

## 1. Summary

Trivalent anorganic arsenic compounds like arsenic(III)-oxide and arsenic(III)-sulfide have been used in medicine for more than 2400 years. In the 19<sup>th</sup> century arsenic(III)-oxide was applied as Fowler's solution to cure cancer. However, with the discovery of radiotherapy and high potential cytostatic drugs in the 20<sup>th</sup> century, arsenic(III)-oxide disappeared as one of the cancer standard therapies. Until the end of the last century, the use of arsenic(III)-oxide and organic trivalent arsenic compounds was restricted to homeopathy and therapy of Syphilis, Leishmaniosis and relapsed acute promyelocytic leukemia (APL) or APL refractory to conventional (*all-trans retinoic acid*, ATRA) therapy. Because of its effects in APL (i. e. degradation of the fusion protein PML-RAR $\alpha$  (fusion of the promyelocytic leukemia protein and the  $\alpha$ -subunit of the retinoic acid receptor) after SUMO-1 mediated binding of ubiquitin, the induction of apoptosis and cell differentiation), the therapeutic use of arsenic(III)-oxide was thought to be restricted to cells in which the fusion protein PML-RAR $\alpha$  is present. However, two out of the three effects induced by arsenic(III)-oxide in APL-cells may not necessarily require the presence of the fusion protein PML-RAR $\alpha$ : induction of apoptosis and cell differentiation.

In this work, the effects of arsenic(III)-oxide on apoptosis and differentiation was analyzed in 22 cell. These cell lines represented various stages of lymphohaematopoietic differentiation. According to their sensitivity towards apoptosis induction a classification system was introduced: induction of apoptosis with concentrations  $\geq 0,1 \mu\text{M}$ ,  $\geq 1 \mu\text{M}$  or  $\geq 5 \mu\text{M}$  arsenic(III)-oxide was classified as sensitivity group A, group B or group C, respectively. The cell lines used for classification included also seven cell lines resistant to conventional cytostatic drugs. Cytostatic-resistant cell lines represented all three sensitivity groups: one cell line (LOUCY) was classified as group A, the cytostatic resistant CCRF-CEM-derivates CEM/C1 and CEM/C2 belonged to the same sensitivity group (group B) as their parental cell line and K-562 and their doxorubicin-resistant derivates were representatives of group C. Cytostatic-resistant cell lines HL-60/MX1 and HL-60/MX2 were members of group C, whereas their parental cell line HL-60 belonged to group B.

All three sensitivity groups were represented by these seven cell lines. Treatment of cells with arsenic(III)-oxide (including multiple drug resistant cells) had no effect on expression of P-glycoprotein and the *major vault protein/lung resistance protein* MVP/LRP and was independent from expression of the differentiation marker Thy-1. The potential mechanisms responsible for apoptosis induction were analysed in representative cell lines of all three sensitivity groups. Arsenic(III)-oxide induced activity of caspases, measured by recruitment of Caspase-3, cleavage of the natural caspase-substrates Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP), D4-GDP-dissociation-inhibitor (D4-GDI), the synthetic Caspase-3 substrate PhiPhiLux G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> as well as binding of the fluorescent synthetic caspase-inhibitors FITC-VAD-FMK and FITC-YVADAPK-DNP. A breakdown of the mitochondrial membrane potential could be observed by staining cells with the mitochondrial specific fluorescent dyes MitoTrackerRed CMXRos, MitoTrackerRed CM-H<sub>2</sub>XRos and JC-1. MitoTracker-dyes allow the detection of functional mitochondria, JC-1 is a dye that changes fluorescence with the mitochondrial membrane potential. Arsenic(III)-oxide treatment of cell lines also induced the synthesis of *reactive oxygen species* (ROS, detected by Dihydroethidium), whereas an increase of NO-radicals could be measured only for some cell lines. Mitochondria can be regarded as the primary target of action for arsenic(III)-oxide, as caspases specific inhibitors could reduce the percentage of apoptotic (i. e. Annexin V-FITC and 7-amino-actinomycin (7-AAD)-positive) cells and caspase activity (measured by FITC-VAD-FMK-binding) but had no effect on the breakdown of mitochondrial membrane potential.

An induction of p53 could be detected for some of the cell lines. However, a common mechanism involving activation of p53 seems unlikely.

The treatment of cell lines with arsenic(III)-oxide had no regulatory effect on CD95, and no inhibition of arsenic(III)-oxide-induced apoptosis could be detected by blocking the CD95 pathway. A combination of arsenic(III)-oxide and agents involving the CD95 pathway of apoptosis induction therefore remains interesting. Moreover, no change in expression of the tumor necrosis factor receptors TNFR1 and TNFR2 could be observed after treatment of cell lines with arsenic(III)-oxide.

Beside the effect of apoptosis induction, treatment of cell lines with arsenic(III)-oxide also lead to an apoptosis independent inhibition of proliferation. Proliferation inhibition could already be observed for concentrations of arsenic(III)-oxide that

themselves were not able to induce apoptosis or induced apoptosis only in a low percentage of the cell population. Moreover, inhibition of proliferation was independent from cell cycle position and did neither lead to cell cycle arrest nor to alteration of Ki67 regulation. This phenomenon also can be explained by the fact that arsenic(III)-oxide primary targets mitochondria: as energy production is affected, the cells are arrested in the state where they are just in.

A classification system of sensitivity for haematopoietic cell lines to arsenic(III)-oxide was introduced by this work. This system is based on the sensitivity of cell lines towards arsenic(III)-oxide induced apoptosis. This work clearly shows that a common mechanism is responsible for arsenic(III)-oxide effects on a variety of haematopoeitic cell lines: the caspase-independent breakdown of mitochondrial function.

Furthermore, this work clearly shows that an apoptosis-independent inhibition of cell proliferation can occur during arsenic(III)-oxide treatment of haematopoietic cell lines.

## 2. Zusammenfassung

Dreiwertige anorganische Arsenverbindungen wie Arsentrioxid oder Arsensulfid werden seit über 2400 Jahren in der Medizin verwandt. Schon Mitte des 19. Jahrhunderts kam eine wäßrige Arsentrioxid-Lösung (die sog. Fowlersche Lösung) bei der Therapie von Tumoren und Leukämien zur Anwendung. Nachdem Arsentrioxid durch die Entdeckung der Röntgenstrahlung und die Entwicklung potenter Zytostatika bei der Therapie akuter myeloischer Leukämien immer mehr verdrängt worden war, fanden organische und anorganische dreiwertige Arsenverbindungen bis Ende des 20. Jahrhunderts neben der Anwendung im Bereich der Homöopathie sowie der Therapie von Syphilis und Leishmaniose nur noch Verwendung bei der Therapie der refraktären oder rezidierten akuten Promyelozytenleukämie (APL). Bis vor kurzem wurde vermutet, daß Arsentrioxid seine therapeutischen Effekte nur in APL-Zellen entwickeln könne, da die Arsentrioxid-Wirkung an die Anwesenheit des Fusionsproteins PML-RAR $\alpha$  gekoppelt sei. PML-RAR $\alpha$  ist das Fusionsprotein von Promyelozyten-Leukämie-Proteins mit der  $\alpha$ -Untereinheit des Retinsäurerezeptors. Die Effekte des Arsentrioxids auf APL-Zellen umfassen neben dem Abbau des PML-RAR $\alpha$ -Fusionsproteins nach SUMO-1-Bindung und Ubiquitinylierung auch Vorgänge, die nicht unbedingt an das Vorhandensein des Fusionsproteins gekoppelt sein müssen: Apoptose-Induktion und Zelldifferenzierung.

In dieser Arbeit wurde daher die Wirkung von Arsentrioxid auf Apoptose, Differenzierung und Proliferation an 22 malignen lymphatischen und myeloischen Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsstadiums und Herkunftsgewebes untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität dieser Zelllinien gegenüber Arsentrioxid-Konzentrationen, welche auch bei der APL-Therapie im Plasma von Patienten zu erzielen sind, konnten drei Sensitivitätsgruppen für Zelllinien definiert werden: Zelllinien mit Sensitivität gegenüber  $\geq 0,1 \mu\text{M}$  (Gruppe A),  $\geq 1 \mu\text{M}$  (Gruppe B) und  $\geq 5 \mu\text{M}$  (Gruppe C) Arsentrioxid. Die Klassifizierung schloß auch sieben Zytostatika-resistente Zelllinien ein, welche alle Sensitivitätsgruppen repräsentierten. Unter diesen Zytostatika-resistenten Zelllinien waren Vertreter aller Sensitivitätsgruppen zu finden: Die Zelllinie LOUCY gehörte der Sensitivitätsgruppe A an, CCRF-CEM und deren Zytostatika-resistente Derivate CEM/C1 und CEM/C2 fielen

in die Sensitivitätsgruppe B und die Zelllinie K-562 sowie deren Doxorubicin-resistente Derivate in die Sensitivitätsgruppe C. Lediglich die Zytostatika-resistenten Derivate der Zelllinie HL-60 (Sensitivitätsgruppe B), HL-60/MX1 und HL-60/MX2, zeigten eine geringere Sensitivität als deren parentale Zelllinie und wurden der Gruppe C zugeordnet.

Eine Arsentrioxid-Behandlung repräsentativer Zelllinien (einschließlich der Zytostatika-resistenten Zelllinien) hatte keinen Einfluß auf die P-Glykoprotein-Expression oder -Regulation und war unabhängig von der Expression des Differenzierungsmarkers Thy-1. Auch für das Zytostatikaresistenz-vermittelnde Protein MVP/LRP (*major vault protein/lung resistance protein*) konnte keine Regulation nach Arsentrioxid-Behandlung beobachtet werden.

Der für die Arsentrioxid-induzierte Apoptose verantwortliche Mechanismus wurde für repräsentative Zelllinien aller Sensitivitätsgruppen bestimmt. Arsentrioxid-Behandlung von Zellen führte zu einer Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Dies wurde nachgewiesen durch die Detektion von aktivierter Caspase-3, von den gespaltenen natürlichen Caspasen-Substraten Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) und D4-GDP-Dissoziation-Inhibitor (D4-GDI), von dem synthetischen Caspase-3 Substrat PhiPhiLux G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> und durch die Bindung der fluoreszierenden Caspase-Inhibitoren FITC-VAD-FMK und FITC-YVADAPK-DNP. Arsentrioxid-Behandlung von Zellen bewirkte den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, welches durch die fluoreszierenden Mitochondrien-spezifischen Farbstoffe MitoTrackerRed CMXRos, MitoTrackerRed CM-H<sub>2</sub>XRos und JC-1 nachgewiesen wurde. Der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 ändert seine Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit vom mitochondrialen Redoxpotential. Nach Arsentrioxidbehandlung kam es zur Bildung von ROS (*reactive oxygen species*, nachgewiesen durch Dihydroethidium). Die Mitochondrien sind als primärer Wirkungsort des Arsentrioxids anzusehen, da Caspasen-Inhibitoren zwar einen Rückgang des Prozentsatzes apoptotischer Zellen bewirkten und die Aktivierung von Caspasen hemmten, aber nur einen geringen Einfluß auf die Bildung von ROS und den Funktionsverlust der Mitochondrien hatten. NO-Radikale traten hingegen nur bei einigen Zelllinien nach Arsentrioxid-Behandlung auf.

In einigen der Zelllinien kam es zur Induktion von p53, jedoch scheint dies kein genereller Mechanismus der Arsentrioxid-Wirkung zu sein.

Im Rahmen der Arsentrioxid-induzierten Apoptose konnte weder eine CD95-Induktion gemessen noch die Arsentrioxid-induzierte Apoptose durch Blockierung des CD95-Rezeptors gehemmt werden. Somit erscheint eine Kombination von Arsentrioxid mit Substanzen sinnvoll, welche über den CD95-Weg Apoptose induzieren. Ferner konnte an verschiedenen Zelllinien gezeigt werden, daß die Expression der Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptoren TNFR1- und TNFR2 durch Arsentrioxid-Behandlung nicht beeinflußt wird.

Neben der Apoptose-Induktion zeigte Arsentrioxid eine Apoptose-unabhängige Proliferationsinhibition. Die Proliferationsinhibition trat bereits bei einer Arsentrioxid-Konzentration auf, welche entweder keine Apoptose auslöste oder aber Apoptose nur in einem kleinen Anteil der Gesamtpopulation induzierte. Die durch Arsentrioxid induzierte Apoptose war unabhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus und führte weder zu einem Zellzyklusarrest noch zu einer Regulation des Proliferationsmarkers Ki67. Auch dieses Phänomen läßt sich mit einer Primärwirkung von Arsentrioxid auf Mitochondrien erklären: Durch die Inaktivierung von Mitochondrien wird die Energieproduktion der Zelle entkoppelt und die Zelle verharrt in dem Zustand, in dem sie sich gerade befindet.

Aufgrund dieser Arbeit wurde eine Systematik eingeführt, anhand derer Zelllinien gemäß ihrer Sensitivität gegenüber Arsentrioxid-induzierter Apoptose klassifiziert werden können. Ein für zahlreiche hämatopoetische Zelllinien allgemeingültiger Mechanismus der Apoptose-Induktion wurde beschrieben: die Caspasen-unabhängige Mitochondrieninaktivierung. Es wurde ferner gezeigt, daß es im Rahmen der Arsentrioxid-Behandlung hämatopoetischer Zelllinien zu einer Apoptose-unabhängigen Proliferationsinhibition kommen kann.