

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die Expression von  
CEACAMs bei humanen Akute-Promyelozytenleukämie - und  
Akute-myeloische-Leukämie - Zelllinien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Till Jacobi

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Reutter  
2. Prof. Dr. med. U. Keilholz  
3. Prof. Dr. W. Zimmermann

**Datum der Promotion: 19.9.2008**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>03</b>
<b>Einleitung .....</b>	<b>06</b>
<b>I. Die akute Promyelozytenleukämie (APL).....</b>	<b>06</b>
Die Hämatopoese .....	06
Die Leukämie .....	07
Akute myeloische Leukämie .....	08
Akute Promyelozytenleukämie .....	08
<b>II. Die Therapie der APL und ihre Wirkungsmechanismen.....</b>	<b>09</b>
Therapieregime der APL .....	09
All-trans-Retinsäure (ATRA) .....	11
Arsentrioxid (As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) .....	13
Curcumin.....	13
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).....	14
Die molekularen Grundlagen der APL.....	15
Die Wirkung von ATRA und As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> auf RAR $\alpha$ /RXR und PML/RAR $\alpha$ .....	16
<b>III. Die Karzinoembryonalen Antigen-verwandten Zelladhäsionsmoleküle (CEACAM).....</b>	<b>17</b>
Die CEA-Proteinfamilie.....	17
Die CEACAMs 1, 3, 6 und 8.....	20
<b>IV. Neutrophile Granulozyten .....</b>	<b>22</b>
<b>Fragestellung .....</b>	<b>23</b>
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
<b>I. Auswirkung von All-trans-Retinsäure (ATRA), GM-CSF und Curcumin auf die Morphologie von NB4 –Zellen .....</b>	<b>24</b>
Dosis-Wirkungsbestimmung von ATRA, GM-CSF und Curcumin .....	25
Veränderungen von Wachstumscharakteristiken, Granularität und Größe der NB-4-Zellen nach ATRA-Behandlung .....	27
Bei der Kombination von ATRA + GM-CSF entstehen Makrophagen .....	28
<b>II. Auswirkungen von ATRA auf Proliferation und Apoptose von NB4 .....</b>	<b>30</b>
Veränderung der Apoptoserate verursacht durch ATRA-Behandlung .....	30

---

Veränderungen von Proliferation und Zellzahl durch ATRA-Exposition .....	31
<b>III. CEACAM-Expression in NB4 bei ATRA-Gabe .....</b>	<b>34</b>
Expression von CEACAMs auf der Zelloberfläche von NB4 nach ATRA-Behandlung .....	34
Die Expressionskinetiken der einzelnen CEACAMs nach ATRA-Behandlung .....	36
Degranulation von mit ATRA differenzierten NB4 .....	38
Transkription von CEACAMs nach ATRA-Behandlung von NB4-Zellen .....	40
Translation von CEACAMs in NB4-Zellen nach ATRA-Behandlung .....	43
<b>IV. Arsenitrioxid (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) beeinflusst die Apoptoserate von NB4 .....</b>	<b>46</b>
Arsenitrioxid steigert die Apoptose in NB4-Zellen, doch induziert keine CD 11b-Expression .....	46
<b>V. Einfluss von ATRA auf die Differenzierung von HL-60-Zellen .....</b>	<b>48</b>
ATRA verändert Proliferationseigenschaften und induziert Apoptose in HL-60-Zellen .....	48
ATRA und DMSO induzieren die Expression von CD11b und CEACAM 1 auf HL-60 .....	50
<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
ATRA führt zu einer Veränderung von Zellgröße, Granularität und Proliferationsverhalten von NB4-Zellen .....	53
Expression von CEACAM 1, 3, 6 und 8 in differenzierten NB 4 nach ATRA-Gabe auf der Zelloberfläche .....	54
Die Expressionskinetiken der CEACAMs unterscheiden sich voneinander .....	54
Die CEACAM-Expression auf Transkriptionsebene unterscheidet sich von der auf Translationsebene .....	55
Glykosylierung von CEACAM 1 .....	56
Kombinationen von ATRA mit GM-CSF und Curcumin .....	56
GM-CSF und ATRA bewirken die Differenzierung von NB4 zu Makrophagen .....	57
CEACAM: Marker für Therapieerfolg und neuer Behandlungsansatz ?.....	58
Arsenitrioxid bewirkt keine Differenzierung von NB4-Zellen .....	59
ATRA und HL-60 .....	59
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>

---

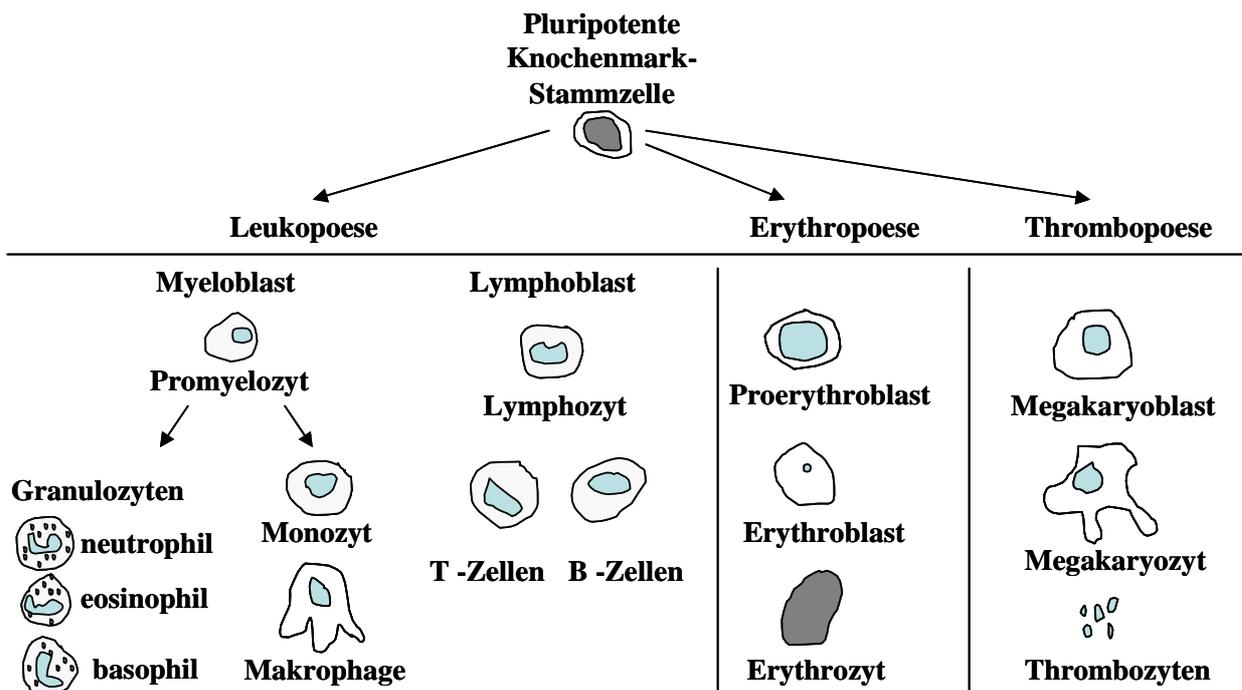
<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>63</b>
Geräte .....	63
RNA Isolierung (Gesamt-RNA) mit RNAzol .....	63
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	64
Reverse Transkription von RNA (Erststrang-cDNA-Synthese) .....	64
PCR (Polymerase-Chain-Reaction) .....	65
PCR-Primer für verschiedene CEACAMs .....	66
Agarosegel-Elektrophorese .....	66
Antikörper .....	67
Indirekte Immunfluoreszenz .....	67
Durchflusszytometrie .....	68
Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie .....	69
Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	70
Immunpräzipitationen .....	70
SDS-PAGE nach Laemmli .....	70
Tricin-SDS-PAGE .....	71
Western-Blot .....	72
Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran .....	72
Zelllinien und allgemeine Zellkulturbedingungen .....	73
Zelllinien.....	73
Allgemeine Kulturbedingungen .....	73
Differenzierung der Zelllinien .....	74
Herstellung von Zelllysaten .....	74
Isolierung von humanen Granulozyten .....	74
Proliferationsassay .....	75
<b>Literatur .....</b>	<b>76</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>92</b>
<b>Danksagung und Erklärung.....</b>	<b>93</b>

## Einleitung

### I. Die akute Promyelozytenleukämie

#### Die Hämatopoese

Unter Hämatopoese versteht man die Bildung und Reifung von Blutzellen. Beim Embryo erfolgt sie im Dottersack, beim Fetus zunächst in der Leber, später in der Milz, während sie nach der Geburt im Wesentlichen im Knochenmark unter dem Einfluss bestimmter Wachstums - faktoren (z. B. Erythropoetin, Zytokine wie GM-CSF) stattfindet. Ausgehend von einer pluri - potenten Stammzelle entstehen über verschiedene Differenzierungsstufen Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten (Abb. 1).



**Abb. 1: Die Hämatopoese.** Schematische Darstellung

Die Leukozyten bestehen aus Lymphozyten (25 %), Monozyten (5 %) und den Zellen der myeloischen Zellreihe, den neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten. Diese entstehen aus ihren Vorläufern den Myeloblasten und Promyelozyten und machen etwa 70 % der Leukozyten aus, wobei sich die Anteile ständig in Abhängigkeit von Ereignissen wie Infektionen

verschieben. Täglich werden dabei Millionen von Leukozyten abgebaut und neu gebildet (u.a. ca.  $10^{11}$  neutrophile Granulozyten) , was vor allem im frühen Lebensalter eine erhöhte Gefahr der Entartung zur Folge hat und somit zu einer hohen Zahl maligner Erkrankungen der Leukopoese, den so genannten Leukämien (bei Kindern ca. 30 % aller malignen Erkrankungen), führt.

### Die Leukämie

Die Leukämie (griechisch für weißes Blut), die 1846 von Rudolf Virchow zum ersten Mal beschrieben wurde, ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems. Es kommt zu einer systematisierten diffusen autonomen Proliferation einer Leukozytensubpopulation bzw. deren Vorstufen. Diese funktionsinsuffizienten Zellen bezeichnet man auch als Blasten. Zunächst verdrängt die Expansion des malignen Zellklons die normale Blutbildung im Knochenmark, was auch Anämien und Thrombozytopenien zur Folge hat, anschließend treten sie vermehrt im peripheren Blut auf und infiltrieren schließlich die Organe wie die Milz, die Leber und Lymphknoten.

Man unterscheidet bei den Leukämien nach der Abstammung des Zellklons und ihrem Verlauf Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Leukämieform im Kindesalter, wohingegen die akute myeloische Leukämie (AML) eher im höheren Lebensalter auftritt.

Leukämieform	Häufigkeit pro Jahr	Häufigkeitsgipfel
Akute lymphatische Leukämie (ALL)	1,5 / 100.000 Einwohner	um das 4. Lj
Akute myeloische Leukämie (AML)	2,5 / 100.000 Einwohner	60. Lj
Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	3 / 100.000 Einwohner	60. Lj
Chronische myeloische Leukämie (CML)	1 / 100.000 Einwohner	50. – 60. Lj

**Tab. 1. : Darstellung der verschiedenen Leukämieformen.** Lj = Lebensjahr

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

Bei der AML handelt es sich um eine seltene Erkrankung des Blutes, bei der es zu malignen Neoplasien der hämatopoetischen Zellen der myeloischen Zellreihe (Endprodukte sind Granulozyten und Makrophagen) auf Kosten der normalen Hämatopoese kommt. Es entwickelt sich eine diffuse und autonome Vermehrung unreifer Vorläuferzellen und es entsteht ein Mangel an funktionsfähigen Zellen, welches in erhöhte Infektanfälligkeit, Blutungsneigung und Organinfiltrationen mit entsprechenden Beschwerden mündet. Eine in der Forschung häufig verwendet, gut etablierte Zelllinie sind HL-60-Zellen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Sie wurden aus dem peripheren Blut einer 35jährigen Frau mit AML gewonnen (AML FAB M2, 1976)

Ätiologisch finden sich neben Spontanmutationen häufig Knochenmarksschäden, vor allem durch Benzol und Zytostatika und genetische Faktoren wie die Trisomie 21 (Down-Syndrom) und das Klinefelter-Syndrom (XXY-Syndrom), aber auch Folgeerkrankung nach myelodysplastischem Syndrom, aplastischer Anämie oder myeloproliferativen Erkrankungen .

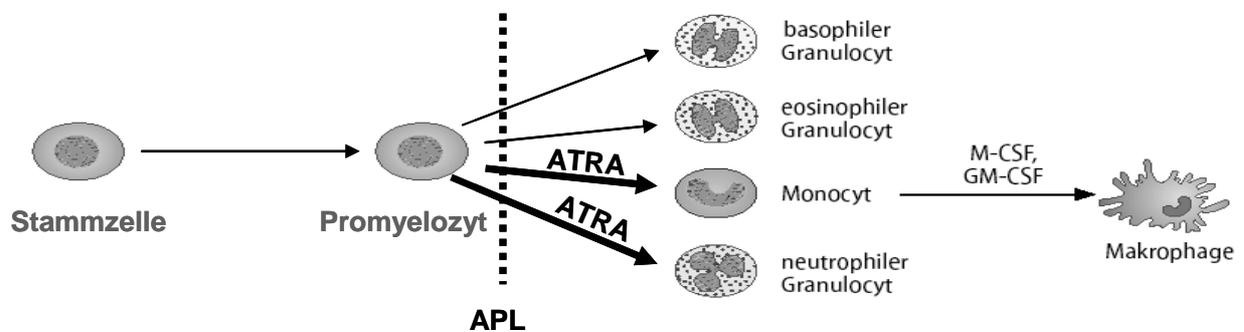
Die AML ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters (meist über 60 Lebensjahren) und besteht aus mehreren Untergruppen, die sich hinsichtlich ihrer Morphologie, Genetik und Zytochemie voneinander unterscheiden und dementsprechend auch unterschiedliche Prognosen und Therapieansätze nach sich ziehen.

### **Akute Promyelozytenleukämie (APL)**

Eine dieser Untergruppen der akuten myeloischen Leukämien (AML) ist die APL, die 1957 das erste Mal von Leif Hillestad beschrieben wurde und auch als AML - FAB -M3 bezeichnet wird (FAB steht für French-American-British-Group, die die AML-Subgruppen nach morphologischen Gesichtspunkten einteilt), die etwa 10-15 % aller AML-Fälle ausmacht. Entgegen den anderen AML-Subgruppen, bei denen der Altersgipfel bei 70 Lebensjahren anzusiedeln ist, tritt die APL in der Regel im mittleren Erwachsenenalter (um das 40. Lebensjahr) auf. Sie gilt als die am besten therapierbare Leukämieform.

Bei der APL kommt es auf Grund eines Defektes in der Zelldifferenzierung zu einer ungehemmten Vermehrung von Promyelozyten, einem unreifen Vorläufer von Makrophagen und Granulozyten (Abb. 2). Die Promyelozyten sind charakteristisch granuliert, Peroxidase - positiv und weisen die AML-typischen Auerstäbchen auf, welche jedoch in den APL-Zellen häufig gebündelt auftreten (so genannte faggots oder Faggot-Zellen). Die in dieser Arbeit

verwendete Zelllinie sind die NB4-Zellen, die aus dem Knochenmark einer 23jährigen Frau mit APL-Rezidiv gewonnen wurde (1989) und die charakteristische Translokation t(15;17) tragen. Neben dieser spezifischen Genmutation der betroffenen Zellen (siehe unten) und der Vermehrung von Promyelozyten wegen des Differenzierungsblocks kommt es bei der APL als drittes Charakteristikum sehr häufig zu disseminierter intravasaler Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie (disseminated intravascular coagulation, kurz DIC) und sekundärer Hyperfibrinolyse und Fibrinogenopenie. Unter der DIC versteht man eine überschießende Aktivierung des Gerinnungssystems mit entsprechender Gegenreaktion, was ausgeprägte hämorrhagische Diathesen und Mikroembolien der Endstrombahn mit Zirkulationsstörungen und Organversagen (Schocklunge u.a.) zur Folge haben kann.



**Abb. 2: Defekt in der Differenzierung der Zellen der myeloischen Zellreihe.** Auf Grund der Translokation t(15;17) kommt es zu einer Unterbrechung der Differenzierung der promyeloischen Zellen auf der unreifen Vorstufe der Promyelozyten. Durch den therapeutischen Ansatz von ATRA kann eine Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten erreicht werden

## II. Die Therapie der APL

### Therapieregime der APL

So unterschiedlich die verschiedenen Leukämietypen sind, so unterschiedlich sind auch die Therapieansätze. Die APL gilt seit der Verwendung von ATRA mit Anthrazyklinen als der am besten heilbare Subtyp der AML. Hauptziel des ATRA-Einsatzes ist es, den Differenzierungsblock aufzuheben und die Blasten zu Granulozyten zu differenzieren, die dann kontrolliert in Apoptose gehen. Durch den Einsatz von ATRA kann eine komplette Remission

von über 90% und 5-Jahres-Überlebensraten von 70-80% erzielt werden, bei alleiniger Chemotherapie ohne ATRA lag die Rate der kompletten Remission bei 60%, die 5-Jahres-Überlebensrate sogar nur bei 25%.

Zum Einsatz kommt ATRA in der Induktionsphase, in der versucht wird, eine komplette Remission zu erreichen. Eine komplette Remission liegt dann vor, wenn keine Blasten mehr im peripheren Blut nachweisbar sind, die Regeneration der Hämatopoese mit Thrombozyten  $> 100.000 / \mu\text{l}$  und Neutrophilen  $> 1.000 / \mu\text{l}$  stattgefunden hat, der Blastenanteil im Knochenmark unter 5% gedrückt werden kann und des Weiteren keine extramedullären Manifestation oder transfusionsbedürftigen Anämien zu finden sind.

Es schließt sich danach eine Konsolidierungsphase an, in der der erzielte Effekt noch einmal verstärkt wird und die einer weiteren Induktionstherapie entspricht, ehe dann die Erhaltungstherapie einsetzt (bei erzielter kompletter Remission), deren Ziel die Verhinderung eines Rezidivs und die Stabilisierung des erreichten Zustandes ist und die meist niedriger dosiert wird.

ATRA wird in der Induktionsphase verwendet (in Kombination mit Dexamethason zur Prophylaxe von unerwünschten Nebenwirkungen). Da es jedoch lediglich eine morphologischen Remission bewirkt und in der Regel noch die Fusionstranskripte der Translokation t(15;17) in der PCR nachzuweisen sind, schließt sich entweder unmittelbar eine Chemotherapie an oder wird bereits gleichzeitig verabreicht. Nachdem die Remission erreicht ist, wird eine Konsolidierungstherapie mit Anthrazyklinen und Cytarabin eingeleitet.

### **Behandlungsprotokoll der APL nach der GIMEMA-AIEOP-EORTC-Gruppe**

#### **1. Induktion**

ATRA            45 mg/m<sup>2</sup> tägl., in 2 Tagesdosen aufgeteilt, oral Tag 1-30  
                  längstens bis zur Normalisierung des Knochenmarkes

Idarubicin     12 mg/m<sup>2</sup> i.v. Tag 2,4,6,8

#### **2. Konsolidierung (3 Zyklen)**

Cytosin-Arabinosid	1 g/m <sup>2</sup> Infusion über 6 h	Tag 1-4
Idarubicin	5 mg/m <sup>2</sup> 3 h nach Ende von AraC	Tag 1-4
Mitoxantron	10 mg/m <sup>2</sup>	Tag 1-5
Etoposid	100 mg/m <sup>2</sup> 12 h nach Start v. Mitoxantron	Tag 1-5

Cytosin-Arabinosid	150 mg/m <sup>2</sup> alle 8 h subkutan	Tag 1-5
6-Thioguanin	70 mg/m <sup>2</sup> alle 8 h oral	Tag 1-5

**3. Erhaltungstherapie, wenn PCR-negativ. Falls PCR-positiv:  
Knochenmarkstransplantation.**

**Randomisiert:**

6-Mercaptopurin	90 mg/m <sup>2</sup> täglich, oral
Methotrexat	15 mg/m <sup>2</sup> 1 x pro Woche i.m.

**oder:**

ATRA	45 mg/m <sup>2</sup> für 2 Jahre alle 3 Monate je Tag Tag 1-15
------	---

**oder:**

Kombination von 6-MP/MTX und ATRA

**oder:**

keine Therapie

Arsentrioxid gilt dabei als Reservetherapeutikum, wenn die Induktionstherapie oder Standardtherapie versagen, z.B. dann, wenn eine ATRA-Resistenz der APL-Zellen vorliegt. Man spricht in diesem Falle von Salvagetherapie.

Es wird dann täglich in einer Dosierung von 0,15 mg / kg Körpergewicht intravenös infundiert, bis eine komplette Remission erreicht ist, muss allerdings bei ausbleibendem Therapieerfolg spätestens am fünfzigsten Tag abgesetzt werden. In der Konsolidierungsphase beträgt die Dosis ebenfalls 0,15 mg/kg Körpergewicht und wird täglich an fünf aufeinander folgenden Tagen gegeben; gefolgt von 2 Tagen Pause für eine Dauer von 5 Wochen.

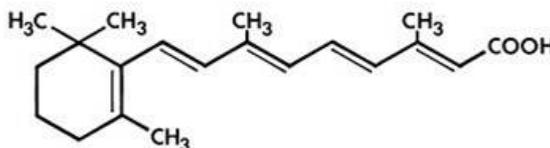
**All-trans-Retinsäure (ATRA)**

ATRA (Abb. 3), auch bekannt als Vitamin-A-Säure oder Tretinoin, gehört zu den nicht-aromatischen Retinoiden (Retinoide der 1. Generation), die vom Retinol, dem so genannten Vitamin A abstammen, welches u. a. eine bedeutende Rolle im Sehvorgang spielt.

**Abb. 3: Strukturformel von ATRA**

IUPAC-Name: 3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl) nona-2,4,6,8-tetraensäure

Summenformel  $C_{20}H_{28}O_2$ , Molekulargewicht 300,435g/mol



ATRA kommt physiologischer Weise in einer Konzentration von  $10^{-8}$  -  $10^{-9}$  M im menschlichen Körper vor und reguliert dabei wenigstens 169 Gene (Zhen-Yi Wang, 2003), die u.a. für Transkriptionsfaktoren und Proteine, die die Zellzyklusregulation und Apoptose beeinflussen, kodieren. Es wird in Form eines gelben Pulvers geliefert, ist lichtempfindlich und gilt bei systemischer Aufnahme als teratogen (fruchtschädigend). In der Therapie der APL kann sie das Retinsäure-Syndrom induzieren. Dabei kommt es bei 25% der ATRA-behandelten Patienten innerhalb der ersten 3 Wochen zu einer lebensbedrohlichen Reaktion mit Fieber, raschem Anstieg der Leukozyten, Pleura- und Perikardergüssen und Herz- und Nierenversagen mit einer Letalität von 10 %. Die Behandlung erfolgt mit hohen Dosen von Dexamethason. Dies wird auch zur Prophylaxe verwendet und senkt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens auf unter 15% (und die Letalität auf 1 %).

ATRA wird neben der Akne-Therapie in topischer Form systemisch in der Induktionsphase der Therapie der APL verwendet, wo es zu einer Remission der malignen Zellen dient (siehe Therapie der APL). ATRA überwindet dabei die Differenzierungsblockade der Promyelozyten durch Binden an den RXR/RAR $\alpha$ - Rezeptorkomplex, der über eine Regulation der Transkription die Differenzierung der malignen Zellen hin zu reifen Granulozyten reguliert (Nakamaki et al., 1989). Eine schwerwiegende Komplikation der ATRA-Therapie stellt die Entwicklung einer Resistenz der APL-Zellen gegen ATRA dar, die in der Regel bei Rezidivpatienten auftritt (Nason-Buchenal et al., 1998). Die genauen Mechanismen sind derzeit noch nicht bekannt, es werden jedoch Mutationen im PML/RAR $\alpha$ -Fusionsprotein vermutet, so dass ATRA nicht mehr binden kann und damit wirkungslos bleibt (Shao et al., 1997).

Es gibt mittlerweile viel versprechende Versuche, ATRA auch für die AML zu nutzen. In ersten Studien des Kompetenznetzes Leukämien wird von einer Steigerung der Remissionsrate um mehr als 13 % gesprochen.

### **Arsentrioxid (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)**

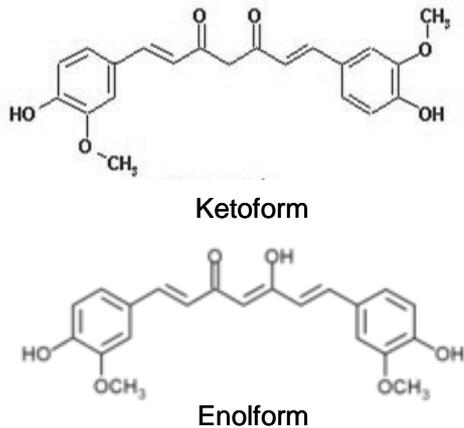
Arsentrioxid oder Arsenik ist in der Medizin die wichtigste chemische Verbindung des Arsens und liegt in Form geruchslosen, weißen Pulvers vor. Neben seiner Bedeutung als Medikament bei Hautkrankheiten (Psoriasis) und der Behandlung der APL, findet es auch in anderen Bereichen Anwendung, z.B. als Insekten- und Nagetiergift.

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> stellt ein starkes Gift da, welches karzinogen und teratogen wirkt und vor allem oral bereits in Dosen unter 0,1 g tödlich wirken kann und schon nach einigen Stunden mit starken Schmerzen, Erbrechen und Diarrhöen imponiert. In der Folge treten Seh- und Bewusstseinsstörungen sowie Krämpfe auf. Als Medikament wird es unter ärztlicher Aufsicht intravenös verabreicht um, unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Neben den genannten Vergiftungserscheinungen sind weitere Nebenwirkungen Hypokaliämie, Hyperglykämie, Thrombo- und Neutropenie, Leukozytose und als Folge der Elektrolytentgleisungen Beeinträchtigungen der Herzfähigkeit wie Verlängerung der QT-Zeit mit Torsades de Pointes und AV- Blöcke. In einem guten Viertel der Patienten entsteht ein dem Retinsäuresyndrom sehr ähnliches Syndrom, dass ebenfalls mit Dexamethason behandelt wird (siehe oben).

Arsenik wird heute bei Rezidiven oder therapieresistenter APL als so genannte Salvagetherapie unter dem Namen Trisenox<sup>®</sup> verabreicht (siehe Therapie der APL) und gilt derzeit als einzige Alternative zur Knochenmarktransplantation. In einer Studie wurde in 85 % der Patienten eine Remission erzielt und eine 18monatige Überlebensrate von 66% erreicht. Im Gegensatz zu ATRA kann Arsentrioxid auch eine Remission auf molekularer Ebene induzieren (Zheng et al., 2007), die genauen Wirkmechanismen sind jedoch nicht bekannt (Zhou et al., 2005).

### **Curcumin**

Curcumin (Abb. 4) stellt einen gelben Farbstoff dar, der Bestandteil der Gelbwurzel (*Curcuma longa* oder auch Tumeric) ist, jedoch auch synthetisch hergestellt werden kann. Er findet als Lebensmittelfarbstoff E100 und als Gewürz Verwendung, weist jedoch zusätzlich noch anti-inflammatorische und anti-oxidative Eigenschaften auf. Es blockt dabei nicht nur die Synthese der Eikosanoide (Entzündungsmarker, z.B. Leukotriene), sondern wirkt auch als freier Radikalfänger und Enzyminhibitor (z.B. Cytochrom 450).



**Abb. 4: Darstellung der Tautomere des Curcumins**

Desweiteren ist Curcumin bekannt für seine anti-karzinogene Wirkung, indem es ohne gesunde Zellen zu belasten, in Tumorzellen Apoptose induziert (Song et al., 2005). Eine Rolle im Zusammenhang mit der Behandlung von Alzheimer wird diskutiert, da Curcumin in der Lage zu sein scheint, Amyloid-Plaques zu zerstören (Yang et al., 2005).

Außer leichten Magenverstimmungen und einer Verstärkung des Gallenflusses sind keine Nebenwirkungen im menschlichen Körper bekannt.

Der Wirkungsmechanismus des Curcumins beruht auf einer Hemmung der Histondeazetylase in NB4-Zellen, wodurch die Proliferation dieser APL-Zelllinie gehemmt wird (Li et al., 2005).

### **Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)**

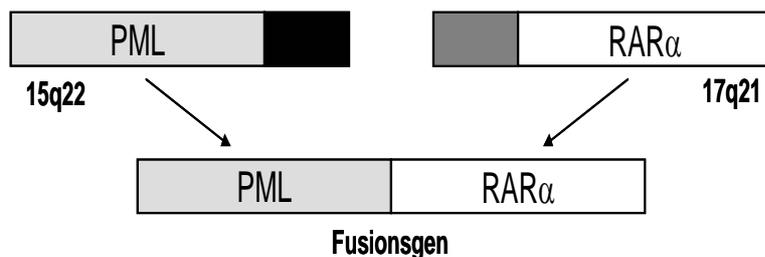
GM-CSF ist ein natürlicherweise im menschlichen Körper vorkommendes Protein, welches von Makrophagen und Granulozyten sezerniert wird und eine Differenzierung der pluripotenten Stammzellen der Hämatopoese in Richtung der myeloischen Zellreihe (Granulozyten, Makrophagen) bewirkt. Kommt es zu Infektionen oder liegt ein Mangel an oben genannten Zellen vor, so wird das Zytokin vermehrt sezerniert. Die Medizin macht sich diese Wirkung zunutze, wenn es z.B. nach Knochenmarktransplantationen oder Chemotherapien zu Granulozytopenien kommt. Nebenwirkungen sind dabei Knochenschmerzen, Fieber, allergische Reaktionen und Gewichtszunahme.

Auch im Rahmen der APL-Therapie wird GM-CSF genutzt, indem es einerseits die ATRA – Wirkung verstärkt (Hsu et al., 1999), andererseits den bereits angesprochenen Granulozytopenie entgegen wirkt. ATRA steigert dabei die GM-CSF-Rezeptorzahl (Noel et al., 2004). Außerdem

verzögert GM-CSF die Apoptose von Granulozyten in vitro (Wolach et al., 2007) und soll in Kombination mit ATRA in der Lage sein, auch die seltene Translokation t(11;17), bei der die alleinige ATRA- Therapie versagt, behandeln zu können (Jansen et al., 1999 ).

### Die molekularen Grundlagen der APL

Der APL liegt eine Genmutation der Promyelozyten, eine so genannte Translokation, zu Grunde. Unter einer Translokation versteht man in der Genetik einen Austausch von Chromosomen oder Chromosomenabschnitten, die innerhalb des Chromosomenbestandes von ihrer ursprünglichen Position auf eine andere verlagert werden. Die meisten promyelozytischen Blasten (über 90 % der Fälle) tragen eine spezifische reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17, t(15;17), genauer der Genabschnitte 15q22 und 17q21). Dabei steht die erste Zahl für das Chromosom, die zweite für die Chromosomenbande und der Buchstabe für den Chromosomenarm – q für lang, p für kurz. Dies führt zu einem bestimmten Fusionsgen, dem Promyelozytic Leukemia (PML)/Retinoic Acid Receptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ )–Hybridgen (Abb. 5). Die anderen Genmutationen wie etwa t(11;17) sind sehr selten und haben eine deutlich schlechtere Prognose, da sich ihre Behandlung insgesamt schwieriger gestaltet.



**Abb. 5: Translokation der Genabschnitte 15q22 und 17q21.** Die beiden Abschnitte bilden dabei ein Fusionsgen, von dem wiederum das neue,

der APL zu Grunde liegende Fusionsprotein PML / RAR $\alpha$  kodiert wird

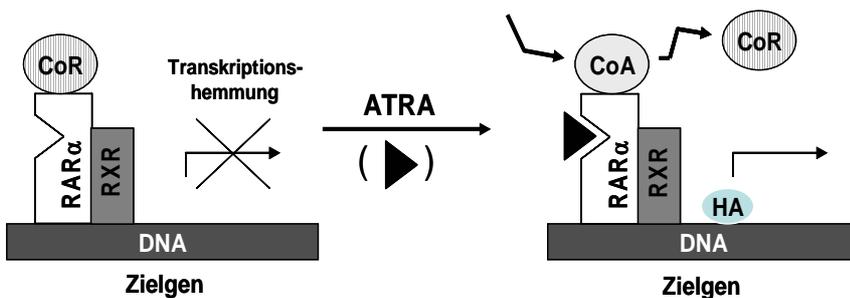
Im Falle der t(15;17) Translokation wird nun ein neues Fusionsprotein translatiert, welches mit der Funktion des normalen RAR $\alpha$ -Proteins interferiert, wobei sich das Fusionsprotein als dominant gegenüber dem Wildtyp-Protein erweist. Das RAR $\alpha$ -Protein gehört zu der Gruppe der Liganden-induzierbaren Transkriptionsfaktoren, bei denen es sich um Proteine handelt, die nach

Aktivierung durch bestimmte Aktivatoren (die Liganden, in diesem Falle ATRA) z.B. an die DNA binden und dadurch die Transkription in Gang setzen bzw. verstärken oder ihrerseits für die Transkription wichtige Faktoren aktivieren und damit dafür sorgen, dass die entsprechenden Abschnitte in RNA umgeschrieben (transkribiert) werden können, aus der im Zuge der Translation Proteine hergestellt werden.

### Die Wirkung von ATRA und $As_2O_3$ auf $RAR\alpha/RXR$ und $PML/RAR\alpha$

Um seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben zu können, bildet  $RAR\alpha$  mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ein Heterodimer, welches von Retinsäure (all-trans retinoic acid, ATRA) aktiviert werden kann (Abb. 6). Beide, sowohl RXR als auch  $RAR\alpha$  gehören zu der Subgruppe der Nukleus-Rezeptor-Familie, zu der u. a. auch die Steroidrezeptoren und die Thyroidhormonrezeptoren gehören und bestehen jeweils noch einmal aus 3 Subtypen ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), welche die Expression von Zielgenen regulieren und im Zellkern ihre Wirksamkeit entfalten.

Der durch ATRA aktivierte Transkriptionsfaktor  $RXR/RAR\alpha$  rekrutiert einen Aktivationsfaktor, der wiederum die Histone azetyliert, welche kleine DNA-Organisationseinheiten darstellen. Damit startet er die Transkription und sorgt so u.a. für die Differenzierung der Zellen der myeloischen Zellreihe.



**Abb. 6: ATRA-Wirkung an den Transkriptionsfaktoren  $RAR\alpha/RXR$ .**

In Abwesenheit von ATRA rekrutieren die Transkriptionsfaktoren den Transkriptions-Co-Repressor (CoR), der u.a. über die Deazetylierung der Histone für eine Transkriptionshemmung sorgt. Bindet ATRA an die Faktoren, dann wird der CoR freigegeben und ein Aktivationsfaktor (CoA) rekrutiert, der wiederum eine Histonazetylierung (HA) bewirkt und damit die Transkriptionsblockade aufhebt.

Das  $PML/RAR\alpha$ -Fusionsprotein bindet nun jedoch entweder allein oder als Heterodimer mit RXR an die Zielgene von  $RXR/RAR\alpha$ , was zu einer Deazetylierung der Histone und damit über

die Bildung von Heterochromatin zu einer Unterdrückung der Transkription führt. Dadurch kommt es u.a. zu einem Stopp der Zelldifferenzierung und einer Hemmung der Apoptose. Da das onkogene Fusionsprotein (PML/RAR $\alpha$ ) diese Interaktion nun auch in Anwesenheit des Liganden (bei physiologischer Konzentration) aufrechterhält, kommt es zu einer konstitutiven Unterdrückung der RAR $\alpha$ -regulierten Gene. Dies hat die transkriptionell unterdrückten Differenzierungs-Blockade und somit die gestörte Zellreifung der Promyelozyten zur Folge.

Wird im Zuge der Therapie eine gegenüber der physiologischen Menge erhöhte Konzentration von ATRA verabreicht, so bindet dieses an das PML/RAR $\alpha$ -Protein und sorgt dadurch für eine Änderung in der Konfiguration des Proteins, welches die Aktivierung der Transkription wieder möglich macht. Die Blasten können sich nun wieder differenzieren und auch die weitere Hämatopoese ist ungestört möglich. Desweiteren kommt es zu einer Hochregulierung von RAR $\alpha$ , einer Runterregulierung von PML/RAR $\alpha$ , einer Reaktivierung von RXR und einer Reihe weiterer Effekte.

Die genauen Wirkungsmechanismen von As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ist hingegen noch nicht geklärt, den Hauptangriffspunkt bildet jedoch der PML-Teil von PML/RAR $\alpha$ , wobei das pathologische Fusionsprotein vermutlich direkt zerstört wird. Im Gegensatz zu ATRA bewirkt As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nur eine partielle Differenzierung der Leukämiezellen und aktiviert des Weiteren Caspasen – Proteasen, die Peptidbindungen c-terminal von Aspartat spalten –, die die Apoptose vorantreiben.

### **III. Die Karzinoembryonalen Antigen-verwandten Zell-Adhäsionsmoleküle (CEACAM)**

#### **Die CEA-Proteinfamilie**

Das 1965 von Gold und Freedman entdeckte *Carcinoembryonic Antigen* (CEA) – nach neuerer Nomenklatur als CEACAM5 bezeichnet – ist Namensgeber der Familie der CEA-verwandten Zell-Adhäsionsmoleküle (CEACAMs, *Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecules*), da die Mitglieder der CEA-Familie in verschiedenen Spezies (Ratte, Maus, Mensch) mit unterschiedlichen Namen bezeichnet wurden (BGP, C-CAM, CD66 etc.) wurde deren Nomenklatur der Übersicht halber 1999 reformiert. Diese neue Nomenklatur findet in der hier vorliegenden Arbeit Verwendung (Beauchemin et al., 1999). CEACAM1 ist das Gründermole-

kül, da es im Gegensatz zu den meisten anderen CEACAM-Familienmitgliedern nicht nur im Menschen, sondern auch in weiteren Spezies wie Ratte, Maus, Kuh, Hund und Affe vorkommt. Die für die CEACAMs kodierenden Gene liegen beim Menschen alle auf Chromosom 19q13.2. Zudem gibt es von CEACAM1 und CEACAM3 verschiedene Spleiß-Varianten. Diese entstehen durch alternatives Spleißen, d.h. aus ein und demselben Primärtransskript können durch unterschiedliches Schneiden im Transkriptionsvorgang verschieden mRNAs erzeugt werden. Dabei können zahlreiche CEACAM-Varianten entstehen (z.B. kurze und lange Isoformen des CEACAM 1, Abb. 7).

Die Mitglieder der CEA-Familie gehören zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie der zellulären Oberflächenproteine, da sie einen den Immunglobulinen (so genannte Antikörper) vergleichbaren Aufbau besitzen (Abb. 7). Derzeit sind beim Menschen 12 Mitglieder bekannt: 7 Mitglieder der CEACAM-Familie sind transmembranär gebunden, 4 über Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI) mit der Zellmembran verbunden und eines kommt in löslicher Form vor.

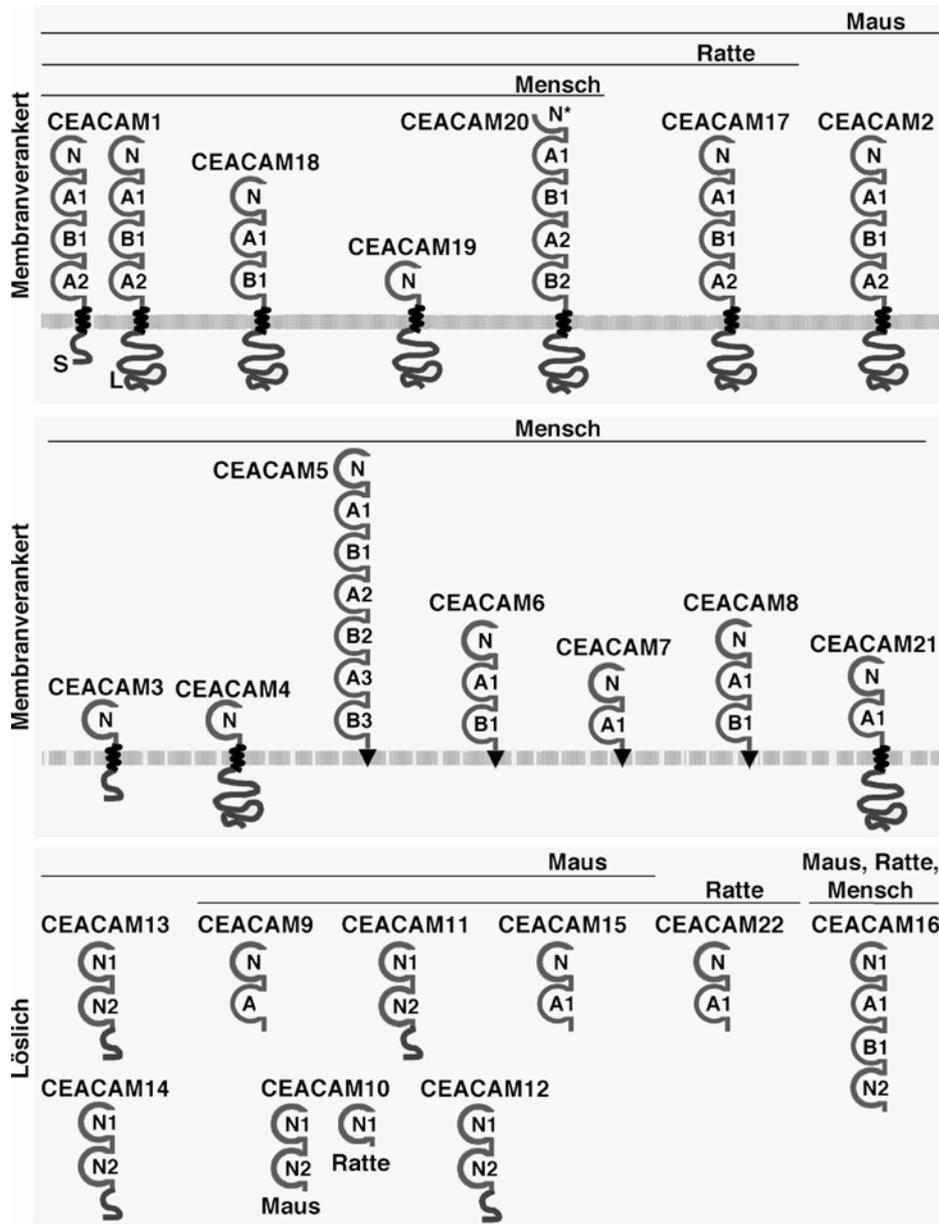
Allen CEACAMs liegt ein von der Struktur her ähnlicher Aufbau zu Grunde: die extrazelluläre Domäne setzt sich aus Ig V und Ig C zusammen. Ig V steht für die Abschnitte des CEACAMs, die eine Homologie zu dem variablen Teil des klassischen Igs aufweisen, welcher im Antikörper die Antigenbindungsstellen darstellt; Ig C zeigt sich homolog zum konstanten Teil des Igs, der z.B. der Opsonierung dient. Die Ig V-Domänen bestehen aus 108 bis 110 Aminosäuren und sind damit etwas größer als die nur 86 bis 96 Aminosäuren umfassenden Ig C- Domänen, die sich wiederum noch einmal in C1- oder A-Typ, der mehr dem klassischen Ig-Typ entspricht und C2- oder B-Typ aufteilen, welcher vom Faltungsmuster her zwischen dem V-Typ und C1/A liegt (Bork et al., 1994). Jedes CEACAM verfügt über eine variable und 0 bis 6 konstante Domänen.

Die CEACAMs sind außerdem hochglykosyliert. Es handelt sich bei der Glykosylierung um eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, denn die durch die angehefteten Kohlenhydratgruppen entstehenden hoch spezifischen Glykosylierungsmuster verändern und beeinflussen die Proteinkonformation und die Affinität zu bestimmten Bindungspartnern und Vorgänge der Signaltransduktion maßgeblich. Die Mehrzahl aller extrazellulär exprimierten eukaryontischen Proteine ist daher glykosyliert. Dabei unterscheiden sich die Glykosylierungsmuster der einzelnen CEACAMs auch in Abhängigkeit vom Ort ihrer Expression, CEACAM1 ist z. B. auf Granulozyten wesentlich höher glykosyliert als auf Epithelien (Horst et al., 2004, Singer und Lucka 2005).

Die Expressionsorte der CEACAMs sind dabei ausgesprochen heterogen, so wird CEACAM1 auf Granulozyten, Endothelien und Epithelien exprimiert, während CEACAM3 und 8

ausschließlich auf Granulozyten, 5 und 7 nur auf Epithel und 6 auf Granulozyten und Epithelien vorkommen. Bei CEACAM4 ist das Expressionsprofil noch unbekannt.

Interessant für die Klinik wurden CEACAMs seit der Etablierung von CEACAM5, welches im klinischen Alltag besser als CEA bekannt ist und als Tumormarker bei Kolon- und Bronchialkarzinomen erhöht ist, wobei es zur Verlaufs- und Rezidivkontrolle dient.



**Abb. 7:**  
**Schematische Darstellung der Mitglieder der CEA-Familie.**

N: Ig-ähnliche Domäne des variablen Typs.

A und B: Ig-ähnliche Domäne des konstanten Typs.

Die schwarzen Dreiecke stellen GPI-Anker dar. L und S stehen für die lange und die kurze Spleißvariante von CEACAM1.

CEACAM20 besitzt eine verkürzte N-Domäne. Von den anderen Proteinen bestehen ebenfalls Spleißvarianten, die hier nicht dargestellt sind.

Die CEACAMs 12 bis 20 sind bisher nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen worden.

Aber auch andere CEACAMs geraten wegen ihrer prognostischen Verwendbarkeit in den Fokus der Forschung. Beim kolorektalen Karzinom ist z.B. CEACAM1 herunterreguliert und CEACAM6 erhöht (Nollau et al., 1997). Ein erhöhtes CEACAM1 bedeutet eine verschlechterte Prognose mit erhöhtem Metastasenrisiko beim kleinzelligen Lungenkarzinom (Laack et al., 2002; Sienel et al., 2003) und dem malignen Melanom (Thies et al., 2002).

CEACAMs sind nicht nur immunregulatorisch aktiv, sondern erfüllen weitere wichtige Funktionen im Rahmen der Zellorganisation, indem sie Differenzierung und Wachstum steuern. Die Ausübung dieser vielfältigen Funktionen beruht auf der Fähigkeit der CEACAMs, homo- und heterophile Bindungen, also Bindungen mit gleichen oder mit anderen CEACAMs, eingehen zu können. Eine detaillierte Beschreibung der Funktionen und der Signaltransduktion sind in den folgenden Übersichtsartikeln zu finden: Öbrink (1997), Singer und Lucka (2005), Gray-Owen und Blumberg (2006) und Kuespert et al. (2006).

Darüber hinaus sind CEACAMs in die Signaltransduktion involviert, ein Prozess, bei dem die Zellen durch die Übermittlung äußerer Reize in das Zellinnere mit Änderung ihres Stoffwechsels reagieren können.

CEACAMs gehen auch Pathogenbindungen ein, wobei die sie als Rezeptoren für Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Salmonella typhi* (Leusch et al., 1991; Sauter et al., 1991), *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* und *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* (Hauck et al., 2006) dienen.

### **Die CEACAMs 1, 3, 6 und 8**

*CEACAM1* kodiert verschiedene Isoformen, die sich u. a. durch die Länge ihrer zytoplasmatischen Anteile (lange Form human 71 Aminosäuren, kurze Form 10 Aminosäuren) unterscheiden. Es handelt sich bei CEACAM1 um ein transmembranäres Protein mit einer variablen und 3 bis 4 konstanten Domänen. Es weist innerhalb der CEACAM-Familie das breiteste Expressionsmuster auf, denn es ist nicht nur in Leukozyten, sondern auch auf Epithelien und Endothelien zu finden, wobei die Proteingröße in Granulozyten bei 150-160 kD, in Epithelien und Endothelien jedoch wegen geringerer Glykosylierung lediglich bei 120 kD liegt.

Es kann mit CEACAM1, 5 und 6 Bindungen eingehen und sein zytoplasmatischer Anteil interagiert mit Bestandteilen des Zytoskeletts und spielt dadurch eine Rolle in der Signaltransduktion und der Zellmigration (Klaile et al., 2005, Da Silva-Azevedo et al., 1999). Über zwei ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), die per Phosphorylierung

aktiviert werden, wird eine inhibitorische Wirkung innerhalb der Zelle erzielt. CEACAM1 ist Bestandteil des Migrationsprozesses von T- und B-Zellen (Khan et al., 1993; Kammerer et al., 2001) und moduliert die Angiogenese als eine Art Wachstumsfaktor (Ergün et al., 2000). Eine Verwicklung in die Tumorprogression ist sehr wahrscheinlich, denn es wird in erhöhten Konzentrationen an der Invasionsfront u. a. des Magenkarzinoms und des multiplen Melanoms gefunden (Thies et al., 2002). Bei einigen malignen Neoplasien ist es im Gegensatz dazu auch herunterreguliert, z.B. in Kolon -, Prostata – und Mammakarzinom (Horst et al., 2004), wo es die Funktion eines Tumorsuppressors einzunehmen scheint.

*CEACAM3* weist von den auf Granulozyten exprimierten CEACAMs mit einer Größe von lediglich 30 kD die kleinste Größe auf. Es besteht aus einer variablen Domäne und besitzt keine konstante Domäne. Es ist wie CEACAM1 ebenfalls transmembranär verankert, wird jedoch im Gegensatz zu diesem nicht auf Endothelien oder Epithelien, sondern nur auf Granulozyten gefunden, wo es aber nicht in den Granula gespeichert wird (Singer et al., 2002). Es geht nach bisherigen Kenntnissen keine Bindungen mit anderen CEACAMs ein (Horst et al., 2004).

Es spielt jedoch wie CEACAM1 eine Rolle in der Signaltransduktion, wo es über ein ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) in seinem zytoplasmatischem Anteil verfügt, welches aktivierend auf Vorgänge in der Zelle wirkt. Es scheint auch an der Phagozytose von Bakterien beteiligt zu sein (Schmitter et al., 2004; Schmitter et al., 2007), besonders auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten (Sarantis et al. 2007).

*CEACAM6*, dessen eine variable und zwei konstante Domänen GPI-verankert sind, weist wiederum ein dem CEACAM1 ähnlich breites Expressionsmuster auf, wird jedoch nicht in Endothelien gefunden. Es hat eine Größe von 90-100 kD und kann Bindungen mit sich selbst, mit CEACAM1 und 8 eingehen.

Es scheint wie CEACAM1 an der Progression und Entstehung maligner Geschehen beteiligt zu sein (Duxbury et al., 2004) und ist über die Bindung mit CEACAM1 an der Signaltransduktion beteiligt (Lucka et al., 2003).

*CEACAM8*, welches ebenfalls einen GPI-Anker besitzt, verfügt neben seiner variablen Domäne noch über zwei konstante Domänen und weist somit annähernd die gleiche Größe wie CEACAM6 auf (90-100 kD). Es wird auf Leukozyten exprimiert und kann mit CEACAM6 heterogene Bindungen eingehen (Oikawa et al., 1991).

## IV. Neutrophile Granulozyten

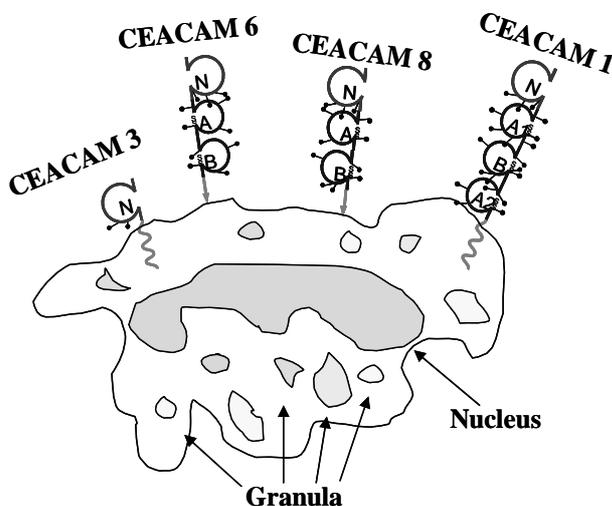
Die neutrophilen Granulozyten (Abb. 8) stellen mit etwa 50 bis 70% den größten Anteil an Leukozyten im Differentialblutbild. Der Mensch besitzt etwa 9.000 neutrophile Granulozyten je  $\mu\text{l}$  Blut. Sie haben eine mittlere Verweildauer von 6 bis 8 Stunden im Blut und können anhand ihrer Kernform – junge Granulozyten sind stabkernig, alte segmentkernig – altersmäßig unterschieden werden.

Sie sind ein wichtiger Teil des angeborenen, unspezifischen Abwehrsystems des Körpers, in dem ihre Aufgabe darin besteht, Infektionen (in der Regel bakteriellen Ursprungs) durch Phagozytose und Exozytose zu bekämpfen. Bei der Exozytose schütten die Granulozyten aus ihren Granula Stoffe wie Proteasen, Myeloperoxidasen und radikale, reaktive Sauerstoff-Verbindungen (z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (= *oxidative burst*)) aus, die die Bakterien zerstören.

Unter Granula versteht man körnchenförmige Einlagerungen, die Speicher- und Sekretstoffe enthalten, die im Zuge der Degranulierung ausgeschüttet werden und sich durch ihre Anfärbbarkeit unterscheiden lassen. Die Granula der Granulozyten enthalten u. a. Enzyme wie Lysozym, Kollagenase, Elastase, Neuramidase, Plasminogenaktivatoren und Cathepsin G.

Kommt es, wie z.B. im Rahmen einer APL, zu einer Granulozytopenie, also einem Granulozytenmangel, dann droht eine erhöhte Infektanfälligkeit.

Reife Granulozyten besitzen auf ihrer Zelloberfläche zahlreiche Proteine, die für ihre Aktivitäten essentiell sind; zu diesen gehören auch Mitglieder aus der Familie der CEACAMs. Es sind die CEACAMs 1, 3, 6 und 8 (Singer et al., 2002 und Schmitter et al., 2004), die z. B. für die Migration (Verlassen der Blutgefäße, um an den Ort der Infektion zu gelangen) der Granulozyten von Bedeutung sind.



**Abb. 8: Neutrophiler Granulozyt.**

Darstellung eines stabkernigen Granulozyten mit Granula. Auf der Zelloberfläche sind die CEACAMs 1, 3, 6 und 8 exprimiert. CEACAM 1 und 3 weisen jeweils einen transmembranären Anteil auf, 6 und 8 sind GPI-verankert. CEACAM1 kommt in seinen Formen 1-4 L und 1-3 L vor (hier nur 1-4 L gezeigt).

## Fragestellung

Bei der Behandlung der APL stellt ATRA den wesentlichen Bestandteil der Induktionstherapie dar. Die Wirkung von ATRA beruht dabei auf der Induktion einer Differenzierung der malignen Vorläuferzellen hin zu kurzlebigen Granulozyten. Humane Granulozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche bestimmte Proteine, zu denen unter anderem CEACAM 1, 3, 6 und 8 gehören.

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der APL-Zelllinie NB4 geklärt werden, ob die ATRA-differenzierten Zellen tatsächlich Eigenschaften reifer Granulozyten aufweisen, wobei das besondere Augenmerk auf die Expression der CEACAMs gerichtet war. Dabei sollte die Frage geklärt werden, inwieweit vom Expressionszeitpunkt und von der Expressionsstärke der CEACAMs eine Aussage hinsichtlich der Wirksamkeit der Therapie und damit hinsichtlich der Prognose des Patienten getroffen werden kann. Desweiteren wurde untersucht, ob die CEACAMs bereits vor der Differenzierung der NB4-Zellen intrazellulär als Proteine oder als mRNA vorlagen oder ob durch ATRA-Gabe der gesamte Vorgang der CEACAM-Transkription und -Translation erst angeregt wird. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die Expression der vier CEACAMs zeitgleich oder zeitversetzt induziert wurde. Neben der CEACAM-Expression sollten noch weitere Differenzierungsparameter bestimmt werden: die Apoptose- und Proliferationsrate, sowie Veränderungen der Granularität und Zellgröße.

Außer in der APL-Therapie findet ATRA mittlerweile auch in der Therapie der AML Verwendung. Daher sollte die AML-Zelllinie HL-60 hinsichtlich ihrer Differenzierbarkeit hin zu Granulozyten untersucht werden, wobei erneut die Induzierbarkeit der CEACAM-Oberflächenexpression im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen sollte.

Neben ATRA sollten auch eine Reihe weiterer Medikamente, die derzeit bereits Verwendung finden auf ihre Auswirkungen bzgl. der Differenzierung analysiert werden. Dabei sollten neben dem bereits als Reservetherapeutikum in der APL-Therapie verwendeten Arsentrioxid auch GM-CSF und Curcumin allein und in Kombination mit ATRA genutzt werden.

## Ergebnisse

### **I. Auswirkung von All-trans-Retinsäure (ATRA), GM-CSF und Curcumin auf die Morphologie von NB4-Zellen**

ATRA, ein Retinoid, ist essentieller Bestandteil der Induktionsphase der Chemotherapie der APL, einer Form der AML. Bei der APL kommt es wegen eines genetischen Defektes der Granulozytopoese zu einer ungebremsten Vermehrung der unreifen Vorstufen der Granulozyten, den Promyelozyten. Die Wirkung von ATRA beruht darauf, diesen Differenzierungsblock aufzuheben und die Promyelozyten zu Granulozyten zu differenzieren. In vitro werden dazu häufig NB4-Zellen verwendet, bei denen es sich um eine humane Akute-Promyelozyten-Leukämiezellen handelt. Sie liegen in der Regel als lockere, cluster-bildende, runde und polymorphe Zellen in Suspension vor und verdoppeln sich unter Zellkulturbedingungen alle 24 Stunden, was sie für Versuche besonders geeignet macht. Neben ATRA spielen auch weitere Retinsäure-Derivate wie 13-cis- und 9-cis-Retinsäure eine Rolle, deren Wirkungsmechanismen denen des ATRAs ähneln (Idres et al., 2002) und die daher hier mit untersucht werden sollten. In der APL-Therapie wird auch GM-CSF genutzt, welches die Differenzierung der Promyelozyten verstärkt (Hsu et al., 1999) und die Apoptose der Granulozyten verhindert (Wolach et al., 2007). Curcumin, als Bestandteil der Gelbwurzel ein häufig verwendetes Gewürz, weist hingegen selber eine anti-kanzerogene Wirkung auf und wird derzeit auf eine Verbesserung der Wirksamkeit der ATRA-Therapie in Kombinationsgabe untersucht (Song et al., 2005; Liu et al., 2007).

Reife Granulozyten weisen auf der Zelloberfläche ein charakteristisches Expressionsmuster bestimmter Proteine auf, zu denen auch die zur CEA-Familie gehörenden CEACAMs 1, 3, 6 und 8 zählen. In dieser Arbeit sollten die Expressionsmuster und -kinetiken der CEACAMs u. a. mit Hinblick auf ihre Verwendbarkeit als Verlaufs- und Erfolgsmarker der Therapie untersucht werden.

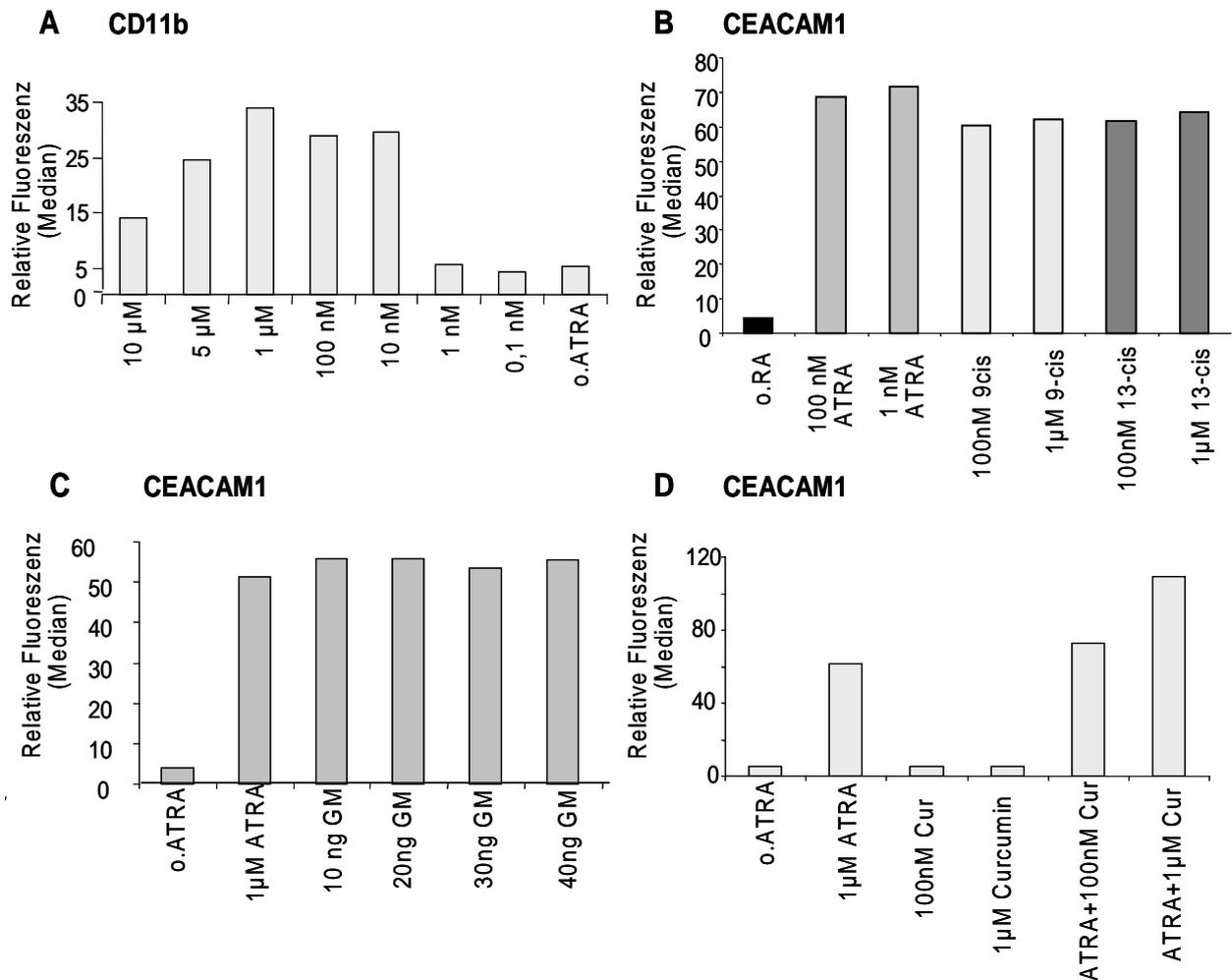
### **Dosis-Wirkungsbestimmung von ATRA, GM-CSF und Curcumin auf die Expression von CEACAMs**

Zunächst sollten die optimalen Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe bestimmt werden, wobei, soweit vorhanden, die Orientierung anhand der in der Literatur bereits publizierten Konzentrationen erfolgte. Als Erfolgskontrolle diente der etablierte Oberflächenmarker CD11b, der auf reifen Granulozyten und differenzierten NB4 exprimiert wird (Di Noto et al., 1996; Zang et al., 2002, Lee et al. 2002) sowie die Induktion von CEACAM1, welche mit der Durchflusszytometrie bestimmt wurden. In der Literatur wird die zur Differenzierung der NB4-Zellen notwendige Konzentration von ATRA mit 1  $\mu\text{M}$  angegeben (Benedetti et al., 1996), wobei ähnliche Konzentrationen auch für die Retinsäure-Derivate 13-cis- und 9-cis-Retinsäure (RA) gelten. Um die optimale Konzentration zu finden, wurden diese Agenzien in verschiedenen Konzentrationen verwendet. In Figur A der Abb. 9 ist zu erkennen, dass eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ATRA die höchste Expression von CD11b bewirkt, während sie bei fallenden und steigenden Konzentrationen abnimmt. Auch verglichen mit den anderen RA-Derivaten erweist sich ATRA als wirksamer, was sich an den CEACAM1-Expressionen in Abb. 9b zeigt, so dass ATRA für die folgenden Versuche verwendet wurde.

Auch bei GM-CSF wurde die optimale Dosis untersucht (Abb. 9c), indem verschiedene Konzentrationen mit ATRA kombiniert wurden. Wie zu erkennen ist, hat eine Steigerung der GM-CSF-Konzentration über die aus der Literatur (Noel et al., 2004) bekannte Konzentration von 10 ng/ml keinen Einfluss auf die Höhe der CEACAM-1-Expression, weswegen diese Konzentration übernommen wurde.

Curcumin wurde in Kombination mit verschiedenen ATRA-Konzentrationen ausgetitriert, wobei der Rahmen der Konzentrationen durch die dosisabhängige Fähigkeit Curcumins gesteckt wurde, Apoptose zu induzieren (Banjerdpongchai et al., 2002). Da ATRA allein bereits eine apoptotische Wirkung entfaltet und vor allem ein synergistischer Effekt von Curcumin in Bezug auf die Höhe und die Kinetiken der Expression der CEACAMs erwünscht war, wurden keine höheren Konzentrationen als die aus der Literatur bekannte Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Curcumin verwendet (Banjerdpongchai et al., 2002).

Curcumin schien in den Titrationsversuchen bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in Kombination mit 1  $\mu\text{M}$  ATRA eine erhöhte Expression von CEACAM 1 hervorzurufen (Figur D) als die bloße Inkubation mit ATRA, jedoch konnte diese Beobachtung in den folgenden Versuchen (siehe unten) nicht bestätigt werden.



**Abb. 9: Dosis-Wirkungsbestimmung von ATRA, GM-CSF und Curcumin mittels Durchflusszytometrie.** Es wurden jeweils  $250 \times 10^5$  NB4-Zellen für 5 Tage mit den angegebenen Konzentrationen und Kombinationen differenziert. Als Erstantikörpern fanden die monoklonalen Maus-anti-human-Antikörper anti-CD11b bzw. 18/20 (Konzentrationen jeweils 10 $\mu$ g/ml), als Zweitantikörper der Fluorescein-Isothiocyanat/FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers F(ab')<sub>2</sub> (Konzentration 1:40) Verwendung.

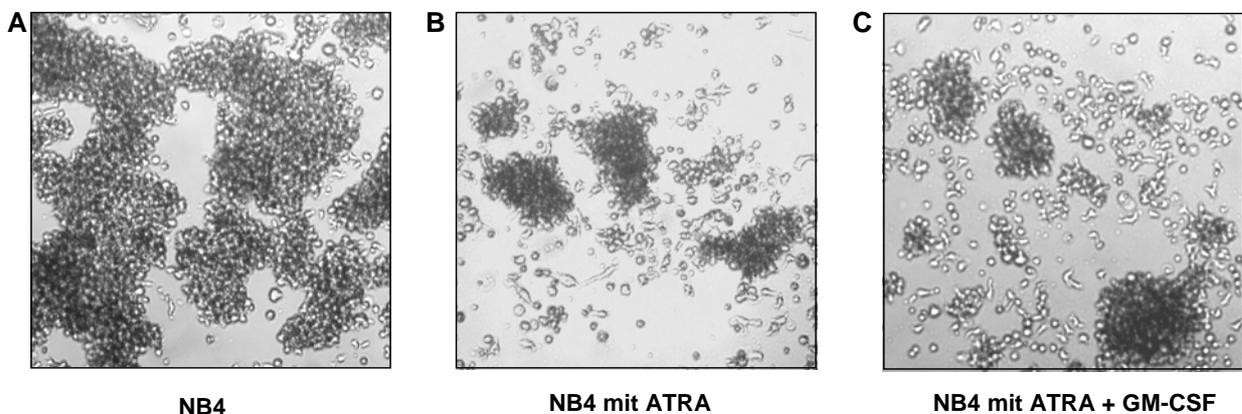
**A)** Oberflächenexpression von CD11b bei Titration von ATRA **B)** Veränderung in der Oberflächenexpression von CEACAM1 bei Inkubation mit ATRA, 13-cis- und 9-cis-RA

**C)** Oberflächenexpression von CEACAM1 bei Titration von GM-CSF in Kombination mit jeweils 1 $\mu$ M ATRA **D)** Oberflächenexpression von CEACAM1 bei Titration von Curcumin

o.RA: ohne ATRA, GM: GM-CSF, Cur: Curcumin, 13-cis: 13-cis-RA, 9-cis: 9-cis-RA

### **Veränderungen von Wachstumscharakteristiken, Granularität und Größe der NB4-Zellen nach ATRA-Behandlung**

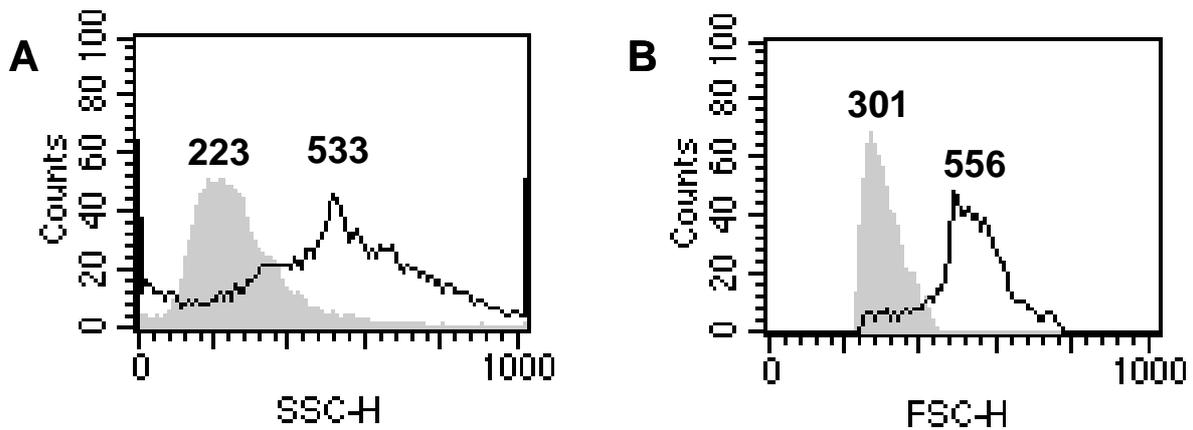
Unbehandelte NB4-Zellen wachsen normalerweise als runde Zellen in Zellverbänden in lockeren Zell-Clustern. Wurden die Zellen jedoch mit den differenzierenden Wirkstoffen inkubiert, so änderte sich ihr Wachstumsverhalten. Die sich differenzierenden Zellen wuchsen zunehmend als Einzelzellen oder bildeten kleine, dichte Zellcluster, die sich gegen Ende der fünftägigen Inkubation von den großen lockeren Zell-Clustern aus der Normalkultur deutlich unterschieden (Abb. 10).



**Abb. 10: Zellmorphologie von NB4 nach Inkubation mit ATRA und ATRA + GM-CSF über 5 Tage.** Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  ATRA, 1  $\mu\text{M}$  ATRA in Kombination mit 10 ng/ml GM-CSF und nur mit Medium für 5 Tage inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Digitalkamera photographiert (A) NB4 ohne ATRA-Behandlung (gleiches Bild bei alleiniger Behandlung der Zellen mit entweder nur 1  $\mu\text{M}$  Curcumin oder 10 ng/ml GM-CSF) (B) NB4 nach 5 Tagen Inkubation mit ATRA (gleiches Bild bei Kombination von ATRA mit 1  $\mu\text{M}$  Curcumin) (C) NB4 nach 5 Tagen Inkubation mit ATRA und GM-CSF (gleiches Bild für die Kombination von ATRA mit GM-CSF und Curcumin)

Des Weiteren wurden die Größe und die Granularität der behandelten Zellen analysiert. Dazu wird mittels der Durchflusszytometrie die von den Zellen verursachte Streuung des Lichtes gemessen. Die Vorwärtsstreuung (FSC) gibt die Größe und die Seitwärtsstreuung (SSC) die Granularität/Membranbeschaffenheit der Zelle an. Mit Hilfe der beiden Messparameter Größe

versus Granularität lassen sich verschiedene Zellpopulationen unterscheiden (z.B. Lymphozyten von Granulozyten). In der FACS-Analyse wurde dabei deutlich, dass die differenzierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten NB4-Zellen an Größe zugenommen hatten und auch eine erhöhte Granularität wie bei reifen Granulozyten beobachtet aufwiesen (Abb. 11). Diese Granula sind körnchenförmige Einlagerungen in Zellen, die Speicher- und Sekretstoffe enthalten, die sie im Zuge der so genannten Degranulierung auszuschütten vermögen.



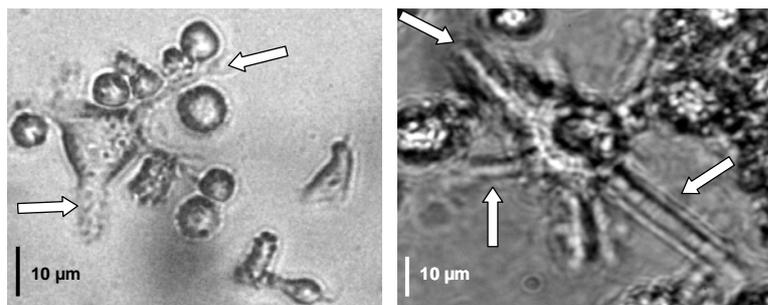
**Abb. 11: Veränderung der Granularität (A) und Zellgröße (B) von NB4-Zellen nach ATRA-Behandlung.** Analyse der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung im Durchflusszytometer von behandelten (schwarze Linie) und unbehandelten Zellen (graue Fläche). Die Zahlen stellen Relativwerte für die Lichtstreuung gemessen an der Streuung in einer Negativprobe mit Aqua dest. dar, wobei der SSC die Seitwärts-, der FSC die Vorwärtsstreuung erfasst.

### **Bei der Kombination von ATRA und GM-CSF entstehen Makrophagen**

GM-CSF ist ein Zytokin, welches bei Entzündungen vermehrt von Monozyten und Granulozyten ausgeschüttet wird und die Bildung und Reifung von Granulozyten und Makrophagen verstärkt. Bei NB4-Zellen handelt es sich um eine APL-Zelllinie und damit um einen Vorläufer von Monozyten und Granulozyten. Demzufolge müsste es möglich sein, NB4-Zellen mit Hilfe von GM-CSF zu Makrophagen zu differenzieren.

Bei mikroskopischer Betrachtung der differenzierten Zellen fiel auf, dass einige Zellen, die mit der Kombination aus ATRA und GM-CSF oder ATRA/GM-CSF mit Curcumin behandelt

worden waren, deutlich von der normalen, runden Form abweichen und dendritenartige Auswüchse entwickelten. Dies war nicht der Fall, wenn kein GM-CSF benutzt wurde (Abb. 12). Die Zellen zeigten sich des Weiteren entgegen der üblichen Wachstumsweise, in welcher die NB4-Zellen in Suspension vorliegen, adhären und haften am Boden der Kulturflaschen an. Da sich Granulozyten und Makrophagen aus derselben Vorläuferzelle, dem Promyelozyten, entwickeln, nahmen wir an, dass es sich um Makrophagen handelte.

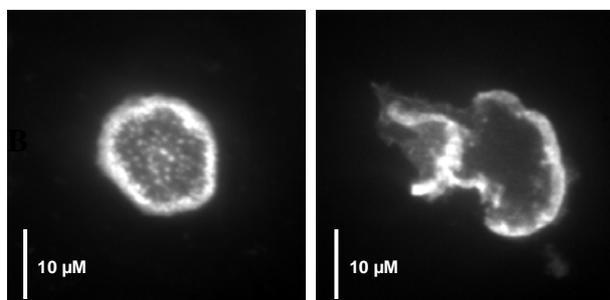


**Abb. 12: Ausbildung von Dendriten bei differenzierten NB4-Zellen nach Behandlung mit ATRA und GM-CSF über 5 Tage.**

Digitalphotos differenzierter

NB4-Zellen unter dem Zeissmikroskop (40fache Vergrößerung) in Suspension nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und befeuchteter Luft. Als Nährmedium wurde RPMI-1640 mit 10% FKS (fetales Kälberserum), 2mmol L-Glutamin und 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin verwendet.

Um festzustellen, ob es sich bei den Zellen tatsächlich um Makrophagen handelt, wurden die Zellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf das Vorliegen von CD14 getestet, ein Oberflächenprotein, welches vor allem auf Makrophagen und Monozyten vorkommt und eine Rolle in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen spielt (Dentener et al., 1993). Bei den adhären Zellen konnte eine Immunfluoreszenz anfärbung und damit ein CD14-Nachweis beobachtet werden (Abb. 13)



**Abb. 13: Indirekte Immunfluoreszenz mit CD14 von adhären NB4 nach Behandlung mit ATRA und GM-CSF.**

Aufnahme in 40facher Vergrößerung unter dem Zeiss-Mikroskop nach 5 Tagen

Inkubation bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung

und befeuchteter Luft. Als Nährmedium wurde RPMI-1640 mit 10% FKS (fetales Kälberserum), 2mmol L-Glutamin und 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin verwendet.

## **II. Auswirkungen von ATRA auf Proliferation und Apoptose von NB4-Zellen**

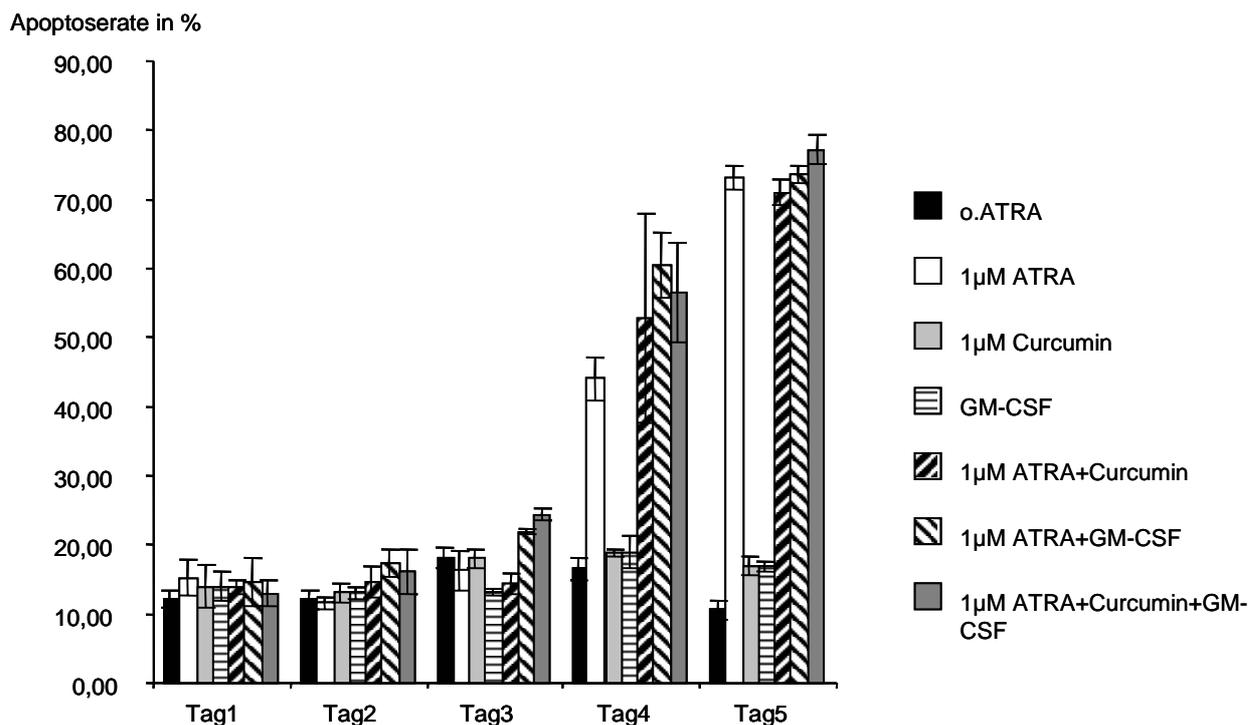
### **Veränderung der Apoptoserate verursacht durch ATRA-Behandlung**

Bei dem Vorgang der Apoptose handelt es sich um den so genannten programmierten Zelltod. Die Zelle geht im Gegensatz zur Nekrose, wo der Zelltod durch äußere Einflüsse zustande kommt, durch einen von der betroffenen Zelle selbst aktiv ausgeführten Mechanismus zugrunde. Bei malignen, neoplastischen Erkrankungen ist dieser Vorgang jedoch außer Kraft gesetzt und es kommt zu einem unkontrollierten Wachstum der malignen Zellen wie z.B. der NB4-Zellen.

Die NB4-Zellen werden jedoch mit ATRA zu Granulozyten differenziert, was dazu führt, dass die Zellen auch wieder in Apoptose gehen müssten, da die durchschnittliche Lebensdauer eines ausgereiften Granulozyten in etwa 6 Stunden beträgt. Dazu können die differenzierten Zellen mit Propidiumjodid (PJ) inkubiert werden, welches sich bei sterbenden Zellen auf Grund der durchlässig werdenden Zellmembranen in die DNA einlagern (es interkaliert in Nukleinsäuren) kann. Die Fluoreszenz (dunkelrot) des PJs kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert werden und dient daher zur Lebend-Tot-Diskriminierung.

Es konnte so gezeigt werden, dass bei differenzierten NB4-Zellen ein Apoptosevorgang induziert wird, der dazu führt, dass von Tag 4 an der Anteil der apoptotischen Zellen bei den mit ATRA behandelten NB4-Zellen rapide ansteigt, bis schließlich an Tag 6 alle Zellen tot sind. Bei den nicht behandelten NB4-Zellen ändert sich die Apoptoserate quasi nicht (Abb. 14).

Zwischen den einzelnen Wirkstoffkombinationen ist kein Unterschied festzustellen, solange ATRA verwendet wird. Die Kombinationen, die kein ATRA enthalten, weisen auch keine zunehmende Apoptoserate auf.



**Abb. 14: Apoptoseraten von NB4-Zellen an verschiedenen Tagen in Abhängigkeit von der Behandlung in Prozent toter Zellen.** Messung erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Alle NB4-Zellen wurden mit 1µM ATRA, 10ng/ml GM-CSF, 1µM Curcumin und den entsprechenden Kombinationen für 1 bis 5 Tage und anschließend mit 5 µl Propidiumjodid (PJ) je 200 ml resuspendierte Zellen für ca. 45 Minuten inkubiert. Anschließend Bestimmung des prozentualen Anteils über Fluoreszenzbestimmung im FACS.

### Veränderungen von Proliferation und Zellzahl durch ATRA-Exposition

Im Gegensatz zu malignen Zellen, die sich unkontrolliert vermehren, können reife Granulozyten nicht mehr proliferieren. Die differenzierten NB4-Zellen sollten also nicht mehr in der Lage sein, sich zu vermehren. Um festzustellen, ob neben der steigenden Apoptoserate auch Proliferation und Zellzahl durch ATRA beeinflusst werden, wurden einerseits die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt, um die absolute Anzahl der Zellen festzustellen und andererseits ein Proliferationsassay durchgeführt, welches Aufschluss über das Proliferationsverhalten liefern sollte (siehe Material und Methoden).

Es wurden jeweils ca. 900.000 Zellen unter gleichen Bedingungen (siehe Material und Methoden) angesetzt und an den entsprechenden Tagen gezählt.

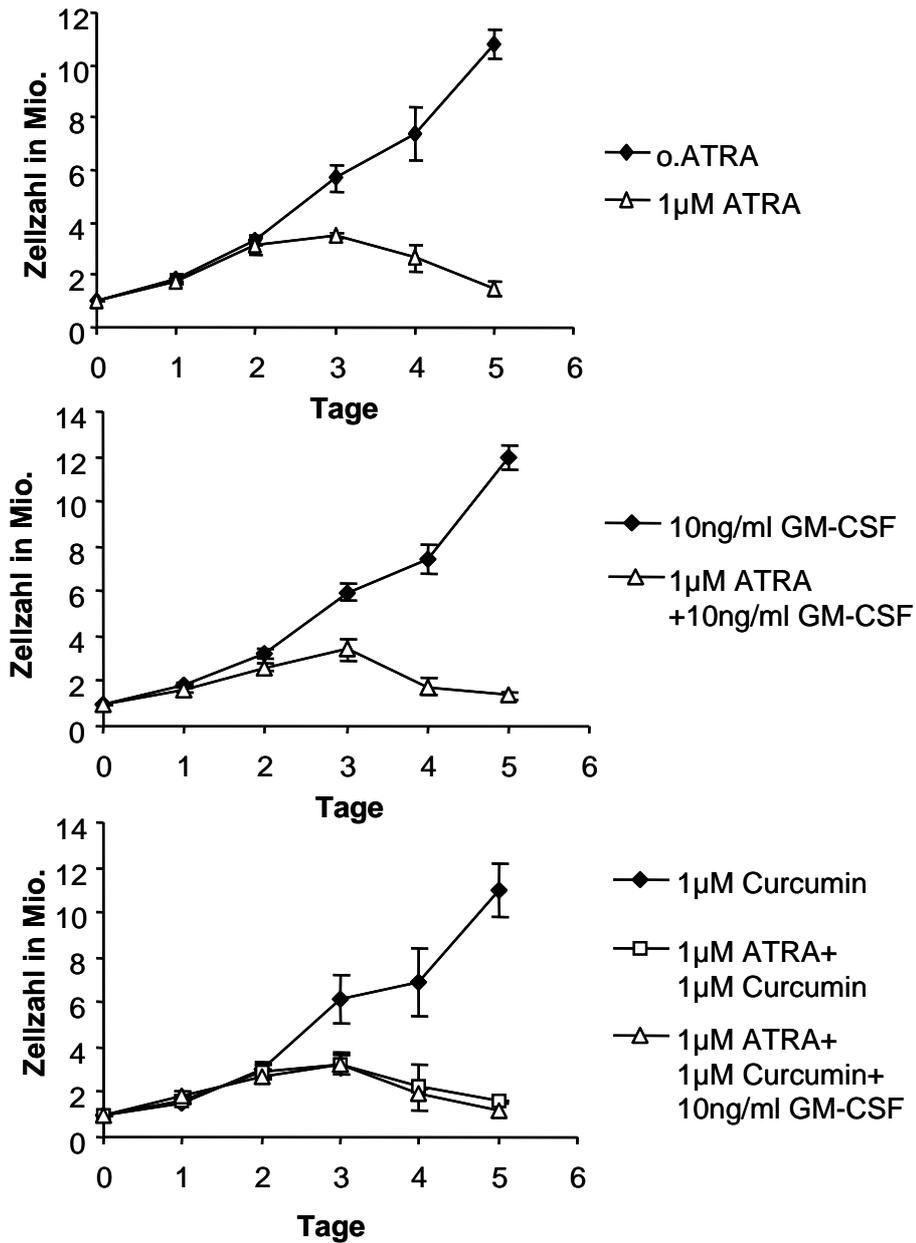


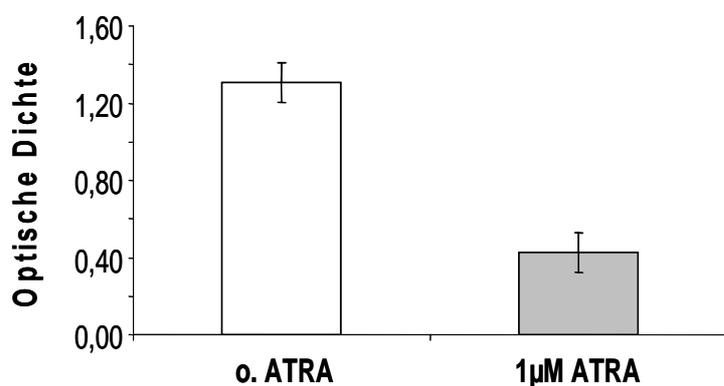
Abb. 15: Veränderungen der Zellzahl bei Gabe verschiedener Kombinationen von ATRA, GM-CSF und Curcumin. Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauerzählkammer

Abb. 15 ist zu erkennen, dass sich innerhalb der ersten beiden Tage nach Beginn der Inkubation die Zellen unter allen Kombinationen im gleichen Tempo vermehren. Nach drei Tagen beginnt dann die Zellzahl bei allen ATRA-beinhaltenen Kombinationen zu stagnieren und anschließend abzufallen. An Tag 5 sind schließlich durchschnittlich zehnmal so viele Zellen bei den nicht mit ATRA behandelten Zellen vorhanden wie bei den behandelten, an Tag 6 sind alle ATRA-behandelten Zellen tot. Dies wurde mit Hilfe von Propidiumjodid im Durchflusszytometrieverfahren

nachgewiesen, so dass auf eine Zählung der Zellen an Tag 6 verzichtet werden konnte. Dabei ist keine Veränderung des durch ATRA induzierten Effektes zwischen den einzelnen Kombinationen erkennbar.

Alle Zellen, die nicht mit ATRA inkubiert wurden, vermehren sich erwartungsgemäß, wobei auch hier kein Unterschied zwischen den einzelnen Kombinationen sichtbar wird.

Bei der Messung der Proliferationsaktivität wurden NB4-Zellen für einen Zeitraum von 5 Tagen einmal mit und einmal ohne ATRA inkubiert und anschließend mit Hilfe des CellTiter 96<sup>®</sup>-Kits (Promega GmbH) die optische Dichte bestimmt. Dabei handelt es sich um eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Zellvitalität und damit indirekt der Veränderung der Menge lebender Zellen. Durch die Reduzierung von MTS-Tetrazolium zu einem farbigen Produkt durch NADPH oder NADH, welche nur in lebenden Zellen mit aktiven Dehydrogenasen vorkommen, kann über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm die Mitochondrienaktivität gemessen werden. Nimmt die optische Dichte zu, kann davon auf die Veränderung der Zellvitalität und damit auch auf die Veränderung der absoluten Zellzahl geschlossen werden.



**Abb. 16: Proliferationsassay ATRA-behandelten und unbehandelten NB4-Zellen nach 5 Tagen Inkubation im ELISA.**

NB4-Zellen wurden für 5 Tage mit und ohne 1 µM ATRA inkubiert und anschließend mit Hilfe

des CellTiter 96<sup>®</sup>-Kits ( Promega GmbH ) behandelt. Die Messung erfolgte bei 450 nm Wellenlänge im ELISA – Reader NB4-Zellen. o.ATRA = ohne ATRA

Der Proliferationsassay bestätigt dabei die Ergebnisse der manuellen Zellzählung, denn die unbehandelten Zellen zeigen dabei eine mehr als dreimal so hohe optische Dichte wie die Zellen, die mit ATRA inkubiert wurden. Dies bedeutet, dass Vitalität und Proliferationsaktivität bei ihnen höher liegen, was für die undifferenzierten NB4-Zellen zu erwarten ist (Abb. 16).

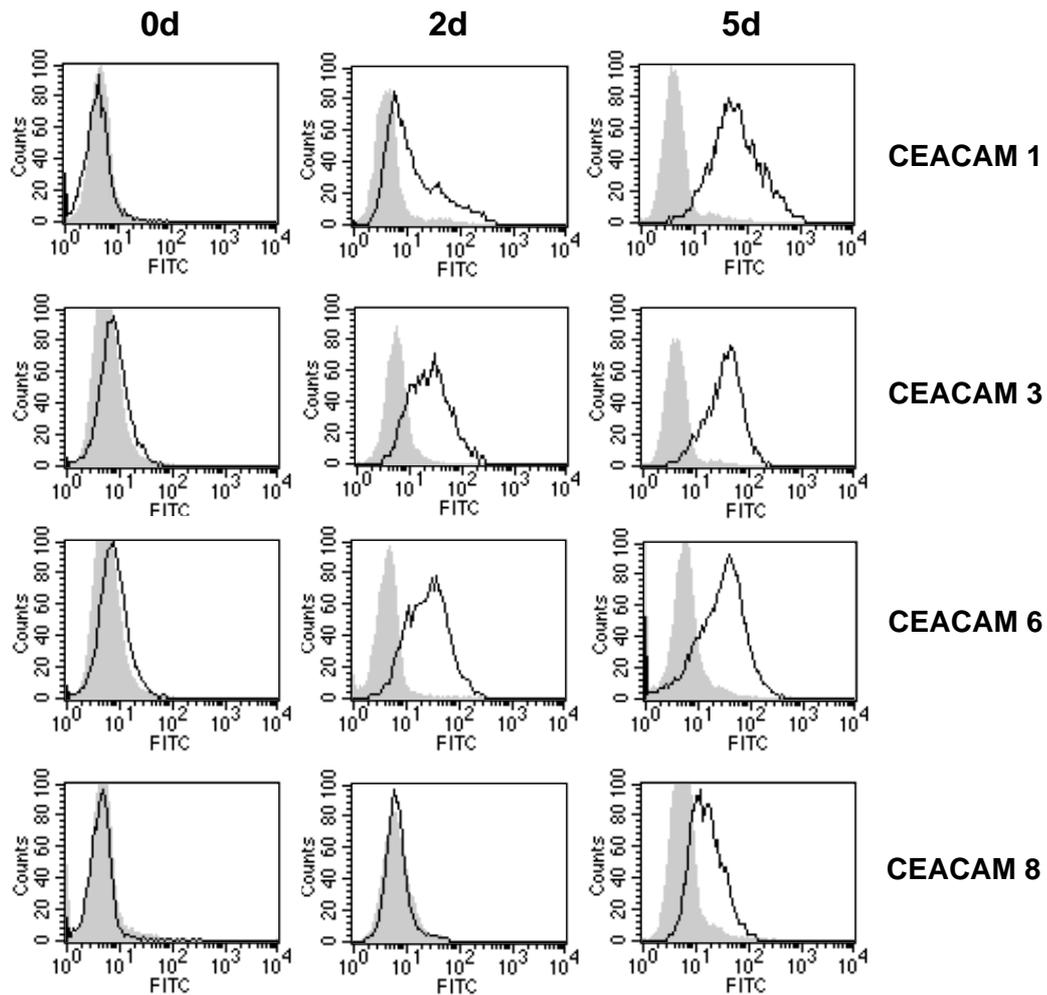
### **III. CEACAM-Expression in NB4-Zellen bei ATRA-Gabe**

#### **Expression von CEACAMs auf der Zelloberfläche von NB4-Zellen nach ATRA-Behandlung**

Das Ziel der Therapie der APL ist es, den Differenzierungsblock in den malignen Vorläufern der Granulozyten und Monozyten aufzuheben. Dazu wird in der Induktionstherapie ATRA verwendet, welches zur Differenzierung der malignen Zellen hin zu Granulozyten führt. Diese verfügen über bestimmte Oberflächenproteine, zu denen die CEACAMs 1, 3, 6 und 8 (Singer et al., 2002) sowie der Oberflächenmarker CD 11b gehören. Während CD 11b bereits als Marker für die Differenzierung der NB4-Zellen etabliert ist, wurde die Veränderung der Oberflächenexpression der verschiedenen CEACAMs, die bei undifferenzierten NB4-Zellen nicht vorkommen, bisher nicht eingehend untersucht.

Um nachzuweisen, dass eine Induktion der Oberflächenexpression von CEACAMs auf NB4-Zellen bei der Therapie mit ATRA erfolgt, wurden die mit ATRA und den jeweiligen Kombinationen aus ATRA, GM-CSF und Curcumin behandelten Zellen an den Tagen 1 bis 5 mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dieser Zeitraum wurde deshalb gewählt, weil nach den Ergebnissen der Apoptoseuntersuchungen mit PJ an Tag 6 die differenzierten Zellen bereits gestorben waren. Dabei wurden Antikörper gegen die CEACAMs verwendet, die nach ihrer Bindung an CEACAMs anschließend Färbeantikörper banden, mit denen eine Immunfluoreszenz gemessen werden konnte.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie ergaben dabei zunächst, dass auf den undifferenzierten NB4-Zellen keine CEACAMs auf der Zelloberfläche zu finden sind. Nach Behandlung mit ATRA erschienen innerhalb von 5 Tagen sowohl CD 11b (Daten nicht gezeigt) als auch CEACAM 1, 3, 6 und 8 (Abb. 17). Die einzelnen CEACAMs erschienen jedoch nicht zeitgleich, sondern folgten viel mehr unterschiedlichen Kinetiken.

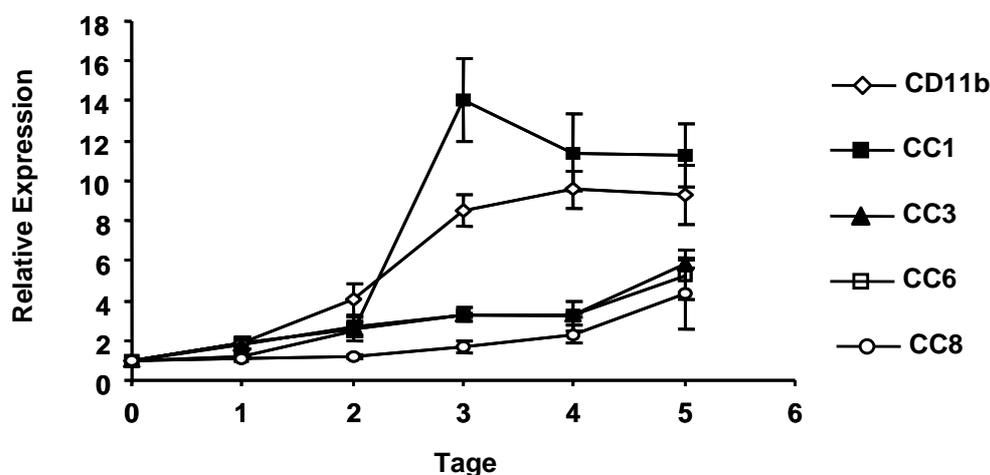


**Abb. 17: Expression von CEACAMs auf der Zelloberfläche von NB4-Zellen nach ATRA-Behandlung.** FACS-Analyse von mit (schwarze Linie) und ohne (graue Fläche) ATRA. Die Zellen sind mit und ohne 1  $\mu$ M ATRA 1 – 5 Tage inkubiert worden.

Die verwendeten Erst-Antikörper sind 18/20 für CEACAM1, Col 1 für CEACAM3, 13H10 für CEACAM6, anti-CD-66b für CEACAM8, anti-CD11b und als Negativkontrolle Immunglobulin G. Alle Erst-Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml verwendet und sind Maus-anti-human-Antikörper. Angefärbt wurden die Erstantikörper mit Hilfe des Fluorescein – Isothiocyanat (FITC)-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers F(ab')<sub>2</sub>, der in einer Konzentration von 1:40 verwendet wurde.

### Die Expressionskinetiken der einzelnen CEACAMs nach ATRA-Behandlung

Die Expressionskinetiken zeigen, dass die CEACAMs nicht alle zur gleichen Zeit auf der Oberfläche erscheinen (Abb. 18). Hierzu wurden die Messung der Zellen mit Hilfe der Gate-Funktion in der Durchflusszytometrie auf die Überlebenden eingegrenzt und anschließend die einzelnen relativen Fluoreszenzen (Median) mit der Ig-Negativkontrolle ins Verhältnis gesetzt, so dass das Ausmaß der Expressionsveränderungen gegenüber den unbehandelten Zellen dargestellt werden konnte (relative Expression).



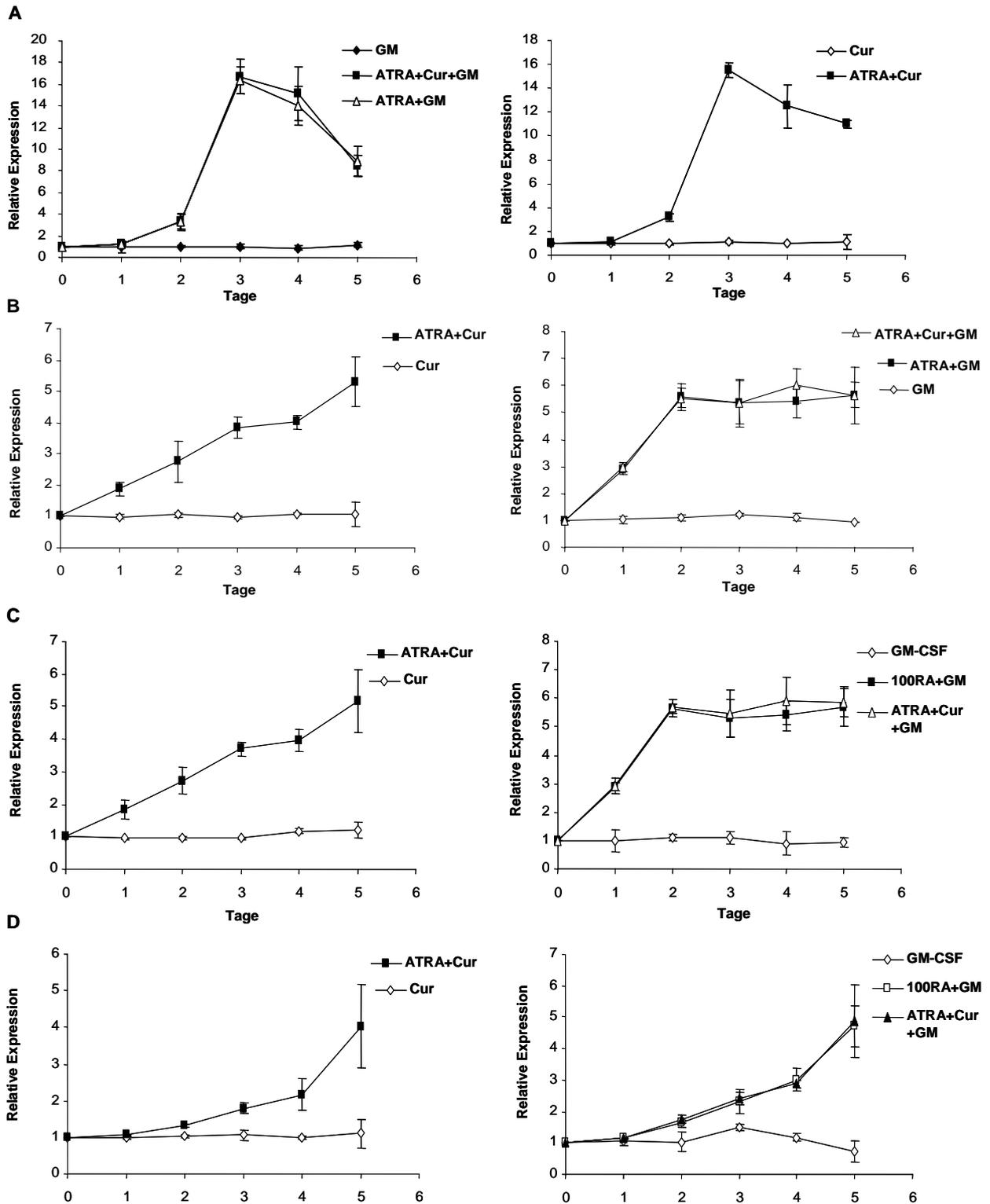
**Abb. 18: Kinetiken der CEACAMs und CD11b auf NB4-Zellen nach ATRA-Behandlung.** Relative Expressionen in der Durchflusszytometrie.

Schon nach 2 Tagen ist die Oberflächenexpression von CEACAM3, 6 und CD11b erhöht. Während CD 11b bis Tag 4 ansteigt und dann ein Plateau erreicht, bleibt die Expression von CEACAM3 und 6 bis Tag 4 in etwa auf gleichem Level, um an Tag 5 noch einmal anzusteigen. Dabei gleichen sich ihre Kinetiken stets (Abb. 18).

CEACAM8 hingegen wird bis Tag 5 gar nicht exprimiert, um dann an Tag 5 plötzlich anzusteigen. Die CEACAM1-Expression macht an Tag 3 einen deutlichen Sprung um danach leicht abzufallen und auf gleichem Level zu verbleiben.

Bei den anderen Kombinationen verhalten sich die Kinetiken der CEACAM-Expressionen prinzipiell ähnlich wie bei alleiniger ATRA-Gabe, wenn ATRA involviert ist (Abb. 19). Bei alleiniger Gabe von Curcumin oder GM-CSF ist hingegen keine Expression zu sehen, sodass beide Substanzen keine Rolle in der CEACAM-Expression zu spielen scheinen.

# Ergebnisse



**Abb. 19: Darstellung der Kinetiken der CEACAM-Expressionen auf der Zelloberfläche von NB4-Zellen für verschiedene Kombinationen.** Relative CEACAM-Expression nach FACS-Analyse. A) CEACAM1, B) CEACAM3, C) CEACAM6 und D) CEACAM8. Es wurden jeweils 1  $\mu$ M ATRA, 1  $\mu$ M Curcumin und 10 ng/ml GM-CSF verwendet. RA: ATRA; Cur. Curcumin, GM: GM-CSF

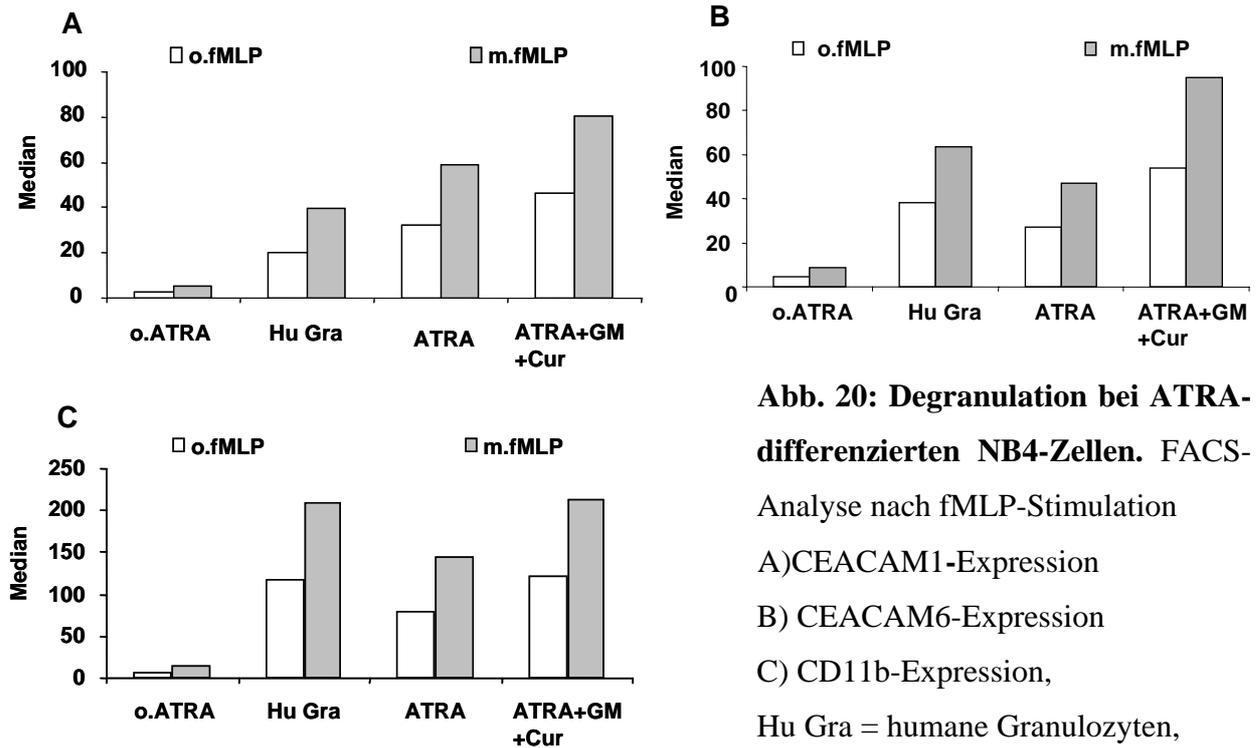
Bei Kombination von ATRA und GM-CSF erreichen die Expressionen von CEACAM3 und 6 jedoch schneller ein Plateau, nämlich bereits am Tag 2, und verharren auf ihm, wohingegen bei alleiniger ATRA-Gabe oder in Kombination mit Curcumin kein Plateau erreicht, sondern ein konstanter Anstieg der Expression bis Tag 5 erfolgt.

### **Degranulation von mit ATRA differenzierten NB4-Zellen**

Wenn die Granulozyten einen Fremdkörper erkennen, so schütten sie diese Substanzen aus, indem sie die Granula (Degranulation) und einige weitere Stoffe wie radikale Sauerstoffspezies nach außen hin entleeren. Bei diesem Vorgang, den man als *oxidative burst* bezeichnet, gelangen auch in den Granula befindliche Proteine an die Zelloberfläche.

Die differenzierten NB4-Zellen wurden nun mit einem klassischen Auslöser der Degranulation bei Granulozyten stimuliert, dem formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP), bei dem es sich um ein bakterielles Tripeptid handelt, welches den Granulozyten über einen bestimmten Rezeptor aktiviert. Die so aktivierten Granulozyten werden dadurch *in vivo* zum Ort der Infektion gelockt (Chemotaxis).

Durch den fMLP-Stimulationsversuch sollte untersucht werden, ob es bei den durch ATRA differenzierten NB4-Zellen nicht nur zu einer induzierten Expression von CEACAMs kommt, sondern auch zu einer durch fMLP verursachten Degranulation und somit wie für Granulozyten bekannt zu einer gesteigerten Expression von CEACAM1, CEACAM6 und CEACAM8. CEACAM3 wurde hierbei nicht untersucht, da beschrieben wurde, dass es nicht in Granula von Granulozyten vorkommt.



**Abb. 20: Degranulation bei ATRA-differenzierten NB4-Zellen.** FACS-Analyse nach fMLP-Stimulation  
 A) CEACAM1-Expression  
 B) CEACAM6-Expression  
 C) CD11b-Expression,  
 Hu Gra = humane Granulozyten,  
 GM = GM-CSF, Cur = Curcumin

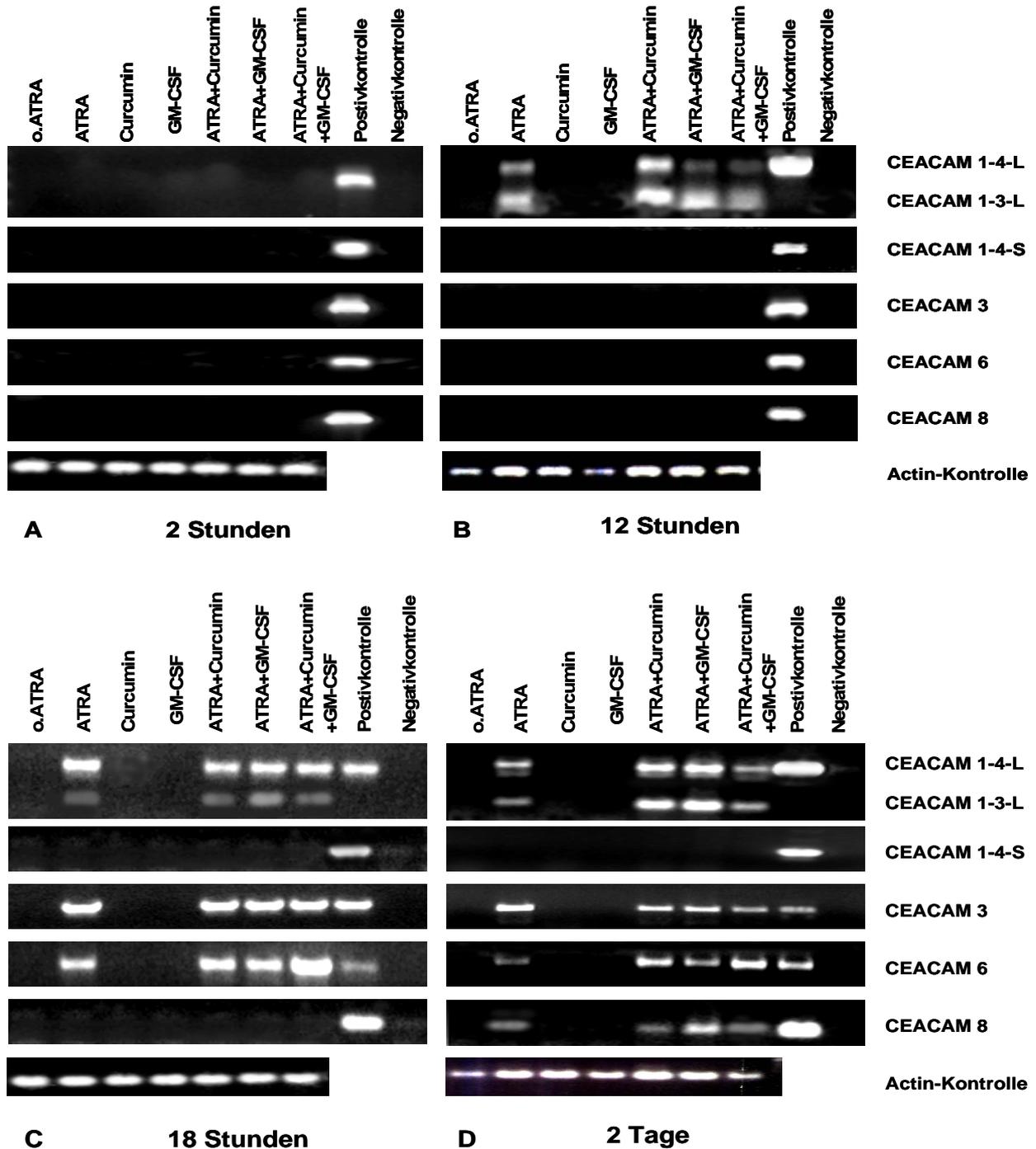
Die NB4-Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen für 5 Tage inkubiert und anschließend mit  $10^{-6}$  M fMLP je Ansatz für 15 Minuten stimuliert und anschließend in der Durchflusszytometrie die CEACAM-Expressionsveränderungen gemessen. Als Positiv - kontrolle wurden humane Granulozyten aus dem Blut von Mitarbeitern verwendet. Als Erstantikörper wurden 18/20, 13H10, anti-CD66b und anti-CD11b verwendet (jeweils  $10\mu\text{g}$ ). Die Ansätze erfolgten mit  $1\mu\text{M}$  ATRA und  $1\mu\text{M}$  Curcumin und  $10\text{ng/ml}$  GM-CSF.

In Abb. 20 stellt sich die Degranulationsfähigkeit der differenzierten NB4-Zellen deutlich dar, sowohl für CEACAM 1 (A), als auch für CEACAM 6 (B) und CD 11b (C) ist eine Steigerung der Oberflächenexpression gegenüber unstimulierten Zellen zu sehen, wenn ATRA verwendet wurde. Desweiteren ist eine stärkere Expressionserhöhung bei der Kombination von ATRA mit Curcumin zu sehen. Zwischen mit ATRA differenzierten NB4-Zellen und Granulozyten sind keine wesentlichen Unterschiede in der Expressionshöhe festzustellen. ATRA führt also zur Entstehung degranulationsfähiger Zellen.

### **Transkription von CEACAMs nach ATRA-Behandlung von NB4-Zellen**

Unter dem Einfluss von ATRA werden CEACAMs auf der Zelloberfläche exprimiert, wobei sie jedoch jeweils eigenen Expressionskinetiken folgen. Um eine Oberflächenexpression zu ermöglichen, müssen die CEACAMs in den NB4-Zellen auch auf genetischer Ebene als *messenger-RNA* (mRNA) vorliegen, die im Zuge der Transkription von der DNA abgelesen wird und die als Matrize für die Synthese eines Proteins in der Translation dient. Um nachzuweisen, dass diese CEACAM-RNA in den differenzierenden Zellen zu finden ist, wurde die Zell-RNA mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht. Dabei wird die mRNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Die umgeschriebene DNA wird nun im PCR-Verfahren exponentiell vervielfältigt und anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt, angefärbt und fotografiert. Bei diesem Ansatz sollte untersucht werden, ob eventuell bereits RNA in den undifferenzierten NB4-Zellen vorliegt und die Translation der CEACAMs durch die ATRA-Behandlung angeregt wird oder ob die Transkription an sich durch ATRA erst noch aktiviert werden muss. In letzterem Falle sollte dann untersucht werden, ob sich die Kinetiken der Transkription von denen der Oberflächenexpression unterscheiden.

Die NB4-Zellen wurden dazu nach der üblichen Methode über verschiedene Zeiträume mit den jeweiligen Kombinationen behandelt und anschließend lysiert, die RNA isoliert und mit der Hilfe der reversen Transkriptase wie oben erklärt in geeignete Matrizen-DNA umgeschrieben, mit der PCR exponentiell vervielfältigt und fotografiert. Alle Verfahren und die verwendeten Primer sind im Abschnitt Material und Methoden aufgeführt.



**Abb. 21: Untersuchung der CEACAM-Expressionen auf mRNA-Ebene zu verschiedenen Zeitpunkten.** Darstellung von DNA-Banden, wobei bei (A) nach 2 h, bei (B) nach 12 h, bei (C) nach 18 h und bei (D) nach 2 Tagen Inkubation die RNA aus den Zellen isoliert wurde. Es wurden 1µM ATRA, 1µM Curcumin und 10 ng/ml GM-CSF je Ansatz verwendet. Als Positivprobe diente Plasmid-DNA, als Negativ-Probe fand aqua dest. Verwendung, zum Nachweis, dass tatsächlich Zellmaterial verwendet wurde, wurde Actin genommen.

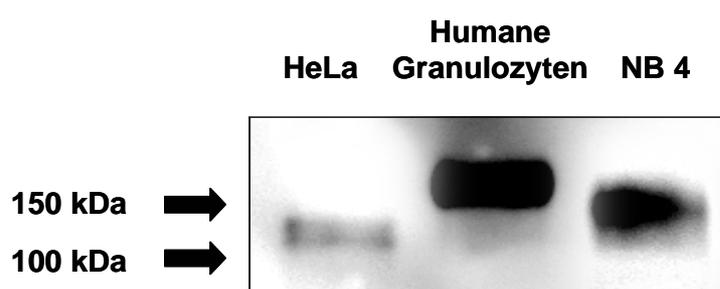
Zunächst ist deutlich zu sehen, dass in unbehandelten NB4-Zellen keine Transkription von CEACAM-mRNA stattfand (Abb. 21, A). Nach 2 (Abb. 21, A), 4 und 6 h (nicht gezeigt) nach ATRA-Behandlung ist noch keine Transkription von CEACAMs nachweisbar. Nach 12 h induziert die ATRA-Behandlung die Transkription von CEACAM1-mRNA. Interessanterweise wird dabei ausschließlich die mRNA der langen, nicht jedoch die der kurzen CEACAM1-Isoformen transkribiert (CEACAM1-4L und CEACAM1-3L; Abb. 21, B). Soweit bekannt sind in humanen Granulozyten ebenfalls nur die langen Isoformen von CEACAM1 exprimiert, wohingegen die meisten anderen CEACAM 1 exprimierenden Zelltypen kurze und lange CEACAM 1-Isoformen ko-exprimieren (Singer et al., 2002). Die CEACAM3, CEACAM6 und CEACAM8-mRNAs werden hier noch nicht transkribiert. Interessanterweise werden CEACAM3 und 6 deutlich vor CEACAM1 als Protein auf der Zelloberfläche der sich differenzierenden Zellen exprimiert (Abb.19). Erst nach 18 h ist die mRNA von CEACAM3 und 6 nachweisbar (Abb. 21, C). Sie werden, wie schon bei der FACS-Analyse zu sehen, zeitgleich transkribiert und anschließend wahrscheinlich recht zügig translatiert. Die mRNA, die CEACAM8 kodiert, wird wie die Oberflächenexpression von CEACAM8 als letztes gemessen, die mRNA erscheint jedoch bereits an Tag 2 (Abb. 21, D) und damit deutlich früher als das Protein auf der Zelloberfläche, wo es erst an Tag 5 exprimiert wird.

Bei allen Kombinationen, die kein ATRA enthalten, werden, wie schon in der Durchflusszytometrie zu sehen, keine CEACAMs gebildet. Es wird jedoch deutlich, dass sich die Zeitpunkte der Oberflächenexpression und der Transkription unterscheiden, denn CEACAM1 liegt zwar als erstes auf RNA-Ebene vor, wird aber erst nach CEACAM 3 und 6 auf der Zelloberfläche sichtbar und erreicht genau wie CEACAM8 erst 2 – 3 Tage nach Transkription seine maximale Expression auf der Zelle, während CEACAM3 und 6 schon kurz nach ihrer Transkription exprimiert werden. Dies bedeutet auch, dass sich die Transkriptionskinetiken der CEACAMs untereinander ebenfalls unterscheiden.

### Translation von CEACAMs in NB4-Zellen nach ATRA-Behandlung

Da CEACAMs sowohl auf RNA-Ebene als auch auf der Zelloberfläche nachzuweisen waren, lag die Vermutung nahe, dass wie für reife Granulozyten beschrieben CEACAM 1, CEACAM 6 und CEACAM 8 auch intrazellulär in bestimmten Granula gespeichert vorliegen und nach Zellaktivierung durch Degranulierung auf die Zelloberfläche gelangen. Des Weiteren ist für CEACAM 1 eine granulozytenspezifische Glykosylierung beschrieben worden, welche bewirkt, dass das CEACAM 1 aus Granulozyten mit ca. 160 kD deutlich größer ist als das CEACAM 1 mit 120 kD, welches in anderen Zellen (z.B. Epithel, Lymphozyten, Endothel) exprimiert wird (Singer et al., 2002). Bei der Glykosylierung handelt es sich um einen hochspezifischen, post-translationalen Prozess, bei dem sich unter anderem die Proteinstabilität oder die Bindungsaffinitäten zu bestimmten Bindungspartnern ändern.

Um der Frage nachzugehen, ob CEACAM 1 in differenzierten NB4-Zellen die gleiche Größe aufweist wie in humanen Granulozyten, wurden Proteine lysierter humaner Granulozyten, lysierter und differenzierter NB4-Zellen und lysierter CEACAM 1-transfizierter HeLa-Zellen in einem 9%-igen Tricin-Gel nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt und geblottet. Das in den von Cervixkarzinomzellen abstammenden HeLa-Zellen vorkommende CEACAM 1 weist eine Größe von ca. 120 kD auf und ist damit kleiner als das von humanen Granulozyten mit 160 kD. In HeLa-Zellen kommt CEACAM 1 nicht endogen vor, da sie transfiziert sind, d.h., es ist künstlich CEACAM 1-DNA von außen eingebracht worden.



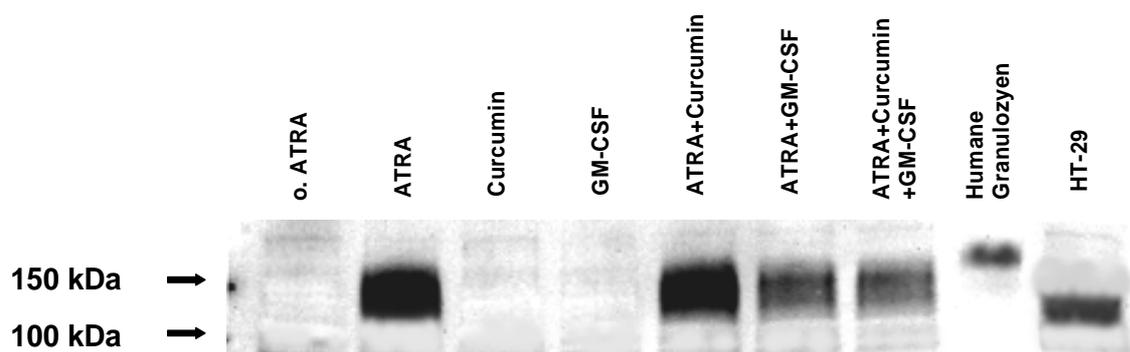
**Abb. 22: Western-Blot von NB4-Zellen auf CEACAM 1.**

Polyacrylamidgelelektrophorese von differenzierten NB4-Zellen. Es wurden jeweils 100µg Protein lysierter humaner Granulozyten aus Blut von Mitarbeitern,

lysierter CEACAM 1-positiver HeLa-Zellen sowie lysierter, über 5 Tage mit 1µM ATRA differenzierter NB4-Zellen in einem 9%-igen Tricin-Gel laufen gelassen. Anschließend wurde der Blott mit 5µg/ml des anti-CEACAM 1/5 –Antikörpers 4/3/17 inkubiert. Als Zweitantikörper wurde anti-Maus-HRPO verwendet.

Wie in Abb. 22 zu erkennen ist, liegt das Molekulargewicht des in differenzierten NB4-Zellen gebildeten CEACAM 1 bei ca. 140 kD und damit annähernd bei dem von humanen Granulozyten und ist damit deutlich größer als CEACAM 1 aus den CEACAM 1- transfizierten HeLa-Zellen.

Auch der Western-Blot für alle Kombinationen bestätigte die zuvor gezeigten Ergebnisse, nämlich dass die Differenzierung der NB4-Zellen von dem Vorhandensein von ATRA abhängt (Abb. 23).

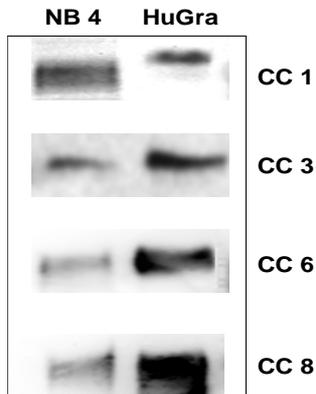


**Abb. 23: CEACAM 1 in Proteinform in unterschiedlich differenzierten NB4-Zellen.**

Western-Blot von NB4-Zellen auf CEACAM 1. Es wurden jeweils 100µg Protein lysierter humaner Granulozyten aus Blut von Mitarbeitern, sowie lysierter, über 5 Tage mit 1µM ATRA differenzierter NB4-Zellen und lysierter CEACAM1-positiver HT-29 in einem 9%-igen Tricin-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde der Blott mit 5µg/ml des anti-CEACAM 1/5 –Antikörpers 4/3/17 inkubiert. Als Zweitantikörper wurde anti-Maus-hrp verwendet.

Wie bereits in vorhergehenden Versuchen zu sehen, bewirken weder GM-CSF noch Curcumin allein eine Differenzierung der NB4-Zellen, während in allen Kombinationen, in denen ATRA enthalten ist, CEACAM1 in den Zellen exprimiert ist. Dabei unterscheiden sich die Größen von CEACAM1 in den unterschiedlich differenzierten NB4-Zellen nicht voneinander. Humane Granulozyten wiesen hingegen eine höhere, humane Kolon-Epithelzellen (HT-29) eine deutlich geringere Größe auf. Im Folgenden wurden auch die Größen von CEACAMs3, 6 und 8 in den NB4-Zellen nach Differenzierung durch ATRA analysiert, die jedoch aus technischen Gründen

mit Hilfe der Immunpräzipitation durchgeführt wurden (Abb. 24). Die molekulare Größe der einzelnen CEACAMs wies keinerlei auffällige Unterschiede im Vergleich zu humanen Granulozyten auf.



**Abb. 24: Western-Blot aller CEACAM-Formen in differenzierten NB4-Zellen.** IP mit Western-Blot. Die

lysierten Zellen (je 100  $\mu$ g) wurden mit einem polyklonalen Antikörper Kaninchen-anti-CEACAM mit einer Konzentration von 5 $\mu$ g/ml immunpräzipitiert, dann mit den unten aufgeführten Antikörpern detektiert und mit dem Zweitantikörper anti-Maus-HRPO gefärbt.

HuGra = Humane Granulozyten, CC= CEACAM;

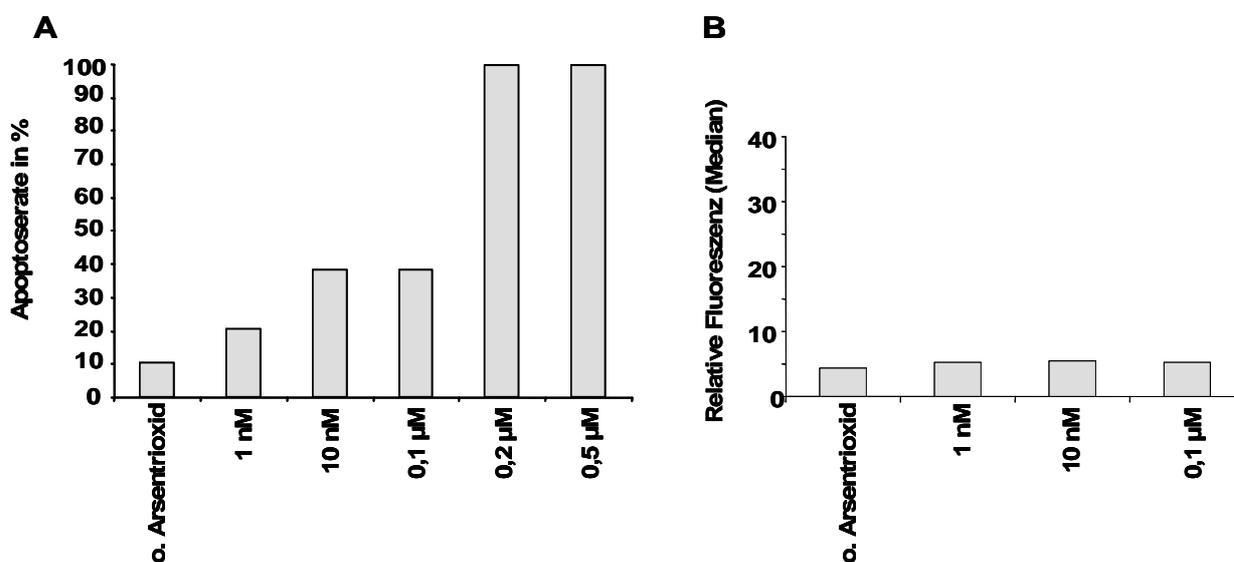
Antikörper: CC1 = 4/3/17, CC3 = Col 1,

CC 6 = 13H10, CC 8 = anti-CD 66b

#### IV. Arsentrioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) beeinflusst die Apoptoserate von NB4

##### Arsentrioxid steigert die Apoptose in NB4-Zellen, induziert jedoch keine CD 11b-Expression

Arsentrioxid wird in der Behandlung von APL-Patienten (Zhi-Xiang et al., 1997) verwendet und ist vor allem dann von Bedeutung, wenn es unter den Leukämiezellen zur Ausbildung einer Resistenz gegen ATRA kommt. Es wird weiterhin beschrieben, dass Arsentrioxid in bestimmten Konzentrationen in der Lage ist, ähnlich wie ATRA Differenzierungen von APL-Zellen zu bewirken (Di Noto et al, 1999). Daher sollte versucht werden, NB4-Zellen zu differenzieren und die Höhe der eventuellen CEACAM-Expressionen mit denen unter ATRA-Differenzierung zu vergleichen.



**Abb. 25: Wirkung von Arsentrioxid-Behandlung auf NB4-Zellen.** A) Einfluss von Arsentrioxid auf die Apoptose von NB4-Zellen nach 9 Tagen Inkubation B) Messung der CD11b-Expression auf NB4-Zellen nach 9 Tagen. Diese wurden über 5 Tage mit Arsentrioxid in verschiedenen Konzentrationen differenziert und zunächst mit Hilfe des Erstantikörpers anti-CD11b (Maus-anti-human, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mit der Durchflusszytometrie auf das Vorkommen von CD 11b auf der Zelloberfläche untersucht. Für die Bestimmung der Apoptoserate wurden die Zellen erneut in 200ml suspendiert und mit 5 $\mu\text{l}$  Propidiumjodid angefärbt.

Es konnte zwar gezeigt werden, dass Konzentrationen über 0,2  $\mu\text{M}$  Apoptose induzieren, jedoch konnte keine Expression von CD 11b auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 25). Aus diesem Grund wurde auf eine weitere Analyse von Differenzierungsmarkern wie CEACAM 1 verzichtet.

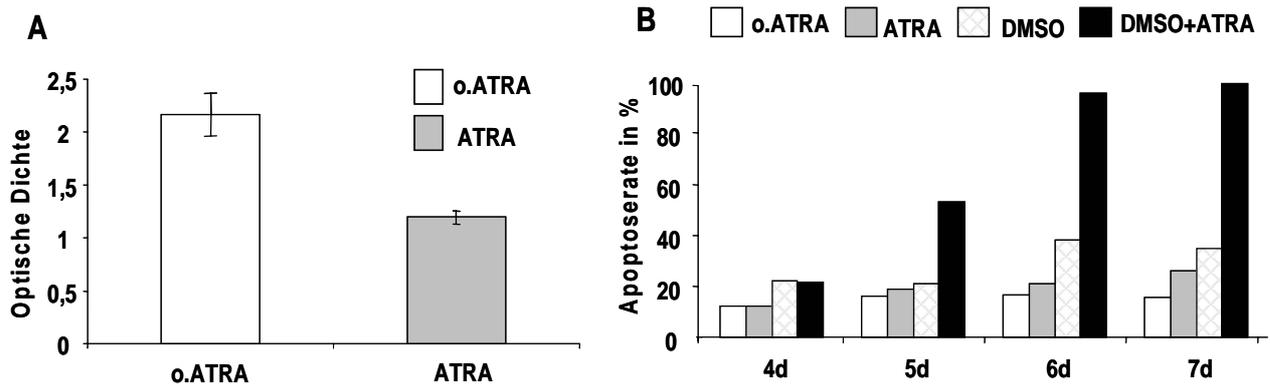
## **V. Einfluss von ATRA auf die Differenzierung von HL-60-Zellen**

### **ATRA verändert Proliferationseigenschaften und induziert Apoptose in HL-60-Zellen**

In der Literatur wird beschrieben, dass ATRA nicht nur NB4-Zellen, sondern auch AML-Zelllinien differenzieren kann und sich das Muster der Oberflächenexpression ändert, indem CEACAM 1 und CD 11b exprimiert werden (Iketzoe et al., 2000). In der Therapie der AML sind bereits erfolgreiche Behandlungsversuche mit ATRA in der Induktionsphase durchgeführt worden (Arsenou et al., 2005). Eine etablierte AML-Zelllinie stellt HL-60 dar, die als runde Einzellzellen in Suspension wuchsen und auf ihrer Oberfläche keine CEACAMs oder CD 11b exprimieren. Es ist bekannt, dass HL-60 neben ATRA auch gegenüber Dimethylsulfoxid (DMSO) empfindlich sind. Bei DMSO handelt es sich um ein organisches Lösungsmittel, welches in der Pharmaindustrie häufig als Trägersubstanz für Medikamente dient, indem DMSO das Eindringen der in ihm gelösten Medikamente über die Haut erleichtert. Die Kombination von ATRA mit DMSO soll in HL-60 die Differenzierung der Zellen verstärken und zur Expression von CEACAM 1 auf der Zelloberfläche führen (Trayner et al, 1997; Pantelic et al., 2004).

Es sollte daher untersucht werden, inwieweit das Verhalten von HL-60-Zellen bei Differenzierung mit ATRA mit dem von NB4 zu vergleichen ist, ob ATRA Apoptose induzieren kann, und CEACAMs auf der Oberfläche der Zellen exprimiert werden. Des Weiteren sollte die Kombination mit DMSO auf eventuelle Verstärkung einer Differenzierung untersucht werden.

Zuerst sollte der Einfluss von ATRA auf die Proliferationsrate von HL-60-Zellen untersucht werden, wozu die Zellen mit ATRA differenziert und anschließend im Proliferationsassay mit Hilfe des CellTiter 96<sup>®</sup>-Kits (Promega GmbH) auf ihre Proliferationsaktivität getestet wurden. In Abb. 26 (Figur A) wird dabei deutlich, dass die Proliferationsaktivität der mit ATRA behandelten HL-60-Zellen genau wie bei den behandelten NB4-Zellen deutlich gegenüber den unbehandelten Zellen reduziert ist. Dabei ist die Proliferation bei den unbehandelten Zellen fast doppelt so hoch (2,2 zu 1,2).



**Abb. 26: Veränderungen in HL-60-Zellen unter ATRA-Inkubation.**

A) Zellproliferationsassay von HL-60-Zellen nach Inkubation mit  $1\mu\text{M}$  ATRA über 5 Tage mit Hilfe des CellTiter 96<sup>®</sup>-Kits

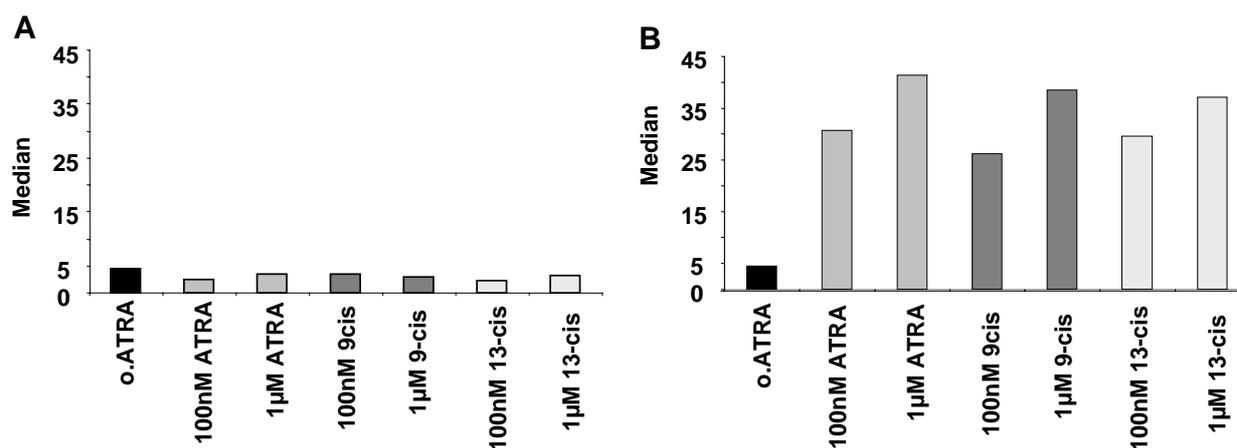
B) Apoptoserate von HL-60 mit Durchflusszytometrie. Dazu wurden die HL-60-Zellen mit  $1\mu\text{M}$  ATRA, 1,25% DMSO, der Kombination aus beiden und ohne ATRA über verschiedene Zeiträume inkubiert und anschließend mit Hilfe von PJ angefärbt.

Die Apoptoseraten der Zellen zeigen, dass offensichtlich die nur mit ATRA oder DMSO behandelten Zellen wesentlich niedrige Apoptoseraten besitzen, als die mit der Kombination aus beiden behandelten, welche nach 7 Tagen zu 99,3 % gestorben sind. Entgegen dem Verhalten der NB4-Zellen ist bei den HL-60-Zellen bei reiner ATRA-Behandlung kein Zusammenhang zwischen sinkender Zellvitalität und Proliferation – also Zellvermehrung – und gesteigener Apoptoserate, die den Anteil toter Zellen wiedergibt, zu finden. Nichtsdestotrotz sind auch bei den der Einfachbehandlung mit ATRA oder DMSO unterzogenen Zellen wieder erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu sehen, welche jedoch niedriger ausfallen als bei den NB4-Zellen, wo am Ende des fünften Tages der Differenzierung sämtliche Zellen in Apoptose gehen.

## ATRA und DMSO induzieren die Expression von CD11b und CEACAM1 auf HL-60-Zellen

Zuerst sollte die Frage der ATRA-Konzentrationen geklärt werden, indem die HL-60-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von ATRA, 9-cis und 13-cis-RA behandelt wurden. Dabei wurden die Zellen unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen für 5 Tage inkubiert und anschließend die Expression von CEACAM 1 und CD11b als Differenzierungsmarker bei Granulozyten in der Durchflusszytometrie gemessen.

Es ist dabei zu sehen, dass sämtliche Retinsäurederivate allein nicht in der Lage sind, eine Differenzierung der HL-60-Zellen zu bewirken, die zu einer Expression von CEACAM 1 (Abb. 27 Figur A) auf der Zelloberfläche führt. Es ist jedoch möglich, mit ihnen eine CD11b-Expression zu induzieren (Abb. 27, Figur B). Dabei erweist sich erneut 1 $\mu$ M ATRA als stärkstes Differenzierungsmittel, auch wenn die Unterschiede marginal ausfallen.



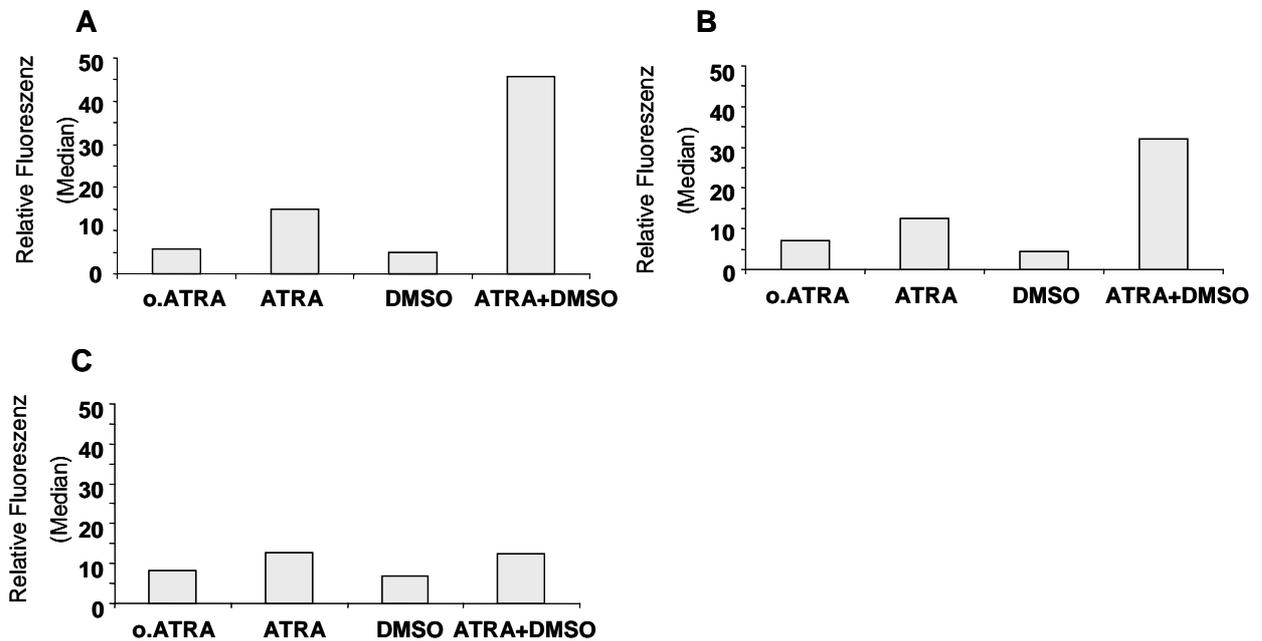
**Abb. 27: Expressionsanalyse von CEACAM 1 und CD11b auf HL-60-Zellen nach Titration mit RA-Derivaten.** A) CEACAM 1-Expression B) CD11b-Expression

Durchflusszytometrie nach 5 Tagen mit 18/20 und anti-CD11b (je 10 $\mu$ g/ml) als Erstantikörper

ATRA und seine Derivate können also allein nicht die Expression von CEACAM 1 auf der Zelloberfläche von HL-60 induzieren. Nun wurde der Versuch unternommen, eine Expression von CEACAM 1 mit Hilfe einer Kombination von DMSO und ATRA zu induzieren. Hierzu wurden die ermittelten Konzentrationen von 1 $\mu$ M ATRA und 1,25% DMSO verwendet und die Zellen erneut über 5 Tage inkubiert.

## Ergebnisse

In der Durchflusszytometrie wurde dabei neben CEACAM 1 und CD 11b auch CEACAM 6 gesucht.



**Abb. 28: Expression von CEACAM 1 (A) und CD 11b (B) und CEACAM 6 (C) auf HL-60-Zellen.** Inkubation der Zellen über 5 Tage mit den jeweiligen Kombinationen und 1 $\mu$ M ATRA und 1,25% DMSO. Die verwendeten Erstantikörper sind 18/20, anti-Cd66b, 13H10 (jeweils 10 $\mu$ g / ml).

Die Versuche ergaben, dass alleinige DMSO-Gabe keinerlei Einfluss in Bezug auf die Induktion der Expression von CEACAMs oder CD 11b hat, während ATRA allein eine – wenngleich geringe – Induktion bewirken kann. Auch die in den Voruntersuchungen festgestellten Ergebnisse (siehe oben), bei denen eine CD 11b-Expression durch ATRA auf HL-60-Zellen gefunden wurde, konnten nicht bestätigt werden. Kombiniert man jedoch ATRA und DMSO, so werden in der Tat sowohl CEACAM 1 (Abb. 28, Figur A) als auch CD 11b (Abb. 28, Figur B) exprimiert. Für CEACAM 6 konnte hingegen keine nennenswert erhöhten Expressionen nachgewiesen werden. HL-60-Zellen können demnach nicht wie NB4-Zellen einfach mit ATRA differenziert werden, sondern bedürfen einer Kombination mit DMSO, wobei auch hier nicht alle CEACAMs auf der Zelloberfläche nachzuweisen waren.

## Diskussion

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine schwerwiegende Erkrankung hämatopoetischer Stammzellen. Eine Sonderform stellt die akute Promyelozytenleukämie (APL) dar, welche durch spezifische Translokationen, die konstant Chromosom 17 involvieren, charakterisiert ist: die häufigste Translokation ist  $t(15;17)$ . Dabei kommt es zu einer Reifungsstörung der myeloischen Zellreihe der Hämatopoese und somit zu einer Vermehrung der unreifen Vorstufen der myeloischen Zellreihe, den Promyelozyten.

Gegenüber den anderen Formen der AML hat die APL eine deutlich bessere Prognose, denn für sie steht mit all-trans-Retinsäure (ATRA) eine zielgerichtete Therapie zur Verfügung, welche eine sehr hohe komplette Remissionsrate aufweist. ATRA überwindet dabei die Differenzierungsblockade, indem es an den RXR/RAR $\alpha$ -Rezeptor-Komplex bindet, der über eine Regulation der Transkription die Differenzierung der malignen Blasten hin zu reifen Granulozyten induziert (Nakamaki et al., 1989). Dies hat den Vorteil, dass die im Gegensatz zu den malignen Blasten kurzlebigen Granulozyten bereits nach 8-16 h in Apoptose gehen und von Makrophagen auf natürliche Weise gefahrlos entsorgt werden. ATRA sorgt allerdings nur für eine Remission auf zellulärer Ebene, d.h., dass das Transkript PML/RAR $\alpha$  in einigen verbliebenen malignen Zellen (etwa ATRA-resistente Zellen) noch mittels biochemischer Nachweismethoden (z.B. PCR) gefunden wird und wenn sich keine Chemotherapie (z.B. mit Cytarabin) anschließt, die die verbliebenen Zellen in Apoptose treibt, ein Rezidiv innerhalb weniger Monate erfolgt (Zheng et al., 2007).

Da nicht selten Resistenzen gegen ATRA festgestellt werden – verstärkt bei Rezidiven der Erkrankung – und daher ein Versagen der Induktionstherapie mit ATRA die Folge ist (Nason – Burchenal et al., 1998), wird in jüngster Zeit alternativ bzw. ergänzend die APL-Behandlung mit Arsentrioxid (Medikamentenname Trisenox ®) postuliert, die nicht nur die Differenzierungsblockade aufhebt, sondern auch direkt den PML/RAR $\alpha$ -Abbau in den Leukämiezellen stimuliert und im Gegensatz zu ATRA somit zu einer Remission sogar auf molekularer Ebene führen kann (Zheng et al., 2007).

In dieser Arbeit wurden neben ATRA und Arsentrioxid noch GM-CSF sowie Curcumin allein oder in Kombination mit ATRA verwendet. GM-CSF dient bereits zur Behandlung der Neutropenie bei Chemotherapie als Infektionsprophylaxe, indem es die Granulopoese verstärken (Link et al., 2000). Bei Curcumin handelt es sich um ein altes chinesisches Heilmittel, welches

auf Grund seiner anti-kanzerogenen Wirkung schon in Versuchen zur Differenzierung von Leukämiezellen in Kombination mit ATRA verwendet wurde (Song et al., 2005; Liu et al., 2007).

Wenn eine ATRA bzw. Arsentrioxid-Behandlung tatsächlich zur Differenzierung der APL-Zellen führt, so müssten auch die für reife Granulozyten charakteristischen Eigenschaften wie die Expression von bestimmten Oberflächenproteinen oder deren Granularität nachweisbar sein. Deshalb untersuchten wir gut etablierte Zelllinien von APL (NB4-Zellen) und AML (HL-60-Zellen) mit und ohne ATRA bzw. Arsentrioxid-Behandlung und in verschiedenen Kombinationen mit den oben genannten Therapeutika.

Neben der Bestimmung der Zellgröße, der Granularität, der Proliferations- und Apoptoserate und der Degranulationsfähigkeit dienten bei diesen Ansätzen auch die Oberflächenexpression, Translation und Transkription bestimmter Zellmarker (neben CD 11b die CEACAMs 1, 3, 6 und 8) sowie die Glykosylierungsstärke und exprimierten Isoformen von CEACAM 1. Bei den CEACAMs handelt es sich um Mitglieder der Ig-Superfamilie, die wichtige Bereiche der immunregulatorischen Fähigkeiten der Granulozyten wie z.B. die Migration beeinflussen und von denen CEACAM 3 und 8 charakteristisch für humane Granulozyten sind.

### **ATRA führt zu einer Veränderung von Zellgröße, Granularität und Proliferationsverhalten von NB4-Zellen**

ATRA sorgt dafür, dass es zu einer Differenzierung der Blasten hin zu Granulozyten kommt, die einmal initialisiert nicht reversibel war. In dieser Arbeit wurden nun die Zellen der APL-Zelllinie NB4 mit Hilfe von ATRA allein und in verschiedenen Kombinationen mit GM-CSF und Curcumin zu Granulozyten differenziert. Dabei konnte mittels Durchflusszytometrie gemessen werden, dass nicht nur die Zellgröße der mit ATRA behandelten Zellen zunahm, sondern sich auch die für Granulozyten typische gesteigerte Granulierung der Zellen zeigte. Die differenzierten Granulozyten hatten darüber hinaus eine deutlich niedrigere Proliferationsrate und eine höhere Apoptoserate als die undifferenzierten NB4-Zellen, was dem Verhalten reifer Granulozyten entspricht, die sich nicht mehr vermehren. Ab Tag 5 gingen die ATRA-behandelten Zellen dann endgültig in Apoptose, was darauf schließen lässt, dass sie um den Tag 5 herum ihre Differenzierung abschließen und dann der Kurzlebigkeit reifer Granulozyten

folgend (8-16 Stunden) sterben. Die kombinierte Gabe von GM-CSF und Curcumin hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Differenzierungsparameter, was verwunderlich ist, da GM-CSF eigentlich für seinen Apoptose- verzögernden Effekt auf Granulozyten bekannt ist (Singer et al., 2005).

### **Expression von CEACAM 1, 3, 6 und 8 in differenzierten NB4-Zellen nach ATRA-Gabe auf der Zelloberfläche**

Das Leukozyten-assoziierte Protein CD11b dient bisher als etablierter Differenzierungsmarker für Granulozyten. Die Expression von CD11b kann auch auf NB4- und HL-60-Zellen durch die ATRA-Therapie induziert werden (Di Noto et al., 1996; Zang et al., 2002, Lee et al. 2002). Die Expression von CEACAM1-3L und CEACAM1-4L, sowie den CEACAMs 3, 6 und 8 auf murenen Granulozyten, ist jedoch bisher wenig oder gar nicht untersucht worden.

Auf der Oberfläche differenzierter NB4-Zellen wurde neben CD11b auch CEACAM 3 und CEACAM 6 beschrieben (Iketzoe et al., 2000; Barber et al., 2007), und auf differenzierten HL60-Zellen CEACAM 1 und CEACAM 3 (Pantelic et al., 2004; Iketzoe et al., 2000).

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass nach ATRA-Behandlung neben CD 11b auch CEACAM 1, 3, 6 und 8 auf der Zelloberfläche von NB4-Zellen exprimiert werden. Zu einer deutlichen Erhöhung der Expression kam es, wenn die differenzierten Zellen mit fMLP stimuliert wurden, was dazu führte, dass die in Granula gespeicherten Proteine an die Zelloberfläche gelangten. Die Fähigkeit zur Degranulation ist charakteristisch für Granulozyten.

### **Die Expressionskinetiken der CEACAMs unterscheiden sich voneinander**

Undifferenzierte NB4-Zellen exprimierten weder CEACAMs noch CD 11b auf der Zelloberfläche. Wie bei einer Differenzierung hin zu Granulozyten zu erwarten, führt ATRA-Behandlung zur Expression von CD11b, CEACAM 1, 3, 6 und 8 auf der Membranoberfläche von differenzierten NB4-Zellen. Interessanterweise tauchen aber nicht alle CEACAM Proteine zeitgleich auf der Zelloberfläche auf, sondern folgen einer speziellen Kinetik. An Tag 2 nach ATRA-Gabe als erstes CEACAM 3 und 6, deren Kinetiken annähernd identisch sind, dann folgt an Tag 3 der plötzliche Anstieg von CEACAM 1, der sein Maximum an Tag 4 erreicht und danach wieder etwas abfällt. Als letztes erreicht CEACAM 8 an Tag 5 sein Maximum, woraufhin die differenzierten NB4-Zellen in Apoptose gehen und an Tag 6 alle tot sind.

Auffällig ist, dass kurz nach der Expression von CEACAM 8 die NB4-Zellen in Apoptose treten, was vermuten lässt, dass CEACAM 8, eventuell in Kombination mit einem anderen CEACAM, an diesem Vorgang beteiligt ist. Für CEACAM 8 wurde bisher nur eine Interaktion mit CEACAM 6 beschrieben (Oikawa et al., 1991), prinzipiell sind jedoch weitere Interaktionen, etwa mit dem ebenfalls erst nach CEACAM 3 und 6 exprimierten CEACAM 1 denkbar.

Für CEACAM 1 wurde sowohl ein anti-apoptotischer Effekt in Monozyten (Yu et al., 2006) als auch eine pro-apoptotische Wirkung in Verbindung mit UspA1 (einem Protein des Konjunktivitis-Erregers *Moraxella catarrhalis*) beschrieben (N`Guessan et al., 2007). In Granulozyten ist jedoch bisher nur seine Funktion bei Adhäsion und Aktivierung der Granulozyten bekannt (Horst et al. 2004). Ähnliche Funktionen wurden auch für CEACAM 6 beschrieben (Barber et al., 2007)

### **Die CEACAM-Expression auf Transkriptionsebene unterscheidet sich von der auf Translationsebene**

Überraschend war, dass die Expressionskinetik auf Transkriptionsebene (mRNA) nicht der der Translationsebene entsprach. CEACAM 1 wird dabei als erstes CEACAM bereits nach 12 h transkribiert, während nach 18 h CEACAM 3 und 6 folgen und CEACAM 8-Transkripte erst nach 48 h nachweisbar waren. Blickt man auf die Oberflächenexpression, so fällt hingegen auf, dass hier zuerst CEACAM 3 und 6 an Tag 2 und dann erst CEACAM 1 an Tag 3 exprimiert werden, während CEACAM 8 auch hier als letztes folgt und somit den größten zeitlichen Abstand zwischen Transkription und Oberflächenexpression aufweist.

Interessanterweise treten hier nur die langen CEACAM 1-Isoformen CEACAM 1-4 L und 1-3 L auf, was klar darauf hinweist, dass ATRA reife Granulozyten entstehen lässt, bei denen keine kurzen Isoformen vorhanden sind (Singer et al., 2002).

In der RT-PCR wird außerdem deutlich, dass vor dem Beginn der Differenzierung der NB4-Zellen auch keine CEACAM-mRNA vorhanden ist, bereits kurz nach Beginn der ATRA-Gabe jedoch mit der Transkription begonnen wird. Das bedeutet, dass ATRA nicht dazu führt, dass bereits vorliegendes CEACAM auf die Zelloberfläche gelangt, sondern dass durch die ATRA-Gabe die CEACAM-Synthese erst aktiviert wird. Außerdem lässt sich von dem Zeitpunkt, an dem ein Protein transkribiert wird, nicht auf den Zeitpunkt schließen, an dem es auch translatiert wird.

### **Glykosylierung von CEACAM 1**

Die Größe von CEACAM 1 variiert in Abhängigkeit von der Glykosylierung. Die Glykosylierung von CEACAM 1 in humanen Granulozyten ist höher als bei CEACAM 1 in anderen Zellen. Im Western-Blot ließ sich erkennen, dass die Glykosylierung des CEACAM 1 bei differenzierten NB4-Zellen höher ist als in anderen Zellen, wie etwa CEACAM1-4L-transfizierten HeLa-Zellen. Mit einer Größe von ca. 150 kD entspricht die höhere Glykosylierung damit zwar noch nicht ganz der Größe, wie sie von humanen Granulozyten bekannt ist (160 kD), ist aber deutlich größer als die CEACAM 1 aus alle anderen Zelltypen, wo sie in etwa bei 120 kD liegt. Die Ursache für diese unterschiedlichen Glykosylierungsgrade ist nicht bekannt, steht aber wahrscheinlich mit der Funktion der jeweiligen Zellen in Zusammenhang. Eventuell erleichtern die Unterschiede zwischen der Glykosylierung von CEACAM 1 auf Granulozyten und z.B. Endothelien eine Bindung und damit die Migration. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, ob die migratorischen Eigenschaften der differenzierten NB4-Zellen durch die etwas niedrigere Glykosylierung beeinflusst werden.

### **Kombinationen von ATRA mit GM-CSF und Curcumin**

GM-CSF, bei dem es sich um einen Wachstumsfaktor für Granulozyten und Makrophagen handelt und der auch physiologisch im Menschen vorkommt, wird therapeutisch genutzt. Er dient zur Prävention und Verkürzung von Neutropenien in Chemotherapien, bei denen es zu einer Suppression des Knochenmarks und damit der Blutbildung kommt. Durch GM-CSF wird die Rate an schweren Infektionen auf Grund des geschwächten Immunsystems verringert (Link et al., 2001).

Desweiteren kann es die Differenzierung von APL-Zellen in Kombination mit ATRA verstärken (Imazumi et al., 1994; Gianni et al., 1994; Hsu et al., 1999) und dabei sogar ATRA-resistente Zellen in die Differenzierung treiben (Tsunumi et al. 1993; Wakayama et al., 1994).

Curcumin, eigentlich ein indisches Gewürz und traditionelles Heilmittel, weist anti-karzinogene Potenz auf: neben der Hemmung des Tumorwachstums in diversen Tumoren (Anto et al. 2002), wie zum Beispiel dem Prostatakarzinom (Nakamura et al., 2002), ist es auch als Proliferationshemmer in NB4-Zellen bekannt (Li et al., 2005). Außerdem induziert Curcumin dosisabhängig die Apoptose in HL-60-Zellen (Banjerdpongchai et al, 2002).

In dieser Arbeit wurden die Einflüsse von Curcumin und GM-CSF auf die CEACAM-Expression, aber auch auf die Apoptose und Proliferationsfähigkeit der differenzierten APL-Zellen untersucht.

Dabei zeigte sich für die verwendeten Substanzen, dass keine von ihnen allein zur Induktion der Differenzierung der NB4-Zellen in der Lage ist. Ihre Kombination mit ATRA bewirkt jedoch eine Oberflächenexpression der verschiedenen CEACAMs, wenngleich gegenüber der alleinigen ATRA-Gabe keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Expression bestehen und somit kein besonderer Effekt, wie aus der Literatur bei anderen Zellen wie HL-60 bekannt, vorkommt.

Auch die Transkription folgt derselben Kinetik wie nach alleiniger ATRA-Gabe.

Bei der Kombination von ATRA mit GM-CSF (jeweils mit und ohne Curcumin) unterscheiden sich die Expressionskinetiken von CEACAM 3 und 6 gegenüber denen bei reiner ATRA-Gabe oder ATRA und Curcumin: CEACAM 3 und 6 erreichen bereits an Tag 2 ihr Maximum und verbleiben auf diesem Stand, während bei alleiniger ATRA-Gabe ein annähernd kontinuierlicher Anstieg mit Erreichen des Maximums an Tag 5 vorliegt. Die Transkriptionskinetiken sind hingegen nicht verändert.

Die in Vorversuchen erzielten Steigerungen in der Expression von CEACAM 1 bei Verwendung von Curcumin in Kombination mit ATRA konnten ebenso wenig bestätigt werden wie die verlängerte Überlebenszeit (über den fünften Tag hinaus) der differenzierten Granulozyten bei Kombination von ATRA mit GM-CSF.

### **GM-CSF und ATRA bewirken die Differenzierung von NB4-Zellen zu Makrophagen**

Im Mikroskop ließ sich erkennen, dass sich bei den Ansätzen, die neben ATRA auch noch GM-CSF verwendet hatten, etliche Zellen als adhärent erwiesen. Sie waren größer als die übrigen NB4-Zellen und bildeten Dendriten aus. Da sowohl Makrophagen als auch Granulozyten von derselben Vorläufer-Zelle ausgehen, erschien die Entstehung durchaus sinnvoll. In der daraufhin durchgeführten indirekten Immunfluoreszenz konnte dann auch die Anfärbung der neu entstandenen Zellen mit dem Antikörper CD 14 gezeigt werden, einem für Makrophagen spezifischen Rezeptor, was den Schluss nahe legte, dass es sich bei den angefärbten Zellen tatsächlich um Makrophagen handelte.

GM-CSF bewirkt also eine Differenzierung der entarteten Vorläuferzellen zu Makrophagen. Ein interessanter Aspekt dabei ist, inwiefern der Anstieg der Makrophagenzahl als therapeutischer

Ansatz nutzbar ist, indem z.B. die in der Therapie verstärkt anfallenden Granulozyten, die vermehrt in Apoptose gehen, schneller oder effizienter abgebaut werden können. Dazu müsste überprüft werden, ob diese Zellen tatsächlich über alle Eigenschaften von Makrophagen verfügen.

Außerdem erscheint die Verwendung von GM-CSF in der APL-Therapie sinnvoll, da mit seiner Hilfe auch die seltenere Form mit Translokation (11;17) behandelbar ist (Jansen et al., 1999) und es bei Rezidiven in Kombination mit ATRA eine erneute Remission erzielen kann (Tsurumi et al. 1993; Wakayama et al., 1994).

### **CEACAM: Marker für Therapieerfolg und neuer Behandlungsansatz ?**

CEACAMs, insbesondere CEACAM 5, werden bereits als Tumormarker verwendet. Die Bestimmung von CEACAM 5 stellt hierbei eine etablierte Methode zur Verlaufskontrolle von malignen Erkrankungen wie dem Kolonkarzinom dar. Beim kolorektalen Karzinom sind häufig auch andere Mitglieder der CEA-Familie in ihrer Expressionsstärke beeinflusst. So ist z.B. CEACAM 1 oft herunterreguliert und CEACAM 6 erhöht (Nollau et al., 1997). Beim kleinzelligen Lungenkarzinom (Laack et al., 2002; Siene et al., 2003) und dem malignen Melanom (Thies et al., 2002) führt eine Erhöhung der CEACAM 1-Expression wiederum zu einer verschlechterten Prognose und erhöhtem Metastasenrisiko.

Die undifferenzierten APL-Tumorzellen weisen keine CEACAMs auf ihrer Zelloberfläche auf, exprimieren diese jedoch im Zuge der Differenzierung zum Granulozyten. Kommt es zu einem Versagen der Therapie, etwa weil im Zuge einer Rezidivkrankung eine ATRA-Resistenz entwickelt wird, so könnte auch die Expression von CEACAMs auf der Zelloberfläche ausfallen. Somit wäre das Fehlen der CEACAM-Expression als Marker einer nicht stattfindenden Differenzierung anzusehen und es müssten entsprechende Alternativtherapien eingeleitet werden.

CEACAMs spielen bereits eine Rolle in der Klinik in therapeutischen Konzepten, so z.B. in der Radioimmunotherapie der AML mit <sup>188</sup>Re-anti-CD66 monoklonalem Antikörper, in der Radioimmunodiagnostik und -therapie mit anti-CEA bei Kolonkarzinomerkkrankungen oder in der Prävention von organspezifischen Abstoßungsreaktionen bei Transplantaten.

Prinzipiell ist eine Nutzung des Wissens um die CEACAM-Expression auf den differenzierten Blasten in der APL-Therapie vorstellbar, indem man CEACAM-Antikörper-Gabe in das

Therapieschema mit einbezieht, die durch ihre Bindung an die CEACAMs Signalkaskaden auslösen könnte, die einen zusätzlich Effekt auf die Induktion der Apoptose haben könnten.

### **Arsentrioxid bewirkt keine Differenzierung von NB4-Zellen**

Das aktuelle Therapieregime sieht einen Einsatz von Arsentrioxid als Reservetherapeutikum im Falle eines Versagens der etablierten Therapie mit ATRA als Induktionsmedikament vor. Arsentrioxid kann ATRA-resistente APL-Zellen allein oder in Kombination mit ATRA in Apoptose bringen (Shen et al., 1997; Shao et al., 1998), und, im Gegensatz zu ATRA allein, auch auf molekularer Ebene eine Remission erzielen (Zheng et al., 2007). Da in der Literatur davon gesprochen wird, dass Arsentrioxid nicht nur zur Apoptose, sondern auch zur Differenzierung von APL-Zellen führt (Di Noto et al., 1999), wurden NB4-Zellen in der vorliegenden Arbeit mit Arsentrioxid behandelt.

Unter Verwendung von Arsentrioxid konnte dabei ab einer Konzentration 0,2  $\mu\text{M}$  eine Apoptose erreicht werden. Als Marker für eine Differenzierung wurde CD 11b gemessen, es konnte jedoch keine erhöhte Expression gemessen werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass es nicht zu einer Differenzierung der NB4-Zellen kommt. Eine Möglichkeit, eine Differenzierung zu erreichen, wäre die Kombination von ATRA und Arsentrioxid.

### **ATRA und HL-60-Zellen**

Bei HL-60-Zellen handelt es sich nicht um APL-, sondern um AML-Zellen. In der Therapie der AML werden derzeit Ansätze mit ATRA untersucht. So konnten HL-60-Zellen mit ATRA behandelt und dadurch sowohl in Apoptose getrieben (Arsenou et al., 2005) als auch differenziert werden. Dabei gibt es jedoch unterschiedliche Angaben dazu, ob CEACAMs induziert werden, oder nicht. In ersten Untersuchungen konnten keine CEACAMs auf der Zelloberfläche der HL-60-Zellen gefunden werden (Trayner et al., 1997), jedoch ist CD 11b auch für HL-60-Zellen ein Differenzierungsmarker und ist dementsprechend induzierbar (Trayner et al., 1997; Iketzoe et al., 2000; Barber et al., 2007). Iketzoe und Mitarbeiter (2000) fanden auch CEACAM 3 auf differenzierten HL-60-Zellen. Unter Verwendung von DMSO wurde die Expression von CEACAM 1 auf HL60-Zellen induziert (Pantelic et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die Expression verschiedener CEACAMs durch

die Behandlung mit ATRA und / oder DMSO induziert werden können und ob diese Expression wie auch bei NB4-Zellen als Marker für die Wirksamkeit der Therapie genutzt werden könnte. In unseren Versuchen zeigte sich, dass ATRA die Proliferationsfähigkeit von HL-60-Zellen senkt, aber ohne die Kombination mit DMSO nicht zu einer Differenzierung der Zellen führt. Kombiniert man ATRA und DMSO, so kommt es zur Expression von CD 11b und CEACAM 1 auf der Zelloberfläche, jedoch nicht von CEACAM 6.

## Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) und eine ihrer Untergruppen, die akute Promyelozytenleukämie (APL), gehören zu den erst im Erwachsenenalter auftretenden malignen Erkrankungen des Blutes. In dieser Arbeit wurden die APL-Zelllinie NB4 und die AML-Zelllinie HL-60 mit verschiedenen Therapeutika behandelt und unterschiedliche Parameter der Zelldifferenzierung und –viabilität untersucht. Zur Untersuchung der Differenzierung wurde sowohl der etablierte Oberflächenmarker CD11b als auch die bisher kaum untersuchten CEACAMs1 und 6 sowie die für Granulozyten spezifischen Marker CEACAM3 und 8 analysiert. Die Ergebnisse sollten darüber Aufschluss geben, in wie weit sich das Expressionsprofil der verschiedenen CEACAMs auf differenzierten und undifferenzierten AML/APL-Zellen als prognostischer Marker für die Wirksamkeit der Differenzierungs-Therapien verwenden lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Zellen der APL-Zelllinie NB4 unter dem Einfluss von Retinsäure (All-Trans Retinoic Acid, ATRA) hin zu neutrophilen Granulozyten differenzierten. Sie veränderten dabei sowohl ihrer Größe als auch ihre Granularität, ihr Proliferationsverhalten und ihre Morphologie granulozytenentsprechend. Zudem zeigten die mit ATRA differenzierten NB4-Zellen mit CD11b, CEACAM1, 3, 6 und 8 ein für Granulozyten typisches Expressionsprofil. Mittels RT-PCR wurden die Transkriptionskinetiken verschiedener CEACAMs nach ATRA-Gabe untersucht, wobei weder die Transkription noch die Proteinsynthese der verschiedenen CEACAMs zeitgleich stattfanden. Als erstes wurde CEACAM1, dann CEACAM3 und 6 und zuletzt CEACAM8 transkribiert. Das Expressionsmuster der vier CEACAM-Proteine auf der Zelloberfläche unterschied sich jedoch signifikant von der Reihenfolge des Auftretens der mRNA-Transkripte. Zuerst erschienen CEACAM3 und 6 gleichzeitig, dann folgte CEACAM 1 und als letztes wurde CEACAM8 exprimiert. Dieses Expressionsmuster der CEACAMs auf der Zelloberfläche final differenzierter NB4-Zellen entspricht dem von reifen humanen Granulozyten. Bei der Kombination von ATRA mit Curcumin und/oder GM-CSF konnten keine gesteigerten CEACAM-Expressionen oder verlängerte Überlebenszeiten der differenzierten Blasten nachgewiesen werden. Bei der Kombination von ATRA und GM-CSF differenzierten sich die NB4-Zellen teilweise zu Makrophagen, was für die ATRA-Therapie, bei welcher eine große Anzahl toter Leukämie-Zellen anfällt, von Bedeutung sein könnte.

Neben dem Oberflächenexpressionsmuster der verschiedenen CEACAMs wurden auch die molekulare Größe und die CEACAM1-Isoformen analysiert. Bekanntermaßen ist ein Großteil des Molekulargewichtes der verschiedenen CEACAMs auf ihre sehr starke Glykosylierung zurückzuführen. Diese Glykosylierung ist heterogen und variiert gerade bei CEACAM1 von Zelltyp zu Zelltyp. So zeigen humane Granulozyten eine deutlich höhere Glykosylierung (160 kD) als z.B. Epithelzellen mit (120 kD). Wir konnten nun zeigen, dass die molekulare Größe von CEACAM1 auf differenzierten NB4-Zellen nahe zu dem von humanen Granulozyten entsprach. Bei der Stimulierung der ATRA-behandelten NB4-Zellen mit fMLP kam es darüber hinaus zu einer schnellen Erhöhung der Oberflächenexpression von CEACAM1 und 6, was bedeutet, dass die differenzierten Zellen genau wie Granulozyten die Fähigkeit zur Degranulation besitzen. Eine weitere Besonderheit humaner Granulozyten ist, dass sie ausschließlich die langen Isoformen von CEACAM1 exprimieren. Wir fanden, dass dieses Merkmal auch für die final differenzierten NB4-Zellen zutrifft.

Werden HL-60-Zellen mit ATRA behandelt, so differenzieren sie im Gegensatz zu den NB4-Zellen nicht. Wird jedoch eine Kombination aus ATRA und DMSO verwendet, so kommt es zur Expression von CEACAM1. CEACAM6 konnte nicht nachgewiesen werden. Andere CEACAMs auf HL-60-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet.

Für Arsentrioxid konnte gezeigt werden, dass es weder auf NB4 noch auf HL-60-Zellen eine Oberflächenexpression von CEACAMs induziert. Es war jedoch dazu in der Lage, die beiden Zelltypen in Apoptose zu treiben.

## Materialien und Methoden

Viele der verwendeten Methoden sind gebräuchliche Arbeitsweisen in molekularbiologisch oder biochemisch arbeitenden Laboratorien, die in üblicher oder leicht abgeänderter Form angewendet wurden. Auf eine detaillierte Referenzliste bezüglich der Methoden wurde daher verzichtet. Alle gebräuchlichen Methoden und dazugehörige Referenzen sind in folgenden Protokoll-Sammlungen wiedergegeben: Ausubel *et al.* (2002): Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1+2; Maniatis *et al.* (1989): Molecular cloning: a laboratory manual Vol. 1-3.

### Geräte

Brutschrank (Heraeus 6000, Kendro); Coulter Particle Counter Z1 (Coulter); Feinwaage (Adventurer, Ohaus); Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B, Kendro Laboratory Products); Magnetrührer (IKAMAG, Roth); Lichtmikroskop (Diavert, Leica); Photometer (BioPhotometer, Eppendorf); Schüttel-Inkubator (Innova 4230 Shaker, Memmert); Sterilbank (Gelaire Class 100, Gelman Instruments); Thermomixer (5436, Eppendorf); Tischzentrifuge (Biofuge pico Heraeus, Kendro Laboratory Products); Ultraschall (Sonicator<sup>TM</sup> W-375, Heat Systems-Ultrasonics, Inc.); Ultrazentrifuge (Sorvall CombiPlus, Kendro Laboratory Products); Waage (CP622, Sartorius); Wasserbad (GFL); Schwenkrotor-Zentrifuge (Megafuge 1.0R, Heraeus);

Alle hier nicht aufgeführten Geräte sind unter ihrer jeweiligen spezifischen Anwendung angegeben.

### RNA-Isolierung (Gesamt-RNA) mit RNAzol

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus kultivierten Säugerzellen wurde RNAzol verwendet (Peqlab, Erlangen). Diese Methode hat den Vorteil, dass mit RNAzol versetzte Proben ohne die Gefahr einer Schädigung der enthaltenen RNA bis zu 6 Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden können.

$5 \cdot 10^6$  nach Wunsch behandelte eukaryote Zellen mit 1 ml RNAzol abschaben, mit einer Pipette homogenisieren und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren (oder die Probe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für einen späteren Gebrauch wegfrieren). 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugeben, 15 s kräftig schütteln, 3-10 min auf

Eis stellen und bei 4°C, 13.000 rpm 5 min zentrifugieren. Die obere Phase vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführen, 1 Volumen Isopropanol dazugeben, 5-10 min auf Eis inkubieren und bei 4°C, 13.000 rpm 10 min zentrifugieren. Das Pellet zweimal mit 70% EtOH waschen (vortexen, bei 4°C, 13.000 rpm 10 min zentrifugieren), kurz an der Luft trocknen und in 30-100 µl ddH<sub>2</sub>O lösen. Die RNA kann für alle gängigen Methoden wie z.B. RT-PCR verwendet werden. Alternativ wurde zur RNA-Isolierung das RNA-Total-Isolation-Mini-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Protokoll verwendet.

### **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Um die Menge und Reinheit der DNA bzw. RNA abzuschätzen, wird die Absorption der DNA- bzw. RNA-haltigen Lösung bei 260 bzw. 280 nm gemessen. Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren, bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenol. Aus dem Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  lässt sich somit auch ein Rückschluss auf die Reinheit der DNA/RNA ziehen, denn Werte unter 1,8 zeigen an, dass die Probe zu viele Proteine enthält, Werte über 2,0 weisen erfahrungsgemäß darauf hin, dass die Probe wahrscheinlich viel RNA bzw. DNA als Verunreinigung enthält. Über den Extinktionskoeffizienten für DNA bzw. RNA in wässrigen Lösungen lässt sich über das Lambert-Beer-Gesetz die Konzentration der DNA/RNA ermitteln. Eine  $OD_{260} = 1$  entspricht 50 µg/ml Doppelstrang-DNA, bzw. 40 µg/ml RNA.

### **Reverse Transkription von RNA (Erststrang-cDNA-Synthese)**

Reverse Transkriptasen sind in der Lage, RNA in DNA umzuschreiben, und so aus RNA eine für die PCR geeignet Matrizen-DNA herzustellen. Die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte mit dem Superscript-III-System von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Es wurden 5 µg Gesamt-RNA mit 250 ng Random-Primer (Random-Hexamere Oligonukleotide) und 1 µl 10 mM dNTP Mix zusammengegeben, auf 13 µl aufgefüllt, für 5 min auf 65°C erhitzt und sofort wieder auf Eis gelagert. Dann wurden 4 µl 5X First-Strand-Buffer, 1 µl 100 mM DTT, 1 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 1 µl Superskript III (200 U/µl) dazugegeben und der Ansatz 5 min bei 25°C, 60 min bei 50°C ( Erststrang-cDNA-Synthese ) und 15 min bei 70°C (Hitze-Inaktivierung) inkubiert. Die so erhaltene cDNA wurde dann als Matrix für weitere PCRs verwendet (siehe oben).

### **PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Die PCR ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte bis ca. 20 kb *in vitro*. Dazu werden Oligonukleotide (Primer) benötigt, die die zu amplifizierende Sequenz 5' und 3' flankieren, wobei der 5'-Primer in Sense-Orientierung und der 3'-Primer revers-komplementär zum abgelesenen DNA-Strang vorliegen muss. Die Primer sollten eine Länge von ca. 20 Nukleotiden besitzen sowie einen GC-Anteil von ca. 50-60% aufweisen, wobei es sich empfiehlt, die Schmelztemperaturen eines Primer-Paares möglichst nicht stark voneinander abweichen zu lassen. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch eine DNA-Polymerase in wiederholten Zyklen. Zuerst wird die DNA bei 94°C denaturiert, dann folgt die Bindung der Primer an die jetzt einzelsträngige DNA (*Annealing*) bei für die jeweiligen Primer spezifischen Temperaturen (*Annealing*-Temperatur). Anschließend erfolgt die eigentliche Amplifikation der DNA. Dazu wird die Temperatur dem jeweiligen Arbeitsoptimum der Polymerase angepasst, wobei für "Standard"-Polymerasen 72°C verwendet werden. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der von den Primern flankierten Transkripte, so dass man nach 24 Zyklen bei einer theoretischen Effizienz von 100 %  $2^{24}$  Transkripte pro Matrizen-DNA erhält.

Die zur Vervielfältigung von cDNA verwendeten Primer sind im Abschnitt PCR-Primer für verschiedene CEACAMs im Einzelnen aufgeführt. Für Test-PCRs wurde die rekombinante Taq von Fermentas (St. Leon-Roth). **Standard-Reaktionsansatz Taq rc** (Fermentas, St. Leon-Roth): 5 µl 10X Taq – Puffer, 2,5 µl 4 mM dNTP (each), 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl 10 pmol/ml Sense-Primer, 1,5 µl 10 pmol/ml Reverse-Primer, 1 µl Taq, 100 ng Matrizen-DNA, ad. 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

**Reaktionsverlauf einer PCR (Taq):** 1 Zyklus mit 2 min 94°C; 35 Zyklen mit 30 s 94°C, 30 s *Annealing*-Temperatur (60°C), 1 min pro kb zu vervielfältigender DNA 72°C; 1 Zyklus mit 1 min 72°C.

**PCR-Primer für verschiedene CEACAMs**

**Tabelle 2:** alle Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben; hu: human, FP: Forward Primer, BP: Backward Primer, CC: CEACAM

Transkript	Primer	Sequenz	Fragment-Länge (in Basenpaaren)
CEACAM 1L	huFP-CC1	GCAACAGGACCACAGTCAAGACGA	
CEACAM 1-4L/3L	huBP-CC1-long	GTGGTTGGAGACTGAGGGTTTGTG C	505/207
CEACAM 1-4S/3S	huBP-CC1-short	AGTGGTCCTGAGCTGCCGGTCTTC	461/167
CEACAM 3	CC3 neu sense	AGGCAGCAGAGACCATGG	
CEACAM 3	CC3 neu reverse	GAGAAGGCAGAGCTGTGG	570
CEACAM 6	CC6 neu sense	GTTCTTCTACTCGCCCACAAC	
CEACAM 6	CC6 neu reverse	CGTTCCTTTTGACCGCTGAGTAG	440
CEACAM 8	CC8 neu sense	ATCTCAGCCCCTTCCTGCAG	
CEACAM 8	CC8 neu reverse	CAGTTGTAGCCACGAGGGTC	180

**Agarosegel-Elektrophorese**

Die Auftrennung der DNA erfolgte je nach Größe der zu untersuchenden DNA in 0,8 (>5 kb) bis 3%igen (<100 bp) Agarosegelen (Standard: 1%). Die Agarose wird in 1x TAE-Puffer (0,04 M Tris/0,1% Acetat/2mM EDTA) durch Kochen gelöst und nach Abkühlen auf 50°C in entsprechende Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren der Agarose wird das Gel in die mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben werden mit Probenpuffer (10X Probenpuffer: 60% Glycerin, 200 mM EDTA, 0,0025% Bromphenolblau) versetzt, in die Taschen gefüllt und bei 75 V bis zur gewünschten Laufstrecke aufgetrennt. Nach 10-minütiger Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml), bei dem das Ethidiumbromid in

der DNA interkaliert und sie dadurch sichtbar macht, kann die DNA unter ultraviolettem Licht (366 nm) visualisiert und fotografiert werden. Alternativ zu Ethidiumbromidbad kann das Ethidiumbromid auch direkt in das Gel gegeben werden. Dazu die zur Homogenität gekochte Agarose in TAE auf ca. 60°C abkühlen lassen und 0,5 µl Ethidiumbromid-Stocklösung pro 100 ml Gellösung dazugeben. 50X TAE: 242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure (100%), 100 ml 0,5 M EDTA, ad. 1 l H<sub>2</sub>O. Größenstandard für dsDNA: 1kb-Plus DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe). Ethidiumbromid-Stocklösung: 10 mg/ml, bei 4°C oder RT aufbewahren.

### **Antikörper**

Der monoklonale Maus-anti-Ratten-CEACAM 1-Antikörper Be9.2 wurde in diesem Labor gewonnen (Becker et al., 1986). Andere benutzte Maus-monoklonale Antikörper: anti-CEACAM 1/5 (4/3/17, F. Grunert, Genovac, Freiburg); anti-CEACAM6 (13H10, F.Grunert, Genovac, Freiburg); anti-CEACAM1/5 (18/20, Singer, AG Reutter, Berlin); anti-CEACAM 1/3/4/5/6 (2D-3, Singer, AG Reutter, Berlin); anti-CEACAM 3/5 (Col-1, Dr J. Schlom NCI, USA), anti-CEACAM8 (80H3, Immunotech, Frankreich); anti-CD66b (Immunotools, Friesoythe; Deutschland); anti-CD11b FITC-konjugiert (Immunotools, Friesoythe; Deutschland); antiCD14 (Immunotools, Friesoythe; Deutschland) polyklonale Antikörper: Kaninchen-anti-Human-CEA (Dako, Dänemark); Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus und Ratte-anti-Maus; Ratte-anti-Ziege-IgG-HRPO-konjugiert; Ziege-anti-Kaninchen-HRPO-konjugiert; Ziege-anti-Human-HRPO-konjugiert (Jackson ImmunoResearch Europe, Cambridgeshire, UK).

### **Indirekte Immunfluoreszenz**

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird ein unmarkierter Antikörper an die spezifischen Antigenstrukturen der Zielzellen gebunden und in einem zweiten Schritt die Zellbindung des primären Antikörpers durch Anheftung eines sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers an diesen nachgewiesen. Die höhere Sensitivität der indirekten Methode im Vergleich zur direkten resultiert aus der Bindungsfähigkeit mehrerer Sekundärantikörper an den primären, was folglich zur Verstärkung des Signals führt. Ein weiterer Vorteil der indirekten Immunfluoreszenz ist, dass der Primärantikörper nicht direkt an einen Farbstoff gekoppelt sein muss.

Es können dazu verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. FITC und Cy-2 (grüne Emission), Rhodamin (rote Emission) und Propidiumjodid (dunkelrot fluoreszierender, in die DNA interkalierender Farbstoff) verwendet, wobei auch Mehrfachfärbungen möglich sind. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde beim FACS, ELISA und im Immunfluoreszenzmikroskop verwendet.

### **Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie beruht prinzipiell auf der Messung von Einzelzellen, die einzeln durch eine Kapillare gesaugt werden und dann eine Messeinheit passieren, in der sie von einem Argonlaser angestrahlt werden.

Über die von der Zelle verursachte Streuung des Lichtes erhält man Auskünfte über Größe (Vorwärtsstreuung, engl. "forward scatter" = FSC) und Granularität/Membranbeschaffenheit (Seitwärtsstreuung, engl. "side scatter" = SSC) der Zelle. Mit Hilfe dieser beiden Messparameter sind unterschiedliche Zellpopulationen identifizierbar (z.B. Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten). Die Zellen können außerdem mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden, die bestimmte Fluoreszenzimpulse emittieren, um weitere Informationen über Zellart und Zustand der Zelle zu erhalten.

Das FACS-Gerät von BD Biosciences Immunocytometry Systems verfügt über einen Argon-Laser, der eine Anregungswellenlänge von 488 nm generiert. Es stehen drei verschiedene Emissionskanäle zur Verfügung, so dass bis zu drei verschiedene Fluorochrome eingesetzt werden können, wenn ihre Anregung im Bereich von 488 nm und ihre Emission in nicht überlappenden Bereichen liegt (z.B. Fluorescein-Isothiocyanat/FITC und Phycoerythrin/PE bzw. Tetramethylrhodamine-Isothiocyanat/TRITC).

Die Zellen werden in kaltem FACS-Puffer (PBS mit 3 % FCS) gut vereinzelt und dann in 100 µl PBS/1% FCS oder PBS/1% BSA aufgenommen. Für die FACS-Analyse werden die Zellen gezählt und pro Ansatz 100.000 bis 500.000 Zellen eingesetzt. Alle folgenden Schritte erfolgen auf Eis.

Um die **spontane Apoptoserate** zu quantifizieren, wurden die Zellen 45 min mit 10 µg/ml Propidiumjodid (PJ, interkaliert in Nukleinsäuren) inkubiert.

Um die **Oberflächenexpression membranständiger Rezeptoren** zu testen, wurden die Zellen mit dem entsprechenden primären Antikörper (10 µg/ml in FACS-Puffer) für 1 h auf Eis inkubiert, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem fluoreszenz-

markierten sekundären Ziege-anti-Maus F(ab')<sub>2</sub> in PBS für 1 h auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden vor der Analyse dreimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Die Messung erfolgte am FACScan Instrument und wurde mit dem Lysis-II-Programm (beides BD Biosciences, CA, USA) ausgewertet. Grundsätzlich wurden Kontrollfärbungen mit einem Isotyp- übereinstimmenden Ig anstelle der Primärantikörper durchgeführt, da die FACS-Analyse eine relative und keine absolute Methode ist. Diese Kontrollfärbungen dienten zur Feststellung der jeweiligen Hintergrundfluoreszenz und zum Einstellen des FACScan-Instruments. Die Analyse der Daten erfolgte mit der CellQuest Software (BD Biosciences).

### **Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die Zellen wurden auf 8-Well-Zellkulturobjektträgern kultiviert (Plastik) und entsprechend der Fragestellung (Entstehung von Makrophagen bei GM-CSF-Stimulierung) stimuliert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur (RT) in 4% PFA/PBS fixiert. Waschen Die Objektträger wurden für 1 h mit 1% BSA/PBS blockiert, mit dem primären Antikörper CD14 (10 µg/ml) über Nacht bei 4 °C inkubiert, mit 1% BSA/PBS gewaschen und mit den entsprechenden CY2-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:250) für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die Objektträger wurden mit Elvanol eingedeckelt und über Nacht getrocknet. (Herstellung von Elvanol [70% PBS, 25% Glycerol, 5% Polyviol, 0,5% β-Mercaptoethanol, 1 mg/ml Phenylendiamin] : 3 g Polyviol in 40 ml PBS lösen und 16 h rühren lassen. 15 ml Glycerin zugeben und weitere 16 h rühren lassen. 15 min bei 12000 rpm [Sorvall] zentrifugieren, Überstand zur Weiterverwendung dekantieren. 1 mg Phenylendiamin/ml Gesamtvolumen zugeben und lichtgeschützt lösen. pH auf 8 einstellen, 250 µl Mercaptoethanol zugeben und lösen. Ansatz aliquotieren und bei -20°C aufbewahren)

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde bei vierzigfacher (Zeiss Plan-Neofluar; N.A. 0.90) bzw. 63-facher (Zeiss plan-Neofluar; N.A. 1.25) Vergrößerung mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop aufgenommen, welches mit dem 'AxioCam Digital System' (einer digitalen Schwarz-Weiß-Kamera) ausgerüstet war. Alle Bilder wurden zur weiteren Bearbeitung in Adobe Photoshop importiert.

### **Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

**BCA-Methode:** Prinzipiell wurde zur Proteinbestimmung in den Lysaten das BCA-Test-Kit der Firma Pierce verwendet. Dieses Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B (4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Proteine reduzieren im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ . Die Bichinonin-4-carbonsäure (BCA) reagiert mit  $\text{Cu}^+$ , wobei zwei Bichinoninsäure-Moleküle einen intensiv purpur-gefärbten Chelatkomplex mit dem  $\text{Cu}^+$ -Ion eingehen. Die Proben werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 200  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wird, versetzt. Nach Inkubation für ca. 45 min bei RT wird die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Aus BSA-Proben bekannter Konzentrationen kann eine Eichgrade erstellt werden, anhand derer die Konzentration der unbekannt Probe bestimmt wird.

### **Immunpräzipitationen**

Für Immunpräzipitationen wurden Lysate mit 100  $\mu\text{g}$  Protein mit 3 bis 5  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Antikörpers oder Ig-Kontrollen und 30  $\mu\text{l}$  Protein-G-Sepharose für 8 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Das Pellet wurde viermal mit eiskaltem Lysispuffer gewaschen.

Die pelletierte Protein-G-Sepharose wurde für die weiteren Analysen in 60  $\mu\text{l}$  reduzierendem Lämmli-puffer bei 5°C für 7 Minuten gekocht und damit für die weitere SDS-PAGE-Analyse vorbereitet.

### **SDS-PAGE nach Laemmli**

Für die vertikale Elektrophorese von Proteinen wurde das Mini-Protean-System II der Firma Biorad verwendet. Es wurden diskontinuierliche Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel verwendet. Es wurde zunächst das Trenngel gegossen und nach der Polymerisation desselben das Sammelgel darauf gegossen. Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Protein-haltigen Proben werden im Verhältnis 5:1 mit fünfmal reduzierender Probenpuffer (Lämmli) gemischt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel bei konstanter Spannung von 100 V und zur Auftrennung im Trenngel bei konstanter Spannung von 200 V.

**Lösung A:** 30% Acrylamid (w/v), 0,8% N,N'-Methylenbisacryl-amid (w/v). **Lösung B:** 0,2% SDS (w/v), 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. **Lösung C:** 0,2% SDS (w/v), 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8. **Trenngellösung:** (X%ig): (X/30)\*9 ml Lösung A; 2,25 ml Lösung B; 9-(LsgA+LsgB) ml ddH<sub>2</sub>O; 45 µl APS (10%); 4,5 µl TEMED. 4%ige **Sammelgellösung:** 0,4 ml Lösung A; 0,75 ml Lösung C; 1,85 ml ddH<sub>2</sub>O; 12 µl APS (10%); 3 µl TEMED. **Zehnfach Laufpuffer:** 0,25 M Tris, pH 8,8 (kein HCl! pH stellt sich ein!), 1,92 M Glycin, 1% SDS (w/v). **Einfach Laufpuffer:** 1 Vol 10X Laufpuffer, 1Vol EtOH, 8Vol ddH<sub>2</sub>O. **Fünffach Probenpuffer (reduzierend):** 12,5% SDS (w/v); 0,3 M Tris-HCl, pH 6,8; 50% Glycerin (v/v); 0,015% Bromphenolblau (w/v), 50 mM Dithiothreitol (DTT).

Es wurden vor allem Gele mit einer Prozentigkeit von 7,5% genutzt. Je höher die Prozentigkeit des Gels, desto langsamer laufen die Proteinbanden durch das Gel und desto weniger deutlich wird die Auftrennung zwischen den einzelnen Banden. Je kleiner das Protein ist, desto höher sollte die Prozentigkeit sein.

### Tricin-SDS-PAGE

Als Alternative zu den Lämmli-Gelen existiert auch das Tricin-Gel, dessen Vorteil die bessere Auftrennbarkeit eines breiteren Proteinbereiches (10 – 150 kD) darstellt. Mit Hilfe des Tris-Tricin-Systems können Proteine in einem Molekularbereich von 20-250 kD in einem Gellauf analysiert werden, was mit Lämmli-Gelen nur unter Verwendung von Gradienten-Gelen möglich ist. Durch das Glycerin im Trenngelpuffer ist es möglich, das Sammelgel sofort nach dem Einfüllen des Trenngels einzufüllen und beide Gele zusammen polymerisieren zu lassen. Die Trennung erfolgt während des Einlaufens der Proben ins Sammelgel bei 60 V und im Trenngel bei maximal 120 V. Die Laufzeit ist allerdings verlängert.

Lösungen für Tricin-Gelsysteme. **Anodenpuffer:** 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9. **Kathodenpuffer:** 0,1 M Tricin; 0,1% SDS; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3 (pH stellt sich von alleine ein). **Gelpuffer:** 0,3% SDS; 3 M Tris-HCl, pH 8,45. **Acrylamidstammlösung:** 30% Acrylamid (w/v), 0,8% N,N'-Methylenbisacryl-amid (w/v). Ansatz für 4 Minigele: **Trenngel:** 3,1 ml Acrylamidstammlösung; 5 ml Gelpuffer; 1,5 ml Glycerin; ad 15 ml ddH<sub>2</sub>O; 75 µl APS (10%); 7,5 µl TEMED. **Sammelgel:** 1 ml Acrylamidstammlösung; 3,1 ml Gelpuffer; ad 12,5 ml ddH<sub>2</sub>O; 100 µl APS (10%); 10 µl TEMED.

In der Regel wurden für die Sammelgele eine Prozentigkeit von 4% und für die Trenngele eine von 7 % oder 9% in Abhängigkeit von der Proteingröße verwendet.

### **Western-Blot**

Es wurde mit einer Blotapparatur der Firma Biorad geblottet. Direkt nach der Elektrophorese wird der Sandwich-Blot luftblasenfrei unter Blotpuffer zusammengebaut, so dass die Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) zur Anode zeigt (Whatman-Papier/Nitrozellulose/Gel/Whatman-Papier). Der Transfer wird bei 4°C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 60 min in Blotpuffer durchgeführt. Blotpuffer: 150 mM Glycin, 20 mM Tris-HCl, pH 8,3. 10% EtOH. Die Kontrolle des Transfers erfolgt durch Färbung der Proteine auf der Membran mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau-Rot. Nach ca. 1-minütiger Färbung in Ponceaulösung (fünffach Stammlösung: 2% Ponceau-Rot (w/v) 30% TCA (v/v), 30% Sulfosalicylsäure (w/v); Einmal-Lösung, wiederverwendbar) wird mit ddH<sub>2</sub>O wieder entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards werden markiert, dann wird die Membran in PBS (140 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,8) wieder komplett entfärbt.

### **Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran**

Die Nitrozellulosemembran wurde in 10% Magermilchpulver in PBS (140 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,8) für mindestens 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht blockiert. Alle anschließenden Inkubations- und Waschschrte werden in PBS bzw. PBS-T (PBS/0,1% Tween 20) bei einem pH von 7,8 durchgeführt. Die Membran wird mit dem ersten Antikörper in PBS und Milch (1%) mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wird 3 x 2 min mit PBS-T gewaschen und mit dem zweiten Antikörper, einem mit Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Antikörper, in PBS und Milch (1%) für 1 h bei RT inkubiert. Nach gründlichem Waschen (mindestens 3x 5 Minuten) in PBS-T wird das Tween 20 durch 2 x Waschen in PBS entfernt, da es die Peroxidase-Entwicklung stört. Der Blot wird mit der ECL-Methode entwickelt. Die Membran wird zwischen Plastikfolien gelegt, evtl. der Standard mit Leuchtknete (Spielwarengeschäft) markiert und mit einer Mischung aus 10 µl Lösung A, 1 ml Lösung B und 3 µl Lösung C betropft. Die Chemilumineszenz wurde mit dem digitalen Fujifilm LAS-1000 Imaging-System über eine CCD-Kamera erfasst und mit Hilfe der Multigauge (Fuchi) analysiert und quantifiziert. Die Aufnahmen wurden zur weiteren Bearbeitung in Adobe Photoshop importiert. Bei schwachen Blotsignalen wird ein Röntgenfilm

(BioMax Film, Kodak) für 5 s bis 30 min belichtet und anschließend in Entwickler- und Fixiererlösung (KodakGBX Entwickler- und Fixiererkonzentrat, 1:5 zu verdünnen) entwickelt. Lösungen für die Chemilumineszenz: Lösung A: 6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO. Lösung B: 1,25 mM Luminol in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5. Lösung C: 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (täglich frisch ansetzen).

## **Zelllinien und allgemeine Zellkulturbedingungen**

### **Zelllinien**

Die verwendeten Zelllinien sind NB4 (humane Akute-Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie), HL-60 (humane Akute-Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie), HeLa (Cervixkarzinom, epithelial, human) und stammen alle von der DSMZ aus Braunschweig. Die humanen Granulozyten wurden aus dem Blut gesunder Mitarbeiter gewonnen.

### **Allgemeine Kulturbedingungen**

Alle Säuger-Zelllinien wurden im Zellkultur-Brutschrank, (Heraeus 6000, Kendro Laboratory Products) bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und befeuchteter Luft kultiviert. Als Nährmedium wurde RPMI-1640 mit 10% FKS (fetales Kälberserum), 2mmol L-Glutamin und 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin verwendet. Die adhärennten Zellen (HeLa) werden bei 80-90% Konfluenz alle 3–4 Tage passagiert. Zum Ablösen der Zellen wurden diese zunächst gewaschen, anschließend für 3–5 Minuten trypsiniert (Trypsin von Invitrogen) und schließlich in 5 ml Medium mit 10% FCS (blockt Trypsin) je Falcon-Röhrchen resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden nun in entsprechenden Fraktionen auf die neuen Kulturschalen / -flaschen verteilt.

Die in Suspension vorkommenden Zellen (NB4, HL-60) wurden hingegen für 3 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute pelletiert, das Medium abgesaugt und verworfen und die Zellen mit Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Neubauersystem gezählt und mit entsprechenden Verdünnungen ausgesät oder für die jeweiligen Ansätze verwendet. Die Zellkultur-Materialien stammen von den Firmen BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Biochrom KG (Berlin), Corning (New York, USA), Nunc (Wiesbaden), PAA (Cölbe) und TPP (Trasadingen, Schweiz).

### **Differenzierung der Zelllinien**

Es wurden je  $10^6$  Zellen der Myelomazelllinien in 6 ml RPMI-Medium (siehe allgemeine Kulturbedingungen) für 2 Stunden bis maximal 5 Tage in verschiedenen Stimulationsansätzen kultiviert. Zu den benutzten Agenzien gehörten all-trans-Retinsäure (ATRA), 13-cis-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure, G-CSF, GM-CSF, Curcumin, DMSO und Arsentrioxid, die zur Inkubation der Zellen allein oder in Kombination Verwendung finden. Dabei erfolgte bei den länger dauernden Ansätzen nach 3 und 4 Tagen jeweils ein Medium-Wechsel.

### **Herstellung von Zelllysaten**

Das pelletierte Zellsediment wurde mit einer Lösung aus Lysispuffer (1% TritonX, 25mM HEPES, 150 mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2) und Protease-Inhibitor (AEBSF, E-64, Betastatin, Leupeptin, Aprotinin, ) und 1mM PMSF und resuspendiert und für etwa eine halbe Stunde unter gelegentlichem Vortexen auf Eis inkubiert.

### **Isolierung von humanen Granulozyten**

Die Leukozyten wurden mit Hilfe von Sedimentation durch Plasmasteril (Fresenius, Bad Homburg) von den Erythrozyten und Thrombozyten getrennt (3 ml Plasmasteril auf 10 ml Blut für 40 min bei Raumtemperatur). Der weißliche Überstand wurde abgenommen und pelletiert (5 min bei 2.000 Umdrehungen je Minute), das Pellet in PBS resuspendiert (der Überstand wurde verworfen) und dann mit Ficoll (10-12 ml/ 50 ml Blut) in seine einzelnen Bestandteile (Granulozyten, Lymphozyten, restliche Erythrozyten) aufgetrennt.

Nach anschließender dreißigminütiger Zentrifugation (3 Minuten bei 2.000 und 27 Minuten bei 3.000 rpm) konnten die im Überstand zu findenden Lymphozyten abgesaugt und die im Zellpellet verbliebenen Erythrozyten mit einer hypoosmolaren Lösung lysiert werden („Osmo-Schock“), indem aqua dest. für 10-20 s zum Pellet gegeben wurde und das Pellet danach in einem mit Medium gefüllten Röhrchen resuspendiert wurde (um das aqua dest. zu verdünnen).

Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit den lysierten Erythrozyten abgenommen und die Prozedur so oft wiederholt, bis sich keine Erythrozyten mehr im Pellet befanden, also ein klar weißes Pellet vorlag. Die gewonnenen Granulozyten konnten danach in Medium resuspendiert werden. Alle Schritte laufen bei Raumtemperatur ab.

### **Proliferationsassay**

Der CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega GmbH, Mannheim) beruht auf einer kolorimetrischen Methode zur Bestimmung lebender Zellen und fußt auf der Reduktion einer Tetrazolium-Komponente zu einem farbigen, löslichen Formazan-Produkt. Diese Reduktion erfolgte durch vitale Zellen unter Verbrauch von NADH oder NADPH, welche in metabolisch aktiven Zellen gebildet werden. Die Formazan-Konzentration ist also der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen gegenüber proportional.

Es wurden gemäß der Angaben des Herstellers auf einer 96-Well-Mikrotiter-Platte je 1.000 Zellen (nach 5-tägiger Inkubation entsprechend der Fragestellung)/Well mit jeweils 20µl CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Hierbei wurden jeweils 3fach-Bestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Platten bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader (Sunrise, Tecan) gemessen.

## Literatur

**Arsenou ES, Papadimitriou EP, Kliafa E, Hountala M, Nikolaropoulos SS:**

Effects of retinoic acid steroidal analogs on human leukemic HL60 cell proliferation in vitro and on angiogenesis in vivo.

Anticancer Drugs. 2005;16:151-8.

**Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al.:**

Current Protocols in Molecular Biology, Volume 1+2. 5<sup>th</sup> ed., Published by John Wiley and Sons, Inc. (2002)

**Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P et al.:**

Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer.

Am J Pathol. 1998;152:1401-6

**Banjerdpongchai R, Suttajit M, Kongtawelert P:**

Effect of Curcumin on HL-60 cell apoptosis induced by Doxorubicin

Chiang Chai Med Bull, 2002, 41:59-66

**Barber N, Belov L, Christopherson RI:**

All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL-60 and NB4 myeloid leukaemias

Leuk Res. 2007 (Epub ahead of print)

**Beauchemin N, Draber P, Dveksler G et al.:**

Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family.

Exp Cell Res. 1999; 252:243-9.

**Benedetti L, Grignani F, Scicchitano B et al.:**

Retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia involves PML-RARalpha-mediated increase of type II transglutaminase.  
Blood 1996;87:1939-50.

**Bork P, Holm L, Sander C:**

The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core.  
J Mol Biol. 242:309-20, 1994

**Brest P, Betis F, Cuburu N et al.:**

Increased rate of apoptosis and diminished phagocytic ability of human neutrophils  
Infected with afa/dr diffusely adhering Escherichia coli strains  
Infection and Immunity, 2004, p. 5741–5749

**Castaigne S, Lefevre P, Chomienne C et al.:**

Effectiveness and Pharmacokinetics of Low-Dose All-trans Retinoic Acid  
(25 mg/m<sup>2</sup>) in Acute Promyelocytic Leukemia  
Blood, Vol 82, No 12. 1993: pp 3560-3563

**Chen BG, Yan WH, Meng ZF, Guo ZM, Zhu M, Li BL**

Expression of CD66c (CEACM6) in adult acute leukemia and its significance  
Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2006; 27:370-3.

**Coco FL, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG**

Genetic Diagnosis and Molecular Monitoring in the Management of Acute Promyelocytic  
Leukemia  
Blood, Vol 94, No 1, 1999: pp 12-22

**Da Silva-Azevedo L, Reutter W**

The lon isoform of the cell adhesion molecule C-Cam binds to actin,  
Biochem Biophys Res Commun, 1999, 256:404-8

**Dentener MA, V Bazil, EJ Von Asmuth, M Ceska and WA Buurman:**

Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages  
J Immunol., 1993, Vol 150, 2885-2891

**Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM:**

All-trans retinoic acid (ATRA) and the regulation of adhesion molecules in acute myeloid leukemia.  
Leuk Lymphoma. 1996; 21:201-9.

**Di Noto R, Boccuni P, Costantini S et al.:**

In vitro exposure of acute promyelocytic leukemia cells to arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) induces the solitary expression of CD66c (NCA-50/90), a member of the CEA family.  
Tissue Antigens 1999; 54:597-602

**Douer D:**

Transcription therapy for acute promyelocytic leukaemia  
Expert Opin Investig Drugs. 2000; 9:329-46

**Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Ashle SW, Whang EE:**

CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of Pancreatic adenocarcinoma cells  
Oncogene, 2004; 23: 465-73

**Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Ashle SW, Whang EE:**

CEACAM 6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness  
Br J Cancer, 2004; 91:1384-90

**Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Zinner MJ, Ashle SW, Whang EE:**

Overexpression of CEACAM6 promotes insulin-like growth factor I-induced pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness  
Oncogene, 2004; 23:5834-42

**Ergün S, Kilic N, Ziegeler G et al.:**

CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor.

Moll Cell 2000, 5:311-320

**Fenaux P, Wang ZZ, Degos L:**

Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids

Curr Top Microbiol Immunol. 2007; 313:101-28

**Gianni M, Koken M, Chelbi-Alix M et al.:**

Combined Arsenic and Retinoic Acid Treatment Enhances Differentiation and Apoptosis in Arsenic-Resistant NB4 Cells

Blood, Vol 91, No 11, 1998: pp 4300-4310

**Gianni M, Terao M, Zanotta S, Barbui T, Rambaldi A, Garattini E.:**

Retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor synergistically induce leukocyte alkaline phosphatase in acute promyelocytic leukemia cells

Blood. 1994; 83:1909-1921.

**Hauck CR, Agerer F, Muenzner P, Schmitter T:**

Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection.

Eur J Cell Biol. 2006, 85:235-242

**Herold G:**

Innere Medizin, eine vorlesungsorientierte Darstellung

**Honig M, Peter HH, Jantscheff P, Grunert F.:**

Synovial PMN show a coordinated up-regulation of CD66 molecules.

J Leukoc Biol.1999; 66:429-36

**Horst A.K., Wagner C:**

CEA-Related CAMs

Springer-Verlag 2004, Vol. 165:283-341

**Hsu HC, Tsai WH, Chen PG, Hsu ML, Ho CK, Wang SY.:**

In vitro effect of granulocyte-colony stimulating factor and all-trans retinoic acid on the expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules in acute promyelocytic leukemic cells.

Eur J Haematol. 1999; 63:11-18

**Huang Xiaojun:**

Potential of arsenic trioxide-induced apoptosis by retinoic acid in retinoic acid sensitive and resistant HL-60 myeloid leukemia cells

Chinese Medical Journal, 2000, Vol. 113 No.6

**Idres N, Marill J, Flexor MA, Chabot GG:**

Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers.

J Biol Chem. 2002; 277:31491-8

**Ikezoe T, Daar ES, Hisatake J, Taguchi H, Koeffler HP:**

HIV-1 protease inhibitors decrease proliferation and induce differentiation of human myelocytic leukemia cells

Blood, 2000 z Volume 96, Number 10

**Imaizumi M, Sato A, Koizumi Y, et al. :**

Potentiated maturation with a high proliferating activity of acute promyelocytic leukemia induced in vitro by granulocyte or granulocyte/macrophage colonystimulating factors in combination with all-trans retinoic acid.

Leukemia. 1994; 8:1301-1308.

**Jansen JH, M.C. de Ridder, W.M.C. Geertsma**

Complete Remission of t(11;17) Positive Acute Promyelocytic Leukemia Induced by All-trans Retinoic Acid and Granulocyte Colony-Stimulating Factor

Blood, Vol 94, No 1, 1999: pp 39-45

**Jones J, Laffafian I, Cooper AM et al.:**

Expression of complement regulatory molecules and other surface markers on neutrophils from synovial fluid and blood of patients with rheumatoid arthritis  
Br J Rheumatol., 1994; 33:707-12

**Kammerer R, Stober D, Singer BB, Öbrink B, Reimann J:**

Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 on Murine Dendritic Cells Is a Potent Regulator of T Cell Stimulation  
J Immunol. 166:6537-6544, 2001

**Kataoka K, Tkata Y, Nkajima A, Saito S, Huh N:**

A carcinoembryonic antigen family cDNA from mouse placenta encoding a protein With a rare domain composition  
Placenta 21:610-4

**Keck U, Nedellec P, Beauchemin N, Thompson J, Zimmermann W:**

The CEA10 gene encodes a secreted member of the murine carcinoembryonic antigen Family and is expressed in the placenta, gastrointestinal tract and bone marrow  
Eur J Biochem 229:455-64

**Khan WN, Hammarström S, Ramos T, Klein G:**

Expression of antigens of the carcinoembryonic antigen family on B cell lymphomas and Epstein-Barr virus immortalized B cell lines  
International Immunology, Vol. 5, No. 3, pp. 265-270, 1993

**Klaile E:**

Identifizierung und Charakterisierung neuer intrazellulärer Bindungspartner von CEACAM 1-L und deren Einfluss auf CEACAM 1-L-vermittelte Zellfunktionen  
Dissertation an der Freien Universität Berlin, 2005

**Komura N, Ikeda Y, Masuda N, Umezawa Y, Ito K, Kizaki M, Umezawa K.:**

Designed ATRA analogue active against ATRA-resistant acute promyelocytic leukemia cells having a single nucleotide substitution in their retinoic acid receptor.  
Leuk Res. 2007; 31:301-13. Epub 2006

**Laack E, Nikbakht H, Peters A et al:**

Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: a factor of independent prognostic significance.

J Clin Oncol. 2002; 20:4279-84.

**Lee KH, Chang MY, Ahn JI, et al:**

Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells

Biochem Biophys Res Commun. 2002; 296:1125-33

**Leusch HG, Drzeniek Z, Hefta SA, Markos-Pusztai Z, Wagener C:**

The putative role of members of the CEA-gene family ( CEA, NCA, BGP ) as ligands for the bacterial colonization of different human epithelial tissues.

Zentralbl Bakteriologie 275:118-122, 1991

**Leusch HG, Drzeniek Z, Hefta SA, Markos-Pusztai Z, Wagener C:**

Binding of E.coli and Salmonella strains to members of the CEA family: differential binding inhibition by aromatic -glycosides of mannose

Infect Immun. 59:2051-2057, 1991

**Li XG, Chen Y, Wu Q, Liu HL:**

Effects of curcumin on the acetylation of histone H3, P53 and the proliferation of NB4 cells

Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2005; 26:551-3.

**Link H, Hess C.H., Albers P et al.:**

Rationale Therapie mit den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF

Arbeitskreis Supportive Maßnahmen in der Onkologie, Online-Veröffentlichung, 2000

**Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS:**

Acute Myeloid Leukemia and Acute Promyelocytic Leukemia

Am Soc Hematol Edu Program; 2003; 82-101.

**Lucka L, Müller MM, Budt M, Ragge E:**

Multifunctional carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 (CAECAM-1)  
Falk132a-07, 2003, p.83-92

**Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J:**

Molecular cloning: a laboratory manual  
2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989

**Murate T, Suzuki M, Hattori M et al.:**

Up-regulation of Acid Sphingomyelinase during Retinoic Acid-induced Myeloid  
Differentiation of NB4, a Human Acute Promyelocytic Leukemia Cell Line

**Nakamura K, Yasunaga Y, Segawa T et al. :**

Curcumin down-regulates AR gene expression and activation in prostate cancer cell lines  
Int J Onc. 21: 825-830, 2002

**Nakamaki T, Sakashita a, Sano M et al.:**

Granulocyte-colony stimulating factor and retinoic acid cooperatively induce granulocyte  
differentiation of acute promyelocytic leukaemia cells in vitro  
Jpn J Cancer Res. 1989;80:1077-82

**Nason-Burchenal K, Allopenna J, Begue A et al.:**

Targeting of PML/RARalpha is lethal to retinoic acid-resistant promyelocytic leukaemia  
cells  
Blood. 1998; 92:1758-67

**Nason-Burchenal K, Maerz W, ALbanell J:**

Common defects of different retinoic acid resistant promyelocytic leukaemia cells are  
persistent telomerase activity and nuclear body disorganization  
Differentiation 1997; 61:321-31

**N'Guessan PD, Vigelahn M, Bachmann S:**

The UspA1 protein of *Moraxella catarrhalis* induces CEACAM-1-dependent apoptosis in alveolar epithelial cells.

J Infect Dis. 2007;195:1651-60. Epub 2007

**Noel A. Maun, Peter Gaines, Arati Khanna-Gupta:**

G-CSF signaling can differentiate promyelocytes expressing a defective retinoic acid receptor: evidence for divergent pathways regulating neutrophil differentiation

Blood, 2004, Volume 103, Number 5

**Nollau P, Scheller H, Kona-Horstmann M et al:**

Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas.

Cancer Res. 1997; 57:2354-7

**Öbrink B:**

CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties.

Curr Opin Cell Biol 1997, 9:616-26.

**Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki M et al.:**

A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains

J. Biol. Chem., Vol. 266, 7995-8001, 1991

**Pantelic M, Chen I, Parker J, Zhang P, Grunert F, Chen T:**

Retinoic acid treated HL60 cells express CEACAM1 (CD66a) and phagocytose *Neisseria gonorrhoe*

FEMS Immunology, Volume 42, 2004, Pages 261-266

**Raffael A**

Grundlagen der analytischen Durchflusszytometrie

**Sarantis H, Gray-Owen SD:**

The specific innate immune receptor CEACAM3 triggers neutrophil bactericidal activities via a Syk kinase-dependent pathway.

Cell Microbiol. 2007; 9(9):2167-80.

**Sauter SL, Rutherford SM, Wagener C, Shively JE, Hefta JE:**

Binding of nonspecific cross-reacting antigen, a granulocyte membrane glycoprotein, to Escherichia coli expressing type 1 fimbriae.

Infect Immun. 1991; 59: 2485-2493

**Schmitter T, Agerer F, Peterson L, Münzner P, Hauck CR:**

Granulocyte CEACAM3 is a Phagocytic Receptor of the Innate Immune System that Mediates Recognition and Elimination of Human-specific Pathogens

J Exp Med., Volume 199, Number 1, 2004 35–46

**Schmitter T, Pils S, SakkV et al.:**

The Granulocyte Receptor Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 3 (CEACAM3) Directly Associates with Vav to Promote Phagocytosis of Human Pathogens

J Immunol. 2007; 178:3797-805

**Sham RL, Phatak PD, Belanger KA, Packman CH:**

The effect of dexamethasone on functional properties of HL60 cells during all-trans retinoic acid induced differentiation. Are there implications for the retinoic acid syndrome?

Blood Cells Mol Dis.1996; 22:139-49.

**Shao W, Benedetti L, Lamph WW, Nervi C, Miller WH**

A retinoid-resistant acute promyelocytic leukemia subclone expresses a dominant negative PML-RAR alpha mutation.

Blood. 1997; 89:4282-9.

**Siene W, Dango S, Woelfle U:**

Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small cell lung cancer.  
Clin Cancer Res. 2003; 9:2260-6.

**Singer BB, Klaile E, Scheffrahn I et al.:**

CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes.  
Eur J Immunol 2005; 35:1949-59.

**Singer BB, Lucka L:**

CEACAM1  
UCSD-Nature Molecule Pages, Published online: 2005 doi:10.1038/mp.a003597.01

**Singer BB, Scheffrahn I, Heymann R, Sigmundsson K, Kammerer R, Öbrink B:**

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes.  
J Immunol. 2002; 168:5139-46.

**Singer BB, Scheffrahn I, Öbrink B:**

The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation.  
Cancer Res. 2000; 60:1236-44.

**Skubitz KM, Campbell KD, Ahmed K et al.:**

CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils  
J Immunol., 1995; 155:5382-90

**Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP:**

CD66a, CD66b, CD66c, and CD66 d each independently stimulate neutrophils  
J Leukoc Biol., 1996; 60:106-17

**Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Ouyang GL, Bao SD:**

Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression.

Braz J Med Biol Res. 2005; 38:1791-8. Epub 2005

**Strax J:**

Tumeric

www.PSA-Rising.com, 2003

**Takeshita A, Shinjo K, Naito K:**

Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA-and arsenic-resistant acute myelocytic leukemia (APL) cells

Leuk. 2005; 19:1306-11

**Tallman MS:**

Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia

Bets Pract Res Clin Haematol. 2007; 20:57-65

**Thies A, Moll I, Berger J et al.:**

CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of Metastatic disease.

J Clin Oncol. 20:2530-2536

**Trayner I, Bustorff T, Etches A, Mufti G, Foss Y, Farzaneh F:**

Changes in antigen expression on differentiating HL-60 cells treated with dimethylsulphoxide, all – trans – retinoic acid, 1,25 – dihydroxyvitamin D3 or 12 – O – tetradecanoyl phorbol – 13 – acetate

Leukemia Res. 22 (1998) 537 – 547

**Tsurumi H, Tojo A, Takahashi T, Moriwaki H, Asano S, Muto Y.:**

The combined effects of alltrans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor as a differentiation induction therapy for acute promyelocytic leukemia.

Intern Med. 1993; 32:648-650.

**Wakayama T, Furuya H, Takagi C, Ichiba S, Kato Y.**

Complete remission induced by combined treatment with all-trans retinoic acid (ATRA) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in a patient with relapsed acute promyelocytic leukemia.

Rinsho Ketsueki. 1994;35:1315-1321.

**Wenlin Shao, Mirco Fanelli, Fabiana F. Ferrara:**

Arsenic Trioxide as an Inducer of Apoptosis and Loss of PML/RAR $\alpha$  Protein in Acute Promyelocytic Leukemia Cell

J Natl Cancer Inst, Vol. 90, No. 2, 1998

**Wolach B, van der Laan LJ, Maiani NA:**

Growth factors G-CSF and GM-CSF differentially preserve chemotaxis of neutrophils aging in vitro.

Exp Hematol. 2007; 35:541-50

**Yang F, Lim GP, Begum AN et al.:**

Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo

J Biol Chem., Vol. 280, 5892-5901, 2005

**Yu Q, Chow EM, Wong H:**

CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway.

J Biol Chem. 2006; 281:39179-93. Epub 2006

**Zang C, Liu H, Ries C, Ismail MG, Petrides PE:**

Enhanced migration of the acute promyelocytic leukemia cell line NB4 under in vitro conditions during short-term all-trans-retinoic acid treatment.

J Cancer Res Clin Oncol. 2000; 126:33-40.

**Zebhauser R, Kammerer R, Eisenried A, McLellan A, Moore T, Zimmermann W:**

Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine CEA family  
Genomics 31:31, 2005

**Zheng X, Seshire A, Ruster B et al.:**

Arsenic but not all-trans retinoic acid overcomes the aberrant stem cell capacity of PML/RARalpha-positive leukemic stem cells  
Haematologica. 2007; 92:323-31

**Zhen-yi Wang:**

Treatment of Acute Leukemia by Inducing Differentiation and Apoptosis  
Hematology, Jan 2003; 2003: 1 - 13.

**Zhi-Xiang Shen, Guo-Qiang Chen, Jian-Hua Ni et al.:**

Use of Arsenic Trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia (APL): II. Clinical Efficacy and Pharmacokinetics in Relapsed Patients  
Blood Vol.89, No 9, 1997; 90:124–33

**Zhou GB, Zhao WL, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z:**

Retinoic Acid and Arsenic for Treating Acute Promyelocytic Leukemia  
PLoS Medicine 2005, e12

**Zhu J, Shi XG, Shu Hy et al.:**

Effect of retinoic acid isomers on proliferation, differentiation and PML relocalisation in the APL cell line NB4  
Leuk., 1995, 9: 302-9

## Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie
ATRA	<i>all-trans retinoic acid</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen – related cell adhesion molecule</i>
d	<i>day/Tag</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Adsorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-Activated Cell Scanning/Sorting, Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum
FSC	<i>Forward Scatter</i>
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
GTP	Guanosintriphosphat
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	Glycosyl – Phosphatidyl – Inositol
h	<i>hour/Stunde</i>
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
His	Histidin
HRPO	<i>Horse Raddish Peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin

## Abkürzungsverzeichnis

---

IP	Immunpräzipitation
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kb	Kilobasen
kD	kilo-Dalton
mAb	<i>monoclonal Antibody</i>
min	Minuten
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
pAb	<i>polyclonal Antibody</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PBS-T	PBS-Tween
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PJ	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PML	Promyelozytenleukämie
RAR $\alpha$	<i>Retinoic Acid Receptor <math>\alpha</math></i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNS	Ribonucleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT – PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RXR	Retinoid – X – Rezeptor
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	<i>Side Scatter</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	TBS-Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydromethyl)aminomethan
ZKÜ	Zellkultur-Überstand

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

### **Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Werner Reutter für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Unterweisungen in Zuckermolekülen, den Unterschieden zwischen Schwaben und Badenern und dem leckeren Kartoffelsalat.

Ich danke Dr. Lothar Lucka für die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien und -platz und abendliches Bier aus dem Kühlraum.

Dr. Bernhard B. Singer danke ich für die unendlich vielen Ideen (ungefähr eine pro Tag), die konstruktive Kritik, die Fachsimpeleien über Fußball und die Ausdauer bei der Durchsicht meiner „ätzenden Diskussion“.

Vielen Dank vor allem an Dr. Esther „rothaariges L....“ Klaile, die immer da war, wenn sie gebraucht wurde (jedenfalls ab nachmittags), für die vielen Tipps, die Salzbrezeln und wasweissichnochalles.

Dank an Dr. Mario M. Müller für die vielen Hilfestellungen, das Fußballspielen und dem Spaß an seiner Angst vor meinen Hefen.

Ich danke auch André Gronau für die Geschichten über die Mensa, die Fußballgespräche und seine Hinweise auf meine rutschenden Hosen.

Iwona Cichocka danke ich für die Hilfe in der Zellkultur, die Gurken und den Wodka bei ihr zu Hause.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich immer aufgemuntert und an ein Ende mit Dissertation geglaubt haben. Und natürlich für die Unkosten, die ich schon seit Jahren verursache und die ohne Murren ge- und ertragen werden!

## **Erklärung**

„Ich, Till Jacobi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Der Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die Expression von CEACAMs bei humanen Akute-Promyelozytenleukämie - und Akute-myeloische-Leukämie - Zelllinien

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“