

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin

Medizinische Klinik III (Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin)
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Thiel

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Arsentrioxid
in malignen lymphatischen und myeloischen Zelllinien
unterschiedlichen Differenzierungsgrades:
CD95-unabhängige, Caspasen- und Mitochondrien-abhängige Apoptose-Induktion,
Apoptose-unabhängige Proliferationsinhibition
und Expression Zytostatikaresistenz-vermittelnder Proteine

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde zum Doctor rerum medicarum
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Markus Thomas Rojewski
aus : Baden-Baden

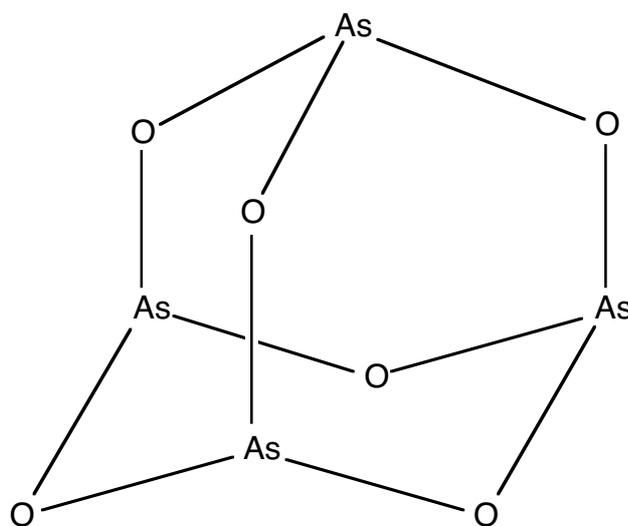
Referent: Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier

Korreferent: Prof. Dr. med. J. Oertel

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13. Dezember 2002

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von
Arsentrioxid in
malignen lymphatischen und myeloischen Zelllinien
unterschiedlichen Differenzierungsgrades:
CD95-unabhängige,
Caspasen- und Mitochondrien-abhängige Apoptose-Induktion,
Apoptose-unabhängige Proliferationsinhibition
und Expression Zytostatikaresistenz-vermittelnder Proteine



2,4,6,8,9-Hexaoxa-1,3,5,7-tetraarsatricyclo[3,3,1,1(3,7)]dekan

Meiner Mutter

1.	SUMMARY	1
2.	ZUSAMMENFASSUNG	4
3.	EINLEITUNG	7
3.1	DIE VERWENDUNG VON ARSENTRIOXID IN DER MEDIZIN	7
3.1.1	GESCHICHTLICHER HINTERGRUND	7
3.1.2	KLASSIFIZIERUNG DER AKUTEN LEUKÄMIEN NACH DER FRENCH-AMERICAN-BRITISH (FAB)- UND WORLD-HEALTH-ORGANISATION (WHO)-KLASSIFIZIERUNG	8
3.1.3	ARSENTRIOXID UND APL	9
3.1.4	ARSENTRIOXID UND NICHT-PROMYELOZYTEN-LEUKÄMIEN	12
3.1.5	DIE VERWENDUNG VON ARSENTRIOXID IN DER ONKOLOGIE	13
3.1.6	WEITERE VERWENDUNGEN VON ARSENTRIOXID IN DER MEDIZIN	14
3.1.7	DIE BEDEUTUNG DER ZYTOSTATIKA-RESISTENZ FÜR DIE THERAPIE AKUTER LEUKÄMIEN	14
3.2	APOPTOSE	15
3.2.1	APOPTOSE – NEKROSE – PARAPTOSE – APONEKROSE: DEFINITIONEN UND ABGRENZUNGEN	15
3.2.2	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG UND BEISPIELE DER APOPTOSE	16
3.2.3	INDUKTOREN DER APOPTOSE	18
3.2.3.1	DIE DURCH REZEPTOR-LIGANDEN-BINDUNG INDUZIERTER APOPTOSE	21
3.2.3.2	DIE DURCH ZYTOSTATIKA INDUZIERTER APOPTOSE	24
3.2.4	WICHTIGE BEI DER APOPTOSE ABLAUFENDE PROZESSE	24
3.2.4.1	MORPHOLOGISCHE PROZESSE	24
3.2.4.2	PROZESSE, DIE AN DER ZELLMEMBRAN STATTFINDEN	24
3.2.4.3	ZYTOPLASMATISCHE PROZESSE	25
3.2.4.4	MITOCHONDRIALE PROZESSE	29
3.2.5	NOS UND APOPTOSE	30
3.2.6	METHODEN ZUM NACHWEIS DER APOPTOSE	30
3.2.6.1	ANNEXIN V-FITC	30
3.2.6.2	7-AMINO-AKTINOMYCIN D (7-AAD)	31
3.2.6.3	NACHWEIS UND BLOCKIERUNG DER CASPASEN-AKTIVITÄT	31
3.2.7	BLOCKIERUNG DER APOPTOSE	31
3.3	EFFEKTE DER ARSENTRIOXID-WIRKUNG IN HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN MIT UND OHNE DER TRANSLOKATION T(15;17) UND IN NICHT-HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN	32
3.3.1	INDUKTION VON APOPTOSE	32
3.3.2	EINFLUSS AUF DEN ZELLZYKLUS UND DIE ZELLPROLIFERATION	34
3.3.3	ZELLTRANSFORMATION DURCH ARSENTRIOXID	35
3.3.4	ZELLDIFFERENZIERUNG	36
3.3.5	WEITERE POTENTIELLE WIRKUNGSWEISEN DES ARSENTRIOXID (IMMUNOLOGISCHE EFFEKTE, GLUKONEOGENESE, ANGIOGENESE)	36
4.	ZIELSETZUNG	37
5.	MATERIALIEN	39
5.1	ELEKTRISCHE GERÄTE	39
5.2	GRUNDCHEMIKALIEN, FEINCHEMIKALIEN UND ZYTOSTATIKA	39
5.3	PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN	39
5.4	REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	41
5.5	ZELLINIEN	42
5.6	FLUORESZENZFARBSTOFFE	42
5.7	ANTIKÖRPER	42
5.8	ANNEXIN V-FITC, AMINOSÄUREDERIVATE UND MODIFIZIERTE PEPTIDE	44
5.9	VERBRAUCHSMATERIALIEN	44
5.10	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	44

6.	METHODEN	45
6.1	ZELLKULTUR	45
6.2	AUFTAUEN VON ZELLEN	45
6.3	ISOLIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS VOLLBLUT	45
6.4	AUFZUCHT VON ZELLEN	46
6.5	BESTIMMUNG DER ZELLDICHTE	46
6.6	APOPTOSE-INDUKTION IN ZELLEN MIT ARSENTRIOXID UND ZYTOSTATIKA	46
6.7	APOPTOSE-INDUKTION IN ZELLEN MIT MAUS-ANTI-HUMAN-CD95-ANTIKÖRPER	47
6.8	CASPASEN-INHIBITION MIT BOC-D-FMK, Z-ASP-2,6-DBMK, Z-D(OME)E(OME)VD(OME)-FMK UND Z-VAD-FMK	47
6.9	ANNEXIN V-FITC-FÄRBUNG	48
6.10	7-AAD FÄRBUNG	48
6.11	ANNEXIN V-FITC/7-AAD-DOPPELMARKIERUNG	49
6.12	MITOTRACKERRED CMXROS- BZW. MITOTRACKERRED CM-H ₂ XROS-FÄRBUNG	49
6.13	JC-1-FÄRBUNGEN ZUM NACHWEIS DES ZUSAMMENBRUCHS DES MITOCHONDRIALEN REDOXPOTENTIALS	50
6.14	DIHYDROETHIDIUM-FÄRBUNGEN ZUM NACHWEIS VONROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES)	50
6.15	NACHWEIS FREIER NO-RADIKALE	51
6.16	PHIPHILUX G ₂ D ₂ -FÄRBUNGEN	51
6.17	FITC-VAD-FMK UND FITC-YVADAPK-DNP-FÄRBUNG	51
6.18	FITC-VAD-FMK/ MITOTRACKERRED CMXROS DOPPELMARKIERUNG	52
6.19	ANNEXIN V-FITC/ MITOTRACKERRED CMXROS DOPPELMARKIERUNG	52
6.20	NACHWEIS DER ZYTOPLASMATISCHEN PROTEINE CASPASE-3, POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE (PARP), GDP-DISSOZIATIONS-INHIBITOR (D4-GDI), P53 UND KI67	52
6.21	NACHWEIS DES ZYTOPLASMATISCHEN PROTEINS LRP	53
6.22	PKH26-MARKIERUNG	54
6.23	PROPIDIUMIODID-FÄRBUNG	54
6.24	NACHWEIS DER OBERFLÄCHENPROTEINE P-GLYKOPROTEIN (MDR-1), CD90, CD95, TNFRI UND TNFRII	55
6.25	BESTIMMUNG DER FLUORESCENZINTENSITÄT IM DURCHFLUSSZYTOMETER	56
6.26	STATISTISCHE AUSWERTUNG	58
7.	ERGEBNISSE	59
7.1	ARSENTRIOXID INDUZIERT APOPTOSE IN EINER VIELZAHL ZYTOSTATIKA-SENSITIVER UND ZYTOSTATIKA-RESISTENTER ZELLINIEN UNTERSCHIEDLICHEN HÄMATOPOETISCHEN DIFFERENZIERUNGSGRADES	59
7.1.1	ARSENTRIOXID INDUZIERT APOPTOSE IN MALIGNEN LYMPHATISCHEN UND MYELOISCHEN ZELLINIEN	59
7.1.2	ARSENTRIOXID INDUZIERT APOPTOSE IN MALIGNEN LYMPHATISCHEN UND MYELOISCHEN ZYTOSTATIKA-RESISTENTEN ZELLINIEN	62
7.1.3	DIE ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE IST UNABHÄNGIG VON DER BASALEXPRESSION DES ZYTOSTATIKARESISTENZ-VERMITTELNDEN PROTEINS P-GLYKOPROTEIN (MDR-1)	66
7.1.4	ARSENTRIOXID BESITZT KEINEN REGULATORISCHEN EINFLUSS AUF DIE P-GLYKOPROTEIN (MDR-1)-EXPRESSION	66
7.1.5	ARSENTRIOXID BESITZT KEINEN REGULATORISCHEN EINFLUSS AUF DIE LRP-EXPRESSION	70
7.1.6	DIE ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE IST UNABHÄNGIG VON DER BASALEXPRESSION DES DIFFERENZIERUNGSMARKERS THY-1 (CD90)	70
7.1.7	EINTEILUNG DER UNTERSUCHTEN MALIGNEN LYMPHATISCHEN UND MYELOISCHEN ZELLINIEN BEZÜGLICH IHRER SENSITIVITÄT GEGENÜBER ARSENTRIOXID	73
7.1.8	VERGLEICH DES NACHWEISES APOPTOTISCHER ZELLEN DURCH BINDUNG VON ANNEXIN V-FITC UND 7-AAD NACH ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE	73

7.2	DIE DURCH ARSENTRIOXID INDUZIERTER PROLIFERATIONSINHIBITION IST UNABHÄNGIG VON DER APOPTOSE-INDUKTION UND FÜHRT ZU KEINEM ZELLZYKLUSARREST	75
7.2.1	DIE ARSENTRIOXID-BEHANDLUNG VON ZELLEN FÜHRT ZU EINER PROLIFERATIONSINHIBITION BZW. VERMINDERUNG DER ZELLTEILUNGSRATE	76
7.2.2	DIE ARSENTRIOXID-INDUZIERTER PROLIFERATIONSINHIBITION IST UNABHÄNGIG VON DER APOPTOSE-INDUKTION	77
7.2.3	DIE ARSENTRIOXID-INDUZIERTER PROLIFERATIONSINHIBITION HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE EXPRESSION DES PROLIFERATIONSMARKERS KI67	79
7.2.4	DIE DURCH ARSENTRIOXID-INDUZIERTER PROLIFERATIONSINHIBITION IST UNABHÄNGIG VON DER POSITION DER ZELLE IM ZELLZYKLUS	82
7.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DER ARSENTRIOXID-VERMITTELTER APOPTOSEINDUKTION: CASPASEN-AKTIVIERUNG UND BEEINFLUSSUNG DER MITOCHONDRIENFUNKTION	85
7.3.1	DIE AKTIVIERUNG VON CASPASEN BEI DER ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE: SPALTUNG VON PROCASPASE-3, POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASE-1 (PARP) UND GDP-DISSOZIATIONS-INHIBITOR (D4-GDI)	85
7.3.2	DIE AKTIVIERUNG VON CASPASEN BEI DER ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE: SPALTUNG DES CASPASEN-SUBSTRATES PHIPILUX G ₂ D ₂ UND BINDUNG DER CASPASEN-INHIBITOREN FITC-VAD-FMK UND FITC-YVADAPK-DNP.	90
7.3.3	DIE ARSENTRIOXID-BEHANDLUNG VON ZELLEN FÜHRT ZUM ZUSAMMENBRUCH DES MITOCHONDRIALEN REDOXPOTENTIALS	92
7.3.4	DIE ARSENTRIOXID-BEHANDLUNG VON ZELLEN FÜHRT ZUR BILDUNG VON ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES)	96
7.3.5	CASPASEN-INHIBITOREN HEMMEN DIE DURCH ANNEXIN V-FITC NACHWEISBARE ARSENTRIOXID-VERMITTELTE APOPTOSE IN CCRF-CEM- UND JURKAT-ZELLEN, NICHT JEDOCH DIE BEEINFLUSSUNG DER MITOCHONDRIALEN AKTIVITÄT.	99
7.3.6	DIE ARSENTRIOXID-BEHANDLUNG VON ZELLEN UND DIE BILDUNG VON NO-RADIKALEN	108
7.3.7	ARSENTRIOXID BEEINFLUSST DIE EXPRESSION DES PROLIFERATIONSMARKERS P53 NUR IN EINIGEN ARSENTRIOXID-SENSITIVEN ZELLINIEN	109
7.4	DIE ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE KANN DURCH BLOCKIERUNG CD95-SPEZIFISCHER PROZESSE NICHT INHIBIERT WERDEN UND IST SOMIT CD95-UNABHÄNGIG.	114
7.4.1	DIE ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE IST UNABHÄNGIG VON DER CD95 (FAS)-BASEXPRESSION	115
7.4.2	ARSENTRIOXID BESITZT KEINEN REGULATORISCHEN EINFLUSS AUF DIE CD95 (FAS)-EXPRESSION	115
7.4.3	DIE IN CCRF-CEM UND JURKAT-ZELLEN MIT ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE KANN DURCH BLOCKIERUNG VON CD95 (FAS) NICHT GEHEMT WERDEN	119
7.4.4	TITRATION DER APOPTOSE-INDUZIERENDEN UND APOPTOSE-INHIBIERENDEN ANTI-CD95-ANTIKÖRPER	119
7.4.5	CD95-BLOCKIERUNGSEXPERIMENTE	123
7.4.6	DIE TNFRI- UND TNFRII-EXPRESSION WIRD DURCH ARSENTRIOXID NICHT MODULIERT	127
7.5	UNTERSUCHUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN VON PATIENTEN, WELCHE FÜR EINE ARSENTRIOXID-THERAPIE IM VORFELD UND RAHMEN DER KLINISCHEN STUDIE „ARSENTRIOXID ZUR BEHANDLUNG DER AML BEI REZIDIV, THERAPIE-REFRAKTÄREM ZUSTAND ODER > 70 JAHRE UND KONTRAINDIKATION FÜR EINE STANDARD-POLYCHEMOTHERAPIE“ REKRUTIERT WURDEN, AUF IHRE SENSITIVITÄT GEGENÜBER ARSENTRIOXID	133
8.	DISKUSSION	136
8.1	INDUKTION DER APOPTOSE IN LYMPHO-HÄMATOPOETISCHEN ZELLINIEN UNTERSCHIEDLICHEN DIFFERENZIERUNGSGRADES	136
8.2	INDUKTION DER APOPTOSE IN LYMPHO-HÄMATOPOETISCHEN ZYTOSTATIKA-RESISTENTEN ZELLINIEN	138
8.3	VERGLEICH DES NACHWEISES APOPTOTISCHER ZELLEN DURCH BINDUNG VON ANNEXIN V-FITC UND 7-AAD NACH ARSENTRIOXID-INDUZIERTER APOPTOSE	141

8.4	DIE DURCH ARSENTRIOXID INDUZIERT PROLIFERATIONSINHIBITION IST UNABHÄNGIG VON DER APOPTOSE-INDUKTION UND FÜHRT ZU KEINEM ZELLZYKLUSARREST	141
8.5	DIE APOPTOSE-INDUKTION DURCH ARSENTRIOXID FÜHRT ZUR BILDUNG VON ROS UND ZU EINER AKTIVIERUNG VON CASPASEN, IST JEDOCH CD95- UND CASPASEN-UNABHÄNGIG	143
8.5.1	DIE AKTIVIERUNG VON CASPASEN DURCH ARSENTRIOXID	143
8.5.2	MÖGLICHE URSACHE DER CASPASEN-AKTIVIERUNG: P53-AKTIVIERUNG	147
8.5.3	DIE APOPTOSEINDUKTION DURCH ARSENTRIOXID IST NICHT CD95-ABHÄNGIG UND FÜHRT ZU KEINER REGULATION VON CD95 UND TNFR	148
8.5.4	DIE BILDUNG VON ROS UND NOS DURCH ARSENTRIOXID	150
8.6	MODELL ZUR APOPTOSE-INDUKTION DURCH ARSENTRIOXID	152
9.	ABKÜRZUNGEN UND SYNONYME	154
10.	APPENDIX	158
10.1	MUSTERAUSWERTUNGEN	158
10.2	ALLGEMEINE ANMERKUNGEN	160
11.	LITERATUR	161
12.	ERKLÄRUNG ZU EIGENEN PUBLIKATIONEN	181
13.	WEITERE EIGENE PUBLIKATIONEN	183
14.	DANKSAGUNG	185
15.	LEBENS LAUF	186