

## 7. Ergebnisse

### 7.1 *Arsentrioxid induziert Apoptose in einer Vielzahl Zytostatika-sensitiver und Zytostatika-resistenter Zelllinien unterschiedlichen hämatopoetischen Differenzierungsgrades*

In bisherigen klinischen Studien wurde eine Arsentrioxid-Dosierung in der Größenordnung von 0,1 mg/kg – 0,15 mg/kg<sup>4</sup> als tolerabel und therapeutisch effektiv etabliert. Für diese Dosierungen wurde in einer pharmakologischen Studie (Shen, 1997) die Arsen-Plasmakonzentration der mit Arsentrioxid intravenös behandelten Patienten mit APL bestimmt. Eine Arsen-Plasmakonzentration von 0,5  $\mu$ M bis 1  $\mu$ M Arsentrioxid wurde nahezu kontinuierlich über 24 Stunden täglich und Konzentrationen von 5  $\mu$ M Arsentrioxid über mehrere Stunden täglich erzielt.

#### 7.1.1 *Arsentrioxid induziert Apoptose in malignen lymphatischen und myeloischen Zelllinien*

Um die Effekte von Arsentrioxid in pharmakologisch erzielbaren Konzentrationen auf Zellen des hämatopoetischen Systems zu untersuchen, wurden insgesamt 22 maligne lymphatische und myeloische Zelllinien auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Arsentrioxid-induzierter Apoptose in Langzeit-Inkubationsexperimenten analysiert (Rojewski, 2000c; Rojewski, 2002). Diese Zelllinien repräsentierten unterschiedliche hämatopoetische Differenzierungsstadien und stammten aus verschiedenen Geweben (z. B. Knochenmark, Lymphknoten, peripheres Blut, Lunge). Eine Beschreibung der benutzten Zelllinien sowie von deren Herkunftsgewebe ist in **Tabelle 2** aufgelistet. Ein Teil dieser Zelllinien (LOUCY, DOHH-2, CCRF-CEM, NB-4, ML-2, MV-4-11, KG-1a, HL-60, NC-NC, PBL 985, 697, KG-1, Jurkat, U937, HEL und K-562) wurde über einen Zeitraum von bis zu 35 Tagen mit 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M Arsentrioxid (bzw. PBS; Lösungsmittel von Arsentrioxid) inkubiert. Unmittelbar nach Beginn der Inkubation (Tag 0) sowie nach 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28 und 35 Tagen wurde ein Aliquot der jeweiligen Ansätze entnommen und der Prozentsatz apoptotischer Zellen durch Annexin V-FITC und 7-AAD-Färbung nachgewiesen.

---

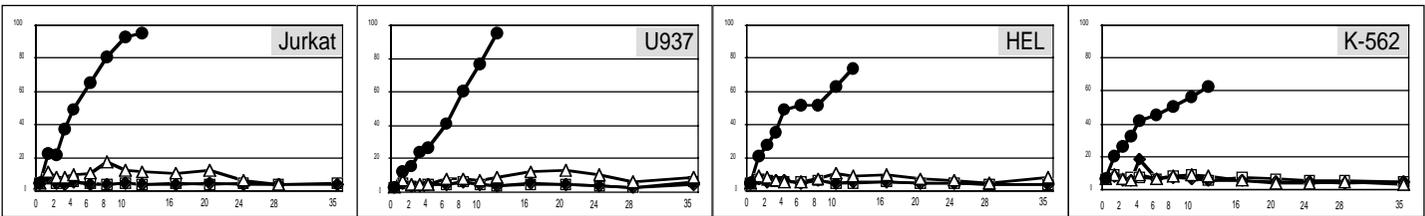
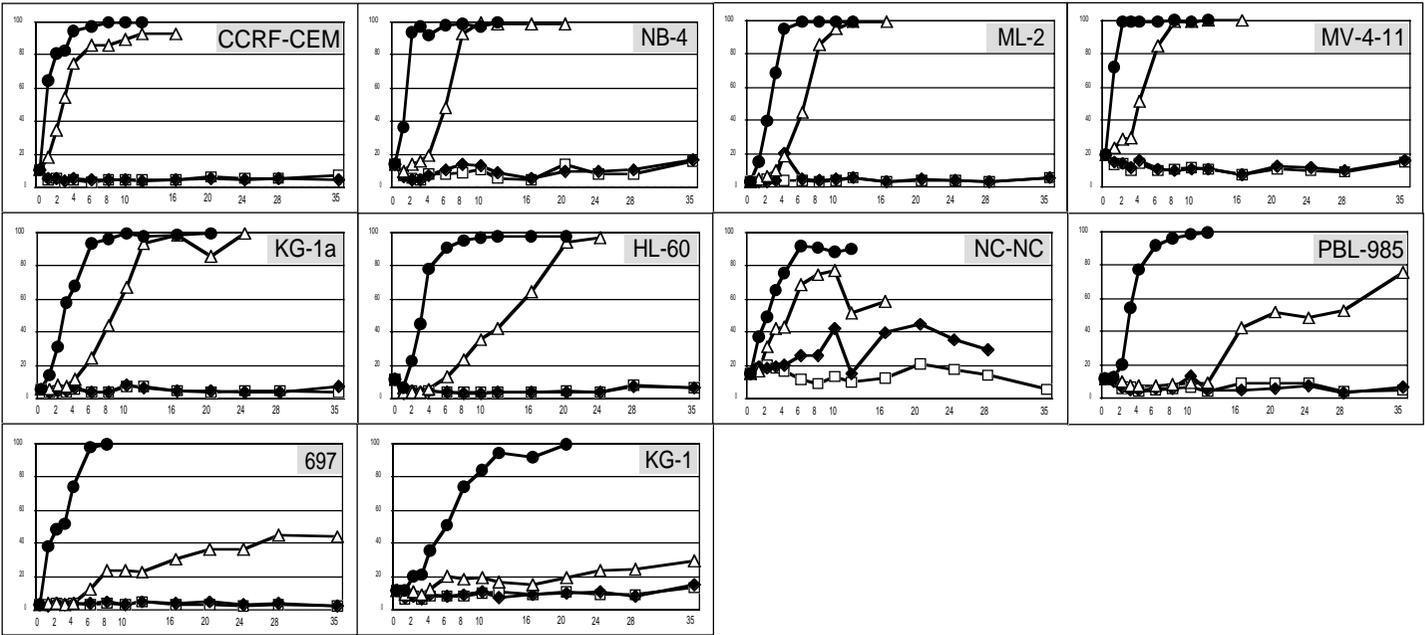
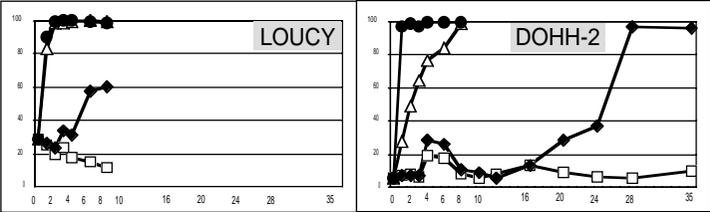
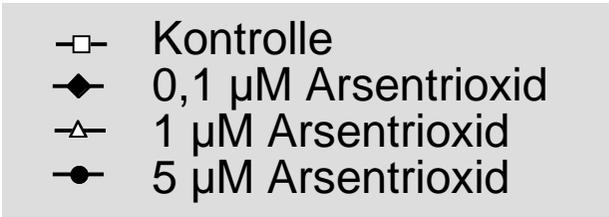
<sup>4</sup> Angaben in mg Arsentrioxid/kg Körpergewicht

**Tabelle 2:** Klassifizierung der 22 untersuchten Leukämie- und Lymphom-Zelllinien gemäß ihrer Sensitivität gegenüber Arsentrioxid

Zelllinie	Beschreibung und Herkunftsgewebe	Klasse
LOUCY	humane T-Zell-Leukämie, peripheres Blut	A
DOHH-2	humanes B-Zell-Lymphom, Effusion der Lunge	A
CCRF-CEM	akute Lymphoblasten-Leukämie, peripheres Blut	B
CEM/C1	MDR akute Lymphoblasten-Leukämie, peripheres Blut	B
CEM/C2	MDR akute Lymphoblasten-Leukämie, peripheres Blut	B
NB-4	humane akute Promyelozyten-Leukämie (APL), Knochenmark	B
ML-2	humane akute Monomyelozyten-Leukämie, peripheres Blut	B
MV-4-11	biphänotypische B-Myelomonozyten Leukämie, peripheres Blut	B
NC-NC	humane B-Lymphoblastoiden-Leukämie, peripheres Blut	B
HL-60	akute Promyelozyten-Leukämie (APL), peripheres Blut	B
KG-1a	akute myelogene Leukämie, Knochenmark	B
PBL-985	akute myeloische Leukämie, peripheres Blut	B
697	humane B-Zell-Vorläufer-Leukämie, Knochenmark	B
KG-1	humane myelogene Leukämie, Knochenmark	B
HEL	humane Erythroleukämie, Knochenmark	C
HL-60/MX1	MDR akute Promyelozyten-Leukämie (APL), peripheres Blut	C
HL-60/MX2	MDR akute Promyelozyten-Leukämie (APL), peripheres Blut	C
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie, Tumor	C
K-562	chronische myelogene Leukämie (CML), Knochenmark	C
K-562 (0.02)	MDR chronische myelogene Leukämie (CML), Knochenmark	C
K-562 (0.1)	MDR chronische myelogene Leukämie (CML), Knochenmark	C
U-937	Histozyten-Lymphom, Effusion der Lunge	C

**Abbildung 2** zeigt die Zeitverlaufskurven von 16 der untersuchten Zelllinien. Dargestellt ist der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen. Färbungen mit 7-AAD (nicht dargestellt, vgl. hierzu auch **Abbildung 8**, Seite 74) führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Bestimmung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen in den Ansätzen mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid erfolgte im allgemeinen bis zu einem Anstieg auf über 95% für mehr als zwei Meßzeitpunkte. Es bestand eine Heterogenität der einzelnen Zelllinien bezüglich der Sensitivität gegenüber den verschiedenen Arsentrioxid-Konzentrationen und der zur Apoptose-Induktion benötigten Inkubationszeit.

Abbildung 2: Langzeitinkubation 16 verschiedener Zelllinien über 35 Tage in Anwesenheit von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid. Näheres siehe Text.



% Annexin V-positive Zellen

Inkubationszeit [Tage]

A

B

C

Die zur Apoptose-Induktion benötigte Arsentrioxid-Konzentration diente als Grundlage für eine Klassifizierung der in dieser Arbeit verwandten Zelllinien in drei Gruppen (vgl. **Abbildung 2** und **Tabelle 2** sowie (Rojewski, 2000c; Rojewski, 2001a; Rojewski, 2002)):

- 1) Die Zelllinien LOUCY und DOHH-2 erwiesen sich als besonders sensitiv gegenüber Arsentrioxid. Bereits die geringste der eingesetzten Konzentrationen des Arsentrioxids ( $0,1 \mu\text{M}$ ) war in der Lage, Apoptose nach entsprechender Inkubationszeit zu induzieren; Zelllinien dieser Sensitivität wurden in der *Gruppe A* zusammengefaßt.
- 2) Die *Gruppe B* (**Abbildung 2**, CCRF-CEM, NB-4, ML-2, MV-4-11, KG-1a, HL-60, NC-NC, PBL985, 697 und KG-1) vereinigte alle Zelllinien, in denen nach 35 Tagen Inkubation durch  $0,1 \mu\text{M}$  Arsentrioxid keine Apoptose induziert werden konnte, welche aber sensitiv gegenüber  $1 \mu\text{M}$  Arsentrioxid waren. Die zur Apoptose-Induktion benötigten Inkubationszeiten variierten stark, jedoch gab es diesbezüglich auch *Inter-Assay*-Schwankungen. In das Sensitivitätsmuster der *Gruppe B* fielen die meisten der untersuchten Zelllinien: 10 von 16 in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien fielen in diese Sensitivitätsgruppe; bei Berücksichtigung der Zytostatika-resistenten Zelllinien (vgl. nächsten Abschnitt) waren es sogar 12 von 22 Zelllinien.
- 3) Zelllinien, in denen mit  $5 \mu\text{M}$  Arsentrioxid Apoptose induziert werden konnte, welche aber gegenüber Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  Arsentrioxid resistent waren, wurden in *Gruppe C* zusammengefaßt (vgl. **Abbildung 2** und **Tabelle 2**). In diese Gruppe fielen die Zelllinien Jurkat, U937, HEL und K-562 sowie die Zytostatika-resistenten Derivate der Zelllinien K-562 und HL-60 (vgl. nächster Abschnitt).

Mehrere der Langzeit-Inkubationsexperimente wurden in Doppelbestimmungen ausgeführt. Es ergab sich eine geringe *Inter-Assay*-Variabilität (s. o.), jedoch erfolgte keine Verschiebung der Zelllinien hin zu einer anderen Sensitivitätsgruppe.

### 7.1.2 *Arsentrioxid induziert Apoptose in malignen lymphatischen und myeloischen Zytostatika-resistenten Zelllinien*

Da durch Arsentrioxid-Behandlung in allen in **Abbildung 2** beschriebenen Zelllinien Apoptose induziert werden konnte, war es von besonderem Interesse, ob durch

Arsentrioxid auch in Zytostatika-resistenten hämatopoetischen Zelllinien in pharmakologisch erzielbaren Konzentrationen vergleichbare Effekte erzielt werden können. Die in die Sensitivitätsgruppe A fallende Zelllinie LOUCY (vgl. **Abbildung 2**) wurde ursprünglich aus einer Patientin mit multipler Zytostatika-Resistenz isoliert (Ben-Bassat, 1990).

Zu den auf ihre Sensitivität gegen Arsentrioxid getesteten Zelllinien CCRF-CEM und HL-60 sind bei der ATCC je zwei Derivate mit unterschiedlichem Grad der Zytostatika-Resistenz verfügbar (Harker, 1989; Fujimori, 1995; Kapoor, 1995). In der Abteilung Hämatologie der Medizinischen Klinik III am Universitätsklinikum Benjamin Franklin (Berlin) wurden mehrere Doxorubicin-resistente K-562 Derivate etabliert (Rojewski, 2002). Bei den Zelllinien CEM/C1 bzw. CEM/C2 handelt es sich um durch Camptothecin selektionierte Derivate der Zelllinie CCRF-CEM mit einer multiplen Resistenz gegen Zytostatika<sup>5</sup>. HL-60/MX1 bzw. HL-60/MX2 sind durch Mitoxantron-Selektion etablierte Zelllinien und besitzen ebenfalls Resistenzen gegen mehrere konventionelle Zytostatika<sup>6</sup>.

In Langzeit-Inkubationsexperimenten über 20 Tage wurden alle Zelllinien in Anwesenheit von PBS, 1  $\mu\text{M}$  oder 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid und verschiedenen Konzentrationen eines Zytostatikum, gegen das die Zelllinien resistent sind, inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde jeden zweiten Tag durch Annexin V-FITC-Färbung bestimmt. Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften von Mitoxantron und Doxorubicin war eine Bestimmung apoptotischer Zellen mit 7-AAD nicht möglich.

Die Untersuchung der Arsentrioxid-Sensitivität der Zytostatika-resistenten Derivate der Zelllinien CCRF-CEM, HL-60 und K-562 ist in **Abbildung 3** zusammengefaßt.

Die Zelllinie CCRF-CEM sowie deren Zytostatika-resistente Derivate wurden mit Camptothecin (zwischen 50 nM und 500 nM), K-562 und deren Zytostatika-resistente Derivate mit Doxorubicin (zwischen 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und die Zelllinien HL-60, HL-60/MX1 und HL-60/MX2 mit Mitoxantron (zwischen 10 nM und 150 nM) inkubiert.

---

<sup>5</sup> Die Zelllinie CEM/C1 besitzt Resistenz gegenüber Camptothecin, Topotecan, 9-Amino-Camptothecin und 10,11-Methylendioxy-Camptothecin. Die Zelllinie CEM/C2 weist neben einer erhöhten Resistenz gegenüber Camptothecin, Topotecan, 9-Amino-Camptothecin und 10,11-Methylendioxy-Camptothecin zusätzlich Resistenzen gegenüber Etoposid, Dactinomycin, Bleomycin, Mitoxantron, 4'-(9-Acridinylamino)methansulfon-*m*-anisidin, Daunorubicin und Doxorubicin auf.

<sup>6</sup> Die Zelllinien HL-60/MX1 und HL-60/MX2 besitzen Resistenzen gegenüber Mitoxantron, Etoposid, Teniposid und Bisantren, Dactinomycin, 4'-(9-acridinylamino)methan-sulfon-*m*-anisidin, Daunorubicin und Doxorubicin.



Bezüglich der Apoptose-Induktion mit 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid unterschied sich keine der Zytostatika-resistenten Zelllinien von der jeweiligen Zelllinie, aus welcher sie gewonnen wurde.

In CCRF-CEM-Zellen löste Camptothecin bereits in einer Konzentration von 50 nM nach kurzer Zeit (2 Tage) Apoptose in nahezu der gesamten Zellpopulation aus (97% für Annexin V-FITC-positive, 99% für 7-AAD-positive Zellen), wohingegen der Prozentsatz apoptotischer Zellen bei CEM/C1 und CEM/C2 unter bzw. im Bereich von 20% lag (5% für Annexin V-FITC-positive und 7-AAD-positive CEM/C1-Zellen und 10% für Annexin V-FITC-positive, 9% für 7-AAD-positive CEM/C2-Zellen). In der Zelllinie CEM/C1 werden Konzentrationen von 100 nM Camptothecin zur Apoptose-Induktion benötigt, während CEM/C2-Zellen selbst gegenüber 500 nM Camptothecin noch resistent sind. In der Zelllinie CCRF-CEM und deren Derivaten konnte durch Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid Apoptose induziert werden. Für CEM/C1- und CEM/C2-Zellen wurde jedoch eine längere Inkubationszeit als für CCRF-CEM benötigt, um in einem vergleichbaren Prozentsatz an Zellen Apoptose zu induzieren. Bei der Zelllinie CEM/C2 gelang es auch nicht nach 20-tägiger Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid in der gesamten Population den programmierten Zelltod auszulösen.

Bereits die geringste der eingesetzten Doxorubicin-Konzentrationen (0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reichte aus, um in K-562-Zellen nach entsprechender Inkubationszeit (8 Tage) in 57% der Zellen Apoptose auszulösen. Die Zelllinien K-562(0.02) bzw. K-562(0.1) besaßen Resistenzen gegen bis zu 0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bzw. 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxorubicin. Gegenüber einer Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid waren sowohl die parentale Zelllinie K-562 als auch die Zytostatika-resistenten Derivate unempfindlich.

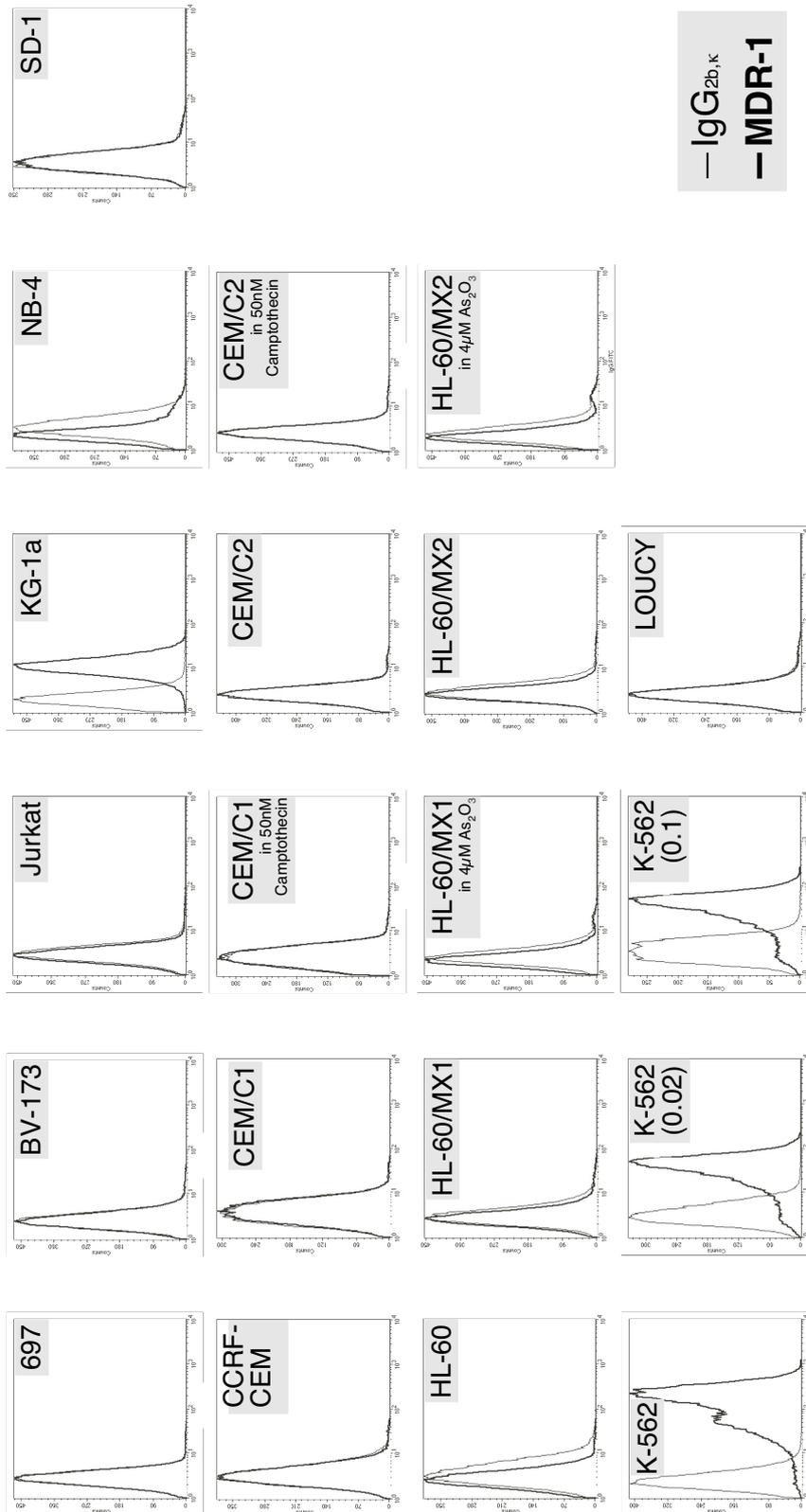
Die Zelllinien HL-60/MX1 bzw. HL-60/MX2 zeigten gegenüber bis zu 20 nM bzw. 75 nM Mitoxantron Resistenz, wohingegen bereits 10 nM Mitoxantron nach 8-tägiger Inkubation in 49% der HL-60-Zellen Apoptose induzierte. Während die parentalen HL-60-Zellen sensitiv gegenüber einer Behandlung 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid sind, konnte in keiner der beiden Zytostatika-resistenten Derivate nach 20-tägiger Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid Apoptose induziert werden.

### 7.1.3 Die Arsentrioxid-induzierte Apoptose ist unabhängig von der Basalexpression des Zytostatikaresistenz-vermittelnden Proteins P-Glykoprotein (MDR-1)

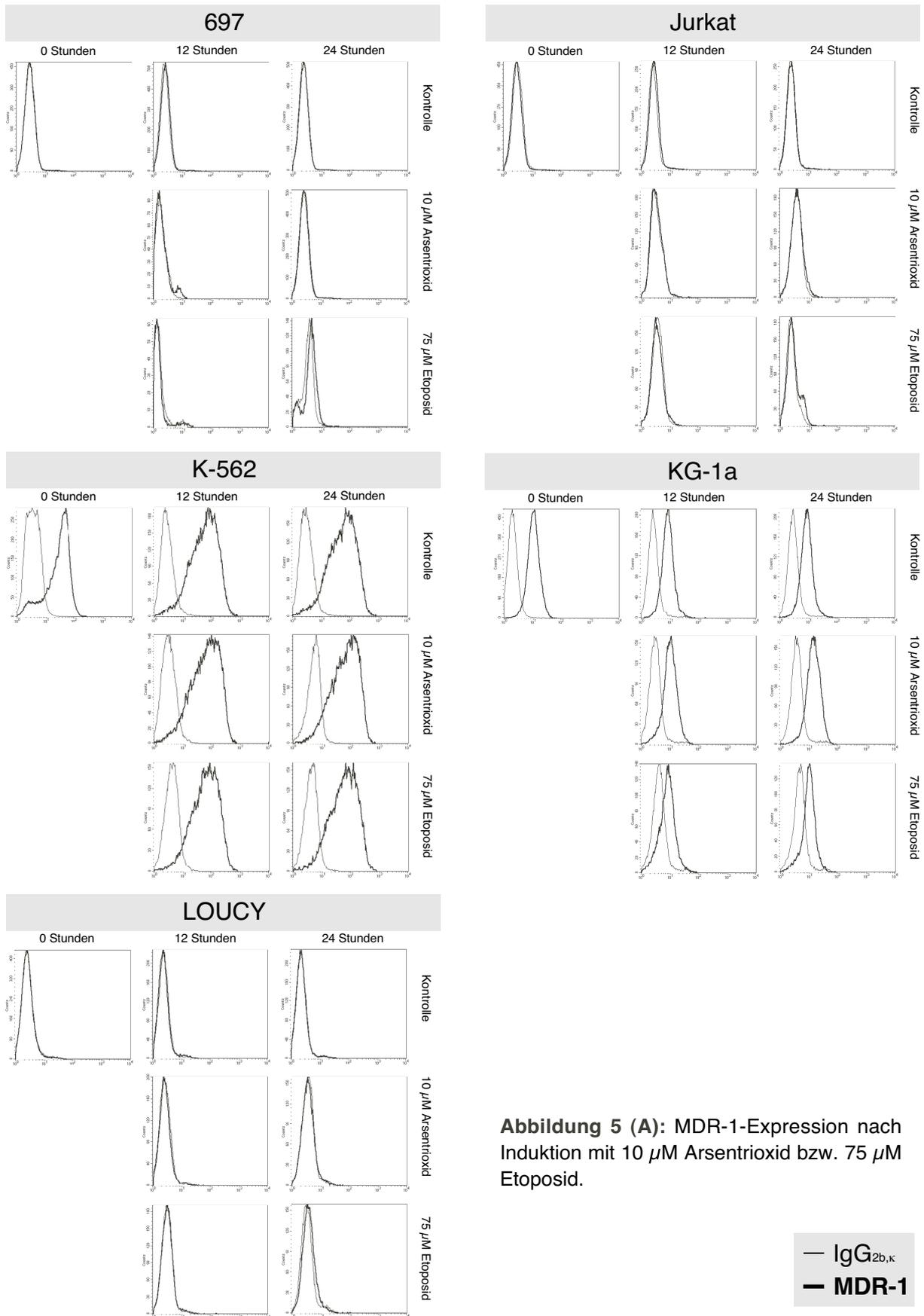
Um Hinweise zu bekommen, inwieweit die Arsentrioxid-Sensitivität der untersuchten Zellen von der Expression Zytostatikaresistenz-vermittelnder Proteine abhängig ist, wurde die Basalexpression des an der Zelloberfläche exprimierten P-Glykoproteins (MDR-1) durchflusszytometrisch untersucht. **Abbildung 4** zeigt die MDR-1-Expressionsmuster der Zelllinien 697, BV-173, Jurkat, KG-1a, NB-4, SD-1, LOUCY sowie CCRF-CEM, HL-60, K-562 und deren Zytostatika-resistenten Derivaten CEM/C1, CEM/C2, HL-60/MX1, HL-60/MX2, K-562(0.02) und K-562(0.1). Zusätzlich wurden CEM/C1- und CEM/C2-Zellen über einen Zeitraum von zwei Monaten in Anwesenheit von 50 nM Camptothecin und HL-60/MX1- und HL-60/MX2-Zellen (ebenfalls über einen Zeitraum von zwei Monaten) in Anwesenheit von 4  $\mu$ M Arsentrioxid gehalten und auf ihre MDR-1-Expression untersucht. Lediglich die relativ Arsentrioxid-unempfindlichen Zelllinien KG-1a und K-562 sowie deren Zytostatika-resistente Derivate K-562(0.02) und K-562(0.1) zeigen eindeutig eine, mit dem Durchflußzytometer nachweisbare, MDR-1-Expression.

### 7.1.4 Arsentrioxid besitzt keinen regulatorischen Einfluß auf die P-Glykoprotein (MDR-1)-Expression

Von großer Bedeutung bei Therapien mit Zytostatika ist die Hochregulation Zytostatikaresistenz-vermittelnder Proteine wie beispielsweise des MDR-1. Daher wurde die MDR-1-Expression nach 12- und 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid für die Zelllinien 697, Jurkat, K-562, KG-1a, LOUCY, CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60 und HL-60/MX2 im Durchflußzytometer bestimmt und mit der Basalexpression von MDR-1 auf diesen Zelllinien verglichen (**Abbildung 5**). Zusätzlich erfolgte eine Gegenfärbung mit 7-AAD zum Nachweis apoptotischer Zellen. Durch Inkubation mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid kam es bei keiner der untersuchten Zelllinien zu einer Veränderung des MDR-1-Expressionsmusters.

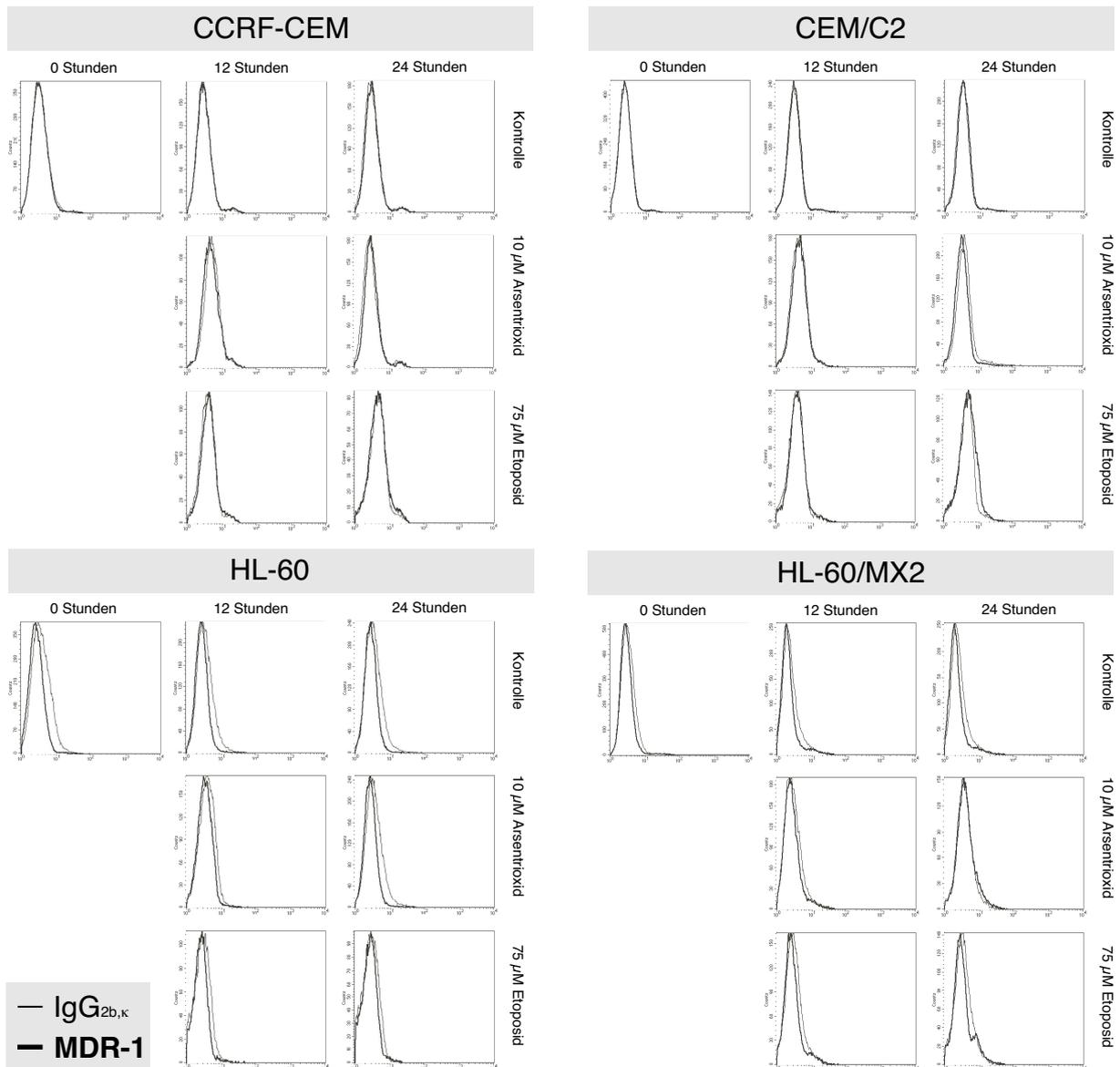


**Abbildung 4: Histogrammendarstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der P-Glykoprotein (MDR-1)- Basalexpression.** Die P-Glykoprotein-Expression von je 50.000 Zellen der Zelllinien 697, BV-173, Jurkat, KG-1a, NB-4, CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, K-562(0.02), K-562(0.1) und LOUCY wurden im Durchflußzytometer mit einem FITC-gekoppelten, monoklonalen Maus-IgG<sub>2b,K</sub>-Anti-Human-P-Glykoprotein-Antikörper bestimmt. Zusätzlich wurde die MDR-1-Expression von CEM/C1 und CEM/C2 bzw. HL-60/MX1 und HL-60/MX2, welche über einen Zeitraum von zwei Monaten in Anwesenheit von 50 nM Camptothecin bzw. 4 µM Arsentrioxid kultiviert wurden, untersucht. Lediglich die Zelllinien KG-1a und K-562 sowie deren Doxorubicin-resistenten Derivate exprimierten MDR-1. Zur Kontrollfärbung diente unspezifischer, FITC-gekoppelter, monoklonaler Maus-IgG<sub>2b,K</sub>-Antikörper (dünne Linie). Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zugehörige Zellzahl.



**Abbildung 5 (A):** MDR-1-Expression nach Induktion mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid.

— IgG<sub>2b,κ</sub>  
 — MDR-1

Abbildung 5 (B): MDR-1-Expression nach Induktion mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid

**Abbildung 5: Histogrammdarstellung der im Durchflußzytometer gemessenen P-Glykoprotein-Expression von je 50.000 Zellen der Zelllinien (B) CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60 und HL-60/MX2 bzw. (A) 697, Jurkat, K-562, KG-1a und LUCY nach Inkubation mit PBS, 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid. Der Nachweis der P-Glykoprotein-Expression erfolgte mit FITC-gekoppeltem, monoklonalem Maus-IgG<sub>2b,κ</sub>-Anti-Human-P-Glykoprotein-Antikörper (dicke Linie) nach 12- und 24-stündiger Behandlung der Zelllinien. Zur Kontrollfärbung diente unspezifischer, FITC-gekoppelter, monoklonaler Maus-IgG<sub>2b,κ</sub>-Antikörper (dünne Linie). Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zur jeweiligen Fluoreszenzintensität zugehörige Zellzahl.**

Eine nach 7–AAD-positiven und 7–AAD-negativen Zellen (Daten nicht dargestellt) getrennte Auswertung der mit Maus-IgG<sub>2b,κ</sub>-Anti-Human-MDR-1-FITC gefärbten Zellen wies darauf hin, daß weder in lebenden noch in apoptotischen Zellen MDR-1-Regulation stattfand.

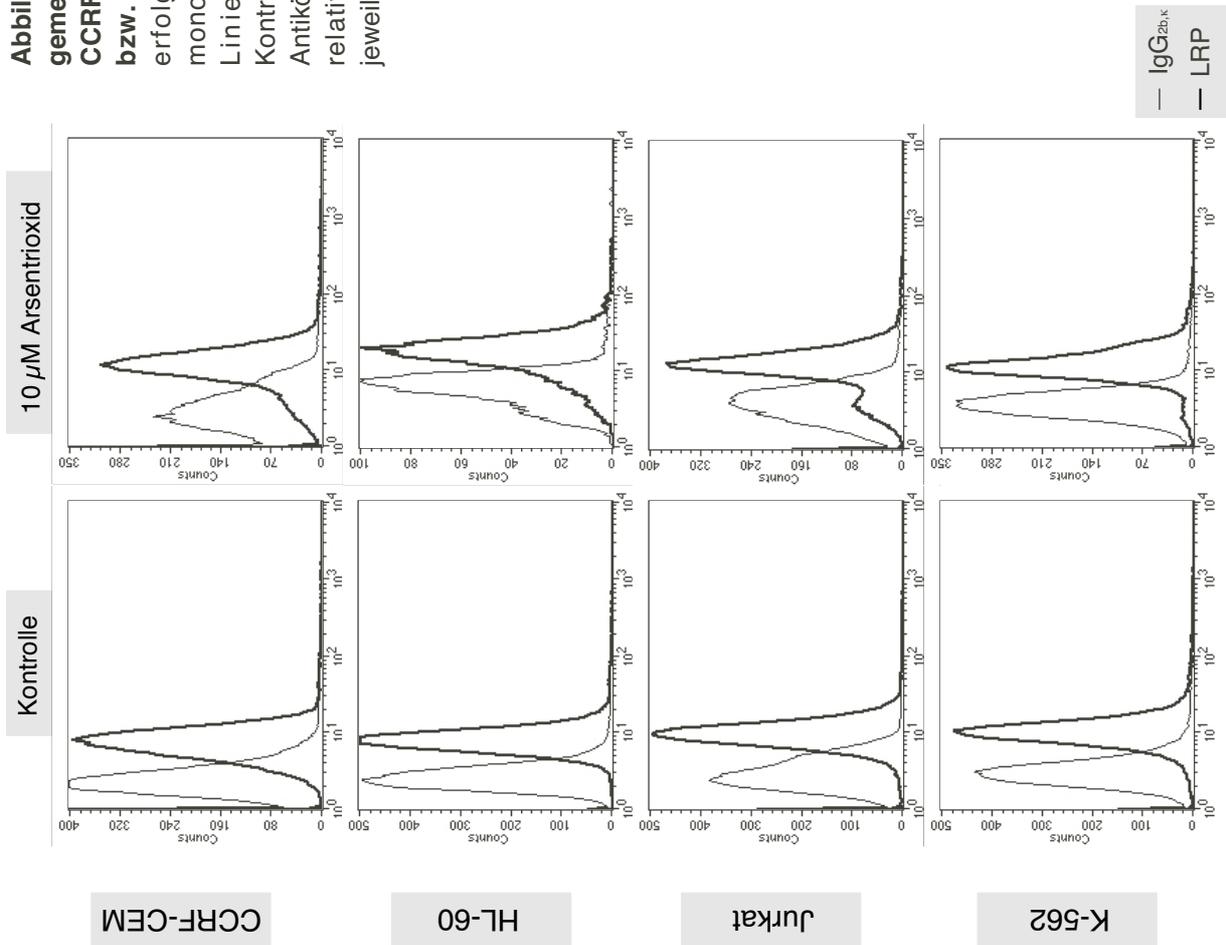
#### 7.1.5 *Arsentrioxid besitzt keinen regulatorischen Einfluß auf die LRP-Expression*

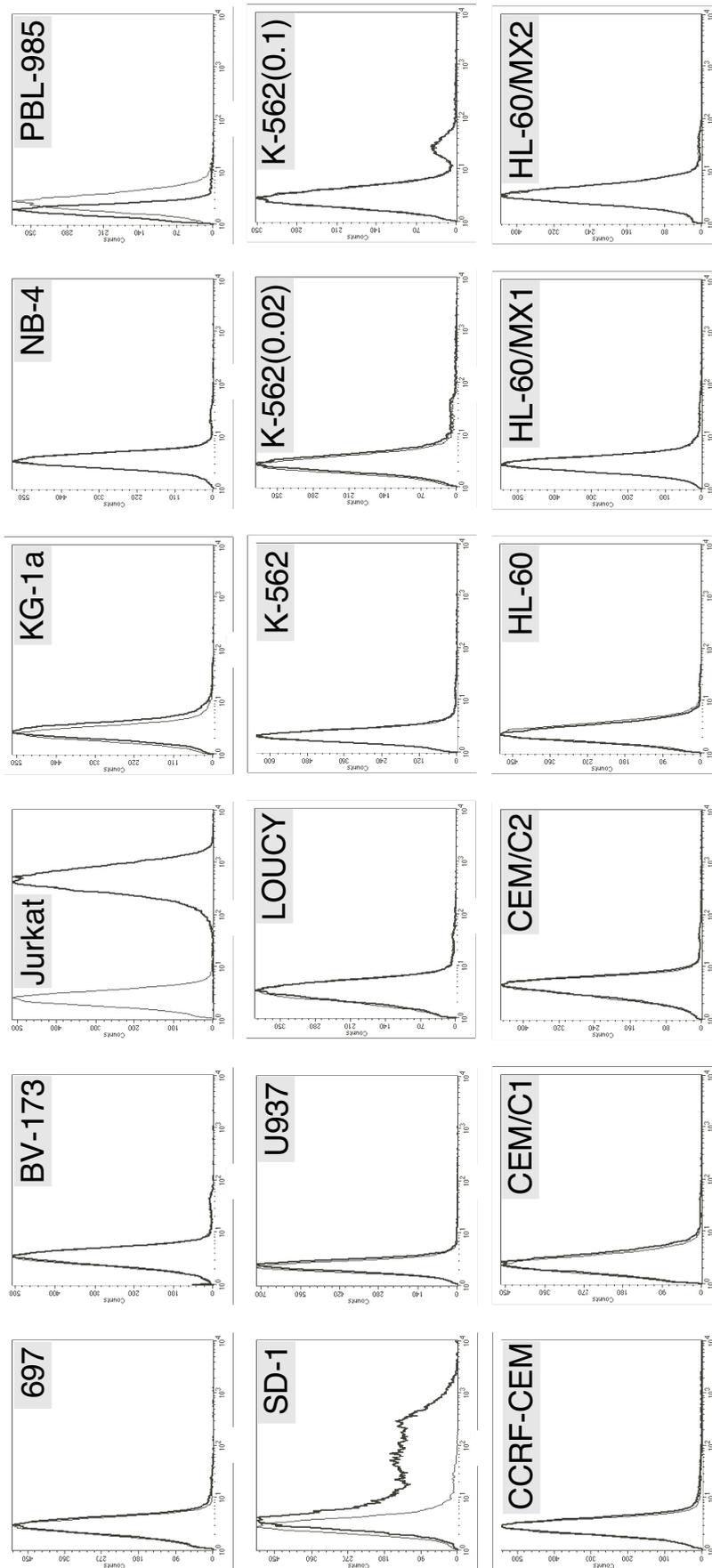
Bei LRP handelt es sich um ein weiteres Zytostatikaresistenz-vermittelndes Protein. Es ist Bestandteil eines größeren Komplexes aus RNA und Proteinen. Ein Vergleich der LRP-Expression für die Zelllinien CCRF-CEM, HL-60, Jurkat und K-562 nach 12-stündiger (Daten nicht dargestellt) und 24-stündiger Arsentrioxid-Inkubation mit den jeweiligen PBS-Kontrollen lieferte keinen Hinweis auf eine Hochregulation für LRP. Bei Berücksichtigung der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Messungen (**Abbildung 6**) schien es eher zu einer Verringerung der LRP-Expression in Anwesenheit des Arsentrioxid zu kommen.

#### 7.1.6 *Die Arsentrioxid-induzierte Apoptose ist unabhängig von der Basalexpression des Differenzierungsmarkers Thy-1 (CD90)*

Die Anwesenheit des Oberflächenproteins CD90 (Thy-1) ist charakteristisch für eine kleine Subpopulation fötaler Leberzellen, Zellen des Nabelschnurbluts und Knochenmarkzellen eines bestimmten Differenzierungszustands. Hämatopoetische Zellen, welche CD90 exprimieren, gehören zu den frühen, sehr unreifen CD34-positiven oder zu CD34-negativen, CD3- und CD4-positiven Zellen. Wie bei *Hossain et al* (Hossain, 2000) diskutiert, könnte die Expression von CD90 eine Aussage über die Arsentrioxid-Sensitivität ermöglichen. Daher wurden einige der in den Langzeit-Inkubationsexperimenten untersuchten Zelllinien durchflusszytometrisch auf ihre CD90-Expression (durch Inkubation mit einem monoklonalen FITC-markierten Maus-IgG<sub>1,κ</sub>-Anti-Human-CD90) getestet. Für die Zelllinien 697, Jurkat, KG-1a, NB-4, PBL-985, U937, LOUCY, K-562, K-562(0.02), K-562(0.1), CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2 HL-60, HL-60/MX1 und HL-60/MX2 sind die CD90-Expressionsprofile in **Abbildung 7** dargestellt (Negativkontrolle BV-173, Positivkontrolle SD-1). Lediglich die Zelllinie Jurkat und eine Teilpopulation der Zelllinie SD-1 exprimierten CD90.

**Abbildung 6: Histogrammdarstellung der durchflußzytometrisch gemessenen LRP-Expression von je 50.000 Zellen der Zelllinien CCRF-CEM, HL-60, Jurkat und K-562 nach Inkubation mit PBS bzw. 10 µM Arsentrioxid. Der Nachweis der LRP-Expression erfolgte mit Ziege-Anti-Maus-IgG-FITC nach Inkubation mit monoklonalem Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-Anti-Human-LRP-Antikörper (dicke Linie) nach 24-stündiger Behandlung der Zelllinien. Zur Kontrollfärbung diente unspezifischer, monoklonaler Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-Antikörper (dünne Linie). Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zur jeweiligen Fluoreszenzintensität zugehörige Zellzahl.**





— IgG<sub>1,K</sub>    — CD90

**Abbildung 7: Histogrammendarstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der CD90-Expression.** Die CD90-Expression von je 50.000 Zellen der Zelllinien 697, BV-173, Jurkat, KG-1a, NB-4, PBL-985, SD-1, U937, LOUCY, K-562, K-562(0.02), K-562(0.1), CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX1 und HL-60/MX2 wurden im Durchflußzytometer mit einem PE-gekoppelten, monoklonalen Maus-IgG<sub>1,K</sub>-Anti-Human-CD90(Thy-1)-Antikörper bestimmt (dicke Linie). Lediglich die Zellpopulation der Zelllinie Jurkat und eine Teilpopulation der Zelllinie SD-1 exprimierten CD90. Zur Kontrollfärbung diente unspezifischer, PE-gekoppelter, monoklonaler Maus-IgG<sub>1,K</sub>-Antikörper (dünne Linie). Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zugehörige Zellzahl.

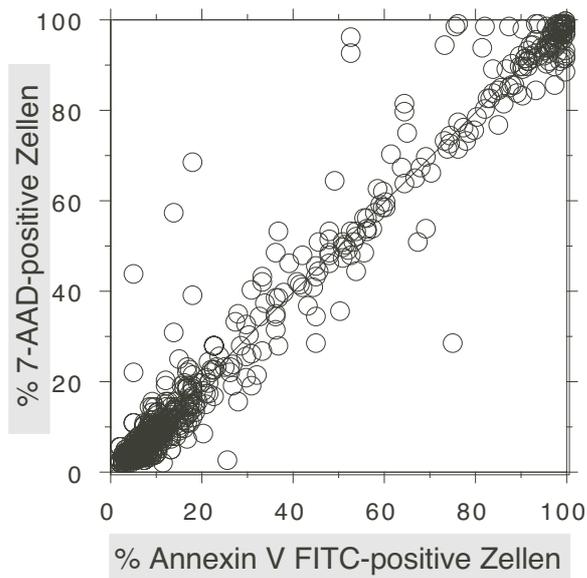
Für einen Zusammenhang zwischen der CD90-Expression und dem Ausmaß der Arsentrioxid-Sensitivität gibt es daher keinen Hinweis.

#### 7.1.7 *Einteilung der untersuchten malignen lymphatischen und myeloischen Zelllinien bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Arsentrioxid*

**Tabelle 2** faßt die Ergebnisse der Langzeit-Inkubationsexperimente zusammen. Die Zelllinien wurden gemäß ihrer Sensitivität gegenüber Arsentrioxid aufgelistet. Interessanterweise gab es keinerlei Zusammenhang zwischen dem Differenzierungs-grad bzw. dem Herkunftsgewebe der Zelllinien und deren Sensitivität gegenüber Arsentrioxid. Vertreter der einzelnen Zytostatika-resistenten Zelllinien waren ebenfalls in allen drei Sensitivitätsgruppen zu finden. Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid konnte in allen Zytostatika-resistenten Zelllinien erfolgen. Lediglich bei den Zelllinien HL-60/MX1 und HL-60/MX2 gab es eine Verschiebung in eine andere Sensitivitäts-gruppe. Parentale HL-60-Zellen gehörten der Sensitivitätsgruppe B an, HL-60/MX1 und HL-60/MX2 fielen in Gruppe C. Die Kinetik der Apoptose-Induktion bei den Zelllinien CEM/C1 und CEM/C2 unterschied sich von der der parentalen Zelllinie, jedoch zeigten CCRF-CEM und deren Derivate denselben Sensitivitäts-Grundtypus.

#### 7.1.8 *Vergleich des Nachweises apoptotischer Zellen durch Bindung von Annexin V-FITC und 7-AAD nach Arsentrioxid-induzierter Apoptose*

Die in den **Abbildungen 2 und 3** gezeigten Ergebnisse stellen durchflusszytometrische Messungen dar, in denen der Anteil apoptotischer Zellen durch Bindung von Annexin V-FITC bestimmt wurde. Mit Ausnahme der Inkubationsexperimente mit den fluoreszierenden Zytostatika Doxorubicin und Mitoxantron wurden jedoch auch 7-AAD-Färbungen zum Nachweis apoptotischer Zellen durchgeführt. **Abbildung 8** zeigt den Korrelationsplot von 987 Doppelmarkierungen von Annexin V-FITC und 7-AAD, welche im Rahmen der Langzeit-Titrationsen durchgeführt wurden. Der Korrelationskoeffizient betrug  $r^2 = 0,989$  ( $p < 0,0001$ ).



$$(\% \text{ 7-AAD-positive Zellen}) = 0,565 + 0,981 \times (\% \text{ Annexin V-positive Zellen})$$

**Abbildung 8: Regressionsanalyse des Prozentsatzes apoptotischer Zellen, gemessen durch Annexin V-FITC-Bindung und 7-AAD-Interkalierung.** Die Ergebnisse von 987 Doppelmarkierungen mit Annexin V-FITC und 7-AAD wurden in einem Regressionsplot aufgetragen (% Annexin V-FITC-positive Zellen versus % 7-AAD-positive Zellen). Ein Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung apoptotischer Zellen lieferte einen Korrelationskoeffizienten von  $r^2=0,989$  ( $P < 0,0001$ ).

## 7.2 Die durch Arsentrioxid induzierte Proliferationsinhibition ist unabhängig von der Apoptose-Induktion und führt zu keinem Zellzyklusarrest

Wie von mehreren Autoren beschrieben (Muller, 1998a; Muller, 1998b; Sternsdorf, 1999; Lallemand-Breitenbach, 2001), besteht die Wirkung von Arsentrioxid bei APL-Zelllinien aus drei Effekten: Neben der Apoptose-Induktion und dem Abbau des an SUMO-1-gebundenen PML-RAR $\alpha$ -Fusionsproteins nach Ubiquitinylierung spielt offenbar die Differenzierung bzw. Zellzyklus-Arrestierung von APL-Zellen eine wichtige Rolle (Lu, 1999; Darwiche, 2001). Ohsawa et al. (Ohsawa, 2000) und Perkins et al. (Perkins, 2000) konnten zeigen, daß Arsentrioxid auch in Nicht-APL-Zelllinien in gewisser Weise eine Differenzierung auslösen kann.

Differenzierungsprozesse von Zelllinien in Kultur lassen sich nicht unbedingt auch direkt auf die Vorgänge *in vivo* übertragen. Die etablierten Zelllinien weisen nicht immer die klassischen Differenzierungsmarker auf oder exprimieren diese nach einer induzierten Differenzierung. Da in dieser Arbeit der Effekt von Arsentrioxid auf zahlreiche hämatopoetische Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades beschrieben werden sollte, wurde der Einfluß von Arsentrioxid auf die Proliferationsrate der einzelnen Zelllinien untersucht. Dies ist ein indirekter Nachweis der Differenzierung, da bei Differenzierungsprozessen i. a. auch eine Veränderung der Zellteilungsrate auftritt. Ein potentieller Einfluß von Arsentrioxid auf die Proliferation wurde anhand mehrerer Parameter nach Arsentrioxid-Behandlung untersucht:

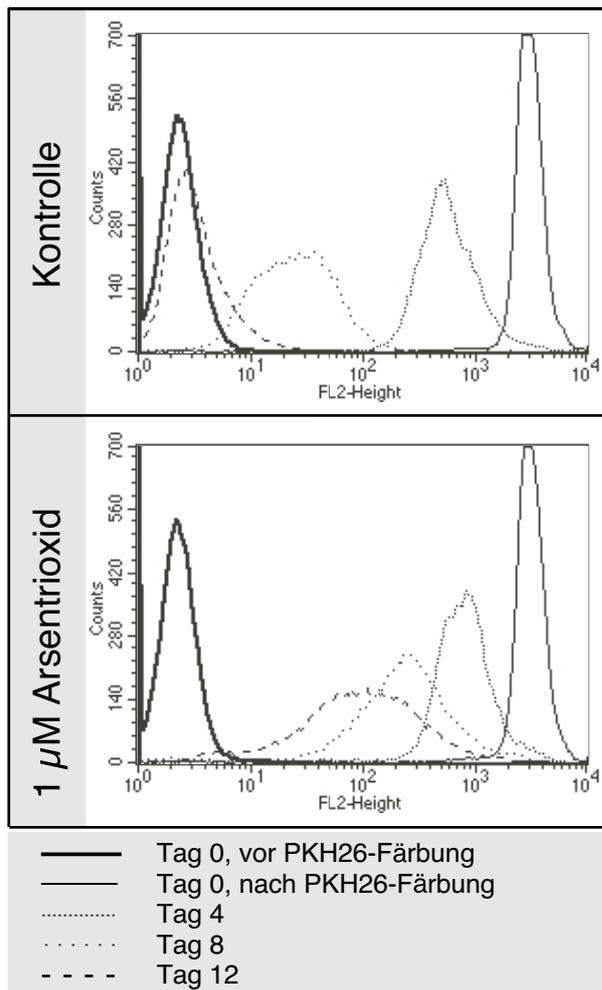
- durchflußzytometrischer Nachweis der Ausdünnung des in die Zellmembran integrierenden Fluoreszenzfarbstoffes PKH26,
- durchflußzytometrische Bestimmung der Expression des zytoplasmatischen Proliferationsmarkers Ki67 mit einem spezifischen, an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten, monoklonalen Antikörper nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und
- durchflußzytometrische Zellzyklusanalysen auf der Basis des DNA-Gehalts nach Propidiumiodid-Färbungen.

Proliferationsuntersuchungen wurden nur an Zelllinien durchgeführt, bei denen auch nach mehrtägiger Inkubation mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid nur in einem geringen Prozentsatz der Zellen Apoptose induziert werden konnte.

### 7.2.1 Die Arsentrioxid-Behandlung von Zellen führt zu einer Proliferationsinhibition bzw. Verminderung der Zellteilungsrate

Zellen der Linien 697, HEL, KG-1a, Jurkat, PBL-985, U937 sowie K-562, HL-60 und Zellen von deren Zytostatika-resistenten Derivaten K-562(0.02), K-562(0.1) bzw. HL-60/MX1 und HL-60/MX2 wurden mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 angefärbt. Dieser lipophile, nichttoxische Farbstoff integriert in die Zellmembran und wird bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen weitergegeben. Die Abnahme der Anzahl in die Membran integrierter PKH26-Moleküle konnte durch Messungen mit dem Durchflußzytometer verfolgt werden. **Abbildung 9** zeigt beispielhaft die Abnahme der Fluoreszenzintensität im Abstand von je vier Tagen nach Färbung mit PKH26 für die Zelllinie 697. Dargestellt ist die Eigenfluoreszenz der Zellen vor der Färbung (dicke Linie), die Zunahme der Fluoreszenzintensität unmittelbar nach PKH26-Färbung (dünne Linie) bzw. nach 4, 8 und 12 Tagen Inkubation (gepunktete bzw. gestrichelte Linien, vgl. Legende der **Abbildung 9**) in einem Medium ohne (oberer Teil der Abbildung) bzw. mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid (unterer Teil der Abbildung). Deutlich sichtbar ist, daß es in Anwesenheit von 1  $\mu$ M Arsentrioxid zu einer zeitlich verzögerten Abnahme der Fluoreszenzintensitäten kam.

Durch Annexin V-FITC-Färbung von PKH26-markierten Zellen war es möglich, die Verringerung der Proliferationsrate in Abhängigkeit von der Annexin V-FITC-Bindung darzustellen. Zu jedem der PKH26-gefärbten Ansätze wurde außerdem eine ungefärbte Kontrolle angesetzt. In **Abbildung 10** sind die Differenzen der mittleren Fluoreszenzkanäle ( $\Delta$  mittlerer Fluoreszenzkanal) von PKH26-gefärbten Zellen und ungefärbten Kontrollen im logarithmischen Maßstab dargestellt (Rojewski, 2000a; Rojewski, 2000c; Rojewski, 2002).

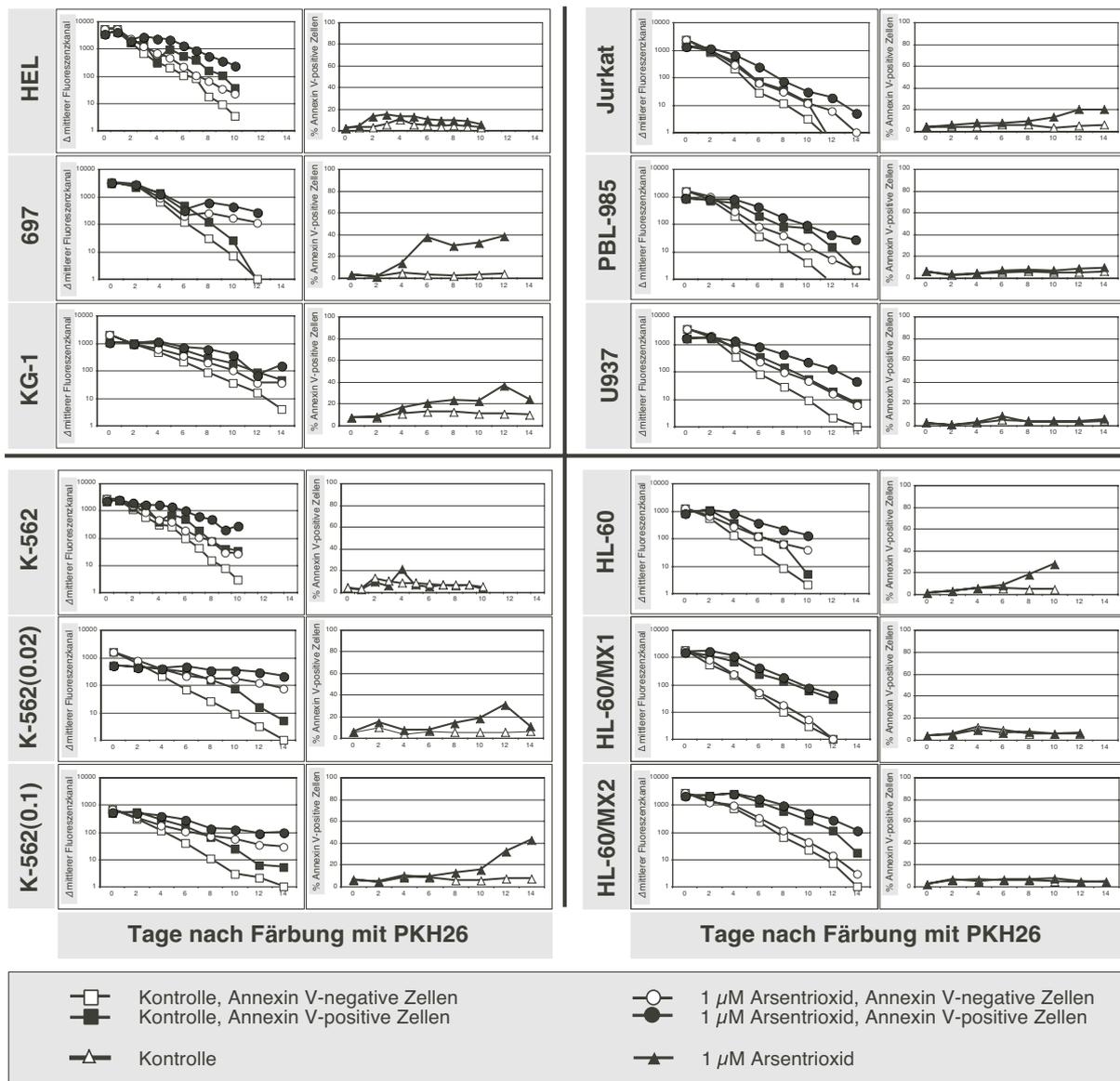


**Abbildung 9: Die Arsentrioxid-induzierte Proliferationsinhibition bei der Zelllinie 697.** Messung der mit dem Durchflußzytometer bestimmten Proliferationsrate für die Zelllinie 697. Die Zellen wurden mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 gefärbt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 4, Tag 8, Tag 12) wurden die mit 1 μM Arsentrioxid behandelten bzw. unbehandelten Zellen auf den in ihrer Membran befindlichen PKH26-Gehalt untersucht, welcher als Maß der Proliferation diente. Dargestellt ist das Histogramm einer repräsentativen Messung. Die Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL-2, in welchem die Fluoreszenz des PKH26 gemessen werden konnte, ist deutlich zu erkennen. Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zur jeweiligen Fluoreszenzintensität zugehörige Zellzahl.

### 7.2.2 Die Arsentrioxid-induzierte Proliferationsinhibition ist unabhängig von der Apoptose-Induktion

Es erfolgte eine getrennte Darstellung der berechneten Differenz  $\Delta$ mittlerer Fluoreszenzkanal nach Annexin V-FITC-positiven und Annexin V-FITC-negativen Zellen. Die jeweiligen Meßzeitpunkte und Inkubationszeiten sind der Legende der **Abbildung 10** zu entnehmen. Wie aus **Abbildung 10** (rechtes Diagramm für die jeweilige Zelllinie) deutlich wird, blieb der Anteil apoptotischer Zellen nach 10 Tagen in allen untersuchten Zelllinien (außer in der Zelllinie 697) unter 25% .

<sup>9</sup> Der genaue Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen nach 10-tägiger Inkubation mit 1 μM Arsentrioxid betrug 5% für HEL, 32% für 697, 22% für KG-1, 12% für Jurkat, 6% für PBL-985, 4% für U937, 4% für K-562, 18% für K-562(0.02), 15% für K-562(0.1), 16% für HL-60, 6% für HL-60/MX1 und 7% für HL-60/MX2.



**Abbildung 10: Die durch Arsentrioxid induzierte Proliferationsinhibition ist unabhängig von der Apoptose-Induktion.** Präsentation durchflußzytometrischer Messungen der Proliferationsrate mittels PKH26-Färbung. Nach Inkubation mit PBS bzw. 1 μM Arsentrioxid wurde ein Aliquot der Zellen mit Annexin V-FITC gegengefärbt: Tägliche Messung erfolgte für die Zelllinien HEL und K-562 über einen Zeitraum von 10 Tagen, für die restlichen Zelllinien jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von 10 Tagen für die Zelllinien HL-60, über 12 Tage für die Zelllinien 697 und HL-60/MX1 bzw. über 14 Tage für die Zelllinien KG-1, K-562(0.02), K-562(0.1), Jurkat, PBL-985, U937 sowie HL-60/MX2. Der gleichzeitige Nachweis von PKH26-Fluoreszenz als Maß der Proliferationsrate und Annexin V-FITC als Maß des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen erfolgte im Durchflußzytometer. Die Differenz des mittleren Fluoreszenzkanals (relative Fluoreszenzintensität) PKH26-gefärbter Zellen und ungefärbter Kontrollen wurde als Δmittlerer Fluoreszenzkanal bezeichnet. Dargestellt ist die Abnahme der Differenz Δmittlerer Fluoreszenzkanal PKH26-markierter apoptotischer und lebender Zellen.

Die Abnahme der Differenz  $\Delta$  mittlerer Fluoreszenzkanal von Kontrollen (Rechtecke) divergierte in allen Fällen (außer HL-60/MX1 und HL-60/MX2) von der von 1  $\mu$ M Arsentrioxid-behandelten Zellen (Kreise). Dies galt auch für die Annexin V-FITC-negativen, nicht-apoptotischen Zellen (offene Symbole). Somit war die Proliferationsinhibition durch 1  $\mu$ M Arsentrioxid in allen Zelllinien unabhängig von der Apoptose-Induktion (Rojewski, 2000a; Rojewski, 2000c; Rojewski, 2002).

Beispielsweise betrug die Differenz  $\Delta$  mittlerer Fluoreszenzkanal der Annexin V-FITC-negativen Zellen für K-562(0.02) an Tag 2 in etwa 1000, sowohl in den Kontrollansätzen (offene Quadrate) als auch in den mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid behandelten Ansätzen (offene Kreise). Eine Abnahme der Differenz  $\Delta$  mittlerer Fluoreszenzkanal auf  $\pm 100$  (entspricht in etwa 3,3 Teilungen<sup>8</sup>) wurde für die Kontrollansätze nach ca. 4 Tagen erreicht, wohingegen in den Arsentrioxid-behandelten Ansätzen 10 Tage für diese Abnahme benötigt wurden.

Lediglich in den Zelllinien HL-60/MX1 und HL-60/MX2 konnte kein Unterschied der Proliferationsrate von Kontrollen und den mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid behandelten, Annexin V-FITC-negativen Zellen festgestellt werden. In diesen Zelllinien kam es offensichtlich zu keiner Proliferationsinhibition durch 1  $\mu$ M Arsentrioxid.

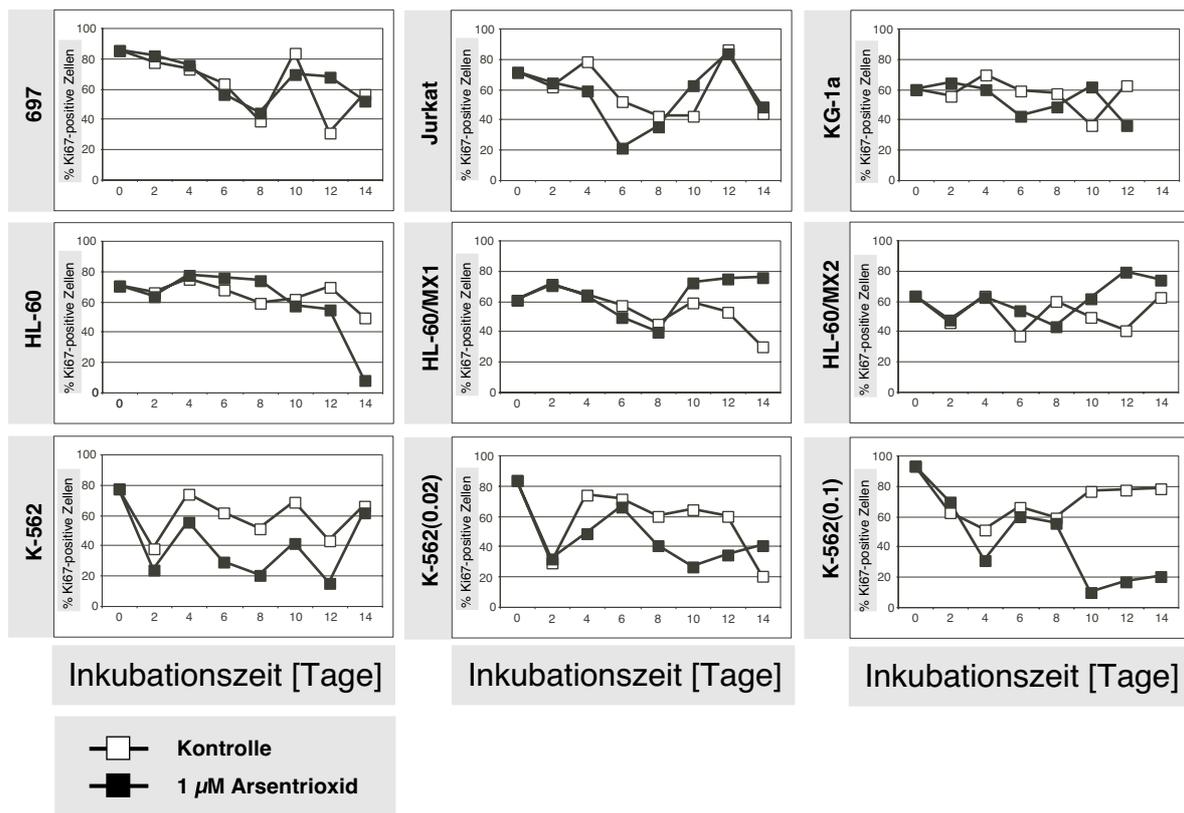
### 7.2.3 Die Arsentrioxid-induzierte Proliferationsinhibition hat keinen Einfluß auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki67

Der Index des Proliferationsmarkers Ki67 wird in der klinischen Routinediagnostik häufig zur Prognostik von Tumor- bzw. Leukämien herangezogen, wobei eine erhöhte Ki67-Expression mit einer verschlechterten Prognose einhergeht (Gore, 1993). **Abbildung 11** zeigt den prozentualen Anteil Ki67-positiver Zellen in unbehandelten und mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid behandelten Versuchsansätzen für die Zelllinien 697, Jurkat, KG-1a bzw. HL-60 und K-562 sowie für deren Zytostatika-resistente Derivate HL-60/MX1, HL-60/MX2, K-562(0.02) und K-562(0.1) über einen Zeitraum von 14 Tagen.

---

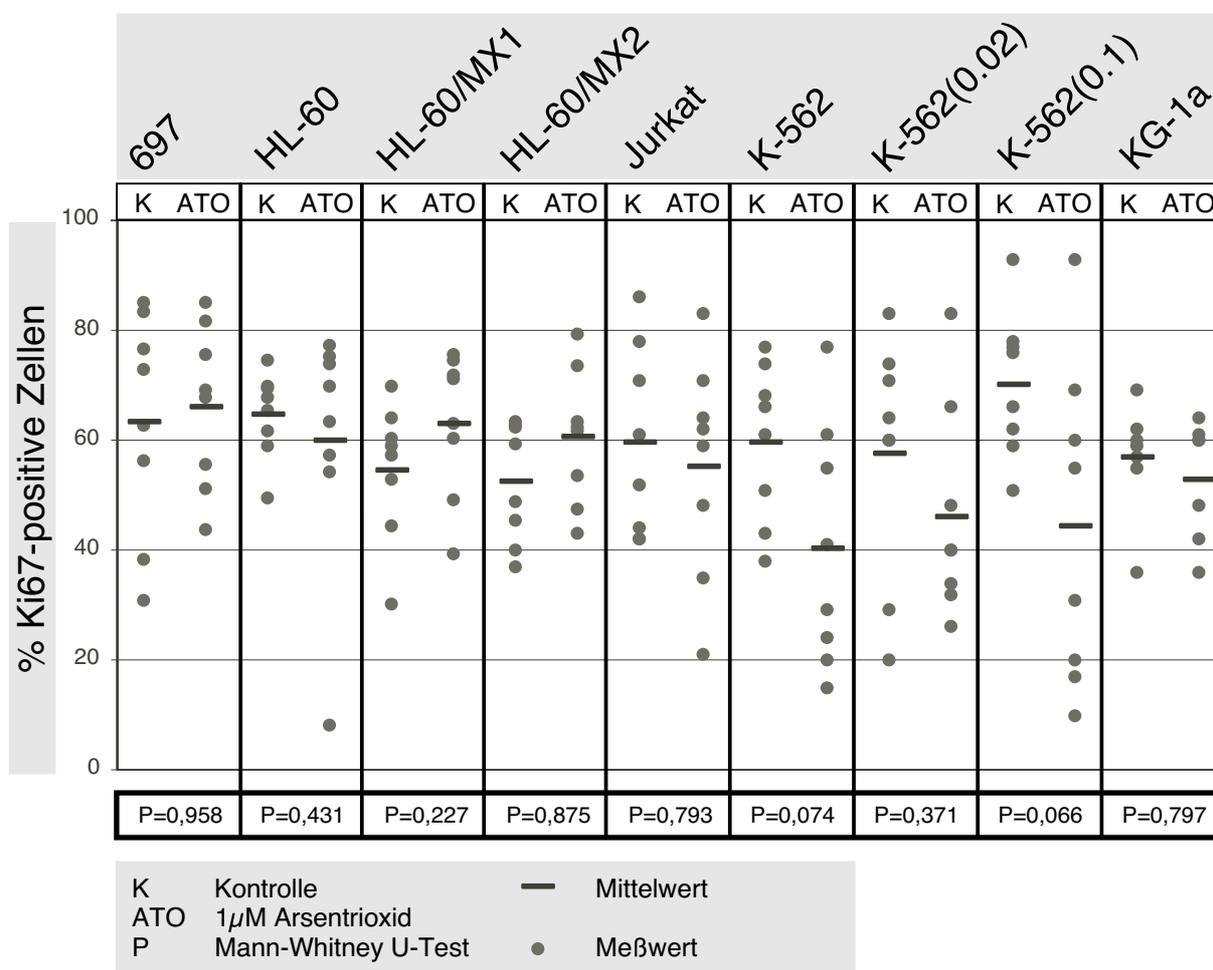
<sup>8</sup> Es handelt sich um eine Abnahme der Differenz  $\Delta$  mittlerer Fluoreszenzkanal um den Faktor  $1000/100 = 10$ . Da bei jeder Zellteilung der Farbstoff gleichmäßig auf zwei Tochterzellen weitergegeben wird, kann man in diesem Fall von ca. 3,3 Teilungen ( $2^{3,33} \approx 10$ ) ausgehen.

Der Nachweis erfolgte jeden zweiten Tag durch Inkubation mit Ki67-spezifischen, FITC-markierten Maus-IgG<sub>1,κ</sub> nach Fixierung und Permeabilisierung eines Aliquots unbehandelter (weiße Quadrate) bzw. mit 1 μM Arsentrioxid-behandelter (schwarze Quadrate) Zellen im Durchflußzytometer. Die Verlaufskurven für Ansätze mit und ohne Arsentrioxid waren nicht identisch und divergierten in einigen Fällen. Dies kam besonders für die Zelllinien HL-60, HL-60/MX1 und K-562(0.1) zum Vorschein. Bei den Zelllinien KG-1a, HL-60/MX2 und K-562 (0.02) war eine zunehmende Asynchronisierung der Kurven zu verzeichnen.



**Abbildung 11: Die durch Arsentrioxid induzierte Proliferationsinhibition beeinflusst nicht die Expression des Proliferationsmarkers Ki67.** Darstellung des Prozentsatzes Ki67-positiver 697-, Jurkat-, KG-1a-, HL-60-, HL-60/MX1-, HL-60/MX2-, K-562-, K-562(0.02)- und K-562(0.1)-Zellen. Nach Inkubation der Zelllinien mit 1 μM Arsentrioxid über einen Zeitraum von 14 Tagen konnte kein signifikanter Unterschied der Ki67-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gemessen werden (vgl. hierzu auch **Abbildung 12**). Nach Fixierung, Permeabilisierung und anschließender Inkubation mit Maus-IgG<sub>1,κ</sub>-Anti-Human-Ki67-FITC bzw. einem unspezifischen FITC-markierten Maus-IgG<sub>1,κ</sub> wurden die Fluoreszenzintensitäten von je 50.000 Zellen im Durchflußzytometer bestimmt.

In **Abbildung 12** sind der Prozentsatz Ki67-positiver Zellen zu allen 8 Meßzeitpunkten sowie der jeweilige Mittelwert für alle Zelllinien dargestellt. Um festzustellen, ob sich die Ki67-Expression in Kontrollansätzen (K) und Arsentrioxid-behandelten Ansätzen (ATO) signifikant unterschied, wurde ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt. **Abbildung 12** verdeutlicht, daß über einen Zeitraum von 14 Tagen kein signifikanter Unterschied in der Ki67-Expression in unbehandelten und Arsentrioxid-behandelten Zellen existierte. Es gilt für alle Ansätze  $P > 0,05$ .



**Abbildung 12: Die durch Arsentrioxid induzierte Proliferationsinhibition beeinflußt nicht die Expression des Proliferationsmarkers Ki67.** Die Verteilung des Prozentsatzes Ki67-positiver Zellen der einzelnen Messungen (graue Punkte) vom jeweiligen Mittelwert der Expression (schwarze Linie) ist für die Zelllinien 697, HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, Jurkat, K-562, K-562(0.02), K-562(0.1) sowie KG-1a dargestellt. Die Expressionsprofile Arsentrioxid-behandelter Zellen und deren Kontrollen unterscheiden sich nicht signifikant. Vergleiche hierzu die P-Werte des Mann-Whitney U-Tests.

#### 7.2.4 Die durch Arsentrioxid-induzierte Proliferationsinhibition ist unabhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus

Die Behandlung verschiedener hämatopoetischer Zelllinien mit Arsentrioxid in Konzentrationen, welche in diesen Zelllinien noch keine Apoptose auslösten, führte eindeutig zu einer Apoptose-unabhängigen Proliferationsinhibition (**Abbildung 11**).

Durch Zellzyklusanalysen (**Abbildung 13**) sollte geklärt werden, ob es zu einem Arrest durch Arsentrioxid in einer bestimmten Position im Zellzyklus kam.

Daher wurden die Zelllinien Jurkat, U937, HL-60 und K-562 sowie die Zytostatika-resistenten Zelllinien HL-60/MX1 und K-562(0.1) über einen Zeitraum von 14 Tagen in Anwesenheit von 1  $\mu$ M Arsentrioxid gezogen, und der DNA-Gehalt der Zellen wurde vergleichend zum DNA-Gehalt unbehandelter Zellen analysiert. Nach Fixierung, Permeabilisierung und RNA-Verdau erfolgte die durchflußzytometrische Bestimmung der in den Kernen vorhandenen DNA-Menge (**Abbildung 13**).

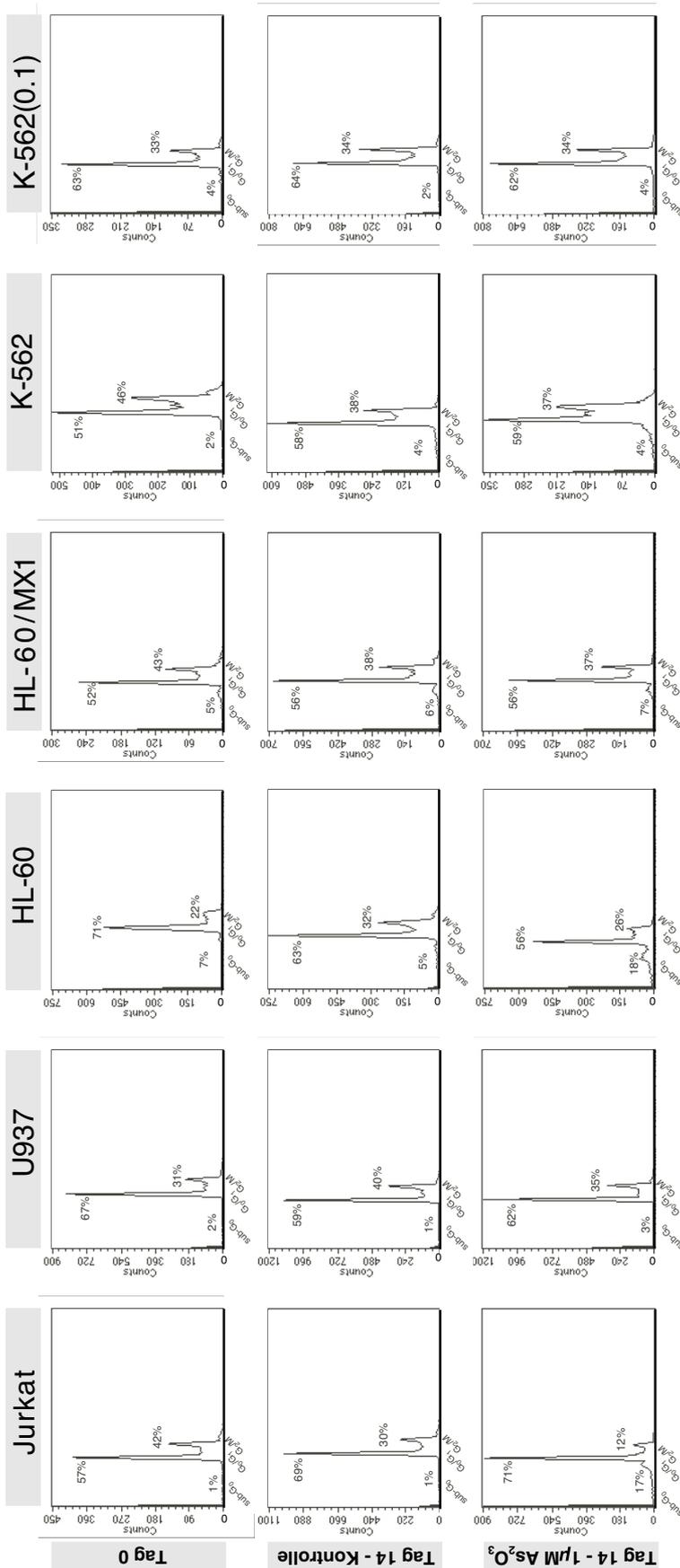
Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase, welche einen einfachen Chromosomensatz besaßen, zeigten eine geringere Fluoreszenzintensität als sich teilende Zellen in der S- bzw.  $G_2/M$ -Phase.

In einigen Ansätzen konnte eine weitere Population beobachtet werden. Diese sogenannte Sub- $G_0$ -Population besaß eine geringere Fluoreszenzintensität als die  $G_0/G_1$ -Population. Die Population stellte apoptotische Zellen dar und war besonders bei den Zelllinien Jurkat (17% der Zellen) und HL-60 (14% der Zellen) ausgeprägt. Der Vergleich von unbehandelten und über 14 Tage mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid behandelten Zellen ergab keine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Zellen in der  $G_0/G_1$ - bzw. der  $G_2/M$ -Phase. Bei einem Vergleich der Fluoreszenzprofile von Tag 0 mit den Profilen von Tag 14 konnte zwar beobachtet werden, daß sich im Laufe der Inkubation eine Veränderung ergab. So betrug beispielsweise der Anteil von sich in der  $G_0/G_1$ -Phase befindenden HL-60-Zellen zu Beginn der Inkubation (Tag 0) 71% und fiel nach 14 Tagen auf 63% (Kontrolle) bzw. 56% (1  $\mu$ M Arsentrioxid).

Allerdings blieb das Verhältnis der Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase zu dem der Zellen in der  $G_2/M$ -Phase nach 14 Tagen in diesem Fall nahezu identisch (1,97 für den Kontrollansatz bzw. 2,14 für mit Arsentrioxid behandelte Zellen). Die Verschiebung

der Absolutwerte war hier auf die bereits beschriebene Zunahme der Sub-G<sub>0</sub>-Phasen-Population zurückzuführen.

Die durch Arsentrioxid induzierte Proliferationsinhibition war daher in allen Fällen unabhängig von der Position der Zellen im Zellzyklus (Rojewski, 2002).



**Abbildung 13: Die durch Arsentrioxid induzierte Proliferationsinhibition ist unabhängig von der Position der Zellen im Zellzyklus.** Durchflußzytometrische Zellzyklusuntersuchungen der Zelllinien Jurkat, U937, HL-60, HL-60/MX2, K-562 und K-562(0.1) mittels DNA-Gehaltbestimmung durch Propidiumiodidfärbung: Nach 14-tägiger Inkubation in Anwesenheit von 1 µM Arsentrioxid konnte bei keiner der untersuchten Zelllinien eine Verschiebung des Verhältnisses von Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- bzw. der G<sub>2</sub>/M-Phase im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden. Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zur jeweiligen Fluoreszenzintensität zugehörige Zellzahl.

### 7.3 *Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Arsentrioxid-vermittelten Apoptoseinduktion: Caspasen-Aktivierung und Beeinflussung der Mitochondrienfunktion*

Zur näheren Charakterisierung der bei der Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid beteiligten Mechanismen wurden mehrere zentrale Parameter untersucht. Hierzu zählte u. a.

- die Beteiligung von Caspasen,
  - die Bedeutung der mitochondrialen Aktivität und eine Auswirkung auf das mitochondriale Membranpotential,
  - die Bildung von freien Sauerstoffradikalen (ROS = *reactive oxygen species*) und NO-Radikalen
  - die Aktivierung von p53 sowie
- bei der Arsentrioxid-induzierten Apoptose.

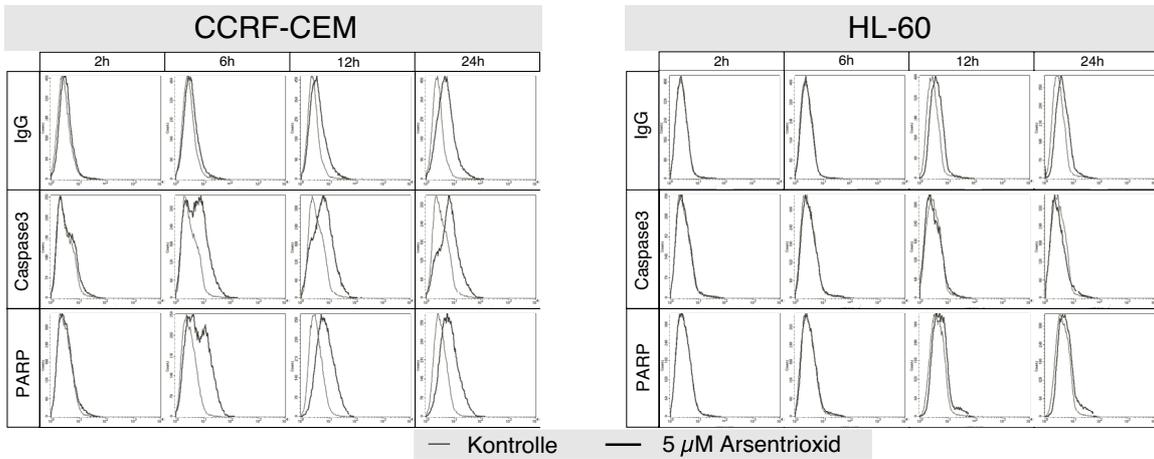
Bei den oben beschriebenen Parametern handelt es sich um Effekte, welche i. a. wenige Stunden nach Behandlung mit Induktoren der Apoptose (z. B. Zytostatika wie Etoposid, Camptothecin oder Antikörpern wie z. B. Anti-CD95-Antikörper) auftreten. Um für jede der Messungen repräsentative Zelllinien aller Sensitivitätsgruppen untersuchen zu können, wurden die in den jeweiligen Experimenten verwandten Zelllinien über maximal 24 Stunden mit Arsentrioxid inkubiert. Um Effekte auch in weniger sensiblen Zelllinien der Sensitivitätsgruppe C sehen zu können, betrug die zur Apoptose-Induktion eingesetzte Arsentrioxid-Konzentration in allen Ansätzen 10  $\mu\text{M}$ . Lediglich bei einigen der mit LOUCY (Sensitivitätsgruppe A) bzw. CCRF-CEM und HL-60 (Sensitivitätsgruppe B) durchgeführten Experimente betrug die Arsentrioxid-Konzentration 5  $\mu\text{M}$ .

#### 7.3.1 *Die Aktivierung von Caspasen bei der Arsentrioxid-induzierten Apoptose: Spaltung von Procaspase-3, Poly(ADP-ribose)Polymerase-1 (PARP) und GDP-Dissoziations-Inhibitor (D4-GDI)*

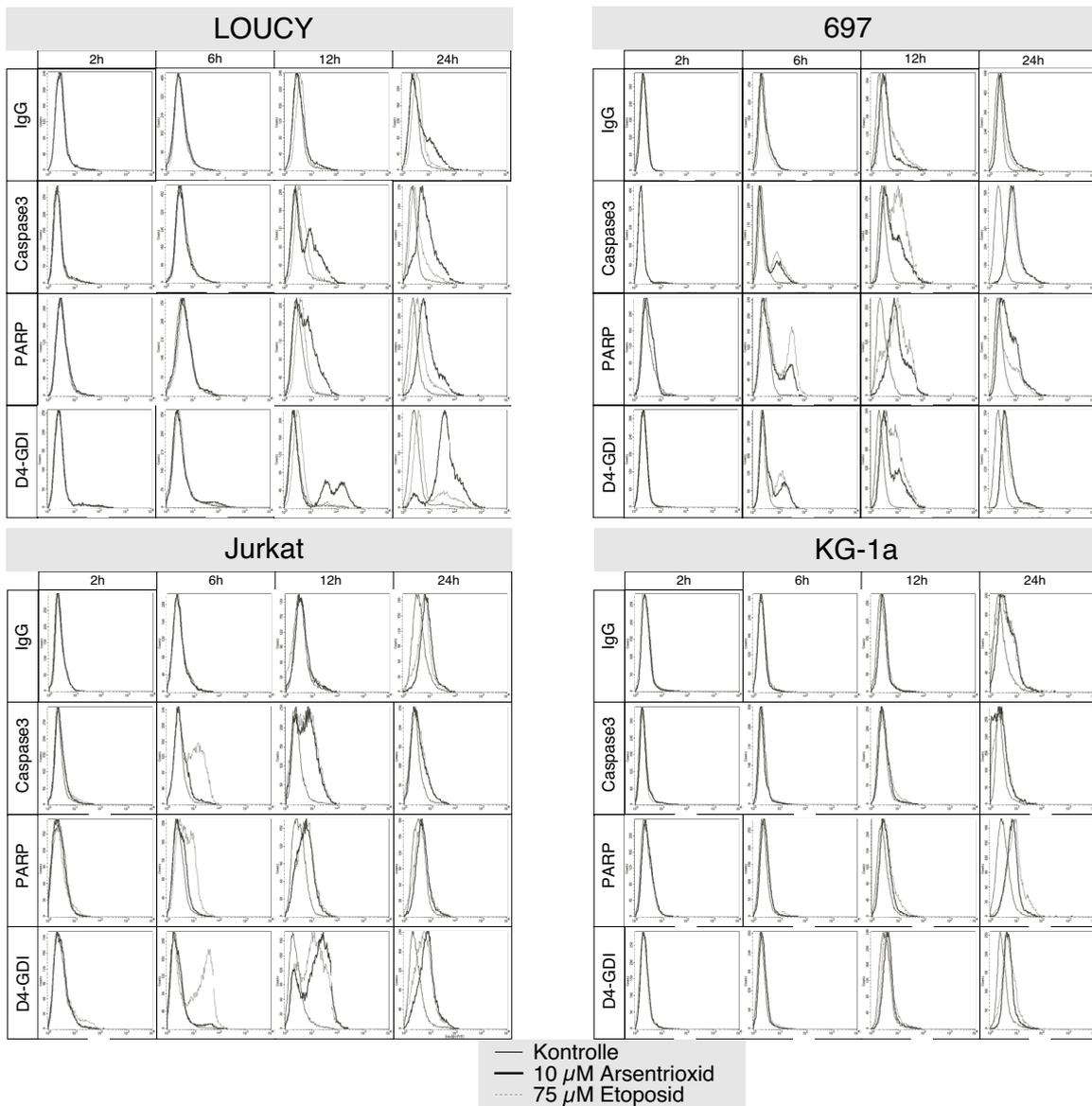
Typischerweise kommt es bei der klassischen Apoptose-Induktion (beispielsweise durch Zytostatika) zu einer Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Daher wurde zunächst die Aktivierung von Caspasen, welche an zentraler Stelle in der Caspasen-

Kaskade stehen, untersucht: die Spaltung von Procaspase-3, die Spaltung des an zentraler Stelle der DNA-Reparatur stehenden Caspasen-Substrats PARP sowie die Spaltung der Rho-GTPase D4-GDI, welche Apoptose-assoziierte Veränderungen des Zytoskeletts und der Zellmembran bewirkt. Der Nachweis der gespaltenen Proteine wurde nach Fixierung, Permeabilisierung und Inkubation mit sogenannten *cleavage site specific* Antikörpern durchgeführt. Diese *cleavage site specific* Antikörper sind gegen ein Epitop der entsprechenden Antigene gerichtet, das nur von den jeweiligen gespaltenen Proteinen präsentiert wird. Somit war sichergestellt, daß nur die durch Caspasen gespaltenen Produkte (i. e. aktivierte Caspase-3, gespaltenes PARP und D4-GDI) nach Inkubation mit den Antikörpern im Durchflußzytometer nachgewiesen werden konnten. **Abbildung 14** stellt eine Zusammenfassung repräsentativer Experimente zum Nachweis der Caspase-3-Rekrutierung und PARP- sowie D4-GDI-Spaltung dar. Die Informationen über Inkubationszeiten und verwandte Antikörper sind der Legende zur **Abbildung 14** zu entnehmen. Wie in **Abbildung 14 (A)** zu sehen ist, führte eine Behandlung von CCRF-CEM-Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bereits nach 6 Stunden zur Rekrutierung aktivierter Caspase-3 und zu Caspasen-induzierter PARP-Spaltung. In den weniger Arsentrioxid sensitiven HL-60-Zellen blieb dieser Effekt selbst nach 24-stündiger Inkubation aus. Inkubationen mit höheren Konzentrationen von Arsentrioxid (10  $\mu\text{M}$ ) und dem Zytostatikum Etoposid (75  $\mu\text{M}$ ) sind in den **Abbildungen 14 (B)** und **(C)** dargestellt. Das Zytostatikum Etoposid diente als positive Kontrolle der Caspasen-Aktivierung. In den Zelllinien 697 und CCRF-CEM kam es bereits nach 6-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid zu einer Caspase-3-Rekrutierung und PARP- sowie zur D4-GDI-Spaltung. Während Etoposid in den Zytostatika-resistenten CCRF-CEM-Derivaten ebenfalls bereits nach 6 Stunden Procaspase-3-, PARP- und D4-GDI-Spaltung verursachte, konnte dieser Effekt erst nach 12-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid beobachtet werden. Ähnlich wie die CCRF-CEM-Derivate CEM/C1 und CEM/C2 verhielten sich auch die Zelllinien Jurkat und HL-60 und die Zytostatika-resistenten HL-60-Derivate HL-60/MX1 und HL-60/MX2. Allerdings konnte im Fall von HL-60/MX1 und HL-60/MX2 lediglich die Spaltung von D4-GDI beobachtet werden.

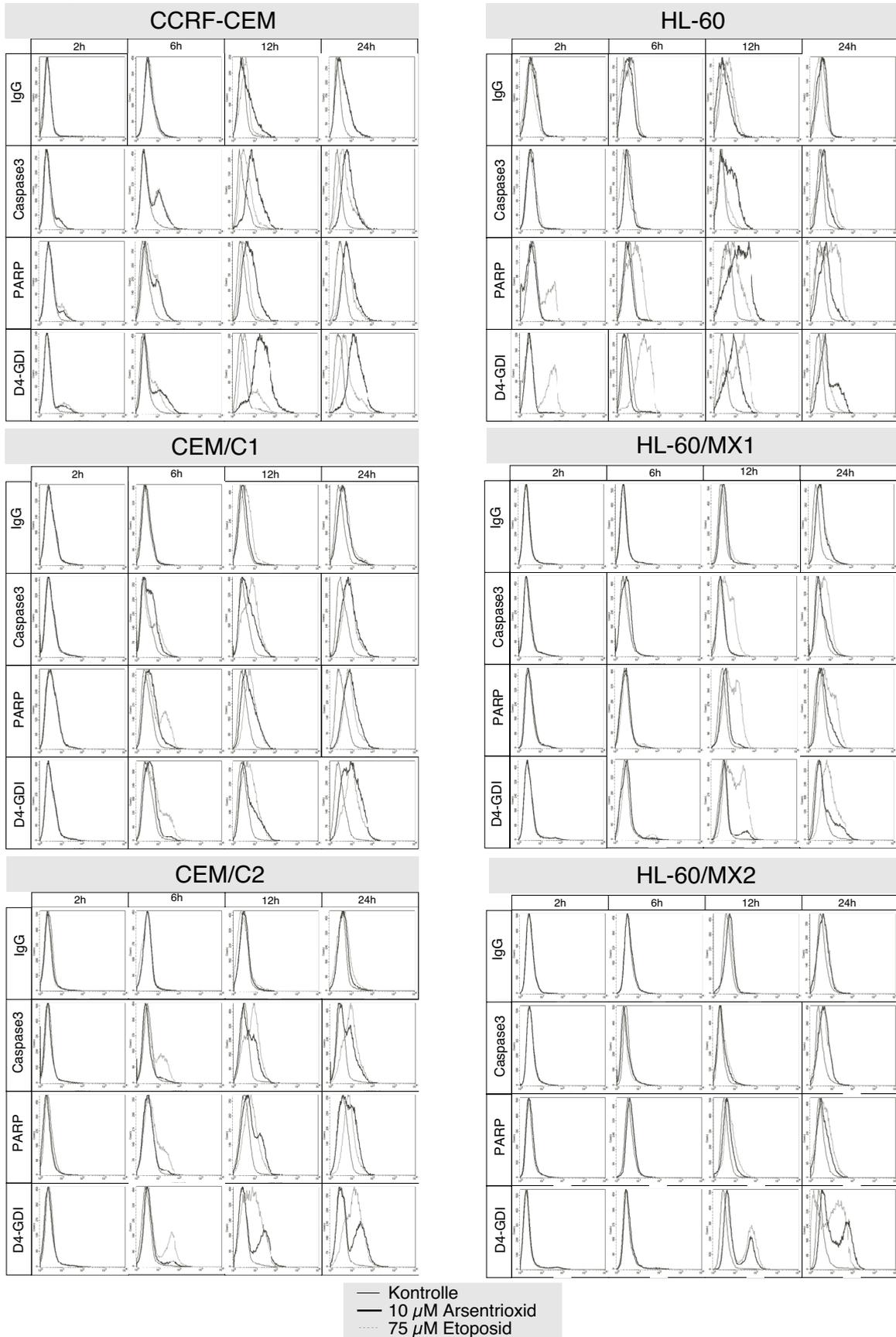
**Abbildung 14 (A):** Procaspase-3- und PARP-Spaltung nach Induktion mit 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid

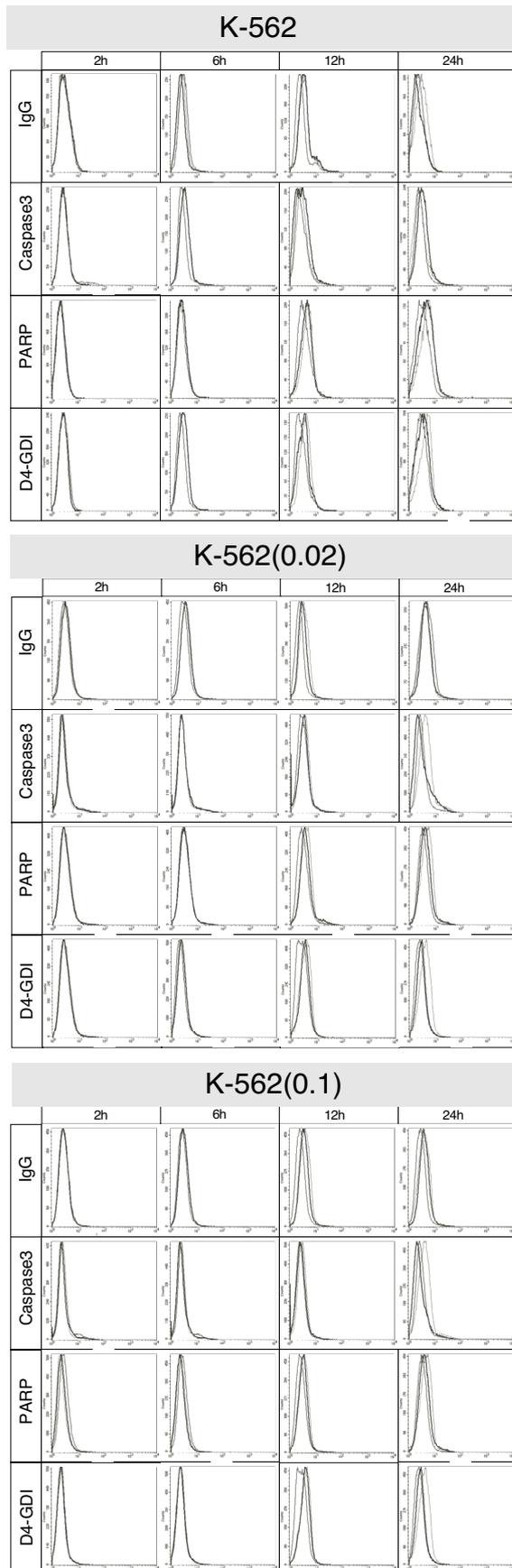


**Abbildung 14 (B):** Procaspase-3, PARP- und D4-GDI-Spaltung nach Induktion mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid



**Abbildung 14 (C):** Procaspase-3-, PARP- und D4-GDI-Spaltung nach Induktion mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid





**Abbildung 14: Caspasen-Aktivierung während Arsentrioxid-Behandlung - Spaltung von Procaspase-3, PARP und D4-GDI.**

(A) Durchflußzytometrische Bestimmung der Caspasen-Aktivierung durch polyklonale Antikörper gegen Caspasen-spezifische Spaltprodukte: Kaninchen-Anti-Human-(Aktivierte-Caspase-3)-PE- und Kaninchen-Anti-Human-(PARP-cleavage-site (214/215))-FITC-Antikörper. Das Auftreten der durch Caspasen gespaltenen Produkte im Zytoplasma wurde nach 2-, 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von PBS (dünne Linie) bzw. 5 μM Arsentrioxid (dicke Linie) für die Zelllinie CCRF-CEM und HL-60 bestimmt.

(B), (C) und (D) Durchflußzytometrische Bestimmung der Caspasen-Aktivierung durch monoklonale (Maus-IgG<sub>1,k</sub>-Anti-Human-(D4-GDI)-FITC)- und polyklonale (Kaninchen-Anti-Human-(Aktivierte-Caspase-3)-PE; Kaninchen-Anti-Human-(PARP-cleavage-site(214/215))-FITC) Antikörper gegen Caspasen-spezifische Spaltprodukte. Das Auftreten der durch Caspasen gespaltenen Produkte im Zytoplasma wurde nach 2-, 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von PBS (dünne Linie) bzw. 10 μM Arsentrioxid (dicke Linie) oder 75 μM Etoposid (gestrichelte Linie) für die Zelllinien (B) LOUCY, 697, Jurkat und KG-1a sowie (C) CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2 und (D) K-562, K-562(0.02), K-562(0.1) bestimmt.

Die Histogramme einzelner repräsentativer Messungen sind mit ihren jeweiligen Kontrollen dargestellt. Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zugehörige Zellzahl. Für jede Messung wurden die Fluoreszenzintensitäten von 50.000 Zellen bestimmt.

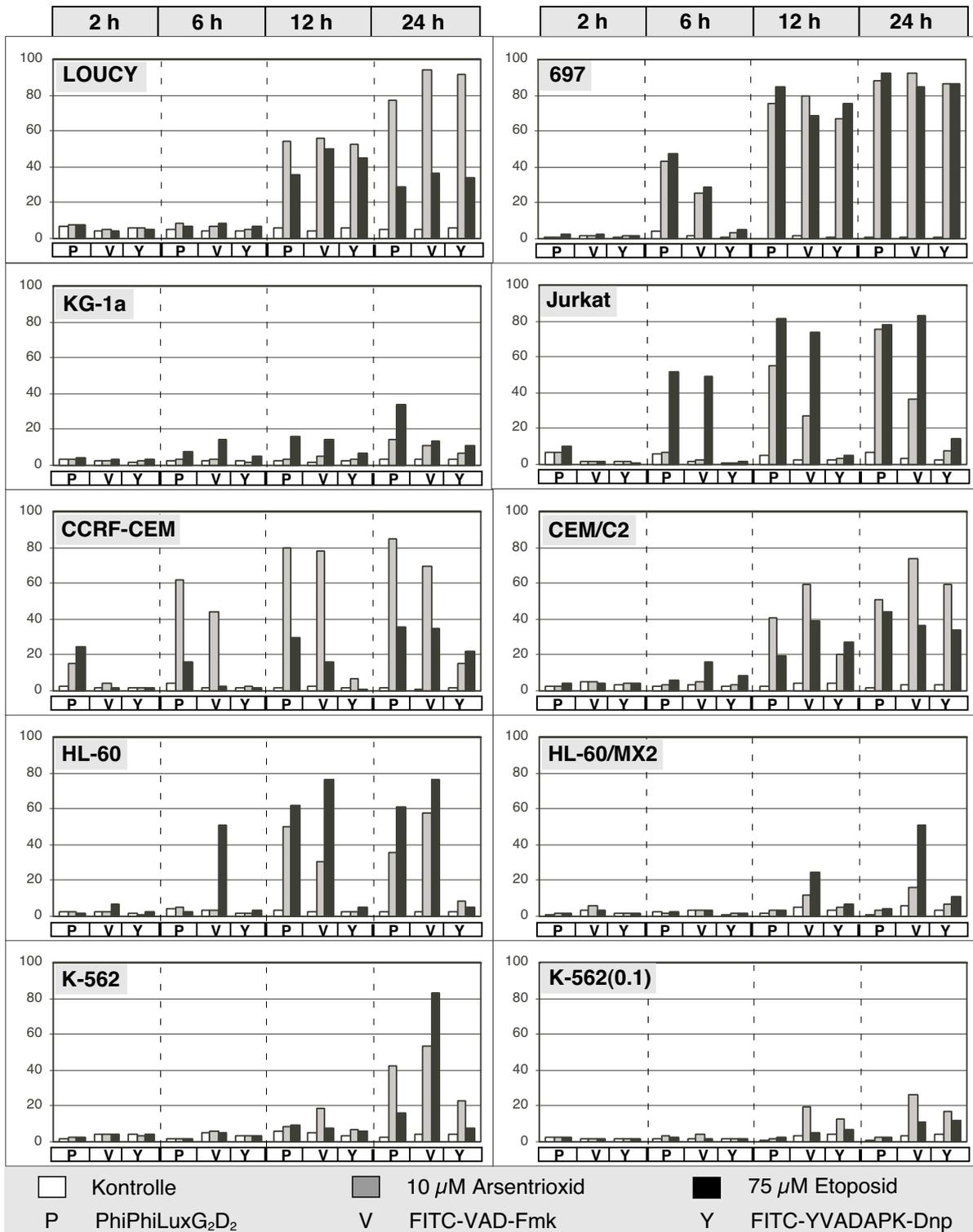
**Abbildung 14 (D): Procaspase-3-, PARP- und D4-GDI-Spaltung nach Induktion mit 10 μM Arsentrioxid bzw. 75 μM Etoposid**

— Kontrolle  
 — 10 μM Arsentrioxid  
 ..... 75 μM Etoposid

In den Zelllinien KG-1a und K-562 sowie deren Doxorubicin-resistenten Derivaten K-562(0.02) und K-562(0.1) konnte selbst nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid keine Caspasen-abhängige Substratspaltung beobachtet werden. Besonders interessant war das Ergebnis bei der Zelllinie LOUCY, welche aus einer Patientin mit multiplen Resistenzen gegen Zytostatika isoliert wurde. Hier wurde Apoptose mit 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid und 75  $\mu\text{M}$  Etoposid induziert. Während Arsentrioxid nach 12-stündiger Inkubation zur Spaltung von Procaspase-3, PARP und D4-GDI führte, war dieser Effekt bei Etoposid auch nach 24-stündiger Behandlung nicht zu beobachten.

### 7.3.2 Die Aktivierung von Caspasen bei der Arsentrioxid-induzierten Apoptose: Spaltung des Caspasen-Substrates PhiPhiLux $G_2D_2$ und Bindung der Caspasen-Inhibitoren FITC-VAD-FMK und FITC-YVADAPK-DNP.

Neben dem indirekten Nachweis der Caspasen-Aktivität mit mono- bzw. polyklonalen Antikörpern gegen D4-GDI- bzw. PARP-Spaltprodukte und dem direkten Nachweis der aktivierten Caspase-3 wurde das Vorhandensein aktivierter Caspasen durch Bindung und Spaltung künstlicher Substrate nachgewiesen. Das Caspase-3-spezifische Substrat PhiPhiLux  $G_2D_2$  (Peptidsequenz GDEVDGI) ist ein nicht fluoreszierender Komplex, der nach Spaltung des Peptids durch Caspase-3 seine Eigenschaften ändert und fluoresziert. Die Fluoreszenz konnte durchflußzytometrisch nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt *Material und Methoden*). Die Bindung der an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelten Caspasen-Substrate bzw. Caspasen-Inhibitoren VAD-FMK und YVADAPK-DNP wurde ebenfalls durchflußzytometrisch bestimmt. FITC-VAD-FMK beinhaltet eine relativ unspezifische Bindungssequenz für eine Vielzahl von Mitgliedern der Caspasen. Daher konnten nahezu alle aktivierten Caspasen an dieses modifizierte Peptid binden. FITC-YVADAPK-DNP enthält eine für die Caspase-1 (und in geringerem Ausmaß für Caspase-4) spezifische Erkennungssequenz. In **Abbildung 15** sind die Ergebnisse der Spaltung von PhiPhiLux  $G_2D_2$  sowie die Bindung von FITC-VAD-FMK und FITC-YVADAPK-DNP nach 2-, 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid für die Zelllinien 697, Jurkat, KG-1a, LOUCY, CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX2, K-562 und K-562(0.1) zusammengefaßt.



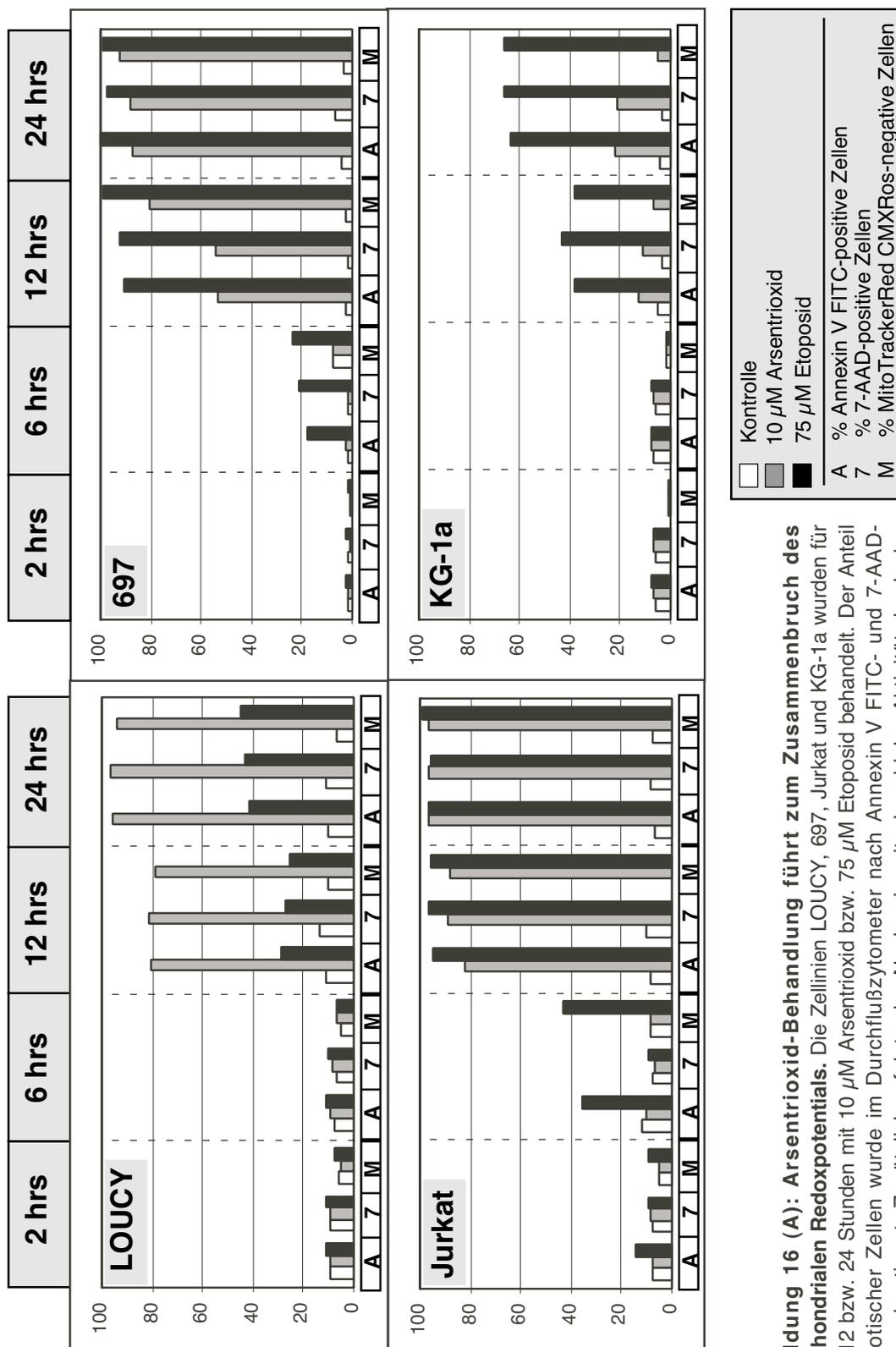
**Abbildung 15: Caspasen-Aktivierung während Arsentrioxid-Behandlung: Spaltung von PhiPhiLuxG<sub>2</sub>D<sub>2</sub> und Bindung der Caspasen-Inhibitoren bzw. Caspasen-Substrate FITC-VAD-Fmk bzw. FITC-YVADAPK-Dnp.** Durchflußzytometrische Bestimmung der Caspasen-Aktivierung durch Spaltung des Caspase-3-spezifischen Substrates PhiPhiLuxG<sub>2</sub>D<sub>2</sub> (P) und Bindung der FITC-markierten Caspasen-Inhibitoren VAD-FMK (V) sowie YVADAPK-Dnp (Y). Der Prozentsatz fluoreszierender Zellen (Abszisse) nach 2-, 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit PBS (weiße Balken), 10 μM Arsentrioxid (graue Balken) bzw. 75 μM Etoposid (schwarze Balken) ist für die Zelllinien LOUCY, 697, KG-1a, Jurkat, CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX2, K-562 sowie K-562(0.1) im Balkendiagramm dargestellt.

In den Zelllinien 697 und CCRF-CEM konnten bereits nach 6 Stunden Inkubation mit Arsentrioxid bzw. Etoposid die Spaltung von PhiPhiLux G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> und die Bindung von FITC-VAD-FMK beobachtet werden. In der Zelllinie Jurkat traten diese Effekte für Etoposid ebenfalls nach 6 Stunden, für Arsentrioxid aber erst nach 12 Stunden auf. Die Zelllinien LOUCY, CEM/C2 und HL-60 reagierten ähnlich wie 697, jedoch ließen sich die Arsentrioxid-induzierten Caspasen-Aktivitäten erst nach 12 Stunden nachweisen, in der Zelllinie K-562 sogar erst nach 24-stündiger Inkubation. Bei den Zytostatika-resistenten Zelllinien HL-60/MX2 und K-562(0.1) war eine Caspasen-Aktivierung durch 10 µM Arsentrioxid auch nach 24-stündiger Inkubation nur in einem geringen Prozentsatz der Zellen nachweisbar.

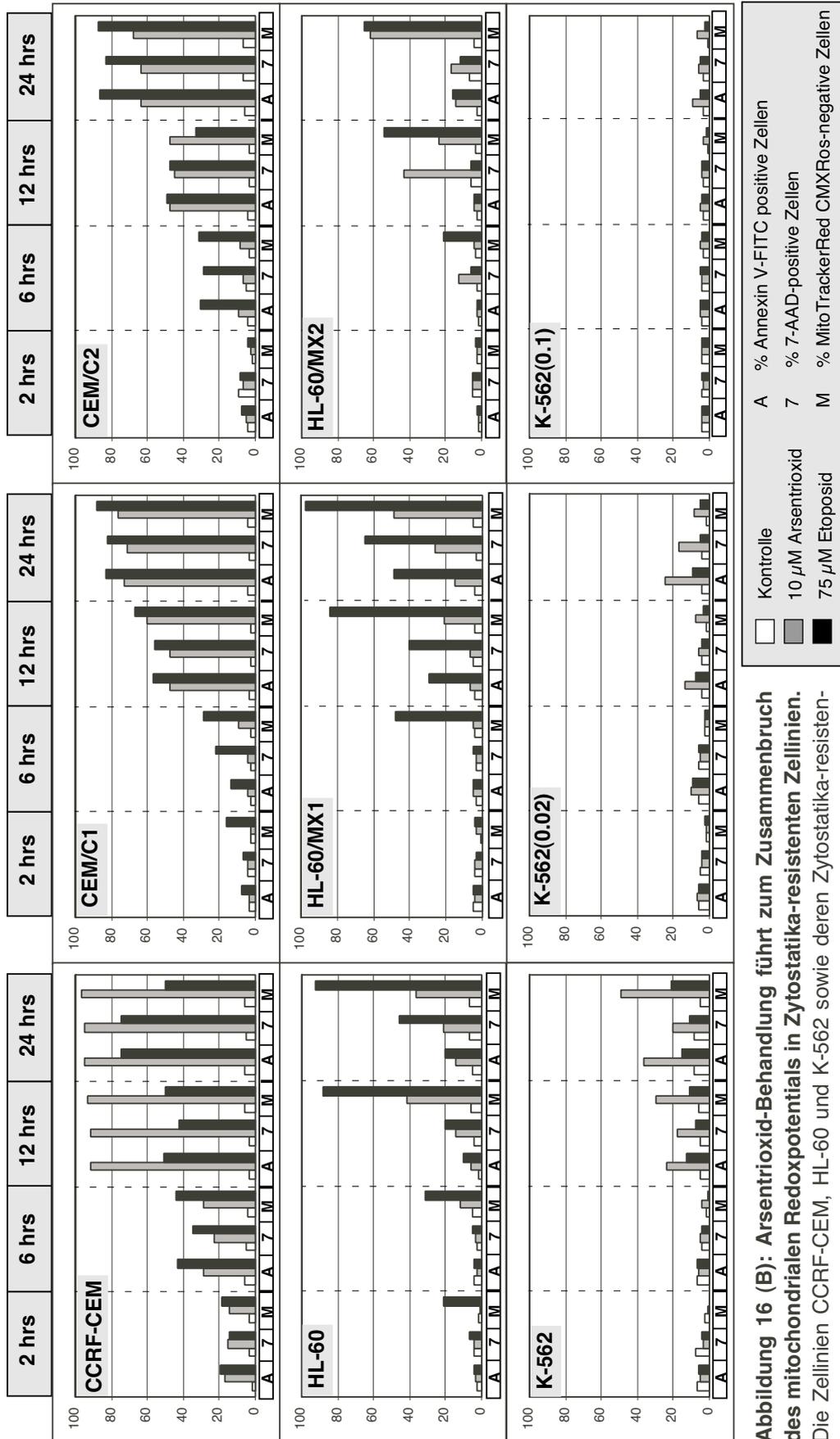
Die unterschiedliche Sensitivität für Arsentrioxid und Etoposid in den verwandten Konzentrationen trat besonders deutlich bei den Zelllinien Jurkat, CEM und HL-60 hervor.

### 7.3.3 *Die Arsentrioxid-Behandlung von Zellen führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Redoxpotentials*

Das Vorhandensein aktiver Mitochondrien ist für den Energiestoffwechsel der Zelle unerlässlich. Die Aktivierung der Caspasen-Kaskade führt i. a. auch zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Redoxpotentials und damit zu einem Verlust der mitochondrialen Funktion. Um nachzuweisen, ob Arsentrioxid einen Einfluß auf die Funktionalität von Mitochondrien besitzt, wurde das Vorhandensein von Mitochondrien ohne intaktes Membranpotential für die Zelllinien LOUCY, 697, Jurkat und KG-1a (**Abbildung 16 (A)**), CEM, HL-60, K-562 sowie für deren Zytostatika-resistente Derivate CEM/C1, CEM/C2, HL-60/MX1, HL-60/MX2, K-562(0.02) und K-562(0.1) (**Abbildung 16 (B)**) nach 2-, 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit PBS (weiße Balken), 10 µM Arsentrioxid (graue Balken) bzw. 75 µM Etoposid (schwarze Balken) durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTrackerRed CMXRos im Durchflußzytometer detektiert. MitoTrackerRed CMXRos ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher passiv in die Zelle gelangt, dort in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential von Mitochondrien aufgenommen wird, mittels der CMX-Gruppe an SH-Gruppen mitochondrialer Proteine binden kann und dadurch in den Mitochondrien zurückgehalten, während noch im Zytoplasma vorhandener Farbstoff in den sich an die Färbung anschließenden Waschschrinen wieder entfernt wird.



**Abbildung 16 (A): Arsentrioxid-Behandlung führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Redoxpotentials.** Die Zelllinien LOUCY, 697, Jurkat und KG-1a wurden für 2, 6, 12 bzw. 24 Stunden mit 10 μM Arsentrioxid bzw. 75 μM Etoposid behandelt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde im Durchflußzytometer nach Annexin V FITC- und 7-AAD-Färbung bestimmt. Zusätzlich erfolgte der Nachweis mitochondrialer Aktivität durch den Mitochondrien-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoTrackerRed CMXRos im Durchflußzytometer. Der Anteil positiver Zellen für Annexin V, 7-AAD sowie negativer Zellen für MitoTracker Red CMXRos ist im Balkendiagramm dargestellt. Jede Messung wurde an 50.000 Zellen durchgeführt.



**Abbildung 16 (B): Arsentrioxid-Behandlung führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Redoxpotentials in Zytostatika-resistenten Zelllinien.** Die Zelllinien CCRIF-CEM, HL-60 und K-562 sowie deren Zytostatika-resistenten Derivate wurden für 2, 6, 12 bzw. 24 Stunden mit 10 μM Arsentrioxid bzw.

75 μM Etoposid behandelt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde im Durchflußzytometer nach Annexin V-FITC- und 7-AAD-Färbung bestimmt. Zusätzlich erfolgte der Nachweis mitochondrialer Aktivität durch den Mitochondrien-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoTrackerRed CMXRos im Durchflußzytometer. Der Anteil positiver Zellen für Annexin V-FITC und 7-AAD sowie negativer Zellen für MitoTracker Red CMXRos ist im Balkendiagramm dargestellt (50.000 Zellen je Messung).

Zellen mit intakten Mitochondrien lassen sich dementsprechend nicht mit dem Farbstoff anfärben.

Parallel zur Färbung mit MitoTrackerRed CMXRos erfolgte die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen durch Annexin V-FITC- und 7-AAD-Färbungen.

Zur einfacheren Interpretation der Ergebnisse wurde in **Abbildung 16** der prozentuale Anteil Annexin V-FITC-positiver (A) und 7-AAD-positiver (7), jedoch MitoTracker-Red CMXRos-negativer (M) Zellen der Gesamtpopulation aufgetragen. Alle drei Färbungen lieferten vergleichbare Ergebnisse. Der Anteil Annexin V-FITC-positiver, 7-AAD-positiver und MitoTrackerRed CMXRos-negativer Zellen war für die jeweils vergleichbaren Ansätze in allen Zelllinien ähnlich. MitoTrackerRed CMXRos-negative Zellen traten in LOUCY, 697, Jurkat, CEM/C1, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2 und K-562-Zellen nach 12-stündiger, in der Zelllinie CCRF-CEM bereits nach 6-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid auf. Zur Beeinflussung der Mitochondrienaktivität in der Zelllinie KG-1a wurde eine 24-stündige Inkubation mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid benötigt, während in den Doxorubicin-resistenten Zelllinien K-562(0.02) und K-562(0.1) selbst nach 24-stündiger Inkubationsdauer keine MitoTrackerRed CMXRos-negativen Zellen nachweisbar waren. Allerdings war in der Zelllinie K-562(0.1) nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid der Anteil Annexin V-FITC- bzw. 7-AAD-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht.

Ein durch 10  $\mu$ M Arsentrioxid verursachter Zusammenbruch der mitochondrialen Aktivität konnte somit in allen Zelllinien (außer K-562(0.1)) nach 24-stündiger Inkubation beobachtet werden.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis des Verlustes der mitochondrialen Integrität bietet die Oxidation der farblosen Verbindung MitoTrackerRed CM-H<sub>2</sub>XRos. Die Abnahme der mitochondrialen Aktivität kann durch die Fähigkeit lebender Zellen bestimmt werden, die Verbindung MitoTrackerRed CM-H<sub>2</sub>XRos in den Fluoreszenzfarbstoff MitoTrackerRed CMXRos zu oxidieren. Der Prozentsatz fluoreszierender Zellen kann dann, wie bereits für MitoTrackerRed CMXRos beschrieben, im Durchflußzytometer nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der MitoTrackerRed CM-H<sub>2</sub>XRos-Untersuchungen für die Zelllinien 697, CEM, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX2, Jurkat, K-562, K-562(0.1), KG-1a und

LOUCY sind in **Abbildung 17** dargestellt. Sie unterschieden sich nicht signifikant von den Ergebnissen der MitoTrackerRed CMXRos-Färbungen. Eine Regressionsanalyse der Ergebnisse ergab einen Wert von  $r^2 = 0,889$  bei  $P < 0,0001^9$ .

#### 7.3.4 Die Arsentrioxid-Behandlung von Zellen führt zur Bildung von ROS (reactive oxygen species)

Die Färbungen der oben beschriebenen Zelllinien mit dem vom Mitochondrienpotential abhängigen Farbstoff MitoTrackerRed CMXRos belegten eindeutig einen hemmenden Einfluß von Arsentrioxid auf die Funktionalität von Mitochondrien. Da es in Anwesenheit bestimmter Zytostatika (z. B. Doxorubicin) zur Bildung von *reactive oxygen species* (ROS) nach einer Schädigung der mitochondrialen Integrität kommt, wurde die Bildung von ROS nach Arsentrioxid-Behandlung bei den Zelllinien LOUCY, CCRF-CEM, HL-60, Jurkat, KG-1a und K-562 bestimmt (**Abbildung 18**). ROS verkörpern sehr kurzlebige Formen von Molekülen; daher wurden unterschiedliche Inkubationszeiten sowohl für Arsentrioxid als auch für das ROS-Nachweisreagenz Dihydroethidium (DHE) gewählt. Die Inkubationszeiten für Arsentrioxid und DHE sind der Legende zur **Abbildung 18** zu entnehmen.

DHE ist eine licht- und sauerstoffempfindliche Substanz, welche durch ROS in das Ethidium oxidiert wird (Bredius, 1993; Cinco, 1994; Perticarari, 1994; Van Amersfoort, 1994). Ethidium weist nach Interkalierung in DNA eine sehr intensive rote Fluoreszenz auf (Bucana, 1986; Perticarari, 1994). In durchflußzytometrischen Analysen kann diese Fluoreszenz nachgewiesen werden.

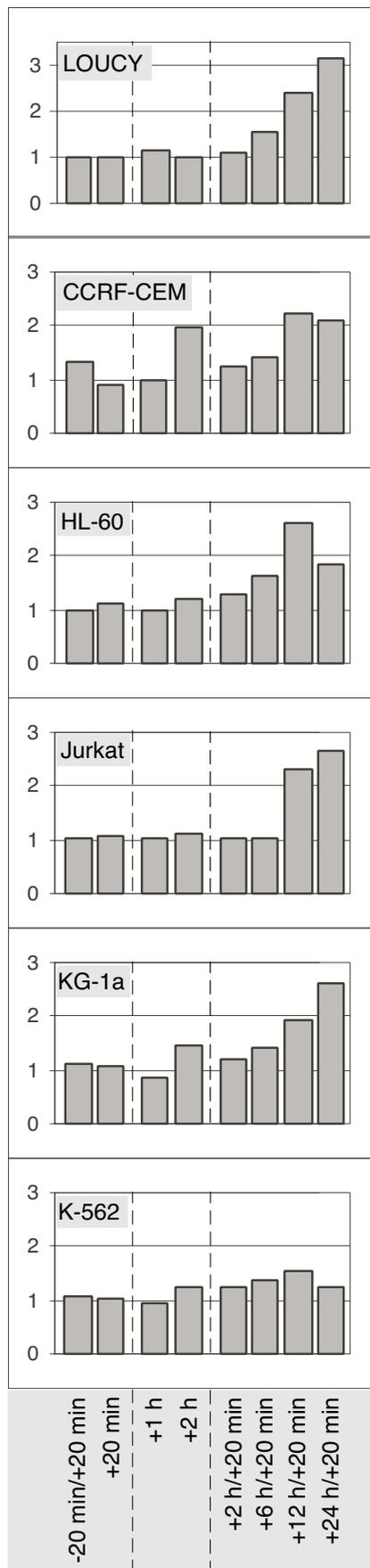
Da die Zunahme der Fluoreszenzintensität Ethidium-positiver Zellen im Vergleich zur Eigenfluoreszenz DHE-behandelter Zellen nur sehr gering war, zeigt **Abbildung 18** einen *Induktionsfaktor* für ROS. Dieser *Induktionsfaktor* berechnete sich als Quotient aus den mittleren Fluoreszenzkanälen der mit DHE-gefärbten Arsentrioxid-behandelten und unbehandelten Proben. Aus **Abbildung 18** wird ersichtlich, daß es nach Arsentrioxid-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen bereits nach zweistündiger Inkubation (+2) zur erhöhten Bildung von ROS kam.

---

<sup>9</sup> Für die lineare Regression ergab sich die Gleichung: % MitoTrackerRed CMXRos-positive Zellen =  $4,977 + 0,909 \times$  % MitoTrackerRed CM-H2XRos-positive Zellen.

**Abbildung 17: Arsentrioxid-Behandlung führt zum Zusammenbruch der mitochondrialen Integrität.** Die Zelllinien LOUCY, 697, Jurkat, KG-1a, CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX2, K-562 und K-562(0.1) wurden für 2, 6, 12 bzw. 24 Stunden mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid bzw. 75  $\mu$ M Etoposid behandelt. Die Abnahme der mitochondrialen Aktivität in den jeweiligen Ansätzen wurde durch die Fähigkeit der Zellen gemessen, die Verbindung MitoTrackerRed CM-H<sub>2</sub>XRos in den Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red CMXRos zu oxidieren, welcher im Durchflußzytometer nachgewiesen werden konnte. Eine Oxidation des Farbstoffes war nur in Zellen mit funktionellen Mitochondrien möglich. Der Anteil negativer Zellen für MitoTrackerRed CMXRos ist im Balkendiagramm dargestellt. Die dargestellten Daten basieren auf den Messungen der Fluoreszenzintensitäten von 50.000 Zellen.





**Abbildung 18: Bildung von ROS (radical oxygen species) nach Arsentrioxid-Behandlung verschiedener Zelllinien.** Die Zelllinien LOUCY, CCRF-CEM, HL-60, Jurkat, KG-1a und K-562 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Bildung von ROS nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid untersucht. Der Nachweis von ROS erfolgte im Durchflußzytometer nach Färbung der Zellen mit dem Farbstoff Dihydroethidium (DHE, 5  $\mu$ M). Die Zellen wurden entweder für 20 Minuten mit DHE vor der Arsentrioxid-Behandlung (-20/+20), für 20 Minuten (+20 Minuten), 1 Stunde (+1 Stunde) oder 2 Stunden (+2 Stunden) zusammen mit Arsentrioxid inkubiert oder nach 2-, 6-, 12- bzw. 24-stündiger Arsentrioxid-Behandlung für 20 Minuten mit DHE gefärbt (+2h/+20min, +6h/+20min, +12h/+20min bzw. +24h/+20min). Dargestellt sind die Induktionsfaktoren der reactive oxygen species, beschrieben als Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensitäten von Arsentrioxid-behandelten Proben und den zugehörigen Kontrollansätzen. Jede Messung wurde an 25.000 Zellen durchgeführt, falls die vorhandene Zellzahl dies zuließ.

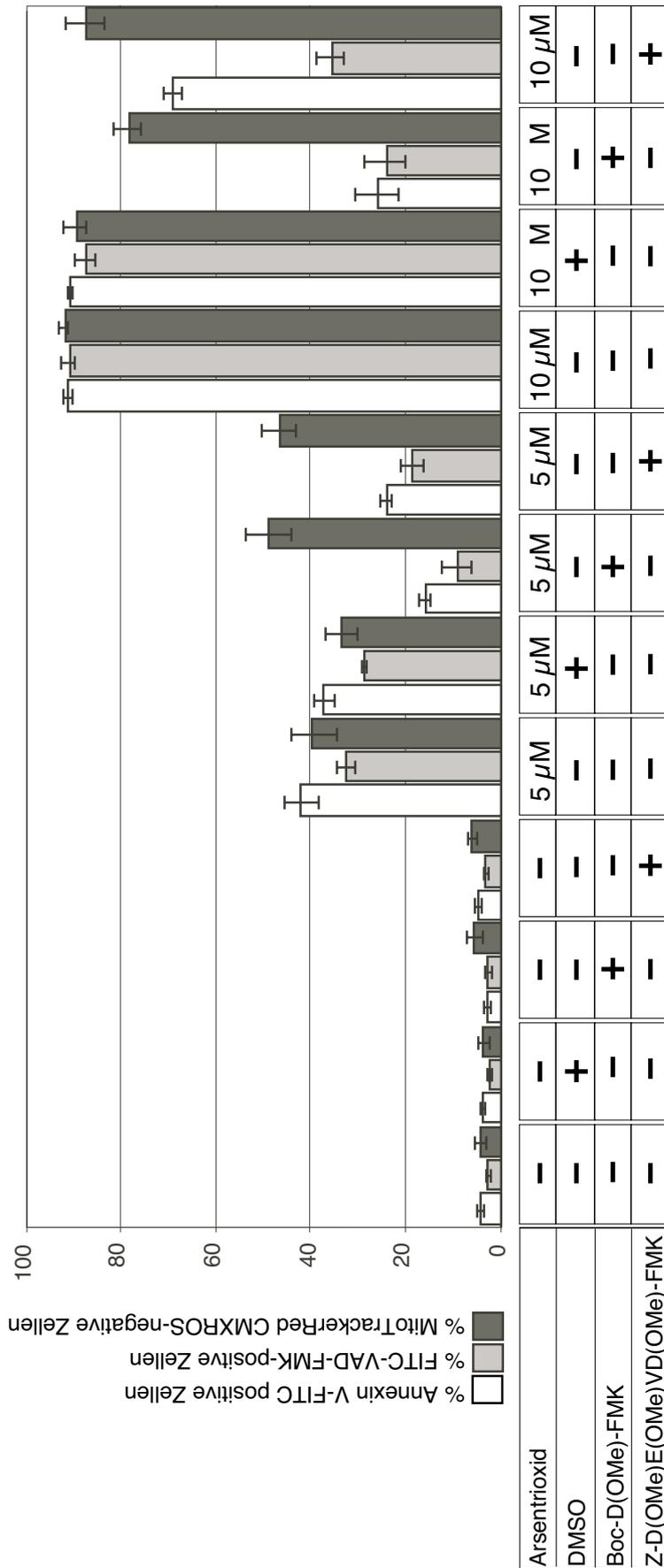
In LOUCY- und KG-1a-Zellen konnten erhöhte Werte für ROS nach 24-stündiger, in HL-60- und Jurkat-Zellen bereits nach 12-stündiger Inkubation mit Arsentrioxid gemessen werden. In K-562-Zellen blieb der ROS-Gehalt von Kontrollen und Arsen(III)-behandelten Ansätzen nahezu konstant. Mehrere Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse aus jeweils einer Messung.

### 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.*

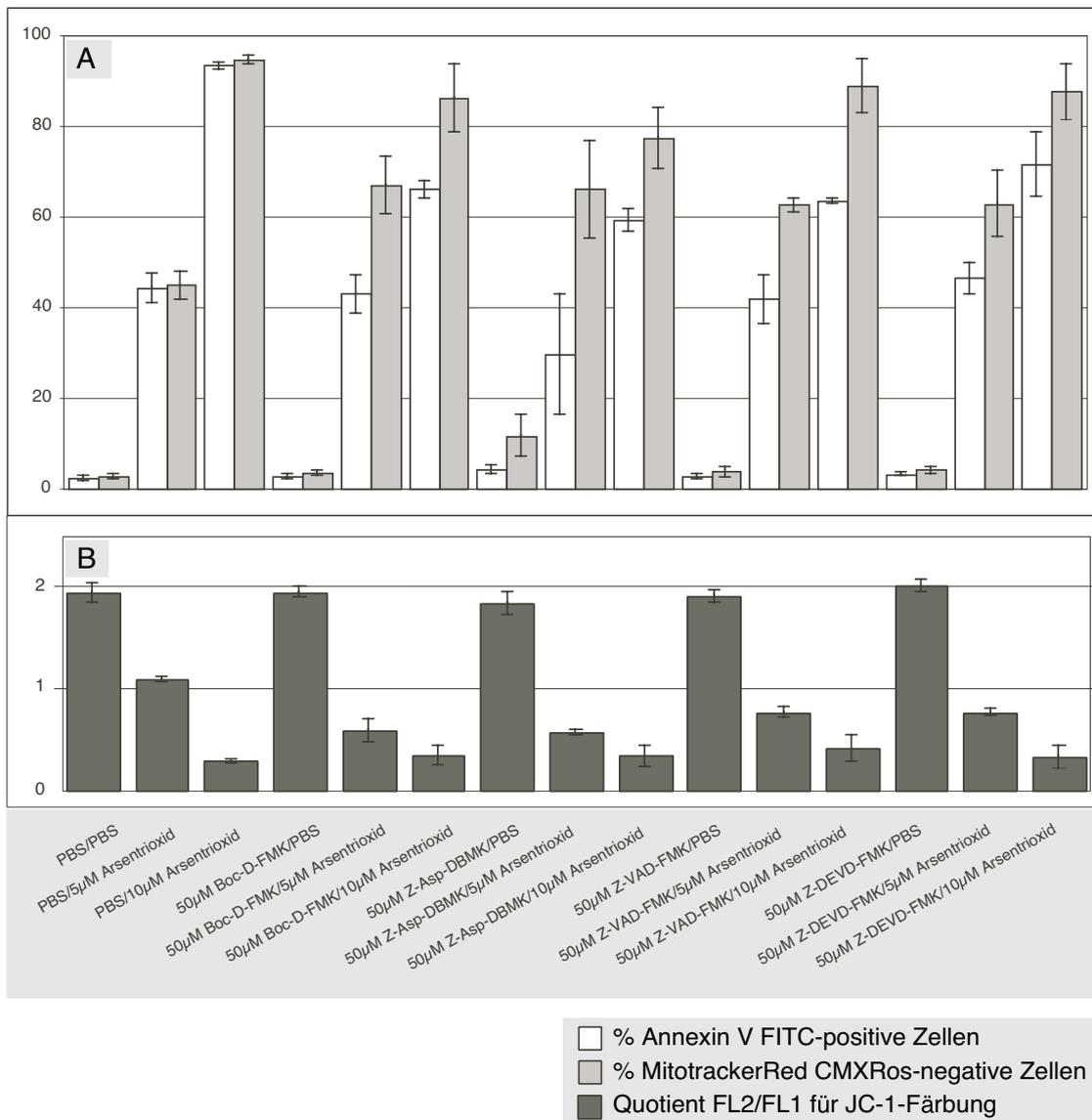
Die Bedeutung der Caspasen-Aktivierung bei der Arsentrioxid-induzierten Apoptose sollte durch die Verwendung Caspasen-spezifischer Inhibitoren geklärt werden. Hierzu wurden CCRF-CEM- bzw. Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Caspasen-Inhibitoren behandelt und anschließend zur Apoptose-Induktion mit Arsentrioxid inkubiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen für CCRF-CEM-Zellen sind in **Abbildung 19** und **Abbildung 20**, für die Zelllinie Jurkat in **Abbildung 21** und **Abbildung 22** zusammengefaßt.

Die Aminosäurederivate Boc-D(OMe)-FMK und Z-Asp-2,6-DBMK bzw. die modifizierten Peptide Z-VAD-FMK und Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK fanden dabei als Caspasen-Inhibitoren Verwendung. Bei den Aminosäurederivaten sowie Z-VAD-FMK handelt es sich um Pan-Caspasen-Inhibitoren, welche eine irreversible Inhibition aller bekannter Caspasen ermöglichten. Das Peptidderivat Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)FMK stellt einen Inhibitor für bestimmte Caspasen-Subpopulationen dar und ist ein irreversibler Inhibitor für die Enzyme Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7, Caspase-8 und Caspase-10. Die höchste Affinität besitzt der Inhibitor jedoch zum aktiven Zentrum der Caspase-3.

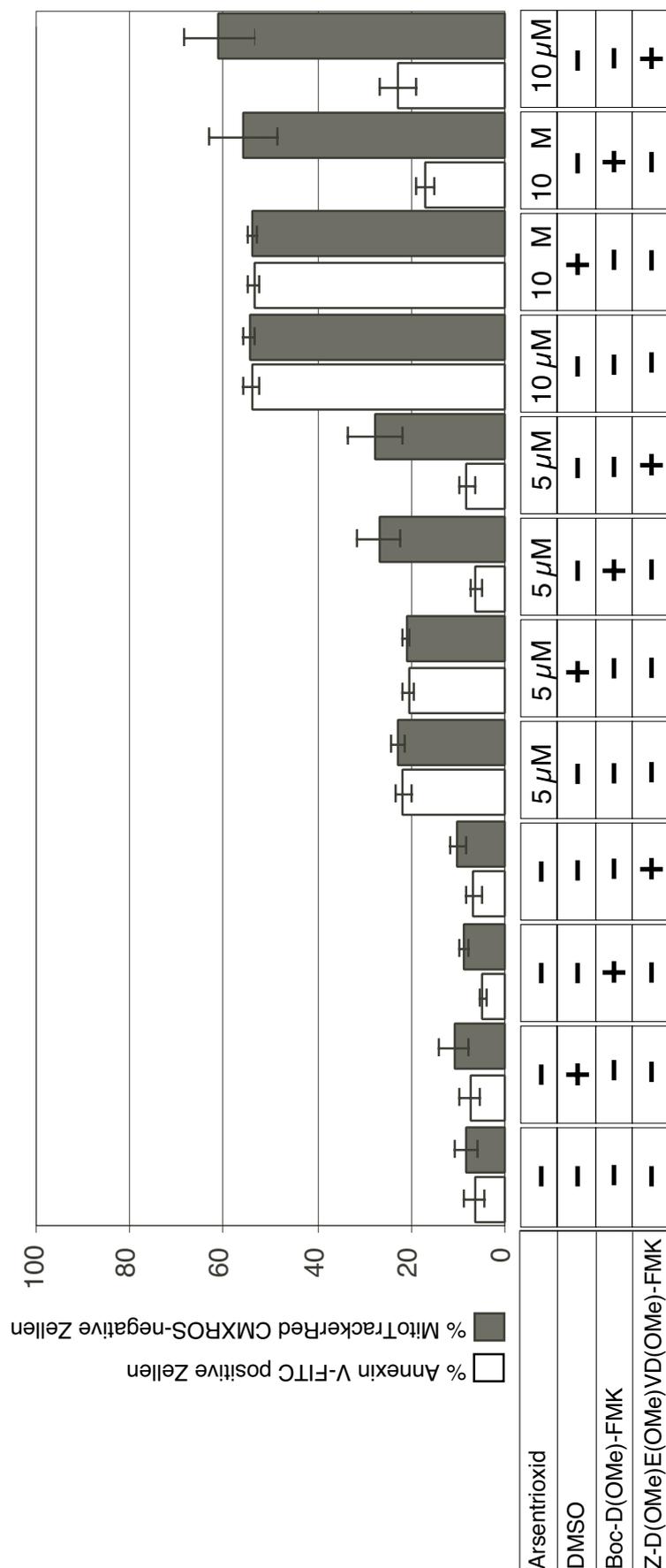
Nach einer einstündigen Vorinkubation mit den jeweiligen Caspasen-Inhibitoren erfolgte in den Ansätzen mit CCRF-CEM-Zellen eine 12-stündige, in den Ansätzen mit Jurkat-Zellen eine 24-stündige Behandlung mit PBS bzw. 5  $\mu$ M sowie 10  $\mu$ M Arsentrioxid.



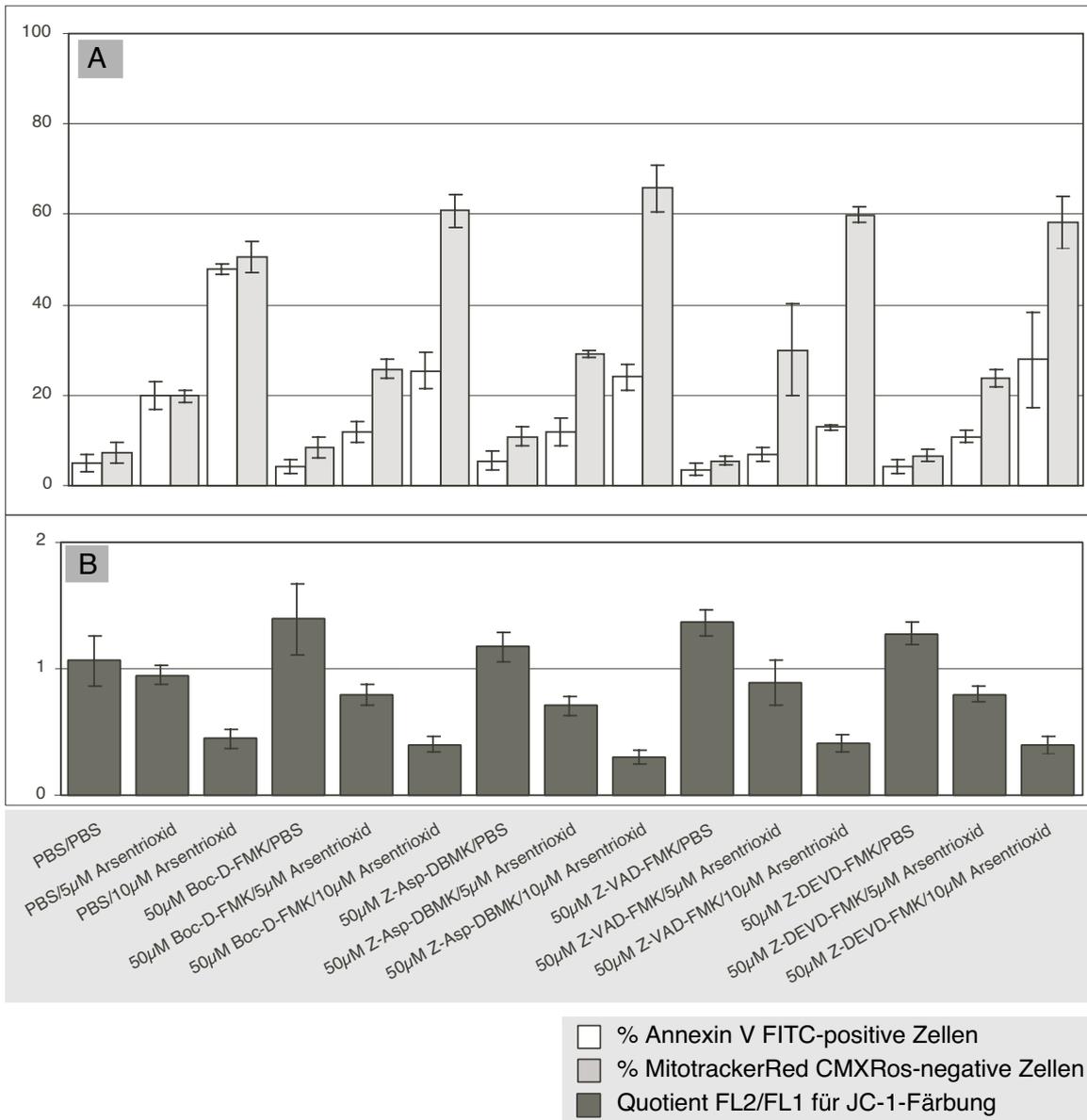
**Abbildung 19: Caspasen-Inhibitoren verhindern die durch Annexin V-FITC-Bindung nachweisbare Arsentrioxid-vermittelte Apoptose-Induktion in CCRF-CEM-Zellen, nicht jedoch die Hemmung der mitochondrialen Aktivität.** Nach einstündiger Vorinkubation mit den Caspasen-Inhibitoren Boc-D(OMe)-FMK bzw. Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK wurden CCRF-CEM-Zellen für 12 Stunden mit 5 μM bzw. 10 μM Arsentrioxid bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln (DMSO bzw. PBS) behandelt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen des Prozentsatzes Annexin V-FITC positiver (weiß), FITC-VAD-FMK-positiver (hellgrau) bzw. MitoTrackerRed CMXRos negativer (dunkelgrau) Zellen von 6 unabhängigen Experimenten für MitoTrackerRed CMXRos bzw. 3 unabhängigen Experimenten für Annexin V-FITC und FITC-VAD-FMK. Die Zellzahl betrug 50.000 bei den Annexin V-FITC- und bei 3 der 6 MitoTrackerRed CMXRos-Messungen, 25.000 bei den restlichen Messungen.



**Abbildung 20: Caspasen-Inhibitoren verhindern die durch Annexin V-Bindung nachweisbare Arsentrioxid-vermittelte Apoptose-Induktion, nicht jedoch den Zusammenbruch der mitochondrialen Aktivität.** Nach einstündiger Vorinkubation mit den Caspasen-Inhibitoren Boc-D(OMe)-FMK, Z-Asp-2,6-DBMK, Z-VAD-FMK bzw. Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK wurden CCRF-CEM-Zellen für 12 Stunden mit 5 µM und 10 µM Arsentrioxid behandelt. Schaubild (A) zeigt den Prozentsatz Annexin V-FITC positiver und MitoTrackerRed CMXRos-negativer Zellen. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 nachgewiesenen Effekte auf das mitochondriale Redoxpotential sind dem Schaubild (B) zu entnehmen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 3 unabhängigen Experimenten, bei denen die Fluoreszenzintensitäten von jeweils 25.000 Zellen je Messung ermittelt wurden. Die Abszisse in (A) stellt den Prozentsatz der jeweils Annexin V-FITC bzw. der MitoTrackerRed CMXRos-negativen Zellen dar, in (B) den Quotienten aus den mittleren Fluoreszenzkanälen der Fluoreszenzen FL-2 und FL-1.



**Abbildung 21: Caspasen-Inhibitoren verhindern die durch Annexin V-FITC-Bindung nachweisbare Arsentrioxid-vermittelte Apoptose-Induktion in Jurkat-Zellen, nicht jedoch die Hemmung der mitochondrialen Aktivität.** Nach einstündiger Vorinkubation mit den Caspasen-Inhibitoren Boc-D(OMe)-FMK bzw. Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK wurden Jurkat-Zellen für 24 Stunden mit 5 μM bzw. 10 μM Arsentrioxid bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln (DMSO bzw. PBS) behandelt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen des Prozentsatzes Annexin V-FITC positiver (weiß) bzw. MitoTrackerRed CMXRos-negativer (dunkelgrau) Zellen von je 3 unabhängigen Experimenten, bei denen die gemessene Zellzahl 25.000, und von je 3 unabhängigen Experimenten, bei denen die gemessene Zellzahl je Ansatz 50.000 betrug.



**Abbildung 22: Caspasen-Inhibitoren verhindern die durch Annexin V-Bindung nachweisbare Arsenitrioxid-vermittelte Apoptose-Induktion, nicht jedoch den Zusammenbruch der mitochondrialen Aktivität.** Nach einstündiger Vorinkubation mit den Caspasen-Inhibitoren Boc-D(Ome)-FMK, Z-Asp-2,6-DBMK, Z-VAD-FMK bzw. Z-D(Ome)-E(Ome)-VD(Ome)-FMK wurden Jurkat-Zellen für 24 Stunden mit 5 µM und 10 µM Arsenitrioxid behandelt. Schaubild (A) zeigt den Prozentsatz Annexin V-FITC-positiver und MitoTrackerRed CMXRos-negativer Zellen. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 nachgewiesenen Effekte auf das mitochondriale Redoxpotential sind dem Schaubild (B) zu entnehmen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 3 unabhängigen Experimenten, bei denen die Fluoreszenzintensitäten von jeweils 25.000 Zellen je Messung ermittelt wurde. Die Abszisse in (A) stellt den Prozentsatz der jeweils Annexin V-FITC-positiven bzw. der MitoTrackerRed CMXRos-negativen Zellen dar, in (B) den Quotienten aus den mittleren Fluoreszenzkanälen der Fluoreszenzen FL-2 und FL-1.

Nach der 13-stündigen (für CCRF-CEM) bzw. 25-stündigen (für Jurkat) Gesamt-Inkubationszeit lieferte die durchflußzytometrische Auswertung von Doppelmarkierungen mit Annexin V-FITC und MitoTrackerRed CMXRos Aufschluß über den Anteil apoptotischer Zellen und den jeweiligen Prozentsatz an Zellen mit inaktiven Mitochondrien in den einzelnen Versuchsansätzen (**Abbildung 19** bis **Abbildung 22**). Die Bestimmung einer noch vorhandenen Rest-Caspasen-Aktivität erfolgte bei der Zelllinie CCRF-CEM durch Bindung des Caspasen-Substrats FITC-VAD-FMK im Durchflußzytometer (**Abbildung 19**). Mit dem fluoreszierenden Substrat/Inhibitor FITC-VAD-FMK konnten nur solche Zellen angefärbt werden, welche noch durch die jeweils verwandten Caspasen-Inhibitoren nicht abgesättigte, aktive Caspasen beinhalteten. Der direkte Nachweis des Zusammenbruchs des mitochondrialen Redoxpotentials war durch Färbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 möglich (Gorman, 1997; Mancini, 1997; Salvioli, 1997) (**Abbildung 20 (B)** und **Abbildung 22 (B)**). Bei der Substanz JC-1 handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher in Abhängigkeit vom mitochondrialen Redoxpotential in die Mitochondrien aufgenommen wird (Chen, 1993). Wird JC-1 in geringen Konzentrationen eingesetzt<sup>10</sup>, so liegt der Farbstoff bei geringem Membranpotential als grün fluoreszierendes Monomer vor und bildet bei erhöhtem Membranpotential sogenannte J-Aggregate, welche eine orangefarbene Fluoreszenz besitzen<sup>11</sup>. Die Bildung dieser J-Aggregate steht in direkter Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential (Cossarizza, 1993). Die Quotienten der mittleren grünen und orangefarbenen Fluoreszenzintensitäten von JC-1-Monomeren und JC-1-J-Aggregaten wurden für die Zelllinien CCRF-CEM (**Abbildung 20 (B)**) und Jurkat (**Abbildung 22 (B)**) dem Anteil Annexin V-FITC-positiver bzw. MitoTrackerRed-CMXRos-negativer Zellen gegenübergestellt (**Abbildungen 20 (A)** und **22 (A)**).

Es zeigte sich für beide Zelllinien, daß die Caspasen-Inhibitoren in den eingesetzten Konzentrationen *per se* keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen oder auf die Funktion bzw. das Redoxpotential der Mitochondrien hatten.

Für die Zelllinie CCRF-CEM (**Abbildung 19**) stieg der Anteil Annexin V-FITC- bzw. FITC-VAD-FMK-positiver und MitoTrackerRed CMXRos-negativer Zellen nach

---

<sup>10</sup> Dies gilt für wäßrige Lösungen mit einer Endkonzentration unter 100 nM.

<sup>11</sup> Die Bestimmung der Zunahme bzw. Abnahme der grünen und orangenen Fluoreszenzintensitäten konnte im Kanal FL-1 und FL-2 des Durchflußzytometers erfolgen, vgl. Kapitel *Methoden*.

Behandlung mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid auf ca. 30% - 40%<sup>12</sup> bzw. nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid auf ca. 90%<sup>13</sup> an. Eine Vorinkubation der Zellen mit DMSO, dem Lösungsmittel der Caspasen-Inhibitoren, hatte keinen signifikanten Einfluß<sup>14</sup>. Der Anteil Annexin V-FITC bzw. FITC-VAD-FMK-positiver, mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid behandelte Zellen sank jedoch im Fall der Vorbehandlung mit dem Inhibitor Boc-D(OMe)-FMK auf 15,85%  $\pm$  1,30%<sup>15</sup> bzw. 8,94%  $\pm$  3,22%<sup>16</sup>, im Fall der Vorbehandlung mit dem Inhibitor Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK auf 23,76%  $\pm$  1,15%<sup>17</sup> bzw. 18,39%  $\pm$  2,61%<sup>18</sup>. Der durch die Inhibitoren erzielte Rückgang des Anteils Annexin V-FITC- bzw. FITC-VAD-FMK-positiver Zellen war im Fall der Apoptose-Induktion mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid noch deutlicher ausgeprägt. Eine Reduktion des Anteils Annexin V-FITC- bzw. FITC-VAD-FMK-positiver Zellen um ca. 65%<sup>19</sup> wurde durch die einstündige Inkubation mit Boc-D(OMe)-FMK erzielt. Im Fall des Inhibitors Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK divergierten die Ergebnisse für die Annexin V-FITC und die FITC-VAD-FMK-Färbungen. Während der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen nur um knapp 20% auf ca. 70% (68,84%  $\pm$  1,77%;  $p = 0,0040$ ) zurückging, sank der Anteil FITC-VAD-FMK-positiver Zellen um mehr als 54% auf ca. 36% (35,63%  $\pm$  3,02%;  $p = 0,0039$ ).

Überraschend war jedoch das Ergebnis der MitoTrackerRed CMXRos-Färbungen. Im Gegensatz zu den Färbungen mit Annexin V-FITC konnte durch einstündige Vorinkubation mit dem Caspasen-Inhibitor Boc-D(OMe)-FMK bzw. Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK nach der mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid induzierten Apoptose der

<sup>12</sup> 42,07%  $\pm$  3,56% ( $p = 0,063$ ) für Annexin V-FITC-positiv, 32,76%  $\pm$  2,12% ( $p = 0,0045$ ) für FITC-VAD-FMK-positiv bzw. 39,60%  $\pm$  4,68% ( $p < 0,0001$ ) für MitoTrackerRed CMXRos-negative Zellen.

<sup>13</sup> 91,21%  $\pm$  1,01% ( $p = 0,0002$ ) für Annexin V-FITC-positiv, 90,86%  $\pm$  1,39% ( $p = 0,0003$ ) für FITC-VAD-FMK-positiv bzw. 91,84%  $\pm$  1,08 ( $p < 0,0001$ ) für MitoTrackerRed CMXRos-negative Zellen.

<sup>14</sup> 3,89%  $\pm$  0,61% ( $p = 0,8343$ ) für Annexin V-FITC-positiv, 2,41%  $\pm$  0,06% ( $p = 0,3879$ ) für FITC-VAD-FMK-positiv bzw. 3,76%  $\pm$  1,02% ( $p = 0,2342$ ) für MitoTrackerRed CMXRos-negative Zellen.

<sup>15</sup> Bei einem Vergleich mit Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,0009$ ; bei einem Vergleich mit unbehandelten Kontrollansätzen:  $p = 0,0067$ .

<sup>16</sup> Bei einem Vergleich mit Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,0153$ ; bei einem Vergleich mit unbehandelten Kontrollansätzen:  $p = 0,1037$ .

<sup>17</sup> Bei einem Vergleich mit Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,0031$ ; bei einem Vergleich mit unbehandelten Kontrollansätzen:  $p = 0,0036$ .

<sup>18</sup> Bei einem Vergleich mit Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,0005$ ; bei einem Vergleich mit unbehandelten Kontrollansätzen:  $p = 0,0128$

<sup>19</sup> Reduktion des Anteils Annexin V-FITC-positiver Zellen auf 25,79%  $\pm$  4,43% (bei einem Vergleich mit Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,0023$ ; bei einem Vergleich mit unbehandelten Kontrollansätzen:  $p = 0,0152$ ), des Anteils FITC-VAD-FMK-positiver Zellen auf 24,03%  $\pm$  4,21% (bei einem Vergleich mit Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,0015$ ; bei einem Vergleich mit unbehandelten Kontrollansätzen:  $p = 0,0187$ ).

Anteil MitoTrackerRed CMXRos-negativer Zellen nicht reduziert werden<sup>20</sup>, und nach der mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid induzierten Apoptose erfolgte lediglich eine Reduktion um ca. 10%<sup>21</sup>.

Wie aus **Abbildung 20 (A)** hervorgeht, zeigte sich dieses Phänomen auch bei der durch 10  $\mu$ M Arsentrioxid induzierten Apoptose-Induktion nach Vorinkubation mit anderen Caspasen-Inhibitoren wie beispielsweise Z-Asp-DBMK und Z-VAD-FMK. Interessanterweise trat auch keine Änderung des FL2/FL1-Quotienten beim Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials durch JC-1 auf (**Abbildung 20 (B)**), was auf ein intaktes Mitochondrienpotential schließen ließ. Es muß jedoch angemerkt werden, daß im Fall der **Abbildung 20** der durch Caspasen-Inhibitoren vermittelte Rückgang Annexin V-FITC-positiver Zellen i. a. geringer war als bei der Versuchsreihe, welche in **Abbildung 19** dargestellt wurde.

Für die Zelllinie Jurkat ergab die Vorinkubation mit Caspasen-Inhibitoren ein ähnliches Muster. Der durch 24-stündige Behandlung mit 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Arsentrioxid induzierte Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen betrug 21,65%  $\pm$  1,51% ( $p < 0,0001$ ) bzw. 64,09%  $\pm$  1,51% ( $p < 0,0001$ ) der Gesamtpopulation. Das Lösungsmittel der Caspasen-Inhibitoren (DMSO) zeigte keinen Effekt auf die Viabilität der Zellen<sup>22</sup>. Der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen sank jedoch nach einstündiger Vorinkubation mit Boc-D(OMe)-FMK bzw. Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK auf unter 9%<sup>23</sup> bei Behandlung mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid und auf ca. 20%<sup>24</sup> bei Behandlung mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid. Der Anteil MitoTrackerRed-CMXRos-negativer Zellen zeigte diese Verminderung nicht. Der Anteil MitoTrackerRed CMXRos-negativer Zellen nach 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Arsentrioxid-Behandlung betrug 23%<sup>25</sup> bzw. 54%<sup>26</sup> und blieb nach Vorinkubation mit Boc-

<sup>20</sup> 16,97%  $\pm$  2,02%; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle:  $p = 0,0005$  bzw. 22,70%  $\pm$  3,76%; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle:  $p = 0,0006$ .

<sup>21</sup> DMSO-Kontrolle: 3,76%  $\pm$  1,02; 5  $\mu$ M Arsentrioxid: 39,60%  $\pm$  4,86% (bei einem Vergleich mit DMSO-Kontrolle:  $p < 0,0001$ ); 10  $\mu$ M Arsentrioxid: 91,84%  $\pm$  1,08% (bei einem Vergleich mit DMSO-Kontrolle:  $p < 0,0002$ ); 50  $\mu$ M Boc-D(OMe)-FMK + 5  $\mu$ M Arsentrioxid: 48,68%  $\pm$  4,99% (bei einem Vergleich mit DMSO-Kontrolle:  $p < 0,05$ ); 50  $\mu$ M Boc-D(OMe)-FMK + 10  $\mu$ M Arsentrioxid: 78,26%  $\pm$  2,88% (bei einem Vergleich mit DMSO-Kontrolle:  $P < 0,0001$ ); 50  $\mu$ M Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK + 5  $\mu$ M Arsentrioxid: 46,38%  $\pm$  3,63% (bei einem Vergleich mit DMSO-Kontrolle:  $p = 0,0007$ ); 50  $\mu$ M Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK + 10  $\mu$ M Arsentrioxid: 87,42%  $\pm$  4,02% (bei einem Vergleich mit DMSO-Kontrolle:  $p = 0,0652$ ).

<sup>22</sup> 7,38%  $\pm$  2,16% im Vergleich zu 6,47%  $\pm$  2,17% bei der Kontrolle ( $p = 0,1283$ ).

<sup>23</sup> 6,15%  $\pm$  1,31%; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle:  $p = 0,4201$  bzw. 8,14%  $\pm$  1,31%; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle:  $p = 0,5926$ .

<sup>24</sup> 16,97%  $\pm$  2,02%; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle:  $p = 0,0005$  bzw. 22,70%  $\pm$  3,76%; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle:  $p = 0,0006$ .

<sup>25</sup> 22,96%  $\pm$  1,41%; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle:  $p < 0,0001$ .

D(OMe)-FMK mit 27%<sup>27</sup> bzw. 56%<sup>28</sup>, nach Vorinkubation mit Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK mit ca. 28%<sup>29</sup> bzw. 61%<sup>30</sup> nahezu unverändert.

Die in **Abbildung 22** präsentierten Ergebnisse bestätigen nochmals die in **Abbildung 21** gezeigten, mehrfach durchgeführten Versuche. Zusätzlich wurden in diesem Experiment weitere Caspasen-Inhibitoren mit unterschiedlichen Caspasen-Spezifitäten eingesetzt: Z-Asp-DBMK, Z-VAD-FMK. Der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen sank durch Vorinkubation mit Boc-D(OMe)-FMK, Z-Asp-DBMK, Z-VAD-FMK bzw. Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK und anschließende Behandlung mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid von ca. 20% auf jeweils ca. 7% - 12%<sup>31</sup> und bei Inkubation mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid von ca. 50% auf ca. 13% - 28%<sup>32</sup>. Der Anteil MitoTrackerRed CMXRos-negativer Zellen blieb jedoch in allen Fällen bei 5  $\mu$ M Arsentrioxid-Behandlung deutlich über 22%<sup>33</sup>, nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid zwischen 58% und 66%<sup>34</sup>.

Die Daten der **Abbildung 22 (B)** belegen ebenfalls, daß der durch Arsentrioxid induzierte Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials durch die Caspasen-Inhibitoren Boc-D(OMe)-FMK, Z-Asp-DBMK, Z-VAD-FMK bzw. Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK nicht verhindert werden kann. Dies wird beim Vergleich der Quotienten FL2/FL1 deutlich. Es besteht kein signifikanter Unterschied der Quotienten bei den Ansätzen mit bzw. ohne Caspasen-Inhibitoren.

Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, daß Caspasen-Inhibitoren zwar den Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen nach Arsentrioxid-Behandlung reduzierten,

---

<sup>26</sup> 54,45%  $\pm$  1,20%; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle:  $p < 0,0001$ .

<sup>27</sup> 26,91%  $\pm$  4,44%; im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,0415$ .

<sup>28</sup> 55,75%  $\pm$  7,26%; im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,5909$ .

<sup>29</sup> 27,66%  $\pm$  5,86%; im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,0636$ .

<sup>30</sup> 60,93%  $\pm$  7,53%; im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor:  $p = 0,1029$ .

<sup>31</sup> Von 19,85%  $\pm$  2,99% auf 11,91%  $\pm$  2,22% für Boc-D(OMe)-FMK ( $p = 0,1318$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle), auf 11,76%  $\pm$  3,09% für Z-Asp-DBMK ( $p = 0,1814$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle), auf 6,91%  $\pm$  1,45% für Z-VAD-FMK ( $p = 0,3825$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) und auf 10,82%  $\pm$  1,27% für Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK ( $p = 0,1108$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

<sup>32</sup> Von 47,75%  $\pm$  1,18% auf 25,43%  $\pm$  3,97% für Boc-D(OMe)-FMK ( $p = 0,0377$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle), auf 23,98%  $\pm$  2,77% für Z-Asp-DBMK ( $p = 0,0269$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle), auf 12,85%  $\pm$  0,64% für Z-VAD-FMK ( $p = 0,0459$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) und auf 27,83%  $\pm$  10,62% für Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK ( $p = 0,1148$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

<sup>33</sup> Von 19,76%  $\pm$  1,38% (Kontrolle) auf 25,71%  $\pm$  2,09% für Boc-D(OMe)-FMK ( $p = 0,0220$ ), auf 29,00%  $\pm$  0,72% für Z-Asp-DBMK ( $p = 0,0092$ ), auf 30,01%  $\pm$  10,15% für Z-VAD-FMK ( $p = 0,1146$ ) und auf 23,89%  $\pm$  1,94% für Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK ( $p = 0,0192$ ).

<sup>34</sup> Von 80,45%  $\pm$  3,44% (Kontrolle) auf 60,89%  $\pm$  3,62% für Boc-D(OMe)-FMK ( $p = 0,0024$ ), auf 65,83%  $\pm$  5,22% für Z-Asp-DBMK ( $p = 0,0019$ ), auf 59,91%  $\pm$  1,69% für Z-VAD-FMK ( $p = 0,0006$ ) und auf 58,23%  $\pm$  5,90% für Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK ( $p = 0,0027$ ).

jedoch nicht in der Lage waren, die durch Arsentrioxid verursachten mitochondrialen Effekte zu reprimieren.

Die Caspasen-Inhibitoren *per se* hatten keinen Einfluß auf den Prozentsatz apoptotischer CCRF-CEM<sup>35</sup>- bzw. Jurkat-Zellen<sup>36</sup>, wenngleich der Prozentsatz MitoTrackerRed CMXRos-negativer Zellen meist etwas über dem Prozentsatz für Annexin V-FITC-positive Zellen lag.

### 7.3.6 Die Arsentrioxid-Behandlung von Zellen und die Bildung von NO-Radikalen

Die Bildung von NO-Radikalen kann bei Prozessen der Signaltransduktion im Rahmen der Apoptose eine entscheidende Rolle spielen (Kojima, 1998; Nakatsubo, 1998; Igarashi, 1999; Bustamante, 2000). Daher wurde für die Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60, Jurkat, K-562, KG-1a und LOUCY analysiert, ob es zur Bildung von NO-Radikalen nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid kommt. Hierzu erfolgte eine Inkubation der jeweiligen Zelllinien mit einem Reagenz (*NO-dye* der Firma BD Clontech, siehe *Material und Methoden*), welches nach Nitrosylierung durch NO-Radikale seine Eigenschaften ändert und zu fluoreszieren beginnt. Unmittelbar nach der Inkubation mit *NO-dye* und 10  $\mu$ M Arsentrioxid bzw. *NO-dye* und 75  $\mu$ M Etoposid sowie nach 2-, 6-, 12-, 24- und 48-stündiger Inkubation wurde ein Aliquot jedes Ansatzes entnommen und auf das Vorhandensein apoptotischer Zellen mit

<sup>35</sup> Die Werte für die Zelllinie CCRF-CEM betragen (in den Klammern sind die zur PBS-Kontrolle zugehörigen P-Werte angegeben):

DMSO-Kontrolle: 3,89%  $\pm$  0,61% ( $p = 0,8343$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 3,76%  $\pm$  1,06% ( $p = 0,3879$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen;

Boc-D(OMe)-FMK-Kontrolle: 2,67%  $\pm$  0,70% ( $p = 0,1801$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 5,60%  $\pm$  1,76% ( $p = 0,7816$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen;

Z-Asp-DBMK-Kontrolle: 4,06%  $\pm$  0,84% ( $p = 0,1720$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 11,53%  $\pm$  4,76% ( $p = 0,0884$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen;

Z-VAD-FMK-Kontrolle: 2,48%  $\pm$  0,49% ( $p = 0,7146$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 3,50%  $\pm$  1,07% ( $p = 0,2945$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen;

Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK-Kontrolle: 4,52%  $\pm$  0,59% ( $p = 0,3022$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 5,91%  $\pm$  1,14% ( $p = 0,3030$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen.

<sup>36</sup> Die Werte für die Zelllinie Jurkat betragen (in den Klammern sind die zur PBS-Kontrolle zugehörigen P-Werte angegeben):

DMSO-Kontrolle: 7,38%  $\pm$  2,16% ( $p = 0,1283$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 10,75%  $\pm$  3,21% ( $p = 0,2908$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen;

Boc-D(OMe)-FMK-Kontrolle: 4,65%  $\pm$  0,72% ( $p = 0,1602$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 8,78%  $\pm$  0,83% ( $p = 0,5302$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen;

Z-Asp-DBMK-Kontrolle: 5,49%  $\pm$  2,12% ( $p = 0,6525$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 10,80%  $\pm$  2,07% ( $p = 0,3679$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen;

Z-VAD-FMK-Kontrolle: 3,55%  $\pm$  1,41% ( $p = 0,1759$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 5,49%  $\pm$  0,96% ( $p = 0,4893$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen;

Z-D(OMe)-E(OMe)-VD(OMe)-FMK-Kontrolle: 6,75%  $\pm$  1,74% ( $p = 0,6168$ ) Annexin V-FITC-positive Zellen und 10,03%  $\pm$  1,55% ( $p = 0,7139$ ) MitoTrackerRed CMXRos-negativ Zellen.

Annexin V-PE gefärbt. **Abbildung 23** zeigt exemplarisch das Ergebnis je einer Meßreihe für CCRF-CEM, CEM/C2, K-562 und LOUCY-Zellen. Die *dot plots* der durchflußzytometrischen Zweifarben-Messungen zeigten eine schwache Zunahme der NO-Radikale 6 Stunden nach Arsentrioxid-Behandlung bzw. eine Zunahme zu einem späteren Zeitpunkt. Im Vergleich dazu stieg nach 6-stündiger Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  Etoposid der Anteil *NO-dye*-positiver Zellen in den Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C2, Jurkat und LOUCY. Im Fall der Zelllinie CCRF-CEM zeigten nahezu alle nicht apoptotischen (i. e. Annexin V-PE-negativen) Zellen eine Zunahme der Fluoreszenz in FL-1, also demjenigen Fluoreszenzkanal, in welchem die Fluoreszenz des *NO-dyes* gemessen wurde. In einigen der Kontrollansätze (z. B. CCRF-CEM und LOUCY) stieg die mittlere Fluoreszenzintensität für FL-1 zwischenzeitlich ebenfalls an, sank jedoch wieder auf den ursprünglichen Wert. Für die Zelllinien CCRF-CEM, HL-60, K-562, KG-1a und LOUCY wurden alle Färbungen (außer nach 48 Stunden) in Dubletten ausgeführt.

### 7.3.7 *Arsentrioxid beeinflusst die Expression des Proliferationsmarkers p53 nur in einigen Arsentrioxid-sensitiven Zelllinien*

Die durchflußzytometrische Bestimmung der p53-Expression nach Behandlung von Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid über einen Zeitraum von 2, 6, 12 und 24 Stunden ist in **Abbildung 24** für die Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60/MX1, HL-60/MX2, K-562, K-562(0.02), K-562(0.1), 697, Jurkat, KG-1a und LOUCY dargestellt. Lediglich in den Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, 697 und LOUCY konnte eine Arsentrioxid-Induktion von p53 mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes p53 nach Fixierung und Permeabilisierung in einer Teilpopulation durchflußzytometrisch nachgewiesen werden.

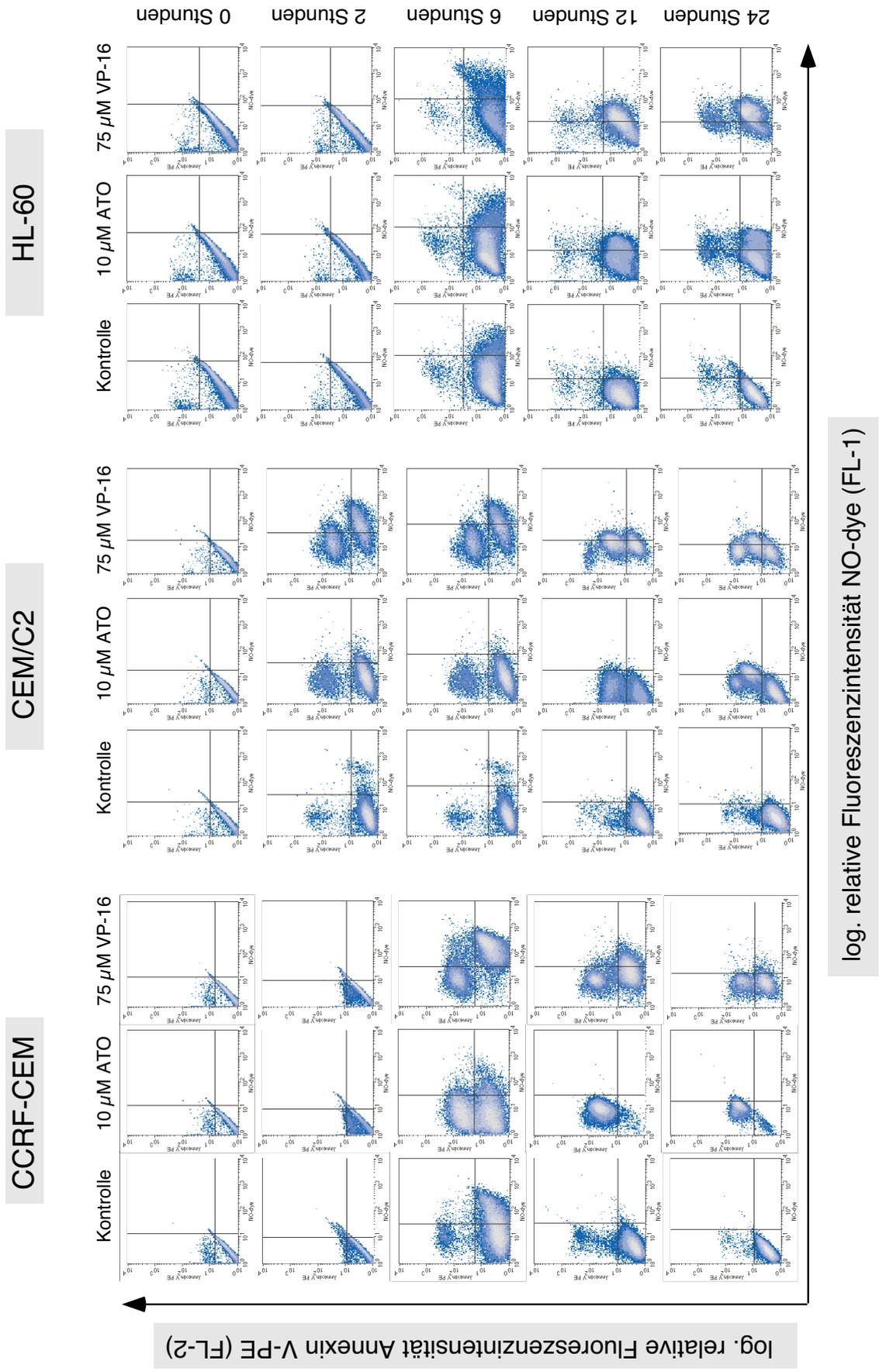
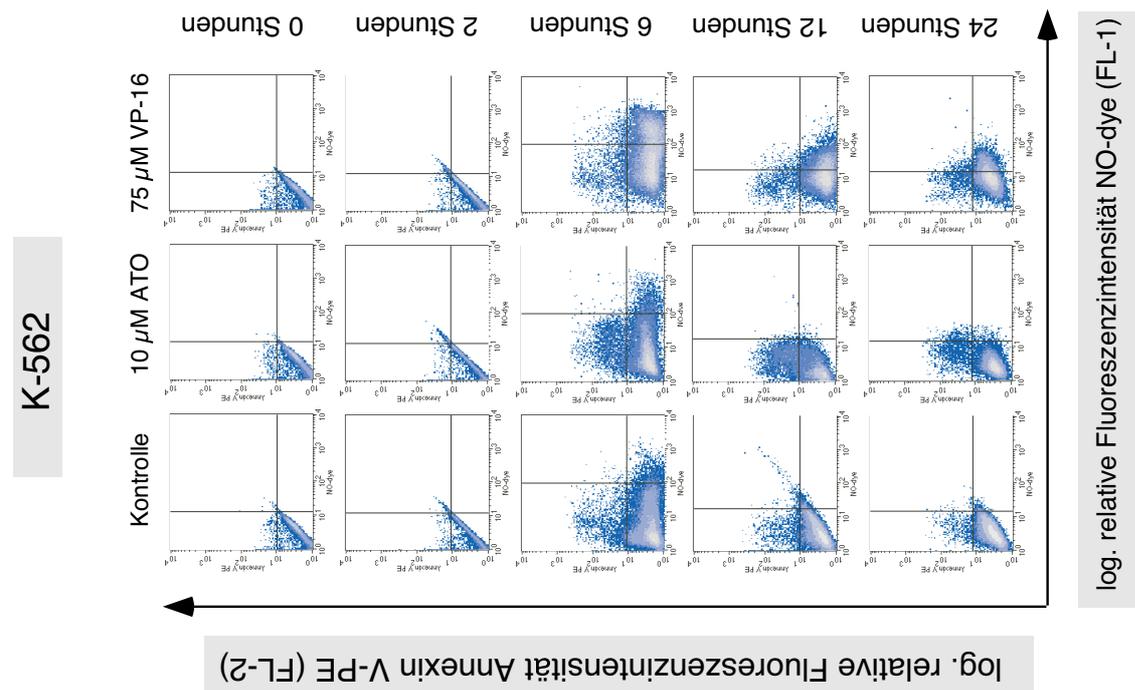


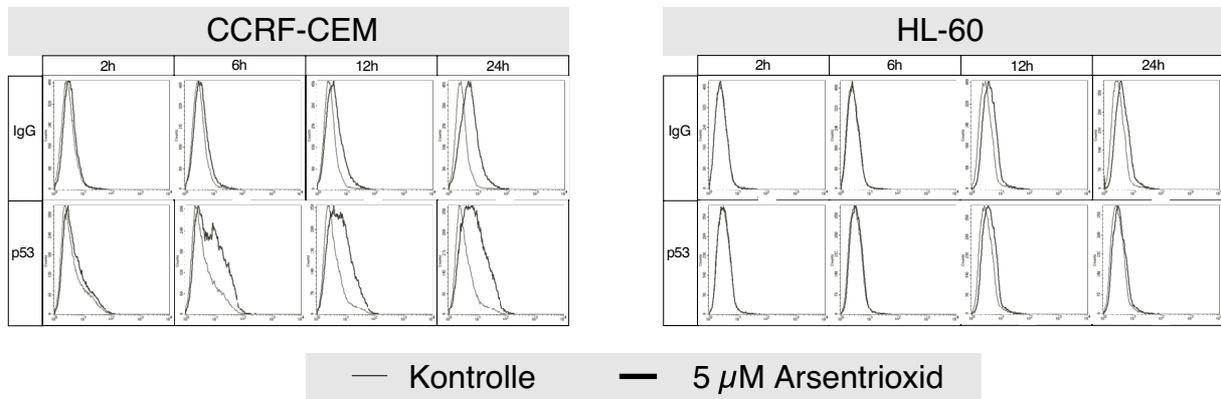
Abbildung 23(A): Arsentrioxid und die Bildung freier NO-Radikale in den Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C2 und HL-60

**Abbildung 23: Arsentrioxid und die Bildung freier NO-Radikale in den Zelllinien (A) CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60 und (B) K-562.** Die Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60 und K-562 wurden im Anschluß an die Färbung mit dem NO-Nachweisreagenz NO-dye für einen Zeitraum von 24 Stunden mit 10 µM Arsentrioxid (ATO) bzw. 75 µM Etoposid (VP-16) inkubiert. Unmittelbar nach Ansetzen des Versuches (0 Stunden) sowie nach 2-, 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Substanzen (PBS, Arsentrioxid bzw. Etoposid) wurde ein Aliquot des jeweiligen Inkubationsansatzes entnommen und durch eine Gegenfärbung mit Annexin V-PE auf das Vorhandensein apoptotischer Zellen untersucht. Dargestellt sind dot plots, in denen die relativen Fluoreszenzintensitäten von 50.000 Zellen für den Fluoreszenzkanal FL-1 (NO-dye) und die dazu jeweils zugehörigen Werte für FL-2 (Annexin V-PE) gegeneinander aufgetragen wurden.

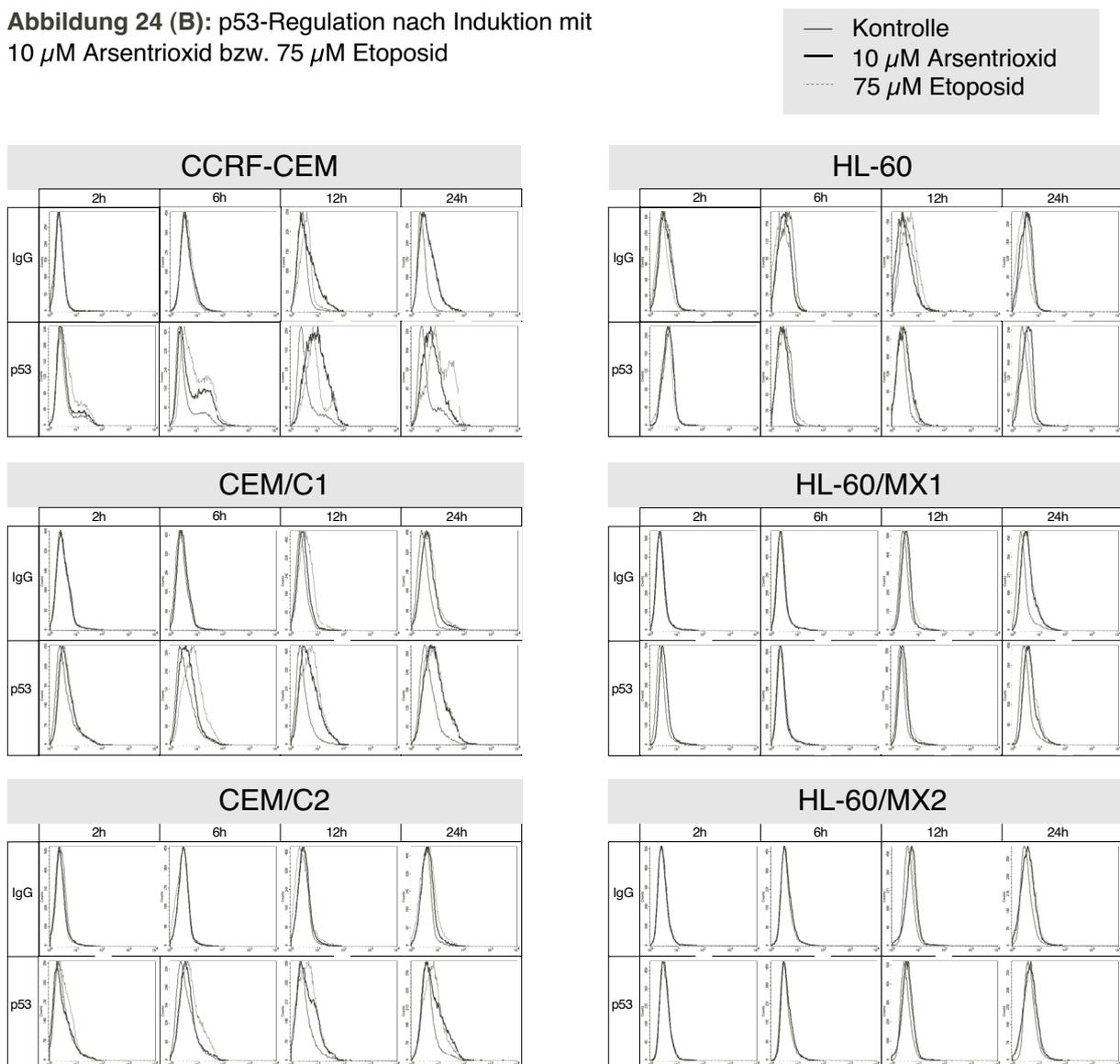


**Abbildung 20 (B): Arsentrioxid und die Bildung freier NO-Radikale in der Zelllinie K-562.**

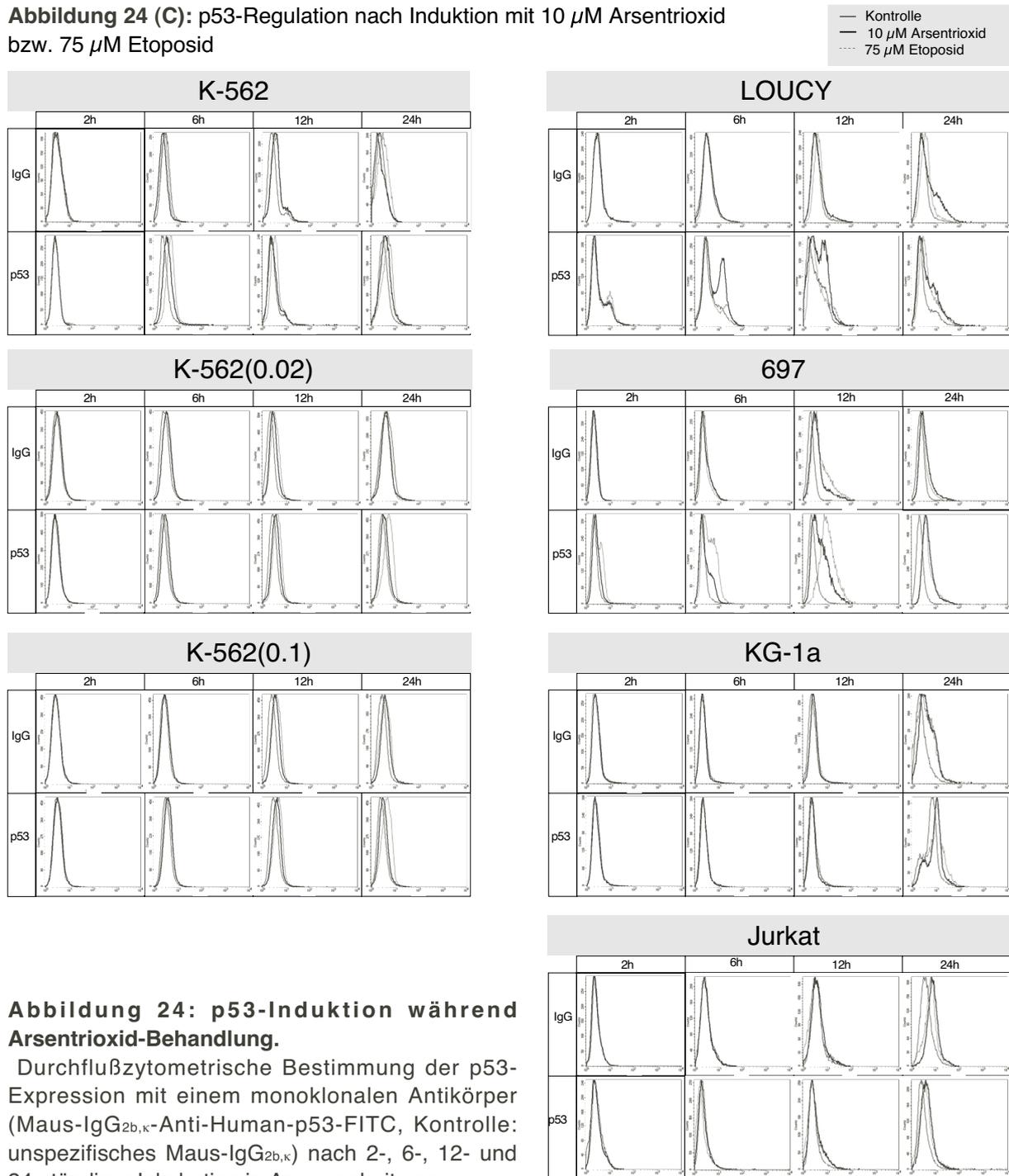
**Abbildung 24 (A):** p53-Regulation nach Induktion mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid



**Abbildung 24 (B):** p53-Regulation nach Induktion mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid bzw. 75  $\mu$ M Etoposid



**Abbildung 24 (C):** p53-Regulation nach Induktion mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid



**Abbildung 24: p53-Induktion während Arsentrioxid-Behandlung.**

Durchflußzytometrische Bestimmung der p53-Expression mit einem monoklonalen Antikörper (Maus-IgG<sub>2b,κ</sub>-Anti-Human-p53-FITC, Kontrolle: unspezifisches Maus-IgG<sub>2b,κ</sub>) nach 2-, 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von:

(A) PBS (dünne Linie) bzw. 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid (dicke Linie) für die Zelllinien CCRF-CEM und HL-60, (B) PBS (dünne Linie), 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid (dicke Linie) bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid (gestrichelte Linie) für die Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX1 und HL-60/MX2 sowie (C) K-562, K-562(0.02), K-562(0.1), LOUCY, 697, KG-1a und Jurkat. Die Histogramme einzelner repräsentativer Messungen sind mit ihren jeweiligen Kontrollen dargestellt. Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zugehörige Zellzahl. Für jede Messung wurde die Fluoreszenzintensität von je 25.000 ((B) und (C)) bzw. 50.000 (A) Zellen bestimmt.

7.4 *Die Arsentrioxid-induzierte Apoptose kann durch Blockierung CD95-spezifischer Prozesse nicht inhibiert werden und ist somit CD95-unabhängig.*

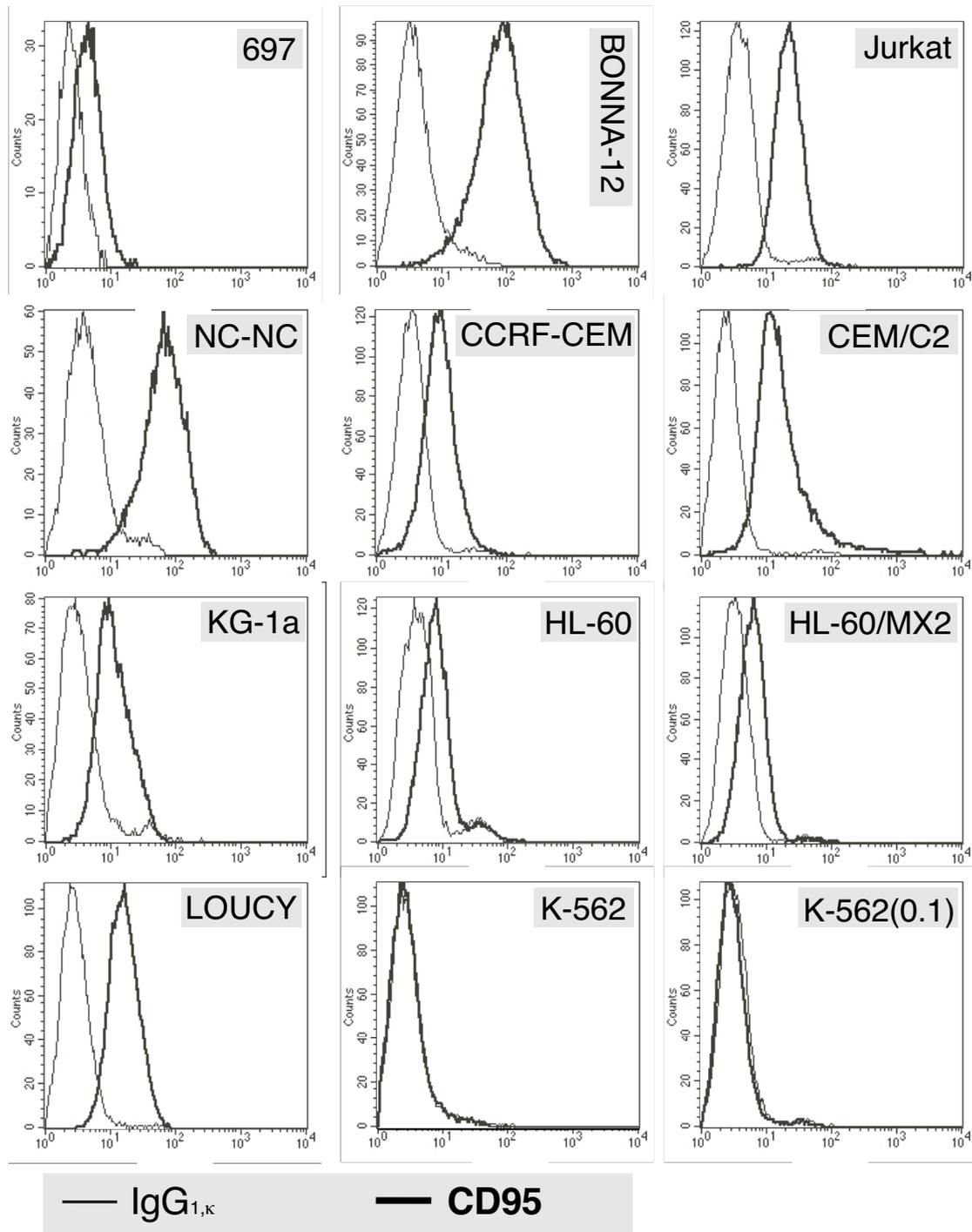
Da sich die Wirkung von Arsentrioxid in den bisher beschriebenen Parametern nicht von der Apoptose-Induktion durch konventionelle, auf Mitochondrien wirkenden Zytostatika wie beispielsweise Etoposid oder Camptothecin unterscheidet, lag es nahe festzustellen, ob die Sensitivität von Arsentrioxid von der Expression des Oberflächenproteins Fas (CD95) abhängig ist. Friesen et al. (Friesen, 1999) beschrieben, daß die Wirkung bestimmter Zytostatika wie z. B. Doxorubicin, Methotrexat, Cytarabin, Etoposid oder Cisplatin zur autokrinen bzw. parakrinen Regulation der CD95-Expression bzw. zu einer erhöhten Sekretion von solubilisierendem Fas-Ligand (FasL) führen soll (vgl. Abschnitt 3.2.3.1 *Die durch Rezeptor-Liganden-Bindung induzierte Apoptose*). Daher wurden Untersuchungen durchgeführt, welche Aufschluß über die Relevanz der CD95-Expression in Abhängigkeit von der Arsentrioxid-Behandlung von Zellen liefern konnten. Von besonderer Bedeutung ist ein möglicher Einfluß von Arsentrioxid auf die CD95-Regulation, da im Rahmen klinischer Studien die Kombination klassischer Zytostatika mit Arsentrioxid durchaus realistisch erscheint. In den USA lief im Jahr 2002 bereits eine Studie über die Kombination von Arsentrioxid und Zytostatika (*Tretinoin, Cytarabine, and Daunorubicin With or Without Arsenic Trioxide Followed by Tretinoin With or Without Mercaptopurine and Methotrexate in Treating Patients With Acute Promyelocytic Leukemia; Study ID Numbers 199/14325; CLB-C9710; CAN-NCIC-C9710*). Sollte der Mechanismus zur Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid partiell einen anderen Weg beschreiben, so wäre eine Kombination mit Zytostatika sinnvoll, welche die CD95-Expression zu regulieren vermögen bzw. Apoptose über eine CD95-Trimerisierung induzieren.

#### 7.4.1 *Die Arsentrioxid-induzierte Apoptose ist unabhängig von der CD95 (Fas)-Basalexpression*

Ein Vergleich der CD95-Expression mehrerer Zelllinien unterschiedlichen hämatopoetischen Differenzierungsgrades zeigte eindeutig, daß kein Zusammenhang zwischen CD95-Expression und der Sensitivität gegenüber Arsentrioxid existiert (**Abbildung 25**). Zelllinien aller Sensitivitätsgruppen exprimierten CD95. Als Beispiele seien hier die Zelllinien LOUCY (Sensitivitätsgruppe A), CCRF-CEM (Sensitivitätsgruppe B) bzw. Jurkat (Sensitivitätsgruppe C) genannt. Auch die Zelllinie KG-1a, welche zur Sensitivitätsgruppe B gehörte, in der jedoch auch nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid keine Caspasen-Aktivierung oder Bildung von ROS nachweisbar war, exprimierte CD95. Lediglich die Zelllinie K-562 sowie deren Doxorubicin-resistentes Derivat K-562(0.1) zeigten keine CD95-Expression.

#### 7.4.2 *Arsentrioxid besitzt keinen regulatorischen Einfluß auf die CD95 (Fas)-Expression*

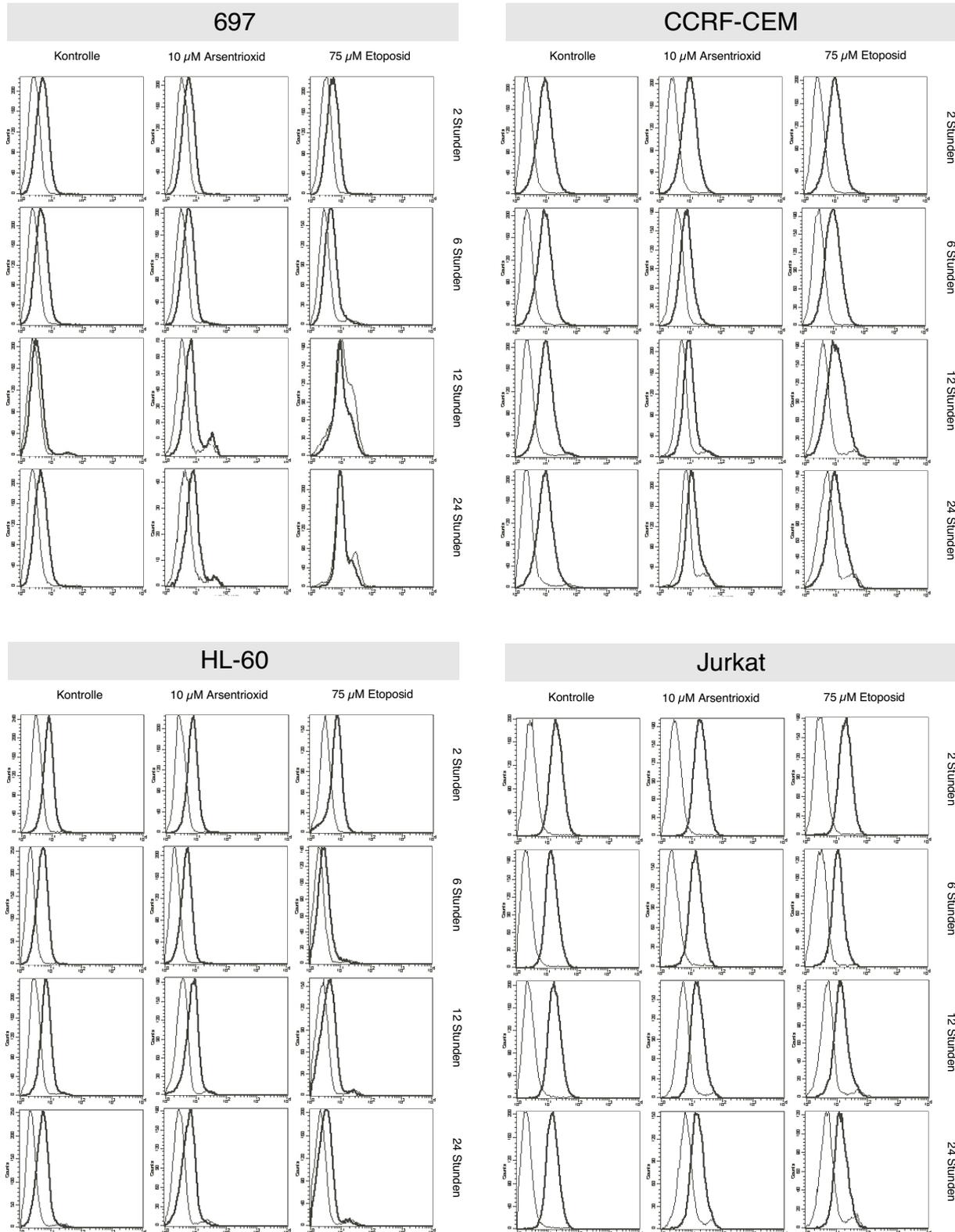
Zur Überprüfung einer CD95-Regulation nach Arsentrioxid-Behandlung wurden die Zelllinien 697, CCRF-CEM, HL-60, Jurkat (**Abbildung 26 (A)**) sowie K-562, KG-1a und LOUCY (**Abbildung 26 (B)**) mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid bzw. Etoposid für 2, 6, 12 bzw. 24 Stunden inkubiert. In den durchflußzytometrischen Messungen konnte in keinem der untersuchten Versuchsansätze eine Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen werden, welche auf eine erhöhte CD95-Expression hätte schließen lassen können. Bei einigen Zelllinien konnte sogar beobachtet werden, daß die Differenz der Fluoreszenzintensitäten zwischen den mit einem Isotyp-Kontrollantikörper und den mit einem CD95-spezifischen Antikörper gefärbten Ansätzen abnahm. Dies würde bedeuten, daß sowohl Etoposid als auch Arsentrioxid zu einer Verringerung der CD95-Expression (z. B. in Jurkat Zellen nach 24-stündiger Behandlung) führten.



**Abbildung 25: Histogrammdarstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der CD95 (Fas)-Expression.** Die CD95-Expression von je 50.000 Zellen der Zelllinien 697, BONNA-12, Jurkat, NC-NC, CCRF-CEM, CEM/C2, KG-1a, HL-60, HL-60/MX2, LOUCY, K-562 und K-562(0.1) wurden im Durchflußzytometer mit einem FITC-gekoppelten, monoklonalen Maus-IgG<sub>1,k</sub>-Anti-Human-CD95(Fas)-Antikörper bestimmt (dicke Linie). Zur Kontrollfärbung diente unspezifischer, FITC-gekoppelter, monoklonaler Maus-IgG<sub>1,k</sub>-Antikörper (dünne Linie). Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zugehörige Zellzahl.

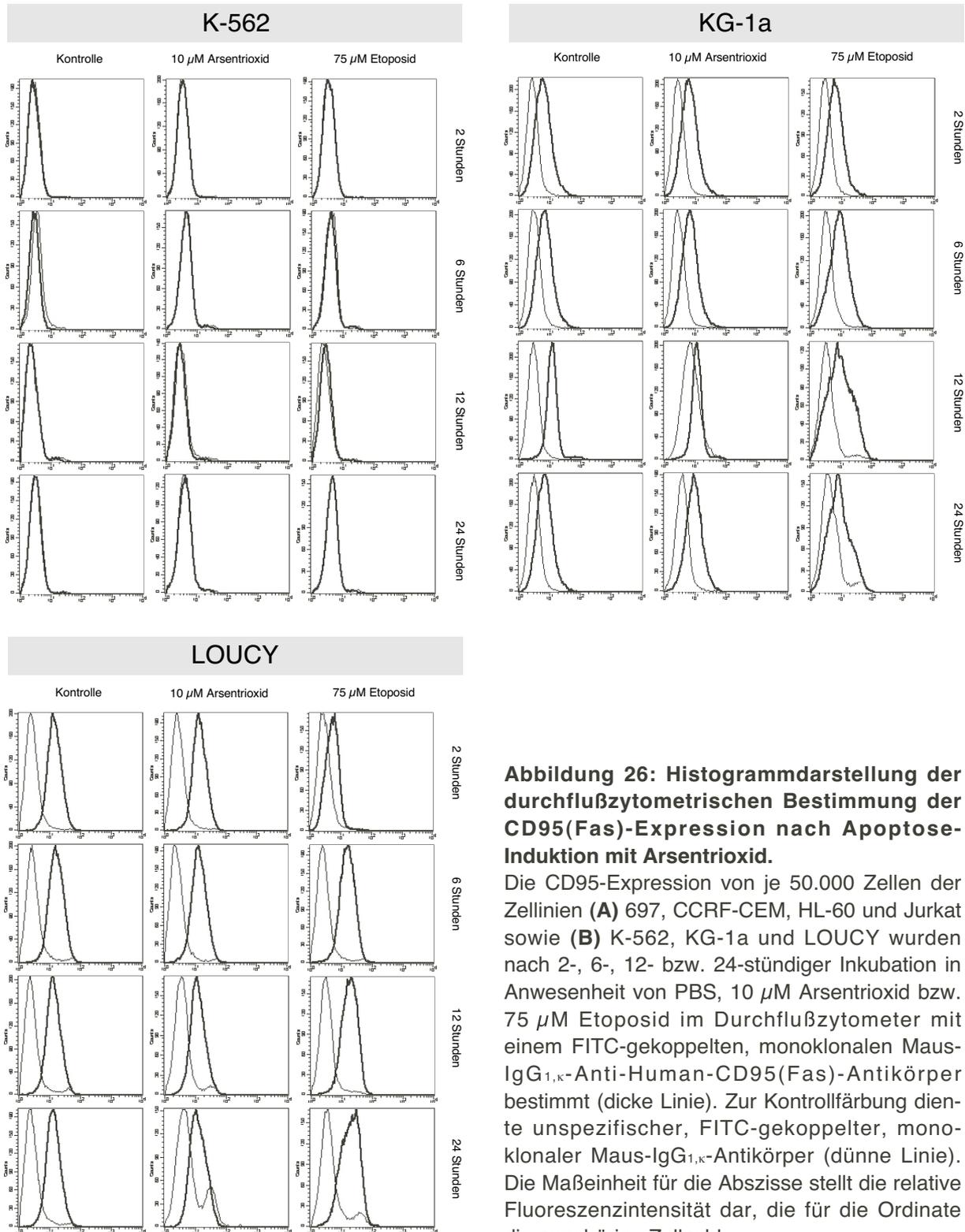
**Abbildung 26 (A):** CD95-Expression nach Induktion mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid

— IgG<sub>1,κ</sub> — CD95



**Abbildung 26 (B):** CD95-Expression nach Induktion mit 10  $\mu\text{M}$  Arsen(trioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid

— IgG<sub>1,κ</sub> — CD95



**Abbildung 26:** Histogrammdarstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der CD95(Fas)-Expression nach Apoptose-Induktion mit Arsentrioxid.

Die CD95-Expression von je 50.000 Zellen der Zelllinien (A) 697, CCRF-CEM, HL-60 und Jurkat sowie (B) K-562, KG-1a und LOUCY wurden nach 2-, 6-, 12- bzw. 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von PBS, 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 75  $\mu\text{M}$  Etoposid im Durchflußzytometer mit einem FITC-gekoppelten, monoklonalen Maus-IgG<sub>1,κ</sub>-Anti-Human-CD95(Fas)-Antikörper bestimmt (dicke Linie). Zur Kontrollfärbung diente unspezifischer, FITC-gekoppelter, monoklonaler Maus-IgG<sub>1,κ</sub>-Antikörper (dünne Linie). Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zugehörige Zellzahl.

Durch Doppelmarkierungsexperimente mit einem an FITC gekoppelten Maus-IgG<sub>1,k</sub>-Anti-Human-CD95 und Annexin V-PE bzw. 7-AAD konnte zusätzlich gezeigt werden, daß eine erhöhte CD95-Expression weder in Annexin V-PE-positiven noch in Annexin V-negativen bzw. weder in 7-AAD-positiven noch in 7-AAD-negativen Teilpopulationen auftrat (Daten nicht dargestellt).

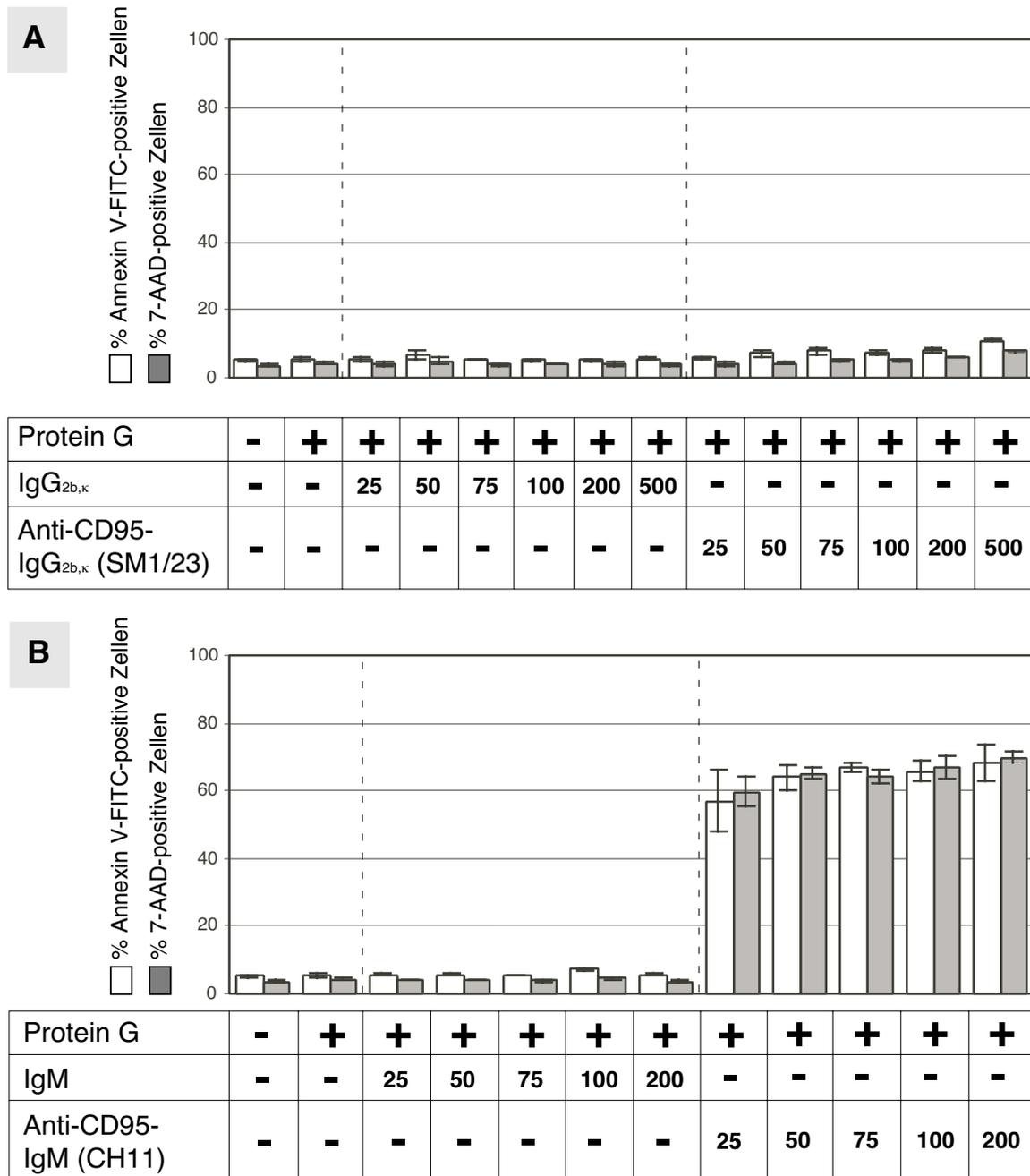
#### *7.4.3 Die in CCRF-CEM und Jurkat-Zellen mit Arsentrioxid-induzierte Apoptose kann durch Blockierung von CD95 (Fas) nicht gehemmt werden*

Da die durch Antikörper im Durchflußzytometer oder Western-Blots nachgewiesene CD95-Expression nicht immer auch das Vorhandensein funktionellen CD95 bedeuten muß, wurde in zwei der oben beschriebenen Zelllinien (CCRF-CEM und Jurkat) untersucht, ob es sich bei dem auf diesen Zellen exprimierten CD95 um eine funktionelle Variante handelte. Der Nachweis der Expression von funktionellem CD95 konnte entweder durch Bindung spezifischer Antikörper für CD95 erfolgen, welche eine Vernetzung (Trimerisierung) von CD95-Molekülen auf der Oberfläche bewirkten und somit die CD95-vermittelte Apoptose auslösten (die IgM-Klone 7C11 und CH11), oder aber durch Antikörper, welche an CD95 banden und das Molekül derart maskierten, daß durch einen Apoptose-induzierenden Anti-CD95-Antikörper keine Apoptose mehr ausgelöst werden konnte (der IgG<sub>2b,k</sub> Klon SM1/23).

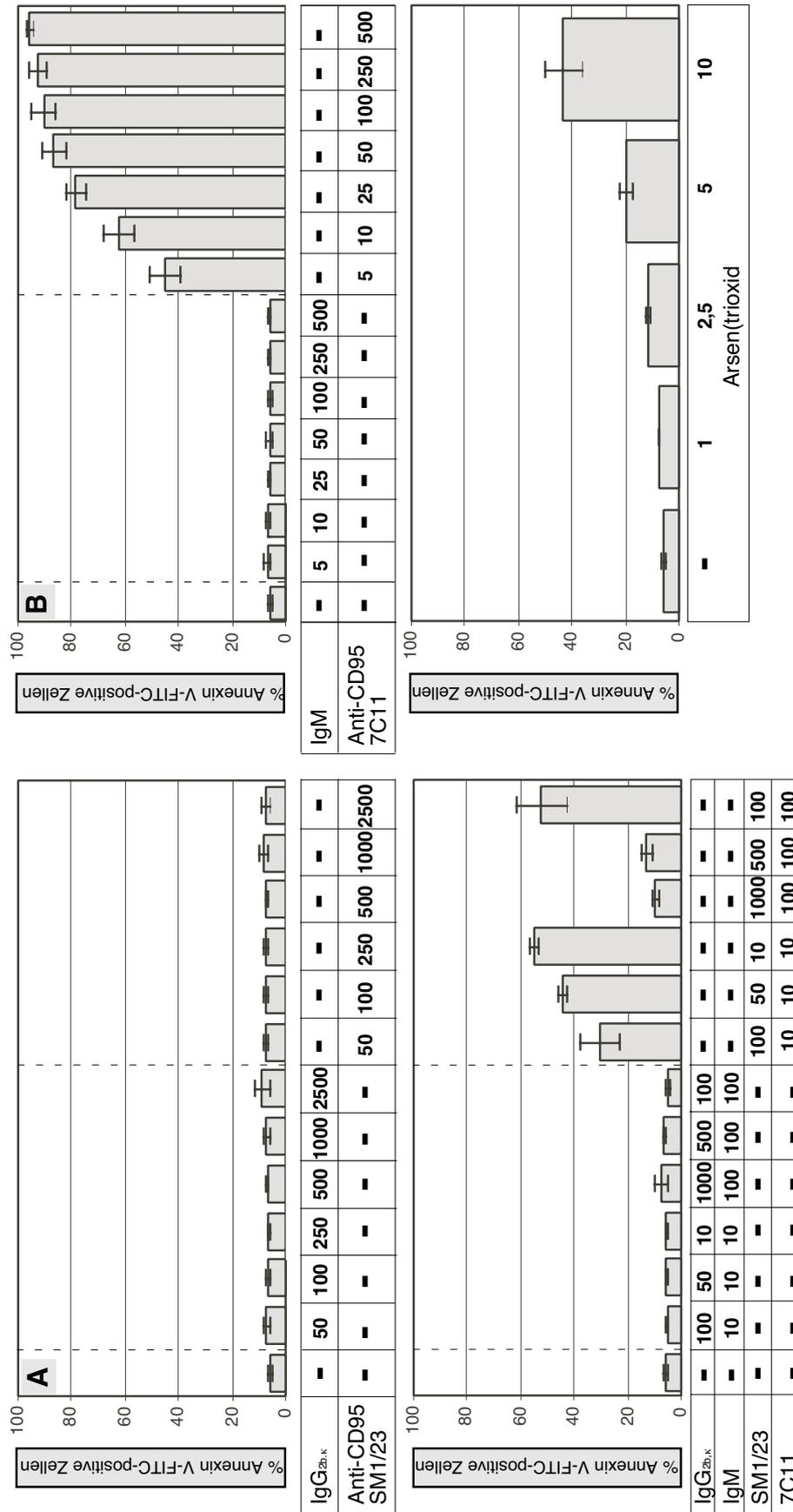
#### *7.4.4 Titration der Apoptose-induzierenden und Apoptose-inhibierenden Anti-CD95-Antikörper*

Zunächst erfolgte für die Zelllinien CCRF-CEM (**Abbildung 27**) bzw. Jurkat (**Abbildung 28**) die Bestimmung der zur Apoptose-Induktion benötigten Konzentration der induzierenden Antikörper CH11 bzw. 7C11. Um toxische Effekte des die Apoptose blockierenden Antikörpers SM1/23 auszuschließen, wurde die für diesen Antikörper einzusetzende Konzentration ebenfalls ausitiert.

CCRF-CEM-Zellen wurden hierzu über 24 Stunden mit Maus-IgM-Anti-CD95 (CH11) oder Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-Anti-Human-CD95 (SM1/23) bzw. den jeweiligen Isotyp-Kontrollen dieser Antikörper versetzt, und der Anteil apoptotischer Zellen wurde durch Annexin V-FITC sowie 7-AAD-Färbung bestimmt.



**Abbildung 27: Apoptose-Induktion in der Zelllinie CCRF-CEM durch CD95: Titration Apoptose-induzierender (B) und Apoptose-inhibierender (A) Maus anti-human CD95 Antikörper.** CCRF-CEM-Zellen wurden für 24 Stunden mit (A) dem Apoptose-blockierenden Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-anti-human-CD95-Antikörper (Klon SM1/23) oder mit (B) mit dem Apoptose-induzierenden Maus-IgM-Anti-Human-CD95-Antikörper (Klon CH11) bzw. den Isotypkontrollen der entsprechenden Antikörper-Subklassen inkubiert. SM1/23 induzierte selbst in einer Konzentration von 500 ng/mL keine Apoptose, wohingegen geringe Konzentrationen von CH11 (25 ng/mL) bereits in mehr als 50% der Zellen Apoptose induzierten. Die Abszisse stellt den Prozentsatz Annexin V-FITC-positiver (weiß) bzw. 7-AAD-positiver (grau) Zellen dar. Je Ansatz wurden die Fluoreszenzintensitäten von 25.000 Zellen gemessen (n=3). ProteinG wurde in einer Konzentration von 5 µg/mL eingesetzt. Angabe der Konzentrationen in ng/mL.



**Abbildung 28: Apoptose-Induktion in der Zelllinie Jurkat durch CD95: Titration Apoptose-induzierender und Apoptose-inhibierender Maus-Anti-Human-CD95-Antikörper.** Jurkat-Zellen wurden für 24 Stunden mit (A) dem Apoptose-blockierenden Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-Anti-Human-CD95-Antikörper (Klon SM1/23), mit (B) dem Apoptose-induzierenden Maus-IgM-Anti-Human-CD95-Antikörper (Klon 7C11), mit Arsentrioxid (D) bzw. den Isotypkontrollen der entsprechenden Antikörpersubklassen inkubiert. SM1/23 induzierte selbst in einer Konzentration von 2500 ng/mL keine Apoptose, wohingegen

geringe Konzentrationen von 7C11 (5 ng/mL) bereits in nahezu 50% der Zellen Apoptose auslöste. Teilabbildung (C) zeigt die Hemmung der 7C11 induzierten Apoptose durch SM1/23 (näheres siehe Text). Die Abszisse stellt den Prozentsatz Annexin V-FITC-positiver Zellen dar. Je Ansatz wurden die Fluoreszenzintensitäten von 25.000 Zellen gemessen. Die Konzentrationen bei (A), (B) und (C) sind in ng/mL, bei (D) in  $\mu\text{M}$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) angegeben (n=3).

Für den blockierenden Klon SM1/23 und dessen Isotyp-Kontrolle lagen die verwandten Konzentrationen zwischen 25 ng/mL und 500 ng/mL (**Abbildung 27 (A)**), für den induzierenden Klon CH11 und dessen Isotyp-Kontrolle zwischen 25 ng/mL und 200 ng/mL (**Abbildung 27 (B)**). Der Einsatz von ProteinG diente, ähnlich wie im *Instruction Manual „Apoptosis – Applied Reagents and Technologies“* (*Apoptosis - Applied Reagents and Technologies, 1998*) für den Anti-CD95-Antikörper-Klon DX2 beschrieben, der Stabilisierung des CH11/CD95-Komplexes.

SM1/23 induzierte selbst in einer Konzentration von 500 ng/mL keine Apoptose in CCRF-CEM-Zellen, wohingegen bereits die geringste eingesetzte CH11-Konzentration (25 ng/mL) ausreichte, um in mehr als 55%<sup>37</sup> der Zellen Apoptose zu induzieren. Der Anteil Annexin V-FITC- bzw. 7-AAD-positiver Zellen blieb durch die Inkubation mit den jeweiligen Isotyp-Kontrollen nahezu unverändert.

Bei den Titrationen für die Zelllinie Jurkat wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Annexin V-FITC-Färbungen bestimmt. Die Titration erfolgte analog für die Zelllinie CCRF-CEM. Beim Austesten der zur Verfügung stehenden induzierenden Antikörper stellte sich jedoch Klon 7C11 als am effektivsten dar (Daten nicht gezeigt), was die Verwendung von ProteinG überflüssig machte. Die für SM1/23 bzw. 7C11 sowie für deren Isotyp-Kontrollen eingesetzten Konzentrationen betragen 50 ng/mL bis 2500 ng/mL (**Abbildung 28 (A)**) bzw. 5 ng/mL bis 500 ng/mL (**Abbildung 28 (B)**). SM1/23 induzierte selbst in einer Konzentration von 2500 ng/mL keine Apoptose in Jurkat-Zellen, wohingegen bereits die geringste eingesetzte CH11-Konzentration (5 ng/mL) ausreichte, um in ca. 45% (45,07% ± 5,59%) der Zellen Apoptose zu induzieren. Der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen blieb durch die Inkubation mit den jeweiligen Isotyp-Kontrollen nahezu gleich. Um zu testen, inwieweit der blockierende Antikörper SM1/23 in der Lage war, die durch 7C11 induzierte Apoptose zu reprimieren, wurden Koinkubationsexperimente durchgeführt (**Abbildung 28 (C)**). Hierzu erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des inhibierenden Antikörpers SM1/23 (10 ng/mL bis 1000 ng/mL). An diese Inkubation schloß sich die Zugabe von 7C11 (Koinkubation) über einen Zeitraum von 24 Stunden an. Damit sich für SM1/23 und 7C11 die Verhältnisse von 10:1, 5:1 und 1:1 ergaben, betrug die verwandten

7C11-Konzentrationen 10 ng/mL und 100 ng/mL. Es zeigte sich, daß mindestens die fünffache Konzentration des blockierenden Antikörpers SM1/23 eingesetzt werden mußte, um eine deutliche Reduktion des durch 7C11-Inkubation induzierten Anteils apoptotischer Zellen zu erzielen. Das beste Ergebnis konnte für die Verwendung von 100 ng/mL 7C11 und 1000 ng/mL SM1/23 erreicht werden. Daher kamen in den folgenden Koinkubationsexperimenten bei der Zelllinie Jurkat diese Konzentrationen zum Einsatz. In **Abbildung 28 (D)** ist die Titration der Arsentrioxid-Konzentration dargestellt. Für die Blockierungsexperimente mit SM1/23 und Arsentrioxid (siehe nächster Abschnitt) sollten nur solche Konzentrationen von Arsentrioxid eingesetzt werden, welche in einem möglichst geringen Anteil der Zellpopulation Apoptose reproduzierbar induzierten. Der Anteil der durch Arsentrioxid induzierten apoptotischen Zellen sollte deutlich unter dem des durch 7C11 induzierten Anteils liegen, denn nur hierdurch konnte gewährleistet werden, daß die Menge des blockierenden Antikörpers SM1/23 auch für die Blockierung der durch Arsentrioxid vermittelten Apoptose ausreichend war.

In den folgenden Experimenten (vgl. nächster Abschnitt) kam daher Arsentrioxid in den Konzentrationen 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M zum Einsatz.

Die Durchführung einer detaillierten Arsentrioxid-Titration für CCRF-CEM-Zellen war aufgrund der vorliegenden Ergebnisse aus den Langzeit-Titrationsexperimenten (**vgl. Abbildung 2** und **Abbildung 3**) nicht mehr nötig.

Weitere Ergebnisse zur Repression der durch CH11 bzw. 7C11 induzierten Apoptose mit dem blockierenden Antikörper SM1/23 liegen für die Zelllinien NB-4 bzw. KG-1a vor (Daten nicht gezeigt; vgl. (Schrezenmeier, 2001b)). Auch in diesen Zelllinien konnte das Vorhandensein von funktionellem CD95 nachgewiesen werden.

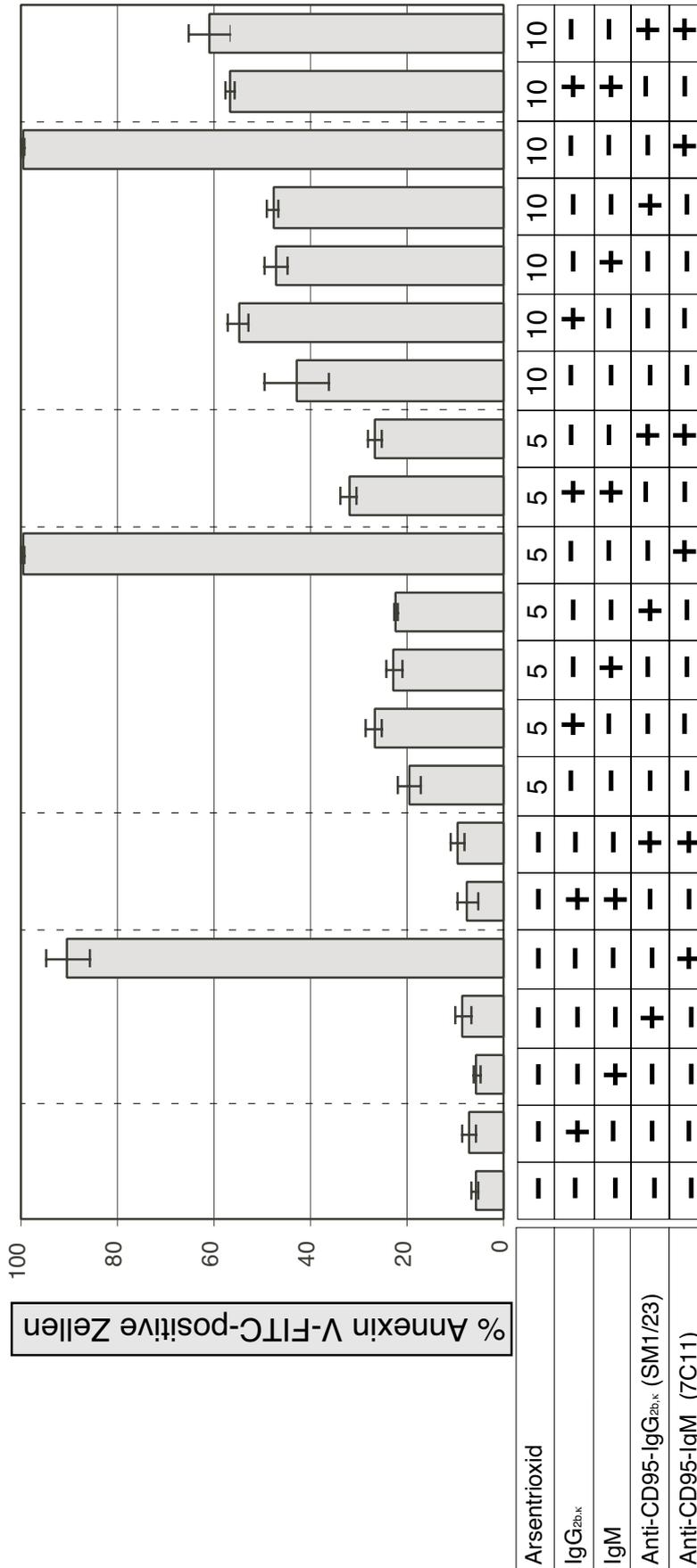
#### 7.4.5 CD95-Blockierungsexperimente

Die Ergebnisse der Blockierungsexperimente Arsentrioxid-induzierter Apoptose durch den blockierenden Anti-CD95-Antikörper SM1/23 sind in **Abbildung 29** für die Zelllinie CCRF-CEM, in der **Abbildung 30** für die Zelllinie Jurkat zusammengefaßt.

---

<sup>37</sup> 56,96%  $\pm$  11,33% ( $p = 0,0224$  im Vergleich zur entsprechenden IgM-Kontrolle) für Annexin V-FITC-positive bzw. 59,66%  $\pm$  5,52% ( $p = 0,0022$  im Vergleich zur entsprechenden IgM-Kontrolle) für 7-AAD-positive Zellen.





**Abbildung 30: Die in Jurkat-Zellen mit Arsentrioxid induzierte Apoptose kann durch Blockierung von CD95 nicht gehemmt werden.** Jurkat-Zellen wurden für eine Stunde mit 1000 ng/mL des Apoptose-blockierenden Maus-IgG<sub>2b,k</sub>-Anti-Human-CD95-Antikörpers (Klon SM1/23) inkubiert; anschließend erfolgte eine 24-stündige Behandlung mit 100 ng/mL des Apoptose-induzierenden Maus-IgM-Anti-Human-CD95-Antikörper (Klon 7C11) bzw. 5 µM oder 10 µM Arsentrioxid. In den Kontrollen erfolgte die Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Isotypantikörpern. SM1/23 blockierte die 7C11, nicht jedoch die Arsentrioxid-induzierte Apoptose. Der Anteil apoptotischer Zellen in den mit Arsentrioxid-behandelten Ansätzen konnte durch Koinkubation mit 7C11 erhöht werden. SM1/23 senkte den Anteil apoptotischer Zellen in den Ansätzen mit Arsentrioxid und 7C11. Die Abszisse stellt den Prozentsatz Annexin V-FITC-positiver Zellen dar. Je Ansatz wurden die Fluoreszenzintensitäten von 25.000 Zellen gemessen (n=3).

Wie bereits erwähnt, blieb die Verwendung von ProteinG und den jeweiligen Isotyp-Kontrollen Maus-IgM (für CH11 und 7C11) bzw. Maus-IgG<sub>2b,k</sub> (für SM1/23) ohne Auswirkung auf die Apoptose-Induktion durch CH11 bzw. 7C11. Ebenso zeigten die Isotyp-Kontrollen und ProteinG keinerlei Einfluß auf die durch Arsentrioxid induzierte Apoptose in CCRF-CEM- oder Jurkat-Zellen.

Weder für die Zelllinie CCRF-CEM noch für die Zelllinie Jurkat konnte eine Reduktion des durch Arsentrioxid induzierten Anteils apoptotischer Zellen durch den inhibierenden Anti-CD95-Antikörper SM1/23 beobachtet werden.

In CCRF-CEM-Zellen erfolgte die Apoptose-Induktion entweder durch 25 ng/mL CH11 oder durch 1  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M Arsentrioxid. Der Anteil apoptotischer Zellen betrug für CH11 über 60%<sup>38</sup>, für 1  $\mu$ M Arsentrioxid ca. 25%<sup>39</sup> und für 5  $\mu$ M Arsentrioxid ca. 80%<sup>40</sup>. Durch einstündige Vorinkubation mit 500 ng/mL des blockierenden Anti-CD95-Antikörpers SM1/23 reduzierte sich der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 25 ng/mL CH11 auf unter 9%<sup>41</sup> und der Anteil 7-AAD-positiver Zellen auf ca. 7%<sup>42</sup>. Schloß sich an die einstündige Vorinkubation mit 500 ng/mL SM1/23 jedoch eine Inkubation mit 1  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M Arsentrioxid an, konnte keine Reduktion des Anteils der durch Arsentrioxid induzierten Annexin V-FITC-positiven<sup>43</sup> oder 7-AAD-positiven<sup>44</sup> Zellen festgestellt werden. Nach Koinkubation von 1  $\mu$ M Arsentrioxid mit 25 ng/mL CH11 stieg der Anteil apoptotischer Zellen auf über 70%<sup>45</sup> an. Für 5  $\mu$ M Arsentrioxid war der Anteil apoptotischer Zellen durch Zugabe von 25 ng/mL CH11 nur unwesentlich erhöht<sup>46</sup>.

---

<sup>38</sup> 63,11%  $\pm$  4,03% ( $p = 0,0224$ ) für Annexin V-FITC-positiv bzw. 64,95%  $\pm$  4,03% ( $p = 0,0022$ ) für 7-AAD-positiv Zellen.

<sup>39</sup> 25,47%  $\pm$  1,98% ( $p = 0,0029$ ) für Annexin V-FITC-positiv bzw. 23,61%  $\pm$  2,11% ( $p = 0,0024$ ) für 7-AAD-positiv Zellen.

<sup>40</sup> 80,87%  $\pm$  2,17% ( $p = 0,0002$ ) für Annexin V-FITC-positiv bzw. 79,49%  $\pm$  1,47% ( $p = 0,0001$ ) für 7-AAD-positiv Zellen.

<sup>41</sup> 8,20%  $\pm$  1,67%;  $p = 0,0253$  bei Vergleich mit den Isotyp-Kontrollansätzen.

<sup>42</sup> 6,59%  $\pm$  1,61%;  $p = 0,0103$  bei Vergleich mit den Isotyp-Kontrollansätzen.

<sup>43</sup> 34,92%  $\pm$  15,16% ( $p = 0,0347$  bei Vergleich mit dem Arsentrioxid-behandelten Isotyp-Kontrollansatz) für 1  $\mu$ M bzw. 86,32%  $\pm$  0,72% ( $p = 0,3983$  bei Vergleich mit dem Arsentrioxid-behandelten Isotyp-Kontrollansatz) für 5  $\mu$ M Arsentrioxid.

<sup>44</sup> 35,58%  $\pm$  10,65% ( $p = 0,0101$  bei Vergleich mit den Isotyp-Kontrollansätzen) für 1  $\mu$ M bzw. 81,26%  $\pm$  1,65% für 5  $\mu$ M ( $p = 0,1188$  bei Vergleich mit den Isotyp-Kontrollansätzen) Arsentrioxid.

<sup>45</sup> 73,79%  $\pm$  6,52% ( $p < 0,0001$  bei Vergleich mit dem Arsentrioxid-behandelten Isotyp-Kontrollansatz) für Annexin V-FITC-positiv bzw. 73,57%  $\pm$  7,16% ( $p < 0,0001$  bei Vergleich mit dem Arsentrioxid-behandelten Isotyp-Kontrollansatz) für 7-AAD-positiv Zellen.

<sup>46</sup> 90,88%  $\pm$  8,76% ( $p = 0,0068$  bei Vergleich mit dem Arsentrioxid-behandelten Isotyp-Kontrollansatz) für Annexin V-FITC-positiv bzw. 88,71%  $\pm$  4,22% ( $p < 0,0001$  bei Vergleich mit dem Arsentrioxid-behandelten Isotyp-Kontrollansatz) für 7-AAD-positiv Zellen.

In Jurkat-Zellen erfolgte die Apoptose-Induktion entweder durch 100 ng/mL 7C11 oder durch 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Arsentrioxid. Der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen betrug für 7C11 über 90%<sup>47</sup>, für 5  $\mu$ M Arsentrioxid ca. 20%<sup>48</sup> und für 10  $\mu$ M Arsentrioxid ca. 43%<sup>49</sup>. Durch einstündige Vorinkubation mit 1000 ng/mL des blockierenden Anti-CD95-Antikörpers SM1/23 reduzierte sich der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen im Fall einer 24-stündiger Inkubation mit 100 ng/mL CH11 auf ca. 10%<sup>50</sup>. Schloß sich an die einstündige Vorinkubation mit 500 ng/mL SM1/23 jedoch eine Inkubation mit 5  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M Arsentrioxid an, konnte keine Reduktion des Anteils der durch Arsentrioxid induzierten Annexin V-FITC-positiven Zellen festgestellt werden. Nach Koinkubation von 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Arsentrioxid mit 100 ng/mL 7C11 stieg der Anteil apoptotischer Zellen auf nahezu 100%<sup>51</sup>.

Der durch Koinkubation von 1  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M Arsentrioxid und 100 ng/mL 7C11 induzierte Anteil Annexin V-positiver Zellen konnte jedoch durch eine einstündige Vorinkubation mit 1000 ng/mL SM1/23 deutlich reduziert werden. Der Anteil betrug nach einstündiger Vorinkubation mit 1000 ng/mL SM1/23 für die Koinkubation von 5  $\mu$ M Arsentrioxid mit 100 ng/mL 7C11 ca. 25%<sup>52</sup>, für die Koinkubation von 10  $\mu$ M Arsentrioxid mit 100 ng/mL 7C11 ca. 60%<sup>53</sup>.

Interessanterweise stellte sich heraus, daß es keine Rolle spielte, ob eine einstündige Vorinkubation mit dem reprimierenden Antikörper SM1/23 vor der Apoptose-Induktion erfolgte oder ob der induzierende Antikörper 7C11 eine Stunde vor Inkubation mit SM1/23 zugegeben wurde (Daten nicht dargestellt).

#### 7.4.6 Die TNFRI- und TNFRII-Expression wird durch Arsentrioxid nicht moduliert

Da Arsentrioxid eindeutig keinen Einfluß auf die CD95-Expression besaß und durch Arsentrioxid-Behandlung auch keine Regulation der CD95-Expression erzielt werden konnte, wurde der Einfluß auf zwei weitere Rezeptoren untersucht, welche bei der

<sup>47</sup> 90,28%  $\pm$  4,50%;  $p = 0,0019$  bei Vergleich mit dem Isotyp-Kontrollansatz.

<sup>48</sup> 19,74%  $\pm$  2,40%;  $p = 0,0175$  bei Vergleich mit PBS.

<sup>49</sup> 43,05%  $\pm$  6,63%;  $p = 0,0149$  bei Vergleich mit PBS.

<sup>50</sup> 9,61%  $\pm$  1,39%;  $p = 0,6066$  bei Vergleich mit dem Isotyp-Kontrollansatz.

<sup>51</sup> 99,63%  $\pm$  0,10% für 5  $\mu$ M Arsentrioxid bzw. 99,60%  $\pm$  0,10% für 10  $\mu$ M Arsentrioxid.

<sup>52</sup> 26,50%  $\pm$  1,37%;  $p = 0,0401$  im Vergleich zur Inkubation mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid und den jeweiligen Isotyp-Kontrollen.

<sup>53</sup> 60,88%  $\pm$  4,28%;  $p = 0,1219$  im Vergleich zur Inkubation mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid und den jeweiligen Isotyp-Kontrollen.

Zytostatika-vermittelten Induktion der Apoptose, aber auch der Nekrose eine Rolle spielen. Es handelt sich hierbei um den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Typ I (TNFRI) bzw. den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Typ II (TNFRII). Die Expression von TNFRI (**Abbildung 31**) und TNFRII (**Abbildung 32**) auf den Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60, K-562, KG-1a und LOUCY wurde nach 2-, 6-, 12- bzw. 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von PBS, 10  $\mu$ M Arsentrioxid bzw. 75  $\mu$ M Etoposid im Durchflußzytometer bestimmt. Zur Kontrollfärbung diente ein jeweils unspezifischer Isotyp-Antikörper. Es konnte keine Veränderung des TNFRI-Expressionsmusters beobachtet werden. Lediglich für die Zelllinie K-562 ist die Abnahme der TNFRII-Expression nach Arsentrioxid-Behandlung diskutierbar.

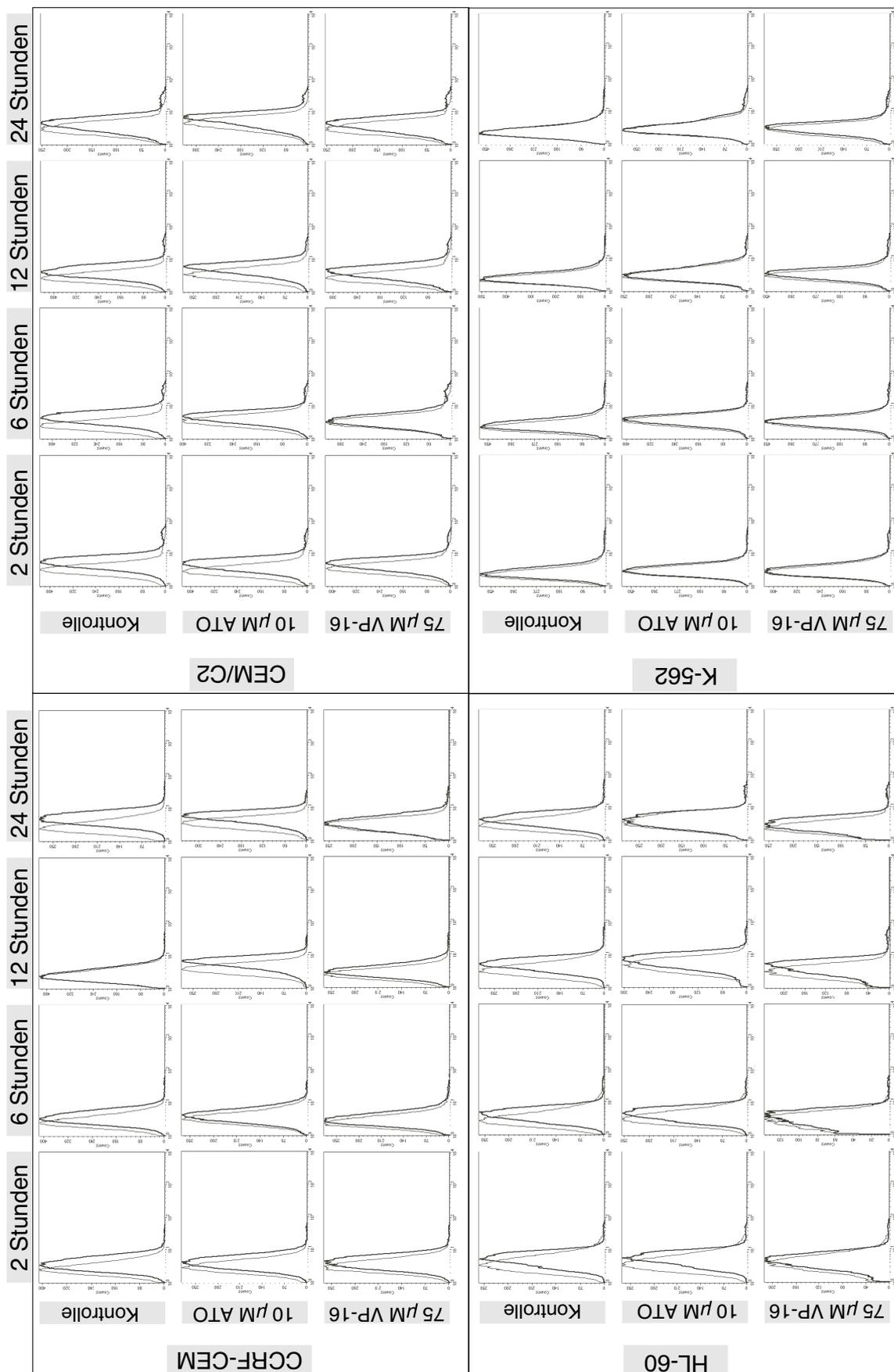


Abbildung 31(A): Histogrammdarstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der TNFRI-Expression in CCRF-CEM-, CEM/C2-, HL-60- und K-562-Zellen nach Apoptoseinduktion mit Arsentrioxid.

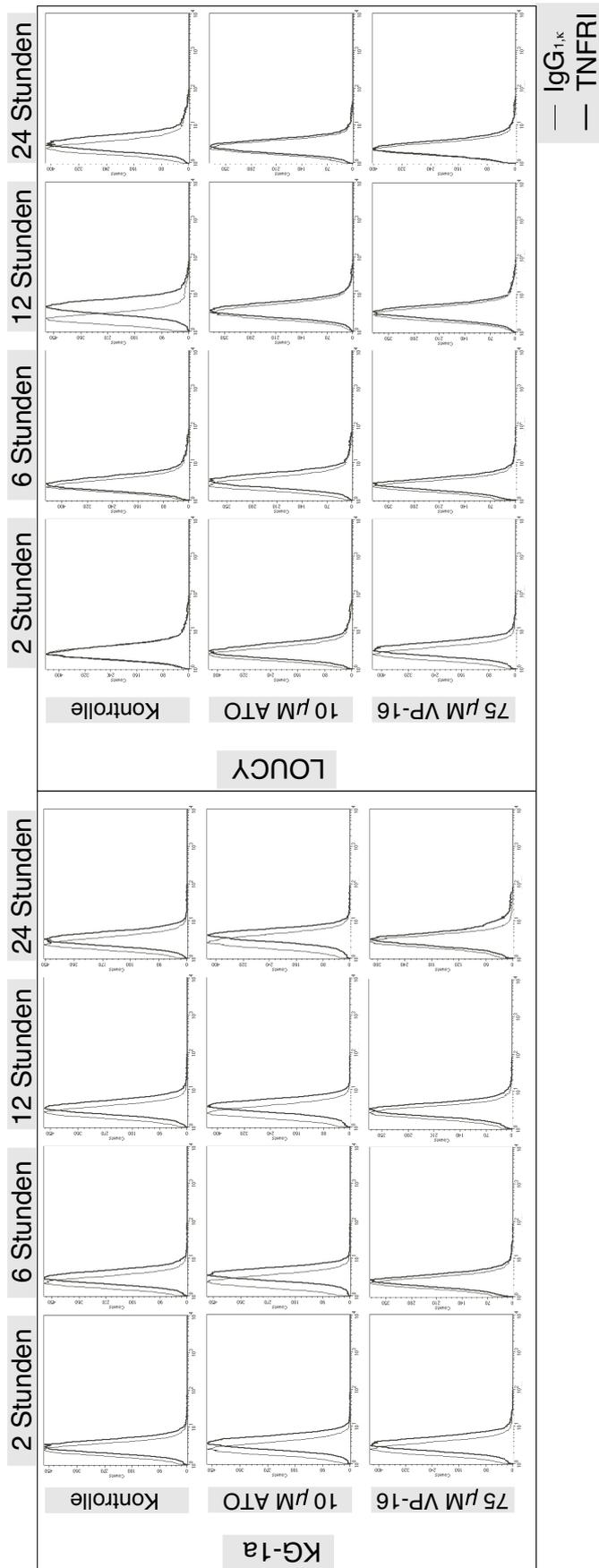


Abbildung 31(B): Histogrammdarstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der TNFR1-Expression in KG-1 und LOUCY nach Apoptoseinduktion mit Arsentrioxid.

**Abbildung 31:** Histogrammdarstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der TNFR1-Expression nach Apoptoseinduktion mit Arsentrioxid. Die TNFR1-Expression von je 50.000 Zellen der Zelllinien (A) CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60, K-562 bzw. (B) KG-1a und LOUCY wurden nach 2-, 6-, 12- bzw. 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von PBS, 10 μM Arsentrioxid bzw. 75 μM Etoposid im Durchflußzytometer mit einem FITC-gekoppelten, monoklonalen Maus-IgG<sub>1,k</sub>-Anti-Human-TNFR1-Antikörper bestimmt (dicke Linie). Zur Kontrollfärbung diente unspezifischer, FITC-gekoppelter, monoklonaler Maus-IgG<sub>1,k</sub>-Antikörper (dünne Linie). Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zugehörige Zellzahl. Es konnte keine Veränderung des TNFR1-Expressionsmusters beobachtet werden.

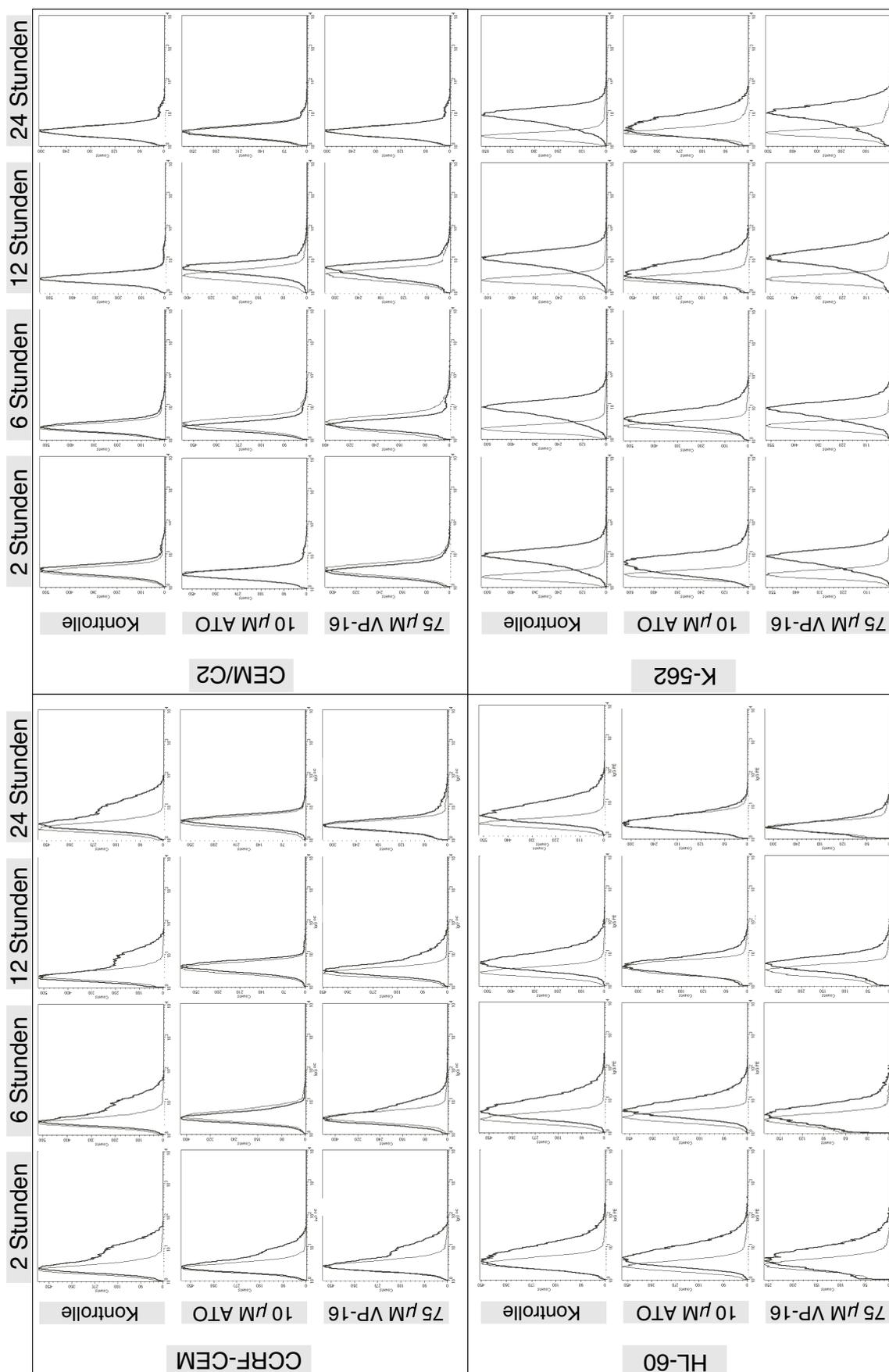


Abbildung 32(A): Histogrammdarstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der TNFR1-Expression in CCRF-CEM-, CEM/C2-, HL-60- und K-562-Zellen nach Apoptoseinduktion mit Arsentrioxid.

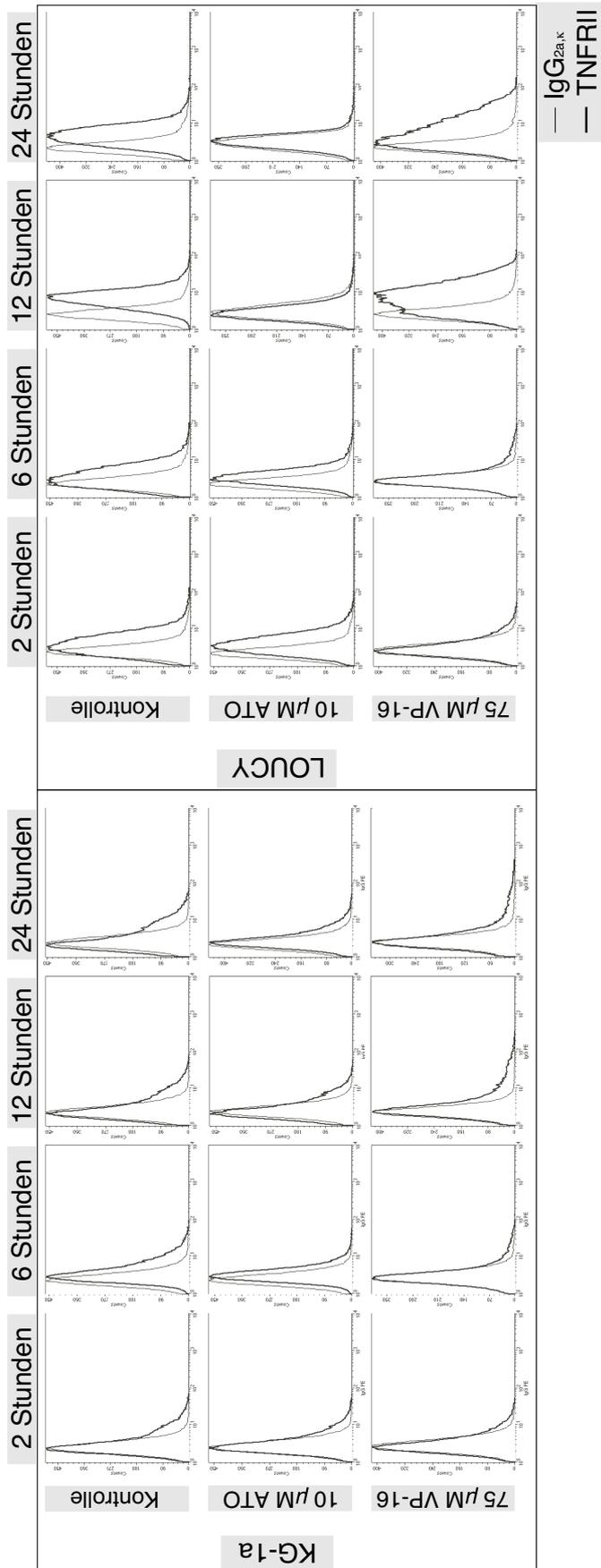


Abbildung 32(B): Histogrammдарstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der TNFR1I-Expression in KG-1 und LOUCY nach Apoptoseinduktion mit Arsentrioxid.

**Abbildung 32: Histogrammдарstellung der durchflußzytometrischen Bestimmung der TNFR1I-Expression nach Apoptose-Induktion mit Arsentrioxid.** Die TNFR1I-Expression von je 50.000 Zellen der Zelllinien (A) CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60, K-562 bzw. (B) KG-1a und LOUCY wurden nach 2-, 6-, 12- bzw. 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von PBS, 10 µM Arsentrioxid bzw. 75 µM Etoposid im Durchflußzytometer mit einem PE-gekoppelten, monoklonalen Maus-IgG<sub>2a,k</sub>-Anti-Human-TNFR1I-Antikörper bestimmt (dicke Linie). Zur Kontrollfärbung diente unspezifischer, PE-gekoppelter, monoklonaler Maus-IgG<sub>2a,k</sub>-Antikörper (dünne Linie). Die Maßeinheit für die Abszisse stellt die relative Fluoreszenzintensität dar, die für die Ordinate die zugehörige Zellzahl. Es konnte keine Veränderung des TNFR1I-Expressionsmusters beobachtet werden.

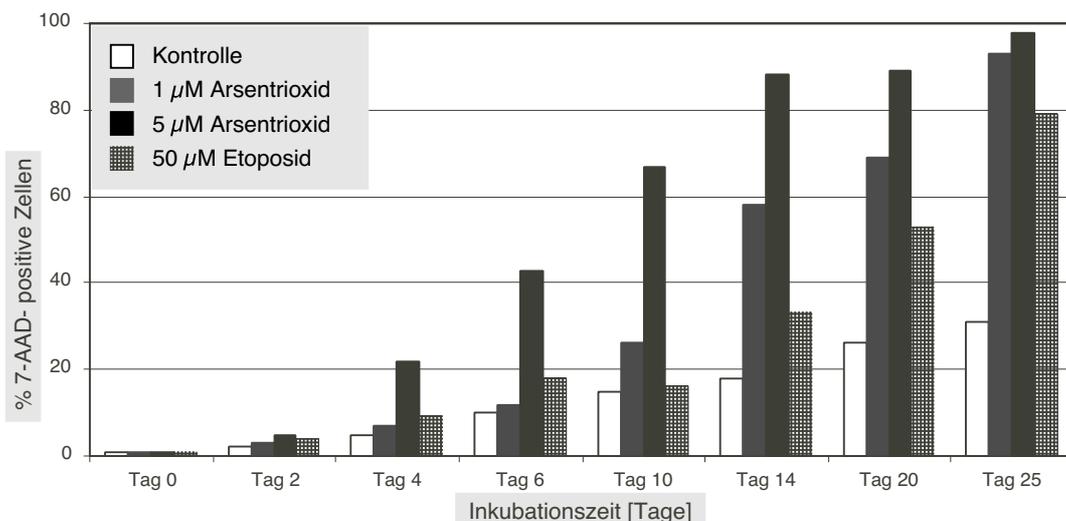
7.5 *Untersuchung mononukleärer Zellen von Patienten, welche für eine Arsentrioxid-Therapie im Vorfeld und Rahmen der klinischen Studie „Arsentrioxid zur Behandlung der AML bei Rezidiv, therapie-refraktärem Zustand oder > 70 Jahre und Kontraindikation für eine Standard-Polychemotherapie“ rekrutiert wurden, auf ihre Sensitivität gegenüber Arsentrioxid*

Seit Beginn der klinischen Studie 3/1999 konnten eine Patientin mit einer chronischen myelo-monozytären Leukämie (CMML) (Baldus, 2000) sowie ein Patient mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) rekrutiert werden. Nach Aufreinigung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut der an CMML erkrankten Patientin, wurden isolierte Zellen über einen Zeitraum von 25 Tagen in Anwesenheit von PBS, 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 50  $\mu\text{M}$  Etoposid kultiviert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durch Annexin V-FITC- und 7-AAD-Färbung unmittelbar nach der Isolierung (Zeitpunkt 0) sowie nach 2-, 4-, 6-, 10-, 14-, 20- und 25-tägiger Inkubation mit den angegebenen Substanzen bestimmt. **Abbildung 33** zeigt die Ergebnisse der 7-AAD-Färbungen. Nach vier Tagen stieg in dem mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid behandelten Ansatz der Anteil 7-AAD-positiver Zellen von 5% auf 22%, während nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bzw. 50  $\mu\text{M}$  Etoposid kaum ein Anstieg apoptotischer Zellen verzeichnet werden konnte<sup>54</sup>. Nach 10 Tagen betrug der Anteil apoptotischer Zellen bei Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid 67% und bei Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid 26%. Für die unbehandelten und mit 50  $\mu\text{M}$  Etoposid behandelten Zellen blieb der Prozentsatz 7-AAD-positiver Zellen jedoch bei 16%. Lediglich nach 20 Tagen stieg der Anteil apoptotischer Zellen bei Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Etoposid auf über 53%, lag damit aber deutlich unter dem Anteil apoptotischer Zellen in den mit 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid induzierten Ansätzen<sup>55</sup>. Allerdings betrug der Anteil 7-AAD-positiver Zellen in der unbehandelten Kontrolle bereits 26%.

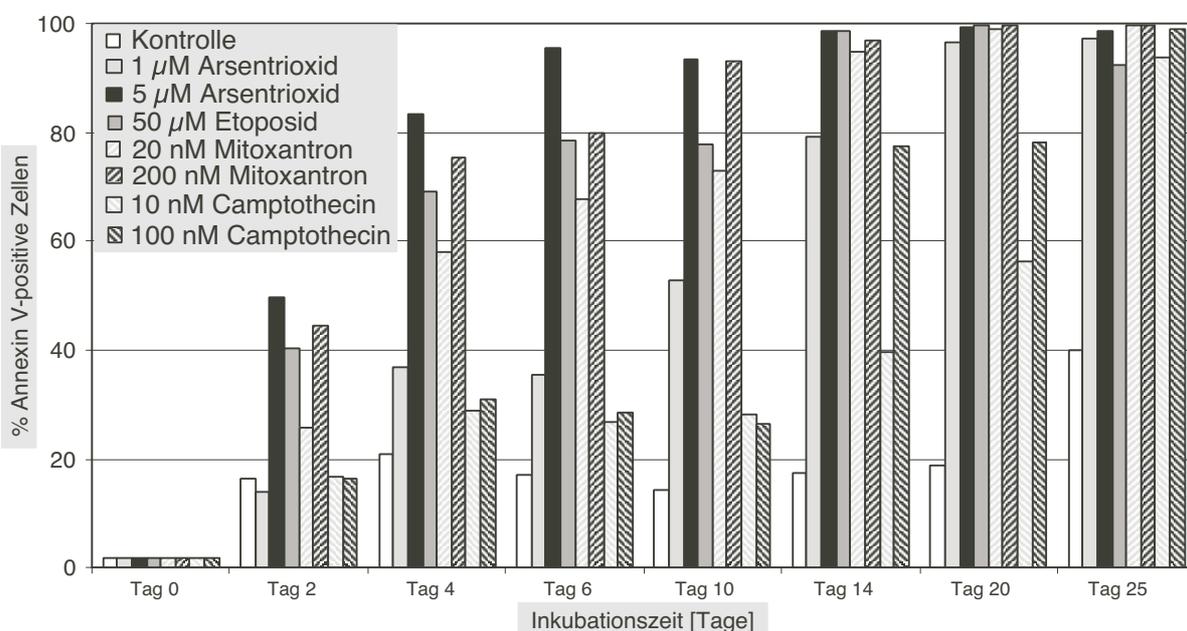
Wie bei der CMML-Patientin konnten mononukleäre Zellen eines AML-Patienten isoliert und in Kultur genommen werden (**Abbildung 34**).

<sup>54</sup> 7% bei Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid, bzw. 9% bei Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Etoposid; im Vergleich hierzu: der Anteil 7-AAD-positiver Zellen in der Kontrolle betrug 5%.

<sup>55</sup> ca. 70% für 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid und 90% für 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid.



**Abbildung 33: Apoptose-Induktion mit Arsentrioxid in mononukleären Zellen einer Patientin mit chronisch myelo-monozytärer Leukämie.** Mononukleäre Zellen wurden aus Vollblut der Patientin (mit multipler Resistenz gegen Zytostatika) durch Dichtegradientenzentrifugation in Ficoll isoliert und über einen Zeitraum von 25 Tagen in PBS (weiß), 1 μM (grau) oder 5 μM (schwarz) Arsentrioxid bzw. 50 μM Etoposid (gerastert) gehalten. Unmittelbar nach der Isolierung sowie nach 2, 4, 6, 10, 14, 20 und 25 Tagen erfolgte der Nachweis apoptotischer Zellen durch 7-AAD-Färbung. Je Ansatz wurden die Fluoreszenzintensitäten von 50.000 Zellen gemessen. Näheres siehe Text.



**Abbildung 34: Apoptose-Induktion mit Arsentrioxid in mononukleären Zellen eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.** Mononukleäre Zellen wurden aus Vollblut des Patienten durch Dichtegradientenzentrifugation in Ficoll isoliert und über einen Zeitraum von 25 Tagen in Anwesenheit von Arsentrioxid bzw. unterschiedlicher Zytostatika (siehe Legende) inkubiert. Unmittelbar nach der Isolierung sowie nach 2, 4, 6, 10, 14, 20 und 25 Tagen erfolgte der Nachweis apoptotischer Zellen durch Annexin V FITC-Färbung. Je Ansatz wurden die Fluoreszenzintensitäten von 50.000 Zellen gemessen. Näheres siehe Text.

Die Inkubation mit Arsentrioxid (1  $\mu\text{M}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$ ) sowie konventionellen Zytostatika (50  $\mu\text{M}$  Etoposid, 20 nM bzw. 200 nM Mitoxantron, 10 nM bzw. 100 nM Camptothecin) erfolgte abermals über einen Zeitraum von 25 Tagen. Die Probenentnahme zur Bestimmung des Prozentsatzes Annexin V-FITC-positiver Zellen aus den jeweiligen Kulturansätzen fand zu den gleichen Zeitpunkten statt wie bei der CMML-Patientin beschrieben. Bereits nach zweitägiger Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid war eine deutliche Zunahme des Anteils Annexin V-FITC-positiver Zellen von 2% auf 50% zu verzeichnen. Nach vier Tagen stieg bei dem mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid behandelten Ansatz der Anteil Annexin V-FITC-positiver Zellen in der Kontrolle bereits von 2% auf über 16%. Nach 10 Tagen stieg der Anteil apoptotischer Zellen bei Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid auf 93% und bei Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid auf 53%. Mit 50  $\mu\text{M}$  Etoposid und 20 nM bzw. 200 nM Mitoxantron konnte in über 70% der Zellen Apoptose induziert werden<sup>56</sup>. Lediglich in den mit 10 nM oder 100 nM Camptothecin behandelten Ansätzen stieg der Anteil apoptotischer Zellen nur gering an<sup>57</sup>. Für die unbehandelten Zellen blieb der Prozentsatz Annexin V-FITC-positiver Zellen jedoch mit 14% nahezu konstant.

---

<sup>56</sup> Der Anteil apoptotischer Zellen am Tag 0 betrug in allen Ansätzen 2% und stieg nach 10-tägiger Behandlung mit: 50  $\mu\text{M}$  Etoposid auf 78%, 20 nM Mitoxantron auf 78% und 200 nM Mitoxantron auf 93%.

<sup>57</sup> Der Anteil apoptotischer Zellen am Tag 0 betrug in allen Ansätzen 2% und stieg nach 10-tägiger Behandlung mit: 10 nM Camptothecin auf 28% und 100 nM Camptothecin auf 27%.