Kolonie bildende Einheiten zum einen für Granulozyten, erythroide Kolonien, Monozyten und Makrophagen (colony-forming unit; daher CFU-GEMM genannt), zum anderen die lymphoiden Vorläuferzellen, aus denen sich über B- bzw. T-Zell-Progenitoren B- und T-Zellen entwickeln. Die myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich einerseits zu myelomonozytären Vorläuferzellen (GMP), die sich zu Granulozyten und Makrophagen differenzieren, und andererseits zu megakaryozytär-erythroiden Progenitoren (MEP), aus

denen Megakaryozyten, Thrombozyten und Erythrozyten entstehen. Die folgende Graphik bietet einen zusammenfassenden Überblick über das hierarchische Modell der Hämatopoese<sup>1</sup>:



**Abbildung 1: Modell der Hämatopoese.** Hämatopoetische Stammzellen können unterteilt werden in zur unbegrenzten Erneuerung fähige *long-term hematopoietic stem cells* (LT-HSC) und in *short-term* (ST-) HSC, die sich zu multipotenten Progenitoren (MPP) differenzieren. Diese haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren. Aus ihnen gehen die ersten liniendifferenzierten Vorläuferzellen hervor (*common myeloid progenitor* (CMP) und *common lymphoid progenitor* (CLP)). Die CLP differenzieren sich zu T- und B-Lymphozyten sowie zu Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), während die CMP einerseits myelo-monozytäre Vorläuferzellen (GMP), die sich zu Granulozyten und Makrophagen entwickeln, und andererseits megakaryozytär-erythroide Progenitoren (MEP) hervorbringen, die sich zu Megakaryozyten bzw. Thrombozyten und zu Erythrozyten entwickeln. Dendritische Zellen können sich sowohl aus CMP als auch aus CLP entwickeln. Nach Passegue et al. (2003), verändert.

Es sei hier darauf hingewiesen, dass Stammzellen sich nicht im eigentlichen Sinne *morphologisch* charakterisieren lassen, sondern *funktionell* charakterisiert werden: Sie sind in der Lage, identische Nachkommen zu generieren, sich in verschiedene Blutzelllinien zu differenzieren und nach Transplantation im Empfänger dessen Hämatopoese komplett zu rekonstruieren (Dexter und Spooncer, 1987; Lemischka et al., 1986; Verfaillie et al., 2002). Grundlage der Stammzelltransplantation ist die mutmaßliche Fähigkeit der Stammzellen,

<sup>1</sup> Böhmler, Andreas: Die Wirkung chemotaktischer Faktoren auf hämatopoetische Stammzellen, leukämische Zellen und das Mikromilieu des Knochenmarks. Logos Verlag Berlin, 2005, S.2

unter physiologischen Bedingungen aus dem Knochenmark in die Zirkulation zu gelangen (Mobilisierung). Sie sind in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut nachweisbar (Berenson et al., 1988; McCredie et al., 1971; To et al., 1997). Dieses Phänomen wird verstärkt nach einer zytotoxischen Schädigung beobachtet und spiegelt das Potential dieser Zellen zur Geweberegeneration wider (Wright et al., 2001). Der Übergang von Vorläuferzellen in die Zirkulation kann durch die exogene Gabe von G-CSF (Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor) induziert und klinisch zur Gewinnung 'mobilisierter' Stammzellen genutzt werden (Dührsen et al., 1988; To et al., 1997). Die Rückkehr der hämatopoetischen Stammzellen ins Knochenmark an anderer Stelle wird als *Homing* bezeichnet.

Als Standard für den Nachweis humaner hämatopoetischer Stammzellen haben sich immundefiziente NOD/SCID-Mäuse (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency) etabliert (Greiner et al., 1998).

Das Oberflächenglykoprotein CD 34 kennzeichnet eine Population hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark, die zwar in unterschiedlichem Maße bereits liniendeterminiert, aber noch nicht zu reifen Blutzellen ausdifferenziert sind (Holyoake et Alcorn, 1994). Die Gesamtpopulation dieser CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen reicht aus, um in einem Individuum eine vollständige Hämatopoese aufzubauen (Berenson et al., 1988). Wird zusätzlich zu dem Oberflächenmarker CD34 auch das Molekül CD38 exprimiert, so gilt dies als Zeichen einer eher weiter fortgeschrittenen Differenzierung der Zellen.

Durch die maligne Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen entstehen die akuten Leukämien und die chronisch myeloische Leukämie (siehe Abschnitt I.2), entsprechend wird die Existenz einer maligne transformierten 'leukämischen Stammzelle' diskutiert (Passegué et al., 2003), die viele der charakteristischen Eigenschaften der normalen primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen teilt (Small, 2006).

Der unterschiedliche Ausreifungsgrad der ins periphere Blut ausgeschwemmten leukämischen Blasten spiegelt hierbei die verschiedenen Differenzierungsstadien der gesunden Blutzellen wider. Dabei gelingt die Unterscheidung der einzelnen Phänotypen durch die Expression stadienspezifischer Zellmarker, die als „*Cluster of Differentiation*“ (CD) bezeichnet werden, wie CD3, CD7 (T-Zell-Reihe), CD19, CD22 (B-Zell-Reihe), CD33, CD13 (myeloische Zellen) und CD34 (normale Vorläuferzellen (siehe oben) und akute Leukämiezellen, insbesondere bei der AML).



Das für die Hämatopoese nötige Mikromilieu wird von den im Knochenmark vorhandenen Fibroblasten, Adipozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Osteoblasten und Osteoklasten bestimmt (Lüllmann-Rauch, 2003). Über diverse Adhäsionsmoleküle ( u.a. CD 44, das Hyaluronsäure erkennt, CD 31, ein heparinbindendes Protein (Chan & Watt, 2001; Watt et al., 1993), mehrere Sialomucine sowie Integrine und Selektine (=Calcium-abhängige Proteine, deren Liganden Kohlenhydratpitope bestimmter Glykoproteine auf Leukozyten und Endothelzellen darstellen) ) stehen die Stamm- und Vorläuferzellen mit diesen Stromazellen in Kontakt. Bereits 1996 konnte die Expression des P-Selektin- Liganden PSGL-1 auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen nachgewiesen werden (Tracy et al.). Unter anderem für P-Selektin wurde gezeigt, dass es am *Rolling* hämatopoetischer Vorläuferzellen entlang von Endothelzellen und ihrem Knochenmark-*Homing* beteiligt ist (Frenette et al.,1998; Mazo et al., 1998). Werden E- und P-Selektin blockiert, so führt dies *in vivo* sogar zur Mobilisierung von CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut (Frenette et Weiss, 2000). In diesem Zusammenhang wichtige Vertreter der Integrin-Familie sind die Moleküle ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) mit seinem Liganden LFA-1 (*leukocyte function-associated molecule-1*) auf Leukozyten und VCAM-1 (*Vascular Adhesion Molecule-1*) auf aktivierten Endothelzellen mit seinem Liganden VLA-4 (*very late antigen-4*) (Bevilacqua,1993; Springer, 1994).

Sowohl Integrine als auch Selektine spielen nicht nur bei transendothelialen Migrationsprozessen hämatopoetischer Vorläuferzellen, sondern auch bei Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle (siehe unten).

Das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Zelluntergang wird durch regulatorische Polypeptide, die Zytokine, geregelt. Zu den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gehört beispielsweise das von T-Lymphozyten produzierte Interleukin 3, das bei der Entwicklung der Granulozyten von Bedeutung ist, ferner die *colony stimulating factors* (diesen wird in der Regel ein Präfix vorangestellt, das die unter dem stimulierenden Einfluss gebildete Zellpopulation angibt, also GM-CSF für Granulozyten und Makrophagen usw.), das hauptsächlich in der Niere gebildete Erythropoetin und das in Leber und Niere gebildete Thrombopoetin als Wachstumsfaktoren für die Erythro- beziehungsweise Thrombopoese. Die Interleukine, die nicht nur in der Hämatopoese, sondern auch bei der Regulation der Immunabwehr, bei Entzündungsreaktionen und beim programmierten Zelltod, der Apoptose, eine wichtige Rolle spielen, wirken dabei über Rezeptoren, die auf der zytoplasmatischen Seite mit Tyrosinkinase der Janus-Familie gekoppelt sind und als

Effektorproteine STAT-Transkriptionsfaktoren (*signal transducer and activator of transcription*) aktivieren (Löffler et al., 2003).

Darüber hinaus wirken Leukotriene und das Chemokin SDF-1 als parakrine Faktoren. Beide sind Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und sollen an dieser Stelle etwas genauer besprochen werden, da sie in den Versuchen der vorliegenden Doktorarbeit Verwendung gefunden haben.

#### SDF-1 und sein Rezeptor CXCR4

SDF-1 (= *stromal cell derived factor 1*) ist ein von den Knochenmarkstromazellen produziertes Zytokin, das strukturelle Ähnlichkeit mit dem für die chemotaktisch gerichtete Granulozytenwanderung im Zuge der Entzündungsreaktion wichtigen Interleukin 8 aufweist (Tashiro et al., 1993). SDF besitzt potente chemotaktische Wirkung auf reife mononukleäre Leukozyten, aber auch auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (Möhle et al., 2001). Die spezifischen Funktionen von SDF-1 werden über den Rezeptor CXCR4 vermittelt, dessen synonym gebrauchter Name „Fusin“ sich aus seiner Funktion als Kofaktor beim Eindringen des HIV-1-Virus in T-Helferzellen erklärt (Feng et al., 1996). Wie CysLT1 (siehe S.7) gehört auch CXCR4 zur Familie der Sieben-Transmembran-Rezeptoren.

Die gezielte Ausschaltung von SDF-1 bzw. seines Rezeptors in entsprechenden *knockout*-Mäusen führt zu einer drastischen Reduktion der Anzahl der B-Zell-Vorläuferzellen bei der embryonalen Hämatopoese und zu einer Beeinträchtigung der Knochenmarkmyeloopoese (Nagasawa et al., 1996; Zou et al., 1998). Daneben wurden bei diesen *knockout*-Mäusen auch Effekte von SDF-1 auf nichthämatopoetische Zellen deutlich: Die Herzentwicklung der Tiere war gestört, was sich in ventrikulären Septumdefekten äußerte (Nagasawa et al., 1996) und auch die Migration neuronaler Zellen, sowie die Vaskularisierung des Gastrointestinaltraktes waren beeinträchtigt (Ma et al., 1998; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998).

In *in vitro* Modellen konnte seine Bedeutung für die transendotheliale Migration hämatopoetischer Vorläuferzellen gezeigt werden (Aiuti et al., 1997). Ferner ist bekannt, dass SDF-1 innerhalb des Vorgangs des Knochenmarkhomings (siehe oben) eine Rolle spielt, wobei auf den Vorläuferzellen exprimierte Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Integrine aktiviert werden: SDF-1 führt zu einer verstärkten Affinität von Rezeptoren der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrin Subfamilien. Dabei sind vor allem VLA-4 und VLA-5 am eigentlichen Transmigrationsprozess der Vorläuferzellen und deren Einwanderung in die hämatopoetischen Nischen des Knochenmarks beteiligt (Peled et al., 1999 und 2000; Yahata et al., 2003).

Die Expression von CXCR4 auf CD 34<sup>+</sup> Zellen in seiner funktionell aktiven Form konnte 1998 von Möhle et al. nachgewiesen werden.

Zirkulierende CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Vorläuferzellen reagieren auf SDF mit einer dosisabhängigen intrazellulären Kalziummobilisation, die einen ersten Schritt der G-Protein gekoppelten Signalkaskade darstellt, in deren Verlauf monomeres globuläres Aktin zu filamentösem Aktin polymerisiert und so Veränderungen des Zytoskeletts hervorruft, die letztendlich zu einer Bewegung der Zelle in Richtung der höheren Konzentration des entsprechenden Liganden führen (Chemotaxis) (Möhle et al., 2001).

Obwohl SDF-1 nachweislich eine tragende Rolle beim *Homing* hämatopoetischer Vorläuferzellen spielt, lassen experimentelle Daten auf die Beteiligung weiterer chemotaktischer Faktoren und G-Protein gekoppelter Rezeptoren schließen: Die Transplantation fetaler Leberzellen aus CXCR4<sup>-/-</sup> Mäusen in letal bestrahlte Rezipientenmäuse führte trotzdem zu einer Einwanderung dieser Zellen ins Knochenmark, allerdings mit stark verringerter Anzahl an B-Zell- und Granulozytenvorläufern (Kawabata et al., 1999; Ma et al., 1999; Rosu-Myles et al., 2000).

Auch auf malignen CD34<sup>+</sup> myeloiden und lymphatischen Vorläuferzellen (so zum Beispiel bei AML- und ALL-Zellen) wurde die CXCR4-Expression in Abhängigkeit von deren Differenzierungsgrad nachgewiesen (Möhle et al., 2000).

Bei B-ALL-Zellen vermittelt CXCR4 nicht nur die Migration ins Knochenmark von NOD/SCID-Mäusen (Spiegel et al., 2004), sondern auch die Interaktion der leukämischen Zellen mit Fibronektin und VCAM-1 (Shen et al., 2001). Auch für das anschließende Überleben und die Proliferation der malignen Zellen im Knochenmark spielt CXCR4 eine wichtige Rolle (Burger et al., 2000), wohingegen durch Inkubation von B-ALL-Zellen mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100, der die Anlagerung von SDF-1 an seinen Rezeptor verhindert, die stromaabhängige Proliferation der malignen Zellen reduziert werden konnte (Juarez et al., 2003).

### Leukotriene und der Leukotrien-Rezeptor CysLT1

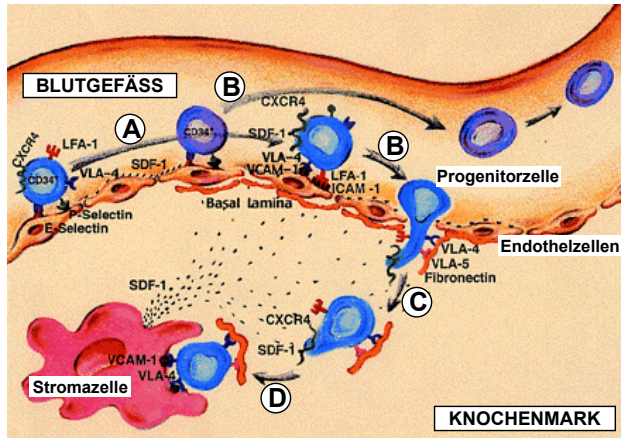
Leukotriene gehören zusammen mit den Prostaglandinen und Thromboxanen zur Gruppe der Eikosanoide. Sie werden mit Hilfe der Lipoxygenasen aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere der Arachidonsäure (einer Eikosatetraensäure; griech. *eicos* = 20, also einer Fettsäure mit zwanzig C-Atomen und vier Doppelbindungen), hergestellt. Die Expression des Schlüsselenzyms der Leukotrienbiosynthese, der 5-Lipoxygenase, wurde sowohl bei

hämatopoetischen Vorläuferzellen als auch bei reifen Leukozyten nachgewiesen. Der funktionell aktive Leukotrien D<sub>4</sub>-Rezeptor CysLT1 wird hingegen vorzugsweise auf unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Bautz et al., 2001).

Bei einer Reihe von entzündlichen Phänomenen spielen Leukotriene eine Schlüsselrolle: Sie erhöhen die Kapillarpermeabilität und führen zu Ödemen, wirken chemotaktisch auf Leukozyten (König et al., 1990; Samuelsson, 1981) und gehören zu den stärksten Konstriktoren der Bronchialmuskulatur (Leukotrien C<sub>4</sub> ist zum Beispiel 100-1000 mal wirksamer als Histamin und spielt bei der Entstehung von Asthmaanfällen eine entscheidende Rolle (Löffler et al., 2003)). Interessanterweise überstanden *knock-out*-Mäuse, bei denen das Gen für die Lipoxigenase ausgeschaltet worden war, und die folglich keine Leukotriene mehr synthetisieren konnten, experimentell hergestellte Schock- und Entzündungsreaktionen besser als die Wildtypmäuse (Löffler et al., 2003); die eigentliche physiologische Funktion der Leukotriene ist also nach wie vor nicht vollständig geklärt!

Zwischen der Einwanderung von Leukozyten in einen Entzündungsherd und den Mechanismen des Stammzellhomings bestehen nun bemerkenswerte Parallelen (Chan & Watt, 2001; Möhle et al., 1999). Die vor allem in den postkapillären Venolen stattfindende Leukozytenextravasation besteht aus den folgenden Schritten: Die schwimmenden Leukozyten geraten zunächst in kurzen Kontakt mit der Gefäßwand, werden daraufhin langsamer und rollen sich am Endothel entlang („Rolling“). Für diese zunächst lockere vorübergehende Bindung sind so genannte Selektine verantwortlich. Wird die Aktivierung der Leukozyten durch chemotaktisch aktive Zytokine (=Chemokine, zu denen zum Beispiel Interleukin 8, MCP1, MIP1 und Rantes gehören) erhöht, so vermitteln die Integrine auf den Leukozyten eine feste Anhaftung an das Endothel. Anschließend wandern die Leukozyten unter dem Einfluss chemotaktischer Faktoren wie dem Fragment des Komplementsystems C5a oder Leukotrien B<sub>4</sub> durch die Endothelzellen hindurch ins Gewebe (Transmigration oder Diapedese). Ganz analog kommt es auch beim Stammzellhoming zunächst zu einer reversiblen Selektin-vermittelten Bindung der Progenitorzellen an das Knochenmarkendothel, bevor eine durch Integrine vermittelte feste Adhäsion und anschließend die transendotheliale Migration folgen. Beim Stammzellhoming unterliegt die Aktivierung der Integrine dem Einfluss von SDF-1 und CXCR4 (Lapidot, 2001; Lapidot & Petit, 2002). Sowohl das Endothel des entzündeten Gewebes als auch das des hämatopoetischen Mikromilieus exprimiert nachweislich Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin und *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)* (Jacobsen et al., 1996; Schweitzer et al., 1996), von dem Zanjani 1999

zeigte, dass es *in vivo* am Tiermodell die Adhäsion von Leukozyten am Endothel des Entzündungsorts bewirkt und gleichermaßen für das Stammzellhoming von Bedeutung ist.



**Abbildung 2: Modell der SDF-1-induzierten transendothelialen Migration hämatopoetischer Progenitorzellen.** Humane CD34<sup>+</sup> Zellen, die sich im Blutkreislauf befinden, nehmen über endothelexprimiertes E- und P-Selektin zunächst reversibel Kontakt mit dem Knochenmarkendothel auf (*Rolling*; A). Von Zellen des hämatopoetischen Mikromilieus gebildetes SDF-1 stimuliert CXCR4-positive hämatopoetische Zellen. Es kommt zur Aktivierung von Adhäsionsrezeptoren der Integrinfamilie (VLA-4, VLA-5, LFA-1) auf den CD34<sup>+</sup> Zellen, wodurch die feste Adhäsion an die vaskulären Liganden VCAM-1 und ICAM-1 sowie an Komponenten der Extrazellulärmatrix (z.B. Fibronectin) vermittelt wird (B). Stammzellen mit zu geringer CXCR4-Expression lösen sich wieder ab und gelangen zurück in den Blutstrom. Die adhären Zellen migrieren durch die Endothelschicht hindurch ins Knochenmark (C), wo sie mit Zellen des hämatopoetischen Mikromilieus in Kontakt treten (D). Nach Peled et al. (2000), verändert.

Von Böhmler konnte gezeigt werden, dass LTD<sub>4</sub> die β1-Integrine VLA-4 und VLA-5 auf CD 34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen heraufregulieren kann und zu einer vermehrten Zelladhäsion an endotheliale Monolayer, plastikgebundenes VCAM-1 und Fibronectin führt. Dieser Effekt war sowohl zeit- als auch dosisabhängig (Böhmler, 2005). Dass LTD<sub>4</sub> die Adhäsion der CD 34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen auch an Fibronectin steigert, lässt vermuten, dass der Lipidmediator nicht nur für die transendotheliale Migration, sondern auch für die Einnischung der Zellen innerhalb des hämatopoetischen Mikromilieus eine Rolle spielt. LTD<sub>4</sub> besitzt einen proliferationssteigernden Effekt auf die Koloniebildung

hämatoopoetischer Zellen (Miller et al., 1986; Stenke et al., 1993), und zwar synergistisch mit Interleukin 3 (Böhmler, 2005).

Das von uns verwendete Leukotrien D<sub>4</sub> gehört zu den Cysteinyl-Leukotrienen, deren erste nicht pathologische Rolle im hämatoopoetischen System beobachtet wurde: Die Blockierung der Leukotrienbiosynthese in letal bestrahlten Mäusen führt zu einer Beeinträchtigung der Hämatopoese nach Knochenmarkstransplantation, da sich die liniendeterminierten koloniebildenden Zellen nur eingeschränkt entwickeln (Kozubik et al., 1994). Andererseits erhöht die Zugabe von LTB<sub>4</sub> beziehungsweise LTC<sub>4</sub> die Proliferation GM-CSF-abhängiger myeloider Vorläuferzellen um das zwei- bis dreifache (Stenke et al., 1993).

Cysteinyl-Leukotriene werden physiologischerweise von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten freigesetzt. Sie wirken über G-Protein-gekoppelte Sieben-Transmembranrezeptoren. Diese sind durch sieben hydrophobe Transmembrandomänen gekennzeichnet. Die Signaltransduktion erfolgt über heterotrimere GTP-bindende Proteine (G-Proteine). Der glykosylierte CysLT1-Rezeptor ist sowohl mit Pertussistoxin-sensitiven als auch -insensitiven G-Proteinen gekoppelt, was die Vermutung zulässt, dass unterschiedliche Signaltransduktionswege verschiedene Reaktionen zur Folge haben (Metters et al., 1993; Hoshino et al., 1998). Ihre Aktivierung führt zu einer Steigerung der Konzentration an intrazellulärem freien Kalzium und konsekutiv zu einer Steigerung der Aktinpolymerisierung, was letztendlich eine Zellmigration zur Folge hat. Diese Effekte lassen sich mit geeigneten Methoden quantitativ bestimmen (Bautz et al., 2001; Denzlinger, 1996). Bisher wurden zwei Rezeptoren für Cysteinyl-Leukotriene kloniert (CysLT1 und CysLT2), deren Bindungsaffinität für die verschiedenen Leukotriene unterschiedlich ist: Für CysLT1 nimmt die Affinität von LTD<sub>4</sub> über LTC<sub>4</sub> bis zum LTE<sub>4</sub> ab, während CysLT2 durch LTD<sub>4</sub> und LTC<sub>4</sub> in gleicher Intensität aktiviert werden kann (Heise et al., 2000; Lynch et al., 1999; Sarau et al., 1999; Takasaki et al., 2000). Beim Menschen wird CysLT1 hauptsächlich auf glatten Muskelzellen der Lunge, Gewebsmakrophagen, Monozyten und Eosinophilen exprimiert, wohingegen CysLT2 nur auf nicht hämatoopoetischen Zellen, zum Beispiel auf Pulmonalvenenzellen, gefunden wurde (Heise et al., 2000; Lynch et al., 1999).

Interessanterweise war LTB<sub>4</sub>, welches kein Cysteinyl-Leukotrien ist, bei reifen Granulozyten effektiver als LTD<sub>4</sub>, während es bei CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen keine Reaktion hervorzurufen vermochte (Bautz et al., 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass CD 34<sup>+</sup> hämatoopoetische Vorläuferzellen aus Knochenmark und peripherem Blut CysLT1 in funktionell aktiver Form exprimieren und Leukotrien D<sub>4</sub> die transendotheliale Migration der Zellen in einem *in vitro*-Modell stimuliert (Bautz et al., 2001).

Auf der CD34<sup>+</sup> Zelllinie KG1a ist der CysLT1-Rezeptor hochaktiv und Leukotrien D<sub>4</sub> führt zu starken intrazellulären Kalziumfreisetzung (Möhle et al., 2001). Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit und ihrer geringen Reichweite *in vivo* dürften Leukotriene bei eher lokalen Regulationsvorgängen eine Rolle spielen.

Für CysLT1 steht mit der Substanz MK-571 ein wirksamer Rezeptorantagonist zur Verfügung, der *in vitro* standardmäßig zur Blockierung CysLT1 vermittelter Prozesse eingesetzt wird (Bautz 2001; Jones et al., 1989). Da von hämatopoetischen Zellen CysLT1 exprimiert wird (siehe oben), lässt sich bei diesen Zellen die Reaktion auf LTD<sub>4</sub> mit MK-571 komplett blockieren.

Ein Derivat dieser Substanz kommt auch in der Therapie des mittelgradigen persistierenden Asthmas zum Einsatz (Montelukast = SINGULAIR®).

## 2. Leukämien

Der von Virchow im Zusammenhang mit der chronisch myeloischen Leukämie geprägte Begriff *Leukämie* bedeutet wörtlich „weißes Blut“, da nach dem Zentrifugieren einer leukämischen Blutprobe auf der Erythrozytensäule die verbreiterte weiße Leukozytenmanschette sichtbar ist. Es handelt sich also um einen deskriptiven Begriff, der mehrere sehr heterogene Erkrankungen wie die akute myeloische und lymphatische Leukämie (Proliferation unreifer Zellen), die chronische lymphatische Leukämie (Non-Hodgkin-Lymphom) und die chronische myeloische Leukämie (Proliferation funktionell aktiver Zellen mit erhaltener Differenzierungsfähigkeit) subsumiert.

Die Einteilung der Leukämien erfolgt zum einen nach der Entstehungsgeschwindigkeit (akut versus chronisch), zum anderen nach dem Zelltyp (lymphatisch, wenn lymphatische Vorläuferzellen betroffen sind, myeloisch bei maligner Transformation myeloischer Vorläuferzellen) und der Leukozytenzahl im Blut (aleukämisch: kein Nachweis pathologischer Zellen im peripheren Blut; subleukämisch: Leukozytenzahl normal oder nur leicht erhöht; leukämisch: periphere Leukozytenzahl durch Ausschüttung des entarteten Zellklons in die Blutbahn massiv erhöht). Die klinische Symptomatik dieser Erkrankungen resultiert aus der Verdrängung der normalen Hämatopoese mit konsekutiver Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie, einer Schädigung des B- und T-Zellsystems der Lymphozytopenie und einer möglichen Infiltration anderer Organe.

### Akute Leukämien

Obwohl die akuten Leukämien mit einer Inzidenz von 1,5/ 100.000/ Jahr der ALL und 2,5/ 100.000/ Jahr der AML eher seltene Erkrankungen sind, ist die ALL doch die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters, wohingegen 80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter durch maligne Transformation myeloischer Vorläuferzellen entstehen. Ursächlich ist die Entartung einer oder mehrerer proliferationsfähiger weißer Vorläuferzellen, die sich autonom und ungehemmt diffus vermehren. Schließlich wird durch Expansion des malignen Zellklons das gesamte blutbildende Knochenmark durchsetzt, wodurch die normale Hämatopoese verdrängt wird. Die leukämischen Zellen werden aufgrund verminderter Adhäsion ins Blut ausgeschwemmt und infiltrieren unter Umständen extramedulläre Organe, und zwar gehäuft bei Patienten mit den AML-Subtypen M4 und M5, bei denen sowohl die Expression als auch die funktionelle Aktivität von CXCR4 bei peripheren Blasten hoch war (Möhle et al., 1998). Das durch die resultierende Knochenmarkinsuffizienz geprägte klinische



Bild der verschiedenen Formen ist ähnlich, allerdings bestehen in Therapierbarkeit und Prognose starke Unterschiede.

a) akute myeloische Leukämie (AML)

Der Begriff AML fasst eine „Gruppe klonaler Erkrankungen mit Transformation einer frühen myeloischen Vorläuferzelle“ (Berger et al., 2002) zusammen, wobei unterschiedliche Typen der AML den Differenzierungsstufen myeloischer Progenitorzellen entsprechen.

Die Inzidenz der AML ist mit 15/ 100.000/ Jahr bei Patienten ab 65 Jahren höher. Sie ist die häufigste tödlich verlaufende Neoplasie zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Für die Entstehung einer AML konnten folgende Risikofaktoren identifiziert werden:

- Schädigung des Knochenmarks durch Noxen wie ionisierende Strahlen (Verdopplung des Leukämierisikos bei einer Ganzkörperdosis von 1Gy bei Erwachsenen (Herold, 2004)), alkylierende Substanzen (Chlorambuzil, Cyclophosphamid), Topoisomerasehemmer, Benzol, Lost, Zigarettenrauch
- prädisponierende hämatologische Erkrankungen mit Entwicklung einer „sekundären“ AML:

a) myelodysplastische Syndrome (unterschiedlich stark erhöhtes Risiko einer sekundären AML, abhängig von Blastenanteil, Karyotyp und betroffenen Zellreihen. Der Übergang zwischen einem MDS mit Blastenexzess bis 20-30% und einer AML ist biologisch fließend.)

b) myeloproliferative Syndrome (Chronische myeloische Leukämie, Polycythämia vera, Essentielle Thrombozytose und Osteomyelofibrose). Übergänge zwischen den einzelnen Formen sowie in ein MDS sind möglich, alle Formen zeigen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer sekundären AML. Bei der CML entspricht die Blastenkrise als terminale Erkrankungsphase in 60-70% der Fälle einer AML, bei myelosuppressiver Therapie der PV entwickelt sich in 10-15% der Fälle eine akute Leukämie (unter Aderlass in 2% d. F.), eine Transformation der ET und einer OMF in eine akute Leukämie findet in 10% d.F. statt.

c) aplastische Anämie

d) paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

- genetische Faktoren: Trisomie 21, Fanconi-Anämie, Bloom-Syndrom, Li-Fraumeni-Syndrom

Auf molekularer Ebene finden häufig chromosomale Translokationen statt (in 5-10%: t(8;21), t(15;17), inv(16), t(11q23;n) und in 2-5%: t(3;5), t(3;3), t(8;16), t(6;9), t(1;3), t(9;22)). Auch Deletionen und numerische Aberrationen (Trisomien +8, +13, +21), sowie eine Überexpression der *multidrug resistance* Gene MDR1 und MRP spielen bei der neoplastischen Transformation der hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle. Durch Punktmutationen kann eine Aktivierung der N-ras- und K-ras-Proto-Onkogene stattfinden. Eine Gen-Inaktivierung durch Hypermethylierung ist ebenfalls bekannt (p15, Östrogenrezeptor, E-Cadherin → Adhärenz vermindert).

Der Karyotyp vor Behandlung stellt einen eigenständigen wichtigen prognostischen Faktor dar (Byrd et al., 2002; Farag et al., 2006) und dient zur Stratifizierung der Therapie (Kolitz et al., 2004). Bei Patienten mit auffälligem Karyotyp wird zudem die zytogenetische Analyse zur Dokumentation der kompletten Remission (CR) empfohlen (Cheson et al., 2003).

Da molekulargenetischen Alterationen mögliche Angriffspunkte für eine risikoadaptierte Therapie darstellen, sollen die drei wichtigsten hier in Kürze vorgestellt werden:

Der zur Zeit wichtigste prognostische Faktor bei zytogenetisch normaler AML ist die *internal tandem duplication* (ITD) der FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*). Mutationen im FLT3-Gen treten bei etwa 30% der AML-Patienten auf und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Sowohl diese Mutation als auch eine ebenfalls bekannte Punktmutation führen zur konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors (Griffith et al., 2004), der auch bei normalen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen für Überleben, Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle spielt (Gilliland et al., 2002; Stirewalt et al., 2003). Wenn zu FLT3-Mutationen andere genetische Alterationen hinzukommen, findet die vollständige maligne Transformation statt (Small, 2006). Präklinische Studien haben gezeigt, dass FLT3-Inhibitoren synergistisch zur Chemotherapie wirksam sind (Levis, 2004), jedoch nicht im gleichen Maße wie Imatinib bei der CML, bei der die BCR-ABL-Fusion oft die einzige Mutation ist.

Eine relativ günstige Prognose mit hoher CR-Rate (Appelbaum, 2006) weist die AML mit Mutationen im *core binding factor* (inv(16) und t(8;21)) auf. Da 20% bis 30% der Patienten mit CBF AML Mutationen im KIT-Gen aufweisen, wurde deren prognostische Aussagekraft ebenfalls untersucht: Bei Patienten mit t(8;21) ist eine Mutation im KIT-Gen mit kürzerem rückfallfreiem Überleben und Gesamtüberleben assoziiert; Die prognostische Aussagekraft von KIT-Mutationen bei Patienten mit inv(16)/ t(16;16) ist noch nicht abschließend geklärt (Cairoli et al., 2006; Schnittger et al., 2006; Boissel et al., 2006; Care et al., 2003).

Mit 46 % bis 62 % ist die Mutation des *nucleophosmin member 1 (NPM1)*-Gens die häufigste Alteration in der Gruppe der zytogenetisch normalen AML (Thiede et al., 2006). Falls die NPM1-Mutation nicht zusammen mit einer FLT3-ITD auftritt, ist sie als prognostisch günstig zu werten (Döhner et al., 2005). Auf die schlechte Prognose von Patienten mit FLT3-Mutationen hat eine gleichzeitige NPM1-Mutation jedoch keinen Effekt (Mrozek et al., 2006).

Klassischerweise erfolgt die Einteilung der akuten myeloischen Leukämien nach einer 1985 von der French-American-British Cooperative Group erarbeiteten Klassifikation („FAB-Klassifikation“). Diese berücksichtigt insbesondere morphologische (Differenzierung und Reifegrad) und zytochemische Charakteristika. In der folgenden Tabelle ist die FAB-Klassifikation dargestellt:

**Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML**

<b>FAB</b>	<b>Morphologie und Charakteristika</b>	<b>Myelo-peroxydase</b>	<b>Unspezifische Esterase</b>	<b>Perjodsäure-Schiff-Reaktion</b>	<b>Häufigkeit</b>
<b>M0</b>	„akute undifferenzierte Leukämie“	<3%		----	<2%
<b>M1</b>	„akute unreife Myeloblastenleukämie“	3-10%		----	20%
<b>M2</b>	„akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung“	>30%		---	30%
<b>M3</b>	„akute Promyelozytenleukämie“	++ bis +++		+ / -	10%
<b>M4</b>	„akute myelomonozytäre Leukämie“	+	+		30%
<b>M5</b>	„akute Monoblastenleukämie“	+ / -	+	- / +	10%
<b>M6</b>	„akute Erythroleukämie“	-		+ / -	<5%
<b>M7</b>	„akute Megakaryoblastenleukämie“	-		+ / -	<5%

Dabei zeigt die akute unreife Myeloblastenleukämie (M1) die größte Ähnlichkeit mit den hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Die typischerweise vorhandenen Oberflächenmarker lassen sich aus der folgenden Tabelle<sup>2</sup> entnehmen:

**Tabelle 2: Typische Oberflächenmarker der AML-Subtypen**

	HLA-DR	CD34	CD13	CD33	CDw65	CD14	CD15	Glykophorin A	CD41/CD42b
<b>M1</b>	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>M2</b>	±	±	+	+	+	-	+	-	-
<b>M3</b>	-	-	±	+	±-	-	±	-	-
<b>M4</b>	+	±	+	+	+	+	+	-	-
<b>M5</b>	+	±	+	+	+	±	±	-	-
<b>M6</b>	±	±	±	±	±	-	±	+	-
<b>M7</b>	±	±	?	±	±	-	-	-	+

Auf den Zellen der akuten undifferenzierten Leukämie finden sich die folgenden Marker: CD34, CD33 und CD13. Die Akute Megakaryoblastenleukämie (M7) ist zusätzlich positiv für den Oberflächenmarker CD61 (Senn et al., 2001).

Im Knochenmark lassen sich typischerweise eine erhöhte Zelldichte und eine monomorphe Population von unreifen Zellen, so genannten Blasten, nachweisen. Diese haben einen großen Kern mit deutlich sichtbaren atypischen Nukleolen und einen schmalen basophilen Zytoplasmasaum, der je nach Differenzierung keine Granulation (undifferenziert) oder teilweise granuliertes Zytoplasma besitzt (partielle Differenzierung). Fehlen die mittleren Entwicklungsstufen, so spricht man von einem *Hiatus leucaemicus*. Die Erythropoese und die Megakaryopoese werden zunehmend verdrängt. Dies führt zu einer Anämie und einer Thrombopenie im peripheren Blut. Dort ist die Leukozytenzahl in der Regel erhöht und es lassen sich die charakteristischen leukämischen Blasten im Blutausschlag nachweisen. Eine

<sup>2</sup> Ludwig, W.-D. et al. in : I. Boll, S.Heller (Hrsg): Praktische Blutzell Diagnostik, Springer Verlag (1991) 212-245

Leukozytose im peripheren Blut ist aber nicht obligat. In etwa 10% der Fälle besteht eine „aleukämische“ Verlaufsform mit normalen oder sogar erniedrigten Leukozytenwerten. Bei der Myeloblasten-Leukämie finden sich in bis zu 25% der Fälle Auerstäbchen (=azurophile Kristalle) im Zytoplasma der Leukozyten. Diese können bei der AML-M3 auch in Bündeln auftreten (Faggot' Zellen).

Organmanifestationen finden sich in Knochenmark, Milz, Leber, Lymphknoten und in fortgeschrittenen Stadien auch in zahlreichen anderen Organen (Nieren, Lungen, Gehirn).

Bei neueren, auf Vorschlägen der WHO beruhenden Klassifikationen werden zusätzlich molekularbiologische und immunphänotypische Charakteristika berücksichtigt. Hierbei gilt ein Blastenanteil von >20% im Knochenmark als Definition einer AML.

#### *WHO-Klassifikation (Vorschlag 1999)*

##### *-AML mit spezifischen chromosomalen Translokationen*

- AML mit t(8;21) und AML 1/ETO-Rearrangement
- Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17), t(11;17) oder anderen varianten Translokationen
- AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark und inv(16) oder t(16;16) und CBFβ/MYH11X-Rearrangement
- AML mit 11q23 Anomalien (MLL-Gen)

##### *-AML mit multilinearer Dysplasie*

- und vorhergegangenen MDS
- ohne vorhergegangenes MDS

##### *-Therapiebedingte AML*

- nach Alkylanzien
- nach Epipodophyllotoxinen
- andere

##### *- nicht weiter klassifiziert*

- AML mit minimaler Differenzierung
- AML ohne Ausreifung
- AML mit Ausreifung
- akute myelomonozytäre Leukämie
- akute monozytäre Leukämie
- akute erythroide Leukämie

- akute Basophilenleukämie
- akute Panmyelose mit Myelofibrose
- Akute biphänotypische Leukämie
- Sonderformen
  - hypoplastische AML
  - „smouldering leukemia“

Klinisch stehen die Symptome der Knochenmarkinsuffizienz im Vordergrund: Die Verdrängung der normalen Hämatopoese führt zu einer Anämie mit daraus resultierender Müdigkeit und Schwäche, Blässe von Haut und Schleimhäuten, Tachykardie und eventuell Dyspnoe. Aufgrund der Thrombopenie besteht eine gesteigerte Blutungsneigung mit Petechien, Ekchymosen, Hämatomen und Epistaxis. Der Mangel an funktionsfähigen Granulozyten begünstigt Hautinfektionen, Pharyngitiden, Pneumonien, opportunistische Infektionen (zum Beispiel Soor durch *Candida albicans*) und seltener auch die Entstehung einer Sepsis. Hinzu kommen unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Leistungsminderung, grippeähnliche Symptome und Knochenschmerzen mit meist kurzer Anamnese. Leukämische Zellproliferation und Organinfiltration führen zu Splenomegalie, seltener zu Hepatomegalie, zu Lymphknotenschwellungen und Chloromen (=extramedulläre tumoröse Manifestationsformen). Ein Befall des Zentralnervensystems äußert sich in Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Sehstörungen, zentralnervösen Störungen und selten in Polydipsie. Insbesondere die M3-Leukämie (Promyelozytenleukämie) ist oft mit einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) assoziiert: Infolge intravasaler Gerinnung werden kleine Gefäße thrombotisch verschlossen und damit die Organperfusion beeinträchtigt. Durch den dadurch induzierten Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren kommt es gleichzeitig zu einer hämorrhagischen Diathese mit oft ausgedehnten Blutungen, die klinisch im Vordergrund stehen. Die DIC kann durch den Therapiebeginn mit Blastenzerfall zunächst noch verstärkt werden.

Des Weiteren lassen sich bei der Akuten Promyelozytenleukämie folgende Besonderheiten beobachten: In > 95 % der Fälle ist eine balancierte reziproke Translokation zwischen Chromosom 15 und 17 nachweisbar, die zur Bildung eines Fusionsgens *PML/RAR $\alpha$*  aus dem Promyelozyten- (PML) Gen und dem Gen für den Retinolsäurerezeptor  $\alpha$  (*retinoic acid receptor*) führt (Mistry et al., 2003). PML ist über p53-abhängige Vorgänge an der Tumorsuppression und Kontrolle der genomischen Stabilität beteiligt (Zhong et al., 2000),

während RAR $\alpha$  als Transkriptionsfaktor fungiert. Neben seiner Rolle als therapeutischer Angriffspunkt dient die Nachweisbarkeit des PML/RAR $\alpha$ -Transkriptionsprodukt mittels RT-PCR nach Abschluss der Konsolidierung der Beurteilung des Therapieansprechens (Cheson et al., 2003). Auch die charakteristischerweise starke Expression von CD33 (Paietta et al., 2003), das Fehlen einer *multidrug resistance* und Mutationen im an Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen beteiligten Gen FLT3 sind klinisch relevant. Zur Induktion und Konsolidierung (s.u.) wird nämlich mit einer Kombination aus oraler All-trans-Retinolsäure (Huang et al., 1988) und einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie behandelt (Sanz et al., 2003), wodurch eine Differenzierung induziert und die Gefahr einer DIC reduziert wird (Renz-Polster et al., 2004). Bisher nur bei Patienten, für die eine Chemotherapie kontraindiziert ist, und im Rahmen klinischer Studien eingesetzt, ist Arsenitrioxd (ATO) die vielleicht wirksamste Einzelsubstanz (Douer et al., 2006) und greift ebenfalls am PML/RAR $\alpha$  –Protein an (Chou et al., 2005). Auch Antikörper gegen CD33, zum Beispiel Gemtuzumab und HuM195, werden erfolgreich therapeutisch eingesetzt (Jurcic et al., 2000). Obwohl in Tierversuchen viel versprechend (Sohal et al., 2003), steht die klinische Erprobung von FLT3-Inhibitoren noch aus.

Vor allem bei M4- und M5-Leukämien treten häufig Hautinfiltrate, Gingivahyperplasie und ein Befall des ZNS auf. Bei Leukozytenzahlen >100.000/ $\mu$ l (aber auch schon bei >20% der AML-Patienten mit Leukozytenzahlen >50.000/ $\mu$ l) treten gehäuft Leukostasen auf, die in den Lungen zu Dyspnoe und pneumonischen Leukämieinfiltraten, bei zerebralem Auftreten zu Ischämien oder Hämorrhagien führen können. Außerdem kann es zu arteriellen Gefäßverschlüssen kommen.

Aufgrund des vermehrten Abbaus pathologischer Zellen in der Milz steigt die Harnsäurekonzentration im Blut an, was zu einer Uratnephropathie und Gichtanfällen führen kann. Der erhöhte Zellumsatz führt zu einer LDH-Erhöhung, was prognostische Relevanz besitzt (s.u.).

Bei der Therapie der akuten myeloischen Leukämien kann eine supportive Therapie von der eigentlichen Chemotherapie unterschieden werden.

Unter dem Begriff der supportiven Therapie werden folgende Maßnahmen zusammengefasst:

- Prophylaxe eines Tumor-Lyse-Syndroms: Durch den raschen Abbau von Tumorzellen im Rahmen der Chemotherapie werden intrazelluläre Abbauprodukte wie Kalium, Phosphor, Urate und Säureäquivalente frei. Aufgrund ionischer Summenbeziehungen entsteht dadurch zusätzlich eine Hypokalzämie. Ein bis zwei Tage nach Beginn der

Chemotherapie kann es so durch den Anstieg der Urate zu Nierenversagen kommen, die Hyperkaliämie bedingt Herzrhythmusstörungen und begünstigt eine Herzinsuffizienz, die verminderte Kalziumkonzentration im Blut führt zu Tetanien, Bewusstseinsstörungen und Krampfanfällen. Um dem Auftreten dieser Erscheinungen vorzubeugen, muss Flüssigkeit substituiert werden. Die Gabe von Allopurinol und die Alkalisierung des Harns (pH-Ziel >7,0) sollen die Uratausscheidung fördern. Durch die Gabe von Uricase, einem Enzym, das die Oxidation von Harnsäure zu dem wesentlich besser wasserlöslichen und nierengängigen Allantoin katalysiert, kann die Serumharnsäurekonzentration rasch gesenkt werden.

- Infektprophylaxe und –behandlung
- Substitution von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten sowie von Gerinnungsfaktoren, ggf. Therapie einer DIC
- bei Hyperleukozytose/ Leukostase: Gabe von Hydroxyharnstoff (Litalir<sup>®</sup>), der die Ribonukleotid-Reduktase hemmt und damit letztlich die DNA-Synthese blockiert, Sauerstoffgabe, Bewässerung, restriktive Erythrozytensubstitution, ggf. Dexamethason i.v., wenn möglich Leukapherese
- Menolyse bei prämenopausalen Frauen

Die Behandlung einer AML mit kurativer Intention besteht in einer systemischen Chemotherapie. Dabei wird eine vorübergehende Knochenmarkaplasie angestrebt. Diese Therapie besteht aus mehreren Phasen:

Begonnen wird zunächst mit einer **Induktionstherapie**, deren Ziel die Remissionsinduktion ist. Bei einer Reduktion der Zahl der leukämischen Zellen um mindestens zwei bis drei Zehnerpotenzen spricht man von einer kompletten Remission, obwohl man schätzt, dass zu diesem Zeitpunkt noch  $10^8$  -  $10^9$  maligne Zellen im Körper existieren. Bei Patienten bis 65 Jahre erfolgt anschließend eine **Stratifizierung** nach Ansprechen und Risikogruppen (abhängig vom Karyotyp Unterteilung in „good risk“, „intermediate risk“ und „poor risk“). Durch meist zwei weitere Chemotherapiezyklen soll der maligne Klon weiter reduziert und damit eine **Konsolidierung** erreicht werden. Es folgt eine **Intensivierung** je nach Risikosituation entweder mit Hochdosis-AraC (Cytosin-Arabinosid), familiär-allogener oder fremd-allogener Transplantation. Eine komplette Remission ist hierfür *keine* unbedingte Voraussetzung. Bis vor kurzem wurde, um die Remission durch Proliferationshemmung residualer Blasten möglichst lange aufrecht zu erhalten, eine weitere Chemo- oder



Immuntherapie (*Erhaltungstherapie*) durchgeführt. Diese Strategie hat sich jedoch nicht bewährt und ist wieder verlassen worden.

Wie oben bereits angesprochen, bildet die akute Promyelozytenleukämie (FAB: M3) eine Ausnahme: Hier wird zunächst durch Gabe von All-trans-Retinolsäure (ATRA) eine Differenzierungsinduktion durchgeführt und anschließend zusätzlich chemotherapiert (hier einschließlich Erhaltungstherapie!), wodurch Langzeitüberlebensraten bis zu 90% erreicht werden können.

Der Nachweis prognostisch relevanter KIT-Mutationen bei CBF AML (s. oben) hat potentiell therapeutische Relevanz, da diese Mutationen Angriffspunkte für Tyrosinkinaseinhibitoren (zum Beispiel Imatinib) darstellen. Deren Rolle als Teil der Therapie bei CBF AML-Patienten muss in weiteren klinischen Studien noch näher untersucht werden.

Die Phasen der Chemotherapie erfolgen nach unterschiedlichen Chemotherapie-Protokollen, deren genauer Aufbau hier unerwähnt bleiben soll.

Ist eine kurative Therapie zum Beispiel aufgrund des Alters, reduzierten Allgemeinzustandes oder der Komorbidität des Patienten nicht möglich oder wird diese von ihm nicht gewünscht, so kann eine palliative, möglichst ambulante Therapie zum Erhalt der Lebensqualität des Patienten erfolgen, deren Ziel die Reduktion der Blastenzahl in Knochenmark und peripherem Blut ist.

Als prognostisch wichtige Faktoren wurden herausgearbeitet:

- Alter des Patienten (>60 Jahre ungünstig)
- Karnofsky-Index (Skala zur Bewertung des Allgemeinbefindens von Patienten)
- Leukämietyp (günstig: FAB M3, M4eo (mit Inversion der Chromosom 16, was zur Bildung des *core binding factors* (CBF) führt), M2 mit t(8;21)  
ungünstig: FAB M1, M6, M7, sekundäre Leukämie)
- Leukozytenzahl bei Erstdiagnose (>100.000/ $\mu$ l ungünstig)
- LDH bei Erstdiagnose (>400 U/l ungünstig)
- MDR1-Expression
- Karyotyp (good/ intermediate/ poor risk)
- Vorerkrankungen: vorangegangene Myelodysplasie oder trilineäre Dysplasie bei Erstdiagnose sowie sekundäre AML nach Radio-/ Chemotherapie gelten als ungünstig.

## b) akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die akute lymphatische Leukämie ist eine hämatologische Neoplasie der lymphatischen Zellreihe. Dabei findet eine Transformation der lymphatischen Vorläuferzelle statt, was zu gestörter Ausreifung und klonaler Expansion der leukämischen Zellen führt.

80% der akuten Leukämien im Kindesalter sind akute lymphatische Leukämien, im Erwachsenenalter nur noch 20%. Männer sind im Vergleich zu Frauen ~1,5 mal häufiger betroffen. Ein Altersgipfel liegt zwischen drei und fünf Jahren, wobei Prä-prä-B-ALL und prä-B-ALL häufiger bei Kleinkindern und die T-ALL häufiger bei älteren Kindern vorkommt. Als Risikofaktoren gelten Knochenmarkschädigung (s.o.), medikamentöse Immunsuppression (zum Beispiel nach Nierentransplantation) und verschiedene genetische Faktoren, darunter unter anderem Trisomie 21 und Neurofibromatose.

Die molekulargenetische Pathogenese besteht in einer genetischen Veränderung des Rearrangements von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptoren in lymphatischen Progenitorzellen. Dadurch kommt es zu einem Differenzierungsarrest, Störungen der Proliferationsregulation und klonaler Expansion der leukämischen Zellen. Die Symptomatik ergibt sich wie bei der AML aus der Verdrängung der normalen Hämatopoese mit anschließender Anämie, Thrombopenie und Granulozytopenie. Dazu kommen unspezifische Allgemeinsymptome mit kurzer Anamnese sowie Symptome, die durch Zellproliferation und Organinfiltration entstehen (Hepato- und/ oder Splenomegalie bei 70% der Patienten, Lymphadenopathie bei 60%, mediastinaler Befall mit Lymphadenopathie bei 15%, Befall von Leber, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Hoden etc. bei <10%). Eine Komplikations- und Rezidivquelle stellt bei der ALL die *meningeosis leukaemica*, der Befall von ZNS und Meningen (bei <10% der Patienten) dar. Bei der T-ALL treten gehäuft Hautinfiltrationen auf. Bei mehr als 70% der Patienten können numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Hier sind die Translokationen t(1;19) und t(9;22) („Philadelphia-Chromosom“, dieses ist allerdings bei der CML viel häufiger) die am häufigsten vorkommenden Aberrationen. Durch letztere entsteht das bcr-abl Fusionsprotein, eine proliferationsstimulierende Proteinkinase, die sich durch den Tyrosinkinasinhibitor Imatinib (Glivec®) spezifisch hemmen lässt.

Bei über 90% der Patienten finden sich leukämische Blasten im peripheren Blut. Ihr Fehlen schließt eine akute Leukämie jedoch nicht aus. In 25% der Fälle besteht eine Leukopenie, in 15% normale Leukozytenwerte. Der Blastenanteil im Knochenmark beträgt bei der Erstdiagnose meist >50%; in Abgrenzung zum lymphoblastischen Non-Hodgkin-Lymphom werden Patienten mit mehr als 30% Blasten im Knochenmark als ALL eingestuft.

Die FAB-Klassifikation der ALL erfolgt nach morphologischen Kriterien:

- L1: kleinzellige ALL
- L2: polymorphzellige ALL
- L3: Burkitt-Typ ALL

Von therapeutisch und prognostisch größerer Bedeutung sind jedoch Immunphänotypisierung sowie Zyto- und Molekulargenetik (s.h. Tabelle 3).

**Tabelle 3: Immunphänotypisierung der ALL**

<b>ALL-Subtyp</b>	<b>Häufigkeit</b>
Prä-prä-B	11%
Common	51%
Prä-B	10%
B	4%
Prä-T	7%
T	17%

Die Behandlung erfolgt entsprechend dem immunphänotypisch charakterisiertem Subtyp der Erkrankung, Risikofaktoren und Alter des Patienten im Rahmen von Studien an hämatologischen Zentren. Mögliche Komponenten sind die systemische Polychemotherapie, eine intrathekale Chemotherapie, prophylaktische bzw. therapeutische ZNS-Bestrahlung, mediastinale Bestrahlung und Hochdosis Chemotherapie mit Transplantationsverfahren.

Die Rate kompletter Remissionen liegt über 95%, die 5-Jahres-Überlebensrate bei 80% (Sitzmann, 2002).

Diese insgesamt günstigere Prognose als bei der AML verschlechtert sich, falls zum Diagnosezeitpunkt eine hohe Leukämiezellmasse, ein initialer ZNS-Befall oder Translokationen bestehen oder die Erkrankung bei Säuglingen, Kindern über 10 Jahren oder männlichen Patienten auftritt.

### **3. Ziele der Arbeit**

Während die wichtige Rolle von Peptiden, insbesondere von SDF-1 und seinem Rezeptor CXCR4, als Mediatoren im hämatopoetischen Mikromilieu seit längerem bekannt ist, beginnen wir gerade erst, die Funktionen der nicht-Peptid Mediatoren, zu denen die Leukotriene als Lipidmediatoren gehören, zu verstehen. Lipidmediatoren wurden im normalen Knochenmark nachgewiesen, ebenso wie bei der chemotaktisch gesteuerten Migration von Leukozyten zum Entzündungsort. Der Effekt des Cysteinyl-Leukotriens LTD<sub>4</sub> auf CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen, primitivere CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Vorläuferzellen und die CD34<sup>+</sup> Vorläuferzelllinie KG1a wurde untersucht (Bautz, 2001), auch seine Wirkung auf chronisch leukämische Zellen wurde charakterisiert (Böhmler, 2005). Anlass zur Untersuchung von akut leukämischen Zellen war die Überlegung, dass aufgrund der Ähnlichkeit insbesondere des Progenitorphänotyps (vor allem AML M1) mit CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen auch andere Eigenschaften, namentlich Expression und Funktion des CysLT-1-Rezeptors, ähnlich sein könnten.

Ein großer Nachteil der in der Therapie hämatologischer Neoplasien verwendeten Chemotherapeutika ist ihre unspezifische Wirkung auf alle sich schnell teilenden Zellen. Daher wurden in den letzten Jahren zunehmend Behandlungsstrategien entwickelt, die die malignen Zellen möglichst spezifisch angreifen. Als Beispiel hierfür mag die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) mit dem spezifisch gegen die für die CML typische bcr-abl Tyrosinkinase gerichteten Antikörper Imatinib dienen. Die Suche nach weiteren Zielstrukturen für eine Therapie auch anderer Leukämien erscheint daher vordringlich. Die oben beschriebenen Beobachtungen zum Leukotrienrezeptor CysLT1 stellen einen weiteren Schritt in diese Richtung dar.

Da Zelllinien bei der Identifikation neuer Zielstrukturen in der Therapie hämatologischer Neoplasien zwar eine große Hilfe sein können, die Untersuchung an primären Zellen jedoch nicht ersetzen, soll in der vorliegenden Dissertation nun die Wirkung von LTD<sub>4</sub> und seinem Rezeptor CysLT1 an den leukämischen Zellen, die aus peripherem Blut oder Knochenmark von Patienten mit akuter Leukämie isoliert wurden, untersucht werden. Zum Nachweis der funktionellen Aktivität dienten Versuche zur Aktinpolymerisation sowie exemplarisch durchgeführte chemotaktische Versuche. Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Expression des CysLT1-Rezeptors auf den malignen Zellen untersucht.

## II Material und Methoden

### 1. Chemikalien, Enzyme und Seren

Anti-FITC <i>Microbeads</i>	Miltenyi Biotec
APC-Kalibrierungsbeads (CaliBRITE <sup>®</sup> )	Becton-Dickinson
DEPC-Wasser	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol (96 %)	Uni-Apotheke
FACS-Flow	Becton Dickinson
Ficoll ( <i>Biocoll Separating Solution</i> , 1,077 g/ml)	Biochrom
FITC-Kalibrierungsbeads (CaliBRITE <sup>®</sup> )	Becton-Dickinson
Formaldehyd (36-38 %, aqu.)	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
Human-IgG (Flebogamma <sup>®</sup> 5 %)	Grifols
Lysophosphatidylcholin	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid für die PCR (25 mM)	Applied Biosystems
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	Sigma-Aldrich
Methanol, <i>HPLC-grade</i> (LiChrosolv <sup>®</sup> )	Merck
MuLV Reverse Transkriptase (50 U/μl; 5000 U)	Applied Biosystems
Oligo-d(T) <sub>16</sub> -Primer (50 μM)	Applied Biosystems
PCR Nukleotide-Mix (dNTP's) (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Applied Biosystems
PCR-Puffer II (10x)	Applied Biosystems
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich
<i>Random Hexamers</i> (d(N) <sub>6</sub> ; 50 μM)	Applied Biosystems
Rinderserumalbumin (BSA; 100 mg/ml in IMDM) Roche	
RLT-Puffer mit Guanidinium-Isothiocyanat	Qiagen
RNase-Inhibitor (20 U/μl; 2000 U)	Applied Biosystems
Taq DNA Polymerase (AmpliTaq Gold; 5 U/μl)	Applied Biosystems
Trypanblau	Invitrogen

## 2. Kits

CD34 <sup>+</sup> <i>Progenitor Cell Isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec
RNeasy Mini Kit	Qiagen

## 3. Gebrauchswaren

Einfrierröhrchen 1,0 ml, 1,8 ml	Greiner, Nunc
Einmalspritzen, steril, 1 ml, 10 ml, 20 ml	B.Braun
Magnetseparationssäulen:	
- LS+, <i>Large Cell</i>	Miltenyi Biotec
Parafilm	Pechiney
Pipetten, steril, 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml	BD Falcon
Pipettenspitzen	Greiner
Pipettenspitzen für PCR	Gilson
QIAshredder	Qiagen
Quarzküvetten	Bio-Rad
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße für die PCR	Applied Biosystems
Sterilfilter 0,22 µm, Millex	Millipore
Zellsieb:	
- 30 µm, <i>pre-separation filter</i>	Miltenyi Biotec
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner

## 4. Lösungen

### 4.1 Medien für die Zellkultur

RPMI-Grundmedium	RPMI 1640 mit NaHCO <sub>3</sub> (0,195 %), Glutamax-I, 25 mM HEPES (Invitrogen) 10 % (v/v) FCS 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
RPMI-Vollmedium	RPMI 1640 Grundmedium 1 % (v/v) MEM n/e Aminosäuren 1 % (v/v) MEM Na-Pyruvat

RPMI ohne Serum	RPMI 1640 mit NaHCO <sub>3</sub> (0,195 %), Glutamax-I, 25 mM HEPES (Invitrogen) 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1 % (v/v) MEM n/e Aminosäuren 1 % (v/v) MEM Na-Pyruvat
Einfriermedium	45 % (v/v) PBS Dulbecco's 40 % (v/v) HSA (20 %) 15 % (v/v) DMSO 20 I.U./ml Heparin
Serumfreie Kulturmedien	X-VIVO20 (Cambrex)

## 5. Sonstige Lösungen

FACS-Fixierlösung	99 % (v/v) PBS Dulbecco's 1 % (w/v) Paraformaldehyd
FACS-Puffer	99,98 % PBS Dulbecco's 0,1 % (w/v) BSA 0,1 % (w/v) Natrium-Azid
HBS-Puffer (HEPES-buffered saline)	137 mM NaCl 4 mM KCl 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM Glukose 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 g/l BSA 10 mM HEPES in <i>Aqua bidest.</i> pH 7,4 mit NaOH/HCl (1 N)

HBSS *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) mit

NaHCO<sub>3</sub>, ohne Phenolrot, Kalziumchlorid und  
Magnesiumsulfat (Sigma-Aldrich)

MACS-Puffer

94,4 % (v/v) PBS Dulbecco's  
5 % (v/v) BSA (100 mg/ml in IMDM)  
0,6 % (v/v) ACD

Phalloidin-FITC-Arbeitslösung

0,4 µM Phalloidin-FITC  
18 % Formaldehyd  
0,5 mg/ml Lysophosphatidylcholin  
in PBS Dulbecco's

## 6. Geräte

Durchflusszytometer (FACSCalibur)

Becton Dickinson

Einfrierbehälter (*Cryo 1°C Freezing Container*)

Nunc

Magnet-Separationssystem:

- Midi-MACS

Miltenyi Biotech

Mikroskop:

- Umkehrmikroskop (IX-51)

Olympus

Photometer (*GeneQuant II DNA/RNA Calculator*)

Pharmacia

Pipettierhilfen (*pipetboy acu*)

Integra Biosciences

Pipetten

Eppendorf, Gilson

Sterilbänke

Heraeus

Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400)

Perkin Elmer

Vortex (Vortex-Genie 2)

Scientific Industries

Wasserbad

B.Braun

Zentrifugen

Eppendorf, Heraeus



## 7. Anreicherung der leukämischen Zellen

Die Anreicherung der malignen Zellpopulation erfolgte entsprechend ihres Musters an CD (=Cluster of Differentiation) -Oberflächenantikörpern. Als sehr häufig exprimiertes Antigen eignet sich hierfür insbesondere CD34. Betrug der Anteil der Blasten bereits mehr als 95%, so wurde auf eine Isolierung mit Hilfe des *MACS* – Systems verzichtet und die Probe lediglich ficollisiert (siehe unten).

Die Isolierung der CD34-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen mit dem *Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)* –System umfasst zwei wesentliche Schritte:

In einem ersten Arbeitsschritt erfolgte die Markierung der CD34-positiven Zellen mit einem gegen diesen Zellmarker gerichteten monoklonalen Antikörper. Anschließend wurde ein zweiter, gegen das Fc-Fragment des antiCD34-AKs gerichteter Antikörper, an den ein 50nm großer Eisenpartikel gekoppelt ist, zugegeben. Die so markierten CD34<sup>+</sup> Zellen wurden mit Hilfe einer in einem Magnetfeld (midi-MACS ) positionierten LS-Säule positiv selektioniert.

Das heparinisierte Patientenblut wurde zunächst mit PBS bis zu einem Endvolumen von 50ml verdünnt und anschließend über Ficoll geschichtet. Nach zwanzigminütigem Zentrifugieren bei 750g ohne Bremse bilden die Erythrozyten das Pellet, während die Leukozyten sich zwischen Blutüberstand und Ficoll befinden. Diese Interphase wurde nun abgenommen und der verbliebene Ficoll durch zweimaliges Waschen mit PBS (240g für 8min ) entfernt. Das Pellet wurde in 8ml PBS aufgenommen, über ein bovines Serumalbumin-Kissen geschichtet und erneut bei 320g für 8min ohne Bremse zentrifugiert. Nun befinden sich die Thrombozyten im BSA, die Leukozyten bilden das Pellet. Nach Abschätzen des Zellvolumens wurde die doppelte Menge eiskalter entgaster MACS-Puffer zugegeben und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden pro 10<sup>8</sup> Zellen 50µl Reagenz zugegeben: Zunächst wurden durch anti-humanes-IgG unspezifische Zellen gebunden, dann der Antikörper gegen CD34 zugegeben und für 10min bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden im nächsten Schritt durch Waschen mit MACS-Puffer entfernt. Zu den in MACS-Puffer resuspendierten Zellen wurde nun ein gegen den anti-CD34-AK gerichteter, mit einem Eisenpartikel markierter Antikörper gegeben, die Zellen nach einer Inkubationszeit von 15min bei 4°C in MACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 5ml MACS-Puffer aufgenommen. Die so markierten CD34-positiven Zellen wurden nun über eine mit 3ml MACS-Puffer equilibrierte LS-Säule gegeben. Nach zweimaligem Spülen mit je 6ml MACS-Puffer wurden

die CD34<sup>+</sup> Zellen aus der Säule eluiert und über einer zweiten Säule nochmals positiv selektioniert, so dass die erreichte Reinheit der CD34<sup>+</sup> Zellen bei >95% lag.

Bei einigen Patientenproben wurden die Blasten aus dem peripheren Patientenblut mittels CD3-/CD19- beziehungsweise einer CD2-/CD19-Depletion isoliert. Dabei werden die T-Zellen mit Hilfe des anti-CD3-Antikörpers und die B-Zellen mittels des anti-CD19-Antikörpers in der LS-Säule gebunden. Das CD2 Oberflächenantigen befindet sich auf frühen Zellstadien (einschließlich NK- und T-Zellen). Die Blasten befinden sich in diesem Fall im Durchlauf, der steril aufgefangen wurde. Die übrigen Schritte entsprechen im Prinzip den oben beschriebenen Teilschritten.

### **8. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Um die bei -80°C eingefrorenen Zellen aufzutauen, wurden zunächst 8ml des gewünschten Mediums vorgelegt, um die Zeit, die die Zellen nach dem Auftauen im 37°C warmen Wasserbad im Dimethylsulfoxid (DMSO) enthaltenden Einfriermedium verbringen, möglichst kurz zu halten. Die Zellen wurden dann unter Suspendieren in das Medium ( X-VIVO20 beim Versuch zum Einfluss von Leukotrien D<sub>4</sub> auf das Zytoskelett ) überführt und bei 320g für 7min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Dichte in frischem Medium aufgenommen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen, danach wurden je  $2 \times 10^7$  Zellen in 900µl PBS aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und 1:2 mit Einfrierlösung auf ein Endvolumen von 1,8ml verdünnt. Die Kryoröhrchen wurden direkt im Anschluss in eine mit Isopropanol befüllte Einfrierbox überführt, die eine konstante Abkühlung von 1°C/min garantiert, und bei -80°C eingefroren.

### **9. Messung der Fluoreszenz am Durchflusszytometer (FACS)**

Mit Hilfe des Durchflusszytometers gelingt die quantitative Bestimmung des durch Phalloidin-FITC ( Emissionsspitze für FITC bei 525nm = grün) markierten f-Aktins. Die markierten Zellen werden einzeln am Laser vorbeigeführt und ihre Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften gemessen. Durch die Messung des *forward light scatter* (FSC) wird die Zellgröße und durch die Messung des *side scatter* (SSC) die Zelldichte und Granularität der Zellen erfasst (Loken et al., 1976).

Zur Bestimmung des Phänotyps der Zellpopulation wird im Arbeitsprogramm *Cellquest pro* ein Schaubild eröffnet, das Größe (FSC) und Granularität (SSC) der gemessenen Zellen darstellt, die anschließend eingegatet werden. Die Intensität der Fluoreszenz wird gleichzeitig in einem Histogramm aufgetragen.

Die so gewonnenen Daten wurden mit dem Computerprogramm WIN-MDI ausgewertet: In einem Dotplot wurden die Zellen gegatet und der Fluoreszenz-peak in einem Histogramm dargestellt. Anschließend wurde die relative Steigerung der Fluoreszenz im Vergleich zum Null-Sekunden-Wert der Methanolkontrolle (Lösungsmittelkontrolle, sh. unten) bzw. der LTD<sub>4</sub>-Zugabe bestimmt.

### **10. Einfluss von Leukotrien D<sub>4</sub> auf das Zytoskelett**

Unter den Komponenten des Zytoskeletts bilden die Mikrofilamente mit 6-8nm neben den Intermediärfilamenten (ca.10nm ) und den Mikrotubuli (ca.25nm ) die Gruppe mit dem kleinsten Durchmesser. Diese helikalen Homopolymere besitzen ein Plusende, an dem sie ständig wachsen, und ein Minusende, an dem sie zerfallen. Sie bestehen aus globulärem (g-) Aktin, das mit ATP komplexieren und sich in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> und K<sup>+</sup> Ionen zu filamentösen (f-) Aktin verbinden kann. Dies geschieht am Plusende der Mikrofilamente. Da Aktin die Eigenschaften einer ATPase besitzt, wird das ATP im f-Aktin langsam zu ADP hydrolysiert, und die Mikrofilamente zerfallen an ihrem Minusende. Diese Depolymerisation kann nun durch Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes, durch Bindung an das Minusende gehemmt werden. Dadurch wird eine Quantifizierung des Anteils an f-Aktin am Zytoskelett bei gleichzeitiger Fixierung und Stabilisierung des f-Aktins möglich.

Für den Versuch werden 5x 10<sup>6</sup> Zellen in 4ml X-VIVO20 benötigt (das entspricht 1,25x 10<sup>6</sup> Zellen/ml ). Um unspezifische Effekte auf das Zytoskelett zu vermeiden, wurden die Zellen während des ganzen Versuchs nicht geschüttelt (= im Folgenden *gevoxt*). Nach einmaligem Waschen in X-VIVO wurde das Pellet in 4ml Medium aufgenommen und die Zellsuspension zu je 250µl in 16 sterile Eppendorfgefäße (= im Folgenden *-cups*) aliquotiert. Anschließend wurden die Zellen für 30min bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Währenddessen wurde die Arbeitslösung hergestellt. Um das Phalloidin-FITC-Konjugat dabei nicht unnötig dem Licht auszusetzen, wurde das Licht an der Sterilbank ausgeschaltet. Zu 400µl Formaldehyd wurden 392µl PBS und je 4µl Lysophosphatidylcholin und

Phalloidin-FITC gegeben. Das Lysophosphatidylcholin dient dazu, die Zellmembran für das Phalloidin durchlässig zu machen. Die fertige Arbeitslösung wurde gevortext und zu je 50µl auf 16 sterile Eppendorfcups verteilt.

Zur Herstellung einer 10µM LTD<sub>4</sub>-Lösung wurde die 100µM LTD<sub>4</sub>-Stammlösung 1:10 mit Methanol verdünnt. Da während des Versuchablaufs 2,55µl dieser 10µM LTD<sub>4</sub>-Lösung zu 250µl Zellsuspension gegeben wurden, ergibt sich durch diese 1:100 Verdünnung eine Endkonzentration von 100nM LTD<sub>4</sub>, bei der aufgrund vorheriger Versuche ein Optimum zu erwarten war (vgl. unter Abschnitt III.2).

Der Versuch wurde anschließend wie folgt durchgeführt:

Zu den 250µl Zellsuspension wurden 2,55µl der 10µM LTD<sub>4</sub>-Lösung, bzw. als Lösungsmittelkontrolle 2,55µl Methanol gegeben. Nach Mischen mit einer Pipette wurde für 0, 5, 10, 20, 60, 120 und 240 Sekunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in die Arbeitslösung überführt, das Phalloidin-FITC konnte durch die durch Lysophosphatidylcholin durchlässig gemachte Zellmembran eindringen und das polymerisierte f-Aktin fixieren und färben. Nach weiteren 10min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für 2min bei 8000rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in 200µl FACS-FIX resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Bis zum Messen am FACS-Gerät wurden die Zellen bei 4°C gelagert.

Zur Auswertung wurde die relative Zunahme des Anteils an f-Aktin am Zytoskelett gegenüber der Lösungsmittelkontrolle bestimmt.

### **11. Real-time reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Zur Isolierung der gesamt RNA wurden die Zellen zunächst zweimal in PBS gewaschen und das Pellet anschließend in 700µl Guanidinium-Isothiocyanat-haltigem Puffer (RLT-Puffer, Qiagen, Hilden) aufgenommen. Dies führt zur Lyse der Zellen und zur Denaturierung vorhandener Proteine. Die Aktivität freigesetzter RNasen wurde durch den Zusatz von β-Mercaptoethanol (Endkonzentration: 0,1 M) gehemmt.

Das visköse Zellysate wurde anschließend bei -80°C eingefroren.

Die Aufreinigung und Anreicherung der RNA aus den lysierten Zellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

Die bei Raumtemperatur aufgetaute Zellsuspension muss hierfür zunächst homogenisiert werden: Nach Suspension mit der Pipette gibt man das Zellysate auf eine QIAshredder-Säule und zentrifugiert für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und 26°C. Der Durchlauf

wird mit 700µl 70% Ethanol verdünnt, auf eine Spin-Säule (RNeasy *mini spin columns*) gegeben und bei 10000g für 30 Sekunden zentrifugiert. Dies führt durch eine selektive Anhaftung von RNA-Partikeln mit einer Länge von mehr als 200 Nukleotiden an eine Silikagel-Membran zur eigentlichen Isolierung der RNA.

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch genomische DNA wurden alle Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Hierzu wurde die RNA in 350µl RW1-Puffer (Wasch-Puffer) gewaschen, mit 80µl DNase-Inkubationsmix aus 50µl DNase-Stammlösung und 350µl RDD-Puffer für 15 Minuten inkubiert, in RW1-Puffer und anschließend in RPE- Puffer gewaschen und zuletzt mit 30µl DEPC-Wasser (hochreines, mit dem chemischen RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat versetztes Wasser; Carl Roth, Karlsruhe) eluiert.

Die Durchführung der folgenden Schritte erfolgte auf Eis.

Die Konzentration der eluierten RNA-Lösung wurde durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ) bestimmt. Hierzu wurde 1µl RNA-Lösung mit 7µl DEPC-Wasser verdünnt. Als Referenzwert diente reines DEPC-Wasser. Die gleichzeitige Bestimmung der optischen Dichte bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) ließ darüber hinaus Verunreinigungen der vorhandenen RNA-Präparation durch Proteine erkennen und diente so als Reinheitskontrolle. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  lag in der Regel bei 1,6-1,9.

Anschließend erfolgte die Synthese der komplementären DNA (cDNA) mit Hilfe der MuLV Reversen Transkriptase und Oligo-d(T)-Primern. Die vorausgegangene Konzentrationsbestimmung ermöglichte die Berechnung des Volumens [µl] von 1µg bzw. bei weniger konzentrierten RNA-Lösungen 0,5µg RNA. Dieses Volumen wurde mit DEPC-Wasser auf 5µl aufgefüllt und mit 15µl eines für alle Proben gemeinsam hergestellten Mastermixes versetzt, was den Vorteil hat, dass etwaige Pipettierschwankungen ausgeglichen und für alle Ansätze gleiche Bedingungen geschaffen werden.

Pro RNA-Ansatz (also pro 1µg RNA) wurden für den Mastermix pipettiert:

- 4 µl DEPC-Wasser
- 2 µl Puffer II
- 4 µl  $MgCl_2$
- 2 µl Nukleotide
- 1µl Oligo-d(T)
- 1µl RNase-Inhibitor
- 1 µl MuLV Reverse Transkriptase

Dabei wurde darauf geachtet, das Enzym immer zuletzt zu pipettieren und die Lösungen auf Eis zu haben.

Als Negativ-Kontrolle und zum Erkennen von DNA-Kontaminationen der RNA diente ein ohne Reverse Transkriptase hergestellter Kontrollansatz. Dabei wurde die Reverse Transkriptase im ansonsten identisch hergestellten Mastermix durch 1 µl DEPC-Wasser ersetzt.

Die Umschreibung erfolgte im GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Langen) durch Erhitzen für 20 Minuten auf 42°C, gefolgt von 5 Minuten bei 99°C und anschließender Abkühlung auf 4°C. Das Endvolumen verblieb in allen Ansätzen bei 20 µl.

Nun folgte die Durchführung der eigentlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1985). Diese ermöglicht die Amplifikation spezifischer durch zwei Oligonukleotide begrenzter DNA-Fragmente: In einer zyklischen Reaktion werden zunächst die beiden Stränge durch Temperaturerhöhung auf etwa 90°C denaturiert. Nach Abkühlen auf etwa 50°C lagern sich die aus 18-22 Nukleotiden bestehenden Oligonukleotide, die jeweils komplementär zu einem DNA-Strang sind, an die DNA an (*Annealing*) und dienen der thermostabilen *Taq*-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aqhaticus* als Primer. Es folgt die Komplementierung der Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieser Zyklen ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle.

Für den Reaktionsansatz wurde die cDNA mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 50ng/µl gebracht und 2 µl der verdünnten cDNA in die *wells* einer PCR-96-well-Platte vorgelegt. Für jede Probe wurde dabei eine Doppelbestimmung und zusätzlich als Negativ-Kontrolle ein Ansatz mit DEPC-Wasser anstatt cDNA und ein Ansatz, in dem sich statt cDNA RNA befand, angesetzt. Als interner Standard diente die Amplifikation des Genes für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH).

Für das Reaktionsgemisch pipettiert man pro Ansatz:

- 10 µl ready-to-use Master Mix (enthält die *Taq*-Polymerase, Nukleotide, Puffer)
- 4 µl Primermix (Konzentration im Endansatz: CysLT1: 50 nM fw/ 900 nM rv  
GAP-DH: 900 nM fw/ 300 nM rv)
- 2 µl Sonde (diese besteht aus einem fluoreszierendem Partikel und einem weiteren, der bei räumlicher Nähe der beiden Partikel die Fluoreszenz durch Interferenz auslöscht. Im Verlauf der DNA-Synthese durch die *Taq*-Polymerase

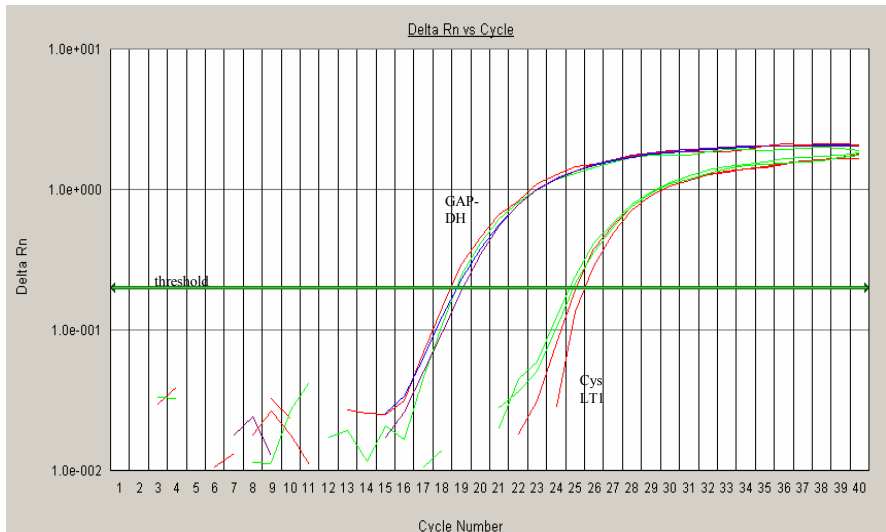
wird diese Sonde „zerschnitten“, wodurch die räumliche Nähe der beiden Partikel verloren geht und die Fluoreszenz zunimmt.)

- 2 µl DEPC-Wasser

Von diesem Reaktionsgemisch werden je 18µl zu der vorgelegten cDNA gegeben und vorsichtig unter Vermeidung der Entstehung von Luftblasen mit der Pipette gemischt. Danach verschließt man die Platte mit optischer Folie und zentrifugiert für eine Minute bei ca. 200g, um etwaige Luftblasen zu beseitigen.

Die Amplifikation erfolgte im ABI PRISM 7000 Sequence Detection System von Applied Biosystems.

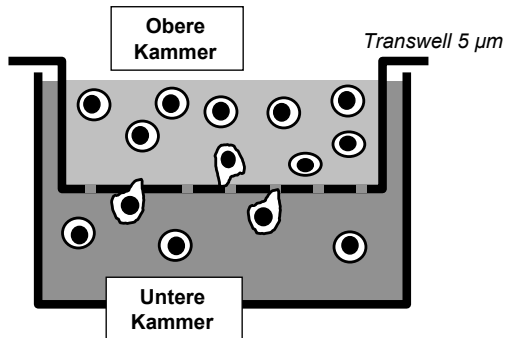
Zur Auswertung der gewonnenen Ergebnisse wurde der Mittelwert aus den jeweiligen Doppelbestimmungen gebildet und dieser zum Wert der Menge an RNA für die GAP-DH als internem Standard in Relation gesetzt. Die mathematische Auswertung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.



**Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der RT-PCR Auswertung.** Die linken Kurven zeigen den negativen Logarithmus zur Basis zwei der eigentlichen RNA-Menge des konstitutiv exprimierten Enzyms GAP-DH, die rechten den des Leukotrienrezeptors CysLT1. Die *threshold* wird optimalerweise im linearen Bereich der Kurven angelegt. Die Relation der Kurven in Höhe des Schnittpunktes mit der *threshold* dient als Grundlage der Auswertung.

## 12. Chemotaxis-Assay

Der Einfluss chemotaktischer Faktoren auf die Zellmigration kann in einem entsprechend modifizierten *in vitro*-Modell untersucht werden (Möhle et al., 1997). Hierzu dient eine 24-well-Platte, die mit Hilfe entfernbarer Membraneinsätze in eine obere und eine untere Kammer unterteilt werden kann, wobei die eingehängte Membran etwa einen Millimeter vom Boden des wells entfernt ist. Die (potentiell) chemotaktische Substanz wird in die untere Kammer gegeben; dadurch bildet sich im Bereich der Membran ein Konzentrationsgradient. Die zu testenden Zellen werden in die obere Kammer gegeben und können die Membran in beide Richtungen frei passieren. Die transmigrierten Zellen können nach einer definierten Inkubationszeit aus dem unteren Teil der Kammer zur Quantifizierung und Phänotypisierung entnommen werden.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des verwendeten Transmigrationssystems (Querschnitt).** Das Reaktionssystem wird durch den Membraneinsatz in eine obere und eine untere Kammer unterteilt. Die nicht migrierten Zellen befinden sich in der oberen Kammer, die transmigrierten in der unteren, aus der sie entnommen, quantifiziert und phänotypisiert werden können. Nach Böhmeler (2005), verändert.

Für die exemplarisch durchgeführten Chemotaxis-Assays wurden aufgrund der ausgeprägten Reaktion im Aktin-Polymerisationsversuch jeweils zwei Proben von Patienten mit AML M1 und M4 gewählt, da diese eine hinreichende funktionelle Aktivität des CysLT1-Rezeptors vermuten ließen.

Für den Versuch werden pro well 500.000 Zellen in 100µl serumfreiem X-VIVO 20 benötigt. Die aufgetauten Zellen wurden zweimal in X-VIVO 20 gewaschen, gezählt und  $1,2 \times 10^7$  Zellen aliquotiert. Nach erneutem Waschen wurde das Pellet in 2,4ml X-VIVO 20 aufgenommen. Zwischenzeitlich erfolgte die Herstellung der zu testenden LTD<sub>4</sub>-Konzentrationen nach dem folgenden Schema: Die vorhandene 100µM LTD<sub>4</sub>-Vorratslösung



wurde 1:3,3 bzw. 1:10 auf 30µM bzw. 10µM LTD4 und anschließend nochmals 1:10 auf 3µM bzw. 1µM mit Methanol verdünnt. Diese LTD4-Stammlösungen wurden jeweils im Verhältnis 1:100 mit X-VIVO 20 auf 1.000nM, 300nM, 100nM, 30nM und 10nM verdünnt und als Carrier-Kontrolle eine 1:100 mit X-VIVO 20 verdünnte Methanollösung hergestellt.

Kontrolle Carrier MetOH	Kontrolle Carrier MetOH	Kontrolle Carrier MetOH	300nM	300nM	300nM
10nM	10nM	10nM	1000nM	1000nM	1000nM
30nM	30nM	30nM	SDF-1 100ng/ml	SDF-1 100ng/ml	SDF-1 100ng/ml
100nM	100nM	100nM	---	---	---

**Abbildung 5: Ansatzschema der 24-well-Platte**

Als Positivkontrolle diente eine 100ng/ml SDF-1- Lösung. 600µl dieser Assay-Medien wurden in die untere Kammer eines Transwell-Systems der Porengröße 5µm vorgelegt. Nach Umsetzen der Membraneinsätze in die mit Assay-Medium gefüllten wells wurden pro well 100µl Zellsuspension, entsprechend 500.000 Zellen, zugegeben. Die Zellen wurden während dieser Zeit nicht gevortext. Die Membraneinsätze erlauben eine Migration von Zellen in beiden Richtungen durch die vorhandenen Poren.

Die so vorbereiteten Platten wurden für 14-16 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Anschließend wurden die Membraneinsätze verworfen, der Inhalt der wells sorgfältig suspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und bei 1500rpm für 7 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurden in 50µl FACS-Puffer aufgenommen und entsprechend der Expression von Oberflächenmarkern mit 2µl einer Lösung von Antikörpern gegen CD34 bzw. CD133 mit PE gefärbt. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation bei 4°C.

Um bei der Messung am FACS vergleichbare Zellzahlen zu erhalten, müssen jedem Ansatz 10.000 FITC-konjugierte Kalibrierungs-beads (CaliBRIT<sup>TM</sup>,BD) als interner Standard

zugegeben werden, damit das FACS-Gerät die Messung jeweils beendet, wenn 5.000 beads gezählt wurden (das gate für die FITC-beads war hierbei G1=R1). Dafür wurden FITC-beads in 1ml FACS-Puffer aufgenommen und gezählt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden allen Ansätzen 50µl FACS-Puffer und 10.000 beads zugegeben.

Anschließend erfolgte die Messung am FACS, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zell- und die beads-Population gut unterscheidbar waren. So war die Ermittlung der relativen Transmigrationsrate bei gleichzeitiger Phänotypisierung, die eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unspezifische Subpopulationen verhindert, möglich.

Zur Auswertung wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Anzahl an migrierten Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen.

#### **14. Statistische Analyse**

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test für unverbundene Stichproben herangezogen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### **13. Patientencharakterisika**

In die Wertung aufgenommen wurden insgesamt dreiundzwanzig Patienten mit akuter Leukämie, deren Diagnose im Routinelabor mittels morphologischer, zytochemischer und immunphänotypischer Kriterien ermittelt wurde. Bei den aus Patientenproben mit akuter myeloischer Leukämie isolierten Zellen erfolgte die Einteilung in die FAB-Subgruppen entsprechend der klinischen Diagnose. Die Entnahme der Zellen erfolgte nach entsprechender Aufklärung und Einverständniserklärung gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Tübingen (Projektnummer 104/2004V).

Von den Patienten waren dreizehn weiblich, zehn männlich. Das Alter bei Isolierung der Zellen lag zwischen 39 und 82 Jahren, bei einem Median von 64 Jahren. Bei vier der Patienten war eine sekundäre AML diagnostiziert worden, bei zwei Patienten eine c-ALL, bei einem eine Ph<sup>+</sup> prä-B-ALL und bei einem eine biphänotypische AL. Auf die FAB-Untergruppen verteilen sich die Patientenproben wie folgt (auch die Fallzahlen der Patienten mit ALL beziehungsweise biphänotypischer AL sind in der Tabelle dargestellt):

**Tabelle 4: Patientencharakteristika und Fallzahlen**

	<b>Totale Fallzahl</b>	<b>Geschlecht (m/w)</b>	<b>Mittleres Alter (Streuwert)</b>
<b>AML FAB M0</b>	2	2/0	64,5 Jahre
<b>AML FAB M1</b>	4	3/1	72,25 Jahre (53-85)
<b>AML FAB M2</b>	5	1/4	62,6 Jahre (48-74)
<b>AML FAB M4</b>	5	2/3	55,8 Jahre (39-82)
<b>AML FAB M5</b>	3	1/2	65,3 Jahre (60-70)
<b>c-ALL</b>	2	0/3	66Jahre
<b>Ph<sup>+</sup>prä-B-ALL</b>	1	0/1	69Jahre
<b>Biphänotyp.AL</b>	1	1/0	64Jahre

### III Ergebnisse

#### 1. RT-PCR-Analyse der CysLT1- mRNA-Expression in humanen AML-und ALL-Zellen

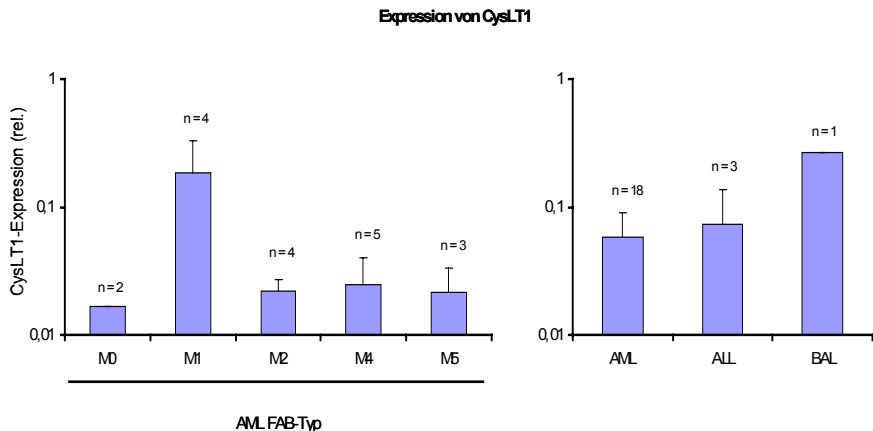
Die Expression des Cysteinyl-Leukotrienrezeptors CysLT1 wurde an aus peripherem Blut oder Knochenmark isolierten Proben von insgesamt 22 an akuter Leukämie erkrankten Patienten analysiert. Davon enthielten 18 Proben Zellen einer AML, drei Proben Zellen einer ALL und eine Probe stammte von einem Patienten mit biphänotypischer ALL.

Als Positivkontrolle diente aufgrund ihrer hohen CysLT1-Expression (Bautz et al., 2001) die CD34<sup>+</sup> Vorläuferzelllinie KG1a. Die ebenso wie reife T-Zellen des peripheren Blutes (Figuroa, 2001) für CysLT1 negative T-Zelllinie Jurkat (Böhmler, 2005) wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Als internen Standard verwendeten wir die mRNA-Menge für das Enzym Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAP-DH).

Die Isolierung der RNA, Generierung von cDNA und deren Amplifikation mittels RT-PCR erfolgte wie unter Punkt II.11 beschrieben.

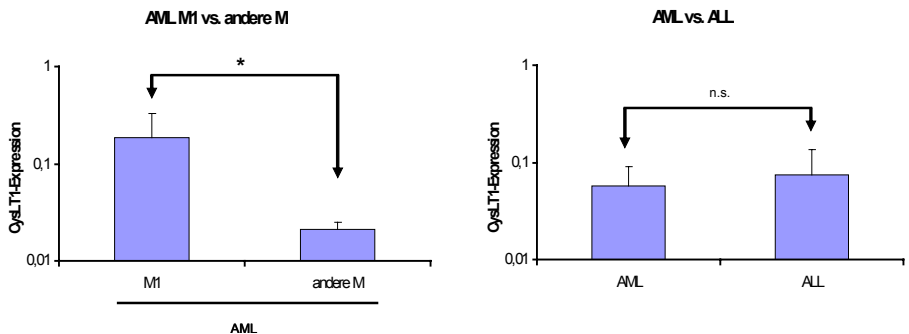
Spezifische PCR-Signale für CysLT1 wurden durchweg bei allen untersuchten Proben gefunden. Es bestanden jedoch quantitative Unterschiede (siehe Abbildung 6):

Betrachtet man alle AML-Untergruppen gemeinsam im Vergleich zu Zellen der akuten lymphatischen Leukämie, so lässt sich bei letzteren ein Trend zu höherer CysLT1-Expression beobachten.



**Abbildung 6:** RT-PCR-Analyse der CysLT1-Expression bei aus peripherem Patientenblut bzw. Knochenmark isolierten akut leukämischen Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die stärksten Signale für den Leukotrienrezeptor unter den AML FAB-Typen M1 bis M5 fanden sich bei Zellen der akuten unreifen Myeloblastenleukämie (FAB M1). Eine noch stärkere Expression zeigt sich bei den Zellen der biphenotypischen ALL. Bei den ALL-Zellen zeigte sich eine höhere CysLT1-Expressionsstärke als bei den Zellen der AML-Untergruppen M0, M2, M4 und M5, die sich hinsichtlich der mRNA-Menge für CysLT1 nicht wesentlich unterschieden. In der Gruppe von Patienten mit AML-M1 ergab sich ein sehr heterogenes Bild, die relativen Werte für die PCR-Signalstärke schwankten hier zwischen 0,0123 und 0,6177 (diese höchste CysLT1-Expression einer AML M1 lag auch deutlich über dem relativen Wert für die PCR-Signalstärke von 0,2652 der biphenotypischen ALL). Die stärkere CysLT1-Expression bei den Zellen der akuten unreifen Myeloblastenleukämie (FAB M1) war dabei im Vergleich zu den anderen FAB-Typen signifikant ( $p < 0,05$ ), während sich der Unterschied zwischen den ALL-Zellen und den Zellen der AML-Untergruppen als statistisch nicht signifikant erwies (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: CysLT1-Expression der AML M1 vs. andere FAB-Typen beziehungsweise AML vs. ALL.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$  (t-Test für unverbundene Stichproben), n.s.: nicht signifikant.

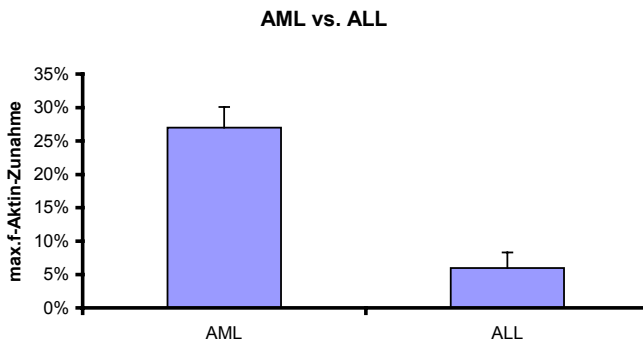
## 2. LTD<sub>4</sub>-induzierte Aktinpolymerisation bei akut leukämischen Zellen

Die bereits unter II.10 beschriebene Umwandlung von globulärem (g-)Aktin in filamentöses (f-)Aktin stellt einen wichtigen Schritt im Zuge der Zellmigration dar. Mit einem Gift des Knollenblätterpilzes, dem Phalloidin, steht eine Substanz zur Verfügung, die es ermöglicht, das polymerisierte f-Aktin zu fixieren. Durch die Konjugation des Phalloidins mit dem

Fluoreszenzfarbstoff FITC wird über die Messung der Zunahme der Fluoreszenz am FACS-Gerät eine quantitative Bestimmung der Zunahme des prozentualen Anteils von f-Aktin am Zytoskelett möglich.

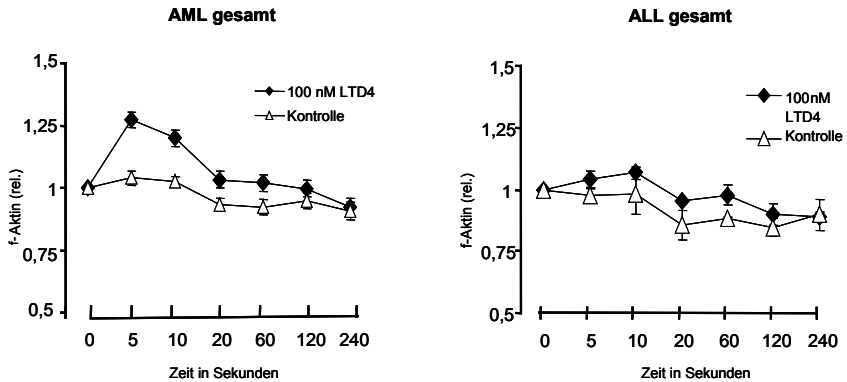
Die Versuche wurden unter Verwendung der in II.10 beschriebenen Methodik durchgeführt. Da bei Vorversuchen an der myeloiden Zelllinie KG1a festgestellt worden war, dass die maximale Reaktion der Zellen bereits bei einer LTD<sub>4</sub>-Endkonzentration von 100nM zu erwarten ist (Böhmler, 2005), wurden alle Versuche mit dieser Leukotriendosis durchgeführt.

Stellt man die Ergebnisse der ALL-Zellen denen der AML-Zellen insgesamt gegenüber, so lässt sich erkennen, dass die Reaktion der AML-Zellen auf die Stimulation mit LTD<sub>4</sub> deutlich stärker ausfällt als bei den ALL-Zellen: Erstere reagierten mit einer Steigerung des Anteils an f-Aktin um  $27 \pm 0,133$  %, letztere mit einer Steigerung von  $6,7 \pm 0,040$  %. Damit lag der Wert für die ALL-Zellen nur geringfügig über dem der Kontrolle, bei der als Stimulus das Lösungsmittel Methanol eingesetzt worden war. Weiterhin ist bemerkenswert, dass bei den AML-Zellen die maximale Reaktion bereits nach einer Inkubationszeit der Zellen mit LTD<sub>4</sub> von fünf Sekunden zu beobachten war und sich nach 240 Sekunden wieder weitestgehend dem Ausgangswert angenähert hatte. Bei den ALL-Zellen trat der maximale Wert von 1,067 erst nach zehn Sekunden auf und erreichte bereits nach 20 Sekunden wieder Werte unter 1,0 (siehe Abbildungen 8-10 und Abbildung 12).

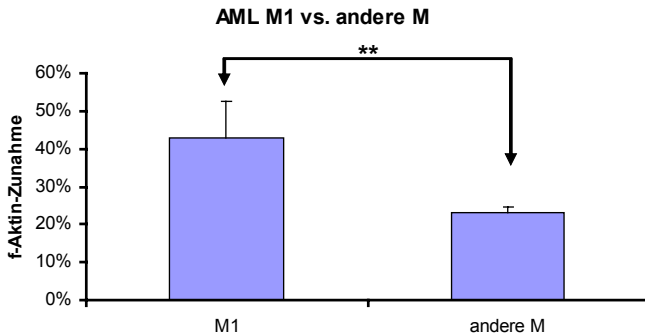


**Abbildung 8: Gegenüberstellung der LTD<sub>4</sub>-induzierten Aktinpolymerisation bei AML- und ALL-Zellen.**

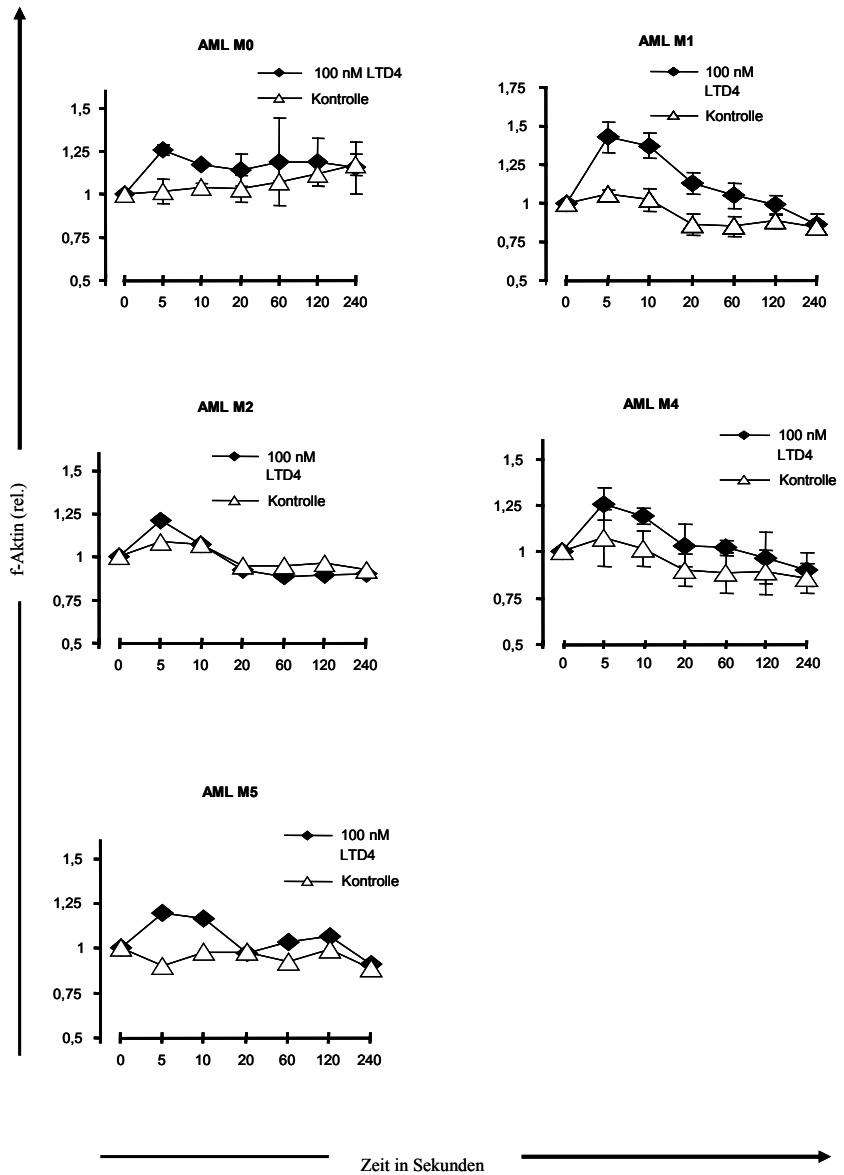
Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Reaktion  $\pm$  SEM bei den AML nach 5s, die den ALL nach 10s. Die größte Zunahme des Anteils an f-Aktin am Zytoskelett erfolgte bei den AML-Zellen bereits nach fünf Sekunden Inkubation mit LTD<sub>4</sub>, bei den ALL-Zellen erst nach zehn Sekunden.



**Abbildung 9 und 10: Fluoreszenzzytometrische Analyse des Effekts von LTD<sub>4</sub> auf das Zytoskelett primärer AML- und ALL-Zellen.** Insgesamt 18 Proben von AML-Zellen und drei von ALL-Zellen wurden mit 100nM LTD<sub>4</sub> beziehungsweise mit dessen Lösungsmittel Methanol stimuliert und mit Hilfe von FITC-konjugiertem Phalloidin auf ihren Gehalt an f-Aktin untersucht. Dargestellt sind die mittleren Werte der relativen Fluoreszenz fünf bis 240s nach Zugabe von LTD<sub>4</sub> in Bezug auf den Ausgangswert vor Leukotrien-Zugabe ( 0 Sekunden = 1). Alle Werte entsprechen den Mittelwerten ± SEM.



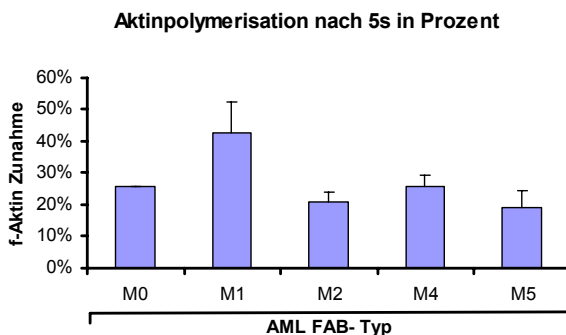
**Abbildung 11: Relative f-Aktin-Zunahme bei der AML M1 im Vergleich zu den anderen FAB-Typen.** Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. \*\*: p < 0,01 (t-Test für unverbundene Stichproben).



**Abbildung 12:** Fluoreszenzzytometrische Analyse des Effekts von LTD4 auf das Zytoskelett (Fortsetzung). Darstellung der AML-Untergruppen.



Wie bei der PCR-Analyse der mRNA-Expression für CysLT1 beobachtet - dort fand sich die stärkste CysLT1- Expression bei der AML M1 -, zeigte sich auch bei der Aktinpolymerisation bei der Betrachtung der einzelnen FAB-Untergruppen für die AML M1 mit  $42,8 \pm 0,098 \%$  die intensivste Steigerung des f-Aktin-Anteils, gefolgt von Zellen der AML M0 mit 26 % (siehe Abbildung 11). Vergleichbare Reaktionen ließen sich bei der AML M4 feststellen (Steigerung um  $25,6 \pm 0,038 \%$ ). Mit  $20 \pm 0,031 \%$  und  $19,3 \pm 0,049 \%$  lagen die Ergebnisse von Zellen der Untergruppe M2 beziehungsweise M5 nicht weit auseinander (siehe Abbildung 13).



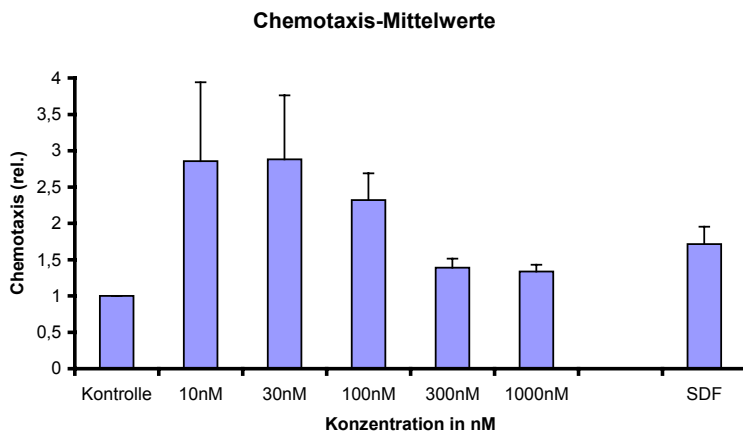
**Abbildung 13: 5-Sekunden-Wert des Anteils an filamentösem Aktin am Zytoskelett.**

Die Abbildung zeigt die mit Hilfe von FITC-konjugiertem Phalloidin am FACS-Gerät bestimmte Zunahme der Fluoreszenz. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Zunahme aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM.

### **3. Funktionelle Untersuchung zur Wirkung von LTD<sub>4</sub> auf das migratorische Verhalten von Blasten bei akuter Leukämie**

Nachdem in den Versuchen zur LTD<sub>4</sub>-induzierten Veränderung des Zytoskeletts eine Zunahme des filamentösen Aktins nach Stimulation der Zellen mit LTD<sub>4</sub> gezeigt werden konnte, wurde in weiteren Versuchen beispielhaft die potentielle Rolle von LTD<sub>4</sub> als chemotaktischem Faktor untersucht, um die Frage zu beantworten, ob die Umwandlung des Zytoskeletts tatsächlich zu einer erhöhten migratorischen Fähigkeit der Zellen führt.

Hierzu wurden Blasten aus dem peripheren Blut von vier AML-Patienten in serumfreiem Medium (X-VIVO 20) für 14-16 Stunden in entsprechende Chemotaxis-Assays eingebracht, die eine Migration der Zellen durch 5µm-Poren in LTD<sub>4</sub>-haltige Medien erlauben (siehe auch unter II.12). Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Ansatz mitgeführt, der 100ng/ml SDF enthielt. Bei der Carrier-Kontrolle wurde das Lösungsmittel Methanol als Stimulus eingesetzt. In der folgenden Abbildung 14 sind die im Versuch gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Es ließ sich ein deutlicher dosisabhängiger chemotaktischer Effekt von LTD<sub>4</sub> auf die Blasten nachweisen, der zu einer Steigerung der Migration um den Faktor  $2,88 \pm 0,883$  gegenüber der Kontrolle führte, bei der sich an Stelle von LTD<sub>4</sub> dessen Lösungsmittel Methanol im Reaktionssystem befand. Die maximale Wirkung des Leukotriens konnte bei einer Konzentration von 30nM festgestellt werden, was sich mit den Untersuchungen von Bautz et al. (2001) und Böhmler (2005) deckt. Bemerkenswert ist jedoch, dass auch bereits die wesentlich geringere Konzentration von 10nM zu einer nur minimal geringeren Zunahme der chemotaktisch gesteuerten Migration der Zellen führte, wobei hier die interindividuellen Schwankungen zwischen den Patientenproben nicht unerheblich waren (Steigerung um den Faktor  $2,85 \pm 1,086$ ).



**Abbildung 14: Chemotaxis von primären Leukämiezellen unter dem Einfluss verschiedener LTD<sub>4</sub>-Konzentrationen.** Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der Anzahl an migrierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, bei der sich an Stelle von LTD<sub>4</sub> dessen Lösungsmittel Methanol im Reaktionssystem befand. Der Ansatz mit 100ng/ml SDF diente als Positivkontrolle.

Bei höheren Leukotrienkonzentrationen konnte ein Rückgang der migratorischen Tätigkeit der Zellen beobachtet werden. Dies ist nicht untypisch für chemotaktische Substanzen und wurde auch bei hämatopoetischen Progenitorzellen beobachtet (Bautz et al., 2001). Dieser Rückgang der migratorischen Tätigkeit könnte zum Beispiel auf eine Downregulation des Rezeptors zurückzuführen sein.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass bei drei von vier Proben der maximale chemotaktische Effekt von Leukotrien D<sub>4</sub> um den Faktor 1,2 bis 3,8 größer war als der der Positivkontrolle mit SDF.

#### IV Diskussion

Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, dass bei der Migration von malignen hämatologischen Zellen und deren Tropismus zum Knochenmark dieselben Mechanismen und Faktoren eine Rolle spielen, welche auch für die Stammzellmigration verantwortlich sind. Sowohl Zellen der akuten als auch der chronischen Leukämie exprimieren verschiedene Adhäsionsmoleküle der Integrinfamilie, die an der Adhäsion der Leukämiezellen an vaskulären Endothelien (Watarai et al., 2002) sowie an der Interaktion mit Zellen des Knochenmarkstromas beteiligt sind (Matsunaga et al., 2003; Winter et al., 2001). Darüber hinaus wird die funktionelle Aktivität der Zellen über dieselben Chemokine gesteuert, die auch an der Migration normaler Lymphozyten beteiligt sind. Wichtigstes Beispiel hierfür ist der *stromal cell derived factor 1* (SDF-1), dessen Rezeptor CXCR4 sowohl auf CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen (Möhle et al., 1998) als auch auf Blasten der akuten lymphatischen Leukämie und auf monozytär differenzierten AML-Blasten exprimiert wird (Möhle et al., 1999b; Möhle et al., 2000). Aber auch der Leukotrienrezeptor CysLT1 konnte in seiner funktionell aktiven Form auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden, ebenso wie die Stimulation der transendothelialen Migration dieser Zellen in einem *in vitro*-Modell durch seinen Liganden Leukotrien D<sub>4</sub> (Bautz et al., 2004). CysLT1 scheint sogar im Gegensatz zum SDF-1-Rezeptor CXCR4 unter physiologischen Bedingungen eher progenitorspezifisch zu wirken.

Auch auf der CD34<sup>+</sup> Zelllinie KG1a ist der CysLT1-Rezeptor hochaktiv und Leukotrien D<sub>4</sub> führt zu einer starken intrazellulären Kalziumfreisetzung (Möhle et al., 2001). Diese Zelllinie besitzt hingegen nur eine sehr geringe Oberflächenexpression von CXCR4 (Bautz et al., 2001; Tavor, 2004).

Eine deutliche Expression von CysLT1 m-RNA wurde auch in den B-Zell-Leukämielinien DOHH-2, MEC-1 und EHEB gefunden, nicht jedoch in der T-Zelllinie Jurkat. Auch auf primären B-CLL-Zellen konnte der CysLT1-Rezeptor in funktionell aktiver Form nachgewiesen werden (Böhmler, 2005).

Darüber hinaus wurde auch bei anderen Tumoren, namentlich den Zellen des kolorektalen Adenokarzinoms, eine Expression des CysLT1-Rezeptors festgestellt, der hier für Überleben und Proliferation der Zellen eine Rolle spielt (Nielsen et al., 2005).

Es ist bekannt, dass Endothelzellen neben Zytokinen und anderen Peptidverbindungen auch in biologisch signifikanten Mengen Cysteinyl-Leukotriene produzieren (Nolan et al., 1990; Zhang et al., 2002; Luo et al., 2003). Bereits in früheren Untersuchungen konnte die

Produktion von Lipidmediatoren (insbesondere von Lipoxinen) durch frisch isolierte humane Knochenmarkzellen festgestellt werden (Lindgren et al., 1993; Stenke et al., 1987; Stenke et al., 1991). In der Arbeit von Böhmler (2005) gelang der Nachweis, dass Knochenmarkstroma- und -endothelzellen in der Lage sind, biologisch signifikante Mengen der Cysteinyl-Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> zu produzieren. Auch Zellen, die selbst keine 5-Lipoxygenase besitzen, können von anderen Zellen parakrin zur Verfügung gestelltes LTA<sub>4</sub> aufnehmen und weiter zu LTB<sub>4</sub> und den Cysteinyl-Leukotrienen LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> umsetzen (transzellulärer Metabolismus) (Denzlinger, 1996). Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit sind Leukotriene besonders geeignet, als parakrine Faktoren lokal und zeitlich eng begrenzt die hämatopoetischen Zellen zu beeinflussen.

Eine erhöhte Syntheserate an LTC<sub>4</sub> konnte bei im peripheren Blut vorhandenen Granulozyten von Patienten mit CML festgestellt werden (Sjolinder et al., 2000). Dies weist auf eine eventuell sogar autokrine Produktion von Leukotrienen (Rether et al., 2006) durch Leukozyten bei der malignen Hämatopoese hin.

Einen weiteren Hinweis auf eine potentielle Funktion von Lipidmediatoren als parakrinen Faktoren liefert die Beobachtung, dass eine Kokultivierung hämatopoeseffreier Knochenmarkstromazellen mit CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark desselben Spenders in einem autologen System zu einem Absinken der Menge an Cysteinyl-Leukotrienen im Kulturüberstand um ca. 90 % führte (Böhmler, 2005). Es wäre denkbar, dass von Komponenten des hämatopoetischen Systems produzierte Cysteinyl-Leukotriene über ähnliche Mechanismen wie SDF-1 zu einer verstärkten Adhäsion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen an das Knochenmarkendothel und zu deren chemotaktischer Einwanderung in die entsprechenden Stromatischen führen. Dort resultiert durch die Interaktion zwischen Stromazelle und hämatopoetischer Vorläuferzelle eine Einflussnahme auf Leukotrienbiosynthese und -stoffwechsel. Für andere Lipidmediatoren wie Sphingosin-1-Phosphat, die ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Einfluss auf Progenitorzellen nehmen, konnte in der Tat eine Modulation des CXCR4-vermittelten Homings nachgewiesen werden (Kimura et al., 2004). Es gibt Hinweise dafür, dass ein Fehlen dieser negativen Feedback-Mechanismen, zum Beispiel durch Abnahme der Anzahl hämatopoetischer Zellen im Knochenmark (Aplasie!), einen Anstieg der Leukotrienmenge im Knochenmark zur Folge hat, was zu einem verstärkten Homing der Zellen führt (Böhmler, 2005).

Wegen dieser zahlreichen Hinweise auf eine wichtige Funktion der Leukotriene sowohl bei der normalen als auch bei der malignen Hämatopoese sollte in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Funktion des Lipidmediators Leukotrien D<sub>4</sub> auf Zellen von akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien untersucht werden, einschließlich seines chemotaktischen Effekts auf leukämische Blasten, da die Leukotrienproduktion von Knochenmarkstromazellen zur Knochenmarkinfiltration bei Leukämien beitragen könnte.

Ein essentieller Schritt im Zuge der Zellmigration ist die Umwandlung von globulärem in filamentöses Aktin (Bearer, 1993). In den Versuchen zur Aktinpolymerisation zeigte sich ein deutlicher Effekt des Leukotriens D<sub>4</sub> auf diesen Vorgang:

Die höchste Steigerung des relativen Anteils von f-Aktin am Zytoskelett zeigte sich bei der akuten unreifen Myeloblastenleukämie (FAB-Typ M1), während die akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung (FAB M2) zu den akuten myeloischen Leukämien mit der geringsten f-Aktin-Steigerung gehörte. Dies unterstreicht nochmals die Tatsache, dass CysLT1 in besonderem Maße auf CD34<sup>+</sup> Zellen exprimiert wird (Bautz et al., 2001).

Mit diesen Ergebnissen decken sich die Resultate der Analyse der Expression des CysLT1-Rezeptors mittels RT-PCR, die ebenfalls bei der AML M1 die mit Abstand höchsten Werte ergab, wohingegen die AML M2 zusammen mit der AML M0 und M5 die geringste CysLT1-Expression erkennen ließ.

Eine Erklärung für diese bei der akuten unreifen Myeloblastenleukämie (FAB-Typ M1) im Vergleich zu den anderen Leukämie-Subtypen hohe Expression und Funktion von CysLT1 mag die Ähnlichkeit der Zellen der AML M1 mit ihren nicht-malignen Gegenstücken sein: Die AML M1 Zellen entsprechen vom Phänotyp am ehesten den CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen, die ja gerade CysLT1-positiv sind (Bautz et al., 2001)!

Trotz dieser gleichsinnigen Veränderung ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen der Aktinpolymerisation als Antwort auf eine LTD<sub>4</sub>-Stimulation und der Expression des CysLT1-Rezeptors nachweisen. Erwartungsgemäß zeigte die myeloblastäre CD34<sup>+</sup> Zelllinie KG1a eine deutliche CysLT-1-Expression, im Gegensatz zur T-Zell-Linie Jurkat, die wie reife T-Zellen des peripheren Blutes negativ für CysLT-1 ist (Böhmler, 2005; Figueroa et al., 2001). Obwohl die Zellen der akuten lymphatischen Leukämie bei der PCR-Analyse die zweithöchste CysLT1-Expression erkennen ließen, war eine funktionelle Antwort im Versuch zur Aktinpolymerisation praktisch nicht vorhanden. Als Erklärung hierfür könnte ein Abbau von mRNA, eine Blockierung der Translation, ein Vorliegen des fertigen Proteins in

intrazellulären Vesikeln, aber nicht an der Zelloberfläche, oder Ähnliches dienen. Dass ein positives RT-PCR-Signal nicht zwangsläufig eine signifikante Oberflächenexpression des jeweiligen Rezeptors zur Folge hat, konnte zum Beispiel auch für CXCR4 in KG1a-Zellen beobachtet werden (Möhle et al., 1998a). Diese mag als weiterer Hinweis für die Komplexität der Regulation des Leukotrienstoffwechsels dienen.

In wie weit der CysLT-1-Rezeptor tatsächlich auf der Oberfläche der Zellen liegt, müssten zukünftige Western-Blot-Untersuchungen zeigen. Leider sind aber bisher keine geeigneten Antikörper verfügbar, die eine Bestimmung von CysLT1 auf der Zelloberfläche erlauben würden.

Da die Chemotaxis muriner und humaner Lymphozyten nicht nur durch Chemokine, sondern auch durch Lipidmediatoren ausgelöst werden kann (Goodarzi et al. 2003; Honig et al., 2003), sollte in einem Migrationsassay exemplarisch untersucht werden, ob primäre humane Zellen akuter Leukämien positiv chemotaktisch auf einen Gradienten von Leukotrien D<sub>4</sub> reagieren. Weil es Hinweise dafür gibt, dass Endothelzellen des Knochenmarks in der Lage sind, Cysteinylleukotrienen zu produzieren, was die Aussage eines entsprechenden Transmigrationsassays verfälscht hätte, wurde ein klassischer Chemotaxisassay gewählt, bei dem die Zellen nicht zusätzlich eine Schicht aus Endothelzellen passieren müssen. Unter diesen Bedingungen war es möglich, bei den vier untersuchten Patientenproben eine dosisabhängige, gegenüber der Kontrolle gesteigerte Migration der Zellen zu beobachten, wobei das Konzentrationsoptimum innerhalb der getesteten Leukotriendosen patientenspezifisch zwischen 10 und 100 nM schwankte. Insgesamt gesehen war der Anteil an migrierten Zellen bei einer Konzentration von 10 nM jedoch nur geringfügig kleiner als bei der von Hoshino et al. (1998) für THP-1-Zellen (humane monozytäre CD34<sup>-</sup> AML-Zelllinie) als optimal beschriebenen Konzentration von 30 nM. Dies macht deutlich, dass LTD<sub>4</sub> bereits in erstaunlich geringen Konzentrationen einen erheblichen Effekt auf die zielgerichtete Zellmigration haben kann.

Neben seinem Effekt auf die Umstrukturierung des Zytoskeletts führt LTD<sub>4</sub> auch zu einer Mobilisierung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern (Bautz et al., 2001). Dies lässt einen multifunktionalen Effekt des Lipidmediators auch bei akut leukämischen Zellen vermuten, der an Mechanismen der Signaltransduktion und an migratorischen Prozessen beteiligt ist. Tatsächlich konnten Hoshino et al. (1998) zeigen, dass LTD<sub>4</sub> sowohl über Pertussistoxin-insensitive Wege der Signaltransduktion zu einer Heraufregulierung der Aktivität der MAP-Kinase führt als auch Pertussistoxin-sensitiv die Chemotaxis der Zellen induzieren kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der Leukotrienrezeptor CysLT1 auf den Zellen akuter Leukämien in allen untersuchten Proben exprimiert wird und sein Ligand LTD<sub>4</sub> sowohl eine chemotaktische Reaktion als auch eine Zunahme der Aktinpolymerisation hervorruft. Wie erwartet war diese CysLT1-Expression und -Funktionalität bei der akuten unreifen Myeloblastenleukämie (FAB AML M1), die phänotypisch den hämatologischen Vorläuferzellen am ähnlichsten ist, am stärksten. Daher könnten CysLT1-Antagonisten möglicherweise Migrationsverhalten und andere Zellfunktionen beeinflussen. Ob diese in der Therapie des allergischen Asthmas bereits eingesetzten Medikamente auch eine Bedeutung in der Therapie der akuten Leukämie, möglicherweise in Kombination mit Chemotherapeutika, erlangen werden, kann derzeit noch nicht abgeschätzt werden.



## V Literatur

- Aiuti A., Webb I.J., Bleul C., Springer T., Gutierrez-Ramos J.C. (1997): The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34<sup>+</sup> progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185:111-120.
- Appelbaum F.R., Kopecky K.J., Tallman M.S., Slovak M.L., Gundacker H.M., Kim H.T., Dewald G.W., Kantarjian H.M., Pierce S.R., Estey E.H. (2006): The clinical spectrum of adult acute myeloid leukemia associated with core binding factor translocations. *Br. J. Haematol.* 135(2):165-173.
- Bautz F. (2002): Die Rolle von parakrinen Faktoren bei der transendothelialen Migration hämatopoetischer Progenitorzellen. Dissertation der Eberhard-Karls-Universität Tübingen; S. 146.
- Bautz F., Denzlinger C., Kanz L., Möhle R. (2001): Chemotaxis and transendothelial migration of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood* 97:3433-3440.
- Bearer E.L. (1993): Role of actin polymerization in cell locomotion: molecules and models. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:582-591.
- Berenson R.J., Andrews R.G., Bensinger W.I., Kalamasz D., Knitter G., Buckner C.D., Bernstein I.D. (1988): Antigen CD34<sup>+</sup> marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J. Clin. Invest.* 81:951-955.
- Berger, Engelhardt, Mertelsmann (2002): Das Rote Buch. Hämatologie und Internistische Onkologie. 2.überarbeitete und erweiterte Auflage, ecomed verlagsgesellschaft mbH&Co.KG, Landsberg/Lech, S.361.
- Bevilacqua M.P., Stengelin S., Gimbrone M.A. Jr., Seed B. (1998): Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-5.
- Böhmler A.M. (2005): Die Wirkung chemotaktischer Faktoren auf hämatopoetische Stammzellen, leukämische Zellen und das Mikromilieu des Knochenmarks. Logos Verlag Berlin.
- Boissel M., Leroy H., Brethon B., Philippe N., de Botton S., Auvrignon A., Raffoux E., Leblanc T., Thomas X., Hermine O., quesnel B., Baruchel A., Leverger G., Dombret H., Preudhomme C. (2006): Incidence and prognostic impact of c-KIT, FLT3 and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 20:965-970.
- Burger J.A., Tsukada N., Burger M., Zvaifler N.J., Dell'Aquila M., Kipps T.J. (2000): Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96:2655-2663.
- Byrd J.C., Mrozek K., Dodge R.K., Carroll A.J., Edwards C.G., Arthur D.C., Pettenati M.J., Patel S.R., Rao K.W., Watson M.S., Koduru P.R.K., Moore J.O., Stone R.M., Mayer R.J.,

- Feldman E.J., Davey F.R., Schiffer C.A., Larson R.A., Bloomfield C.D. (2002): Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100:4325-43336.
- Cairolì R., Beghini A., Grillo G., Nadali G., Elice F., Ripamonti C.B., Colapietro P., Nichelatti M., Pezzetti L., Lunghi M., Cuneo A., Viola A., Ferrara F., Lazzarino M., Rodeghiero F., Pizzolo G., La rizza L., Morra E. (2006): Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias. An Italian retrospective study. *Blood* 107:1189-1198.
- Care R.S., Valk P.J.M., Goodeve A.C., Abu-Duhier F.M., Grooten-Kleinkoort W.M.C., Wilson G.A., Gari M.A., Peake I.R., Löwenberg B., Reilly J.T. (2003): Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br. J. Haematol.* 121:775-777.
- Chan J.Y., Watt S.M. (2001): Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 112:541-557.
- Cheson B.D., Bennett J.M., Kopecky K.J., Buchner T., Willman C.L., Esty E.H., Schiffer C.A., Döhner H., Tallman M.S., Lister T.A., Lo-Coco F., Willemze R., Biondi A., Hiddemann W., Larson R.A., Löwenberg B., Sanz M.A., Head D.R., Ohno R., Bloomfield C.D. (2003): Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 21:4642-4649.
- Chou W.C., Dang C.V. (2005): Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies. *Curr. Opin. Hematol.* 12:1-6.
- Denzlinger C. (1996): Biology and pathophysiology of leukotrienes. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 23:167-223.
- Dexter T.M., Spooncer E. (1987): Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:423-441.
- Döhner K., Schlenk R.F., Habdank M., Scholl C., Rucker F.G., Corbacioglu A., Bullinger L., Fröhling S., Döhner H. (2005): Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics – interaction with other gene mutations. *Blood* 106:3740-3746.
- Dührsen U., Villeval J.L., Boyd J., Kannourakis G., Morstyn G., Metcalf D. (1988): Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 72:2074-2081.
- Farag S.S., Archer A.J., Mrozek K., Ruppert A.S., Carroll A.J., Vardiman J.W., Pettenati M.J., Baer M.R., Qumsiyeh M.B., Koduru P.R., Yi Ning, Mayer R.J., Stone R.M., Larson R.A., Bloomfield C.D. (2006): Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8641. *Blood.* 108:63-73.

- Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E., Berger E.A. (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.
- Figueroa D.J., Breyer R.M., Defoe S.K., Kargman S., Daugherty B.L., Waldburger K., Liu Q., Clements M., Zeng Z., O'Neill G.P., Jones T.R., Lynch K.R., Austin C.P., Evans J.F. (2001): Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:226-233.
- Frenette P.S., Subbarao S., Mazo I.B., von Andrian U.H., Wagner D.D. (1998): Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14423-14428.
- Frenette P.S., Weiss L. (2000): Sulfated glycans induce rapid hematopoietic progenitor cell mobilization: evidence for selectin-dependent and independent mechanisms. *Blood* 1; 96 (7): 2460-2468.
- Gilliland D.G., Griffin J.D. (2002): The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 17:1738-1752.
- Godin I., Dieterlen-Lievre F., Cumano A. (1995): Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:773-777.
- Goodarzi K., Goodarzi M., Tager A.M., Luster A.D., von Andrian U.H. (2003): Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat. Immunol.* 4:965-973.
- Greiner D.L., Hesselton R.A., Shultz L.D. (1998): SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 16:166-177.
- Griffith J., Black J., Faerman C., Swenson L., Wynn M., Lu F., Lippke J., Saxena K. (2004): The structural basis for autoinhibition of FLT3 by juxtamembrane domain. *Mol. Cell.* 13:169-178.
- Heise C.E., O'Dowd B.F., Figueroa D.J., Sawyer N., Nguyen T., Im D.S., Stocco R., Bellefeuille J.N., Abramovitz M., Cheng R., Williams D.L. Jr., Zeng Z., Liu Q., Ma L., Clements M.K., Coulombe N., Liu Y., Austin C.P., George S.R., O'Neill G.P., Metters K.M., Lynch K.R., Evans J.F. (2000): Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.* 275:30531-30536.
- Herold G. (2004): Innere Medizin. Köln 2004, S.75.
- Holyoake T.L., Alcorn M.J. (1994): CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood* 8: 113-124.
- Honig S.M., Fu S., Mao X., Yopp A., Gunn M.D., Randolph G.J., Bromberg J.S. (2003): FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *J. Clin. Invest.* 111:627-637.

- Hoshino M., Izumi T., Shimizu T. (1998): Leukotriene D4 activates mitogen-activated protein kinase through a protein kinase C $\alpha$ -Raf-1-dependent pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* 273:4878-4882.
- Huang M.E., Ye Y.C., Chen S.R., Chai J.R., Lu J.X., Zhao L., Gu L.J., Wang Z.Y. (1988): Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72:567-572.
- Jacobsen K., Kravitz J., Kincade P.W., Osmond D.G. (1996): Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: In vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood* 87: 73-82.
- Jones T.R., Zamboni R., Belley M., Champion E., Charette L., Ford-Hutchinson A.W., Frenette R., Gauthier J.Y., Leger S., Masson P., et al. (1989): Pharmacology of L-660,711 (MK-571): a novel potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67:17-28.
- Juarez J., Bradstock K.F., Gottlieb D.J., Bendall L.J. (2003): Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Leukemia* 17:1294-1300.
- Jurcic J.G., DeBlasio T., Dumont L., Yao T.J., Scheinberg D.A. (2000): Molecular remission induction with retinoic acid and anti CD33 monoclonal antibody HuM195 in acute promyelocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 6:372-380.
- Kawabata K., Ufikawa M., Edawa T., Kawamoto H., Tahibana K., Iizasa H., Katsura Y., Kishimoto T., Nagasawa T. (1999): A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5663-5667.
- Kimura T., Boehmler A.M., Seitz G., Kuci S., Wiesner T., Brinkmann V., Kanz L., Möhle R. (2004): The sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *Blood* 103: 4478-4486.
- König W., Schonfeld W., Raulf M., Koller M., Knoller J., Scheffer J., Brom J. (1990): The neutrophil and leukotrienes-role in health and disease. *Eicosanoids* 3:1-22.
- Kolitz J.E., George S.L., Dodge R.K., Hurd D.D., Powell B.L., Allen S.L., Velez-Garcia E., Moore J.O., Shea T.C., Hohe E., Caligiuri M.A., Vardiman J.W., Bloomfield C.D., Larson R.A. (2004): Dose escalation studies of cytarabine, daunorubicin, and etoposide with and without multidrug resistance modulation with PSC-833 in untreated adults with acute myeloid leukemia younger than 60 years: final induction results of Cancer and Leukemia Group B study 9621. *J. Clin. Oncol.* 22:4290-4301.
- Kozubik A., Hofmanova J., Pospisil M., Netikova J., Hola J., Lojek A. (1994): Effects of drugs inhibiting prostaglandin or leukotriene biosynthesis on postirradiation haematopoiesis in mouse. *Int. J. Radiat. Biol.* 65:369-377.
- Lapidot T. (2001): Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 938:83-95.

- Lapidot T., Petit I. (2002): Current understanding of stem cell mobilization : The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.* 30:973-981.
- Lemischka I.R., Raulet D.H., Mulligan R.C. (1986): Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 45:917-927.
- Levis M., Pham R., Smith B.D., Small D. (2004): In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood* 104:1145-1150.
- Lindgren J.A., Stenke L., Mansour M., Edenius C., Lauren L., Nasman-Glaser B., Ericsson I., Reizenstein P. (1993): Formation and effects of leukotrienes and lipoxins in human bone marrow. *J. Lipid Mediat.* 6:313-320.
- Lou M., Lee S., Brock T.G. (2003): Leukotriene synthesis by epithelial cells. *Histol. Histopathol.* 18:587-595.
- Löffler, Petrides (2003): Biochemie & Pathobiochemie. Springer Verlag Berlin Heidelberg, S.453, S.977 und S.815f.
- Lüllmann-Rauch R. (2003): Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.240f.
- Lynch K.R., O'Neill G.P., Liu Q., Im D.S., Sawyer N., Metters K.M., Coulombe N., Abramovitz M., Figueroa D.J., Zeng Z., Connolly B.M., Bai C., Austin C.P., Chateaufneuf A., Stocco R., Greig G.M., Kargman S., Hooks S.B., Hosfield E., Williams D.L. Jr., Ford-Hutchinson A.W., Caskey C.T., Evans J.F. (1999): Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399(6738):789-93.
- Ma Q., Jones D., Borghesani P.R., Segal R.A., Nagasawa T., Kishimoto T., Bronson R.T., Springer T.A. (1998): Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9448-9453.
- Ma Q., Jones D., Springer T.A. (1999): The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 10:463-471.
- Matsunaga T., Takemoto N., Sato T., Takimoto R., Tanaka I., Fujimi A., Akiyama T., Kuroda H., Kawano Y., Kobune M., Kato J., Hirayama Y., Sakamaki S., Kohda K., Miyake K., Niitsu Y. (2003): Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat. Med.* 9:1158-1165.
- Mazo I.B., Gutierrez-Ramos J.C., Frenette P.S., Hynes R.O., Wagner D.D., von Andrian U.H. (1998): Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 188:465-474.
- McCredie K.B., Hersh E.M., Freireich E.J. (1971): Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 171:293-294.

- Miller A.M., Weiner R.S., Ziboh V.A. (1986): Evidence for the role of leukotrienes C4 and D4 as essential intermediates in CSF-stimulated human myeloid colony formation. *Exp. Hematol.* 14:760-765.
- Mistry A.R., Pedersen E.W., Solomon E., Grimwade D., (2003): The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev.* 17:71-97.
- Möhle R., Bautz F., Rafii S., Moore M.A.S., Brugger W., Kanz L. (1998a): The chemokine receptor CXCR4 is expressed on CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 91:4523-4530.
- Möhle R., Schittenhelm M., Failenschmid C., Bautz F., Kratz-Albers K., Brugger W., Kanz L. (1998): The chemokine receptor CXCR4 is preferentially expressed and functionally active in acute myeloid leukemia (AML) with myelomonocytic differentiation (FAB M4/5). Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH), *Blood*, No.10, Part 1, Nov. 15, 1998, Abstract 2485.
- Möhle R., Bautz F., Rafii S., Moore M.A.S., Brugger W., Kanz L. (1999a): Regulation of transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 872:176-186.
- Möhle R., Failenschmid C., Bautz F., Kanz L. (1999b): Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 13:1954-1959.
- Möhle R., Schittenhelm M., Failenschmid C., Bautz F., Kratz-Albers K., Serve H., Brugger W., Kanz L. (2000): Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 110:563-572.
- Möhle R., Bautz F., Denzlinger C., Kanz L. (2001): Transendothelial Migration of Hematopoietic Progenitor Cells, Role of Chemotactic Factors. *Ann N Y Acad Sci* 938:26-35.
- Mrozek K., Bloomfield C.D. (2006): Chromosome Aberrations, Gene Mutations, Expression Changes and Prognosis in Adult Acute Myeloid Leukemia. American Society of Hematology Education Book 2006, S.169-177.
- Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N., Nishikawa S., Kitamura Y., Yoshida N., Kikutani H., Kishimoto T. (1996): Defects of B-cell lymphopoiesis and bone marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382:635-638.
- Nielsen C.K., Campbell J.I., Ohd J.F., Morgelin M., Riesbeck K., Landberg G., Sjolander A.(2005): A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 65(3): 732-42.
- Nolan K.D., Keagy B.A., Ramadan F.M., Johnson G. Jr., Henke D.C. (1990): Endothelial cells can synthesize leukotriene B4. *J. Vasc. Surg.* 12:298-304.
- Paietta E. (2003): Expression of cell-surface antigens in acute promyelocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 16:369-385.

- Paietta E., Goloubeva O., Neuberg D., Bennett J.M., Gallagher R., Racevskis J., Dewald G., Wiernik P.H., Tallmann M.S. (2004): A surrogate marker profile for PML/RAR alpha expressing acute promyelocytic leukemia and the association of immunophenotypic markers with morphologic and molecular subtypes. *Cytometry B. Clin. Com.* 59:1-9.
- Paschka P., Marcucci G., Ruppert A.S., Mrozek K., Chen H., Kittles R.A., Vukosavljevic T., Perrotti D., Vardiman J.W., Carroll A.J., Kolitz J.E., Larson R.A., Bloomfield C.D. (2006): Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* 24:3904-3911.
- Passagué E., Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Weissman I.L. (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (Suppl. 1):11842-11849.
- Peled A., Kollet O., Ponomaryov T., Petit I., Franitza S., Grabovsky V., Slav M.M., Nagler A., Lider O., Alon R., Zipori D., Lapidot T. (2000): The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34<sup>+</sup> cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95:3289-3296.
- Peled A., Petit I., Kollet O., Magid M., Ponomaryov T., Byk T., Nagler A., Ben-Hur H., Many A., Shultz L., Lider O., Alon R., Zipori D., Lapidot T. (1999): Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR-4. *Science* 283:845-848.
- Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. (2004): Basislehrbuch Innere Medizin. 3.Auflage, München 2004, Urban & Fischer, S. 300.
- Rether C., Hengstebeck S., Xingkui X., Böhmler A., Kanz L., Seitz G., Möhle R. (2006): The G-protein-coupled receptor CysLT1 is expressed in acute myeloid leukemia mediating cell migration and survival. Abstract # 1933, 2006 annual Meeting Abstracts.
- Rosu-Myles M., Gallacher L., Murdoch B., Hess D.A., Keeney M., Kelvin D., Dale L., Ferguson S.S., Wu D., Fellows F., Bhatia M. (2000): The human hematopoietic stem cell compartment is heterogenous for CXCR4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:14626-14631.
- Samuelsson B. (1981): Leukotrienes: a novel group of compounds including SRS-A. *Prog. Lipid Res.* 20:23-30.
- Sanz M.A., Martin G., Lo-Coco F. (2003): Choice of chemotherapy in induction, consolidation, and maintenance in acute promyelocytic leukemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 16:433-451.
- Schiebler, Schmidt, Zilles (1999): Anatomie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S.168.
- Schnittger S., Kohl T.M., Haferlach T., Kern W., Hiddemann W., Spiekermann K., Schoch C. (2006): KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 107:1791-1799.
- Schweitzer K.M., Drager A.M., van der Valk P., Thijssen S.F., Zevenbergen A., Theijssmeijer A.P., van der Schoot C.E., Langenhuijzen M.M. (1996): Constitutive expression of E-

- selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am. J. Pathol.* 148:165-175.
- Senn, Dringes, Klaus (2001): Checkliste Onkologie. 5.Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S.385f.
- Shen W., Bendall L.J., Gottlieb D.J., Bradstock K.F. (2001): The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Exp. Hematol.* 29:1439-1447.
- Sitzmann (2002): Pädiatrie. 2.vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.491.
- Sjolinder M., Stenke L., Nasman-Glaser B., Widell S., Doucet J., Jakobsson P.J., Lindgren J.A. (2000): Aberrant expression of leukotriene C(4) synthase in CD16(+) neutrophils from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 95 (4): 1456-64.
- Small D. (2006): FLT3-Mutations: Biology and Treatment. American Society of Hematology Education Book 2006, S.178-184.
- Sohal J., Phan V.T., Chan P.V., Davis E.M., Patel B., Kelly L., Abrams T.J., O'Farrell A.M., Gilliland D.G., Le Beau M.M., Kogan S.C. (2003): A model of APL with FLT3 mutation is responsive to retinoic acid and a receptor tyrosine kinase inhibitor, SU11657. *Blood* 101:3188-3197.
- Spiegel A., Kollet O., Peled A., Abel L., Nagler A., Bielorai B., Rechavi G., Vormoor J., Lapidot T. (2004): Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood* 103:2900-2907.
- Springer T.A. (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.
- Stenke L., Lauren L., Reizenstein P., Lindgren J.A. (1987): Leukotriene production by fresh human bone marrow cells: evidence of altered lipoxygenase activity in chronic myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* 15:203-207.
- Stenke L., Mansour M., Edenius C., Reizenstein P., Lindgren J.A. (1991): Formation and proliferative effects of lipoxins in human bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:255-261.
- Stenke L., Mansour M., Reizenstein P., Lindgren J.A. (1993): Stimulation of human myelopoiesis by leukotrienes B4 and C4: interactions with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 81:352-356.
- Stirewalt D.L., Radich J.P (2003): The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 3:650-665.
- Tachibana K., Hirota S., Iizasa A., Yoshida H., Kawabata K., Kataoka Y., Kitamura Y., Matsushima K., Yoshida N., Nishikawa S., Kishimoto T., Nagasawa T. (1998): The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393: 591-594.



- Tashiro K., Tada H., Heilker R., Shirozu M., Nakano T., Honjo T. (1993): Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261:600-603.
- Tavor S., Petit I., Porozov S., Avigdor A., Dar A., Leider-Trejo L., Shemtov N., Deutsch V., Naparstek E., Nagler A., Lapidot T. (2004): CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res.* 64:2817-2824.
- Thiede C., Koch S., Creutzig E., Stendel C., Illner T., Schaich M., Ehninger G. (2006): Prevalence, clinical profile and prognosis of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107:4011-4020.
- To L.B., Haylock D.N., Simmons P.J., Juttner C.A. (1997): The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89: 2233-2258.
- Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M. (2002): Stem cells: hype and reality. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*:369-391.
- Watarai M., Miwa H., Shikami M., Sugamura K., Wakabayashi M., Satoh A., Tsuboi K., Imamura A., Mihara H., Katoh Y., Kita K., Nitta M. (2002): Expression of endothelial cell-associated molecules in AML cells. *Leukemia* 16:112-119.
- Watt S.M., Williamson J., Geneviev H., Fawcett J., Simmons D.L., Hatzfeld A., Nesbitt S.A., Coombe D.R. (1993): The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 82:2649-2663.
- Winter S.S., Sweatman J.J., Lawrence M.B., Rhoades T.H., Hart A.L., Larson R.S. (2001): Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. *Br. J. Haematol.* 115:862-871.
- Wright D.E., Wagers A.J., Gulati A.P., Johnson F.L., Weissman I.L. (2001): Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294:1933-1936.
- Yahata T., Ando K., Sato T., Miyatake H., Nakamura Y., Mугuruma Y., Kato S., Hotta T. (2003): A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 101:2905-2913.
- Yoder M.C., Palis J. (2001): Ventral (yolk sac) hematopoiesis in the mouse. *In: Hematopoiesis: a developmental approach* (L. I. Zon, Hrsg.). Oxford University Press, New York; S. 180-191.
- Zanjani E.D., Flake A.W., Almeida-Porada G., Tran N., Papayannopoulou T. (1999): Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. *Blood* 94: 2515-22.
- Zhang Y.Y., Walker J.L., Huang A., Keane J.f. Jr., Clish C.B., Serhan C.N., Loscalzo J. (2002): Expression of 5-lipoxygenase in pulmonary artery endothelial cells. *Biochem. J.* 361(Pt 2):267-276.

- Zhong S., Salomoni P., Pandolfi P.P. (2000): The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat. Cell. Biol.* 2:E85-90.
- Zou J.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.R. (1998): Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and cerebellar development. *Nature* 393(6685):595-599.

*Ich danke...*

*... Tina Wiesner und Dr. G. Seitz für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor,  
meinem Doktorvater, PD Dr. R. Möhle, der immer ein offenes Ohr hatte,  
Sandra Hengstebeck für die gute Zusammenarbeit,  
und ganz besonders Dr. A. Böhmler für seine Unterstützung, Erklärungen und  
Geduld.*

## Lebenslauf

**Name:** Christina Rether

**Geburtsdatum:**

27.09.1982 in Pforzheim

**Eltern:** Ingrid Rether (Oberstudienrätin)

Dr. Udo Rether (Arzt für Allgemeinmedizin)

**Geschwister:** Sabrina, studiert Rhetorik und Neuere/Neuste Geschichte

**Schulbildung:** 1988-1992 Schloßbergschule Neuenbürg

1992-2001 Gymnasium Neuenbürg

2001 Abitur (LK Kunst und Englisch)

**Fremdsprachenkenntnisse:**

Englisch: -Englisch-Leistungskurs

-APIEL-Test

-Medical English Kurs

Französisch: Francais médical Kurs

**Bisherige Auslandsaufenthalte:**

- 1999 für zwei Monate in Timaru ( Neuseeland ) als Austauschschülerin

- August 2005 Famulatur im Derriford Hospital in Plymouth (Chirurgie)

- Juni 2007 bis Januar 2008 PJ in der Schweiz

**Studienverlauf:**

- Krankenpflegepraktikum am Kreiskrankenhaus Neuenbürg (Chirurgie)

- Seit SS 02 Medizinstudium an der Eberhard Karls-Universität-Tübingen

- Tutorin für Anatomie-Seminar WS 03/04

- Physikum im März 04

- Praktisches Jahr: 19.02.-10.06.07 Chirurgie am Diakonie-Klinikum Stuttgart

18.06.-07.10.07 Innere am Kantonsspital Aarau

08.10.07- 10.01.08 Anästhesie am Inselspital Bern

- Staatsexamen 25.04.08

**Famulaturen:**- September 04 am Städtischen Klinikum Sankt Georg in Leipzig (vier Wochen Innere)

- März 05 am Universitätsklinikum Tübingen (zwei Wochen Hämatologie-Onkologie)

- August 05 am Derriford Hospital Plymouth (vier Wochen Chirurgie)

- September 05 Praxisfamulatur in Neuenbürg (sechs Wochen

Allgemeinmedizin)

- März 06 am Auguste Viktoria Klinikum in Berlin (drei Wochen Anästhesie)

- August 06 am SRH Klinikum Karlsbad-Langensteinbach (zwei Wochen

Neurologie)

- September 06 am Westküstenklinikum in Heide (drei Wochen Unfall- und

Wiederherstellungschirurgie)