

## 8. Diskussion

Die zunehmende Bedeutung von Arsentrioxid bei der Therapie refraktärer APL (Chen, 1997; Shen, 1997; Ni, 1998; Soignet, 1998; Tallman, 1998; Agis, 1999; Hu, 1999; Niu, 1999; Hu, 2000; Soignet, 2001a; Soignet, 2001b; Higgins, 2002; Lo Coco, 2002; Tallman, 2002) war die Veranlassung, den Effekt von Arsentrioxid auch in einer Reihe von lympho-hämatopoetischen Nicht-APL-Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades zu analysieren. Wie in der Einleitung (Abschnitt 3.1.3 *Arsentrioxid und APL*) beschrieben, bewirkt Arsentrioxid dieselben Effekte in APL-Zellen wie ATRA: Differenzierung bzw. Wachstumsinhibition (Huff, 1999; Zhu, 1999), Apoptose-Induktion (Chen, 1996; X.J. Huang, 1999; Huff, 1999; Jing, 1999; Zhu, 1999; X. Huang, 2000; Kitamura, 2000; Perkins, 2000) und Abbau des durch PIC-1/SUMO-1 „markierten“, in *nuclear bodies* kondensierten Fusionsproteins (Muller, 1998a; Muller, 1998b; Sternsdorf, 1999; Lallemand-Breitenbach, 2001).

### 8.1 *Induktion der Apoptose in lympho-hämatopoetischen Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades*

Die systematische Untersuchung, ob Arsentrioxid auch in der Lage ist, in Nicht-APL-Zelllinien des hämatopoetischen Systems Apoptose zu induzieren, führte bei der Analyse der in dieser Arbeit untersuchten 22 Zelllinien<sup>58</sup> zu einer klaren Aussage: In allen untersuchten Zelllinien konnte durch therapeutisch erzielbare Konzentrationen von Arsentrioxid Apoptose induziert werden. Die Zelllinien unterschieden sich jedoch hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Arsentrioxid. Unterschiedliche Schwellenkonzentrationen und Inkubationszeiten wurden benötigt, um Apoptose in den jeweiligen Zelllinien zu induzieren. Gemäß ihrer Sensitivität konnte eine Systematik der Arsentrioxid-Sensitivität eingeführt werden (vgl. **Tabelle 2**, **Abbildung 2** und **Abbildung 3**) (Rojewski, 2000a; Rojewski, 2000c; Schrezenmeier, 2000; Rojewski, 2002): Sensitivitätsgruppe A vereinte alle Zelllinien, in welchen bereits eine Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid in der Lage war, Apoptose zu induzieren. In der Sensitivitätsgruppe B wurden solche Zelllinien zusammengefaßt, in denen

---

<sup>58</sup> Bei den in der Arbeit untersuchten Zelllinien handelt es sich mit Ausnahme der Zelllinie NB-4 um Zelllinien ohne t(15;17). Um sicherzustellen, daß keine weitere Zelllinie mit t(15;17) vorlag, wurden alle Zelllinien im zytogenetischen Routinelabor der Medizinischen Klinik III am UKBF der FU-Berlin auf das Vorhandensein von t(15;17) einer PCR unter Anwendung des SOP untersucht. Die häufig den APL-Zelllinien zugerechneten HL-60 Zellen besitzen keine t(15;17), sondern gehören zu den sog. atypischen APL-Zelllinien mit einer t(5;17) und t(16;17).

Apoptose erst durch Konzentrationen von  $\geq 1 \mu\text{M}$  Arsentrioxid und in Sensitivitätsgruppe C solche Zelllinien, in denen Apoptose erst durch Konzentrationen von  $\geq 5 \mu\text{M}$  Arsentrioxid induziert werden konnte. Die zur Apoptose-Induktion benötigte Inkubationszeit mit Arsentrioxid zeigte ein breites Variationsspektrum. Bei einigen der untersuchten Zelllinien (z. B. HL-60, K-562, HEL, Jurkat) waren relativ lange Inkubationszeiten notwendig. Diese Tatsache sollte bei der Etablierung von Therapieschemata berücksichtigt werden. Bei klinischen Studien über Arsentrioxid bei refraktärer APL liegen die mittleren Therapiezeiten zwischen 31 Tagen (Niu, 1999) und 47 Tagen (Soignet, 1998). Geht man davon aus, daß typische (NB-4) und atypische (HL-60) APL-Zelllinien (Sensitivitätsgruppe B) im Vergleich z. B. mit HEL-, K-562- oder U937-Zellen (Sensitivitätsgruppe C) relativ empfindlich gegenüber Arsentrioxid sind, könnte bei der Therapie von Nicht-APL-Leukämien ein längerer Zeitraum notwendig sein als bei der APL, um eine komplette Remission zu erzielen. Ein Großteil der Titrations wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei den einzelnen Experimenten teilweise eine gewisse Variabilität innerhalb der jeweiligen Zelllinien existierte. Diese hatte jedoch keinen Einfluß auf das Grundmuster der Sensitivität und die Zugehörigkeit zu einer Sensitivitätsgruppe. Es bestand offensichtlich kein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungszustand der lympho-hämatopoetischen Zelllinien oder dem Gewebe, aus welchem sie isoliert wurden, und deren Sensitivität gegenüber Arsentrioxid (vgl. **Tabelle 2**). Das Vorhandensein des Differenzierungsmarkers CD90 (Thy-1), welcher vor allem auf frühen hämatopoetischen, sehr unreifen CD34-positiven oder CD34-negativen, CD3- und CD4-positiven Zellen auftritt, ermöglichte, anders als bei Hossain et al. (Hossain, 2000) diskutiert, keine Aussage über die Arsentrioxid-Sensitivität der jeweiligen Zelllinie (vgl. die Ergebnisse in **Tabelle 2** und **Abbildung 7**). Ebenso bestand kein Zusammenhang zwischen der CD95-Expression und der Sensitivität gegenüber Arsentrioxid (**Abbildung 25**), da sowohl LOUCY-Zellen (Sensitivitätsgruppe A), 697-, KG-1a-, CCRF-CEM-, CEM/C2-, NC-NC- und HL-60-Zellen (Sensitivitätsgruppe B) als auch HL-60/MX2 und Jurkat-Zellen (Sensitivitätsgruppe C) CD95 exprimierten. Lediglich zwei der auf CD95-Expression untersuchten Zelllinien, nämlich die am wenigsten Arsentrioxid-sensitiven Zelllinien K-562 und K-562(0.1), exprimierten kein CD95. Eine fehlende Regulation von CD95 nach Arsentrioxid-Behandlung von Zellen des hämatopoetischen Systems stehen auch im Einklang mit der Arbeit von Kitamura et al. (Kitamura, 2000). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, daß Arsentrioxid in der Lage ist, auch in Nicht-APL-Zelllinien Apoptose zu induzieren, vorausgesetzt, die eingesetzte

Arsentrioxid-Konzentration wurde über einen ausreichend langen Zeitraum appliziert. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß die in dieser Arbeit bei diesen Experimenten verwandten Arsentrioxid-Konzentrationen durchaus pharmakologisch erzielbar waren, d. h. denen im Plasma von mit Arsentrioxid behandelten Patienten entsprachen (Shen, 1997; Ni, 1998). Darüber hinaus erfolgte die Inkubation mit Arsentrioxid über einen einer Arsentrioxid-Therapie bei APL entsprechenden Zeitraum (Shen, 1997; Soignet, 1998; Hu, 1999; Hu, 2000; Soignet, 2001a).

Die Ergebnisse zur Apoptose-Induktion wurden (z. T. während der Durchführung der Experimente) durch mehrere Publikationen über Apoptose-Induktion mit Arsentrioxid in hämatopoetischen<sup>59</sup> und nicht-hämatopoetischen<sup>60</sup> Zelllinien bestätigt. Lediglich die von Lu et al. (Lu, 1999) berichtete Unempfindlichkeit von HL-60-Zellen gegenüber Arsentrioxid konnte nicht nachvollzogen werden. Dies ist unter Umständen darauf zurückzuführen, daß die Apoptose-Induktion bei Lu et al. nur über einen Zeitraum von 24 Stunden mit einer Konzentration von 2  $\mu$ M Arsentrioxid durchgeführt wurde. Andererseits konnten Lu et al. (Lu, 1999) in NB-4- und HEL-Zellen Apoptose-Induktion nach 24-stündiger Inkubation mit 2  $\mu$ M Arsentrioxid im TUNNEL-Assay beobachten. Ein direkter Vergleich der hier präsentierten Ergebnisse mit den Ergebnissen von Lu et al. (Lu, 1999) ist nicht möglich, da in deren Arbeit Arsentrioxid nur in einer Konzentration 2  $\mu$ M eingesetzt wurde. Eventuell stellt der in der Arbeit von Lu et al. (Lu, 1999) beschriebene TUNNEL-Assay zum Nachweis apoptotischer Zellen eine sensitivere Methode dar als der Annexin V/7-AAD-Nachweis. Die Ergebnisse erscheinen jedoch widersprüchlich, zumal in den Experimenten der hier präsentierten Arbeit apoptotische HL-60-Zellen nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid zu einem relativ frühen Zeitpunkt nachgewiesen werden konnten, jedoch eine mehrtägige Inkubation mit 5  $\mu$ M Arsentrioxid notwendig war, um in HEL-Zellen Apoptose zu induzieren.

## 8.2 *Induktion der Apoptose in lympho-hämatopoetischen Zytostatika-resistenten Zelllinien*

Für die bisherigen klinischen Studien zur Verwendung von Arsentrioxid bei Nicht-APL-Leukämien wurden überwiegend AML-Patienten mit multiplen Resistenzen gegenüber konventionellen Zytostatika rekrutiert. Daher war es von besonderem Interesse, anhand mehrere Zytostatika-resistenter Zelllinien zu testen, ob eine

---

<sup>59</sup> Siehe auch **Tabelle 1** Abschnitt 3.3 für die Zelllinien HL-60 (Wang, 1998; X.J. Huang, 1999), K-562 (Perkins, 2000), KG-1 (Wang, 1998), U937 (Wang, 1998; Iwama, 2001) und für die Zelllinie Jurkat (Zhang, 2001).

<sup>60</sup> Siehe auch **Tabelle 1** im Abschnitt 3.3.

Resistenz gegenüber konventionellen Zytostatika wie z. B. Camptothecin, Etoposid, Mitoxantron oder Doxorubicin einen Einfluß auf die Sensitivität gegenüber Arsentrioxid bewirken kann und Kreuzresistenzen zwischen klassischen Zytostatika und Arsentrioxid existieren (Rojewski, 2000a; Rojewski, 2000c; Schrezenmeier, 2000; Rojewski, 2002). Zur Untersuchung kamen die drei Zelllinien CCRF-CEM, HL-60 und K-562 sowie die Camptothecin-resistenten CCRF-CEM-Derivate CEM/C1 und CEM/C2, die Mitoxantron-resistenten HL-60-Derivate HL-60/MX1 und HL-60/MX2 sowie die Doxorubicin-resistenten K-562-Derivate K-562(0.02) und K-562(0.1). Die Zelllinie LOUCY entstammt einer Patientin mit multipler Resistenz gegenüber Zytostatika, bei der nie eine komplette Remission erzielt werden konnte (vgl. Kapitel *Material*). Außerdem wurden die peripheren mononukleären Zellen von zwei Patienten mit multiplen Resistenzen untersucht, welche im Rahmen einer Arsentrioxid-Studie rekrutiert wurden. In allen Zelllinien bzw. primären Zellen konnte durch Arsentrioxid Apoptose induziert werden. Die Zelllinie LOUCY stellte sich als besonders sensitiv gegenüber Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid heraus (Sensitivitätsgruppe A).

Die aus den Patienten mit AML bzw. CMML isolierten primären mononukleären Zellen lieferten ebenfalls Hinweise, daß Arsentrioxid in der Lage ist, in primären Zellen von Patienten mit multiplen Zytostatika-Resistenzen Apoptose zu induzieren (Baldus, 2000).

In den 6 Zytostatika-sensitiven Derivaten konnte, ebenso wie in deren parentalen Zelllinien, Apoptose induziert werden. Nur im Fall der Mitoxantron-resistenten Zelllinien HL-60/MX1 und HL-60/MX2 zeigte sich eine Verschiebung des Sensitivitätsmusters. Die parentale Zelllinie war deutlich sensitiver gegenüber Arsentrioxid (Sensitivitätsgruppe B) als deren Mitoxantron-resistente Derivate (Sensitivitätsgruppe C).

Die Untersuchungen zur Expression und Regulation zweier wichtiger, bei der Vermittlung von Zytostatika-Resistenzen beteiligter Proteine lieferte keinen Hinweis auf die Induktion dieser Proteine durch Arsentrioxid (**Abbildungen 4 bis 6**). Die Expression von MDR-1 wurde bei keiner der 9 untersuchten Zelllinien durch Arsentrioxid auf Proteinebene moduliert. Auch schien es keinen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von MDR-1 und der Sensitivität gegenüber Arsentrioxid zu geben (**Abbildung 4**). Lediglich 4 der 16 auf MDR-1-Expression untersuchten Zelllinien exprimierten MDR-1: K-562 und deren Doxorubicin-resistente Derivate K-562(0.02) und K-562(0.1) sowie die Zelllinie KG-1a. Zwar waren die

Zelllinie K-562 und deren Derivate relativ unempfindlich gegenüber Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid (Sensitivitätsgruppe C), jedoch fällt die Zelllinie KG-1a (wie auch die MDR-1-negativen Zelllinien HL-60, 697, NB-4, CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60) in die Sensitivitätsgruppe B. Jurkat-Zellen gehören der Sensitivitätsgruppe C an und sind MDR-1-negativ.

Auch eine Kultivierung der Camptothecin-resistenten Zelllinien CEM/C1 und CEM/C2 in Camptothecin und der Mitoxantron-resistenten Zelllinien HL-60/MX1 und HL-60/MX2 in 4  $\mu$ M Arsentrioxid über einen Zeitraum von 4 Monaten hatte keinen Einfluß auf die Expression von MDR-1 (**Abbildung 4**).

Der durch Arsentrioxid-Behandlung induzierte Schutzmechanismus gegen Arsenite, wie er von Sok et al. (Sok, 2001) für primäre Kulturen muriner Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere durch das Arsenit-induzierbare RNA-assoziierte Protein (AIRAP) beschrieben wurde, wirkte sich auf die Arsentrioxid-Behandlung lympho-hämatopoetischer Vorläufer-Zelllinien nicht aus.

Kioka et al. (Kioka, 1992) berichteten über die Induktion von MDR-1 durch  $\text{NaAsO}_2$  in Adenokarzinoma-Zelllinien und humanen Hepatozyten-Zelllinien auf Proteinebene (Western) und RNA-Ebene (Slot-Blot), Verneht et al. über die Induktion von MRP2 in primären Hepatozyten von Ratte und Mensch (Verneht, 2001b) und MRP1 in Lungentumor-Zelllinien (Verneht, 2001a).

Eine Regulation der Expression von MDR-1 in Zelllinien des hämatopoetischen Systems erscheint unwahrscheinlich. Die Diskrepanz zur Arbeit von Kioka et al. (Kioka, 1992) könnte u. a. auch auf die extrem hohe eingesetzte Dosis von 100  $\mu$ M  $\text{NaAsO}_2$  zurückzuführen sein. Quantitative regulatorische Untersuchungen mit hämatopoetischen Zelllinien auf RNA-Ebene ließen keinen Rückschluß auf eine Regulation der MDR-1-RNA nach Behandlung der Zelllinien mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid für 24 Stunden zu, zeigten jedoch eine positive Regulation der LRP-RNA (Daten nicht gezeigt, eigene Beobachtungen, pers. Kommunikation mit Frau Heufelder, Medizinische Klinik III am UKBF, FU-Berlin).

Für das Protein LRP konnten im Durchflußzytometer in den Zelllinien CCRF-CEM, HL-60, Jurkat und K-562 jedoch keine regulatorischen Effekte nach Arsentrioxid-Behandlung beobachtet werden (**Abbildung 6**), da LRP auf Protein-Ebene in allen untersuchten Zelllinien bereits stark exprimiert wurde.

Unabhängig von einer möglichen Regulation von LRP zeigten die Untersuchungen an Zytostatika-resistenten Zelllinien, daß Arsentrioxid vor allem bei der Therapie Zytostatika-resistenter Leukämien Verwendung finden könnte.

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

Der Vergleich von 987 Doppelmarkierungen von Annexin V-FITC und 7-AAD, welche im Rahmen der Langzeit-Titrationsen durchgeführt wurden, ergaben einen Korrelationskoeffizient von  $r^2 = 0,989$  ( $p < 0,0001$ , **Abbildung 8**) (Rojewski, 2002). Auf Grund dieser hohen Korrelation wurde bei einigen Experimenten auf eine Doppelmarkierung verzichtet, zumal eine solche mit Annexin V-FITC und 7-AAD aus technischen Gründen nicht immer möglich war. Doppelmarkierungen von Annexin V-FITC und 7-AAD konnten u. a. nicht durchgeführt werden bei Messungen, in denen gleichzeitig mit Annexin V-FITC die Fluoreszenzen der Farbstoffe MitoTrackerRed-CMXRos und MitoTrackerRed CH<sub>2</sub>MXRos zum Nachweis der mitochondrialen Integrität oder PKH67 zum Nachweis der Zellproliferation gemessen wurden.

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

Neben dem Effekt der Apoptose-Induktion besitzt Arsentrioxid offensichtlich die Fähigkeit, die Proliferation aller in dieser Arbeit getesteten Leukämie- und Lymphomzelllinien zu inhibieren (**Abbildung 10**). Zelllinien, wie beispielsweise 697, Jurkat, HL-60, U937, PBL-987, K-562, KG-1 oder HEL, die nur wenig sensitiv oder völlig unempfindlich gegenüber Apoptose-Induktion durch 1  $\mu$ M Arsentrioxid waren, wiesen eine eindeutige Inhibition der Proliferationsrate nach 10-tägiger Inkubation mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid auf. Wachstumsinhibition konnte selbst bei den Doxorubicin-resistenten Derivaten der Zelllinie K-562 (i. e. K-562(0.02) und K-562(0.1)) beobachtet werden. Lediglich die Mitoxantron-resistenten Derivate der Zelllinie HL-60 (i. e. HL-60/MX1 oder HL-60/MX2) zeigten keine oder nur eine geringe Inhibition der Proliferationsrate.

Untersuchungen zum Expressionsprofil des Proliferationsmarkers Ki67 (**Abbildung 11** und **Abbildung 12**) zeigten, daß die Proliferationsinhibition unabhängig von der Ki67-Expression ist. Eine (jedoch nicht signifikante) Verringerung der Ki67-Expression und die Asynchronisierung der Ki67-Expression ist diskutierbar (Rojewski, 2002). Dieses Ergebnis bestätigt die *in vivo*-Experimente an Neuroblastomzellen (Ora, 2000). In den mit Arsentrioxid behandelten Neuroblastom-zellen erfolgt keine Regulation des Proliferationsmarkers Ki67.

Wie den DNA-Histogrammen in **Abbildung 13** der Propidiumiodid-Färbungen zu entnehmen ist, führte die Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid dennoch nicht zum Zellzyklusarrest. Das Verhältnis von Zellen in der  $G_0$ - und in der  $G_1$ -Phase blieb nach 14-tägiger Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert (**Abbildung 13**) (Rojewski, 2002). Ein Arrest des Zellzyklus wurde zwar bereits mehrfach beschrieben (Eguchi, 1997; Li, 1999; Lu, 1999; Seol, 1999; Zhu, 1999; S. Huang, 2000; Ora, 2000; Park, 2000; Darwiche, 2001; Park, 2001; Vega, 2001), allerdings handelt es sich bei den hierbei beobachteten Phänomenen um Effekte bei Zelllinien, welche keine Verbindung zum hämatopoetischen System besitzen, oder aber um Effekte, die durch hohe, auch die Apoptose auslösende Konzentrationen Arsentrioxids hervorgerufen wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit befinden sich im Einklang mit der Arbeit von Park et al. (Park, 2001), welche berichten, daß Arsentrioxid in Konzentrationen unter 2  $\mu\text{M}$  in U937-Zellen keinen  $G_2$ /M-Arrest auszulösen vermag. Konzentrationen über 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid sind hierzu jedoch in der Lage. Eine neuere Publikation (Oketani, 2002) beschreibt die Arsentrioxid-induzierte Proliferationsinhibition in der humanen hepatozelluären Karzinoma-Zelllinie HuH 7 und der humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2. In Zellzyklusanalysen mit Propidiumiodid beobachteten Oketani et al. ebenfalls eine Zunahme der Sub- $G_0$ -Population bei einer gleichzeitigen Abnahme der Zellen in der  $G_0$ / $G_1$ -Phase in HuH7-Zellen nach 72-stündiger Behandlung der zellen mit 1  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid. Vergleichbare Effekte erzielten sie in HepG2-Zellen mit Arsentrioxid-Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$ . Die Ergebnisse dieser Experimente, welche nicht an Zellen des hämatopoetischen Systems durchgeführt wurden, bestätigen die Messungen dieser Arbeit und lassen auf eine Zelllinien-unabhängigen Arsentrioxid-induzierte Proliferationsinhibition schließen.

Ein möglicher Mechanismus, über welchen Arsentrioxid eine Proliferationsinhibition auslösen könnte, stellt die Arsentrioxid-vermittelte Inhibition der Tubulin-Aggregation (Li, 1999) bzw. der Mikrotubuli-Aggregation (Ramirez, 1997) dar. Arsentrioxid bindet *in vivo* an mindestens vier humane Proteine, zu denen auch Tubulin und Aktin gehören (Menzel, 1999). Eine Arsentrioxid-vermittelte Vernetzung von DNA mit Proteinen (Ramirez, 2000) könnte für die Proliferationsinhibition ebenfalls in Betracht gezogen werden.

### 8.5 *Die Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid führt zur Bildung von ROS und zu einer Aktivierung von Caspasen, ist jedoch CD95- und Caspasen-unabhängig*

#### 8.5.1 *Die Aktivierung von Caspasen durch Arsentrioxid*

Der Mechanismus, über welchen Arsentrioxid Apoptose induziert, wurde bisher nur unzureichend untersucht. Wie in **Tabelle 1** zusammengefaßt, gibt es zahlreiche Hinweise auf einen möglichen Mechanismus. Eine Beteiligung von Caspasen bei der Arsentrioxid-induzierten Apoptose wird als sehr wahrscheinlich angenommen. Die Aktivierung von Caspase-8 (Kitamura, 2000) und Caspase-3 (X.J. Huang, 1999) in APL-Zelllinien scheint ebenso von Bedeutung zu sein wie die Aktivierung von Caspase-3 in Nicht-APL-Zelllinien (Perkins, 2000). Auch für *in vivo*-Modelle des hämatopoetischen Systems wird von einer Aktivierung bestimmter *downstream*-Caspasen wie z. B. der Caspase-1 bei mit drei- und fünfwertigen anorganischen Arsensalzen behandelten Mäusen (Liu, 2001) ausgegangen.

Hinsichtlich des Mechanismus, durch welchen Apoptose in den unterschiedlichen primären Zellen und Zelllinien ausgelöst wird, ergibt sich kein einheitliches Bild, was unter anderem auf die verschiedenen Versuchsdurchführungen (Variabilität der Inkubationszeiten mit Arsentrioxid, verschiedene Konzentrationen von Arsentrioxid, Heterogenität der untersuchten Zelllinien, der primären Leukämie- und Tumorzellen und Gewebematerial aus unterschiedliche Spezies) zurückzuführen sein kann.

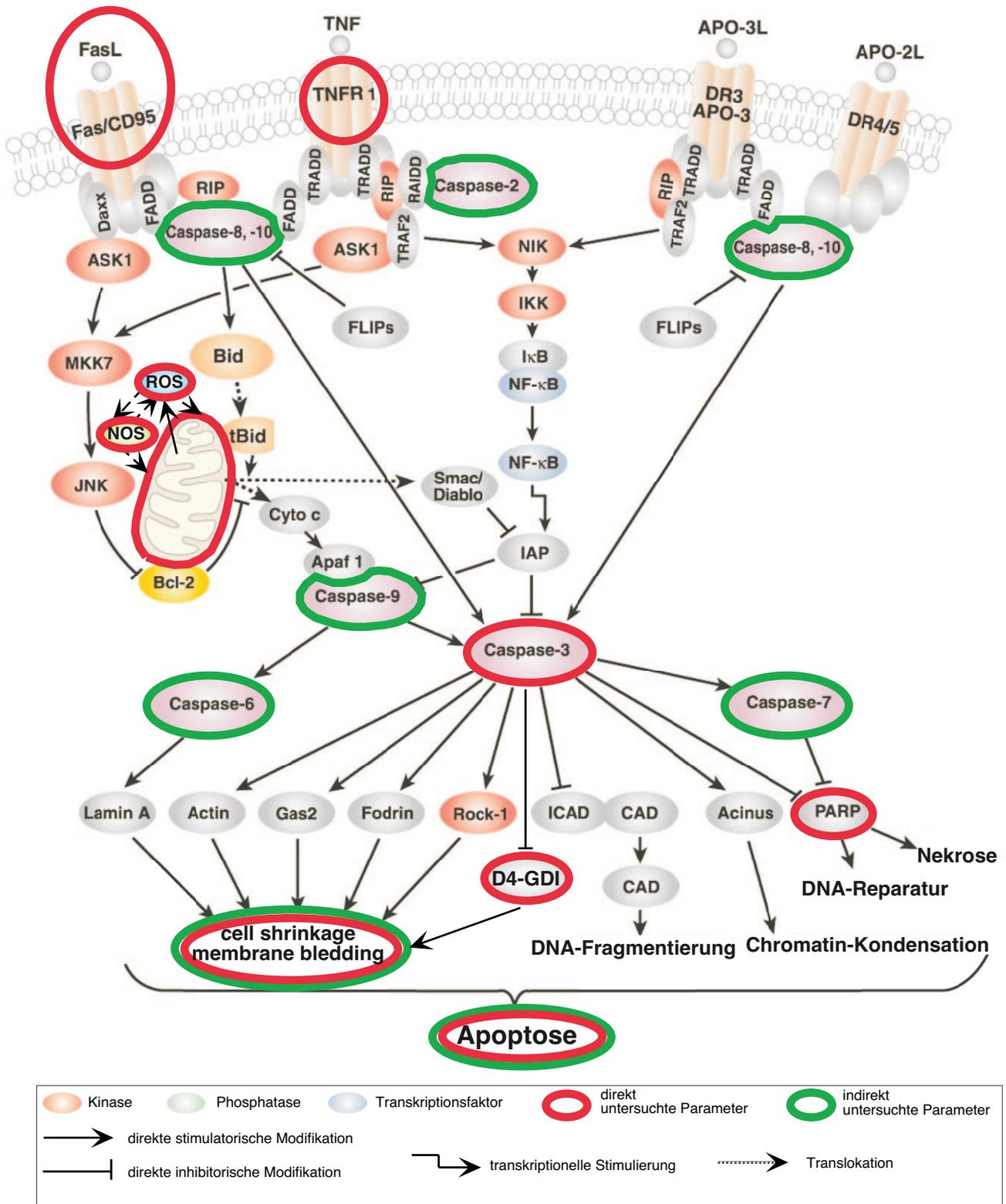
Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente fokussierten sich auf den Nachweis von aktivierter Caspase-3, von Spaltprodukten Caspase-3-spezifischer Substrate (D4-GDI, PhiPhiLux D<sub>2</sub>G<sub>2</sub>) und von Caspase-3-, Caspase-7- und Caspase-9-

spezifischen Substraten (PARP) sowie auf den funktionellen Nachweis von Caspase-3 bzw. Caspase-1 und Caspase-4 nach Arsentrioxidbehandlung in den Zelllinien CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, K-562, K-562(0.02), K-562(0.1), LOUCY, 697, Jurkat sowie KG-1a. Durch die Verwendung dieser Zelllinien konnte gewährleistet werden, daß mindestens je ein Vertreter der unterschiedlichen Sensitivitätsgruppen und Zelllinien mit unterschiedlichen Zytostatika-Resistenzen untersucht wurden. Eine übersichtliche Darstellung aller direkt und indirekt untersuchter Caspasen (bzw. deren Aktivitätsnachweis oder die Hemmung deren Aktivitäten) ist den **Abbildungen 35** und **36** zu entnehmen.

Die durchflußzytometrischen Ergebnisse (Rojewski, 2001a; Rojewski, 2001b) bestätigten die bisher in der Literatur beschriebenen Daten insofern, als in nahezu allen Zelllinien eine Aktivierung von Caspase-3 nach 24-stündiger Arsentrioxid-Behandlung (Konzentration 10  $\mu$ M) beobachtet werden konnte. In einigen Fällen war der direkte Nachweis aktivierter (i. e. gespaltener) Caspase-3 nicht oder nur bedingt möglich. Der Nachweis gespaltener Caspasen-Substrate, wie PhiPhiLux G<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, D4-GDI und PARP, lieferte, wie dies bei einer enzymatischen Reaktion zu erwarten war, aussagekräftigere Ergebnisse.

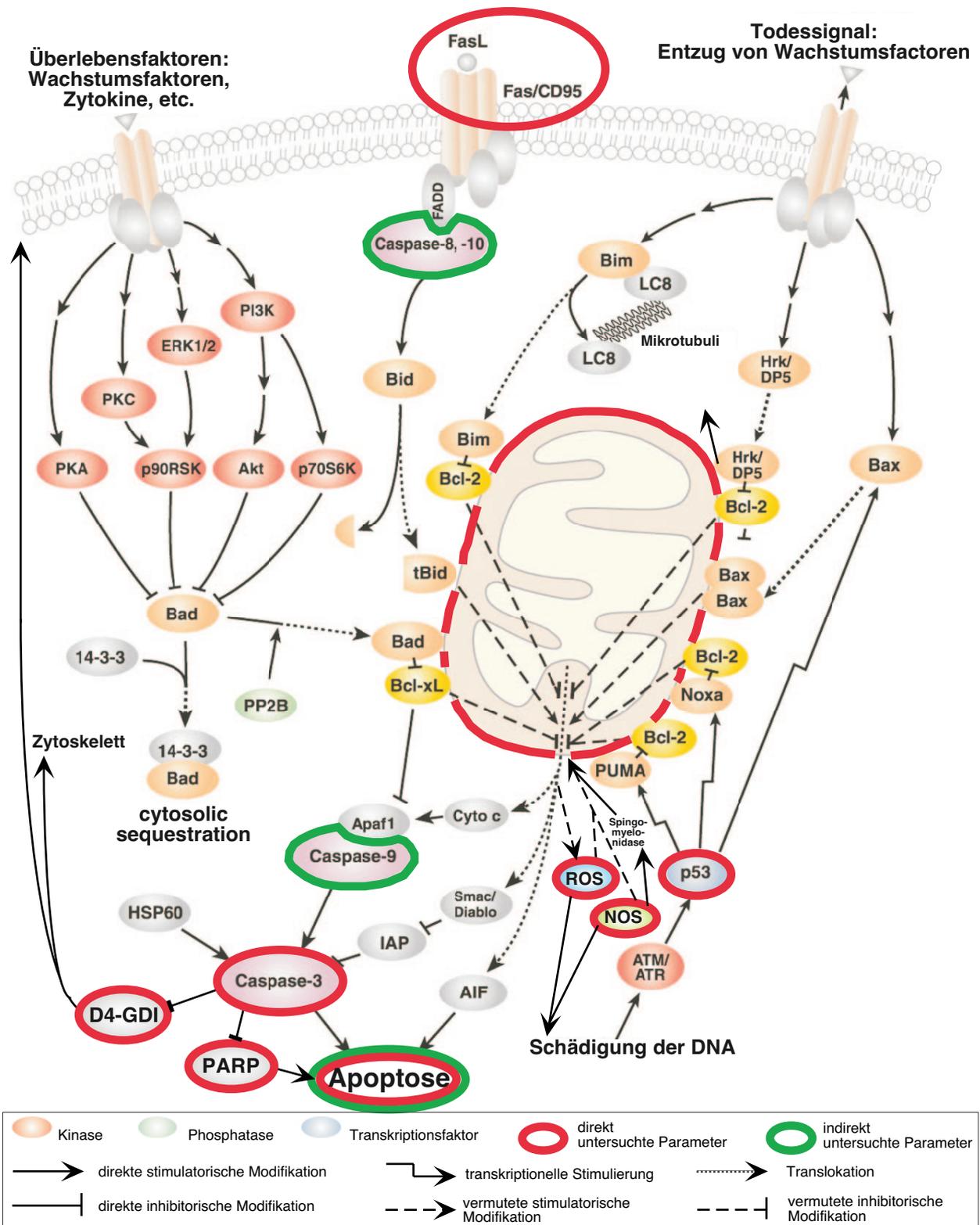
Besonders deutlich konnte die Aktivierung von Caspase-3 in den Zelllinien LOUCY, 697, CCRF/CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX1 und Jurkat beobachtet werden. Bei der Zelllinie HL-60/MX2 trat zwar auch bereits nach 12-stündiger Arsentrioxid-Inkubation eine für den *cleavage site specific* Antikörper gegen D4-GDI positive Population auf, jedoch war der Nachweis von Zellen mit gespaltener Caspase-3 und gespaltener PARP nicht möglich. Für die Zelllinien KG-1a, K-562, K-562(0.02), K-562(0.1) konnte auch nach 24-stündiger Inkubation keine Spaltung von Caspase-3, PARP oder D4-GDI beobachtet werden (**Abbildung 14**). Offensichtlich beruhte das Fehlen des Nachweises einer Caspasen-Aktivität in diesen Zelllinien nicht auf der Nachweismethode. Die zytoplasmatische Färbung mit mono- bzw. polyklonalen Antikörpern zum Nachweis der Caspasen stellte sich somit als ebenso zuverlässig heraus wie der verwandte funktionelle Assay, die Spaltung und Akkumulation von PhiPhiLux G<sub>2</sub>D<sub>2</sub>.

**Rezeptor-vermittelte Apoptose-Signalwege**



**Abbildung 35:** Zusammenfassende Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten, bei der Apoptose beteiligten Parameter. Näheres siehe Text. Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Cell Signaling Technology, Inc., Beverly (MA), USA, (Cell Signaling Technology, 2002a).

### Die mitochondrialen Prozesse bei der Signaltransduktion der Apoptose



**Abbildung 36:** Zusammenfassende Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten, bei der Apoptose beteiligten Parameter. Näheres siehe Text. Verwendung der modifizierten Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Cell Signaling Technology, Inc., Beverly (MA), USA, (Cell Signaling Technology, 2002b).

Offensichtlich kam es in den Zelllinien KG-1a, K-562, K-562(0.02), K-562(0.1) aber zur Spaltung von Caspase-1 (und in geringerem Ausmaß für Caspase-4), denn bereits nach 12-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid konnte in der Zelllinie K-562(0.1) die Bindung des fluoreszierenden Caspasen-Substrates FITC-YVADAPK-DNP nachgewiesen werden (**Abbildung 15**). Eine Bindung von FITC-VAD-FMK, welches als generelles Signal für aktivierte Caspasen gilt, erfolgte ebenfalls nach 12-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid in den Zelllinien K-562 und K-562(0.1) und, wenn auch in sehr geringem Ausmaß, nach 24-stündiger Inkubation in der Zelllinie KG-1a.

Es kann somit als gesichert gelten, daß in den meisten der untersuchten Zelllinien die Aktivierung von Caspase-3 von zentraler Bedeutung für die Signaltransduktion der Arsentrioxid-vermittelten Apoptose ist. Die Tatsache, daß jedoch in der Zelllinie KG-1a keine Aktivierung von Caspase-3 nachgewiesen werden konnte, läßt entweder auf einen alternativen Weg bei der Signaltransduktion schließen oder aber sie ist auf eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Arsentrioxid zurückzuführen. Letzteres erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da für die Zelllinie Jurkat bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt aktivierte Caspase-3 nachgewiesen werden konnte. Wie auch die Zelllinien HL60/MX2, K-562, K-562(0.02) und K-562(0.1) gehört Jurkat jedoch zu der Sensitivitätsgruppe C, wohingegen KG-1a der Sensitivitätsgruppe B zuzurechnen ist. Auch sollte berücksichtigt werden, daß die zur Apoptose-Induktion benötigten Inkubationszeiten mit 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid bei KG-1a-Zellen und Jurkat-Zellen ähnlich waren.

### 8.5.2 *Mögliche Ursache der Caspasen-Aktivierung: p53-Aktivierung*

Ein direkter Einfluß von Arsentrioxid auf die Aktivierung von Caspasen gilt als unwahrscheinlich, nicht zuletzt weil in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß nicht in allen Zelllinien dieselben Caspasen rekrutiert werden. Eine mögliche primäre Wirkung des Arsentrioxids wurde hier bereits diskutiert. Es handelt sich um die Arsentrioxid-vermittelte Vernetzung von Proteinen mit DNA (Ramirez, 2000) bzw. die durch ROS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Schädigung der DNA bei Endothelzellen der Rinder-Aorta (F. Liu, 2000). Eine solche Vernetzung von DNA und Proteinen oder Schädigung der DNA hätte nicht nur eine Proliferationsinhibition zur Folge, sondern

würde, ähnlich der durch UV- oder Röntgenstrahlen induzierten Apoptose, Reparaturmechanismen auslösen und zu einer erhöhten Expression des Proteins p53 führen (vgl. auch **Abbildung 1** und **Abbildung 36**). Es gibt mehrere Hinweise, daß Arsentrioxid in der Tat einen positiven regulatorischen Effekt auf die p53-Expression besitzt, jedoch wurde dies bisher überwiegend für nicht dem hämatopoetischen System entstammende Zelllinien beschrieben, wie z. B. für die gastrischen Zelllinien AGS und MKN-28 (Jiang, 2001), für die Zervixkarzinom-Zelllinien HeLa (Um, 2002) und für die humanen Fibroblasten (Vogt, 2001). Arbeiten, welche gegen eine Regulation von p53 durch Arsentrioxid sprechen, beschäftigen sich z. T. ebenfalls mit nicht-hämatopoetischen Systemen (z. B. mit der murinen epidermalen Zelllinie JB6 (C. Huang, 1999a) oder mit der humanen Bronchial-Epithel-Zelllinie BEAS-2B (F. Chen, 2001)), aber auch mit der APL-Zelllinie NB4 (Chen, 1996). Um einen Anhaltspunkt über die Bedeutung der p53-Regulation im Rahmen einer Arsentrioxid-Behandlung von Zellen zu erhalten, wurden daher repräsentative Zelllinien der Sensitivitätsgruppe A (LOUCY), der Sensitivitätsgruppe B (697, CCRF-CEM, HL-60, KG-1a), der Sensitivitätsgruppe C (Jurkat, K-562) sowie die Zytostatika-resistenten Derivate CEM/C1 und CEM/C2, HL-60/MX1 und HL-60MX2 sowie K-562(0.02) und K-562(0.1) auf p53-Expression nach 2-, 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Arsentrioxid untersucht (**Abbildung 24**). Eine Induktion des Proteins p53 konnte lediglich in den relativ hoch Arsentrioxid-sensitiven Zelllinien LOUCY, CCRF-CEM und 697 beobachtet werden. Ein allgemeingültiger Mechanismus der Arsentrioxid-vermittelten Apoptose-Induktion über p53-Induktion ist somit sehr unwahrscheinlich.

### *8.5.3 Die Apoptoseinduktion durch Arsentrioxid ist nicht CD95-abhängig und führt zu keiner Regulation von CD95 und TNFR*

Die durch CD95L/CD95 (FasL/Fas)-Interaktion vermittelte Apoptose-Induktion stellt eine klassische Form des programmierten Zelltods dar. Für mehrere Zytostatika konnte gezeigt werden, daß ein autokriner bzw. parakriner Mechanismus der CD95L- und CD95-Regulation vorhanden ist (vgl. Einleitung). Da die CD95-vermittelte Apoptose im hämatopoetischen System und bei immunologischen Prozessen von entscheidender Bedeutung ist (vgl. Abschnitt 3.3.1 *Induktion von*

Apoptose), wurde in der hier vorgelegten Arbeit die Regulation von CD95 untersucht.<sup>61</sup>

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse widerlegen jedoch eindeutig eine Beteiligung von CD95 (vgl. Rojewski, 2001a) und bestätigen eine frühere Veröffentlichung über die APL-Zelllinie NB-4, für welche eine Regulation von CD95 ausgeschlossen, wohl aber die Aktivierung von Caspase-8 nachgewiesen werden konnte (Kitamura, 2000).

Wie **Abbildung 25** zu entnehmen ist und in Abschnitt *8.1 Induktion der Apoptose in lympho-hämatopoetischen Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades* bereits angesprochen wurde, besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der Sensitivität der Zelllinien und deren CD95-Expressionsstatus. Repräsentative Zelllinien aller Sensitivitätsgruppen (**Abbildung 26**) wurden auf Induktion der CD95-Expression nach Arsentrioxid-Behandlung untersucht. In keinem der vorliegenden Fälle konnte eine Regulation von CD95 auf Proteinebene beobachtet werden. Es zeichnete sich im Gegenteil eher die Tendenz zu einer negativen Regulation von CD95 nach 12- und 24-stündiger Arsentrioxid-Inkubation ab. Inwieweit dies jedoch tatsächlich für die Arsentrioxid-vermittelte Apoptose-Induktion von Bedeutung ist oder ob es sich dabei um einen Artefakt der durchflußzytometrischen Messungen handelte, konnte nicht geklärt werden.

Um Effekte von Arsentrioxid auf einen autokrinen bzw. parakrinen CD95L-Mechanismus ausschließen zu können, wurden Experimente mit die CD95-vermittelte Apoptose inhibierenden Antikörpern an zwei repräsentativen Zelllinien (CCRF-CEM und Jurkat) durchgeführt (**Abbildungen 27 bis 30**). Ein parakriner oder autokriner Mechanismus, welcher eine Apoptose-Induktion über CD95L/CD95 involviert, kann ausgeschlossen werden, da der die CD95-vermittelte Apoptose blockierende Antikörper SM1/23 zwar die CD95-induzierte Apoptose in Jurkat und CCRF-CEM-Zellen blockieren konnte, nicht jedoch die Arsentrioxid-vermittelte Apoptose. Besonders deutlich kam dies bei einer kombinierten Apoptose-Induktion von einem die CD95-vermittelte Apoptose-induzierenden Anti-CD95-Antikörper (7C11) mit Arsentrioxid in Jurkat-Zellen zum Ausdruck. Durch Vorinkubation konnte die kombinierte Apoptose-Induktion von Arsentrioxid und dem die Apoptose über

---

<sup>61</sup> Eine übersichtliche Darstellung kann den **Abbildungen 35** und **36** entnommen werden.

CD95 induzierenden Anti-CD95-Antikörper 7C11 mit dem die CD95-induzierte Apoptose inhibierenden Anti-CD95-Antikörper SM1/23 lediglich auf das Ausmaß der mit Arsentrioxid induzierten Apoptose reduzieren.

Ein zweiter untersuchter ligandenabhängiger Mechanismus der Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid gilt ebenfalls als unwahrscheinlich: Die Wechselwirkung von  $TNF\alpha$  mit den TNF-Rezeptoren Typ I und Typ II kann ausgeschlossen werden, da:

- lediglich einige der Zelllinien eine kaum nachweisbare Expression von TNFR I (CCRF-CEM, CEM/C2, HL-60, KG-1a) aufwiesen bzw.
- eher eine negative Regulation der TNFR II-Expression bei den Zelllinien K-562, HL-60 und LOUCY zu verzeichnen war und
- nur Teilpopulationen eine nachweisbare Expression von TNFR II (CCRF-CEM) besaßen.

#### 8.5.4 Die Bildung von ROS und NOS durch Arsentrioxid

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde im letzten Jahr verstärkt die Rolle von ROS bei der Arsentrioxid-induzierten Apoptose diskutiert<sup>62</sup>. Sowohl in epidemiologischen Studien (Zunahme von oxidativem Streß durch chronische Arsentrioxid-Exposition im Trinkwasser (Pi, 2002)) als auch in physiologischen *in vitro*-Experimenten (Freisetzung von Eisen aus Ferritin der Pferdemiß und als Folge hiervon die Bildung von ROS (Ahmad, 2000)) und in experimentellen Versuchen (humane Nierenkarzinom-Zelllinien (Pu, 2002), Endothelzellen der Rinder-Aorta (F. Liu, 2000), Epithelzellen der Schweine-Aorta (Barchowsky, 1999a), endothelialen Zelllinie ECV304 (Tsai, 2001)) konnte die Bildung von ROS gezeigt werden. Die Bildung von ROS nach Arsentrioxid-Behandlung von Zellen trat auch bei den hämatopoetischen Zelllinien K-562 und HL-60 (Perkins, 2000) sowie der APL-Zelllinie NB4 (Jing, 1999) auf.

Die hier vorliegende Arbeit bestätigt nicht nur die Bildung von ROS durch Arsentrioxid in den hämatopoetischen Zelllinien LOUCY, 697, Jurkat, KG-1a, CEM/C2, HL-60 und HL-60/MX2 (**Abbildung 17**) und den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in den Zelllinien LOUCY, CCRF-CEM, HL-60, Jurkat und KG-1a (**Abbildung 18**), sondern zeigt eindeutig, daß Arsentrioxid zu einem Zusammenbruch der mitochondrialen Funktion in den Zelllinien LOUCY, 697,

---

<sup>62</sup> Eine übersichtliche Darstellung kann **Abbildung 36** entnommen werden.

Jurkat, KG-1a, CCRF-CEM, CEM/C1, CEM/C2, HL-60, HL-60/MX1, HL-60/MX2, K-562 und K-562(0.02) führt (**Abbildung 16**) (Rojewski, 2001a). Insofern kann die Aussage von Siu et al. (Siu, 2002), die eine Beteiligung von Mitochondrien bei der Arsentrioxid-induzierten Apoptose ausschließen, nicht nachvollzogen werden. Eventuell besteht diese Diskrepanz, da es sich bei den von Siu et al. (Siu, 2002) untersuchten Zellen um eine Hepatokarzinom-Zelllinie handelt. Dennoch soll erwähnt werden, daß die Ergebnisse von Siu et al. (Siu, 2002) nicht generell auf Zellen bzw. Zelllinien des Nicht-Hämatopoetischen Systems übertragen werden können (vgl. vorheriger Absatz: (Barchowsky, 1999a; Ahmad, 2000; F. Liu, 2000; Tsai, 2001; Pi, 2002; Pu, 2002; Woo, 2002)).

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß der Zusammenbruch der mitochondrialen Funktion in den Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat unabhängig von der Aktivierung von Caspasen erfolgt (**Abbildungen 19 bis 22**). Durch die Verwendung von Pan-Caspasen-Inhibitoren konnte eindeutig belegt werden, daß die Arsentrioxid-induzierte Apoptose zwar durch die Verwendung von Caspasen-Inhibitoren gehemmt werden kann, es jedoch unabhängig von einer Hemmung der Apoptose zum Zusammenbruch der mitochondrialen Aktivität kommt.

Während für die Zelllinie K-562 kein Nachweis von ROS und kein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials gezeigt werden konnte, liegen auch für diese Zelllinie Daten über ein Zusammenbruch der mitochondrialen Funktion vor. Eine Inaktivierung der mitochondrialen Funktion konnte für alle untersuchten Zelllinien mit Ausnahme von K-562(0.1) beobachtet werden. Diese Doxorubicin-resistente Zelllinie weist jedoch eine sehr hohe Resistenz gegenüber Arsentrioxid-induzierter Apoptose auf, so daß sich unter den Bedingungen, unter denen keine Hemmung der mitochondrialen Aktivität gemessen werden konnte, auch keine Zellen in Apoptose befanden.

Es kann daher angenommen werden, daß der primäre Wirkungsort des Arsentrioxid die Mitochondrien sind. Neueste Publikationen liefern ebenfalls Daten, welche für die Bildung von ROS und den Zusammenbruch des mitochondrialen Redoxpotentials als Ursache der Arsentrioxid-Wirkung sprechen (Yi, 2002; Woo, 2002).

In einigen Zelllinien (z. B. HL-60) konnte auch eine Zunahme von NOS nachgewiesen werden, wie dies z. B. für die Ösophagus-Karzinoma-Zelllinie SHEEC1 gezeigt werden konnte (Shen, 2002b; Shen, 2002c). Jedoch wurden NOS

nicht von allen untersuchten hämatopoetischer Zelllinien detektiert (z. B. CEM/C2). Auch für ein Fehlen von NOS nach Arsentrioxid-Bildung gibt es Hinweise aus der Literatur. So kommt es u. a. nicht zur Bildung von NOS bei Behandlung von Epithelzellen der Schweine-Aorta mit geringen Arsentrioxidkonzentrationen (Barchowsky, 1999a).

### 8.6 *Modell zur Apoptose-Induktion durch Arsentrioxid*

Zusammenfassend ergibt sich für die Wirkung von Arsentrioxid ein einheitliches, recht simples Modell. Durch Arsentrioxid wird die Funktion der Mitochondrien eingeschränkt. Dies führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung von ROS. Durch die Veränderungen an der Mitochondrienmembran kommt es dann zu einer Aktivierung von Caspasen und somit des Caspasen-Netzwerkes sowie aller weiteren, für die Apoptose typischen Effekte. Eine übersichtliche Darstellung kann den **Abbildungen 35** und **36** entnommen werden. In diesen Abbildungen sind alle in dieser Arbeit untersuchten Parameter farblich hervorgehoben (indirekt gemessene Parameter grün, direkt gemessene Parameter rot). Durch eine Kombination von direkten funktionellen und durchflußzytometrischen Nachweisen mit CD95- und Caspasen-Blockierungsexperimenten konnte die zentrale Bedeutung der Mitochondrien für die pharmakologischen Effekte der Arsentrioxid-Wirkung beschrieben werden. Arsentrioxid könnte somit nicht nur aufgrund seiner Wirkung in Zytostatikaresistenten Zelllinien und primären Zellen von AML/CMML-Patienten von therapeutischer Bedeutung sein, sondern auch aufgrund seiner potentiellen synergistischen Wirkung Verwendung finden als Modulator der Mitochondrienvermittelten Apoptose-Induktion bei Dosis-Eskalations-Therapien konventioneller Zytostatika.

Die Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Arsentrioxids wurden begleitend zu einer klinischen Studie durchgeführt. Die Sensitivität mononukleärer Zellen der bis zum Abschluß der Arbeit rekrutierten Patienten wurde ebenfalls untersucht. Durch Arsentrioxid konnte in den mononukleären Zellen einer Patientin mit einer u. a. unter Etoposid-Therapie refraktären chronischen myelo-monozytären

Leukämie Apoptose induziert werden (Baldus, 2000). Arsentrioxid zeigte auch eine starke apoptotische Wirkung auf mononukleäre Zellen eines Patienten mit AML. Neben dieser Einsatzmöglichkeit gibt es auch vielversprechende Hinweise zum kombinierten Einsatz von ionisierender Strahlung und Arsentrioxid bei der Therapie solider Tumore. Beim Mammakarzinom konnte eine Stagnation der Tumormassenzunahme nur durch kombinierten Einsatz von ionisierender Strahlung und Arsentrioxid, nicht jedoch durch nur einen der beiden Parameter erzielt werden (Chun, 2002). Auch hierbei handelt es sich um die Kombination zweier, an verschiedenen Angriffspunkten ansetzenden Wirkmechanismen. Lokale Anwendung ionisierender Strahlung führt zu Doppelstrangbrüchen der DNA in den Zellen des soliden Tumors, Arsentrioxid wirkt systemisch durch die Bildung von ROS. Somit ist eine *in vitro*- und *in vivo*-Sensibilisierung des Tumorgewebes für ionisierende Strahlung erzielbar. Neuste Arbeiten zeigen auch eine Repression der Östrogenrezeptor-Expression in den humanen Brustkrebs-Zelllinien MCF7 und T47D nach Arsentrioxid-Behandlung (G.C. Chen, 2002).