

3. Einleitung

3.1 Die Verwendung von Arsentrioxid in der Medizin

3.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Trotz bzw. wegen ihrer toxischen Wirkung werden Arsenverbindungen seit über 2400 Jahren zur Therapie unterschiedlichster Erkrankungen genutzt (Klaassen, 1996). Aristoteles verwandte bereits Arsentrioxid- und Arsentrisulfid-haltige Salben zur Heilung von Geschwüren. Während des Mittelalters fanden arsenhaltige Salben und Tinkturen mehr oder weniger effektive Verwendung als fieberauslösende Reagenzien sowie bei der Heilung von Pest und Malaria. Bereits im 18. und 19. Jahrhundert wurden systematische Untersuchungen zu Therapien mit Arsentrioxid durchgeführt. Zu erwähnen sind vor allem die Untersuchungen von Thomas Fowler, Charles-Hector Guisan, Jean-Louis Schaller und Louis Pasteur. Während Charles-Hector Guisan und Jean-Louis Schaller eine Therapie gegen Tollwut zu etablieren versuchten (Bosson, 2001), benutzte Thomas Fowler eine nach ihm benannte wässrige, NaHCO_3 -gepufferte Arsentrioxid-Lösung zur Therapie von Haut- und Brustkrebs sowie von Leukämien (Aronson, 1994; Antman, 2001). Mit der Entdeckung der ionisierenden Strahlung und dem Aufschwung der chemischen Industrie zu Beginn des 20. Jahrhunderts geriet Arsentrioxid als Therapeutikum immer mehr in Vergessenheit. Lediglich bei der Therapie der refraktären akuten Promyelozytenleukämie (APL) oder im Falle eines Rezidivs bei einer APL fand bzw. findet es nach wie vor Verwendung. Gegen Ende des 20. Jahrhunderts erschienen mehrere Einzelfallberichte und Publikationen klinischer Studien, welche die effektive Wirkung einer Arsentrioxidtherapie bei primärer APL eindeutig belegten (Chen, 1997; Shen, 1997; Ni, 1998; Soignet, 1998; Tallman, 1998; Agis, 1999; Hu, 1999; Niu, 1999; Hu, 2000; Soignet, 2001a; Soignet, 2001b; Tallman, 2002). Es liegt bereits ein erster Bericht vor über erfolgreiche Knochenmarktransplantation nach Arsentrioxid-Behandlung bei einem Patienten mit refraktärer APL (Leoni, 2002; Mikoshiba, 2002). Bisher gibt es jedoch keine nennenswerten Daten über die Verwendung von Arsentrioxid bei anderen akuten Leukämien als bei der APL. Die Gründe für die bisherige Einschränkung der Verwendung von Arsentrioxid auf die Therapie der APL

beruht auf der chromosomalen Besonderheit der APL und wird im Abschnitt 3.1.3 *Arsentrioxid und APL* erörtert.

3.1.2 Klassifizierung der akuten Leukämien nach der French-American-British (FAB)- und World-Health-Organisation (WHO)-Klassifizierung

Eine allgemein verwandte Einteilung der akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien ist die 1976 von der *French-American-British-Cooperative-Group* erstellte (Bennett, 1976) und in den Jahren 1980 (Bennett, 1980), 1985 (Bennett, 1985) und 1991 (Bennett, 1991) modifizierte Klassifikation. Die Einteilung erfolgte, unter Berücksichtigung der morphologischen Eigenschaften von Leukämiezellen, in acht Gruppen für die akuten myeloischen Leukämien (AML) bzw. in drei Gruppen für die akuten lymphatischen Leukämien (ALL). Eine tabellarische Übersicht dieser Einteilung ist im folgenden dargestellt:

AML-FAB-Klasseneinteilung	ALL-FAB-Klasseneinteilung
FAB-M0 minimal differenzierte AML	FAB-L1 kleinzellige Lymphoblastenleukämie
FAB-M1 unreife AML	FAB-L2 polymorphzellige Lymphoblastenleukämie
FAB-M2 reife AML	FAB-L3 Burkitt-Lymphom
FAB-M3 akute Promyelozytenleukämie (APL)	
FAB-M4 akute myelomonozytäre Leukämie	
FAB-M5 AML a) undifferenziert; b) differenziert	
FAB-M6 akute Erythroleukämie	
FAB-M7 akute Megakaryozytenleukämie	

Die Immunphänotypisierung der Subgruppen FAB-M0 und FAB-M7 kann jedoch nicht rein morphologisch erfolgen. Im Laufe der Jahre gewannen die genauere Charakterisierung der AML durch Immunphänotypisierung und später die molekulargenetische Charakterisierung durch (real time) PCR sowie die zytogenetische Charakterisierung durch (24-Farben) FISH und komparative genomische Hybridisierung immer mehr an Bedeutung. Im Jahr 1988 gab es Bestrebungen, die FAB-Klassifizierung durch die MIC (*morphological - immunological - cytogenetic*)-Klassifizierung zu ersetzen (MIC Cooperative Study Group, 1988), jedoch setzte sich erst die von der WHO 1997 vorgeschlagene neue Klassifizierung durch, die den durch die oben beschriebenen Methoden neu gewonnenen Erkenntnissen entsprach (Harris, 1999; World Health Organisation, 2001).

Eine kurze Übersicht der WHO-Klassifizierung ist im Folgenden dargestellt (Haferlach, 2002):

1. AML mit spezifischen zytogenetischen Translokationen
 - mit t(8;21)(q22;q22), AML/ETO
 - akute Promyelozytenleukämie (AML M3 mit t(15;17)(q22;q11-12) und Varianten, PML-RAR- α)
 - mit abnormen KM-Eosinophilen und inv16(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22); CBF β /MYH11
 - mit 11q23 (MLL)-Anomalien
2. AML mit multilineärer Dysplasie (2-3- Linien betroffen)
 - mit vorausgegangener Myelodysplasie/Myeloproliferativem Syndrom
 - ohne vorausgegangenes Myelodysplastisches Syndrom
3. Therapie-induzierte AML und MDS
 - nach Alkylantien
 - nach Epidophyllotoxin
 - andere Auslöser
4. AML ohne Einordnungsmöglichkeit
 - AML ohne andere Einordnungsmöglichkeiten
 - AML minimal differenziert
 - AML mit Ausreifung
 - AMML
 - akute monozytäre Leukämie
 - akute Erythroleukämie
 - akute Megakaryoblasten-Leukämie
 - akute Basophilen-Leukämie
 - akute Panmyelose mit Myelofibrose
 - Myelosarkom/Chlorom
 - akute biphänotypische Leukämie

Arsentrioxid wird bisher nur zur Differenzierungstherapie einer AML FAB-M3 bzw. AML mit spezifischen zytogenetischen Translokationen (Akute Promyelozytenleukämie AML M3 mit t(15;17)(q22;q11-12) und Varianten, PML-RAR α) eingesetzt.

3.1.3 Arsentrioxid und APL

Die akute Promyelozytenleukämie ist ein morphologisch klar definierter Subtyp der AML (AML FAB-M3) und repräsentiert ca. 8% - 10% aller Leukämien. Die APL zeichnet sich zytogenetisch durch das Vorhandensein einer für sie typischen Translokation eines Teils des Chromosoms 15 auf das Chromosom 17 aus, wodurch es an der Bruchstelle der Chromosomen zur Fusion eines Teils des PML (Promyelozytenleukämie)-Gens mit dem Gen, welches für die α -Untereinheit des Retinsäurerezeptors kodiert, kommt. Diese Translokation wird als t(15;17) bezeichnet und führt zur Bildung eines Fusionsproteins, des sogenannten PML-RAR α (Borrow, 1990; de The, 1990; de The, 1991; Kakizuka, 1991; Pandolfi, 1991; Kastner, 1992). Das Fusionsprotein besitzt sowohl funktionelle Domänen des PML als auch des RAR α : Die Dimerisierungs- und die DNA-Bindedomäne des nativen PML bleiben ebenso

erhalten wie die DNA- und die Liganden-Bindungsdomäne des RAR α . Während es sich bei RAR α um ein gut charakterisiertes Protein handelt, wurde das Protein PML erstmals durch die Klonierung des Fusionsproteins beschrieben¹. PML ist eines von neun Proteinen einer neuen Familie mit sogenannten RING-Finger-Motiven. Diese Proteine besitzen eine oder zwei atypische Zink-Finger-Motive und eine *long-coiled-coil*-Struktur, die bei der Dimerisierung eine Rolle spielt (Goddard, 1991; Reddy, 1992). Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß das Protein PML in sogenannten *nuclear bodies* oder *PML oncogenic domains* lokalisiert ist. Das Fusionsprotein PML-RAR α führt zur Verdrängung von PML und anderen Antigenen aus den *nuclear bodies*. Bisher ist nicht bekannt, in welchen Zellkompartimenten PML-RAR α lokalisiert ist (Kastner, 1992; Daniel, 1993; Dyck, 1994; Koken, 1994; Weis, 1994). Als Folge der Fusion regulatorischer Einheiten kommt es zur aberranten Expression des PML-RAR α -Fusionsproteins (Mann, 2001).

Die chromosomale Besonderheit der APL bedingt auch die Therapie für diese Form der Leukämie. Die Standardtherapie primär diagnostizierter APL hat sich mit der Entdeckung der Effekte von *all-trans*-Retinsäure (ATRA) auf APL-Zellen drastisch verbessert. Durch Gabe von ATRA können in APL-Zellen mehrere Effekte erzielt werden:

- 1) ATRA bewirkt eine Differenzierung der APL-Blasten (Wang, 1996; Chen, 1997; Soignet, 1998; Bruserud, 2000; Calleja, 2000).
- 2) ATRA induziert Apoptose (Gianni, 1999; K.C. Wang, 2000; Zheng, 2000; Nawata, 2001).
- 3) ATRA-Behandlung vermittelt die Anlagerung des Proteins PIC-1/SUMO-1 an PML-RAR α . Das Protein SUMO-1 vermittelt die Bindung von Ubiquitin an das Fusionsprotein (Muller, 1998a; Muller, 1998b; Sternsdorf, 1999; Lallemand-Breitenbach, 2001) sowie die Kondensation von PML in *nuclear bodies* (Gianni, 1999). Durch Ubiquitinylierung kann das Fusionsprotein dann über die klassischen Abbauege degradiert werden.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß eine Kombination von ATRA mit Anthrazyklinen in bis zu 80% der primären APL zu einer kompletten Remission führt. Einige dieser Studien sind z. B. bei Douer (Douer, 2002) übersichtlich dargestellt.

¹ zusammengefaßt bei Mangelsdorf, 1995a und Mangelsdorf, 1995b.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß Arsentrioxid dieselben Effekte auf APL-Zellen besitzt wie ATRA:

- 1) Differenzierung bzw. Wachstumsinhibition (Huff, 1999; Zhu, 1999),
- 2) Apoptose-Induktion (Chen, 1996; X.J. Huang, 1999; Huff, 1999; Jing, 1999; Zhu, 1999; X. Huang, 2000; Kitamura, 2000; Perkins, 2000) und
- 3) Abbau des durch PIC-1/SUMO-1 „markierten“, in *nuclear bodies* kondensierten Fusionsproteins (Muller, 1998a; Muller, 1998b; Sternsdorf, 1999; Lallemand-Breitenbach, 2001).

Seit kurzem liegen auch erste Ergebnisse von *in-vitro*-Experimenten vor, bei denen synergistische Effekte von Arsentrioxid und ATRA für eine potentielle kombinatorische Differenzierungstherapie analysiert wurden (Gianni, 1998; Jing, 2001; Au, 2002).

Wie im Abschnitt *3.1.1 Geschichtlicher Hintergrund* bereits erwähnt, findet Arsentrioxid bei der Therapie refraktärer APL und bei einem Rezidiv Anwendung (Hussein, 2002). Im Falle eines Rezidivs entwickeln 60% bis 70% der Patienten eine Resistenz gegen ATRA (Chen, 1997). Die Arsentrioxid-Therapie erfolgt i. a. über einen Zeitraum von 28 - 60 Tage mit ein bis zwei sich daran anschließenden Konsolidierungstherapien in jeweils 4-wöchigem Abstand (Shen, 1997). Eine komplette Remission wurde, je nach klinischer Studie, morphologisch (weniger als 5% APL-Blasten im Knochenmark (Shen, 1997)) oder molekularbiologisch (Fehlen der PML-RAR α -RNA in der RT-PCR (Soignet, 1998; Hu, 1999; Hu, 2000; Soignet, 2001a)) definiert. Der Prozentsatz an Patienten, bei denen eine komplette Remission erzielt werden konnte, lag je nach Studie bei 72,7% (Niu, 1999), 85% (Shen, 1997), 87% (Dombret, 2002) bzw. 90% (Soignet, 2001a). Bei einer Studie, für die 120 Patienten rekrutiert wurden, lag der Median für das 5-Jahres *relapse free survival* bei 34,0% \pm 6,0%, die Gesamtüberlebensrate bei 52,5% \pm 7,9% (Hu, 1999).

Pharmakokinetische Untersuchungen (Shen, 1997; Ni, 1998) der in klinischen Studien mit Arsentrioxid behandelten Patienten zeigten folgenden Verlauf: Nach intravenöser Applikation von 10 mg Arsentrioxid/Tag stieg die Serumkonzentration dreiwertiger Arsenverbindungen nach 5 Stunden auf einen Maximalwert von 5,5 μ M - 7,3 μ M an und sank nach 8 Stunden auf einen Wert von 2 μ M. Nach 12 Stunden blieb die Serum-Arsenit-Konzentration auf einem Basalwert von ca. 0,7 μ M für

weitere 12 Stunden. Nach 30-tägiger Therapie zeigte die Pharmakokinetik des Serum-Arsenits keine signifikante Veränderung (Shen, 1997).

Zu den bisher beschriebenen potentiellen Nebenwirkungen der Arsentrioxidtherapie gehören Hyperleukozytose und ZNS-Infarkt (Roberts, 2000), schwere neurotoxische Schäden (Yip, 2002), Leukozytose und das Retinsäure-Syndrom (Camacho, 2000), ventrikuläre Tachykardie (*Torsade des pointes*) (Ohnishi, 2000; Barbey, 2001a; Barbey, 2001b; Singer, 2001; Unnikrishnan, 2001; Ohnishi, 2002), nicht näher bestimmtes spontanes Ableben (Westervelt, 2001) sowie die bei Patienten und im Tiermodell für chronische und akute Arsenvergiftungen typischen Effekte wie Diarrhoe, Einschränkung der Leber- und Nierenfunktion und spontane Blutungen aufgrund der Schädigung von Gefäßen. (Ishinishi, 1980; Szinicz, 1988; Reichl, 1989; Itoh, 1990; Reichl, 1990; Reichl, 1991a; Reichl, 1991b; Omura, 1996; Holson, 2000; Tanaka, 2000; Shen, 2001; Yu, 2002).

Es soll noch erwähnt werden, daß die Plasma-Arsenit-Konzentration nicht gleichzusetzen ist mit einer Plasma-Arsentrioxid-Konzentration. Arsentrioxid wird, bevorzugt in der Leber, zu weniger therapeutisch effektivem, jedoch toxischerem Monomethyl-, Dimethyl- und Trimethyl-Arsenit metabolisiert (Petrick, 2000; Abdullaev, 2001; Mandal, 2001; Mass, 2001; Petrick, 2001). Alle diese Verbindungen stellen Arsenite dar. Eine Oxidation des dreiwertigen Arsenits in weniger effektives, fünfwertiges Arsenat ist ebenfalls möglich. Organische Arsenverbindungen wie beispielsweise Phenylarsin (Estrov, 1999) werden zur Therapie von APL diskutiert oder befinden sich, wie im Fall des Melarsoprol™, bereits im Stadium klinischer Studien (Soignet, 1999). Wichtig ist es in diesem Zusammenhang auch, zu erwähnen, daß es keinen Hinweis darauf gibt, daß Arsentrioxid *per se* mutagen oder kanzerogen ist; jedoch gilt Arsentrioxid als Ko-Kanzerogen (Rossman, 2001).

3.1.4 Arsentrioxid und Nicht-Promyelozyten-Leukämien

Neben den beschriebenen Effekten des Arsentrioxid bei primären APL-Zellen und APL-Zelllinien gibt es bereits einige Berichte über Effekte von Arsentrioxid bei primären Zellen von Patienten mit nicht-FAB(M3)-Leukämien bzw. etablierten Leukämiezelllinien, welche nicht durch den Typ FAB(M3) charakterisiert werden. Jedoch sind die beschriebenen Wirkungen des Arsentrioxid nicht einheitlich und

liefern ein nur unvollständiges Bild der bei Arsentrioxid-Behandlung von Zellen ablaufenden Prozesse. Eine detailliertere Beschreibung befindet sich im Abschnitt *3.3 Effekte der Arsentrioxid-Wirkung in hämatopoetischen Zellen.*

Einige Beispiele aktueller klinischer Studien zur Verwendung von Arsentrioxid sollen die vielfältige Einsatzmöglichkeit der Substanz bei Leukämien verdeutlichen. Klinische Studien am National Cancer Institute, Maryland, USA, bzw. der Freien Universität Berlin, Deutschland, beschäftigen sich mit der Therapie:

- des multiplem Myeloms (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Phase II Study of Arsenic Trioxide in Patients With Multiple Myeloma, Study ID Numbers 199/15935, CTI-1057; Phase II Study of Arsenic Trioxide and Dexamethasone in Patients With Recurrent or Refractory Stage II or III Multiple Myeloma, Study ID Numbers 199/15878, MSKCC-01012, NCI-G01-1951, CTI-1060; Arsenic Trioxide Plus Vitamin C in Treating Patients With Recurrent or Refractory Multiple Myeloma, Study ID Numbers 199/15234, SCCC-20010, NCI-43, SCCC-NCI-43),
- der chronisch myelogenen Leukämie (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Recurrent or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia or Chronic Myelogenous Leukemia, Study ID Numbers 199/15297, MCC-12395, NCI-1230; Arsenic Trioxide in Treating Patients With Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia That Has Not Responded to Previous Treatment, Study ID Numbers 199/15294, MDA-DM-00058, NCI-311; Arsenic Trioxide in Treating Patients With Relapsed or Refractory Chronic Myelogenous Leukemia, Study ID Numbers 199/14933, MSKCC-99076A, NCI-190),
- der chronisch lymphozytischen Leukämie (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Refractory or Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia, Study ID Numbers 199/15292, MDA-DM-00059, NCI-310),
- der akuten lymphoblastischen Leukämie (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia, Study ID Numbers 199/15218, E-9998),
- der akuten myeloischen Leukämie (z. B. am Universitätsklinikum Benjamin Franklin, FU-Berlin, Deutschland: Arsentrioxid zur Behandlung der AML bei Rezidiv, therapierefraktärem Zustand oder > 70 Jahre und Kontraindikation für eine Standard-Polychemotherapie oder z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Acute Myeloid Leukemia, Study ID Numbers 199/14934, NU-99H6, NCI-T99-0094, NU-476-016),
- lymphoproliferativen Störungen (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Relapsed or Refractory Indolent Lymphoproliferative Disorders, Study ID Numbers 199/14899, MTS-99-884-ME, NCI-T99-0063) und
- Leukämien oder Lymphomen bei Kindern (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide to Treat Children with Leukemia or Lymphoma, Study ID Numbers 00-C-0070).

3.1.5 Die Verwendung von Arsentrioxid in der Onkologie

In der Onkologie findet Arsentrioxid in folgenden klinischen Studien Anwendung:

- von soliden Tumoren der Blase und des Urinaltraktes (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Recurrent Bladder or Urinary Tract Cancer, Study ID Numbers 199/15635, CLB-99903),
- von Tumoren der Zervix (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Stage IVB or Recurrent Cervical Cancer, Study ID Numbers 199/15204, MSKCC-00018, NCI-30),
- von Tumoren der Prostata (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Stage IV Prostate Cancer That Has Not Responded to Previous Hormone Therapy, Study ID Numbers 199/14580, AECM-CCRC-9929, NCI-T99-0077)

- des Hodgkin-Lymphoms (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin's Disease, Study ID Numbers 199/14884; NU-99H5; NCI-T99-0093) und
- des Non-Hodkin-Lymphoms (z. B. am National Cancer Institute, Maryland, USA: Arsenic Trioxide in Treating Patients With Relapsed or Refractory Non- Hodgkin's Lymphoma, Study ID Numbers 199/14814, MSKCC-99051, NCI-T99-0062).

3.1.6 Weitere Verwendungen von Arsentrioxid in der Medizin

Neben der Verwendung bei der Therapie maligner Erkrankungen finden organische Arsenverbindungen z. B. Anwendung in der Veterinärmedizin bei der Therapie des chronischen Müdigkeitsyndromes bei Pferden (Tarello, 2001).

Die Bedeutung von Arsentrioxid bei der Therapie von Malaria hat aufgrund der hohen Todesrate deutlich abgenommen. Außerdem fanden organische Arsenverbindungen wie z. B. Salversan bei der Therapie von Syphilis Verwendung.

Weiterhin wird Arsentrioxid in der Homöopathie als *Arsenicum album* oder *Arsenicum jodicum* u. a. als schweißtreibendes und krampflösendes Agens eingesetzt. Diese Funktionen des Arsentrioxid wurden schon im Mittelalter beschrieben (vgl. Abschnitt 3.1.1 *Geschichtlicher Hintergrund*).

3.1.7 Die Bedeutung der Zytostatika-Resistenz für die Therapie akuter Leukämien

Ein großes Problem der Therapie akuter Leukämien stellen Resistenzen gegen konventionelle Zytostatika dar. Die Regulation des P-Glykoproteins (auch als MDR-1, *multiple drug resistance* bezeichnet) ist ein möglicher Mechanismus der Zytostatika-Resistenz. P-Glykoprotein ist ein Transmembranprotein mit dem Molekulargewicht 170 kDa. Die Anwesenheit von Zytostatika, wie beispielsweise Antrazyklinen, kann eine Hochregulation des P-Glykoproteins bewirken (Friche, 1989). P-Glykoprotein pumpt Zytostatika aktiv aus dem Zellinneren (Chambers, 1993) und bewirkt dadurch eine Desensibilisierung der Zellen gegenüber konventionellen Zytostatika. Zelllinien mit multiplen Resistenzmechanismen wurden ebenfalls beschrieben (Volm, 1992). Neben diesem als klassische Zytostatika-Resistenz bezeichneten Mechanismus gibt es alternative Resistenzmechanismen (Beck, 1987), zu denen u. a. Proteine der gleichen Superfamilie wie MDR-1, beispielsweise das MRP (Hyde, 1990), gehören oder Proteine mit Verwandtschaft zu den Mitoxantron-Resistenz-Proteinen (MXR) bzw. dem plazentalen ABC-Transporter

(ABCP) (Van Den Heuvel-Eibrink, 2002). Für das Zytostatika-resistenz-vermittelnde Protein MDR-1 konnte gezeigt werden, daß es auch den Efflux von Arsentrioxid aus Zellen erhöhen kann (Salerno, 2002). Möglich ist auch, daß keiner der bisher bekannten Mechanismen beteiligt ist (Kubota, 1994). Ein weiterer Resistenz-mechanismus beruht auf der Anwesenheit sogenannter *vaults*². Diese haben eine Masse von 13 MDa und bestehen aus mehreren Kopien des 100 kDa großen *major vault protein/lung resistance protein* MVP/LRP (Scheper, 1993), welches zusammen mit zwei assoziierten kleineren Proteinen (VAPRP und TEP1) und mehreren kleinen, nichttranslatierten, 88 – 141 Basen langen RNA-Molekülen einen Komplex bildet, der für die Resistenz gegenüber Zytostatika verantwortlich gemacht wird (van Zon, 2001). Auf welche Weise dieser Komplex die Zytostatika-Resistenz vermittelt, ist noch weitgehend unbekannt, jedoch wird LRP eine Bedeutung beim Transport zwischen Zytoplasma und Zellkern zugeschrieben (Scheffer, 1995).

Arsentrioxid soll die Expression des MDR-1 in HepG2-Zellen (Kioka, 1992) und in primären adulten Rattenhepatozyten (Vernhet, 2001b) induzieren. Für Arsentrioxid wird auch ein eigener Resistenzmechanismus diskutiert. So kommt es durch Arsenit-Behandlung von primären Epithelzell-Kulturen des proximalen Tubulus der Maus-Niere zur Induktion des sogenannten Arsenit-induzierbaren RNA-assoziierten Proteins (AIRAP), welches einen Mechanismus zum Schutz vor Arseniten bietet (Sok, 2001).

3.2 Apoptose

3.2.1 Apoptose – Nekrose – Paraptose – Aponekrose: Definitionen und Abgrenzungen

Den Begriff der Apoptose prägten Kerr et al. 1972 (Kerr, 1972) für ein Phänomen, das Carl Vogt bereits 1842 (Peter, 1997) beobachtete. Mit dem Begriff Apoptose bezeichneten Kerr et al definierte morphologische Veränderungen von Zellen während des Zelltods. Bei der Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, beobachteten sie die Kondensation und Fragmentierung des Zellkerns, das Anschwellen der Zellmembran und das Abschnüren von Vesikeln,

² Übersichtsarbeiten zum Mechanismus der *vault*-vermittelten Zytostatikaresistenz: Kedersha, 1990a; Kedersha,

welche von Makrophagen phagozytiert wurden. Diese Erscheinung erinnerte sie an herabfallende Blätter von Bäumen im Herbst: Apoptose, griechisch *αποπτωσις*.

Der programmierte Zelltod stellt einen energieverbrauchenden Prozeß dar, bei dem in den Zellen definierte Vorgänge in unterschiedlichen Organellen ablaufen. Hierzu gehört u. a. die Aktivierung einer Kaskade von Cystein-Proteasen, welche auch als Caspasen bezeichnet werden. Eine Diskussion der bedeutendsten bei der Apoptose ablaufenden Prozesse befindet sich in den nachfolgenden Abschnitten dieses Kapitels. Kerr et al (Kerr, 1972) unterschieden somit erstmals zwischen verschiedenen Formen des Zelltodes: der Apoptose und der Nekrose. Die Nekrose definiert sich durch das Anschwellen der Zelle und die Auflösung des Nukleus. Sie wird häufig vereinfachend auch als Caspasen-unabhängiger Zelltod bezeichnet.

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, daß diese Klassifizierung nur eine stark vereinfachte Darstellung der tatsächlichen Möglichkeiten beim Sterben einer Zelle bietet. Der Begriff Aponekrose (Formigli, 2000) bezeichnet eine der zwei bekannten Übergänge zwischen Apoptose und Nekrose. Bei der Aponekrose laufen mehr oder weniger alle Prozesse ab, die charakteristisch für die Apoptose sind. So kommt es beispielsweise zur Aktivierung von Caspasen (Cohen, 1997; Thornberry, 1998a; Thornberry, 1998b), jedoch resultiert der Vorgang der Aponekrose in einer Nekrose. Bei der Paraptose (Sperandio, 2000) hingegen kommt es zu keiner für die Apoptose typischen Aktivierung von Caspasen. Der Zelltod führt nicht zu dem für die Nekrose typischen Aufplatzen der Zelle, sondern zum Abschnüren von Vakuolen und zum Anschwellen von Mitochondrien: Beides sind Apoptose-typische Prozesse. Somit wird deutlich, daß die Bezeichnung des Caspasen-unabhängigen Zelltods für Nekrose keinesfalls zutreffend ist.

Da bei der Nekrose das Aufplatzen absterbender Zellen zytoplasmatische Proteine an solche Orte des Körpers bringt, an denen sie normalerweise nicht anzutreffen sind, führt der nekrotische Zelltod i. a. zu inflammatorischen Prozessen.

3.2.2 *Physiologische Bedeutung und Beispiele der Apoptose*

Die physiologische Bedeutung der Apoptose kommt bereits durch den Begriff des „programmierten Zelltods“ zum Ausdruck. Zellen, welche ihre Funktion erfüllt haben

oder aufgrund eines Alterungsprozesses nicht mehr voll funktionstüchtig sind, erfahren zu Beginn der Apoptose morphologische Veränderungen der Zellmembran (i. e. Präsentation von Phosphatidylserinen auf der Zellemembranaußenseite; vgl. Abschnitt 3.2.4.2 Prozesse, die an der Zellmembran stattfinden). Makrophagen werden chemotaktisch zu diesen Phosphatidylserin-präsentierenden Zellen oder zu den von diesen Zellen abgeschnürten Vesikeln geleitet. Das im Serum zirkulierende Protein Annexin V besitzt (in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen) eine hohe Affinität für Phosphatidylserine (van Engeland, 1998) und steht neben dem *class B scavenger*, CD36, CD68, CD14, β 2-Glykoprotein und Gas-6 in Diskussion, bei der Chemoattraktion der Makrophagen von Bedeutung zu sein (Fadok, 1998), wobei nach neueren Erkenntnissen die Annexin V-Bindung an Phosphatidylserin zur Chemoattraktion nicht notwendig zu sein scheint (Verhoven, 1999). Da Makrophagen diese chemisch markierten Membranvesikel phagozytieren, können inflammatorische Prozessen vermieden werden (Green, 2001; van Lent, 2001).

Der programmierte Zelltod findet permanent in jedem Organismus statt, z. B.:

- beim Abbau gealterter hämatopoetischer Zellen (Daigle, 2001; Debatin, 2001; Kastner, 2001; Tsujimoto, 2001; Chello, 2002; Ishii, 2002; Moisan, 2002; Tamura, 2002; Yamamoto, 2002),
- beim Absterben von Neuronen bzw. bei der Regulation inflammatorischer Prozesse des Nervensystems (Poirier, 1997; Landowski, 2001),
- bei Regenerationsprozessen (Susca, 2001),
- bei Umwandlungen in der Mammarydrüse vor, während und nach der Laktation (Humphreys, 1996; Jager, 1997)

und beginnt bereits während der Embryogenese, z. B. als das Absterben von Zellen in den *limb buds* (Extremitätenknospen) bei der Ausformung von Fingern und Zehen (Wang, 1992).

Zahlreiche Übersichtsarbeiten stellen Aspekte der immensen physiologischen Bedeutung der Apoptose dar (Wyllie, 1980; Trauth, 1989; Nagata, 1995; Brady, 1998; Evan, 1998; Granville, 1998; Lenaz, 1998; Green, 2001; Gupta, 2001; Maeda, 2001).

In der Therapie zahlreicher maligner Erkrankungen nutzt man die Erkenntnisse, daß bestimmte chemische Substanzen bzw. Zytostatika (Pantazis, 1995; Caserini, 1997; Bellosillo, 1998; Allison, 2000; Kurth, 2000; Li, 2000; Chow, 2001; Harris, 2001;

Huang, 2001; Joseph, 2001; Schwartz, 2001; Stepczynska, 2001; Evans, 2002) oder spezifische Antikörper (Landowski, 2001; Timmer, 2002) in der Lage sind, in Zellen bzw. Geweben Apoptose zu induzieren.

3.2.3 Induktoren der Apoptose³

Der Vorgang der Apoptose kann durch zahlreiche Induktoren initiiert werden. Teilweise handelt es sich bei den Induktoren um Substanzen, welche sowohl Apoptose als auch Nekrose auslösen können, wie z. B. TNF (Leist, 1997; Fiers, 1999) oder FasL (Kawahara, 1998; Vercaemmen, 1998). Der Zustand der Zelle und das chemische Milieu entscheiden, welche Art des Zelltods ausgelöst wird.

Zur Übersicht über die unterschiedlichen Induktionsmöglichkeiten sei auf **Abbildung 1** und die **Abbildungen 35** und **36 (Seiten 145** und **146)** verwiesen. Eine Grobeinteilung der Apoptose-Induktoren erfolgt in dieser Arbeit in fünf Hauptgruppen:

- 1) Apoptose-Induktion durch UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung,
- 2) Apoptose-Induktion durch *serum starvation* (Entzug von Wachstumsfaktoren bzw. Nährstoffen),
- 3) Rezeptor-vermittelte, Liganden-abhängige Apoptose (z. B. durch FasL-CD95, TRAIL-*decoy receptor*, TWEAK-*death receptor*, TNF-TNFR1 oder TNF-TNFR2-Bindung),
- 4) Apoptose-Induktion durch freie Sauerstoffradikale (ROS = *reactive oxygen species*) und
- 5) *drug induced apoptosis* (Chemikalien-induzierte bzw. Medikamenten-induzierte Apoptose).

Apoptose-Induktion durch ionisierende Strahlung und UV-Strahlung erfolgt als Reaktion auf chemische Veränderungen in der Zelle, welche Strahlung induzieren kann. Initiator der Apoptose ist in der Regel das Auftreten von Thymidin-Dimeren und DNA-Doppelstrangbrüchen (Story, 1994; Mallya, 1999; Theron, 2000; Menisserde Murcia, 2001).

³ Bei der in diesem und den folgenden Abschnitten angegebenen Literatur handelt es sich u. a. auch um Übersichtsarbeiten zu dem entsprechenden Thema.

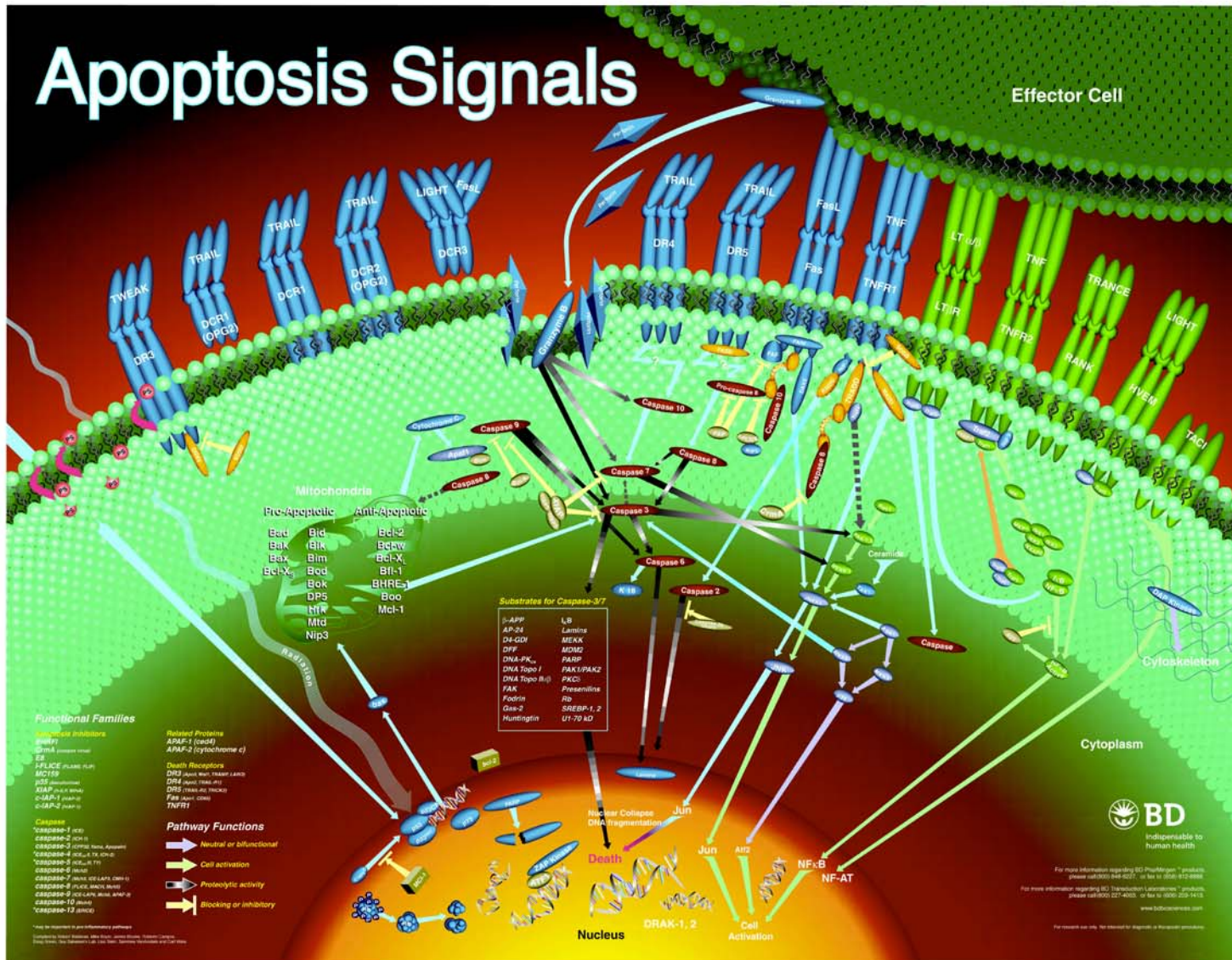


Abbildung 1: Übersicht über die wichtigsten Wege der Apoptose-Induktion. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma BD Biosciences, Heidelberg (2002).

Hierbei kommt es, wie auch bei der Apoptose-Induktion durch *serum starvation*, zu einer Aktivierung bzw. Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors p53 (Lowe, 1993; Yonish-Rouach, 1993; Zambetti, 1993).

Das Protein p53 blockiert die DNA-Replikation in den geschädigten Zellen. Kann der Schaden an der DNA nicht innerhalb einer bestimmten Zeit repariert werden, so wird Apoptose ausgelöst. Die phosphorylierte Form des p53 (She, 2002; Wu, 2002) induziert die erhöhte Synthese des Proteins Bax und vermittelt die Repression der *bcl-2*-Transkription, was zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von Bcl-2, Bcl-x und Bax an der äußeren Mitochondrienmembran führt (Williams, 1993; Yang, 1995). Mitglieder der Bcl-2-Familie besitzen eine Dimerisierungsdomäne und sind mit der äußeren Mitochondrienmembran (Bcl-2, Bcl-x, Bax) sowie der Membran des endoplasmatischen Retikulum (ER) und des Golgy-Apparates (Bcl-2) assoziiert (Janiak, 1994; Ferri, 2001; Kroemer, 2001). Bcl-2/Bcl-2-Homodimere bzw. Bcl-2/Bcl-x- sowie Bcl-2/Bax-Heterodimere besitzen eine anti-apoptotische bzw. neutrale Funktion (Cosulich, 1997; Adams, 1998; Shimizu, 2000). Durch erhöhte Bax- bzw. verminderte Bcl-2-Expression bilden sich vermehrt Bax/Bax-Homodimere aus (Suzuki, 2000). Diese bewirken eine strukturelle Veränderung an der Mitochondrienmembran. Es kommt zur Ausschüttung von Cytochrom c (Apaf-2) und anderen Proteinen (z. B. AIF, *apoptosis inducing factor*) aus dem interstitiellen Spalt der Mitochondrien. Auf welche Weise dies geschieht, ist noch nicht genau geklärt (Desagher, 2000). Zur Zeit gelten drei Modelle als möglich:

- 1) die Bildung neuer, großer Kanäle oder Poren in der äußeren Mitochondrienmembran
- 2) die Schließung von VDACs (*voltage dependent anion channel*)
- 3) die Öffnung von PTPs (*permeability transition pore*)

Im ersten Fall wäre denkbar, daß diese neuen Kanäle von Bax alleine gebildet werden (Antonsson, 1997) oder von Bax in Assoziation mit VDAC, Cyclophilin D und dem *adenine-nucleotide-translocator* (ANT) (Shimizu, 1999). Diskutiert wird auch die Ausbildung lipophiler Kanäle durch Lipide oder Protein-Lipid-Komplexe nach Integration von Bax in die äußere Mitochondrienmembran (Basanez, 1999).

Bei den Modellen 2) und 3) soll die Assoziation von Bax mit der Mitochondrienmembran als Folge eines Anschwellens der Mitochondrienmatrix zum mechanischen

Aufplatzen der äußeren Mitochondrienmembran führen. Im Falle des Modells 2 käme es zu einer Beeinträchtigung des ATP/ADP Austauschs durch Hemmung der F_1F_0 ATPase und der damit verbundenen Ansammlung von Protonen zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran. Die Erhöhung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) soll zu einem osmotischen Ungleichgewicht führen und somit zum Aufreißen der äußeren Mitochondrienmembran. Modell 3 (Kroemer, 1997) favorisiert die Theorie, daß das Aufplatzen der Mitochondrienmembran durch ein Bax-vermitteltes Öffnen der PTPs zustande kommt, indem Bax an die Kontaktstellen des *adenine-nucleotide-translocator* (ANT) zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran bindet, nachdem es in die innere Membran transloziert wurde (Marzo, 1998; Bauer, 1999; Brenner, 2000).

Nach der Freisetzung des Cytochrom c in das Zytoplasma bindet dieses an das Protein Apaf-1 (Cecconi, 1999). Dieser Apaf (*apoptosis protease activating factor*)-Komplex wird auch als Apoptosom bezeichnet und ist zusammen mit ATP ein Aktivator der Caspase-9 und Caspase-3 (Zou, 1997). Das Protein Diva/Boo ist ein weiteres Mitglied der Bcl-2-Familie und ein Inhibitor dieses Komplexes (Cai, 1998). Die Bedeutung der Caspasen und die Prozesse, welche nach Rezeptor-vermittelter, Liganden-abhängiger Apoptose, Apoptose-Induktion nach Generierung von ROS sowie *drug induced apoptosis* ablaufen, werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben. Eine zusammenfassende Darstellung der Apoptose-Induktion durch die in dieser Arbeit verwandten Zytostatika erfolgt ebenfalls in einem separaten Abschnitt.

3.2.3.1 Die durch Rezeptor-Liganden-Bindung induzierte Apoptose

Apoptose-Induktion kann auch durch Bindung von Liganden an funktionelle Rezeptoren und eine sich daran anschließende Signaltransduktion erfolgen. Zur Übersicht der im Folgenden beschriebenen Prozesse sei auf die **Abbildungen 1, 35** und **36** hingewiesen. Als Musterbeispiel eines klassischen Weges der Apoptose-Induktion ist in diesem Abschnitt der FasL-CD95(Fas)-Weg beschrieben. Weitere Wege der Liganden-abhängigen, Rezeptor-vermittelten Apoptose-Induktion stellen z. B. die Wechselwirkungen zwischen TRAIL und dem *decoy receptor* (Ashkenazi, 1999), TWEAK und dem *death receptor* (Ashkenazi, 1999) sowie TNF und dem

TNFR1 bzw. dem TNFR2 (Baker, 1996) dar. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, daß auch für den klassischen Weg der Apoptose-Induktion durch FasL ein zweiter Effekt beschrieben wurde: die Induktion von Nekrose (s. Abschnitt 3.2.1 *Apoptose – Nekrose – Paraptose – Aponekrose: Definitionen und Abgrenzungen*). Für eine detaillierte Betrachtung der im Folgenden beschriebenen Prozesse sei auf die nachstehenden Übersichtsarbeiten verwiesen: (Dhein, 1994; Ware, 1996; Debatin, 1997; Debatin, 1998; Krammer, 1998; Friesen, 1999; Debatin, 2001).

FasL (CD95L) ist ein Typ-II-Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa und wird überwiegend von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Tanaka, 1995). Die Wechselwirkungen zwischen FasL und Fas (Fas, auch als CD95 bezeichnet, ein Typ I-Transmembranrezeptor mit einem Molekulargewicht von 48 kDa) wurden detailliert untersucht, u. a. da die Wechselwirkung zwischen FasL und CD95 bei der antiviralen Immunabwehr, der gezielten Beseitigung von Tumorzellen (Trauth, 1989) und bei der Entwicklung, Reifung und Differenzierung von Lymphozyten von Bedeutung ist (Lynch, 1995; Nagata, 1995). FasL weist an seinem C-terminalen Ende einen 150 Aminosäuren langen Bereich mit Homologie zu TNF, Lymphotoxin und CD40-Ligand auf. Membranständige Metalloproteinasen vermitteln die Proteolyse der membran-ständigen Form des FasL in eine lösliche Form (Tanaka, 1998). CD95 ist ein Membranrezeptor der TNF-Familie und wird auf den meisten Zellen exprimiert. Die Bindung von CD95L an CD95 führt zu einer Trimerisierung von CD95-Molekülen, was ein Signal zur Auslösung von Apoptose darstellt. Der zytoplasmatische Anteil von CD95 besitzt eine 70 Aminosäuren lange funktionelle Domäne, die sog. *death domain* (DD). Der TNFR1 besitzt ebenfalls eine solche DD mit hoher Homologie zu der DD des CD95. Die Apoptose-Induktion über CD95 kann auf verschiedene Wege erfolgen:

Nach FasL-vermittelter CD95-Trimerisierung findet eine Interaktion zwischen der DD von CD95 und der DD des assoziatorischen zytoplasmatischen Proteins FADD (*Fas-associated death domain protein*) statt (Muzio, 1996). FADD besitzt neben der DD eine weitere funktionelle Einheit, die DED (*death effector domain*). Die DED der zytoplasmatischen Caspase-8 dimerisiert mit der DED dieses Proteinkomplexes. Durch die Bindung wird Caspase-8 in seine aktive Form überführt und kann nun die Caspasen-Kaskade aktivieren (vgl. Abschnitt 3.2.4.3 *Zytoplasmatische Prozesse*) (Vincenz, 1997).

Offensichtlich bedarf es jedoch keines assoziatorischen Proteins mit DD zur CD95-vermittelten Apoptose-Induktion. Das Protein Daxx (*death domain associated protein xx*) (Yang, 1997; Chang, 1998; Davison, 2002; Zhong, 2000) und die Proteine RIP (*receptor interacting protein*) und RAIDD (*receptor interacting protein associated protein with death domain*) besitzen keine DD und sind ebenfalls in der Lage, an CD95-Trimere zu binden und Caspase-2 in deren aktive Form zu überführen (Stanger, 1995; Duan, 1997). Während der DD-vermittelte Weg der Apoptose-Induktion durch FLIP (*Fas-like interleukin converting enzyme inhibitory protein*), nicht jedoch durch Bcl-2 blockiert werden kann, ist Bcl-2 in der Lage, die durch Daxx vermittelte Apoptose zu blockieren (Yang, 1997).

Die Verwendung von Anti-CD95-Antikörpern ist von experimentellem und therapeutischem Interesse. Hierbei muß zwischen drei Arten von Antikörpern unterschieden werden:

- 1) neutrale Antikörper, welche an CD95 binden, jedoch keinen physiologischen Effekt besitzen,
- 2) Antikörper, welche den Effekt von FasL nachahmen, an CD95 binden und zu einer Trimerisierung von CD95 führen, so daß Apoptose induziert wird, z. B. Klon 7C11 (Kim, 2000),
- 3) Antikörper, welche zwar an CD95 binden, jedoch eine Trimerisierung des Rezeptors verhindern und somit einen anti-apoptosichen Effekt zur CD95-induzierte Apoptose besitzen, sog. inhibierende oder neutralisierende Antikörper, z. B. Klon SM1/23, vgl. (Schempp, 2001).

Zellen, in denen durch FasL oder einen Apoptose-induzierenden Anti-CD95-Antikörper Apoptose ausgelöst wird, haben oft auch einen autoregulatorischen Rückwirkmechanismus des FasL/CD95-Systems: Die apoptotischen Zellen beginnen mit der Sekretion von FasL bzw. der erhöhten CD95-Expression und zwingen sich selbst und benachbarte Zellen durch einen autokrinen bzw. parakrinen Mechanismus in Apoptose (Friesen, 1997; Fulda, 1997; Fulda, 1998).

Zwei weitere Wege der durch Rezeptor-Liganden-Interaktion vermittelten Apoptose-Induktion sollen nur kurz erwähnt werden:

- 1) Perforin und die Cystein-Protease Granzym B sind Proteine, welche von zytotoxischen T-Zellen als Bestandteil zytolytischer Granula ausgeschieden werden. Perforin erleichtert die Porenbildung in der Zielzelle und somit die

Aufnahme von Granzym B, welches, ähnlich den oben beschriebenen Caspasen, eine Substratspezifität für bestimmte Caspasen besitzt und die Caspasen-Kaskade aktivieren kann.

- 2) Die Apoptose-Induktion durch TNF/TNFR1- und TNF/TNFR2-Bindung kann den **Abbildungen 1** und **35** entnommen werden.

3.2.3.2 Die durch Zytostatika induzierte Apoptose

Da Zytostatika keine einheitliche chemische Stoffklasse darstellen, gibt es keinen allgemeinen Mechanismus der Apoptose-Induktion durch Zytostatika. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Zytostatika Etoposid und Camptothecin handelt es sich um Topoisomerase-Inhibitoren. Doxorubicin und Mitoxantron sind DNA-interkalierende Substanzen. Alle diese Substanzen besitzen die gemeinsame Eigenschaft, mit der DNA-Replikation zu interferieren und hierdurch, wie im Abschnitt 3.2.3 *Induktoren der Apoptose* für die UV- und ionisierende Strahlung beschrieben, Apoptose auszulösen.

3.2.4 Wichtige bei der Apoptose ablaufende Prozesse

3.2.4.1 Morphologische Prozesse

Wie eingangs beschrieben, stammt der Name Apoptose von einem morphologischen Phänomen, welches *Kerr et al. 1972* (Kerr, 1972) beobachteten. Der genaue Mechanismus, welcher zum Abschnüren der von ihnen beobachteten Vesikel führt, ist nicht bekannt. Die morphologischen Prozesse, welche bei der Apoptose ablaufen, lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen:

- 1) Auflösen des Zellkerns (und Abbau der DNA, s. u.) (Burgoyne, 1974),
- 2) Abschüren von Vesikeln (*blebbing, apoptotic bodies*),
- 3) Schrumpfen der Zellen (*cell shrinking*).

3.2.4.2 Prozesse, die an der Zellmembran stattfinden

Die während der Apoptose an der Zellmembran ablaufenden Prozesse finden auf mehreren Ebenen statt. Die oben bereits erwähnten Apoptose-induzierenden

Liganden-Rezeptor-Interaktionen wurden wegen ihrer Bedeutung in einem gesonderten Abschnitt beschrieben.

Durch die Bax/Bax-Homodimer-Assoziation und die damit verbundene Porenbindung in der äußeren Mitochondrienmembran findet, vergleichbar dem Cytochrom c, eine Freisetzung von AIF (*apoptosis inducing factor*) statt (Susin, 1998). AIF ist ein Flavoprotein mit proteolytischen Eigenschaften. Es kann direkt die Caspasen-Kaskade aktivieren, zur DNA-Fragmentierung führen, aber auch Floppasen, wie beispielsweise die Scramblase, aktivieren und Translokasen inhibieren. Die Translokasen sind u. a. für die Aufrechterhaltung der Asymmetrie der Zellmembran verantwortlich. Wie im Abschnitt 3.2.2 *Physiologische Bedeutung und Beispiele der Apoptose* bereits erwähnt, enthält die dem Zytoplasma abgewandte Seite der Zellmembran keine Phosphatidylserine. Die Inaktivierung der Translokasen bedeutet den Verlust der aktiv aufrecht erhaltenen Asymmetrie zwischen äußerer und innerer Seite der Zellmembran (Bratton, 1999). Durch die gleichzeitige Aktivierung von Flippasen wird Phosphatidylserin von der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Zellmembran auf die Zellmembranaußenseite verlagert. Die physiologische Bedeutung dieses Effekts wurde bereits diskutiert.

3.2.4.3 Zytoplasmatische Prozesse

Neben der in diesem Abschnitt beschriebenen Caspasen-Kaskade gibt es zahlreiche weitere zytoplasmatische Prozesse, welche bei der Apoptose von Bedeutung sind. Als Beispiel seien hier die oben bereits erwähnte (vgl. Abschnitt 3.2.3 *Induktoren der Apoptose*) Aktivierung von p53, die Verlagerung von Mitgliedern der Bcl-Familie an die Membran von Mitochondrien, ER und Golgi sowie die Bedeutung der an die Rezeptoren assoziierten zytoplasmatischen Proteine, wie beispielsweise der Mediatoren FADD, TRADD und Daxx oder der Kinasen JunKK und JunK (s. o.), genannt. **Abbildung 1** und **Abbildung 35** stellen die zytoplasmatischen Prozesse der Apoptose zusammenfassend dar. Auf zahlreiche weitere zytoplasmatische, bei der Apoptose beteiligte Proteine wie z. B. M-30, SMAC, DIABOLO, survivin wird hier nicht eingegangen (Verhagen, 2002).

Obwohl Apoptose durch zahlreiche verschiedene Parameter ausgelöst werden kann und es unterschiedliche Wege der zytoplasmatischen Signaltransduktion des

apoptotischen Signals gibt, laufen in zahlreichen Fällen die Signale in einem Netzwerk zusammen. An zentraler Stelle dieses Netzwerkes steht eine Familie von Enzymen, die sog. Caspasen, welche als inaktive Proenzyme oder Zymogene im Zytoplasma auftreten und strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen. Eine umfassende Übersichtsarbeit über die Struktur und Spezifität von Caspasen stammt von Earnshaw et al. (Earnshaw, 1999).

Caspasen (auch als *cysteine-aspartases* bezeichnet) besitzen eine außerordentliche Substratspezifität. Sie wurden zunächst bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen des Nematoden *Coenorhaditis elegans* beschrieben und weisen starke Ähnlichkeiten zu humanem Interleukin-1- β -konvertierendem Enzym (ICE) auf (Yuan, 1993). Mittlerweile sind 14 verschiedene Caspasen im Menschen charakterisiert, welche nach einer einheitlichen Nomenklatur (Caspase-1 bis Caspase-14) numeriert wurden. In ihrem aktiven Zentrum besitzen sie die Aminosäure Cystein und spalten ihr Substrat nach der Aminosäure Aspartat (Sleath, 1990). Aktive Caspasen entstehen aus zwei Procaspasen-Molekülen nach deren proteolytischer Prozessierung und einer Selbst-Assoziation der Spaltprodukte. Die Quartärstruktur der Caspasen wird daher auch als Homodimer eines Heterodimers bezeichnet (Walker, 1994; Mittl, 1997). Caspasen besitzen zwei aktive Zentren je Molekül an jeweils entgegengesetzten Seiten. Zur Aktivierung von Caspasen sind mindestens zwei enzymatische Spaltungen je Molekül notwendig.

Caspasen sind aus einer Aminio-terminalen Prodomäne und zwei weiteren funktionellen Domänen aufgebaut (DED und CARD, s. u.), welche zusammen die große Untereinheit des Enzyms mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa bilden. Die kleine Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von ca. 10 kDa (zusammengefaßt z. B. bei (Cryns, 1998)). Erst nach der Abspaltung der Prodomäne von der großen Untereinheit und der Trennung der kleinen von der großen Untereinheit kann sich das funktionelle Homodimer eines Heterodimers bilden (wie z. B. bei (Ramage, 1995; Martin, 1996; Yamin, 1996; Han, 1997; H. Li, 1997; Srinivasula, 1998) für Caspase-1, Caspase-3 und Caspase-9 beschrieben).

Die funktionellen Domänen der großen Untereinheit bestehen aus einer DED (*death effector domain*) und einer CARD (*Caspase activation and recruitment domain*). CARD ist eine Aminosäuredomäne, welche wie DED und DD die Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen des Apoptose-Netzwerks vermittelt. Caspase-1,

Caspase-2, Caspase-4 und Caspase-9 besitzen CARD-Domänen. CARD, DED und DD haben strukturelle Gemeinsamkeiten: ein dicht gepacktes Bündel von α -Helices (Chou, 1998).

Caspasen mit langen Prodomänen (Caspase-2, Caspase-8, Caspase-9, Caspase-10) werden auch als Initiator-Caspasen oder übergeordnete (*upstream*) Caspasen bezeichnet, da sie üblicherweise den Apoptose-induzierenden Prozessen unmittelbar nachgeschaltet sind. Caspasen mit kleinen Prodomänen sind den Initiator-Caspasen i. A. untergeordnet und werden häufig als Effektor-Caspasen oder untergeordnete (*downstream*) Caspasen bezeichnet (Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7, Caspase-14). Einige *upstream*-Caspasen (z. B. Caspase-1) durchlaufen einen als Selbstreifung bezeichneten Vorgang, bei dem die Moleküle sich autokatalytisch oder transkatalytisch spalten (Ramage, 1995; Yamin, 1996). Es bedarf somit keiner übergeordneten Caspase zur Spaltung. Die *downstream*-Caspasen werden durch enzymatische Spaltung der *upstream*-Caspasen zu funktionellen Enzymen rekrutiert. So spaltet beispielsweise in zellfreien Systemen:

- Caspase-8 die Procaspase-3, Procaspase-4, Procaspase-7 und Procaspase-9 (Srinivasula, 1996a; Muzio, 1997; Takahashi, 1997; Stennicke, 1998),
- Caspase-10 die Procaspase-3, Procaspase-7 und Procaspase-8 (Fernandes-Alnemri, 1996), Caspase-9 die Procaspase-3 (P. Li, 1997) und
- Procaspase-7 (Srinivasula, 1998) und Caspase-3 die Procaspase-6 (Srinivasula, 1996b; Hirata, 1998) in deren jeweils aktive Form.

Neben der Einteilung in *upstream*- und *downstream*-Caspasen oder einer Klassifizierung nach dem Konservierungsgrad bestimmter Bereiche von CARD und DED (vgl. hierzu (Earnshaw, 1999)) können die Caspasen auch nach ihrer Substratspezifität eingeteilt werden. Durch Immobilisierung unterschiedlicher, kurzer, modifizierter Aminosäuresequenzen und Oligopeptide an eine Trägermatrix und anschließende Zugabe von Zellysaten apoptotischer Zellen konnte die Spezifität einzelner Caspasen nach deren irreversibler Bindung an diese Substrate aufgeklärt werden. So besitzt z. B. die Caspase-3 eine sehr hohe Affinität zu dem künstlichen Substrat GDEVDGI (Thornberry, 1997). Diese Aminosäuresequenz wird von anderen Caspasen nur sehr schlecht gespalten. An die zentrale Sequenz „DEVD“ dieses Peptides binden neben Caspase-3 jedoch auch Caspase-6, Caspase-7, Caspase-8

und Caspase-10. Eine Auflistung zahlreicher Substrate und der sie spaltenden Caspasen befindet sich bei Earnshaw et al. (Earnshaw, 1999). An dieser Stelle seien drei Beispiele genannt:

- 1) Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) ist eines der bestuntersuchten Caspasen-Substrate (Berghammer, 1999; Soldani, 2001; Tentori, 2001; Tong, 2001a). PARP ist ein DNA-Reparaturenzym, dessen Expression durch Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA reguliert wird (Tong, 2001b; Uchida, 2001). In apoptotischen Zellen wird PARP (MW 113 kD) durch Caspasen in ein 24 kD und ein 85-89 kD großes Polypeptid gespalten (Tewari, 1995). Diese Spaltung führt zum Ausfall eines wichtigen DNA-Reparatur-mechanismus. Zusammen mit der durch Ca^{2+} -aktivierten CAD (*Caspase-activated DNase*) wird die Spaltung von PARP für die Bildung der typischen DNA-Leiter verantwortlich gemacht, welche man nach gelelektrophoretischer Auftrennung genomischer DNA aus apoptotischen Zellen sehen kann (Nagata, 2000). PARP kann durch Caspase-3, Caspase-7 und Caspase-9 an der Caspasen-Erkennungssequenz DEVD/G zwischen D und G gespalten werden.
- 2) D4-GDP-Dissoziations-Inhibitor (D4-GDI) ist ein negativer Regulator Ras-verwandter Rho-Familien-GTPasen. Rho-GTPasen sind für die strukturellen Veränderungen am Zytoskelett und der Zytoplasmamembran während der Apoptose von Bedeutung (Olofsson, 1999). Die Erkennungs/Spalt-Sequenz für Caspasen besteht aus der Aminosäuresequenz DELD/S. Bisher ist lediglich von Caspase-3 bekannt, daß es eine Affinität für diese Sequenz besitzt und in der Lage ist, das Protein zu spalten (Na, 1996; Krieser, 1999; Essmann, 2000).
- 3) BH-3-interagierende Domäne (BID) ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie proapoptotischer Proteine. Die Erkennungssequenz LQTD/G wird durch Caspase-8 gespalten. Nach Spaltung entsteht die aktive Form des BID, das sogenannte tBID (*truncated* BID). tBID erleichtert die Anlagerung von Bax an die Mitochondrienmembran (Desagher, 1999). Die Bedeutung dieser Anlagerung wurde in Abschnitt 3.2.3 *Induktoren der Apoptose* bereits beschrieben.

Typische Substrate der Caspasen sind nicht nur unmittelbar regulatorische Proteine der Apoptose. Neben der Caspasen-abhängigen Spaltung von Regulatoren des Zellzyklus ($\text{p}21^{\text{waf1}}$ und $\text{p}27^{\text{kip1}}$ (Levkau, 1998), Rb (Janicke, 1996), DC27 (Zhou, 1998)) und von Strukturproteinen (z. B. Lamine (Ucker, 1992; Lazebnik, 1993;

Oberhammer, 1994; Rao, 1996; Takahashi, 1996)) werden auch Kinasen (PKC (Emoto, 1995), MEKK (Cardone, 1997)) modifiziert.

Die Spezifität der Caspasen für bestimmte Aminosäuresequenzen kann man sich zunutze machen, indem Zellen experimentell Substrate zugesetzt werden, welche nach Spaltung durch eine bestimmte Caspase zu fluoreszieren beginnen (z. B. PhiPhiLux G₂D₂) oder welche selbst fluoreszieren (FITC-VAD-FMK, FITC-YVADAPK-DNP). Durch Zugabe irreversibel bindender, modifizierter Substrate können entweder einzelne Caspasen gezielt inhibiert oder aber das gesamte Caspasen-Netzwerk lahmgelegt werden.

3.2.4.4 Mitochondriale Prozesse

Neben den Caspasen kommt den Mitochondrien eine zentrale Bedeutung bei der Apoptose zu. Die wichtigsten Prozesse, welche an den Mitochondrien ablaufen, wurden in dem Abschnitt 3.2.3 *Induktoren der Apoptose* beschrieben. Eine übersichtliche Zusammenfassung dieser Prozesse kann auch **Abbildung 36** entnommen werden.

Es wird jedoch immer deutlicher, daß außer diesen an der Mitochondrienmembran ablaufenden Prozessen die Bildung von ROS eine entscheidende Rolle bei der Apoptose spielt. Der ROS-Gehalt von Zellen ist unmittelbar abhängig von der Menge freien Glutathions und der Neuproduktion an ROS. Einige Zytostatika führen zu einer Erhöhung des ROS-Spiegels in der Zelle. Durch Entkoppelung des mitochondrialen Membranpotentials nach Aufplatzen der äußeren Mitochondrienmembran wird der ROS-Spiegel erhöht, z. B. nach einer TNF-Behandlung von Zellen (Schulze-Osthoff, 1992; Schulze-Osthoff, 1993). Wird durch Zugabe von Antioxidantien die Bildung von ROS verhindert, kann u. a. CD95- und TNF-vermittelte Apoptose in Eosinophilen blockiert werden (Cossarizza, 1995; Talley, 1995; Wedi, 1999). ROS bewirken möglicherweise unmittelbar ein Öffnen des VDAC (*voltage dependent anion channel*) und ein Entkoppeln des mitochondrialen Redoxpotentials (Zamzami, 1995) oder sind in der Lage, Sphingomyelinase zu aktivieren, was eine Zunahme an Ceramid bewirkt (Liu, 1998). Ceramid ist ein intrazellulärer Apoptose-Promotor in Granulozyten und scheint als *second messenger* in der Lage zu sein, bestimmte Kinasen zu aktivieren.

Paradoxerweise kann ROS jedoch in einigen Systemen durch Aktivierung von NF- κ B anti-apoptotisch wirken (Wong, 1988).

3.2.5 NOS und Apoptose

NO-Radikale induzieren Apoptose in epithelialen, mesengialen und endothelialen Zellen (Muhl, 1996) sowie in Krebszellen (Hajri, 1998; Shami, 1998). Physiologisch spielen sie bei Makrophagen- und NK-vermittelten Abwehrmechanismen eine Rolle (Moncada, 1991; Nathan, 1992; Cui, 1994). Die Synthese von NO-Radikalen erfolgt nach Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS oder NOS2, cNOS) und deren Isoformen durch Oxidation von Arginin in Citrullin. Wie NO-Radikale Apoptose induzieren können, ist noch unklar. Eine positive Regulation von CD95 könnte von Bedeutung sein (Fukuo, 1996), ebenso die Bildung von NO-Radikalen nach ROS-Freisetzung aus den Mitochondrien und dem Ausstrom von Cytochrom c (Hortelano, 1997; Ushmorov, 1999). Eine oxidative Schädigung von DNA durch Nitrosylierung und die damit verbundene Prozesse wie PARP-Aktivierung und NAD⁺-Depletion wird diskutiert (Wink, 1991; Nguyen, 1992). Als Übersichtsarbeiten zu diesem Thema sei auf die Publikation von Murphy, Brune (Brüne) et al. und Nathan (Nathan, 1997; Brune, 1998; Murphy, 1999) sowie die modifizierten **Abbildungen 35 und 36** verwiesen. Induktoren von NO-Radikalen können beispielsweise UV-Strahlung oder Zytostatika wie Camptothecin sein.

Wie bei ROS wird für NO-Radikale auch ein anti-apoptotischer Effekt diskutiert (Arrigo, 1998; Ceneviva, 1998; Shen, 1998).

3.2.6 Methoden zum Nachweis der Apoptose

3.2.6.1 Annexin V FITC

Im Abschnitt 3.2.2 *Physiologische Bedeutung und Beispiele der Apoptose* wurde beschrieben, daß Annexin V an im Laufe der Apoptose auf die Zellmembranaußenseite verlagerte Phosphatidylserine binden kann. Das Protein Annexin V kann an einen Fluoreszenzfarbstoff (z. B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE)) gekoppelt werden. Ein Nachweis der Bindung des Annexin V an

die äußere Zellmembran ist dann im Durchflußzytometer oder Fluoreszenzmikroskop möglich.

3.2.6.2 7-Amino-Aktinomycin D (7-AAD)

Bei dem Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD handelt es sich um ein in die DNA interkalierendes Zytostatikum. In lebenden Zellen wird der Farbstoff nicht akkumuliert, da die Zellmembran intakt ist. Im Verlauf der Apoptose finden Veränderungen der Plasmamembran statt und 7-AAD kann in die Zelle diffundieren. 7-AAD interkaliert bevorzugt in die große Furche der DNA zwischen Guanin und Cytidin (Philpott, 1996).

3.2.6.3 Nachweis und Blockierung der Caspasen-Aktivität

Die Möglichkeit der Verwendung von Caspasen-Substraten zum Nachweis spezifischer Caspasen und spezifischer irreversibel bindender Caspasen-Inhibitoren wurde am Ende des Abschnitts 3.2.4.3 *Zytoplasmatische Prozesse* diskutiert. Zum Nachweis der Caspasen kann man sich auch sogenannter *cleavage site specific antibodies* (CSSA) bedienen. CSSAs erkennen nur Epitope gespaltener (i. e. aktivierte) Caspasen oder Epitope bestimmter, durch Caspasen gespaltener Substrate.

3.2.7 Blockierung der Apoptose

Apoptose-Blockierung kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. So kann z. B. die durch *serum starvation* induzierte Apoptose bis zu einem bestimmten Zeitpunkt durch die Gabe von Wachstumsfaktoren aufgehoben werden. Auf die Blockierung der Apoptose durch Caspasen-Inhibitoren wurde bereits eingegangen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Blockierung der FasL-induzierten Apoptose durch blockierende Anti-CD95-Antikörper dar (vgl. Abschnitt 3.2.3.1 *Die durch Rezeptor-Liganden-Bindung induzierte Apoptose*). Die durch Induktoren von ROS vermittelte Apoptose kann durch Regulation des Glutathion-Gehalts der Zelle in gewissen Grenzen inhibiert werden. Der zytoprotektive Effekt sogenannter Radikalfänger beruht auf diesem Prinzip.

3.3 Effekte der Arsentrioxid-Wirkung in hämatopoetischen Zellen mit und ohne der Translokation t(15;17) und in nicht-hämatopoetischen Zellen

3.3.1 Induktion von Apoptose

Mehreren Autoren beschreiben, daß Arsentrioxid in der Lage ist, auch in primären Zellen von Patienten mit Nicht-FAB-M3-Leukämien bzw. in Zelllinien ohne die für APL typische Translokation t(15;17) Apoptose zu induzieren. Jedoch gibt es keinen Hinweis auf einen einheitlichen Mechanismus, durch welchen die Apoptose-Induktion erfolgen soll. Eine Übersicht über die wichtigsten Arbeiten, welche eine Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid beschreiben, kann nachstehender **Tabelle 1** entnommen werden:

Zelltyp	Spezies	diskutierter Mechanismus	Literatur
mononukleäre Zellen von 20 Patienten mit AML FAB-M0, AML FAB-M1, AML FAB-M2, AML FAB-M4, AML FAB-M5, AML FAB-M6	Mensch	-	(Lehmann, 2001)
chronische myeloische Leukämien	Mensch	-	(Z. Chen, 2002; O'Dwyer, 2002)
acht verschiedene maligne Lymphozyten-Zelllinien und primäre Leukämie- und Lymphomzelllinien	Mensch	-	(Zhu, 1999)
HTLV-1 transformierte T-Zellen	Mensch	-	(Bazarbachi, 1999)
durch HTLV-1 induzierte adulte T-Zell-Lymphozyten-Leukämie (ATLL)	Mensch	positive Regulation von Bcl-x _L	(Nicot, 2000)
HTLV-1 transformierte T-Zelllinien HuT-102, MT2, C8166 und C91PL	Mensch	-	(Darwiche, 2001)
maligne Lymphomazellen (Raji, Jurkat)	Mensch	-	(Zhang, 2001)
embryonale Knochenmarkzellen und embryonale Fibroblasten von PML- <i>knockout</i> -Mäusen	Maus	-	(Wang, 1998)
T-Lymphozyten	Maus	Caspasen-Aktivierung vermittelte Spaltung von PARP	(Hossain, 2000)
maligne Lymphozyten	Mensch	Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials	(Zhu, 1999)
T-Zell-Prolymphozyten-Leukämie	Maus	-	(Recher, 2002)
Monoblastenleukämie-Zelllinie SigM5	Mensch	-	(Walter, 2000)
Megakaryozyten-Leukämie-Zelllinien HEL, Meg-01, UT7, M07e	Mensch	Verschiebung des Bcl-2/Bcl-x-Gleichgewichts durch negative Regulation von Bcl-2	(Lu, 1999)
akute Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie HL-60	Mensch	1) Caspasen-Aktivierung vermittelte Spaltung von PARP 2a) Spaltung von BID und PARP 2b) Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials 3) Inhibition der Telomerase 4) Verschiebung des Bcl-2/Bcl-x-Gleichgewichts durch negative Regulation von Bcl-2 5) Bildung von ROS	1) (Wang, 1998; X.J. Huang, 1999; Z. Wang, 2000) 2) (Perkins, 2000) 3) (Z. Wang, 2000) 4) (Chen, 1996) 5) (Perkins, 2000)
akute Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie NB-4	Mensch	1a) CD95-unabhängige Caspase-8 Aktivierung, Caspasen-Aktivierung vermittelte Spaltung von PARP 1b) Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials 2) Verschiebung des Bcl-2/Bcl-x-Gleichgewichts durch negative Regulation von Bcl-2 3) Bildung von H ₂ O ₂	1) (Kitamura, 2000; X.J. Huang, 1999) 2) (Chen, 1996) 3) (Jing, 1999)

Zelltyp	Spezies	diskutierter Mechanismus	Literatur
chronische myelogene Leukämiezelllinie K-562	Mensch	1a) Spaltung von BID und PARP, 1b) Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials 2) Bildung von ROS	1) (Perkins, 2000) 2) (Tibbetts, 2002; Perkins, 2000)
myelogene Leukämie-Zelllinie KG-1	Mensch	-	(Wang, 1998)
Histozyten-Lymphom-Zelllinie U937	Mensch	1) Verschiebung des Bcl-2/Bcl-x-Gleichgewichts durch negative Regulation von Bcl-2 2) Ca ²⁺ -abhängige Produktion von H ₂ O ₂ 3) Öffnen des PTPC 4) durch Katalase revertierbare Erhöhung der (nach Behandlung mit den Glutathionstoffwechsel modulierenden Substanzen der) Arsentrioxid-induzierten Apoptose	(Wang, 1998; Gao, 2002)1) (Chen, 1996) 2) (Iwama, 2001) 3) (Kroemer, 1999; Larochette, 1999) 4) (Gao, 2002; Yi, 2002)
epidermale Zelllinie JB6	Maus	-	(C. Huang, 1999a)
multiples Myelom und die Zelllinien 8226/2, RPMI8226 und U266	Mensch	Spaltung von BID und PARP, Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials	(Grad, 2001; Jia, 2001; Z. Chen, 2002; Hussein, 2002)
Neuroblastomazelllinien	Mensch	Aktivierung von Caspasen	(Akao, 1999; Ora, 2000)
Neurone im Zerebellum	Ratte	-	(Namgung, 2000; Namgung, 2001)
Hepatozyten-Primärkulturen	Ratte	-	(Jacobs, 2000)
Kolonkarzinom-Zelllinien SW480, DLD-1 und COLO201	Mensch	Verschiebung des Bcl-2/Bcl-x-Gleichgewichts durch negative Regulation von Bcl-2; Bildung von ROS	(Nakagawa, 2002)
Hepatokarzinom-Zelllinien QGY-7701 und QGY-7703	Mensch	-	(L. Liu, 2000)
Nierenkarzinom-Zelllinien	Mensch	Caspase-3-Aktivierung, Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, Bildung von ROS	(Pu, 2002)
Blasenkarzinom-Zelllinien	Mensch	-	(Pu, 2002)
Zervix-Zelllinie SiHa	Mensch	-	(Deng, 2000)
gastrische Zelllinie MGC-803	Mensch	Verschiebung des Bcl-2/Bcl-x-Gleichgewichts durch negative Regulation von Bcl-2; Anstieg des intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegels	(Zhang, 1999)
gastrische Zelllinie AGS und MKN-28	Mensch	Caspasen-Aktivierung vermittelte Spaltung von PARP, Aktivierung bzw. Hochregulation von p53	(Jiang, 2001)
Leberkrebs-Zelllinien	Maus	-	(Chen, 2000)
Ösophagus Squamosa-Karzinom-Zelllinie EC8712	Mensch	-	(Xie, 2002)
Ösophaguskarzinom-Zelllinie SHEEC1	Mensch	Veränderungen der Ultrastruktur der Mitochondrien; Anstieg des intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegels; Bildung von NOS	(Shen, 2002b; Shen, 2002c)
gynäkologische Krebszelllinien OVCAR, C18013S, Fibroblastenzelllinie HeLa, Arsentrioxid-unempfindliche gynäkologische Krebszelllinien GG, JAM und humane Fibroblasten	Mensch	Aktivierung bzw. Hochregulation von p53	(Du, 2001)
Zervix-Karzinom-Zelllinien HeLa	Mensch	1) Caspasen-Aktivierung vermittelte Spaltung von PARP 2) Aktivierung bzw. Hochregulation von p53 3) Bildung von Ros und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials	1) (Um, 2002) 2) (Vogt, 2001) 3) (Woo, 2002)
mit drei- und fünfwertigen anorganischen Arsensalzen behandelte Mäusen	Maus	Aktivierung von Caspase-1; positive Regulation von TNF α	(Liu, 2001)
Endothelzellen der Aorta	Rind	durch ROS und H ₂ O ₂ induzierte Schädigung der DNA	(F. Liu, 2000)
Epithelzellen der Aorta	Schwein	Bildung von ROS	(Barchowsky, 1999a)
endotheliale Zelllinie ECV304	Mensch	durch ROS induzierte negative Regulation von FasL	(Tsai, 2001)
Milzzellen	Pferd	<i>in vitro</i> Freisetzung von Eisen aus Ferritin und als Folge hiervon die Bildung von ROS	(Ahmad, 2000)
Studie	Mensch	Zunahme des oxidativen Streß durch chronische Arsentrioxid-Exposition im Trinkwasser	(Pi, 2002)

Wie im Abschnitt 3.1.3 *Arsentrioxid und APL* beschrieben, kann Arsentrioxid bei APL-Zellen nicht nur Apoptose induzieren, sondern besitzt die Fähigkeit, eine Differenzierung auszulösen. Die folgenden Abschnitte stellen eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten bisher beschriebenen, nicht oder nur unmittelbar die Apoptose-Induktion betreffenden Effekte von dreiwertigen anorganischen Arsenverbindungen dar.

3.3.2 *Einfluß auf den Zellzyklus und die Zellproliferation*

Arsentrioxid induziert in den (HTLV-1 transformierten) ATL-Zelllinien HuT-102, MT2, C8166 und C91PL Zellzyklusarrest. Es kommt zu einer Blockade des G_0/G_1 -Überganges, was letztendlich zur Induktion von Apoptose führt (Darwiche, 2001). Park et al. beschreiben jedoch einen G_2/M Arrest für U937-Zellen (Park, 2001).

Der Arsentrioxid-induzierte Zellzyklusarrest ist auch für die Megakaryozyten-Zelllinien HEL, Meg-01, UT7 und M07e (Lu, 1999), für maligne B-Zell-Lymphomzellen (Dai, 1999), für die Chinesische Hamster-Zelllinie V79-Zellen (Eguchi, 1997) und bei Neuroblastomzellen *in vivo* (Ora, 2000) beschrieben. In den mit Arsentrioxid behandelten Neuroblastomzellen erfolgt keine Regulation des Proliferationsmarkers Ki67.

Arsentrioxid zeigt diese inhibitorischen Effekte auf das Zellwachstum bei malignen Lymphozyten-Zelllinien bereits in den im Plasma von Patienten in Studien erzielbaren Konzentrationen, ohne jedoch die Expression der an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Proteine c-myc, Retinoblastoma-Protein, Cyclin-abhängige Kinase 4, Cyclin D1 oder p53 zu modifizieren (Zhu, 1999). Auch bei der Beteiligung der Cyclin-abhängigen Kinasen gibt es widersprüchliche Aussagen. Für humane Myelomzelllinien ist ein G_1 und/oder ein G_2/M -Phasen-Arrest beschrieben. Hierbei kommt es zu keiner Veränderung der Expression der bei der Regulation des Zellzyklus beteiligten Proteine CDK2, CDK4, Cyclin D1, Cyclin E und Cyclin B1, aber zu einer positiven Regulation der Proteine CDK6, cdc2 und Cyclin A. Die mRNA und die Protein-Spiegel von CDK1 und p21 steigen nach Arsentrioxid-Behandlung, nicht jedoch die Menge an p27. Arsentrioxid vermittelt die Bindung von p21 an CDK6, cdc2, Cyclin E und Cyclin A, hemmt die CDK6-assoziierte und aktiviert die cdc2-assoziierte Kinase (Park, 2000). Ein G_2/M -Arrest (Xie, 2002) und ein G_2/M -Arrest mit

p21-Induktion sind auch für die *head neck cancer* Zelllinie PCI-1 publiziert (Seol, 1999).

Neben diesen regulatorischen Effekten wird auch die Inhibition der Tubulin-Aggregation durch Arsentrioxid beobachtet (Li, 1999).

3.3.3 Zelltransformation durch Arsentrioxid

Der genaue Mechanismus, durch den Arsentrioxid Zellen transformieren kann, ist noch nicht bekannt. Es gibt jedoch mehrere Hinweise auf potentielle Faktoren, welche bei der Arsentrioxid-induzierten Beeinflussung des Zellzyklus bzw. der Zelltransformation von Bedeutung sein könnten:

Dreiwertige anorganische Arsenverbindungen induzieren eine p53-unabhängige Expression von GADD45 in humanen bronchialen Epithelzellen (C. Huang, 1999a). GADD45 ist ein sogenanntes *cell cycle check point* Protein, dessen Anwesenheit zu einem G₂/M-Phasen-Arrest des Zellzyklus führt. Der Transkriptionsfaktor NF κ -B sowie die JNK (c-Jun N-terminale Kinase) regulieren die Arsentrioxid-regulierte GADD45-Expression durch einen reziproken Mechanismus (F. Chen, 2001).

Ein direkter und ein indirekter Einfluß auf den Zellzyklus wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Sowohl Arsenate als auch Arsenite aktivieren JNK in der Anwesenheit von Rac oder Rho, sind jedoch unabhängig von Cdc42 oder Ras in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 (Porter, 1999). Bei der Arsenat-vermittelten JNK-Aktivierung sind MEKK3 und MEKK4 beteiligt, wohingegen zur Arsenit-vermittelten JNK-Aktivierung MEKK2, MEKK3 und MEKK4 benötigt wird (Porter, 1999). An Schnitten von Rattengewebe konnte gezeigt werden, daß die Transkriptionsfaktoren c-Jun/AP-1, NF κ B sowie die Streß-bedingten *heat shock* Proteine HSP 32, HSP 70, HSP 72, HSP 60, HSP 90, GADD45 und das DNA-Reparatur-Protein ERCC1 induziert werden (Liu, 2001; Wijeweera, 2001). Die Aktivierung einer weiteren Jun-Kinase, der JNK3, nicht aber der JNK1 und JNK2 oder p38 MAP-Kinase, kann in Neuronen des Cerebellums von Ratten (Namgung, 2001) und in U937-Zellen (Iwama, 2001) nach Behandlung mit dreiwertigen anorganischen Arsenverbindungen demonstriert werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis führen auch die Arbeiten an murinen T-Lymphozyten (Hossain, 2000). Andererseits kann durch die Inhibition von Erk durch dominant negatives Erk2

gezeigt werden, daß JNK für die Arsentrioxid-induzierte Transformation von murinen epidermalen Zelllinien nicht benötigt wird (C. Huang, 1999b).

Bei chronischer Arsenit-Exposition kann es zu einer c-myc-Überexpression und somit zu einer Cyclin D1-Überexpression in der epithelialen Rattenleber-Zelllinie TRL 1215 kommen. Dies hat eine Hyperproliferation zur Folge (H. Chen, 2001).

3.3.4 Zelldifferenzierung

Wie im Abschnitt 3.1.3 *Arsentrioxid und APL* beschrieben, induziert Arsentrioxid die Differenzierung unreifer APL-Blasten. Eine Differenzierung durch Arsentrioxid scheint auch bei den Zelllinien K-562 und HL-60 möglich, da die CD11b-Expression nach Behandlung mit klinisch erzielbaren Konzentrationen ansteigt (Perkins, 2000). Ein möglicher Einsatz von Arsentrioxid beim Myelodysplastischen Syndrom wird u. a. auch wegen der Fähigkeit diskutiert, in Zellen eine Differenzierung auslösen zu können (Beran, 2000; Cheson, 2000; List, 2002).

3.3.5 Weitere potentielle Wirkungsweisen des Arsentrioxid (immunologische Effekte, Glukoneogenese, Angiogenese)

Wie sehr die Zellhomöostase auch durch geringe Konzentrationen von Arsentrioxid beeinflusst werden kann, zeigen *Microarray*-Untersuchungen von Lebergewebe. Biopsien von Patienten mit chronischer Arsentrioxid-Exposition und von Kontrollpersonen wurden miteinander verglichen. Neben einer Modulation Apoptose-relevanter Proteine (TRAIL, Caspasen) und Zellzyklus-relevanter Proteine kommt es auch zu einer Beeinflussung der Expression von Zytokeratinen (Lu, 2001). Bereits 1988 wurde auf Veränderungen des Stoffwechsels durch Arsentrioxid aufmerksam gemacht. Arsentrioxid gilt als Induktor der Glukoneogenese (Szinicz, 1988).

Die Idee, Arsentrioxid auch zur Therapie solider Tumore einzusetzen, hat ihre Wurzeln u. a. in der Eigenschaft des Arsentrioxids, die Angiogenese zu hemmen und hierdurch nekrotische Prozesse im Tumor einzuleiten (Barchowsky, 1999b; Lew, 1999; F. Liu, 2000; Roboz, 2000).

Neuere Publikationen diskutieren auch die Bedeutung eines durch Arsentrioxid ausgelösten immunologischen Mechanismus bei der Therapie von Myeloma-Zellen (Deaglio, 2001).