

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
(Department) Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
(Schwerpunkte: Onkologie, Hämatologie, klinische  
Immunologie, Rheumatologie)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Effekt der Cysteinyl-Leukotriene auf die intrazelluläre  
Kalziumfreisetzung und Proliferation bei der akuten  
Leukämie**

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

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

**vorgelegt von**

**Sandra Hengstebeck**

**aus**

**Friedrichshafen**

**2009**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Möhle

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger



**Teile dieser Arbeit sind unter folgendem Titel veröffentlicht:**

Hengstebeck S, Rether C, Boehmler A, Kanz L, Seitz G, Möhle R. (2007):  
Cysteinyl-Leukotriene: chemotaktische und autokrine Wachstumsfaktoren bei  
der cysLT1-exprimierenden akuten myeloischen Leukämie. Abstract P699,  
Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und  
Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2007.  
Onkologie 30 (Suppl. 3):187, 2007.

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.  
Blood 108(11):547a, 2006.

## Inhaltsverzeichnis

---

Abkürzungen .....	- 2 -
1. Einleitung.....	1
1.1 Die normale Hämatopoese .....	1
1.1.1 Der Sitz der Hämatopoese .....	1
1.1.2 Die Blutbildung .....	2
1.2 Akute Leukämien .....	4
1.2.1 Akute myeloische Leukämie (AML) .....	5
1.2.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL).....	7
1.2.3 Myelodysplastisches Syndrom (MDS).....	10
1.3. Die Migration hämatopoetischer Stamm-, Progenitor- und leukämischer Zellen.....	10
1.3.1 Das Mikroenvironment und andere Faktoren .....	10
1.3.2 Mobilisierung und Homing von Stammzellen .....	11
1.3.3 Das Chemokin SDF-1 und der Rezeptor CXCR4 sowie seine Funktion in Bezug auf Migration und Proliferation.....	12
1.3.4 Migration und Homing von leukämischen Zellen.....	13
1.4 Der Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor (CysLT) .....	14
1.4.1 Struktur und Klassifikation des CysLT-Rezeptors .....	14
1.4.2 Die Eigenschaften des CysLT-Rezeptors.....	14
1.4.3 Inhibition des Rezeptors.....	15
1.5 Leukotriene .....	15
1.5.1 Die Biosynthese der Leukotriene .....	16
1.5.2 Funktion der Cysteinyl-Leukotriene .....	17
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Reagenzien.....	20
2.1.1 Lipidmediatoren, Rezeptoragonisten und –Antagonisten, Zytokine .	20
2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Seren .....	20
2.1.3 Kits .....	20
2.2 Gebrauchswaren.....	21
2.3 Lösungen .....	21
2.4 Geräte.....	23
2.5 Verwendete Zellen.....	23

## Inhaltsverzeichnis

---

2.5.1 Primäre AML- und ALL-Zellen.....	23
2.5.2 Zelllinien .....	24
2.6 Methoden.....	24
2.6.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	24
2.6.2 Isolierung von CD34 <sup>+</sup> Zellen .....	25
2.6.3 CD3-/CD19-Depletion .....	25
2.6.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	26
2.6.5 Durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Kalziumfreisetzung.....	26
2.6.5.1 Funktionsprinzip der Kalziumfreisetzung .....	26
2.6.5.2 Beladen der Zellen mit Fluo-3.....	27
2.6.5.3 Messung und Auswertung .....	27
2.6.5.4 Funktionsprinzip: FACS .....	30
2.6.6 Messung der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität nach Hemmung durch den Rezeptorantagonisten MK-571 und Anfärbung mit WST-1 .....	30
2.7 Datenerfassung, Auswertung und Einsatz statistischer Verfahren .....	31
3. Ergebnisse .....	33
3.1 Intrazelluläre Kalziumfreisetzung in akuten myeloischen und akuten lymphatischen Leukämiezellen .....	33
3.1.1 Kalziumfreisetzung nach Zugabe von LTD4 und SDF-1 .....	33
3.1.2 Subgruppenanalysen bei AML .....	38
3.1.2.1 Unterteilung nach FAB-Gruppen.....	38
3.1.2.2 Einteilung nach Oberflächenmarkern.....	39
3.1.2.3 Schlussfolgerung des Versuches der intrazellulären Kalziumfreisetzung .....	40
3.2 Der Einfluss des spezifischen CysLT1-Rezeptor Antagonisten MK-571 auf die Proliferation von AML-Zellen.....	41
3.2.1 Ergebnisse bei AML-Proben .....	42
3.2.2 Ergebnisse bei ALL-Proben .....	43
3.2.3 Schlussfolgerung des Versuches mit dem Rezeptorantagonisten MK- 571 .....	45

## Inhaltsverzeichnis

---

4. Diskussion .....	46
4.1 Diskussion der Methodik .....	46
4.1.1 Testung auf intrazelluläre Kalziumfreisetzung .....	46
4.1.2 Hemmung der Proliferation und des Metabolismus durch den CysLT1-Antagonisten MK-571 .....	46
4.2 Diskussion der Ergebnisse .....	47
4.2.1 Die Rolle des Chemokins SDF-1 und seines Rezeptors CXCR4 .....	47
4.2.2 Die Rolle der Cysteinyl-Leukotriene und ihres Rezeptors CysLT1 ...	48
4.2.3 Kalziummobilisierung .....	49
4.2.3.1 Die Wirkung von Cysteinyl-Leukotrienen und SDF-1 auf akute myeloische und akute lymphatische Leukämien.....	49
4.2.3.2 Betrachtung der Kalziumfreisetzung in Bezug auf die FAB- Gruppe.....	50
4.2.4 Bedeutung der intrazellulären Kalziummobilisation .....	51
4.2.5 Diskussion weiterer Ergebnisse zu diesem Thema .....	52
4.2.6 Hemmung der Proliferation und des Metabolismus durch den CysLT1-Antagonisten MK-571 .....	53
4.2.6.1 Diskussion über den Wirkungsmechanismus von Leukotrienen auf akute myeloische Leukämiezellen in vivo .....	53
4.3 Schlussfolgerung .....	56
5. Zusammenfassung .....	58
6. Verzeichnis: Abbildungen und Tabellen .....	60
7. Literaturliste .....	62
8. Danksagung .....	69
9. Lebenslauf .....	70

## Abkürzungen

---

### Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Bzw.	beziehungsweise
CAFC	Pluripotente Vorläuferzelle (cobblestone area forming cell)
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre (complementary) Desoxyribonukleinsäure
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
COX	Cyclooxygenase
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
CysLT-1, -2	Cysteinyl-Leukotrienrezeptor-1, -2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (enzyme linked immunosorbent assay)
FAB	French-American-British Cooperative Group
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter)
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (HEPES buffered saline)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]



## Abkürzungen

---

IL	Interleukin
I.U.	Internationale Einheiten (international units)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
LOX	Lipooxygenase
LT	Leukotrien
LTC-IC	Pluripotente Vorläuferzelle (long term culture-initiating cell)
LT-HSC	Long-term-hematopoetic stem-cells
m	Meter
M	molar (Mol/Liter)
MACS	Magnetic associated cell sorting
mAk	Monoklonaler Antikörper
MF	Mittlere Fluoreszenz
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	multipotenten Progenitorzellen
MW	Mittelwerte
n.s.	nicht signifikant
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHSC	Pluripotent hematopoietic stem cell

## Abkürzungen

---

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Sec./s	Sekunde
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SEM	Standard Error of the Mean
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
ST-HSC	Short-term-hematopoetic stem-cells
Tab.	Tabelle

# 1. Einleitung

Leukämie bedeutet weißes Blut und bezieht sich auf die verbreiterte Leukozytenmanschette (buffy coat) auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugieren des Blutes bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenzahlen. Der Begriff „Leukämie“ wurde 1845 von Rudolf Virchow geprägt, der damals das Krankheitsbild einer chronischen myeloischen Leukämie beschrieb. Die Entwicklung von Färbeverfahren für Blutausstriche im Jahre 1891 durch Paul Ehrlich führte zu neuen Erkenntnissen über die Morphologie der akuten Leukämien und ermöglichte in der Folge die Abgrenzung der myeloischen von der lymphatischen Leukämie (Naegeli, 1900). Um die verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen, die zu dem Bild einer „Leukämie“ führen, zu verstehen, muss man sich zuerst mit der normalen Hämatopoese sowie ihren verschiedenen Zellreihen und Reifungsstufen beschäftigen.

## **1.1 Die normale Hämatopoese**

Die frühe Entwicklung der Blutbildung wurde am besten am Mausmodell erforscht. Die ersten Blutzellen entstehen 7,5 Tage nach der Konzeption in mesodermalen Inseln des extraembryonalen Dottersacks. Wenn im Embryo die normale Blutzirkulation entstanden ist, wandern diese ersten Erythroblasten ein (Haar et Ackermann, 1971; Moore et Metcalf, 1970).

Am Tag 10,5 sind auch in der Aorto-Gonado-Mesonephros-Region, welche aus dem Mesoderm entsteht, hämatopoetisch aktive Zellen zu finden. Daher wird vermutet, dass mesodermale Zellen auch in der Lage sind, hämatopoetische Vorläuferzellen hervorzubringen (Godin et al, 1995).

### **1.1.1 Der Sitz der Hämatopoese**

Alle im peripheren Blut zirkulierenden Zellen gehen auf eine gemeinsame pluripotente Stammzelle zurück. Ihre Lebensdauer ist begrenzt, daher muss eine ständige Produktion von hämatopoetischen Zellen erfolgen. Die pränatale

Blutbildung wird in drei Perioden eingeteilt: 1. die megaloblastische oder vitelline, 2. die hepatolienale und 3. die medulläre. In der ersten der drei Phasen findet die Blutbildung in der mesenchymalen Hülle des Dottersacks statt. Ab dem dritten Monat beginnt die hepatolienale Phase, hier findet die Blutbildung vor allem in der Leber, aber auch in der Milz statt. Als letzte Phase schließt sich ab dem 6. Fetalmonat die medulläre Phase an, in der die Bildung von Erythrozyten und myeloischen Leukozyten mehr und mehr vom Knochenmark übernommen wird. Die lymphozytären Vorläuferzellen proliferieren ebenfalls im Knochenmark und produzieren Zellen verschiedener lymphatischer Stadien, die entweder im Knochenmark selbst ihre Funktionsreife erlangen (B-Lymphozyten) oder über die Blutbahn in den Thymus gelangen und dort zu T-Lymphozyten geprägt werden.

Die postnatale Hämatopoese sitzt hingegen im roten Knochenmark aller Knochen, welches sich im Laufe des Lebens allerdings immer mehr in gelbes, fettzellhaltiges Knochenmark umwandelt. Nach Abschluss des Körperwachstums findet sich das rote Knochenmark nur noch in den kurzen und platten Knochen sowie in den Epiphysen langer Knochen, also hauptsächlich in den Beckenknochen, Rippen und dem Sternum. Zu beachten ist außerdem, dass sich das gelbe Knochenmark, z.B. im Rahmen großer Blutverluste, wieder in hämatopoetisch potentes rotes Knochenmark umwandeln kann (Arnold et al, 2002).

### **1.1.2 Die Blutbildung**

Bei der Blutbildung geht man von einem hierarchischen System aus, das sich auf eine pluripotente hämatopoetische Stammzelle (PHSC-pluripotent hematopoietic stem cell) begründet. Diese Stammzellen besitzen zwei wesentliche Eigenschaften, so können sie zum einen identische Nachkommen generieren, zum anderen sich in sämtliche hämatopoetische Zelllinien differenzieren (Morrison et al, 1997).

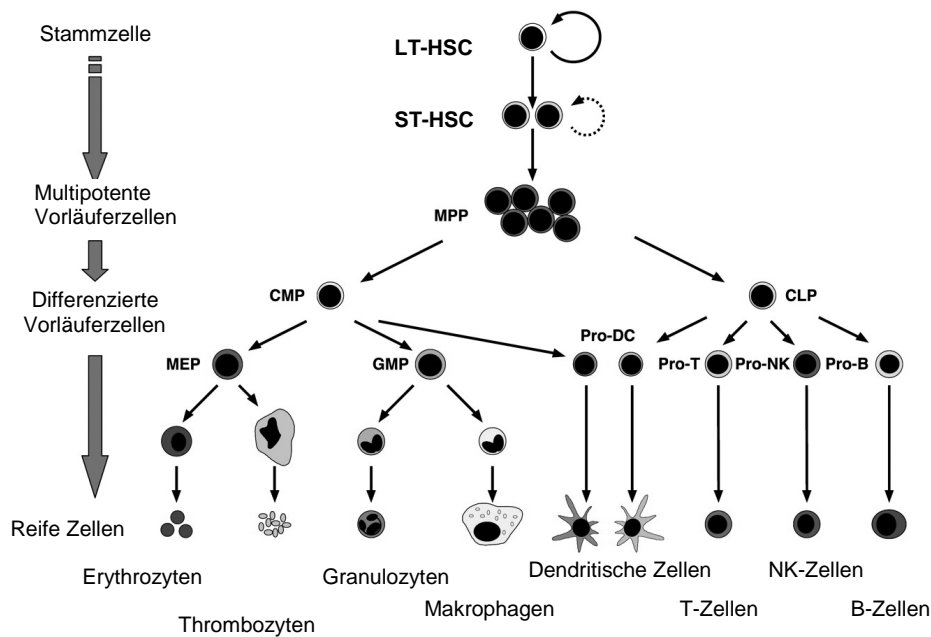
Bei der Differenzierung gibt es zwei verschiedene Theorien. Die eine Theorie beschreibt eine asymmetrische Teilung, bei der die eine der zwei Tochterzellen

sich weiter differenziert, die andere dagegen als Stammzelle erhalten bleibt (Morrison et al, 1997).

Die andere beschreibt eine symmetrische Teilung, wobei beide Tochterzellen sich entweder differenzieren oder als Stammzellen ihre Teilungsfähigkeit behalten.

Die Tochterzellen, die sich weiter differenzieren, zeigen eine sehr hohe Wachstumsrate, wohingegen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren geht. So besitzen die so genannten long-term-hematopoietic stem-cells (LT-HSC) eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit, während die short-term-hematopoietic stem-cells (ST-HSC) nur noch eine begrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung zeigen (Passegué et al, 2003); (siehe Abbildung 1).

Aus den ST-HSC wiederum entwickeln sich die multipotenten Progenitorzellen (MPP), die ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung nun vollständig verloren haben. Stattdessen bringen diese aber die ersten liniendifferenzierten Progenitoren hervor, die in eine myeloische und eine lymphatische Reihe eingeteilt werden. Hierbei entstehen am Ende der Linie aus den myeloischen Vorläuferzellen Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Makrophagen. Aus den lymphatischen Progenitoren entwickeln sich T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen, und aus beiden Reihen die Dendritischen Zellen (Passegué et al, 2003).



**Abbildung 1: Hierarchisches Modell der Hämatopoese**

Hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cells*; HSC) können unterteilt werden in Zellen, die unbegrenzt in der Lage sind, sich selbst zu erneuern können (*long-term* (LT)-HSC) und solche Stammzellen, die nur noch ein begrenztes Potenzial zur Selbsterneuerung aufweisen (*short-term* (ST)-HSC). Letztere differenzieren sich in multipotente Progenitoren (MPP); diese haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren und bringen die ersten liniendifferenzierten Vorläuferzellen hervor, die an der Basis der myeloiden (*common myeloid progenitor*; CMP) bzw. der lymphoiden (*common lymphoid progenitor*; CLP) Entwicklungsreihe stehen. Aus den CLP gehen T- und B-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) hervor. Die CMP bringen einerseits myelo-monozytäre Vorläuferzellen (GMP) hervor (diese differenzieren sich in Richtung Granulozyten und Makrophagen) sowie megakaryozytär-erythroide Progenitoren (MEP), aus denen Megakaryozyten, Thrombozyten und Erythrozyten hervorgehen. Sowohl CMP als auch CLP können über entsprechende Vorstufen Dendritische Zellen hervorbringen. Nach Passegué et al. 2003, verändert.

## 1.2 Akute Leukämien

In gewisser Weise stellen akute Leukämien das maligne Gegenstück zu den unterschiedlich reifen Stamm- und Progenitorzellen bzw. den Zwischenstufen der Hämatopoese dar.

Unter den akuten Leukämien unterscheidet man zwei große Gruppen: die myeloische und die lymphatische. Immunzytologisch verwendet man stadienspezifische Zellmarker, wie z.B. CD34 (Stamm- /Progenitorzellen), CD3,

CD7 (T-Zell-Reihe), CD19, CD22 (B-Zell-Reihe), CD117, CD33, CD13 (myeloische Progenitorzellen) (Foon et al, 1982; Vaughan et al, 1988).

Bei einer akuten Leukämie entartet eine der hämatopoetischen Zellen einer bestimmten Reifungsstufe maligne. Diese proliferiert und akkumuliert im Knochenmark und in den lymphatischen Geweben. Dadurch wird einerseits die physiologische Blutbildung verdrängt, andererseits verlieren die Zellen ihre Affinität zum Knochenmark. Sie werden vermehrt ausgeschwemmt und greifen auf extramedulläre Organe über. Ab einem Prozentsatz von mehr als 30% Blasten im peripheren Blut sprach man bisher nach der FAB-Cooperative Group (French-American–British Cooperative Group) von einer akuten Leukämie (Begemann et Begemann, 1989; Kumar et al, 1997).

Dagegen zählen nach den neuen WHO-Richtlinien schon Blastenzahlen ab 20% im peripheren Blut zu einer akuten Leukämie (NCCN-Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2006).

### **1.2.1 Akute myeloische Leukämie (AML)**

Die AML gehört zu der Gruppe klonaler Erkrankungen mit Transformation einer frühen myeloischen Vorläuferzelle. Je nach dem Differenzierungsgrad der myeloischen Progenitorzellen werden verschiedene Typen unterschieden. Diese werden traditionell gemäß ihrer Differenzierung nach der FAB-Klassifikation eingeteilt. Diese Einteilung wurde 1985 von der French-American-British Cooperative Group erarbeitet (verändert nach Bennett et al, 1985) (siehe Tabelle 1).

Allerdings beginnen seit wenigen Jahren molekularbiologische Kriterien zunehmend die Bedeutung von morphologischen Kriterien (FAB) zu verdrängen. So scheint eine Mutation von Nukleophosmin auf eine gute Prognose hinzuweisen, eine Mutation von FLT-3 dagegen auf eine schlechte Prognose.

Die Inzidenz dieser Erkrankung beträgt 3-4 Fälle/100 000/Jahr, wobei die Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt. Sie macht 3% aller malignen Erkrankungen aus und ist die häufigste tödlich verlaufende Neoplasie zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr.

Als Risikofaktoren gelten unter anderem die Knochenmarksschädigung durch bestimmte Noxen, wie zum Beispiel ionisierende Strahlen, alkylierende Substanzen, Benzol und Zigarettenrauch sowie prädisponierende hämatologische Erkrankungen (myelodysplastisches Syndrom (MDS), myeloproliferatives Syndrom (MPS), etc.). Das Risiko ist ebenfalls bei bestimmten genetischen Erkrankungen erhöht, dazu gehören Trisomie 21, Fanconi-Anämie, Bloom-Syndrom, Li-Fraumeni-Syndrom.

Im Knochenmark findet sich bei der AML – abhängig vom Subtyp – eine klonale Vermehrung maligner myeloischer Vorläuferzellen verschiedener Reifungsstadien. Diese anormale Blastenvermehrung führt zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese.

Infolge dessen lässt sich im peripheren Blut häufig eine Leukozytose nachweisen, wobei aber beachtet werden muss, dass bei 10% der Fälle eine Leukopenie auftritt. Ebenso zeigt sich aufgrund der verdrängten Hämatopoese häufig eine Anämie, die zu Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Tachykardie führt. Ebenfalls kommt es zu einer Thrombopenie mit gesteigerter Blutungsneigung sowie einer Granulozytopenie, welche ein gesteigertes Infektrisiko mit sich bringt.

Außerdem kann sich ein extramedulläres, tumoröses Wachstum („Chlorom“) zeigen sowie ein abdomineller, zerebraler oder ossärer Befall (Lübbert, 2002).

Die Prognose ist abhängig vom Alter und dem Leukämietyp, wobei sich FAB M2, M3, M4, günstig, FAB M1, M6, M7 dagegen ungünstig auswirken. Ebenfalls wichtig für eine gute Prognose ist eine niedrige Laktatdehydrogenase (LDH) sowie eine Leukozytenzahl unter 100 000/ $\mu\text{l}$ , wohingegen eine vorangegangene Myelodysplasie oder eine sekundäre AML nach Radio-/Chemotherapie eine schlechtere Prognose haben (Löwenberg et al, 1999).



## Einleitung

**Tabelle 1: FAB-Klassifikation und ergänzende Merkmale  
(verändert nach Bennett et al, 1995)**

KM: Knochenmark; PB: peripheres Blut; NEZ: nicht-erythro-poetische Zellen

FAB	Morphologie	Zytogenetik	Häufigkeit
<b>M0</b>	Blasten mit minimaler myeloischer Differenzierung (positive immunologische Marker)		2-3%
<b>M1</b>	wenig differenzierte Blasten NEZ im KM: >90% Typ-I/II-Blasten, <3% Promyelozyten, <10% ausreifende Granulopoese		15-20%
<b>M2</b>	Blasten mit Ausreifung, Auerstäbchen, Varianten mit Eosinophilie oder Basophilie NEZ im KM: 30-89% Typ-I/II-Blasten, >10% ausreifende Granulopoese, <20% (Pro)-monozyten	~50% mit t(8;21)	25-30%
<b>M3</b>	überwiegend hypergranulierte Promyelozyten, Auerstäbchen	t(15;17)	5-10%
<b>M3v</b>	überwiegend mikrogranulierte Promyelozyten, Auerstäbchen	t(15;17)	
<b>M4</b>	myelomonozytärer Mischtyp NEZ im KM: >30% Blasten, 30-80% Granulopoese inkl. Myeloblasten, 20-80% (Pro)-monozyten und im PB Monozyten $>5 \times 10^9/L$ (oder: >20% EST-positive Vorläuferzellen im KM, erhöhtes Lysozym)		20-30%
<b>M4eo</b>	zusätzlich zur M4 abnorme Eosinophile NEZ im KM: >5% Eosinophile, PAS + und Chloracetat-Esterase	inv(16)	
<b>M5a</b>	Monoblastärer Typ NEZ im KM: >80% monozytoide Zellen, 80% der monozytoiden Zellen sind Monoblasten		2-9%
<b>M5b</b>	monoblastärer Typ NEZ im KM: >80% monozytoide Zellen, <80% der monozytoiden Zellen sind Monoblasten		
<b>M6</b>	>50% Erythroblasten (aller kernhaltigen Zellen im KM) , Auerstäbchen NEZ im KM: >30% Typ-I/II-Blasten		3-5%
<b>M7</b>	undifferenzierte Blasten, atypische Megakaryozyten		3-12%

### 1.2.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Auch diese Leukämieform beruht auf einer malignen klonalen Neoplasie der hämatopoetischen Zellen. Ihre Inzidenzrate liegt bei 1,5/100 000/Jahr, wobei zu beachten ist, dass 80% der akuten Leukämien im Kindesalter auf eine ALL zurückzuführen sind. Sie ist damit die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter.

## Einleitung

---

Als Risikofaktoren wird neben den bekannten Noxen wie Benzol, Zytostatika und ionisierenden Strahlen, auch eine virale Genese beschrieben.

Die ALL wird entsprechend ihrer Herkunft aus der B- oder T-Zelllinie eingeteilt sowie in weitere Unterklassifikationen (siehe Tabelle 2, Bene et al, 1995).

Wie auch bei der AML zu beobachten ist, wird das Knochenmark durch Blasten überschwemmt und somit die normale Hämatopoese verdrängt. Die Symptome entsprechen daher denen der AML.

Prognostisch ungünstig wirken sich Leukozytenzahlen im peripheren Blut von über 30 000/ $\mu$ l aus, eine Remissionszeit von mehr als 4 Wochen sowie ein Erkrankungsalter ab dem 50. Lebensjahr. Weiterhin setzen der Subtyp pro-B-ALL sowie die zytogenetische Konstellation t(9;22), t(4;11) die Überlebenswahrscheinlichkeit herab.

## Einleitung

**Tabelle 2: Immuntypisierung und Molekulargenetik der ALL gemäß EGIL (Bene et al, 1995)**

Subtyp	Inzidenz bei Erwachsenen	Molekulargenetik	Oberflächenmarker
<b>B-Vorläufer-ALL</b>	72%		
• Pro-B-ALL	11%	ALL1-AF4	CD 19 CD79a CD22 (im Zytoplasma)
• Common ALL	49%	BCR-ABL	CD10 CD19 CD79a CD22 (im Zytoplasma)
• Prä-B-ALL	12%	BCR-ABL,E2A-PBX1	CD10 CD19 CD79a CD22 Schwere Kette des IgM-Moleküls c $\mu$ (in geringer Dichte)
<b>Reife B-ALL</b>	4%	MYC-IGH	CD10 CD19 CD22
<b>T-Linien-ALL</b>	24%	LMO-TCR;TAL1-TCR	
• Frühere T-ALL	6%		CD3 (membranständig oder intrazytoplasmatisch) CD7
• Thymische T-ALL	12%		CD3 (membranständig oder intrazytoplasmatisch) CD1a
• Reife T-ALL	6%		CD2 CD3 CD5 CD7 CD4/8

### **1.2.3 Myelodysplastisches Syndrom (MDS)**

Auch das MDS ist eine klonale Erkrankung mit Transformation einer frühen hämatopoetischen Progenitorzelle, was zu einer Störung der Proliferation, Differenzierung und Apoptose führt. Betroffen hierbei sind sowohl die Granulo-, als auch die Erythro-, und die Thrombopoese. Es kommt meist zu einer Knochenmarkshyperplasie mit variabler Blastenvermehrung und Zytopenie (v.a. Anämie) im peripheren Blut, seltener dagegen zu einer Knochenmarkshypoplasie.

Die Inzidenz liegt bei 3-5/100 000/Jahr und im Allgemeinen handelt es sich um eine Erkrankung des höheren Lebensalters.

Man unterscheidet zwischen einem primären und einem sekundärem myelodysplastischen Syndrom.

Symptome sind initial meist nicht vorhanden, so dass es sich oft um einen Zufallsbefund handelt. Später sind die typischen Zeichen einer Anämie wie Müdigkeit, Leistungsminderung, Tachykardie sowie eine Thrombopenie und Granulozytopenie zu finden. Manchmal sind auch Assoziationen mit Autoimmunerkrankungen möglich.

Als Komplikationen sind Blutungen und Infekte zu beachten sowie ein möglicher Übergang in eine AML (Lübbert et Lindemann, 2002).

### **1.3. Die Migration hämatopoetischer Stamm-, Progenitor- und leukämischer Zellen**

#### **1.3.1 Das Mikroenvironment und andere Faktoren**

Wie oben beschrieben findet die Hämatopoese im adulten Organismus im Knochenmark statt, welches ein komplexes Milieu darstellt. Hier spielen verschiedene Wachstumsfaktoren eine große Rolle für die Differenzierung und Teilung der Stammzellen.

In diesem Mikroenvironment sind vor allen Dingen die Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, Fibroblasten, Adipozyten und Makrophagen von Bedeutung (Mazo et von Andrian, 1999). Besonders die Osteoblasten spielen

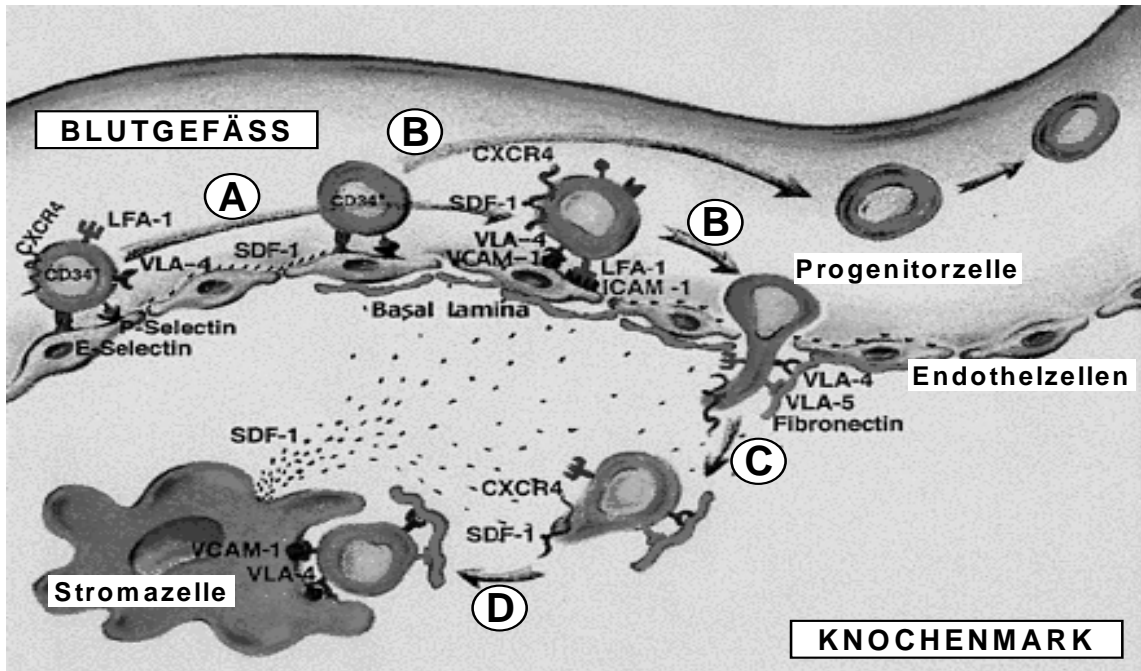
wohl eine wichtige Rolle, denn sie sind über N-Cadherin-vermittelte adhäsive Interaktion mit den LT-HSC verbunden. Diese Tatsache hat zur Folge, dass die Stammzellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus verharren und es so weder zur Proliferation noch Differenzierung kommt. Wenn diese Interaktion aufgrund z.B. äußerer Einflüsse abhanden kommt, so führt dies zur Proliferation der Zellen sowie zur Migration in die Blutbahn (Calvi et al, 2003; Yoshimoto et al, 2003; Zhang et al, 2003).

### **1.3.2 Mobilisierung und Homing von Stammzellen**

Auch physiologischerweise beobachtet man, dass sich geringe Mengen an Stammzellen im peripheren Blut befinden (McCredie et al, 1971; To et al, 1997).

Diese Zellen mobilisieren aus dem Knochenmark, gelangen ins Blut und wandern an anderer Stelle wieder in das Knochenmark ein. Dieser Vorgang wird als Mobilisierung und Homing bezeichnet. Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. Chemo- oder Radiotherapie können im peripheren Blut eine große Anzahl an Stammzellen gefunden werden, was auf ihre Eigenschaft, zerstörtes hämatopoetisches Gewebe wieder zu erneuern, zurückzuführen ist (Wright et al, 2001).

Das Homing von Stammzellen wird über bestimmte Faktoren vermittelt. Dabei spielen Adhäsionsmoleküle, chemotaktische und andere parakrine Faktoren eine wichtige Rolle. Eine Hemmung oder Ausschaltung dieser Einflüsse bedingt eine Mobilisierung der Stammzellen (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Modell der SDF-1-induzierten transendothelialen Migration hämatopoetischer Progenitorzellen.**

Progenitorzellen, die sich im Blutkreislauf befinden, nehmen über endothelexprimiertes E- und P-Selektin zunächst reversibel Kontakt mit dem Knochenmarkendothel auf („Rolling“; A). CXCR4-positive hämatopoetische Zellen werden durch SDF-1 stimuliert; dieses wird von Zellen der hämatopoetischen Mikroumgebung gebildet, auf den Endothelzellen präsentiert und führt zur Aktivierung von Adhäsionsrezeptoren der Integrin-Familie (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). Die adhären Zellen migrieren durch die Endothelschicht hindurch in das Knochenmark (C), wo sie mit Zellen des hämatopoetischen Mikromilieus in Kontakt treten (D). Nach Peled et al, 2000 verändert.

### 1.3.3 Das Chemokin SDF-1 und der Rezeptor CXCR4 sowie seine Funktion in Bezug auf Migration und Proliferation

Die Stammzellen müssen bei ihrer Wanderung aus dem Knochenmark und zurück physiologische Barrieren überwinden. Dabei spielt vor allem das Knochenmarkendothel eine wichtige Rolle. Seine Struktur entspricht derjenigen, die andere Endothelien bei Entzündungen aufweisen, und begünstigt so die Extravasation reifer Leukozyten (Carlos et Harlan, 1994). Diese Migration wird zum einen über Adhäsionsmoleküle der Selektin- und Immunglobulinsuperfamilie (Mazo et al, 1998; Schweitzer et al, 1996) reguliert,

zum anderen über Chemokine (Luster, 1998; Springer, 1994). So liegt die Vermutung nahe, dass auch bei der Mobilisation von Stammzellen diese Faktoren eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wurde bisher vor allen Dingen ein bestimmtes Chemokin: SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) untersucht. Dieser Faktor wird unter anderem von Knochenmark-Stromazellen produziert. Es konnte gezeigt werden, dass ihm bei der Migration von Stammzellen eine Bedeutung zukommt (Böhmler et al, 2005). Die Funktionen des Chemokins SDF-1 werden über den Rezeptor CXCR4 vermittelt, der zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit Sieben-Transmembranhelices gehört (siehe Kapitel 1.4.1). Es konnte gezeigt werden, dass das Homing der Progenitorzellen und die Expression dieses Rezeptors direkt miteinander zusammenhängen.

### **1.3.4 Migration und Homing von leukämischen Zellen**

Ebenso wie bei hämatopoetischen Progenitoren kann man auch bei leukämischen Zellen einen Tropismus zum Knochenmark feststellen, der über verschiedene Adhäsionsmoleküle der Integrin-Familie auf der Oberfläche der Blasten vermittelt wird. Diese Moleküle spielen eine Rolle bei der Adhäsion der Blasten an Gefäßendothelien (Watarai et al, 2002), bei der Organinfiltration (Bailey et al, 2004), wie auch bei Interaktionen mit dem Knochenmarkstroma (Matsunaga et al, 2003; Winter et al, 2001).

Blasten der akuten lymphatischen Leukämie der B-Zellreihe zeigen eine hohe CXCR4-Expression, ebenso wie die akute myeloische Leukämie. Dies lässt darauf schließen, dass ähnliche Mechanismen wie bei der Migration und dem Homing regulärer Stammzellen beteiligt sind. Somit scheint der Rezeptor CXCR4 ebenfalls an dem Knochenmarktropismus mitbeteiligt zu sein.

### **1.4 Der Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor (CysLT)**

#### **1.4.1 Struktur und Klassifikation des CysLT-Rezeptors**

Der CysLT1-Rezeptor wie auch der CXCR4-Rezeptor gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Typ-II-Rezeptoren mit Sieben-Transmembranhelices. Sie enthalten eine extrazelluläre Domäne, die der extrazellulären Ligandenbindungsstelle und somit dem N-terminalen Ende des Rezeptors entspricht. Die Signaltransduktion erfolgt über heterotrimere GTP-bindende Proteine, sogenannte G-Proteine. Typisch für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ist, dass sie die Zellbewegung beeinflussen, so z.B. die Chemotaxis, aber auch die Proliferation. Sie beeinflussen die Zellbewegung unter anderem durch die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium, was als unmittelbares Zeichen einer erfolgten Signaltransduktion gemessen werden kann (Bautz et al, 2001; Denzlinger, 1996). Dies kann durch durchflusszytometrische Messung bestimmt werden.

#### **1.4.2 Die Eigenschaften des CysLT-Rezeptors**

Bisher wurden zwei Rezeptoren kloniert: CysLT1 und CysLT2, wobei die Affinität des Leukotriens LTD4 zu CysLT1 am höchsten ist, während diese bei CysLT2 für die Leukotriene LTD4, LTC4 und LTE4 gleich ist (Heise et al, 2000; Lynch et al, 1999; Takasaki et al, 2000).

CysLT1 wurde beim Menschen auf glatten Muskelzellen der Lunge sowie auf Gewebsmakrophagen, Monozyten und Eosinophilen nachgewiesen, CysLT2 dagegen auf Endothelzellen der Pulmonalvenen (Heise et al, 2000; Lynch et al, 1999).

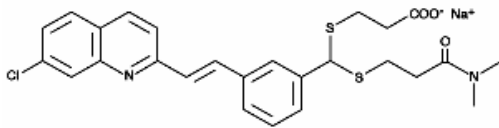
Neuere Untersuchungen von Bautz et al zeigen, dass der CysLT1-Rezeptor von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird und dort u. a. die Proliferation und Migration beeinflusst. Auch auf malignen leukämischen Zellen konnte er nachgewiesen werden. Zu beachten ist, dass auf AML-Zelllinien nur der CysLT1-Rezeptor exprimiert wird (Bautz et al, 2001). In ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von CysLT1 auf CLL-Zellen eine Reduktion der Proliferation sowie eine Apoptose bewirkt (Böhmler et al, 2005).



### 1.4.3 Inhibition des Rezeptors

Dieser Rezeptor kann durch mehrere Rezeptorantagonisten gehemmt werden, unter anderem durch MK-571, welcher experimentell in vitro und in vivo verwendet wird (Bautz et al, 2001; Jones et al, 1989).

Auch wird ein Derivat dieses Antagonisten unter dem Namen Montelukast schon in der Asthmatherapie eingesetzt. (Reiss et al, 1996; Young, 2001); (siehe Abbildung 3).



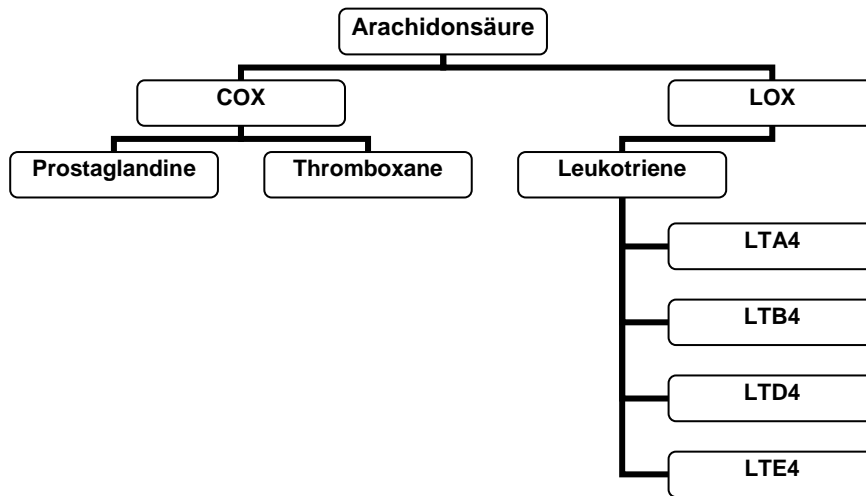
**Abbildung 3: Struktur des CysLT1-Rezeptorantagonisten MK-571.**

Ein Derivat der Substanz (Montelukast) wird auch bei der Therapie des allergischen Asthmas eingesetzt, nach Böhmler, 2005

### 1.5 Leukotriene

Leukotriene (LT) gehören zu der Gruppe der Lipidmediatoren und stoßen durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden an. Somit beeinflussen sie – ähnlich wie Zytokine und Chemokine – die Proliferation, Differenzierung und Funktion ihrer Zielzellen.

## 1.5.1 Die Biosynthese der Leukotriene



**Abbildung 4: Biosynthese der LT, verändert nach Böhmler, 2005**

COX: Cyclooxygenase, LOX: Lipoxygenase

Die Leukotriene wie auch die Prostaglandine und Thromboxane gehören zu der Gruppe der Eikosanoide, die sich von der vierfach ungesättigten Arachidonsäure ableiten. Die Arachidonsäure ist eine Fettsäure mit 20 C-Atomen und wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder mittels der essenziellen Fettsäure Linolsäure gebildet. Die Arachidonsäure nun kann entweder über die Cyclooxygenase (COX) zu Prostaglandinen und Thromboxanen verstoffwechselt werden oder über den Weg der Lipoxygenase (LOX) zu Leukotrienen (Horn et al, 2002).

Die LOX liegt im Zytoplasma vor und verstoffwechselt die Arachidonsäure zunächst zu LTA<sub>4</sub>, welches dann entweder über eine Hydrolase zu LTB<sub>4</sub> oder durch Anlagerung von Gluthation zu Peptidleukotrien reagiert. Werden nun die Peptidleukotriene weiter umgesetzt, so entsteht durch Entfernen von Glutamat LTD<sub>4</sub> und durch Abspalten von Glycin LTE<sub>4</sub> (Horn et al, 2002); (siehe Abbildung 4).

LTD<sub>4</sub> stellt das stoffwechselaktivste Cysteinyl-Leukotrien mit der höchsten Affinität zu dem Rezeptor CysLT1 dar.

### 1.5.2 Funktion der Cysteinyl-Leukotriene

Bei einer entzündlichen Reaktion werden die chemotaktischen Fähigkeiten von Leukozyten durch Lipidmediatoren wie z.B. Leukotriene veranlasst (König et al, 1990; Samuelsson, 1981). Auch als Entzündungsmediatoren bei Asthma sind die Leukotriene (LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub>) bekannt, die nach Allergenkontakt produziert werden und an den Rezeptor CysLT<sub>1</sub> binden. Die von ihnen herbeigeführte Reaktion besteht – neben der Auslösung einer Entzündung – in einer starken Bronchokonstriktion (Samuelsson, 1983). Ebenso führen sie zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität (Busse, 1998; Drazen, 2003). Ihr Einfluss auf normale oder maligne hämatopoetische Stammzellen, ebenso wie die zugrunde liegenden funktionellen Mechanismen sind hingegen noch wenig erforscht.

Bekannt ist, dass sie von reifen hämatopoetischen Zellen wie Leukozyten, Makrophagen und Mastzellen produziert werden können, aber auch Endothelzellen sind zu der Synthese befähigt. (Böhmler et al, 2005; Nolan et al, 1990; Stenke et al, 1987; Zhang et al, 2002).

Weiterhin können sie aufgrund ihrer Eigenschaft als Entzündungsmediatoren die Integrin-vermittelte Adhäsion auslösen, ebenso haben sie die Fähigkeit Neutrophile und Eosinophile anzulocken und zu aktivieren (Damtew et Spagnuolo, 1997; Fregonese et al, 2002; Nagata et al, 2002).

Bei der Extravasation von Leukozyten im Entzündungsgeschehen und bei dem Homing von hämatopoetischen Stammzellen scheint es Parallelen zu geben. So ist bekannt, dass Leukotriene im Entzündungsgeschehen beteiligt sind wie z.B. bei der Expression von Adhäsionsmolekülen (Busse, 1998). Da sie ebenfalls im hämatopoetischen Milieu zu finden sind, ebenso wie der entsprechende Rezeptor, ist die Frage, ob Leukotriene eventuell bei der Stammzellmigration beteiligt sind (Chan et Watt, 2001; Möhle et al, 1999a).

### **1.6 Zielsetzung dieser Arbeit**

Bekannt ist bisher, dass der Rezeptor CysLT1, der durch Cysteinyl-Leukotriene stimuliert wird, von hämatopoetischen Progenitorzelllinien exprimiert wird. So wird unter anderem die Proliferation und Migration dieser Zellen gesteuert. Auch auf malignen leukämischen Zelllinien konnte der Rezeptor nachgewiesen werden. Da die AML ein malignes Gegenstück zu den Progenitorzellen darstellt, könnten hier Cysteinyl-Leukotriene eventuell auch eine Rolle bei der Migration und Proliferation spielen.

In der Asthmatherapie werden seit längerer Zeit Rezeptorantagonisten eingesetzt, die mit hoher Selektivität an die Ligandenbindungsstellen des CysLT1-Rezeptors andocken, aber nicht die intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen. Die Nebenwirkungen sind sehr gering, so dass sie auch bei Kindern eingesetzt werden können. Das zeigte auch das Tierexperiment, in dem selbst extremste Dosierungen nicht letal wirkten. Dies könnte eine neue Behandlungsmethode für die Leukämieformen bedeuten, die den Rezeptor CysLT1 funktionell aktiv aufweisen.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit soll in einem ersten Teil gezeigt werden, ob die Bindung des Cysteinyl-Leukotriens LTD4 an den CysLT1-Rezeptor einen für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typischen Effekt bei der akuten myeloischen Leukämie hervorruft. Durch Messung der intrazellulären Kalziumfreisetzung nach Stimulation des Rezeptors durch LTD4, soll ein früher Schritt der intrazellulären Signalkaskade dargestellt werden.

Über weitere Signaltransduktionskaskaden erfolgt eine Aktinpolymerisierung von G-Aktin zu F-Aktin, welche wiederum zu einer Migration der Zellen führt.

Da Leukozyten die physiologische Hauptquelle für die Leukotrienproduktion sind und Leukämiezellen daher auch als Produzenten für die Liganden von CysLT1 in Frage kommen, soll in einem zweiten Teil der Arbeit überprüft werden, ob es bei der akuten Leukämie eine autokrine Wachstumsstimulation über CysLT1 gibt. Dabei soll gemessen werden, ob nach Zugabe des Rezeptorantagonisten MK-571 die Proliferation der Zellen gehemmt wird.

Im Vergleich dazu sollen diese Versuche auch bei ALL-Proben durchgeführt werden. Ebenfalls soll der Effekt von LTD4 mit dem von SDF-1 verglichen werden.

Durch die intrazelluläre Messung der Kalziumfreisetzung mit Durchflusszytometrie könnte weiterhin ein adäquates Verfahren zur Bestimmung der Rezeptoraktivität sowie deren Hemmbarkeit durch Antagonisten entwickelt werden, um so in Zukunft eventuell die Patienten herauszufiltern, die für eine derartige Behandlung geeignet wären, sofern sich in weiteren Untersuchungen herausstellt, dass CysLT1 für die Proliferation oder das Überleben der Leukämiezellen wichtig ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

#### 2.1.1 Lipidmediatoren, Rezeptoragonisten und –Antagonisten, Zytokine

MK-571	Biomol
LTD4	Biomol
Stromal Cell-Derived Factor-1 $\alpha$ (SDF-1)	R&D

#### 2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Seren

Anti-FITC Microbeads	Miltenyi Biotec
DEPC-Wasser	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol (96%)	Uni-Apotheke
FACS-Flow	Becton Dickinson
Ficoll (Biocoll Separating Solution, 1,077 g/ml)	Biochrom
Fluo-3 AM	Molecular Probes
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
HEPES (1 M Pufferlösung)	Invitrogen
Human-IgG (Flebogamma <sup>®</sup> 5%)	Grifols
Isopropanol	Merck
Methanol, HPLC-grade (LiChrosolv <sup>®</sup> )	Merck
Rinderserumalbumin (BSA; 100 mg/ml in IMDM)	Roche
Trypanblau	Invitrogen
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%/1 mM)	Invitrogen
WST-1	

#### 2.1.3 Kits

CD34 <sup>+</sup> Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec
---	-----------------

### 2.2 Gebrauchswaren

Einfrierröhrchen 1,0 ml, 1,8 ml	Greiner, Nunc
Gewebekulturplatten, 96-well, flacher Boden	Nunc, Greiner
Magnetseparationssäulen:- LS+, Large Cell	Miltenyi Biotec
Parafilm	Pechiney
Pipetten, steril, 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml	BD Falcon
Pipettenspitzen	Greiner
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner

### 2.3 Lösungen

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

## Material und Methoden

---

Serumfreie Kulturmedien	X-VIVO20 (Cambrex) X-VIVO15 ohne Phenolrot (Cambrex)
Ammoniumchlorid-Lysepuffer	1000 ml enthalten: 8,29 g Ammoniumchlorid 1,0 g Kaliumhydrogencarbonat 0,037 g Na <sub>2</sub> -EDTA-2 H <sub>2</sub> O
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 Aqua bidest. pH 7,4 mit NaOH/HCl (1 N)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (HBSS): 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



### 2.4 Geräte

Begasungsbrutschränke	Heraeus
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson
Einfrierbehälter (Cryo 1°C Freezing Container)	Nunc
ELISA-Reader (MR7000)	Dynatech
Magnet-Separationssysteme:	
- Midi-MACS	Miltenyi Biotech
Mikroskope:	
- Umkehrmikroskop (IX-51)	Olympus
Pipettierhilfen (pipetboy acu)	Integra Biosciences
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Sterilbänke	
Megafuge 1,0R	Heraeus Instruments, Stuttgart
Vortex (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries
Wasserbad	B. Braun

### 2.5 Verwendete Zellen

#### **2.5.1 Primäre AML- und ALL-Zellen**

Die hierbei untersuchten maligne entarteten Zellen wurden aus dem peripheren Blut von 20 erkrankten Patienten isoliert. Davon waren 11 Patienten weiblich und 9 männlich und im Alter von 39 bis 85 Jahren. Der Median lag bei 65,5 Jahren.

Von den getesteten Patienten waren 17 an AML erkrankt. Weitere 3 Patienten waren an ALL erkrankt.

Bei Blutentnahme waren die Patienten noch unbehandelt. In allen Fällen wurde das Blut in Heparinröhrchen entnommen.

Die Patienten wurden über die Zellentnahme aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung, bevor das Blut entnommen wurde.

Der Antrag zur „Gewinnung von Blutproben von Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen für Forschungszwecke“, der auch das hier untersuchte Patientenkollektiv umfasst, einschließlich der dafür vorgesehenen Aufklärung wurde von der Ethik-Kommission Tübingen begutachtet und genehmigt (Projekt-Nummer 104-2004V).

### **2.5.2 Zelllinien**

Die hier verwendete humane Zelllinie KG1a weist einen myeloblastären CD34+ Phänotyp (AML) auf und wurde in RPMI Medium mit 10% FCS aufbewahrt. Sie stammt aus der DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

## **2.6 Methoden**

### **2.6.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut**

Als Grundlage für die weitere immunmagnetische Anreicherung von hämatopoetischen Progenitoren, bzw. von AML-Zellen wurden zuerst mononukleäre Zellen durch Zentrifugation über den Dichtegradienten isoliert. Dazu wurde heparinisiertes Vollblut 1:5 mit PBS verdünnt und in Aliquots à 25 ml über jeweils 15 ml Ficoll (1,077 g/ml) geschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 755 g ohne Bremse resultierte eine Interphase aus mononukleären Zellen, die anschließend abpipettiert und zweimal in je 50 ml PBS gewaschen wurde. Das entstandene Pellet wurde in 8 ml PBS resuspendiert, auf 4 ml blasig aufgeschütteltem BSA geschichtet sowie 8 Minuten bei 320 g ohne Bremse abzentrifugiert, um die Thrombozyten zu eliminieren.

Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das resultierende Pellet in eiskaltem, entgasten (30 Minuten Ultraschallbad) MACS-Puffer aufgenommen. Nun mussten Zellzahl und Vitalität bestimmt werden. Hierzu nahm man 10 µl der Zellsuspension in Trypanblau (1:100) auf und zählte die Zellen in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop aus.

Ziel der Isolierung war, mehr als 95% Blasten zu erhalten. Bei sehr hoher Zellzahl mussten keine weiteren Schritte durchgeführt werden. Ansonsten wurden CD34<sup>+</sup> Zellen nach 2.6.2 isoliert, da dieses Progenitorzellantigen häufig bei einer akuten Leukämie exprimiert wird. Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung der Blasten bei einer AML besteht in der Depletion von B- und T-Zellen (nach 2.6.3).

### 2.6.2 Isolierung von CD34<sup>+</sup> Zellen

Sofern die Blasten CD34<sup>+</sup> waren, wurde nun aus den mononukleären Zellen der Anteil der CD34<sup>+</sup> Zellen mittels immunmagnetischer Separation isoliert. Dafür wurde das MACS-System (*Magnetic Activated Cell Sorting*) benutzt sowie das „CD34 Progenitor Cell Isolation Kit“ der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) nach den Angaben des Herstellers.

Bei dieser Methode versah man die Zellen mit Hapten-konjugierten, monoklonalen Antikörpern, die an das CD34-Oberflächenantigen banden, an die wiederum ein magnetisch markierter anti-Hapten Antikörper band. Diese so markierten Zellen ließ man über Separationssäulen (LS+) laufen, die in ein Magnetfeld (Midi-MACS) eingebracht wurden.

Es erfolgte in den Säulen eine Positivselektion und, nachdem das Magnetfeld entfernt wurde, wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen mit 6 ml MACS-Puffer eluiert sowie ein zweites Mal über die Säulen gegeben.

### 2.6.3 CD3-/CD19-Depletion

Wenn CD34 nicht exprimiert wurde, kam ein anderes Verfahren zum Einsatz. In diesen Fällen wurde ein immunmagnetisches Depletionsverfahren angewandt, in dem die nicht-gewünschten Zellen - zumindest ein Teil von diesen - in der Separationssäule zurückgehalten wurden und nur die gewünschten Zellen im Durchlauf angereichert wurden. Für diesen Aufreinigungsprozess wurden die in der Suspension vorhandenen Zellen durch bispezifische Tetramer-Antikörperkomplexe gekennzeichnet, die sowohl die Oberflächenantigene der jeweiligen Zielzelle, als auch die dextranummantelten Eisenpartikel erkannten.

Die Depletion erfolgte laut den Angaben der Hersteller StemCell Technologies. Zuerst wurde wie bei der CD34<sup>+</sup>-Isolierung mittels Ficoll eine Isolierung der mononukleären Zellen durchgeführt sowie eine Lyse der Erythrozyten. Dann wurden die Zellen mittels BSA-Kissen gewaschen, in MACS-Puffer aufgenommen, und eine Menge von  $3 \times 10^8$  Zellen in 1,5 ml MACS-Puffer überführt. Nun wurden die Zellen erst mit 1000 µl humanem IgG bei 4°C 10 Minuten inkubiert, anschließend mit 150 µl anti-CD3-FITC sowie 150 µl anti-CD19-FITC ein zweites Mal bei 4°C 10 Minuten inkubiert. Nach einer Waschung in MACS-Puffer wurde das Pellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Daraufhin wurden 300 µl FITC-Beads zugegeben und erneut bei 4°C 15 Minuten inkubiert. Nach erneuter Waschung wurde das Pellet in 1,5 µl MACS-Puffer aufgenommen und es folgte die Isolierung über die zwei LS-Säulen. Wichtig zu beachten war, dass sich hierbei die Blasten im Durchlauf befanden und die Säulen verworfen wurden.

### **2.6.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden in Aliquots à  $2 \times 10^7$  eingefroren, indem man die Pellets mit 900 µl PBS resuspendierte und in Kryoröhrchen überführte sowie mit ebenfalls 900 µl Einfriermedium versah. Daraufhin wurden die Kryoröhrchen in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox bei -80°C eingefroren. Diese Einfrierboxen bewirkten eine konstante Abkühlrate der Zellen von 1°C pro Minute.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad solange erwärmt, bis sie fast vollständig aufgetaut waren, daraufhin wurden sie unverzüglich zweimal in kaltem Medium (PBS/X-Vivo) gewaschen, um das in der Einfrierlösung vorhandene DMSO zu entfernen.

### **2.6.5 Durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Kalziumfreisetzung**

#### **2.6.5.1 Funktionsprinzip der Kalziumfreisetzung**

An eine Methode von Vandenberghe et Ceuppens angelehnt wurde die intrazelluläre Kalziumionenfreisetzung fluoreszenzzytometrisch quantitativ

gemessen (Vandenberghe et Ceuppens, 1990). Die Kalziumionen wurden nach Stimulation des CysLT1-Rezeptors mit LTD4 mobilisiert. Hierzu versetzte man die Zellen mit dem fluoreszierenden Kalzium-Indikator Fluo-3, der als membrangängiger Ecetomethylester in das Zytoplasma diffundiert und dort durch unspezifische Esterasen hydrolysiert wurde, so dass er seine Membranpermeabilität verlor (Tsien et al, 1982).

Nun konnte das Fluo-3 reversibel an aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzte Kalziumionen binden, wodurch sich seine Fluoreszenzeigenschaften derart veränderten, dass sie mit dem FACS (*Fluoreszenz-Activated-Cell-Sorting*) gemessen werden konnten. Dabei konnte in Relation zu den freigesetzten Kalziumionen das Fluoreszenzsignal von Fluo-3 um mehr als das 100-fache ansteigen. Das resultierende Emissionsmaximum von 526 nm entsprach dabei dem von Fluorescein, so dass eine durchflusszytometrische Analyse auf dem FITC-Kanal bei einer Anregung von 488 nm möglich war.

Da das Fluo-3 mit sehr großer Reversibilität an das Kalzium band, war eine exakte Aussage über den zeitlichen Verlauf der Freisetzung gegeben.

### **2.6.5.2 Beladen der Zellen mit Fluo-3**

5 Mio. Zellen wurden in 400 µl Fluo-3- Arbeitslösung aufgenommen (HBSS & 1mM Fluo-3) und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin versetzte man sie mit HBSS/1% FCS in einer Verdünnung von 1:5 und nach einer weiteren 40 minütigen Inkubation wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml Hapes-buffered-saline-solution aufgenommen, diese Zellsuspension wiederum wurde nun in Aliquots à 200 µl in FACS-Röhrchen überführt und nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei 37°C begann die Messung am FACS.

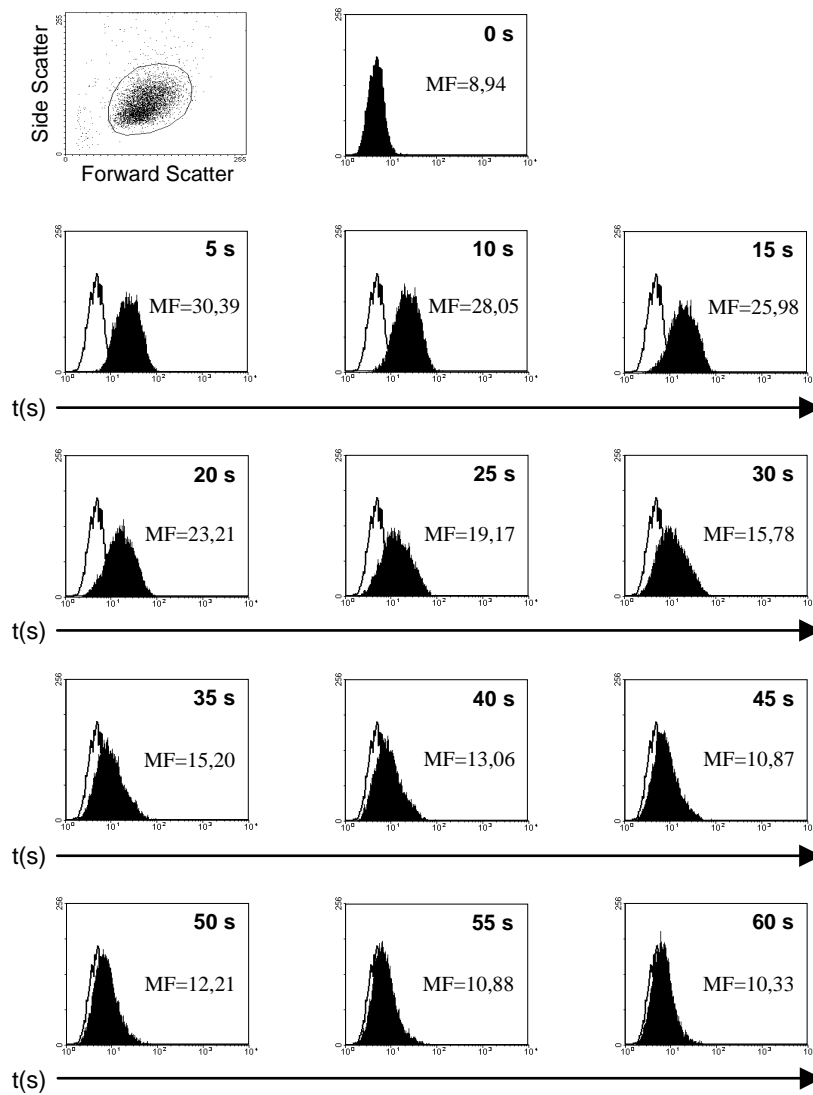
### **2.6.5.3 Messung und Auswertung**

Sofort nach dem Beladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff begann die Messung am FACSCalibur Durchflusszytometer auf dem FITC-Kanal. Zunächst wurde hierzu in einem *histogram plot* die mittlere Fluoreszenz (MF) der

unbehandelten Probe gemessen. Daraufhin wurden die Zellen mit potentiell rezeptorstimulierenden Substanzen wie LTD4 und SDF-1 versehen und unverzüglich die MF in 5 Sekunden Intervallen gemessen über einen Zeitraum von 90 Sekunden. Die im Gerät eingestellte Messdauer pro Intervall betrug 3 Sekunden. In Kontrollreihen wurden lediglich Lösungsmittel der potentiell stimulierenden Substanzen zugesetzt (siehe Abbildung 5).

Um die Ergebnisse der einzelnen Messreihen vergleichen zu können, wurden die Einzelwerte jeder Messreihe in Relation zum jeweiligen Ausgangswert (ohne stimulierendes Agens) gesetzt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels CellquestPro.



**Abbildung 5: Messung der intrazellulären Kalziumfreisetzung.**

Beispielhafte Darstellung der Änderung der Fluo-3-Fluoreszenz über 60 Sekunden als Maß für die intrazelluläre Kalziumfreisetzung nach Stimulation von KG1-Zellen mit 100 nM LTD4 (0 s = unmittelbar vor Zugabe des Leukotriens). Nach Böhmler et al, 2005.

### **2.6.5.4 Funktionsprinzip: FACS**

Im Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter; FACS) wurden die physikalischen Eigenschaften von Zellen oder Partikeln gemessen, indem diese in einem physiologischen Fließmedium einzeln an Laserstrahlen mit definierter Wellenlänge vorbeigeführt wurden. Nachdem die Zellen mittels spezifischer fluoreszierender Farbstoffe wie Fluo-3 gefärbt wurden, konnten sie anhand von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sowie ihren Fluoreszenzeigenschaften individuell und qualitativ analysiert werden (Shapiro, 1988). Die Streurichtung des emittierten Lichts ermöglichte eine Aussage über die Größe und Granularität der Zelle.

Das hier verwendete Gerät ist ein FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson, das mit einem Argon-Ionen-Laser ausgestattet ist, dessen Wellenlänge überwiegend im blauen Bereich liegt (488 nm). Zur Erfassung der Zellgröße dient das Vorwärtsstreulicht (Forward light scatter: FSC), zur Messung der Fluoreszenz hingegen das Seitwärtsstreulicht (Side scatter: SSC). Die Stärke des SSC-Signals ist dabei ein Maß für die Zelldichte und deren Granularität.

### **2.6.6 Messung der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität nach Hemmung durch den Rezeptorantagonisten MK-571 und Anfärbung mit WST-1**

Die Stoffwechselrate und somit auch die Zellvitalität kann mithilfe kolorimetrischer Verfahren gemessen werden. In diesem Versuch soll die Hemmung des CysLT1-Rezeptors durch MK-571 quantifiziert werden. So wurde die Stoffwechselrate gemessen, um dadurch Rückschlüsse auf die Proliferation und Zellvitalität ziehen zu können. Dazu wurden Tetrazoliumsalze zugegeben, die durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan umgesetzt wurden. Formazan ist ein dunkelroter Farbstoff, der spektrophotometrisch quantitativ bestimmt werden kann. Die gemessene Formazankonzentration korrelierte mit den stoffwechselaktiven Zellen. Das in diesem Versuch verwendete WST-1 hatte den Vorteil, dass der gebildete Farbstoff wasserlöslich war und somit keine Kristalle gebildet wurden. Daher mussten keine zytotoxischen



Lösungsmittel hinzugefügt werden und der Ansatz konnte mehrere Male gemessen werden.

Dieses Verfahren wurde verwendet, um den Effekt von MK-571 auf die Vitalität und Proliferation von primären AML- und ALL-Zellen zu quantifizieren. MK-571 ist ein Rezeptorantagonist des CysLT1-Rezeptors.

Hierzu wurden 90 000 primäre Zellen pro Well in je 100 µl RPMI ohne FCS ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen an MK-571 versehen, die folgendermaßen zubereitet wurden.

Die verschiedenen MK-571-Konzentrationen in hochkonzentrierten Ethanol-lösungen wurden erst in 1:10 PBS vorverdünnt und dann im Verhältnis 1:20 durch Zugabe von Zellkulturen weiterverdünnt. Ebenso wurde mit den Kontrollen verfahren, bei denen statt MK-571 nur das Lösungsmittel Ethanol zugegeben wurde. Durch diese Verdünnungsreihen wurde eine identische Ethanolkonzentration in allen Ansätzen erreicht.

Nach einer Inkubation von entweder 24h oder 48h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> mit MK-571 wurde in alle Wells je 10 µl WST-1-Farbstoff hinzugegeben und erneut bei 36°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach je 1, 3 und 6 Stunden wurden die Ansätze dann im ELISA-Reader gemessen. Die spektrophotometrische Auswertung erfolgte bei 450 nm mit 630 nm als Referenzwellenlänge, wobei jeder Ansatz aus 8 Replika bestand.

Als Positivkontrolle wurde KG1a mitgeführt.

### **2.7 Datenerfassung, Auswertung und Einsatz statistischer Verfahren**

Die durchflußzytometrischen Messungen wurden mithilfe des Programms CellquestPro (Becton-Dickinson) ausgewertet und dargestellt. Die Daten der Messung der Stoffwechselaktivität wurden mittels des Elisa-Readers MR7000 ausgerechnet.

Die statistische Auswertung wie Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichung, bzw. des Standard Error of the Mean (SEM) erfolgte in Excel (Microsoft XP-Professional), ebenso die Darstellung der Daten in

Diagrammen. Die Berechnung zur Signifikanzermittlung wurde anhand des t-Tests vorgenommen.

### 3. Ergebnisse

#### **3.1 Intrazelluläre Kalziumfreisetzung in akuten myeloischen und akuten lymphatischen Leukämiezellen**

Durch die Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, wie den CysLT1-Rezeptor, mittels entsprechender Liganden werden über eine Signalkaskade aus intrazellulären Kalziumspeichern Kalziumionen in das Zytoplasma freigesetzt. Diese Kalziummobilisierung ist transient und kann durchflusszytometrisch erfasst werden.

Dabei wurde in dieser Arbeit das Leukotrien D4 (LTD4) verwendet, welches die höchste Affinität zu dem CysLT1-Rezeptor aufweist. Es sollte getestet werden, ob auch bei akuten Leukämien die Zugabe von Leukotrien zu einer Kalziumfreisetzung führt.

Um die Kalziumfreisetzung messen zu können, wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden Kalzium-Indikator Fluo-3 90 Minuten beladen. So konnte im Durchflusszytometer semiquantitativ die Kalziumfreisetzung mittels relativer Fluo-3-Fluoreszenz gemessen werden.

Die Messungen wurden in Abständen von 5 Sekunden durchgeführt, um die Veränderung der intrazellulär freigesetzten Kalziumkonzentrationen im zeitlichen Verlauf zu erfassen.

Die Diagramme zeigen die Mittelwerte (MW), den Standard Error of the Mean (SEM) sowie eine Signifikanzbetrachtung durchgeführt anhand des t-Testes.

##### **3.1.1 Kalziumfreisetzung nach Zugabe von LTD4 und SDF-1**

Die erste Messung jeder Probe (bei 0 Sekunden) wurde ohne Zugabe von LTD4 vorgenommen, um so den Ausgangswert zu bestimmen. Danach wurde den einzelnen Ansätzen in logarithmisch ansteigenden Konzentrationen LTD4 zugegeben. Die Quantifizierung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen nach Zugabe von LTD4 erfolgte in 5 Sekunden Messintervallen, die über einen Zeitraum von 90 Sekunden gemessen wurden. Die stärkste Kalziumfreisetzung

## Ergebnisse

zeigte sich bei der Messung nach 5 Sekunden. Danach fiel die freigesetzte Konzentration wieder ab, da das Kalzium von intrazellulären Speichern aufgenommen wurde. Nach ca. 60 Sekunden war die Kalziumkonzentration bei allen Proben wieder stark abgesunken (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).

Des Weiteren wurden bei den Proben Messungen nach Gabe von SDF-1 (stromal cell derived factor) vorgenommen, diese wurden ebenfalls in 5 Sekunden Messintervallen durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurde der Versuch zudem mit der Zelllinie KG1a durchgeführt. Hier zeigte sich abhängig von der LTD4-Konzentration eine dosisabhängige Kalziumfreisetzung (siehe Abbildung 6).

Als Negativkontrolle galt jeweils die erste Messung jedes Ansatzes. Hier wurde der intrazelluläre Kalziumfluss nur nach Zugabe des Carriers ohne stimulierende LTD4-, bzw. SDF-1-Zugabe dargestellt.

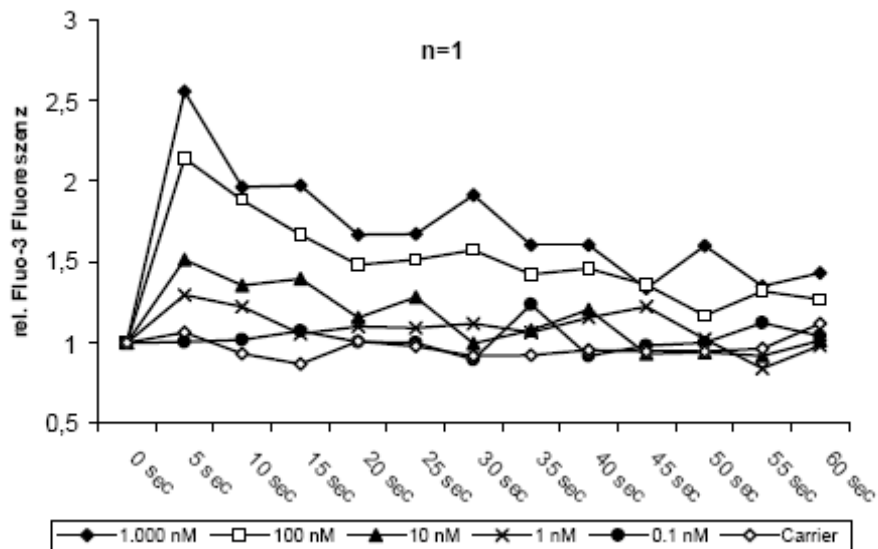


Abbildung 6: Kalziumfreisetzung nach Zugabe der verschiedenen LTD4-Konzentrationen (nM) bei KG1a (n=1).

## Ergebnisse

---

Grundsätzlich induzierte der Ligand LTD4 bei jedem Ansatz zeit- und dosisabhängige intrazelluläre Kalziummobilisationen.

Hierbei lagen die Fluoreszenzintensitäten der mit LTD4 versehenen Ansätze sowohl bei den AML- als auch bei den ALL-Proben deutlich über denen der Negativkontrollen (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).

Außerdem korrelierte die Fluoreszenzintensität sowohl bei der AML als auch bei der ALL mit der Höhe der zugegebenen Konzentration des Leukotriens D4. Bei den AML-Proben zeigten sich ähnlich hohe Fluoreszenzintensitäten bei LTD4-Konzentrationen von 1000 nM und 100 nM. Dahingegen wurde bei den ALL-Proben die höchste Fluoreszenzintensität bei einer Konzentration von 1000 nM LTD4 induziert (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).

Weiterhin konnte bei der AML in den Messungen 5 Sekunden nach Zugabe des Leukotriens ab einer Leukotrienkonzentration von 1 nM bis 1000 nM mit jeder Konzentrationserhöhung ein signifikanter Anstieg der Kalziumfreisetzung im Vergleich zu der Negativkontrolle nach alleiniger Zugabe des Carriers erreicht werden ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 7).

Dahingegen zeigte sich bei Zugabe der geringsten Konzentration von 0,1 nM LTD4 keine signifikante Wirkungssteigerung im Vergleich zu der alleinigen Zugabe des Carriers (siehe Abbildung 7).

Bei den ALL-Proben hingegen konnte in den Konzentrationsschritten von 0,1 nM bis 100 nM LTD4 keine signifikante Wirkungssteigerung im Vergleich zu dem Carrier dargestellt werden. In der Konzentration von 1000 nM LTD4 zeigte sich aber auch hier eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 8).

## Ergebnisse

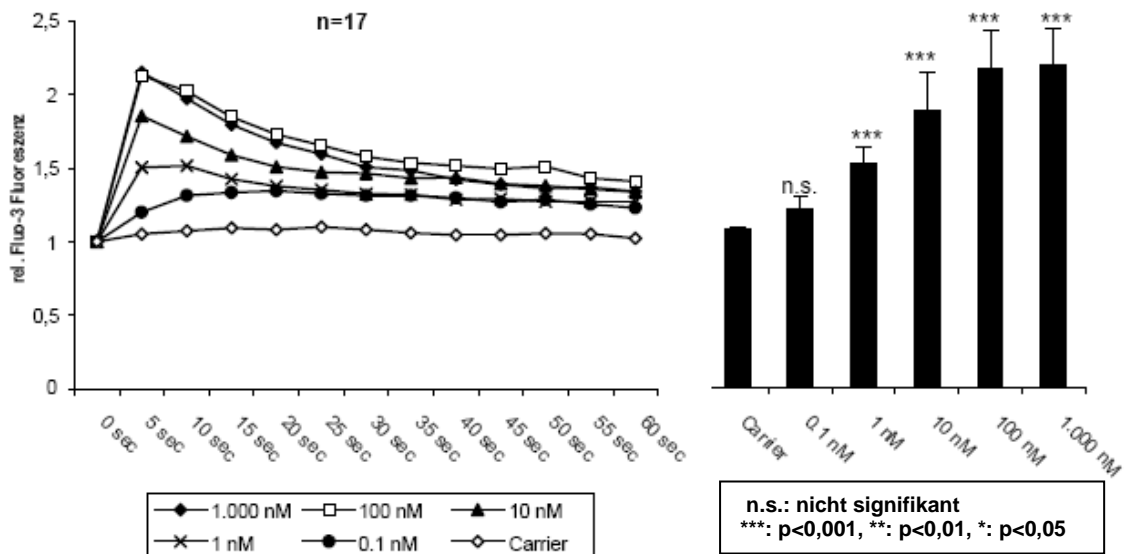


Abbildung 7: AML: die Kalziumfreisetzung nach Zugabe verschiedener LTD4-Konzentrationen (in nM) im Zeitverlauf (n=17; Mittelwerte) sowie die Kalziumfreisetzung 5 Sekunden nach Zugabe der verschiedenen LTD4-Konzentrationen im Vergleich zu dem Carrier (n=17; Mittelwerte; SEM; Signifikanzbetrachtung).

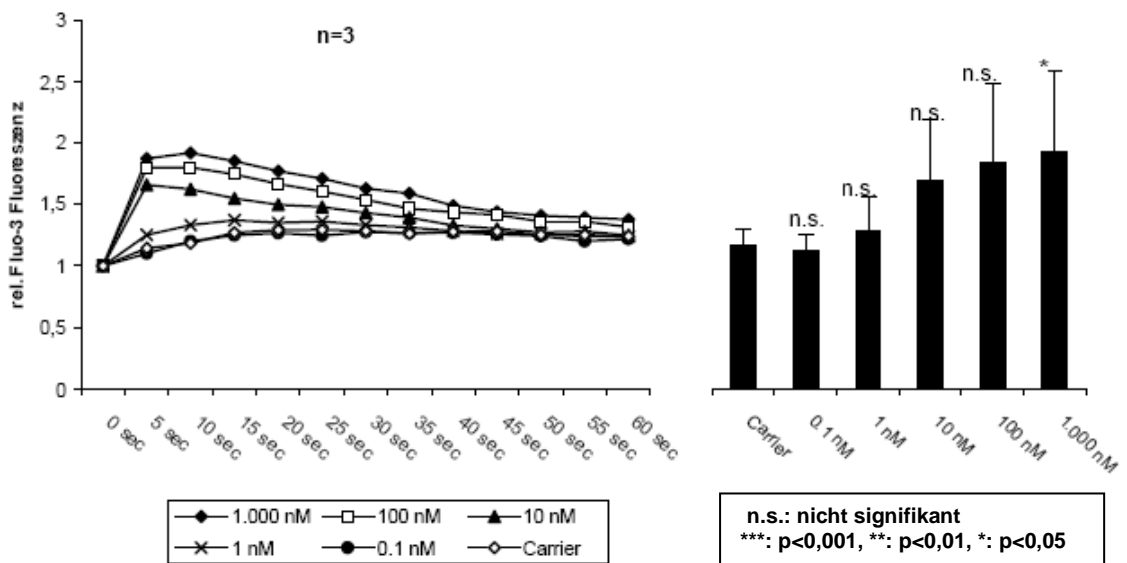


Abbildung 8: ALL: die Kalziumfreisetzung nach Zugabe verschiedener LTD4-Konzentrationen (in nM) im Zeitverlauf (n=3; Mittelwerte) sowie die Kalziumfreisetzung 5 Sekunden nach Zugabe der verschiedenen LTD4-Konzentrationen im Vergleich zu dem Carrier (n=3; Mittelwerte; SEM; Signifikanzbetrachtung).

## Ergebnisse

Bei den AML-Proben zeigte sich insgesamt eine höhere Kalziumfreisetzung nach LTD4-Zugabe als bei den ALL-Proben. Diese war vor allem in den Bereichen der hohen Leukotrienkonzentrationen zu erkennen. Der Unterschied wies allerdings keine Signifikanz auf (siehe Abbildung 9).

In einem weiteren Experiment sollte der Effekt von SDF-1 auf AML im Gegensatz zu dem auf ALL untersucht werden. Hierbei zeigte sich bei den ALL-Proben nach Zugabe von SDF-1 (100 ng/ml) eine höhere und zeitlich länger andauernde Kalziumfreisetzung als bei den AML-Proben, wobei hier allerdings keine Signifikanz zu ermitteln war (siehe Abbildung 9).

Die Zugabe von SDF-1 führte somit zu einer geringeren Kalziummobilisierung bei AML-Zellen als bei ALL-Zellen, wohingegen die Zugabe von LTD4 bei AML-Zellen eine stärkere Kalziumfreisetzung auslöste (siehe Abbildung 9).

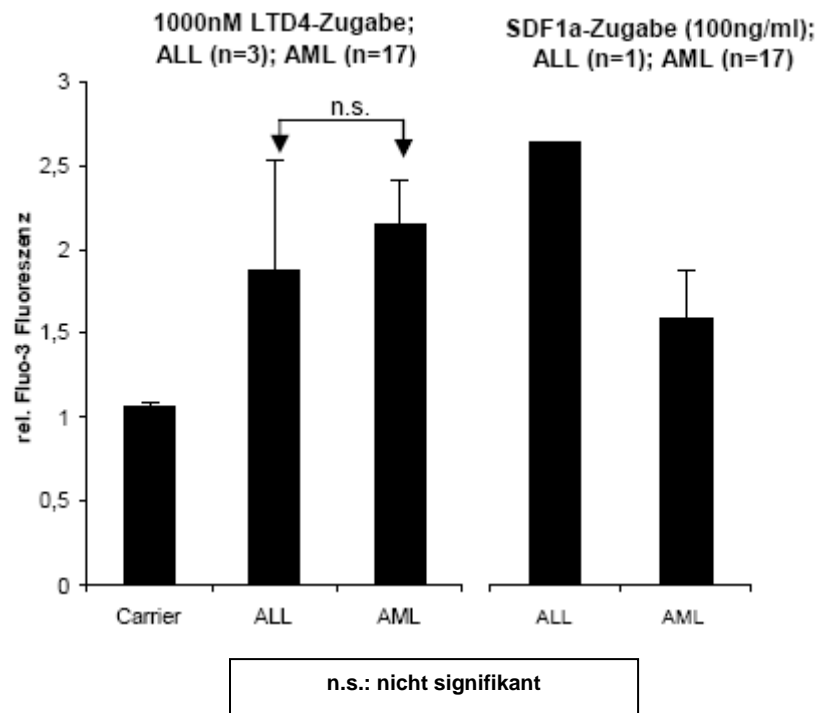


Abbildung 9: Vergleich der Kalziumfreisetzung bei AML und ALL nach 5 Sekunden jeweils nach Zugabe von LTD4 (1000 nM) oder SDF-1 (100 ng/ml) (Mittelwerte; SEM; Signifikanzbetrachtung nach LTD4-Zugabe bei ALL und AML).

Somit konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass das Ausmaß des Effektes von Cysteinyl-Leukotrienen bei der akuten myeloischen Leukämie sehr bedeutend ist und diesen Mediatoren eine wichtige Funktion zuzuschreiben ist.

### **3.1.2 Subgruppenanalysen bei AML**

#### **3.1.2.1 Unterteilung nach FAB-Gruppen**

Auch bei der Betrachtung der Ergebnisse im Zusammenhang mit der Einteilung nach der FAB-Klassifikation zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

So wurde eine Aufspaltung der Ergebnisse nach der FAB-Klassifikation von M0 bis M5 vorgenommen. Es wurde jeweils die Kalziumkonzentration beurteilt, die 5 Sekunden nach Zugabe von 1000 nM LTD4 freigesetzt wurde. Hierbei zeigte sich tendenziell eine höhere Kalziumfreisetzung bei den AML-Proben der FAB-Klassifikation M1 und ein geringerer Effekt bei der FAB-Klassifikation M4. Allerdings waren die Unterschiede im Vergleich zu der Schwankungsbreite nicht sehr groß (siehe Abbildung 10).



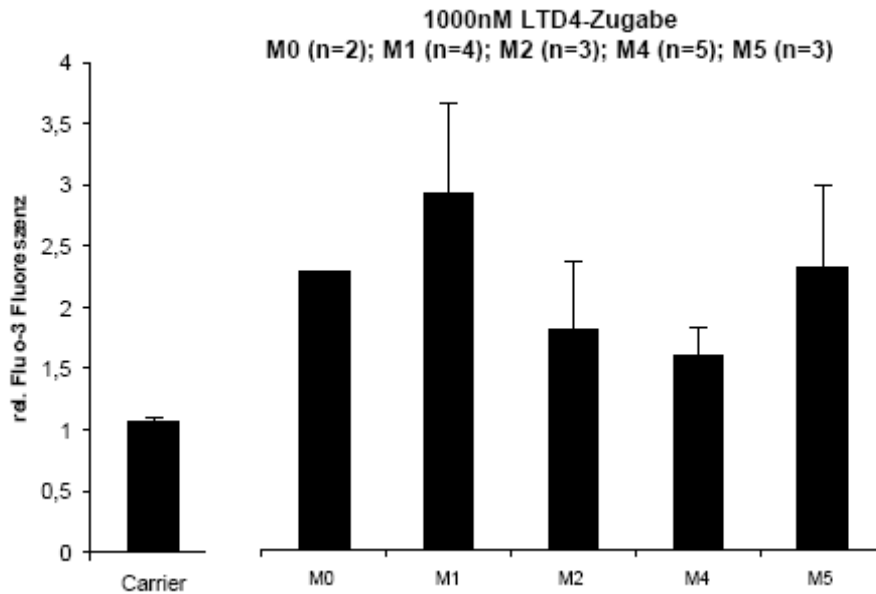


Abbildung 10: Vergleich der Kalziumfreisetzung der unterschiedlichen AML-Subtypen (FAB-Gruppen) 5 Sekunden nach 1000 nM LTD4-Zugabe (Mittelwerte; SEM).

### 3.1.2.2 Einteilung nach Oberflächenmarkern

Um weiterhin beurteilen zu können, ob ein spezifischer Phänotyp der AML mit einer besonderen Empfindlichkeit gegenüber Cysteinyl-Leukotrienen verbunden ist, kann man die Expression verschiedener Oberflächenmarker hinzuziehen. So kann man den Effekt der Rezeptorstimulation mit dem Ausmaß der Expression spezifischer Oberflächenmarker vergleichen. Daher wurde zusätzlich eine Korrelation der Kalziummobilisierung bei der AML mit der Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern hämatopoetischer Zellen vorgenommen. Da wir aus den Vorarbeiten wussten, dass normale hämatopoetische Progenitorzellen sehr stark auf Cysteinyl-Leukotriene reagieren im Vergleich zu reiferen myeloischen Zellen, vermuteten wir, dass Leukämieblasten mit einem ähnlichen Phänotyp wie Progenitoren eine stärkere Reaktion zeigen könnten. Hierbei zeigte sich in der Tat bei den auch auf Progenitoren exprimierten Oberflächenmarkern CD117 und CD34 jeweils eine signifikant positive Korrelation ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 11).

## Ergebnisse

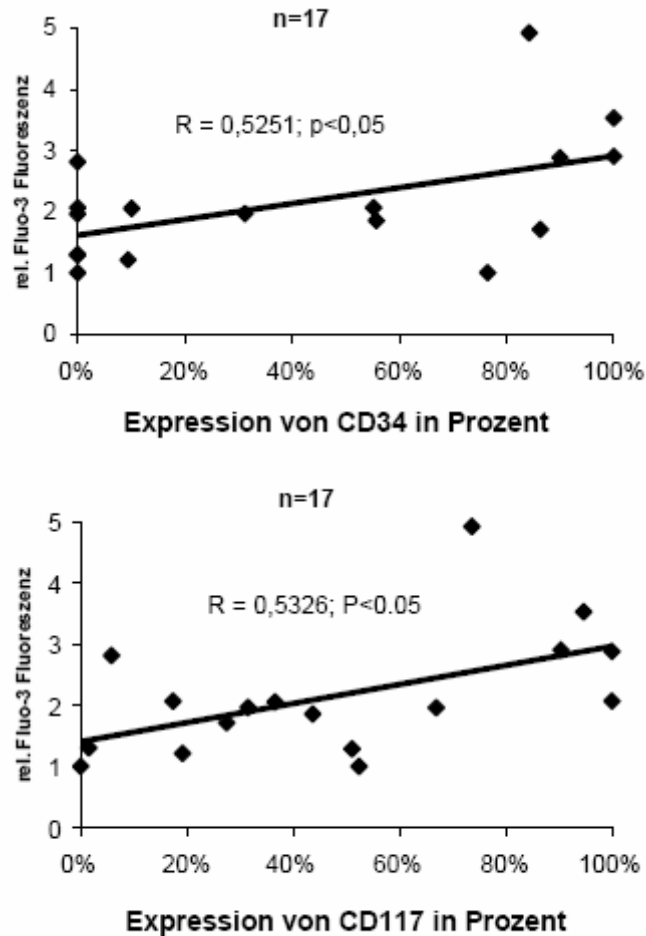


Abbildung 11: AML: Korrelation der Kalziumfreisetzung mit der Expression von CD34 sowie CD117.

### 3.1.2.3 Schlussfolgerung des Versuches der intrazellulären Kalziumfreisetzung

In den Versuchen konnte erstmals gezeigt werden, dass bei allen untersuchten AML-Proben durch Stimulation mit Cysteinyl-Leukotrienen eine Kalziummobilisierung in den Blasten bewirkt werden kann, also der Rezeptor durchweg funktionell aktiv war. Das Ausmaß der Kalziummobilisierung war dabei variabel.

Allerdings zeigten sich zwischen den einzelnen Subgruppen keine wesentlichen Unterschiede. Offensichtlich ist es eine typische Eigenschaft der AML, funktionell auf Cysteinyl-Leukotriene zu reagieren.

### **3.2 Der Einfluss des spezifischen CysLT1-Rezeptor Antagonisten MK-571 auf die Proliferation von AML-Zellen**

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass der CysLT1-Rezeptor mittels LTD4 stimuliert werden kann.

In diesem Versuch sollte nun die Inhibition des Rezeptors untersucht werden. Hierbei sollte geprüft werden, ob eine Hemmung des CysLT1-Rezeptors einen Einfluss auf die Zellproliferation und Zellvitalität hat.

So wurde in diesem Versuch die Stoffwechselrate nach Hemmung des Rezeptors bestimmt, um dadurch Rückschlüsse auf die Proliferation ziehen zu können.

Dazu wurde der Rezeptorantagonist MK-571 in aufsteigenden Konzentrationen zu den AML- bzw. ALL-Zellen gegeben und diese so jeweils 24 bzw. 48 Stunden inkubiert.

Daraufhin wurde die metabolische Aktivität der Zellen durch Zugabe des WST-1-Reagenzes ermittelt.

Zusätzlich wurde jeweils eine Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Die Zellvitalität, die sich nach alleiniger Zugabe des Carriers zeigte, wurde als 100% definiert. Davon abhängig wurde dann eine Zunahme, bzw. Abnahme der Zellvitalität bezeichnet.

Die Diagramme zeigen jeweils die Mittelwerte der verschiedenen Konzentrationen in Prozent sowie den Standard Error of the Mean (SEM).

Als Positivkontrolle wurde der Test auf Hemmung der Proliferationsrate bei der Zelllinie KG1a durchgeführt. Hier zeigte sich schon nach 3 Stunden WST-1 Inkubation eine starke Reduktion der Stoffwechselaktivität. So fiel diese nach 24h MK-571-Inkubation auf 53,2% ab und nach 48 Stunden auf 39,2% (siehe Abbildung 12).

## Ergebnisse

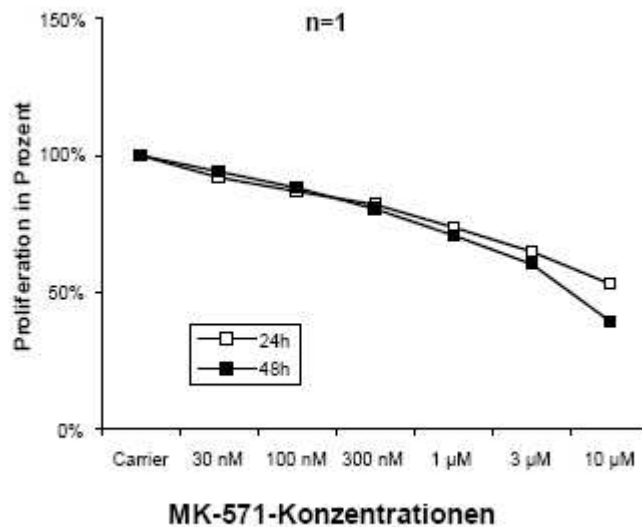


Abbildung 12: KG1a: 3h nach WST-1 Zugabe, nach 24h und 48h MK-571 Inkubation (Mittelwerte aus 8 Replika pro Ansatz).

### 3.2.1 Ergebnisse bei AML-Proben

In den Abbildungen wurde die Zellvitalität in Prozent in Bezug zu den verschiedenen Konzentrationen des Hemmstoffes MK-571 dargestellt.

Bei den Messungen nach einer 3-stündigen Inkubation der AML-Zellen mit WST-1 zeigte sich weder nach 24 Stunden noch nach 48 Stunden MK-571-Inkubation eine wesentliche Änderung der Zellvitalität (siehe Abbildung 13).

Dahingegen konnte nach einer 6-stündigen Inkubation bei den Zellen, die zuvor 24 Stunden mit MK-571 inkubiert worden waren, eine schwach ausgeprägte Verminderung der Vitalität beobachtet werden. So sank die Stoffwechselaktivität bei Zugabe von 10 µM auf 76,5% des Ausgangswertes ab. Bei den Zellen hingegen, die 48 Stunden mit MK-571 inkubiert wurden, konnte kein Abfall der Vitalität gezeigt werden (siehe Abbildung 14).

## Ergebnisse

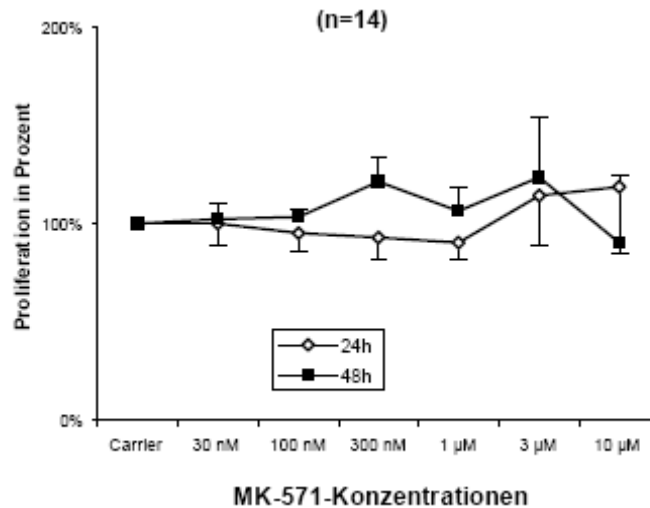


Abbildung 13: AML: 3h nach WST-1 Zugabe, nach 24 und 48h MK-571-Inkubation (Mittelwerte, SEM, 8 Replika pro Ansatz).

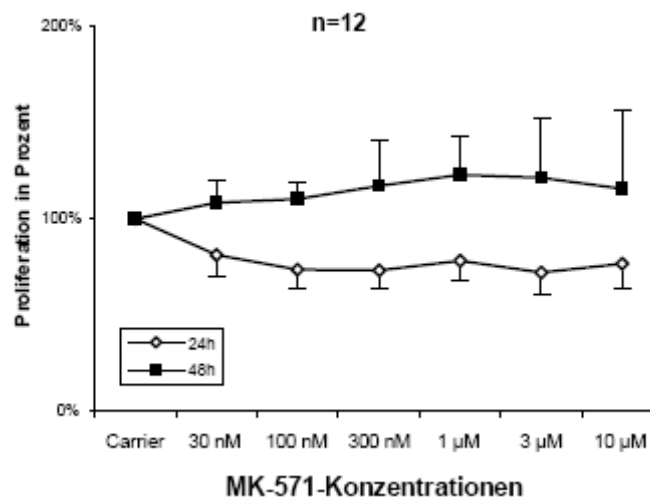


Abbildung 14: AML: 6h nach WST-1 Zugabe, nach 24 und 48h MK-571-Inkubation (Mittelwerte, SEM, 8 Replika pro Ansatz).

### 3.2.2 Ergebnisse bei ALL-Proben

Im Gegensatz dazu wiesen ALL-Zellen mit der gleichen Behandlung eine stärkere Reduktion der Vitalität auf. Allerdings ist zu beachten, dass die Fallzahl nur gering war.

So sank die Stoffwechselaktivität schon nach 3 Stunden WST-1 Inkubation nach vorheriger 24 Stunden MK-571 Inkubation auf 53,2% (bei 10 µM MK-571)

## Ergebnisse

ab. Nach 48 Stunden MK-571 Inkubation lag die Stoffwechselaktivität nur noch bei 21,9% (siehe Abbildung 15).

Nach 6 Stunden WST-1-Inkubation sank die Stoffwechselaktivität dosisabhängig nach 24 stündiger Inkubation mit MK-571 auf 53,7% und nach 48 stündiger Inkubation auf 13,6% (siehe Abbildung 16).

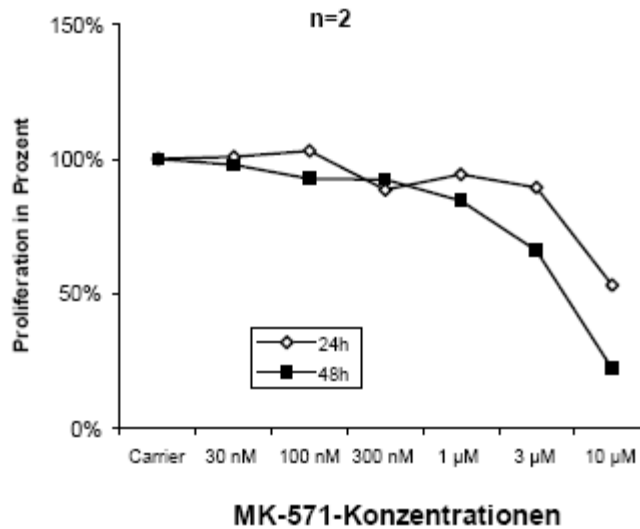


Abbildung 15: ALL: 3h nach WST-1 Zugabe, nach 24 und 48h MK-571-Inkubation (Mittelwerte, 8 Replika pro Ansatz).

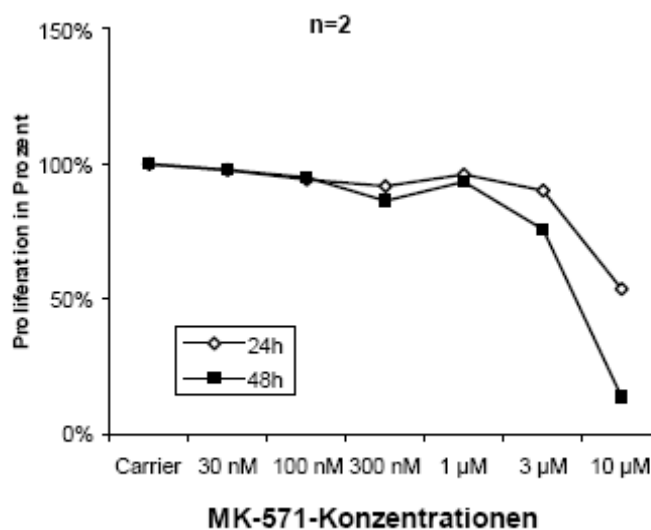


Abbildung 16: ALL: 6h nach WST-1 Zugabe, nach 24 und 48h MK-571-Inkubation (Mittelwerte, 8 Replika pro Ansatz).

### **3.2.3 Schlussfolgerung des Versuches mit dem Rezeptorantagonisten MK-571**

Bei den vorliegenden Ergebnissen konnte in diesem Versuch kein eindeutiger Effekt im Sinne einer Hemmung auf die Proliferation von AML-Blasten gefunden werden, obwohl ein Effekt auf die Zelllinie KG1a vorhanden war.

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methodik

#### **4.1.1 Testung auf intrazelluläre Kalziumfreisetzung**

Die intrazelluläre Kalziumfreisetzung von malignen hämatopoetischen Zellen (AML und ALL) wurde durch eine durchflusszytometrische Messung ermittelt. Dazu enthielt jeder Ansatz eine definierte Anzahl an Zellen, welche mit einer festgesetzten Menge des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3 versehen wurde. Während des Versuches sollte das Beladen der Zellen mit dem Fluo-3-Farbstoff durch jeweils gleiche Inkubationszeiten, Verdünnungsschemata und Waschgänge konstant gehalten werden. Trotz der Bemühungen, standardisierte Abläufe zu schaffen, kann es durch Temperaturschwankungen zu einer Beeinflussung der Vitalität und der Reaktionsfähigkeit der Zellen auf die Leukotrienstimulation gekommen sein. Auch können eventuelle Lichteinflüsse, die nicht vollkommen zu vermeiden waren, zu einem vorzeitigen Verfall des Farbstoffes geführt haben.

Ein weiteres Problem könnte gewesen sein, dass es zwischen der Zugabe von Leukotrien und der Messung der Reaktion nach 5 Sekunden zu Verzögerungen kam. Dann wäre die unmittelbare intrazelluläre Kalziumfreisetzung nach Zugabe von Leukotrien eventuell nicht erfasst worden.

Allerdings war stets ein Effekt nachzuweisen, so dass diese theoretischen Bedenken in der Praxis keine Rolle spielten.

#### **4.1.2 Hemmung der Proliferation und des Metabolismus durch den CysLT1-Antagonisten MK-571**

Bei dem Versuch der Hemmung der Proliferation wurden 90 Well-Platten verwendet, wobei jedes Well mit jeweils konstanten Zellzahlen bestückt wurde. Daraufhin wurden über verschiedene Verdünnungsreihen unterschiedliche Konzentrationen des CysLT1-Antagonisten MK-571 hergestellt und zu den Ansätzen hinzugefügt. Jede Konzentration wurde jeweils in 8 Wells gegeben und daraus der Mittelwert berechnet. Die so versehenen Platten wurden nun bei



37°C 24h und 48h inkubiert. Daraufhin wurden sie mit dem Farbstoff WST-1 versetzt und nach 1h, 3h und 6h im Elisareader gemessen. Obwohl ebenfalls die Inkubationszeiten, die Verdünnungsreihen und Waschgänge standardisiert durchgeführt wurden, kann es auch hier durch Temperaturschwankungen zu Beeinflussung der Ergebnisse gekommen sein. Auch der Einfluss von Licht könnte den Farbstoff WST-1 beeinträchtigt haben und daher eventuell die Messung der Stoffwechselaktivität beeinflusst haben. Die Ergebnisse mit der Zelllinie KG1a belegen jedoch, dass die Methode durchaus geeignet ist, um einen antiproliferativen Effekt nachzuweisen.

Die in 4.1.1 und 4.2.2 beschriebenen Probleme sind zwar theoretisch denkbar, allerdings sind die verwendeten Methoden sehr gut etabliert. Bislang wurden die genannten Probleme nicht beobachtet, sodass man nicht damit rechnen muss, dass sie bei den Experimenten aufgetreten sind.

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

#### **4.2.1 Die Rolle des Chemokins SDF-1 und seines Rezeptors CXCR4**

Wie humane hämatopoetische Vorläuferzellen weisen auch maligne hämatopoetische Zellen einen Tropismus zum Knochenmark auf. Dieser Prozess sowie die funktionelle Aktivität maligner Zellen werden wahrscheinlich auf ähnliche Weise gesteuert wie bei hämatopoetischen Progenitorzellen. Eine wichtige Rolle dabei spielen Chemokine. Ein Chemokin, dem hierbei eine große Bedeutung zukommt, ist SDF-1. Es wirkt als Ligand über den G-Proteingekoppelten Rezeptor CXCR4. Dieser CXCR4-Rezeptor wiederum wird sowohl auf zirkulierenden B-CLL-Zellen als auch auf akuten lymphozytären Leukämieblasten exprimiert. Des Weiteren ist er auf monozytär differenzierten AML-Blasten zu finden (Möhle et al, 1999b; Möhle et al, 2000). Die Funktion dieses Rezeptors scheint unter anderem zu sein, die Migration und die Proliferation maligner hämatopoetischer Zellen im Knochenmark zu steuern (Spiegel et al, 2004; Burger et al, 2000).

### 4.2.2 Die Rolle der Cysteinyl-Leukotriene und ihres Rezeptors CysLT1

In Vorarbeiten zeigte sich, dass auch Cysteinyl-Leukotriene eine Rolle bei der Einwanderung von humanen Stamm- und Vorläuferzellen in das Knochenmark zu spielen scheinen. Sie gehören zwar nicht zu der Gruppe der Chemokine, aber ihre Wirkungsweise scheint diesen sehr ähnlich zu sein. So beeinflussen auch sie unter anderem die Chemotaxis und die Proliferation. Der entsprechende Rezeptor CysLT1 wird auf humanen CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen in hohem Maße exprimiert (Bautz et al, 2001). Dieser Prozess der Stammzellmigration gleicht in vielerlei Hinsicht der Extravasation von Leukozyten im Rahmen einer Entzündung (Chan et Watt, 2001; Möhle et al, 1999a). Dabei werden die Chemotaxis und die Extravasation der reifen Leukozyten ebenfalls durch Leukotriene beeinflusst (Denzlinger, 1996). Es wurde gezeigt, dass der LTD<sub>4</sub> Rezeptor CysLT1 auf humanen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie auf der CD34<sup>+</sup> Zelllinie KG1a in funktionell aktiver Form exprimiert wird. Ebenso konnte in einem entsprechenden In-vitro-Modell der Einfluss von LTD<sub>4</sub> auf die transendotheliale Migration von CD34<sup>+</sup> Zellen gezeigt werden (Bautz et al, 2001).

In weiteren Arbeiten wurde der Einfluss der Cysteinyl-Leukotriene auf die Proliferation chronischer lymphatischer Leukämiezellen beobachtet (Böhmler et al, 2005). So konnte von Böhmler et al bei chronischen lymphatischen Leukämiezellen zum einen ein wachstumssteigernder Effekt beobachtet werden, zum anderen eine erhöhte Migration der Leukämiezellen. Zudem wurde die Expression des Rezeptors CysLT1 in den Zellen gezeigt (Böhmler et al, 2005).

Mit diesen Erkenntnissen liegt der Schluss nahe, dass auch Lipidmediatoren wie die Cysteinyl-Leukotriene maligne hämatopoetische Zellen funktionell beeinflussen können.

Zudem scheinen sie als parakrine Faktoren an der Interaktion von hämatopoetischen Zellen mit Endothel- und Stromazellen beteiligt zu sein. So scheinen Endothel- und Stromazellen in der Lage zu sein, neben Zytokinen und

anderen Peptidverbindungen auch Cysteinyl-Leukotriene in biologisch signifikanten Konzentrationen zu produzieren (Böhmler et al, 2005).

### **4.2.3 Kalziummobilisierung**

In dieser Arbeit sollte nun die funktionelle Wirkung von Cysteinyl-Leukotrienen auf akute myeloische Leukämiezellen genauer untersucht werden. Dazu diente die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern als Maß für die unmittelbare Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors CysLT1 durch Leukotriene. Diese wurde fluoreszenzzytometrisch nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen des Cysteinyl-Leukotriens LTD4 gemessen. LTD4 weist aus dieser Gruppe die höchste Affinität zu dem CysLT1-Rezeptor auf.

Hierbei konnte bei allen AML-Proben ein deutlicher zeit- und dosisabhängiger Effekt festgestellt werden.

Zusätzlich wurde bei den Proben eine Messung der Kalziummobilisierung nach Zugabe des Chemokins SDF-1 mit Wirkung auf den CXCR4-Rezeptor vorgenommen sowie im Vergleich der Effekt auf akute lymphatische Leukämiezellen untersucht.

#### **4.2.3.1 Die Wirkung von Cysteinyl-Leukotrienen und SDF-1 auf akute myeloische und akute lymphatische Leukämien**

Bei den AML-Proben zeigte sich ein Unterschied zwischen der Zugabe von LTD4 und SDF-1. So löste LTD4 eine höhere intrazelluläre Kalziummobilisation aus als SDF-1.

Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass der CysLT1-Rezeptor auf akuten myeloischen Leukämiezellen stärker exprimiert wird als CXCR4.

Dies würde sich mit Untersuchungen von Rether et al decken. So war bei den AML-Subtypen, bei denen die Kalziumfreisetzung am höchsten war, auch die größte RNA-Expression des CysLT1-Rezeptors zu finden (Rether et al, 2006). Allerdings fehlt der direkte Vergleich mit der Rezeptordichte von CysLT1, die nicht bestimmt werden kann.

Des Weiteren käme aber auch in Betracht, dass die Bindung von LTD4 an den CysLT1-Rezeptor eine stärkere Kalziumfreisetzung hervorruft als die Bindung von SDF-1 an den Rezeptor CXCR4. Dies könnte bedeuten, dass der CysLT1-Rezeptor auf AML-Zellen funktionell aktiver ist als der Rezeptor CXCR4. Dies wiederum könnte daraus resultieren, dass die beiden Rezeptoren mit unterschiedlichen G-Protein-Subtypen interagieren. So ist der CysLT1-Rezeptor an die Proteine Gi und Gq gekoppelt, während der Rezeptor CXCR4 nur an das Protein Gi gekoppelt ist (Xue et al, 2007; Roland et al, 2003).

So zeigte auch Bautz et al, dass der Ligand LTD4 bei Bindung an den Rezeptor CysLT1 eine stärkere Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt als der Ligand SDF-1 bei Bindung an den Rezeptor CXCR4 (Bautz et al, 2001).

Bei den ALL-Proben hingegen zeigte sich im Gegensatz dazu eine höhere Kalziumfreisetzung nach Zugabe von SDF-1 als nach LTD4. Dies lässt darauf schließen, dass auf Zellen der akuten lymphatischen Leukämie der CXCR4-Rezeptor funktionell aktiver ist als der CysLT1-Rezeptor. Dies resultiert daraus, dass SDF-1 besonders in B-Vorläuferzellen wirksam ist. Daher stammt auch das frühere Synonym: Pre B Stimulating Factor (PBSF) (Nagasawa et al, 1994).

#### **4.2.3.2 Betrachtung der Kalziumfreisetzung in Bezug auf die FAB-Gruppe**

Weiterhin zeigte sich bei der Unterteilung der AML-Proben nach der FAB-Klassifikation, dass tendenziell eine stärkere Kalziumfreisetzung bei der FAB-Gruppe M1 zu sehen war, auch wenn die Unterschiede nur gering waren. Die FAB-Gruppe M1 bezeichnet AML-Zellen ohne Differenzierung, die dem Phänotyp von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen ähneln. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Rether et al, bei denen ebenfalls die stärksten Effekte von LTD4 bei der FAB-Gruppe M1 erzielt wurden (Rether et al, 2006). Dies deutet daraufhin, dass der Rezeptor CysLT1 vor allem auf unreifen AML-Zellen exprimiert wird, bzw. funktionell aktiv ist.

Auch die Betrachtung der Oberflächenmarker weist darauf hin, dass eher AML-Zellen mit einem Phänotyp, der den hämatopoetischen Progenitorzellen ähnlich ist, den CysLT1-Rezeptor exprimieren. Als Oberflächenmarker von hämatopoetischen Progenitorzellen gelten CD34 und CD117 (Wells et al, 1996).

Die Subgruppe der AML M1 weist ebenfalls diesen Phänotyp von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen auf.

Bei dem Vergleich der Kalziumfreisetzung nach LTD4-Stimulation mit dem Expressionsgrad der Oberflächenmarker zeigte sich sowohl bei CD34, als auch bei CD117 eine positive Korrelation.

Dies kann bedeuten, dass bei wenig differenzierten akuten myeloischen Leukämien, die phänotypisch den CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen ähneln, die Expression und Funktionalität des CysLT1-Rezeptors höher ist und somit der Effekt durch Cysteinyl-Leukotriene größer ist.

Hierzu ist interessant zu bedenken, dass auf reifen mononukleären Zellen des peripheren Blutes der CXCR4-Rezeptor stärker exprimiert wird, als auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen (Möhle et al, 1999a; Bautz et al, 2001). Dagegen exprimieren mobilisierte, zirkulierende CD34<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut vermehrt den CysLT1-Rezeptor in funktionell aktiver Form.

#### **4.2.4 Bedeutung der intrazellulären Kalziummobilisation**

Durch die Bindung von LTD4 an den Rezeptor kommt es zu einer intrazellulären Kalziumfreisetzung. Darauf folgt eine Reorganisation des Zytoskeletts, welche für die Migration der Zellen verantwortlich ist. Diese Reorganisation findet durch Polymerisierung des globulären G-Aktins zu filamentösem F-Aktin statt (Bearer, 1993). Dieser Effekt konnte ebenfalls bei primären AML-Zellen nach Stimulation mit LTD4 gezeigt werden (Rether et al, 2006).

### 4.2.5 Diskussion weiterer Ergebnisse zu diesem Thema

Der CysLT1-Rezeptor an sich und dessen Expression auf primären AML-Zellen wurde von Rether et al mittels RT-PCR analysiert. Dabei konnte in allen primären Proben der AML mRNA detektiert werden. Weiterhin zeigten sich in einer quantitativen TaqMan PCR vor allen in unreifen AML-Blasten der FAB-Klassifikation M1 hohe mRNA-Konzentrationen (Rether et al, 2006). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der intrazellulären Kalziumfreisetzung und spricht wiederum dafür, dass Cysteinyl-Leukotriene vor allem auf progenitorähnliche myeloische Zellen wirken. Diese Zellen ähneln phänotypisch am meisten den CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen.

Weiterhin ist zwar gelegentlich auch in reifen Leukozyten noch RNA des Rezeptors CysLT1 nachweisbar, allerdings bewirken in diesem Fall Cysteinyl-Leukotriene keine intrazelluläre Kalziumfreisetzung mehr (Kanaoka et Boyce, 2004; Bautz et al, 2001).

Zudem wurde die Chemotaxis der AML-Blasten untersucht, da Cysteinyl-Leukotriene zur Infiltration des Knochenmarks führen können (Böhmler et al, 2005). Überraschenderweise induzierten schon geringe Konzentrationen von LTD4 (10 nM) eine signifikante chemotaktische Reaktion der AML-Blasten, während höhere Konzentrationen (bis zu 1 µM) weniger effektiv zu sein schienen (Rether et al, 2006).

Des Weiteren wurde auch in Zelllinien der B-Zell-Leukämierihe wie DOHH-2, MEC-1 und EHEB eine Expression von CysLT1 gezeigt, während in T-Zell-Linien (Jurkat) keine Expression beobachtet werden konnte (Figueroa et al, 2001). Andererseits exprimieren T-Zelllinien verstärkt CXCR4, der wiederum bei KG1a nur eine sehr geringe Oberflächenexpression besitzt (Bertolini et al, 2002; Tavor et al, 2004; Bautz et al, 2001).

### **4.2.6 Hemmung der Proliferation und des Metabolismus durch den CysLT1-Antagonisten MK-571**

Nach den Untersuchungen über die Wirkung von LTD<sub>4</sub> auf den CysLT1-Rezeptor soll nun im Umkehrschluss die Auswirkung der Rezeptorhemmung beobachtet werden. Daher wurde untersucht, ob der Antagonist MK-571 einen antiproliferativen Einfluss auf die malignen Zellen im Sinne einer Hemmung der autokrinen Regulation ausübt.

In Vorarbeiten konnte auf CLL-Zellen ein deutlicher zytotoxischer Effekt gezeigt werden (Böhmler et al, 2005).

In diesem Versuch wurde nun die Proliferationsrate der AML- und ALL-Proben nach 24, bzw. 48 stündiger Inkubation mit MK-571 und anschließender 1, 3 und 6 stündiger Inkubation mit dem Stoffwechselfarbstoff WST-1 gemessen. Dabei zeigte sich bei den AML-Zellen kein eindeutiges Absinken der Proliferationsrate, während sowohl bei der Zelllinie KG1a als auch bei den ALL-Zellen tendenziell ein Effekt zu erkennen war.

Insgesamt konnte kein deutlich antiproliferativer Effekt von MK-571 auf AML-Zellen im Sinne einer Hemmung des autokrinen Mechanismus gezeigt werden, wie dies bei CLL-Zellen der Fall war (Böhmler et al, 2005).

#### **4.2.6.1 Diskussion über den Wirkungsmechanismus von Leukotrienen auf akute myeloische Leukämiezellen in vivo**

Die Ergebnisse dieses Versuches schließen jedoch nicht aus, dass Cysteinyl-Leukotriene bei der Proliferation von AML-Zellen in vivo eine Rolle spielen.

Denn im vorliegenden Versuch werden die Leukämiezellen separat untersucht, ohne dass weitere hämatopoetische Zellen oder Stromazellen ebenfalls betrachtet werden. Somit befindet sich in diesem In-vitro-System nur das durch die malignen Zellen autokrin gebildete LTD<sub>4</sub>.

Weiterhin zerfallen Leukotriene in vitro sehr schnell, so dass in diesem Versuch die Bedingungen in vivo möglicherweise nicht adäquat dargestellt werden konnten.

In vivo könnten dagegen der Wirkungsmechanismus von Cysteinyl-Leukotrienen auf AML-Zellen dahingehend vermutet werden, dass die LTD4-Produktion nicht in den AML-Zellen selbst stattfindet, sondern andere hämatopoetische Zellen die Cysteinyl-Leukotrien-Synthese übernehmen und diese dann parakrin auf die AML-Zellen wirken.

So gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass wohl die meisten AML-Blasten selbst nur wenig Leukotriene produzieren (Stenke et al, 1998).

Ebenfalls ist bekannt, dass vor allem reife hämatopoetische Zellen wie z.B. Makrophagen und Mastzellen, aber auch humane Endothel- und Stromazellen des Knochenmarks zu der Synthese von Cysteinyl-Leukotrienen befähigt sind (Böhmler et al, 2005; Stenke et al, 1987).

Weiterhin wäre auch denkbar, dass diese hämatopoetischen Zellen Nicht-Cysteinyl-Leukotriene produzieren, die dann wiederum von den AML-Blasten in funktionell aktive Cysteinyl-Leukotriene konvertiert werden könnten. Denn gerade AML-Blasten besitzen die notwendige Enzyenausstattung für eine sehr effiziente Konversion (Lindgren et al, 1993; Stenke et al, 1998).

Die in dem Versuch gemessene Proliferation der AML-Zellen, die sich trotz der Inhibition des CysLT1-Rezeptors zeigte, könnte somit die Basalproliferationsrate darstellen, die nicht durch Cysteinyl-Leukotriene beeinflusst wird.

Bei der Zelllinie KG1a und bei den ALL-Zellen könnte dagegen eher eine autokrine LTD4-Produktion vorliegen. Daher können in diesen Versuchen die Proliferation und Stoffwechselaktivität durch die Inkubation mit MK-571 tendenziell eher gehemmt werden.

Zusammenfassend könnte man aus den hier vorliegenden Ergebnissen vermuten, dass nicht alle malignen Zellen zu einer autokrinen LTD4-Produktion fähig sind, sondern dass AML-Zellen eine parakrine Produktion für eine Aktivierung von CysLT1 benötigen. Offen bleibt natürlich, in welchem Ausmaß CysLT1 an der Proliferation beteiligt ist.



## Diskussion

---

Dies könnte die Ursache sein, warum in diesem Versuch die Blockade des CysLT1-Rezeptors bei AML-Zellen nicht zu einer Hemmung der Proliferation und Stoffwechselaktivität führte.

Gemessen an der sehr starken funktionellen Aktivität der Cysteinyl-Leukotriene käme aber auch in diesem Fall eine therapeutische Inhibition des Rezeptors wie zum Beispiel durch das schon in der Asthmatherapie eingesetzte Montelukast in Betracht, da möglicherweise auch geringe Mengen parakrin freigesetzter Cysteinyl-Leukotriene das Wachstum der Leukämieblasten unterhalten.

### **4.3 Schlussfolgerung**

Bei durchweg allen hier untersuchten Proben der akuten myeloischen Leukämie bewirkten die Cysteinyl-Leukotriene eine Signalantwort. Auch bei den untersuchten Proben der akuten lymphatischen Leukämie zeigte sich nach Stimulation mit Cysteinyl-Leukotrienen eine funktionelle Aktivität.

So aktivierte das Leukotrien D4 eine G-Proteinvermittelte Signalkaskade nach Bindung an den Rezeptor CysLT1.

Nach dieser Stimulation konnte ein erhöhter intrazellulärer Kalziumfluss dargestellt werden. Die Höhe der Kalziumfreisetzung erfolgte in Korrelation zu der Dosis der LTD4-Zugabe. Bei der progenitorähnlichen myeloischen Zellreihe der Gruppe FAB M1 zeigte sich tendenziell eine etwas höhere Kalziumfreisetzung. Zudem war bei den AML-Proben der Effekt von LTD4 ausgeprägter als der von SDF-1, was die potenzielle Bedeutung von Cysteinyl-Leukotrienen in der Biologie der AML unterstreicht.

Im Gegensatz dazu war bei der ALL die Kalziumfreisetzung nach LTD4-Zugabe deutlich geringer ausgeprägt.

Auch in dem Vergleich der Kalziumfreisetzung bei AML mit der Expression von Oberflächenmarkern zeigte sich eine positive Korrelation mit der Expression von CD34 und CD117. Diese Oberflächenmarker weisen auf AML-Zellen hin, die dem Phänotyp der CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen ähneln.

Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass Cysteinyl-Leukotriene in Bezug auf maligne Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihe auch in vivo eine wichtige Rolle im hämatopoetischen Milieu spielen.

Dagegen war eine Hemmung der Proliferation durch den Antagonisten MK-571 bei AML nicht möglich, was allerdings in einem autokrinen Zusammenhang untersucht wurde. Dies schließt jedoch nicht aus, dass in einem hämatopoetischen Milieu Leukotriene von hämatopoetischen Zellen sowie von Endothel- und Stromazellen produziert werden könnten und auf parakrine Weise die Proliferation der AML-Blasten beeinflussen. Möglicherweise müssen auch verschiedene Zelltypen kooperieren, um eine effiziente Cysteinyl-Leukotrienbiosynthese zu ermöglichen.

Bislang kann noch nicht abgeschätzt werden, ob die Kenntnis über die beim Migrationsverhalten leukämischer Zellen beteiligten Rezeptoren und chemotaktischen Faktoren eine Rolle in neuen therapeutischen Ansätzen spielen wird. Zumindest theoretisch ist allerdings eine Beeinflussung der Proliferation und der Migration maligner hämatopoetischer Zellen mithilfe von Rezeptorantagonisten denkbar, was sich möglicherweise positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken könnte. Diese Rezeptorantagonisten, die strukturell MK-571 ähneln, werden bereits in Form von z.B. Montelukast in der Asthmatherapie eingesetzt.

Somit wurde erstmalig die Wirkung von Cysteinyl-Leukotrienen auf den Rezeptor CysLT1 sowie seine Funktion bei Zellen der akuten Leukämie nachgewiesen. Die Bindung von LTD4 an den Rezeptor setzt eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, wobei seine genaue Funktion allerdings noch unbekannt ist. Weiterhin scheint er nicht autokrin stimuliert zu werden.

Vor einem eventuellen klinischen Einsatz sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig, die den Effekt auf AML in vivo zeigen könnten.

### 5. Zusammenfassung

Die Cysteinyl-Leukotriene stellen eine Gruppe von Mediatoren dar, die über die Stimulation des G-Protein-gekoppelten Rezeptor CysLT1 wirken.

Sie spielen bei der Migration sowohl von Lymphozyten und Monozyten als auch von hämatopoetischen Progenitorzellen eine wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in einem ersten Teil der Effekt von Cysteinyl-Leukotrienen auf Zellen der akuten myeloischen Leukämie untersucht werden und mit dem Effekt auf Zellen der akuten lymphatischen Leukämie verglichen werden. Dazu wurde peripheres Blut von Patienten, die an AML bzw. ALL erkrankt waren, verwendet. Aus diesem wurden die malignen Zellen immunmagnetisch isoliert.

Um die Wirkung der Cysteinyl-Leukotriene zu untersuchen, wurde der Rezeptor mit dem Liganden LTD4 stimuliert. Daraufhin wurde die intrazellulär freigesetzte Kalziumkonzentration gemessen. Diese stieg sowohl bei der AML als auch bei der ALL schon nach Zugabe von geringen Konzentrationen des LTD4 deutlich an, was ein Zeichen für die funktionelle Aktivität von Cysteinyl-Leukotrienen ist.

Bei den AML-Zellen zeigte die LTD4-Zugabe eine höhere Kalziumfreisetzung, während hier die Zugabe von SDF-1 einen deutlich geringeren Effekt aufwies, als dies bei ALL-Zellen der Fall war. Dies unterstreicht die potentielle Bedeutung der Cysteinyl-Leukotriene in der Biologie der AML.

Bei den AML-Zellen der FAB-Gruppe M1 zeigte sich eine etwas höhere Kalziumfreisetzung. Diese Gruppe ähnelt phänotypisch am meisten den CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Zudem wurde in einem zweiten Teil die Hemmbarkeit der Proliferation durch den Rezeptorantagonisten MK-571 in einem autokrinen Milieu untersucht. Dazu wurde nach Inkubation der Zellen mit MK-571 die noch vorhandene Stoffwechselaktivität mittels des Farbstoffes WST-1 gemessen. Hier war bei den AML-Proben kein Einfluss auf die Proliferation zu erkennen. Da es sich bei dem Versuch um ein autokrines In-vitro-Modell handelt, kann nicht abschließend geklärt werden, ob eine Hemmbarkeit der AML-Zellen mittels des Rezeptorantagonisten auf parakrine Weise möglich ist, bzw. ob alle Faktoren,

## Zusammenfassung

---

die in vivo für eine autokrine Stimulation notwendig sind, auch in diesem Versuch berücksichtigt worden sind.

Allerdings zeigte sich in diesem Versuch sowohl bei der Zelllinie KG1a als auch bei den ALL-Proben eine Hemmung der Proliferation.

Damit wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal der Effekt von Cysteinyl-Leukotrienen auf Zellen der akuten Leukämie nachgewiesen, wobei durch Bindung an den CysLT1-Rezeptor eine intrazelluläre Signalantwort erfolgte.

Eine autokrine Stimulation hingegen ließ sich nicht nachweisen.

Ob durch Inhibition des Rezeptors die Proliferation und Migration maligner hämatopoetischer Zellen beeinflusst werden kann und dies sich möglicherweise positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkt, kann noch nicht abgeschätzt werden.

## 6. Verzeichnis: Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Hierarchisches Modell der Hämatopoese.....	4
Abbildung 2: Modell der SDF-1-induzierten transendothelialen Migration hämatoopoetischer Progenitorzellen.....	12
Abbildung 3: Struktur des CysLT1-Rezeptorantagonisten MK-571.....	15
Abbildung 4: Biosynthese der LT, verändert nach Böhmler, 2005.....	16
Abbildung 5 Messung der intrazellulären Kalziumfreisetzung.....	29
Abbildung 6: Kalziumfreisetzung nach Zugabe der verschiedenen LTD4- Konzentrationen (nM) bei KG1a (n=1).....	34
Abbildung 7: AML: die Kalziumfreisetzung nach Zugabe verschiedener LTD4- Konzentrationen (in nM) im Zeitverlauf (n=17; Mittelwerte) sowie die Kalziumfreisetzung 5 Sekunden nach Zugabe der verschiedenen LTD4- Konzentrationen im Vergleich zu dem Carrier (n=17; Mittelwerte; SEM; Signifikanzbetrachtung).....	36
Abbildung 8: ALL: die Kalziumfreisetzung nach Zugabe verschiedener LTD4- Konzentrationen (in nM) im Zeitverlauf (n=3; Mittelwerte) sowie die Kalziumfreisetzung 5 Sekunden nach Zugabe der verschiedenen LTD4- Konzentrationen im Vergleich zu dem Carrier (n=3; Mittelwerte; SEM; Signifikanzbetrachtung).....	36
Abbildung 9: Vergleich der Kalziumfreisetzung bei AML und ALL nach 5 Sekunden jeweils nach Zugabe von LTD4 (1000 nM) oder SDF-1 (100 ng/ml) (Mittelwerte; SEM; Signifikanzbetrachtung nach LTD4-Zugabe bei ALL und AML).....	37
Abbildung 10: Vergleich der Kalziumfreisetzung der unterschiedlichen AML- Subtypen (FAB-Gruppen) 5 Sekunden nach 1000 nM LTD4-Zugabe (Mittelwerte; SEM).....	39
Abbildung 11: AML: Korrelation der Kalziumfreisetzung mit der Expression von CD34 sowie CD117.....	40
Abbildung 12: KG1a: 3h nach WST-1 Zugabe, nach 24h und 48h MK-571 Inkubation.....	42

## Verzeichnis: Abbildungen und Tabellen

---

Abbildung 13: AML: 3h nach WST-1 Zugabe, nach 24 und 48h MK-571- Inkubation (Mittelwerte und SEM). .....	43
Abbildung 14: AML: 6h nach WST-1 Zugabe, nach 24 und 48h MK-571- Inkubation (Mittelwerte und SEM). .....	43
Abbildung 15: ALL: 3h nach WST-1 Zugabe, nach 24 und 48h MK-571- Inkubation (Mittelwerte). .....	44
Abbildung 16: ALL: 6h nach WST-1 Zugabe, nach 24 und 48h MK-571- Inkubation (Mittelwerte). .....	44
Tabelle 1: FAB-Klassifikation und ergänzende Merkmale .....	7
Tabelle 2: Immuntypisierung und Molekulargenetik der ALL gemäß EGIL .....	9

## 7. Literaturliste

Arnold G, Beier HM, Herrman M, Kaufmann P, Kretschmann HJ, Kühnel W, Schiebler TH, Schmidt W, Steiniger B, Winckerl J, van der Zypen E, Zilles K (2002): Allgemeine Anatomie des Blutkreislaufes. Blut und Blutbildung. In Schiebler TH, Schmidt W (eds.) Anatomie: 153-169. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio

Bairey O, Zimra Y, Rabizadeh E, Shaklai M (2004): Expression of adhesion molecules on leukemic B cells from chronic lymphocytic leukemia patients with predominantly splenic manifestations. *Isr. Med. Assoc. J.* 6:147-151

Bautz F, Denzlinger C, Kanz L, Möhle R (2001): Chemotaxis and transendothelial migration of CD34+ hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood* 97:3433-3440.

Bearer EL (1993): Role of actin polymerization in cell locomotion: molecules and models. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:582-591.

Begemann H, Begemann M (1989): Akute Leukämie. In Begemann H, Begemann M (eds.) *Praktische Hämatologie*: 148, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. Oct; 9(10):1783-6

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1985): Proposed revised criteria for the classification of the acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group *Ann Intern Med.* 103: 620-625

Bertolini F Dell'Agnola C, Mancuso P, Rabascio C, Burlini A, Monestiroli S, Gobbi A, Pruneri G, Martinelli G (2002): CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 62:3106-3112.

Böhmler A (2005): Die Wirkung chemotaktischer Faktoren auf hämatopoetische Stammzellen, leukämische Zellen und das Mikromilieu des Knochenmarks, Logos Verlag Berlin

Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ (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.



Busse W.W. (1998): Leukotrienes and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:S210-S213.

Calvi L.M, Adams G.B, Weibrecht K.W, Weber J.M, Olson D.P, Knight M.C, Martin R.P, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003): Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425:841-846.

Carlos TM, Harlan JM (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101.

Chan JY, Watt SM. (2001): Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 112:541-557.

Damtew B, Spagnuolo PJ (1997): Leukotriene C4 from vascular endothelium enhances neutrophil adhesiveness. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 56:111-116.

Denzlinger C. (1996): Biology and pathophysiology of leukotrienes. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 23:167-223.

Drazen J.M. (2003): Leukotrienes in asthma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 525:1-5.

Figuroa 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 JF (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.

Foon KA, Schroff RW, Gale RP (1982): Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances. *Blood* 60:1-19.

Fregonese L, Silvestri M, Sabatini F, Rossi GA (2002): Cysteinyl leukotrienes induce human eosinophil locomotion and adhesion molecule expression via a CysLT1 receptor-mediated mechanism. *Clin. Exp. Allergy* 32:745-750.

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.

Haar JL, Ackerman GA (1971): A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat. Rec.* 170:199-223.

Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF (2000): Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.* 275:30531-30536.

Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B (2002): Rezeptoren. In Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B (eds.) *Biochemie des Menschen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Jones TR, Zamboni R, Belley M, Champion E, Charette L, Ford-Hutchinson AW, Frenette R, Gauthier JY, 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.

Kanaoka Y et Boyce JA (2004): Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J. Immunol.* 173:1503-1510

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.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (1997): Leukemias and myeloproliferative diseases. In Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (eds.) *Basic Pathology, The Hematopoietic and Lymphoid Systems*: 340-392

Lindgren JA, 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.

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999): Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, Nov 4:341(19):1484.

Lübbert M (2002): Akute myeloische Leukämie. In Mertelsmann R, Engelhardt R, Berger D (eds.) *das Rote Buch*: 361-370. ecomed medizin

Lübbert M, Lindemann A (2002): In Mertelsmann R, Engelhardt R, Berger D (eds.) *das Rote Buch*: 371-377. ecomed medizin

Luster AD (1998): Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338:436-445

Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaufneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF (1999): Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399(6738):789-93.

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 IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH (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.

Mazo IB, von Andrian UH.(1999): Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *J. Leukoc. Biol.* 66:25-32.

McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ (1971): Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 171:293-294.

Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MAS, 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.

Moore MAS, Metcalf D (1970): Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and In vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol.* 18:279-296.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997): Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88: 287-298

Naegeli O. (1900): Über rotes Knochenmark und Myeloblasten. *Deutsch Med Wochenschr.* 26:287.

Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. (1994): Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2305-2309

Nagata M, Saito K, Tsuchiya K, Sakamoto Y. (2002): Leukotriene D4 upregulates eosinophil adhesion via the cysteinyl leukotriene 1 receptor. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109:676-680.

NCCN-Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2006

Nolan KD, Keagy BA, Ramadan FM, Johnson G Jr, Henke DC (1990): Endothelial cells can synthesize leukotriene B4. *J. Vasc. Surg.* 12:298-304.

Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL (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 MM, 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+ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95:3289-3296.

Reiss TF, Altman LC, Chervinsky P, Bewtra A, Stricker WE, Noonan GP, Kundu S, Zhang J (1996): Effects of montelukast (MK-0476), a new potent cysteinyl leukotriene (LTD4) receptor antagonist, in patients with chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:528-534.

Rether C, Hengstebeck S, Xingkui X, Boehmler 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.

Roland J, Murphy BJ, Ahr B, Robert-Hebmann V, Delauzun V, Nye KE, Devaux C, Biard-Piechacyk M. (2003): Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood.* 101(2):399-406

Samuelsson B (1981): Leukotrienes: a novel group of compounds including SRS-A. *Prog. Lipid Res.* 20:23-30.

Samuelsson B (1983): Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* 220:568-575

Schweitzer KM, Drager AM, van der Valk P, Thijsen SF, Zevenbergen A, Theijsmeijer AP, van der Schoot CE, Langenhuijsen MM (1996): Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am. J. Pathol.* 148:165-175.

Shapiro HM (1988). In Liss AR (eds) *Practical Flow Cytometry*: 353 2nd ed.

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 TA (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.

Stenke L, Lauren L, Reizenstein P, Lindgren JA (1987): Leukotriene production by fresh human bone marrow cells: evidence of altered lipoxygenase activity in chronic myelocytic leukemia. *Exp. Hematol.* 15:203-207.

Stenke L, Sjölander M, Miale TD, Lindgren JA, (1998): Novel enzymatic abnormalities in AML and CML in blast crisis: elevated leucocyte leukotriene C4 synthase activity paralleled by deficient leukotriene biosynthesis from endogenous substrate. *Br. J. Haematol.* 101: 728-736

Takasaki J, Kamohara M, Matsumoto M, Saito T, Sugimoto T, Ohishi T, Ishii H, Ota T, Nishikawa T, Kawai Y, Masuho Y, Isogai T, Suzuki Y, Sugano S, Furuichi K. (2000): The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274:316-322.

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.

To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA (1997): The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89: 2233-2258.

Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ (1982): Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.* 94:325-334.

Vandenbergh PA, Ceuppens JL (1990): Flow cytometric measurement of cytoplasmic free calcium in human peripheral blood T lymphocytes with fluo-3, a new fluorescent calcium indicator. *J. Immunol. Methods* 127:197-205.

Vaughan WP, Civin CI, Weisenburger DD, Karp JE, Graham ML, Sanger WG, Grierson HL, Joshi SS, Burke PJ (1988): Acute leukemia expressing the normal human hematopoietic stem cell membrane glycoprotein CD34 (MY10). *Leukemia* 2:661-666.

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.

Wells SJ, Bray RA, Stempora LL, Farhi DC: CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *Am J Clin Pathol.* 1996 Auf;106(2):192-5

Winter SS, Sweatman JJ, Lawrence MB, Rhoades TH, Hart AL, Larson RS (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 DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL (2001): Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294:1933-1936.

Xue X, Cai Z, Seitz G, Kanz L, Weisel KC, Möhle R (2007): Differential Effects of G Protein-Coupled Receptors on Hematopoietic Progenitor Cell Growth Depend on their Signaling Capacities. *Ann N Y Acad Sci.* 1106:180-9.

Yoshimoto M, Shinohara T, Heike T, Shiota M, Kanatsu-Shinohara M, Nakahata T. (2003): Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicates the presence of a niche. *Exp. Hematol.* 31:733-740.

Young RN (2001): Discovery of montelukast: a once-a-day oral antagonist of leukotriene D4 for the treatment of chronic asthma. *Prog. Med. Chem.* 38:249-277.

Zhang YY, Walker JL, Huang A, Keaney JF, Jr, Clish CB, Serhan CN, Loscalzo J (2002): Expression of 5-lipoxygenase in pulmonary artery endothelial cells. *Biochem. J.* 361(Pt 2):267-276.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003): Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425:836-841.

### 8. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Robert Möhle für die freundliche Überlassung der Doktorarbeit, für die gute und zuverlässige Betreuung sowie für die hilfreichen Anmerkungen bei dem Verfassen der Dissertation.

Bei Dr. Andreas Böhmler bedanke ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Methoden und in die technischen Details sowie für die gute Betreuung bei der Durchführung der Versuche zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Gabriele Seitz bedanken für die gute Unterstützung bei der Durchführung der Doktorarbeit und für die geduldige Beantwortung der vielen Fragen.

Und natürlich bedanke ich mich bei Christina Rether, die immer freundschaftlich mit Rat und Tat beiseite stand sowie für die Unterstützung in allen Phasen und für die gute Zusammenarbeit

## 9. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sandra Hengstebeck

Geburtsdatum: 08.03.1982

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### AUSBILDUNGSDATEN

25/11/2008 Staatsexamen

2007-2008 Praktisches Jahr:

1. Tertial: Chirurgie, Frere Hospital, East London, Südafrika

2. Tertial: Neurologie, Marienhospital, Stuttgart

3. Tertial: Innere Medizin, Diakonieklinikum, Stuttgart

2006 Auslandsstudium: Universidad Alcalá de Henares, Spanien

2004 Physikum

seit 2002 Medizinstudium, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

1992-2001 Graf-Zeppelin-Gymnasium, Friedrichshafen: Abitur 2001

### PRAKTIKA

2006 Famulatur in Neurologie, Hospital Príncipe de Asturias, Spanien

2006 Famulatur in Pädiatrie, Hospital Príncipe de Asturias, Spanien

2005 Famulatur in Gynäkologie, UKT, Tübingen

2004 Famulatur in Innere Medizin, Krankenhaus Holweide, Köln

2003 Pflegepraktikum in Neonatologie, Tübingen

2002 Pflegepraktikum in Chirurgie, Friedrichshafen

2002 Praktikum in der Psychiatrie, Ravensburg

2001-2002 Voluntary service in einem Kinderheim, San Pedro S., Honduras

### WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT

2006 -2007 Mitarbeit als studentische, ungeprüfte Hilfskraft im IHCI - Institute of Healthcare Industries, Tübingen

seit 2004 Dissertation experimentelles Stammzelllabor, Universität Tübingen



