

**Wirkung von Arsenit auf die MAP-Kinase-Kaskaden
vermittelte Genexpression und auf die erythroide
Differenzierung in Leukämiezellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Yoandra Ramírez Chávez

aus Havanna

Hamburg

2005

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von November 2001 bis November 2005 am Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Dissertationsgutachter :

Prof. Dr. H. Marquardt und Prof. Dr. A. Schaefer

Disputationsgutachter :

Prof. Dr. H. Marquardt, Prof. Dr. U. Hahn und Dr. P. Ziegelmüller

A mis padres Maya y Luis César

El amor es el significado ultimado de todo lo que nos rodea. No es un simple sentimiento, es la verdad, es la alegría que está en el origen de toda la creación

R. Tagore

Inhaltsverzeichnis

A	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	1
B	EINLEITUNG	5
B.1	Allgemeine Mechanismen der Signalübertragung	5
B.2	MAP-Kinase Signaltransduktion-Kaskaden	7
B.2.1	Die ERK MAP-Kinase-Kaskade	9
B.2.2	Die JNK MAP-Kinase-Kaskade	10
B.2.3	Die p38 MAP-Kinase-Kaskade	11
B.3	Das hämatopoetische System	13
B.4	ERK/MAP-Kinasen und erythroide Differenzierung	15
B.5	Leukämie	16
B.5.1	Formen der Leukämie	16
B.5.2	Therapiemodalitäten	18
B.6	Arsen-Verbindungen und akute promyelozytäre Leukämie (APL)	19
B.6.1	Chemie und Wirkweise	19
B.7	Arsen-Verbindungen und chronische myeloische Leukämie (CML)	20
B.8	Geschichte des Arsens	22
B.8.1	Vorkommen	22
B.8.2	Arsen als Stoffwechselgift	24
B.8.2.1	Akute und chronische Wirkungen	25
B.8.3	Verwendung von Arsen	26
B.9	Stand der Forschung	26
B.9.1	Wirkung von Arsen-Verbindungen auf MAP-Kinasen und deren Zielmoleküle	26
B.9.2	Wirkung von Arsen-Verbindungen auf Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose	29
B.10	Fragestellung	31

C	MATERIAL UND METHODEN	33
C.1	Materialien	33
C.1.1	Geräte	33
C.1.2	Substanzen und Chemikalien	34
C.1.3	Zelllinien	36
C.1.4	Reportergen-Plasmide und <i>Trans</i> -Aktivator-Plasmide	37
C.2	Methoden	41
C.2.1	Molekularbiologische Methoden: Proteine	41
C.2.1.1	Western-Blot-Analyse	41
C.2.1.1.1	Protein-Isolierung	41
C.2.1.1.2	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford	42
C.2.1.1.3	Elektrophorese und Blot	43
C.2.1.2	Immunkomplex-Kinase-Assay	45
C.2.2	Molekularbiologische Methoden: RNA	47
C.2.2.1	Northern-Blot-Analyse	47
C.2.2.1.1	Isolierung von RNA	47
C.2.2.1.2	Bestimmung des RNA-Gehaltes	48
C.2.2.1.3	Glyoxalisierung, Elektrophorese und Blot	48
C.2.2.1.4	Hybridisierung	49
C.2.3	Reportergen-Assay	50
C.2.3.1	Elektroporation von <i>E.coli</i> XL-1 blue	50
C.2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA	50
C.2.3.3	Bestimmung der Konzentration von DNA	51
C.2.3.4	Transiente Transfektion von K562/ELM-I-1 Zellen mit Reportergen-Plasmiden	51
C.2.3.5	Detektion und Quantifizierung des Reporterproteins Luziferase	52
C.2.3.7	Luziferase-Bestimmung	53
C.2.4	Methoden zur Beurteilung von Differenzierung: 2,7 Diaminofluoren-Färbung	53

D	Ergebnisse	55
D.1	Wirkung von Natriumarsenit auf MAP-Kinase vermittelte Signaltransduktionswege	55
D.1.1	Einfluss von Natriumarsenit auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen	56
D.1.1.1	Wirkungen verschiedener Arsenit-Konzentrationen auf die Phosphorylierung der ERK MAP-Kinasen in ELM-I-1 und K562 Zellen	56
D.1.1.2	Wirkungen verschiedener Arsenit-Konzentrationen auf die Phosphorylierung von JNK-Kinase in ELM-I-1 und K562 Zellen	57
D.1.1.3	Wirkungen verschiedener Arsenit- Konzentrationen auf die Phosphorylierung von p38 MAP-Kinasen in ELM-1 und K562 Zellen	59
D.1.1.4	Kinetik der Arsenit-Wirkung auf die ERK-Kaskade	60
D.1.1.5	Kinetik der Arsenit-Wirkung auf die JNK MAP-Kinasen	62
D.1.1.6	Kinetik der Arsenit-Wirkung auf die p38 MAP-Kinasen	63
D.1.2	Einfluss von Natriumarsenit auf die Aktivität von MAP-Kinasen	65
D.1.2.1	Einfluss von Natriumarsenit auf die JNK-Aktivität	66
D.1.2.2	Einfluss von Natriumarsenit auf die p38-Aktivität	67
D.1.3	Einfluss von Natriumarsenit auf die egr-1 Expression	69
D.1.4	Wirkung von Natriumarsenit auf die Transkription über SRE oder CRE	73
D.2	Wirkung von Natriumarsenit auf die erythroide Differenzierung	76
D.2.1	Induktion der Differenzierung von K562 und ELM-I-1 Zellen durch Natriumarsenit.	76
D.2.2	Wirkung von Natriumarsenit auf die Transkription	80
D.3	Wirkung von Arsentrioxid auf die erythroide Differenzierung	83

E	Diskussion	84
E.1	Wirkung von Natriumarsenit auf die MAP-Kinasen in ELM-I-1 und K562 Zellen	84
E.2	Mechanismen der Natriumarsenit vermittelten Induktion der egr-1 Expression	89
E.3	Induktion der erythroiden Differenzierung durch Arsenit	94
E.4	Ausblick	98
F	Literaturverzeichnis	99
G	Anhang	112
G.1	Abkürzungen	112

A Zusammenfassung

Aus pharmakologischer und toxikologischer Sicht ist von Bedeutung, dass Arsenit in zelluläre Signalwege stimulierend bzw. auch hemmend eingreift und dadurch zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflusst.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Natriumarsenit auf die MAP-Kinase-Kaskaden und die daraus resultierende Regulation der *egr-1* Expression in zwei hämatopoetischen Zelllinien untersucht. Es konnte aufgezeigt werden, dass Natriumarsenit in Konzentrationen von 12,5µM-50µM sowohl in ELM-I-1- als auch in K562 Zellen die Stresskinasen JNK- und p38-MAP-Kinasen aktiviert und die ERK-MAPK-Kaskade unterdrückt. Ebenfalls wurde eine Hochregulierung der *egr-1* Expression durch Arsenit festgestellt. Unterbrechung der Signaltransduktion über die ERK/MAPK-Kaskade mit den MEK-Inhibitoren PD98059 und UO126 hat die Induktion der *egr-1* Expression durch Arsenit nicht verhindert. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Arsenit gesteuerte Induktion der *egr-1*-Expression nicht durch Raf-MEK-ERK sondern durch die Stresskinasen JNK und p38 vermittelt wird.

Reportergen-Analyse in K562 Zellen zeigte eine Arsenit-Aktivierung der regulatorischen Sequenz CRE (cAMP-response element), während gleichzeitig die basale SRE-Aktivität unterdrückt wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Induktion der *egr-1* Expression durch Arsenit in K562 Zellen nicht über SRE, sondern über CRE erfolgt, da die Stresskinasen über den ATF2 Transkriptionsfaktor CRE aktivieren können.

Die Hemmung der ERK-Kaskade durch Arsenit in Leukämiezellen könnte für die zytostatischen Effekte von Arsenit bei der Behandlung von Leukämie von Bedeutung sein, da dadurch proliferationshemmende, differenzierungsinduzierende und apoptotische Signale in Gang gesetzt werden. Tatsächlich konnte mit niedrigen, therapeutisch relevanten Konzentrationen (0,5mM-2µM) gezeigt werden, dass Natriumarsenit in K562- und in ELM-I-1 Zellen erythroide Differenzierung induziert. Diese Wirkung von Arsenit korrelierte in Reportergen-Studien in K562 Zellen mit einer Abnahme Elk-1/SRE vermittelten Genexpression. Gleichzeitig wurde eine CRE-Aktivierung durch Arsenit in K562 Zellen auch in niedrigen therapeutisch relevanten Konzentrationen nachgewiesen.

Vergleichende Untersuchungen mit dem in klinischer Prüfung befindlichen Arsentrioxid (ATO) zeigten, dass auch diese Substanz mit der gleichen Konzentrationsabhängigkeit erythroide Differenzierung induziert. Ähnliche Wirkung auf die erythroide Differenzierung wurde mit dem bereits zugelassenen CML-Medikament, Imatinib in K562 Zellen beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Vorstellung, dass der Einsatz von Arsen-Verbindungen wie ATO in der Differenzierungstherapie bei chronischer myeloischer Leukämie zu Imatinib eine vielversprechende Alternative darstellt.

Summary

From the pharmacological and toxicological perspective, it is of interest that arsenic compounds can interfere with cellular pathways in a stimulating as well as in an inhibiting way. The effects may have influences on cellular processes like differentiation, proliferation and apoptosis.

Within this context, the present work analyzes the effect of sodium arsenite on MAP-Kinase-cascades and on the regulation of *egr-1* expression in the hematopoietic cell lines (ELM-I-1 and K562). Sodium arsenite activates at concentrations of 12,5-50 μM the JNK and p38-MAP-Kinases and inhibits the ERK-MAP-Kinase-cascade in the cells studied. In addition, an up-regulation of the *egr-1* expression by arsenite has been also observed. The interruption of the signal transduction from the ERK/MAP-Kinase pathway using the MEK Inhibitors PD98059 and UO126, has shown no effect on the arsenite induction of the *egr-1* expression. This fact implies that the induction of the *egr-1* expression by arsenite is not mediated by Raf-MEK-ERK but rather by the stresskinases JNK and p38.

The reporter gene analysis of K562 cells has shown that arsenite activates the regulatory sequence CRE (cAMP-response-element) and inhibits the basal SRE activity simultaneously. These results indicate that the induction of the *egr-1* expression by arsenite in K562 cells is mediated by CRE and not by SRE. This is most probably due to the activation of the transcription factor ATF2 by stresskinases.

The inhibition of the ERK cascade by application of arsenic to leukemia cells, could be relevant for the treatment of leukemia using arsenics' cytostatic effects. The effect on the ERK cascade can potentially cause an inhibition of proliferation, induction of differentiation or apoptosis. Actually, it could be demonstrated that sodium arsenite induces erythroid differentiation in K562 and ELM-I-1 cells, already in low concentrations that would be therapeutically applicable. This effect of arsenite correlates in reporter gene studies with K562 cells with a decreased Elk-1/SRE-mediated gene expression. CRE activation by arsenite in K562 cells was demonstrated additionally.

Comparative studies with arsenic trioxid (ATO), which is currently used as arsenic compound in clinical trials has shown that induction of erythroid differentiation could be performed in a similar concentration-dependent manner. Similar effects on the erythroid differentiation in K562 cells were observed with the previously approved CML medicine, Imatinib. The results of this work support therefore the idea that the use of arsenic compounds like ATO, along with Imatinib represent promising alternatives in differentiation therapy for CML.

B Einleitung

B.1 Allgemeine Mechanismen der Signalübertragungen

Vielzellige Organismen regulieren ihre Entwicklung und funktionelle Integrität durch das komplexe Zusammenwirken unterschiedlich differenzierter Zellen, die auf extrazelluläre Signale durch die Aktivierung spezifischer Signalwege reagieren. Entscheidende Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose werden durch verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter gesteuert, die an Zelloberflächenrezeptoren binden und diese aktivieren können [Ullrich et al.,1990].

Bei der Signalübertragung (Signaltransduktion) durch extrazelluläre Signalmoleküle unterscheidet man sechs Phasen:

1. Freisetzung des Signalmoleküls durch die Ausgangs- oder Signalzelle
2. Transport zur Zielzelle
3. Erkennung sowie Bindung des Signalmoleküls durch ein spezifisches Rezeptorprotein
4. Veränderung von Stoffwechsel, Aktivität oder Entwicklung der Zelle durch den Komplex aus Signalmolekül und Rezeptor
5. Entfernen des Signals, wodurch in der Regel die Reaktion der Zelle beendet wird.

Durch die Bindung extrazellulärer Signalmoleküle an Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die schließlich den Stoffwechsel, die Aktivität oder die Entwicklung der Zelle verändern [Lodish et al., 2001].

Zellen besitzen ein ausgefeiltes System von Proteinen, um auf extrazelluläre Signale reagieren zu können:

1. Membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: Nach Bindung des Liganden wird ein G-Protein aktiviert, das entweder ein Enzym aktiviert oder hemmt, von dem die Biosynthese eines *second messenger*-Moleküls katalysiert wird, oder die Aktivität eines Ionenkanals beeinflusst, wodurch sich das Membranpotenzial verändert.

2. Membranständige, Tyrosin-Kinase-gekoppelte Rezeptoren: Dies sind Transmembranproteine, welche außen das Signalmolekül binden und innen durch Tyrosinphosphorylierung eine Signaltransduktion-Kaskade in Gang setzen.
3. Intrazelluläre Rezeptorproteine: Das Signalmolekül diffundiert durch die Zellmembran und verbindet sich mit einem zytosolischen Rezeptor.

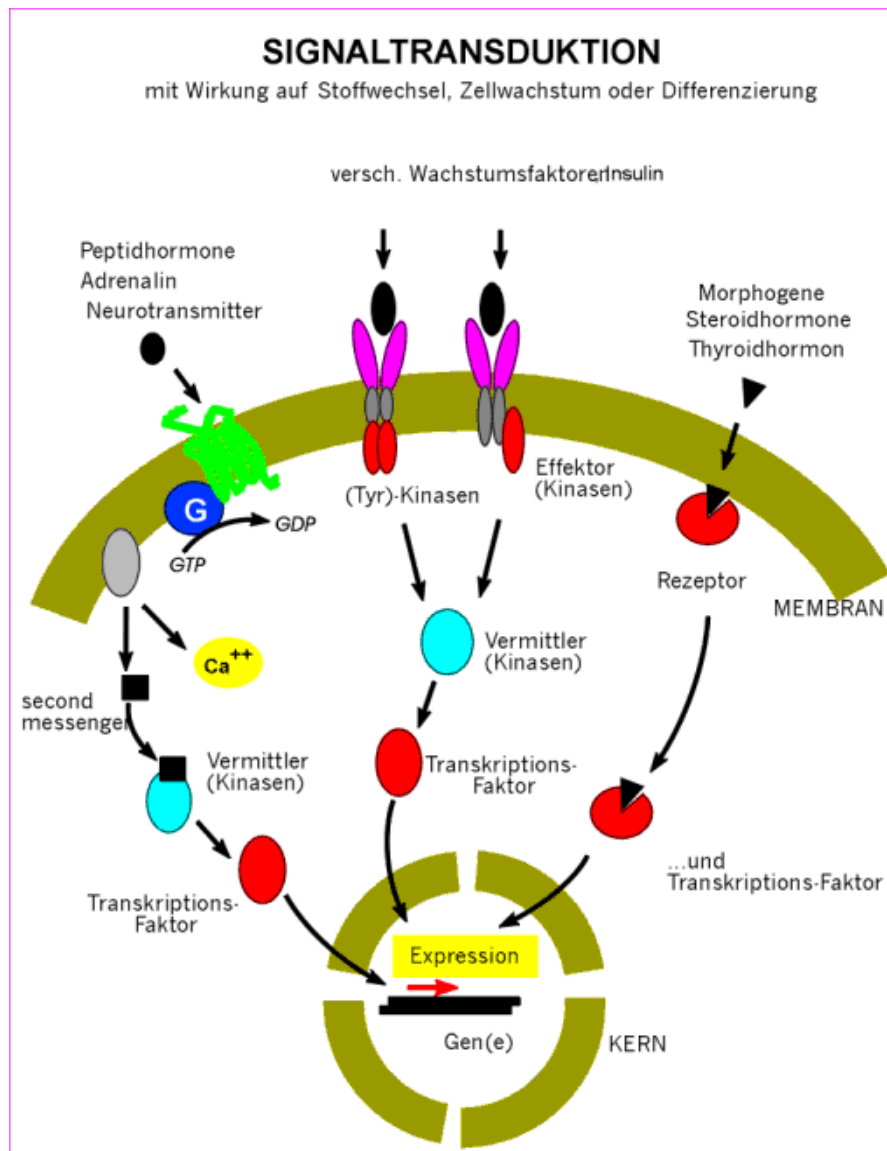


Abb. 1 Schematische Darstellung der Signalübertragung über membranständige und zytosolische Rezeptoren, die durch Bindung ihres Liganden aktiviert werden.

An der intrazellulären Signalübertragung sind verschiedene konservierte Proteine beteiligt, die durch extrazelluläre Signale in einem Rezeptor-vermittelten Vorgang aktiviert werden.

- GTPasen als Schaltproteine (trimere G-Proteine und monomere Ras-ähnliche Proteine): Diese Proteine werden durch die Bindung von GTP angeschaltet, während sie nach Bindung von GDP ausgeschaltet sind.
- Proteinkinasen: Nach der Aktivierung aller Zelloberflächenrezeptoren werden Proteinkinasen aktiviert und damit das Ausmaß der Proteinphosphorylierung verändert. Phosphatasen heben die durch Proteinkinasen erzielten Wirkungen wieder auf, da sie Phosphatgruppen von bestimmten Substratproteinen wieder ablösen.
- Adapterproteine: Sie entfalten keine katalytischen Aktivitäten und aktivieren auch nicht direkt Effektorproteine. Vielmehr bestehen sie aus verschiedenartig kombinierten Domänen, die als Bindungsstellen für weitere Proteine fungieren.

Die Rezeptoren übertragen ihre Signale auf einen hochkonservierten Signalweg (Kinase-Kaskade), der schließlich mit der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors im Zellkern die Expression von Zielgenen steuert. Eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signalübertragung spielen die Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAP-Kinasen).

B.2 MAP-Kinase Signaltransduktion-Kaskaden

Mitogen-aktivierte Protein Kinasen sind eine Gruppe von Serin/Threonin spezifischen Proteinkinasen. Sie sind weitreichend konserviert unter den Eukaryoten und wirken regulierend auf eine Reihe biologischer Prozesse, wie Zelldifferenzierung, Proliferation und programmierten Zelltod. Die MAP-Kinasen gelangen in den Zellkern und phosphorylieren viele unterschiedliche Proteine einschließlich Transkriptionsfaktoren, welche die Expression wichtiger Proteine steuern, die für den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung sind.

MAP-Kinase-Kaskaden (MAPK-Kaskade) sind hierarchisch in drei Module organisiert. Die Signalübertragung erfolgt über MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) zu dualspezifischen Threonin- /Tyrosinkinasen, den MAPK-Kinasen (MAPKK). Diese wiederum stimulieren das letzte Glied dieser Kaskade, die prolangerichteten MAP-Kinasen (MAPK), Serin-/Threonin-spezifische Kinasen, die an einem TXY-Aminosäure Motiv durch Phosphorylierung aktiviert werden (siehe Abb.2).

Bis heute sind drei Untergruppen der MAP-Kinasen ausführlicher charakterisiert worden die jeweils in einer gut definierbaren Signalkette involviert sind. Zu diesen gehören:

- ERK1/2 (extrazellulär Signal-regulierte Kinasen) [Boulton *et al.*, 1991]
- JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen) bzw. (Stress-aktivierte Proteinkinasen) [Sanchez *et al.*, 1994]
- p38 [Enslen *et al.*, 1998]

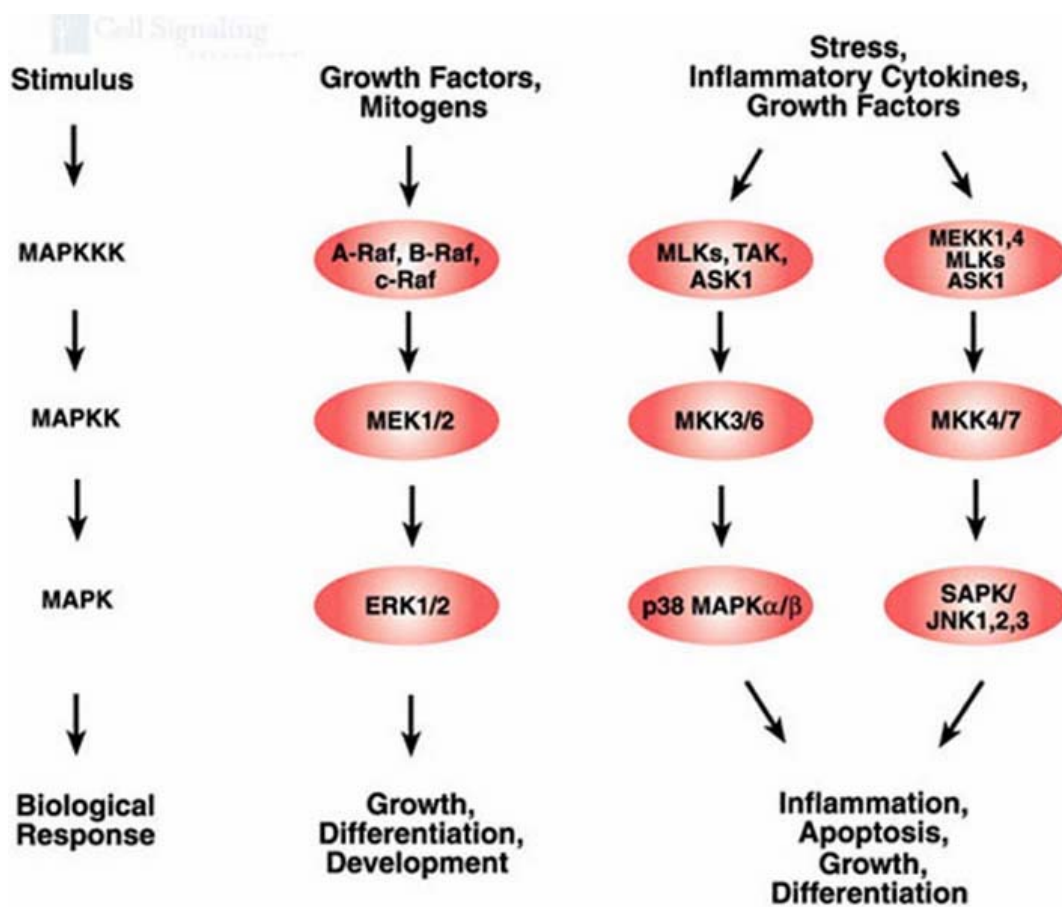


Abb. 2 MAP-Kinase Signaltransduktionskaskaden

B.2.1 Die ERK-MAP-Kinase-Kaskade

Der am besten charakterisierte MAPK Signalweg ist die Raf-MEK-ERK Kinase-Kaskade. Stimuliert wird dieser Signalweg vor allem durch Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) oder Blutplättchen-Wachstumsfaktor (*platelet derived growth factor*, PDGF), was zur Mitose der betreffenden Zelle führt. Deshalb wird der Raf/MEK/ERK-Signalweg oft als klassische mitogene Signaltransduktionskaskade betrachtet (Abb.3).

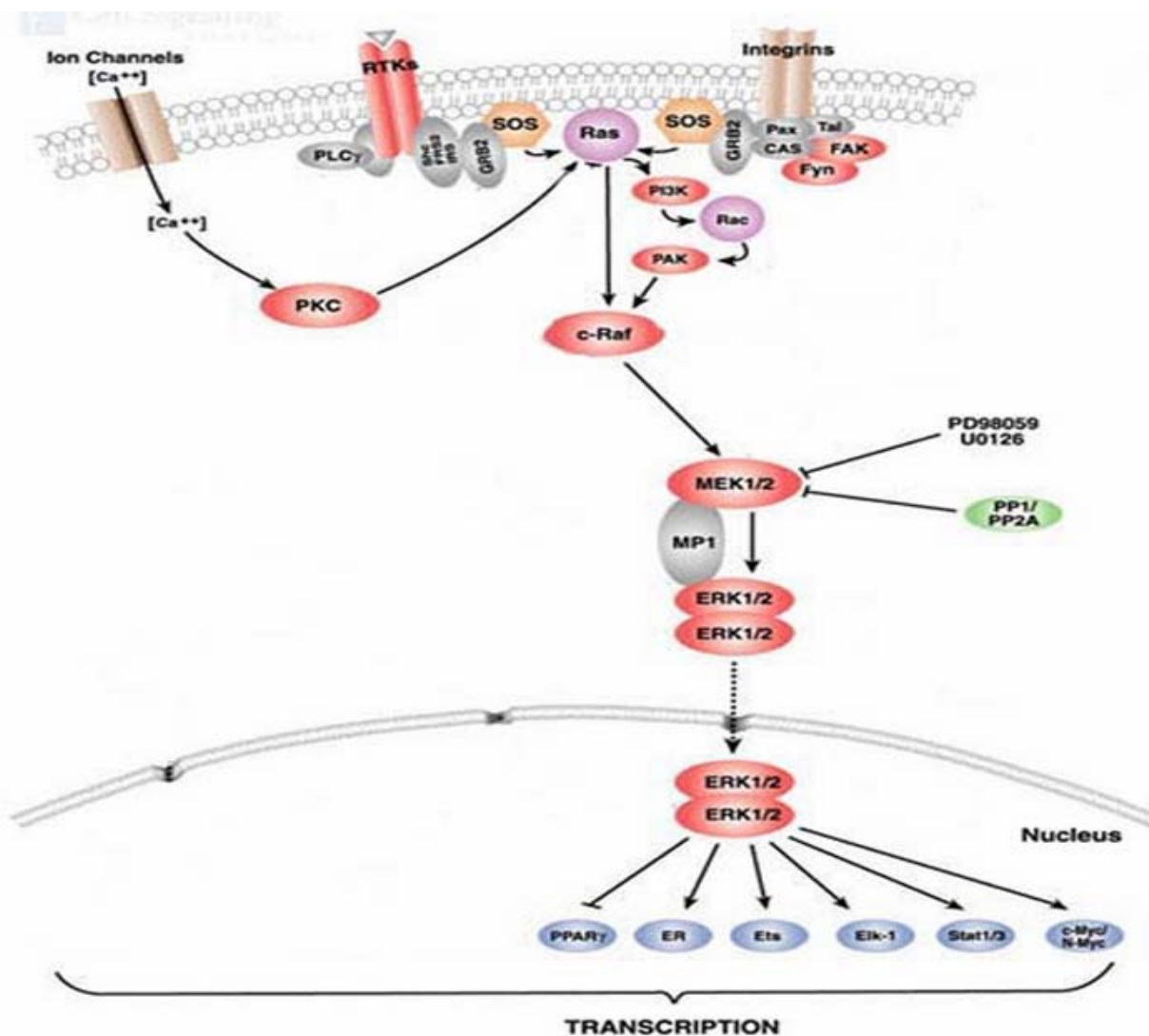


Abb. 3 Die ERK-MAPK-Signaltransduktionskaskade

Die Aktivierung von Raf erfolgt durch Bindung an das aktive Ras-Protein auf der Ebene der Zellmembran. Die Aktivierung von Raf durch Ras führt zur Phosphorylierung zweier Serinreste der dualspezifischen Kinase MEK (*mitogen/extracellular-signal regulated kinase kinase*) die wiederum Phosphatgruppen sowohl auf Threonin- als auch auf Tyrosinreste in den Zielproteinen, den ERK-Isoformen ERK1(p44) und ERK2 (p42) überträgt [Ahn et al., 1991]. Ras stellt somit die Verbindung zwischen dem Wachstumsfaktor-Rezeptor und der Raf-MEK-ERK-Kaskade dar, wobei die Proteine Grb2 und SOS an der Kopplung von Ras mit dem Rezeptor beteiligt sind.

Während ERK das bisher einzige, bekannte Kinasesubstrat von MEK darstellt, kann aktiviertes ERK seinerseits eine Vielzahl von Zielproteinen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma phosphorylieren. Zu den Substraten von ERK zählen unter anderen Transkriptionsfaktoren wie der Ternär-Komplex-Faktor Elk-1 [Schenk und Snaar-Jagalskar, 1999]. Die Bedeutung der ERK1/2 MAP-Kinasen liegt im allgemeinen in der mitogenen Signaltransduktion, sie ist aber auch an Differenzierungsvorgängen beteiligt. Auf der anderen Seite vermittelt die Aktivierung der Raf-MEK-ERK Kaskade durch Wachstumsfaktoren in verschiedenen Zellsystemen antiapoptotische Signale.

B.2.2 Die JNK MAP-Kinase-Kaskade

Die zweite Untergruppe der MAP-Kinasen stellt die c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) auch SAPK: Stress-aktivierte Proteinkinase dar. Diese MAP-Kinase wird in erste Linie durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF alpha oder durch chemische und physikalische Stress-Einflüsse (bakterielle Endotoxine, Arsenit, Anisomycin, H₂O₂, osmotischer Stress, Hitze-Schock, UV-Strahlen und einige genotoxische Substanzen) aktiviert (Abb.4). Die JNK-Isoformen (JNK1 und JNK2) werden durch die zweifach-spezifische Protein kinase MKK4/7 aktiviert. Ras kann auch die Aktivierung der JNK vermitteln. Bekannte Substrate der JNK sind c-Jun, ATF2 und Elk-1.

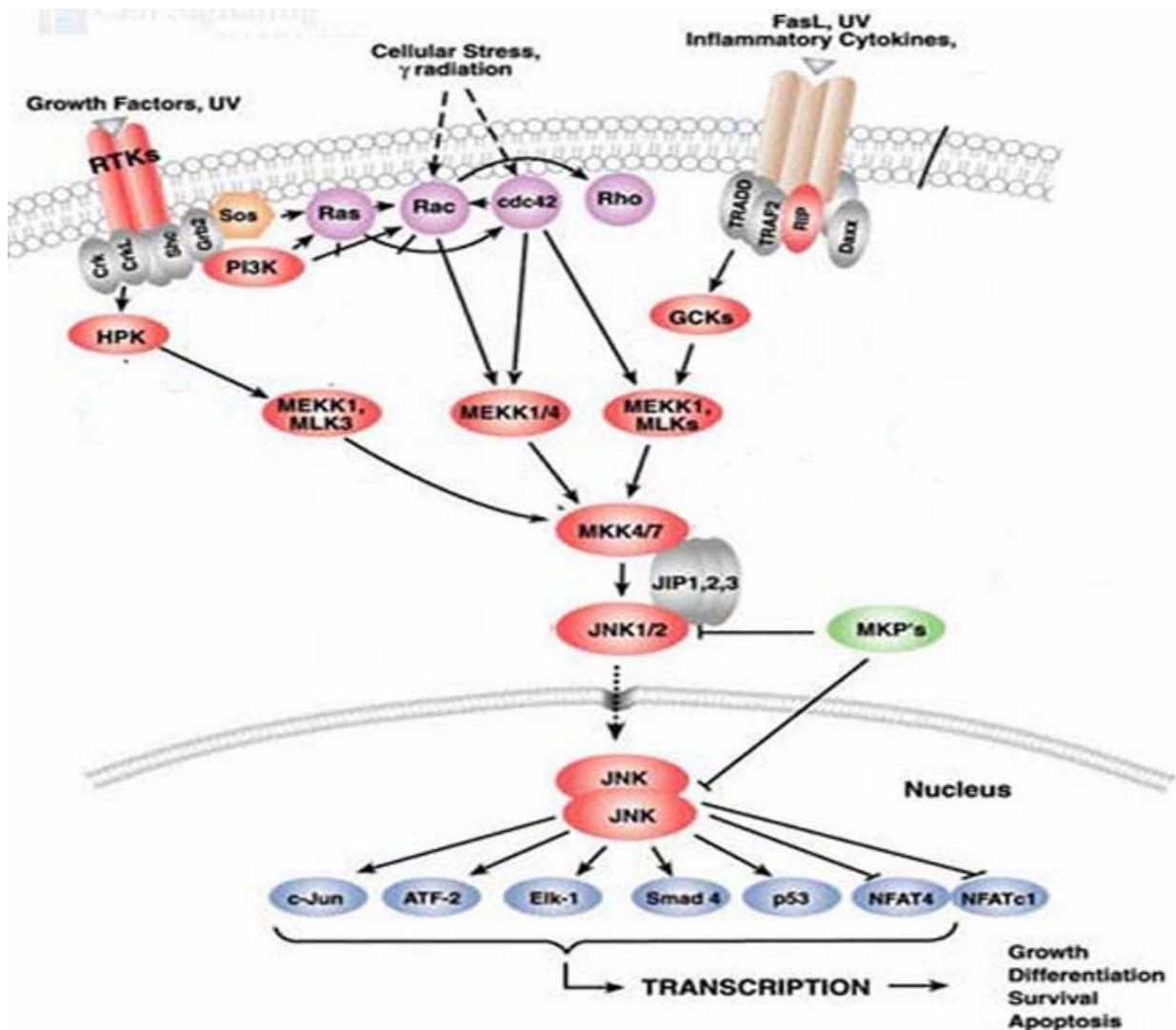


Abb. 4 Die SAPK/JNK Signaltransduktionskaskade

B.2.3 Die p38 MAP-Kinase-Kaskade

Die p38 MAP-Kinase wird auch durch inflammatorische Zytokine und chemische und physikalische Stress-Einflüsse wie Arsenit, osmotischer Stress, UV-Strahlen und Hitze aktiviert. Die p38 Isoformen (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) werden durch MKK3/6 aktiviert. Die Phosphorylierung und Aktivierung von MKK3/6 erfolgt durch TAK1 oder ASK1. Substrate von p38 sind zum einen zytoplasmatische Proteine und zum anderen Transkriptionsfaktoren im Zellkern. p38 phosphoryliert bevorzugt die Transkriptionsfaktoren Sap-1 und ATF-2 [Raingeaud et al., 1995; Janknecht und Hunter, 1997], aber auch CHOP [Wang und Ron, 1996].

Ein wichtiges zytoplasmatisches Substrat der p38 ist die MAPKAP-Kinase 2 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase), die das Hsp 27, CREB [Clifton *et al.*, 1996] und auch den SRF phosphoryliert [Heidenreich *et al.*, 1999]. p38 kann eine Vielzahl von Proteinen sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus regulieren.

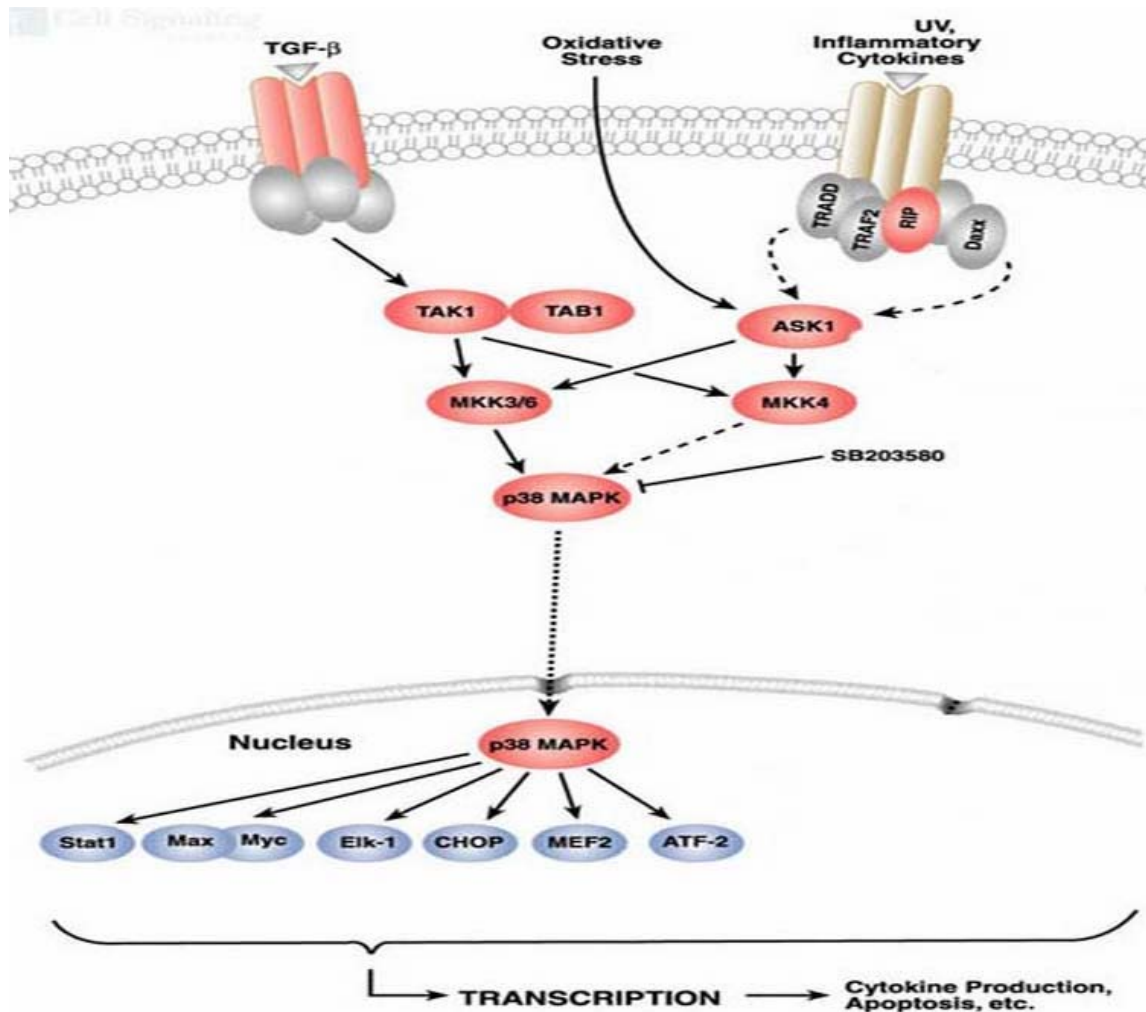


Abb. 5 Die p38 MAPK Signaltransduktionskaskade

Während die Raf-MEK-ERK-Kaskade das Überleben der Zellen fördert, sind die JNK und p38 MAP-Kinasen an der Aktivierung von apoptotischen und inflammatorischen Zellprozessen beteiligt.

B.3 Das hämatopoetische System

Unter dem Begriff Hämatopoese versteht man den Prozeß der Bildung und Reifung von Blutzellen. Aus undifferenzierten Stammzellen im Knochenmark entwickeln sich über verschiedene Vorläuferzellen Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Unter dem Einfluss der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie IL-3, EPO, GM-CSF, TPO und G-CSF reifen innerhalb von einem bis zehn Tagen Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten heran. Nach Abschluss dieses Prozesses wandern die Blutzellen in die Blutbahn und die verschiedenen Körpergewebe. Der grösste Teil der Entwicklung von Lymphozyten geschieht in Knochenmark. Man unterscheidet zwei Arten von immunkompetenten Zellen: T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Während die B-Lymphozyten aus der Stammzelle ähnliche Entwicklungsstufen wie die Granulozyten durchlaufen, erfolgt die Reifung der T-Lymphozyten im Thymus.

Unipotente Stammzellen wandeln sich nur in eine Art differenzierter Zellen um, während pluripotente Stammzellen unter Bildung verschiedener Zellarten differenzieren können, die jeweils spezialisierte Funktionen wahrnehmen. Pluripotente Stammzellen können sich entweder selbst erneuern, oder sie teilen sich in myeloische bzw. lymphatische Stammzellen. In Abhängigkeit von der Art und Menge der einwirkenden Zytokine bilden die myeloischen oder lymphatischen Stammzellen verschiedene Vorläuferzellen, die sich nicht mehr durch Teilung erneuern können. Diese Zytokine fördern die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen für viele Blutzellarten. Zum Beispiel fördert der Wachstumsfaktor Erythropoetin die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen der Erythrozyten BFU-E, CFU-E zu reifen Erythrozyten (Abb.6).

B.4 ERK/MAP-Kinasen und die erythroide Differenzierung

Nach neuen Erkenntnissen spielen die MAP-Kinasen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Differenzierungsvorgängen in hämatopoetischen Zellen. Vor allem die ERK-Kaskade scheint eine zentrale Bedeutung zu übernehmen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung der ERK-Kaskade notwendig und ausreichend ist, um die mono- und megakaryozytäre Differenzierung zu induzieren [*Kharbanda et al., 1994; Whalen et al., 1997; Melemed et al., 1997*]. Außerdem deuteten weitere Untersuchungen an, dass die ERK-Kaskade einen negativen Einfluss auf die Reifung erythroider Zellen ausübt [*Whalen et al., 1997; Matsuzaki et al., 2000; Schaefer et al., 2004*].

Matsuzaki et al., 2000 konnten aufzeigen, dass die Überexpression vom aktiven Ras in erythroblastoiden SKT6 Friend murine Leukämiezellen die Erythropoetin (Epo) induzierte erythroide Differenzierung verhinderte. Umgekehrt führte die Inhibition der MEK/ERK-Signaltransduktionskaskade durch den MEK1-Inhibitor PD 98059 zur Induktion der erythroiden Reifung der SKT6 Zellen.

Uchida et al. 2001 schlossen ebenfalls, dass eine negative Korrelation zwischen der ERK-Aktivierung und erythroiden Differenzierung existieren müsste. Sie fanden heraus, dass in der erythromegakaryozytären UT-7/GM Zelllinie, welche unter Stimulation mit Epo erythroid und unter Thrombopoetin (TPO) megakaryozytär differenziert, die Behandlung mit Epo und PD 98059 die erythroide Reifung der Zellen fördert. Die Kombination von TPO mit diesem MEK1-Inhibitor führt zu einer Unterdrückung der megakaryozytären Differenzierung.

Andere Forschergruppen konnten auch aufzeigen, dass die Inhibition der ERK/MAP-Kinasen die erythroide Entwicklung induziert und fördert [*Whalen et al., 1997; Witt et al., 2000; Miyazaki et al., 2001; Schaefer et al., 2004*].

B. 5 Leukämie

Das Blut besteht aus Blutzellen wie den roten Blutkörperchen (Erythrozyten), den für die Blutgerinnung zuständigen Blutplättchen (Thrombozyten) und den weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Diese Blutzellen übernehmen lebenswichtige Funktionen des Organismus. Da die Zellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben, müssen diese ständig erneuert werden. Der Ort der Blutbildung ist dabei das Knochenmark, das in den Hohlräumen der Knochen verteilt ist. Im Knochenmark werden aus wenigen Vorläufer- oder Stammzellen durch Zellteilungen und Reifungsschritte ständig alle Formen der Blutzellen in großer Zahl neu gebildet. Wenn sie reif sind, treten sie in den Blutkreislauf über.

Bei Leukämie ist durch genetische Veränderungen der Stammzellen der normale Reifeprozess der weißen Blutkörperchen unterbrochen, es treten auch unreife weiße Blutkörperchen in den Blutkreislauf über und vermehren sich unkontrolliert. Die bösartigen Zellen bleiben funktionslos und verdrängen die gesunden Knochenmarkszellen. Es treten z.B. Symptome wie Infektionen, Müdigkeit, Blutarmut und Blutungsneigung auf.

B.5.1 Formen der Leukämie

Man unterscheidet nach dem Verlauf chronische und akute Leukämien. Chronische Formen zeichnen sich durch einen eher schleichenden, symptomlosen Beginn und langsames Fortschreiten aus, während sich akute Leukämien rasch entwickeln und in der Regel mit schweren Krankheitssymptomen und Fieber einhergehen. Die Blutzellen bei chronischen Leukämien sind relativ ausgereift, während bei akuten Leukämien unreife oder undifferenzierte Zellen vorliegen, das heißt, die Entartung hat auf einer früheren Stufe im Reifungsprozess der Blutzellen stattgefunden.

Es werden zwei Arten von Leukämie unterschieden, die myeloische und lymphatische Leukämie, die entweder akut oder chronisch verlaufen können. Myeloische Leukämien gehen von Vorläuferzellen weißer Blutkörperchen aus. Die entarteten Zellen teilen sich unkontrolliert, verdrängen und zerstören das gesunde Knochenmark. Die Leukämiezellen treten in großer Zahl ins Blut über und können auf diesem Wege auch andere Körperorgane und selbst das Gehirn erreichen und sich dort ansiedeln.

Lymphatische Leukämien gehen von Vorläufern der Lymphozyten aus. Diese werden verursacht durch eine langsame Vermehrung von Lymphozyten (weiße Blutkörperchen die sich bevorzugt in Lymphknoten, Lymphe und Milz aufhalten, und deren Aufgabe unter anderem die Antikörperbildung ist).

Zudem unterscheidet man bei Leukämien nach der Herkunft der fehlerhaften vermehrten Blutzellen zwischen lymphatischer Leukämie (ausgehend von Vorstufen der Lymphozyten) und myeloischer Leukämie (ausgehend von Vorstufen der Granulozyten/Monozyten). Daraus ergeben sich folgende Formen von Leukämien, die sich im Hinblick auf Symptome, Verlauf, Prognose und Behandlung deutlich unterscheiden:

Akute myeloische Leukämie (AML)

Ein Zeichen für akute myeloische Leukämien ist die Häufigkeit des Vorkommens der Myeloblasten oder Monoblasten. AML tritt weltweit mit einer Häufigkeit von 2,5 Erkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner auf. Sie ist die bei Erwachsenen am häufigsten vorkommende Leukämieart.

Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Akute Lymphatische Leukämien treten meistens bei Kindern (zwischen dem 2. und 10. Lebensjahr), seltener bei Erwachsenen, vornehmlich im Alter zwischen 30 und 50 Jahren, auf. Ungefähr einer von 100.000 Menschen pro Jahr ist von ALL betroffen. Eine der Leukozytenuntergruppen, die Lymphozyten, sind bei dieser Leukämie betroffen.

Chronische myeloische Leukämie (CML)

Die Chronische Myeloische Leukämie ist gekennzeichnet durch eine erhebliche Vermehrung von Granulozyten und deren Vorstufen in Knochenmark, Blut, Milz und Leber. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 10 Erkrankungen pro Jahr pro 1 Millionen Einwohner auf. Betroffen sind meistens Menschen im mittleren bis höheren Alter.

Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL ist eine Form der Leukämie, bei der die reifen Lymphozyten betroffen sind. Die Leukozytenzahl in Knochenmark, Blut, Lymphgewebe und anderen Organen ist deutlich erhöht, der in ihnen enthaltene Lymphozytenanteil kann bis zu 95% betragen. Betroffen sind meistens ältere Menschen ab dem 50. Lebensjahr. Bei etwa 95% aller CLL-Fälle liegen kanzeröse B-Zellen vor.

Erythroleukämie (Akute myeloische Leukämie-M6)

Diese Leukämieform ist ein Subtyp der akuten myeloischen Leukämien (AML). Der geht häufig ein myelodysplastisches Syndrom voraus und zeigt Häufungen im frühen Kindes- und im hohen Erwachsenenalter. Männer scheinen häufiger als Frauen betroffen zu sein. Die Erythroleukämie beschreibt eine abnorme Proliferation ausschließlich der erythroiden Vorläufern und kann durch den Nachweis von Glycophorin A gesichert werden.

B.5.2 Therapiemodalitäten

Seit Mitte der 40er Jahren wurden eine Reihe von Medikamenten gegen Leukämie entwickelt, die den Weg für die heutige übliche Chemotherapie ebneten. Das Ziel der medikamentöse Therapie ist, die Leukämiezellen vollständig zu zerstören oder möglichst weit zurückzudrängen. Dadurch werden vor allem die Tumorzellen geschädigt, die sich praktisch ständig vermehren. Mit der Chemotherapie kann eine Reduzierung der Leukämiezellen (Teilremission) und teilweise sogar eine weitgehende Krankheitsrückbildung (komplette Remission) erreicht werden.

In den 70er Jahren wurde die Knochenmarktransplantation eingeführt, die heute eine sehr wirkungsvolle Therapie darstellt und oftmals die einzige Chance auf Heilung bietet. Hierbei wird dem Patienten im Anschluss an eine Hochdosistherapie (Chemotherapie und Bestrahlung), die das existierende Knochenmark zerstört, das Knochenmark von einem geeigneten Spender übertragen. In den letzten Jahren wurden mit neuen Methoden verschiedene neue Wirkstoffe entwickelt, die bei manchen Leukämieformen ganz gezielt in die Steuerung der Krebszelle eingreifen und die krankhafte Zellvermehrung hemmen. Eines der erfolgreichsten Beispiele hierfür ist das CML-Medikament Glivec (Wirkstoff Imatinib), das selbst in fortgeschrittenen Phasen der CML vielversprechende Ergebnisse zeigt.

B.6 Arsen-Verbindungen und akute promyelozytäre Leukämie (APL)

APL, eine der acht Unterarten der akuten myeloischen Leukämie (AML), ist eine bösartige Erkrankung der Vorstufen der weissen Blutkörperchen. APL ist durch eine spezifische chromosomale Abnormalität, die Translokation genetisches Materials von Chromosom 17 auf Chromosom 15, charakterisiert. Diese genetische Veränderung führt zur Bildung eines abnormalen Proteins (PML-RAR α), das normale Zellwachstum behindert und die weitere Reifung der Myelozyten im Knochenmark auf der Entwicklungsstufe der Promyelozyten unterdrückt, worauf sie akkumulieren [Grignani et al., 1998].

Durch Behandlung mit dem Vitamin-A-Säure-Derivat All-Trans-Retinsäure, ATRA (Tretionin) können die durch PML-RAR alpha verursachte Störung der Transkription aufgehoben werden, leukämische Zellen reifen wieder zu Granulozyten aus und werden damit unschädlich. Durch eine Behandlung mit Tretionin in Kombination mit der konventionellen Chemotherapie kann die früher meist tödlich verlaufende Promyelozytenleukämie heute in mehr als 80% der Fälle geheilt werden [Niu et al., 1999].

Eine giftige Substanz, die als Unkrautvertilgungsmittel eingesetzt wird und als berüchtigte Waffe in Kriminalromanen gilt, hat Erfolge bei der Behandlung von Leukämie gezeigt: Arsenik oder Arsentrioxid (ATO). Arsenik (Medikament Trisenox) ist in der Lage, auf nicht vollständig bekanntem Weg in die gestörte Reifung der Promyelozyten antileukämisch einzugreifen. Trotz der bekannten Toxizität von As₂O₃ gelang es im Rahmen der Induktions- und Konsolidierungstherapie, komplette Remissionen ohne medikamentös bedingte Todesfälle wegen Toxizität zu erzielen [Soignet et al., 1998].

B.6.1 Chemie und Wirkweise

Der Wirkstoff As₂O₃ hydrolisiert in Wasser zur arsenigen Säure, die in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke – ähnlich wie die Phosphorsäure – in unterschiedlichen Stufen vorliegen kann. Deshalb hat man sich darauf geeinigt, nur von »Arsentrioxid« als eigentlichem Wirkstoff zu sprechen.

Der genaue Wirkmechanismus von Arsentrioxid ist noch nicht geklärt. Dazu existieren zwei Hypothesen: Einerseits soll die Substanz das PML-RAR alpha zerstören, das die Ausreifung der Leukozyten behindert. Andererseits werden die Apoptose-Induktion, partielle Differenzierung und eine antiproliferative Aktivität diskutiert [Zhang et al., 2001].

Eine Beeinflussung des zellulären Redox-Status z.B. durch Ascorbinsäure kann die Apoptose durch Arsentrioxid erhöhen und lässt eine höhere zelltoxische Wirkung erwarten [Grad et. al., 2001; Bachleitner-Hofmann, 2001]. Eine Kombination von Arsentrioxid mit cAMP in APL Zelllinien (NB4 und NB4-R1) induziert die komplette Differenzierung und ermöglicht die Zerstörung des PML-RAR alpha- Fusionsproteins [Zhu et al., 2002].

B.7 Arsen-Verbindungen und chronische myeloische Leukämie (CML)

Für die chronische myeloische Leukämie ist die Bildung des Philadelphia-Chromosoms der häufigste auslösende Faktor. Dabei handelt es sich um ein verkürztes Chromosom 22. Es entsteht, wenn die Enden von Chromosom 22 und Chromosom 9 gegeneinander ausgetauscht werden. Das Stück, das von Chromosom 9 auf Chromosom 22 übertragen wird, ist viel kürzer als der ursprüngliche DNA-Strang. Durch diese Translokation geraten auf Chromosom 22 zwei Gene in unmittelbare Nachbarschaft, die normalerweise nur getrennt voneinander vorkommen.

Das Produkt dieser Genkombination (Bcr-Abl Fusionsprotein) ist eine aktive Tyrosinkinase, die eine unkontrollierte Teilung von Blutzellen verursacht [Konopka et al., 1985]. Die Erkrankung wird in der chronischen Phase zunächst medikamentös behandelt, zum Beispiel mit der Substanz Hydroxyharnstoff (abgekürzt HU für das englische Hydroxyurea) oder mit Interferon-alpha (IFN) in der Erhaltungstherapie.

Eine neue Therapiemöglichkeit mit sogenannten Signaltransduktionshemmern wie Imatinib besteht seit November 2001 für CML-Patienten, die nicht mehr auf Interferon ansprechen und für die andere Behandlungsformen nicht möglich sind.

Imatinib Gleevec® (imatinib mesylate) 4-[(4-Methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-ymidiny]amino]-phenyl]benzamide methanesulfonate, wurde im November 2001 in Deutschland mit dem Handelsnamen Glivec, häufig auch noch als STI571 bezeichnet, zugelassen.

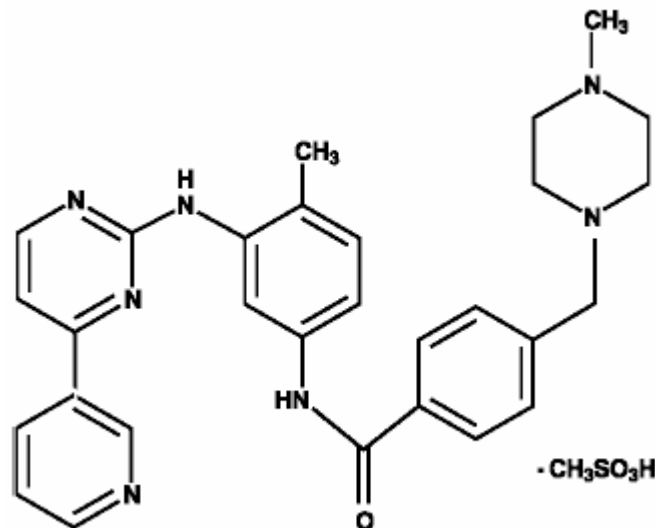


Abb. 7 Chemische Struktur von Imatinib

Das Medikament gilt als Vertreter einer neuen Klasse von Krebsmedikamenten als Signal-Transduktions-Inhibitor = STI. Herkömmliche Zytostatika, die in der Chemotherapie eingesetzt werden, können zwischen gesunden und kranken Zellen nur bedingt unterscheiden und gehen deshalb oft mit schweren Nebenwirkungen einher.

Signaltransduktionshemmer zielen dagegen spezifisch auf die Unterbrechung von Informationswegen in Tumorzellen, die für deren Wachstum unentbehrlich sind. Imatinib setzt an der entscheidenden Ursache für die ungehemmte Vermehrung von Blutzellen bei der chronischen myeloischen Leukämie an. Der Wirkstoff (Imatinib) hemmt die Tyrosinkinase-Aktivität von Bcr-Abl-Protein, indem er mit ATP um dessen Bindungstasche konkurriert und somit die Phosphorylierung von Botenstoffen und die nachfolgenden Signaltransduktionswege stoppt. Imatinib blockiert das Enzym und mit ihm die unkontrollierte Vermehrung der Zellen. Das Medikament wird derzeit eingesetzt, um Patienten zu behandeln, die an einer Philadelphia-Chromosom-positiven CML erkrankt sind und bei denen die Standard-Therapie mit Interferon alpha in der chronischen Phase (zunächst stabile erste Phase) versagt hat.

Mit Imatinib werden auch Patienten in fortgeschrittenen Stadien wieder therapierbar. Es verlangsamt das Fortschreiten der Erkrankung und hat vergleichsweise geringe Nebenwirkungen. Zur Zeit ist noch offen, welcher Langzeiterfolg mit Imatinib zu erreichen ist. Wie lange die Behandlung dauern muss und ob sie nach Erreichen einer kompletten Rückbildung der Leukämie abgebrochen werden kann, ist ebenfalls noch unklar.

Weitere Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass die Kombination aus Imatinib und Arsentrioxid (Medikament Trisenox) synergetische Wirkungen erzielt haben [La Rose et al., 2002].

B.8 Geschichte des Arsens

Der Name "Arsen" leitet sich vom griechischen Wort „arsenikon“ ab, das soviel wie "männlich" bedeutet, aber auch die griechische Bezeichnung für Auripigment ist, ein goldglänzendes Arsenschwefel-Mineral (As_2S_3), das schon im Altertum die Neugier der Naturforscher weckte. Arsen ist ein Halbmetall, das mit einer Häufigkeit von 2,1 mg/kg zu den weniger häufigen Elementen in der Erdkruste gehört. Die Giftigkeit arsenhaltiger Stoffgemische war schon vor 2500 Jahren bekannt. Dioskourides, Leibarzt am Hofe Neros, beschrieb im 1. Jahrhundert nach Christus die Wirkungen von Arsen.

1638 erkannte Agricola den arsenhaltigen Charakter des "weißen Gifts", wie Arsentrioxid genannt wurde, das bei der thermischen Zersetzung arsenhaltiger Mineralien und Erze entstand. Doch erst im letzten Jahrhundert begann die mechanistische Aufklärung der biologischen Wirkungen des Arsens. In dieser Zeit wurden Arsenverbindungen als Pestizide, Pflanzen- und Holzschutzmittel eingesetzt. Auch als Heilmittel haben Arsenikalien besonders in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts eine gewisse Bedeutung erlangt. Einige von ihnen sind heute noch zugelassen.

B.8.1 Vorkommen

Arsen zählt zu den Halbmetallen und kommt in den Oxidationsstufen -3 , 0 , $+3$ und $+5$ vor. Elementar kommt Arsen in der Natur kaum vor. Arsen ist natürlicher Bestandteil der Erdkruste mit einem durchschnittlichen Anteil von 2-5 mg/kg.

In der Luft beträgt der Arsengehalt (meist in partikulärer Form als Arsentrioxid (As_2O_3)) in ländlicher Umgebung zwischen 0,02 und 4 ng/m^3 , in den Städten 3 bis 200 ng/m^3 [Matschuliat et al., 2000].

Die anorganische und organische Form des Arsens sind in der folgende Tabelle gelistet.

Form des Arsen	Chemische Formel	Weitere Bezeichnungen
Rotes Arsen	As_2S_2	Realgar, sandaraca
Gelbes Arsen	As_2S_3	Arsenikon, aurum pigmentum, orpiment
weißes Arsen	As_2O_3	Arsenik
Phenylarsine oxide	$\text{C}_6\text{H}_5\text{AsO}$	

In natürlichen Böden findet man Arsengehalte meist zwischen 0,1 und 20 mg/kg . Kontaminierte Böden, z.B. im Umfeld von Kupferhütten und ehemaligen Arsenproduktionsstätten, können mehr als 1000 mg/kg enthalten [Matschullat et al., 2000; Dickerson et al., 1980; Crecelius et al., 1974; Binder et al., 1987]. Über die chemische Form des Arsens im Boden ist wenig bekannt.

Es ist anzunehmen, dass durch die biologische Aktivität ein Teil in der organischen Form vorliegt [Turpeinen et al., 1999]. Die Gehalte von Arsen im Grundwasser werden stark durch geologische und örtliche Gegebenheiten beeinflusst [Kevekordes et al., 1998; Chowdhury BK, et al., 2000]. In Grund- und Oberflächengewässern hängt das Verhältnis zwischen As(III) und As(V) vom Redoxpotenzial ab.

In Grundwässern können in Abhängigkeit von den Sauerstoff-verhältnissen bis 50% des Gesamtarsens in der dreiwertigen Form gefunden werden [Umweltbundesamt, 1983]. Der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlene Grenzwert für Arsen im Trinkwasser von 10 $\mu\text{g/l}$ wird seit 1997 in Deutschland eingehalten und ist seit 1998 in der EU gesetzlich vorgeschrieben. Für Mineralwässer gelten derzeit noch höhere Grenzwerte für Arsen (50 $\mu\text{g/l}$).

Wegen der oxidativen Aufbereitung wird im Trinkwasser meist etwa 80–90% des Gesamtarsens in der fünfwertigen Form gefunden. Der Grenzwert der Trinkwasserverordnung von 10 µg/l wird in aller Regel weit unterschritten. In anderen Regionen der Erde sind die Arsenwerte im Trinkwasser dagegen wesentlich höher, so dass hier die chronische Exposition zu Erkrankungen der Bevölkerung führen kann. Insbesondere in Indien (West-Bengalen), Taiwan, Argentinien, Nepal und in der inneren Mongolei wurden im Wasser Arsenkonzentrationen von mehr als 3 mg/l gefunden. Mehr als 80 Millionen Menschen in diesen Regionen leben von Trinkwasser, das die Grenze von 50 µg des Elementes pro Liter teilweise deutlich überschreitet. Die meisten Lebensmittel enthalten weniger als 2,5 µg Arsen pro kg. Meeresfrüchte und manche Seefische weisen deutlich höhere Arsengehalte auf. Diese liegen größtenteils als organische Verbindungen, z.B. als Arsenobetain oder Arsenocholin vor, die im Meerestier angereichert werden [Shibata *et al.*, 1992].

B.8.2 Arsen als Stoffwechselgift

Da Arsen kein essentielles Spurenelement ist, sind Mangelercheinungen beim Menschen bisher nicht bekannt. Vielmehr stehen seine toxischen Eigenschaften im Vordergrund: Die meisten Arsenverbindungen sind potente Stoffwechselgifte. Sie greifen in zahlreiche biochemische Prozesse ein, indem sie Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen) von Enzymen und anderen Proteinstrukturen blockieren.

Dadurch stören sie unter anderem den zellulären Energiestoffwechsel, Rezeptor-vermittelte Transportvorgänge, die Signaltransduktion sowie DNA-Reparaturvorgänge [Bernstam *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2002].

Die Giftigkeit hängt von der chemischen Substitution des Arsens ab. Für den Menschen sind Halogeno- und Oxo-Verbindungen des dreiwertigen Arsens stärker giftig als solche der höchsten Oxidationsstufe (fünfwertig). Besonders stark toxisch ist Arsentrioxid (Arsenik), weniger toxisch sind dagegen organische Verbindungen wie Arsenzucker, Arsenobetain und Arsenocholin, die vor allem in Meerestieren, aber auch in einigen Pflanzen vorkommen. Aus den Arsenoxiden Arsenat und Arsenit bilden viele Organismen methylierte Formen.

B.8.2.1 Akute und chronische Wirkungen

Anorganische Arsen-(III-)Verbindungen wurden aufgrund ihrer hohen akuten Toxizität über Jahrhunderte als Mordgift verwendet. Arsen (III) ist mobiler und aufgrund seiner besseren Bioverfügbarkeit 2- bis 10-mal toxischer als Arsen (V). Die orale Aufnahme von 0,1 g (Arsen III) kann tödlich sein. Kurz nach der Aufnahme treten schwere Durchfälle und Erbrechen ein, begleitet von knoblauchartigem Körpergeruch und neurologischen Symptomen.

Die inhalative Aufnahme des hochgiftigen Gases Arsin bei Unfällen führt nach einem Intervall von einigen Stunden zu einer massiven Hämolyse, deren frühes Zeichen ein rot gefärbter Harn ist. Arsenhaltige Reizkampfstoffe führen zu schweren Schädigungen der Haut und Schleimhäute und nach systemischer Aufnahme zu einem allgemeinen Organversagen.

Bei längerfristiger erhöhter Aufnahme von anorganischen Arsenverbindungen, z.B. durch stark belastetes Trinkwasser, kommt es zu Polyneuropathie mit schmerzhaften peripheren Parästhesien sowie Hautveränderungen. In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Regionen der Erde, besonders auch in Bangladesh und West-Bengalen, sehr hohe Arsenbelastungen im Trinkwasser als großes umweltmedizinisches Problem erkannt [Chowdhury et al., 2000; Rahman et al., 2001; Ahsan et al., 2001].

Arsen ist ein Krebs erzeugender Stoff, wobei der Mechanismus der Krebs auslösenden Wirkung noch unklar ist. Arsen ist kein chemisches Mutagen, d.h. es greift die DNA nicht direkt an. Es führt aber *in vitro* und *in vivo* zu chromosomalen Veränderungen [Gebel et al., 2000; Gebel, 1997].

Hautkrebs ist die charakteristische Erkrankung von Menschen mit hoher oraler Arsenbelastung. Nach Einschätzung des Länderausschusses für Immissionsschutz gehört Arsen zu den bedeutsamen Außenluftkanzerogenen [Länderausschuss für Immissionsschutz (LAI), 1993]. Lungenkrebs [Luechtrath, 1983; National Research Council, 1999] sowie Blasen-, Nieren- und Leberkrebs sollen auch durch arsenreiches Trinkwasser begünstigt werden [Bates et al., 1992].

B.8.3 Verwendung von Arsen

Die natürlich vorkommenden Arsensulfide Aurum pigmenum und Realgar wurden schon im antiken Ägypten als gelbe Farbe, Schminke und Hilfsmittel in der Lederindustrie eingesetzt. Auripigment war in der Alchemie bedeutsam, da es beim Reiben an Silber einen Goldglanz bildet.

Trotz der bekannten Giftigkeit von Arsenverbindungen haben Arsenikalien eine lange Tradition als Heilmittel in chinesischer Medizin. Eine 1-prozentige Lösung von Kaliumarsenit wurde nach Reiseberichten des schottischen Missionars David Livingstone 1887 als Antipyretikum und als Mittel gegen die Schlafkrankheit in Afrika eingesetzt.

Es war bis in die 60er-Jahre des letzten Jahrhunderts als Fowler'sche Lösung auch in Deutschland im Gebrauch, wo es außer als Stärkungsmittel zur Psoriasis-Behandlung indiziert war. Zu Anfang dieses Jahrhunderts brachte die Einführung von organischen Arsenverbindungen wie Salvarsan einen Durchbruch in der Behandlung zahlreicher bakterieller Erkrankungen wie Syphilis [Übersichtarbeit von Aronson, 1994]. Seit Ende 2000 ist in den USA auch Arsentrioxid (Trisenox) zur antineoplastischen Chemotherapie seltener Formen der akuten promyelozyten Leukämie (APL) zugelassen.

B.9 Stand der Forschung

B.9.1 Wirkung von Arsen-Verbindungen auf MAP-Kinasen und deren Zielmoleküle

Die bis heute durchgeführten Untersuchungen legen nahe, dass die verschiedenen biologischen Effekte, welche durch Arsen hervorgerufen werden mit grosser Wahrscheinlichkeit auf die Beeinflussung verschiedener Signalwege zurückzuführen sind. Die Mechanismen der Arsen-Kanzerogenese unterliegen einer intensiven Forschung, deren Resultate darauf hindeuten, dass Arsen spezielle Zell-Signaltransduktionswege, die in der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose eingeschlossen sind, beeinflusst und nicht durch einen genotoxischen Effekt Krebs hervorruft.

Es gibt Hinweise darauf, dass Arsen verschiedene MAP-Kinase-Kaskaden aktiviert. Diese Wirkung ist abhängig vom Zelltyp, der Dosis und der Länge der Exposition [Lim et al., 1998; Porter et al., 1999; Simeonova et al., 2000; Daum et al., 2001; Lau et al., 2004]. Ludwig et al., 1998 haben beschrieben, dass Arsenit (500µM) die ERK- und p38-Kinase-Aktivierung in Abhängigkeit von der Zeit in verschiedenen menschlichen Zelllinien bewirkt. Hossain et al., 2000 berichten, dass 100µM Arsenit in T- lymphozyten der Maus eine Erhöhung der Phosphorylierung von ERK, JNK und p38-Kinasen hervorruft. Ähnliche Ergebnisse von anderen Autoren zeigen [Jordanov et al., 1999], dass 200µM Arsenit die JNK1-Aktivität in RAT-1 Zellen stimuliert. Porter et al., 1999 beschreiben die JNK-Aktivierung in menschlichen embryonalen Nierenzellen durch Arsenit und Arsenat. Insbesondere bezieht die Aktivierung von JNK durch Arsenat MEKK3 und MEKK4 mit ein, wohingegen die Aktivierung von JNK durch Arsenit sowohl MEKK2 als auch MEKK3 und MEKK 4 benötigt.

Es wird angenommen, dass die Arsenit-Exposition die Translokation von verschiedenen PKC-Isoformen vom Zytosol zur Plasmamembran verursacht, wo PKC eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion spielt und somit zu den biologischen Effekten der Arsenit-Behandlung beiträgt [Chen et al., 2000]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Arsenit-Behandlung von menschlichen bronchialen epithelialen Zellen (BEAS) in einer direkten Tyrosin-Phosphorylierung von EGF-Rezeptor resultiert. Außerdem bewirkt die Arsenit-Behandlung die Aktivierung von MEK1/2 und dadurch als Folge die Phosphorylierung von ERK und Elk-1. Diese Zellen zeigen eine niedrige Raf-1 Kinase Aktivität, die nicht durch Metal-Exposition gesteigert werden kann [Wu et al., 1999]. Vorherige Studien dieser Gruppen zeigen, dass in der selben Zelllinie eine akute Exposition von 500µM Arsenit ERK2, JNK, p38 Kinasen, ATF-2 und c-Jun aktiviert, aber nicht Elk-1 [Samet et al., 1998].

Andere Autoren haben beschrieben, dass Arsenit (400-500µM) über den EGR-Rezeptor eine Ras-abhängige ERK Aktivierung verursacht [Chen et al., 1998; Doza et al., 1998]. Tanaka et al., 2003 haben ebenfalls gezeigt, dass Arsenikate den MEK1/2-ERK1/2 Signalweg über den EGF-Rezeptor aktivieren.

Trouba et al., 2000 schlußfolgern, dass Arsenit-Exposition eine Unterbrechung der Kontrolle der Zell-Proliferation hervorruft. Studien dieser Gruppe deuten darauf hin, dass Arsenit behandelte Zellen eine erhöhte Reaktion auf Mitogenstimulierung haben und zeigen, dass Arsenit das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung unterbricht. Diese Ergebnisse unterstützen frühere Beobachtungen von gesteigerter DNA-Synthese als Antwort auf Arsenit Behandlung und Stimulierung durch Mitogene [Trouba et al., 1999]. Diese Gruppe hat vor kurzem gezeigt, dass mikromolare Konzentrationen (0,005-5µM) von Natriumarsenit Cox-2 und ERK1/2 Phosphorylierung in normalen menschlichen epidermalen Keratinozyten stimulieren [Trouba et al 2004]. Die Arsenit-Exposition von JB6 Cl41 Zellen führt zur Transformation dieser Zellen und es wurde gezeigt, dass die Arsenit Aktivierung von ERK und nicht von JNK für diese Wirkung verantwortlich ist [Huang et al., 1999]. Die Ergebnisse dieser Gruppe unterstützen die Hypothese, dass die Aktivierung der ERK-Kaskade durch Arsenit karzinogene Effekte fördert, während die Aktivierung von JNK durch Arsenit mit apoptotischer Wirkung einhergeht und damit zu dem zytostatischen Effekt beiträgt. Die Aktivierung von ERK durch Arsenit wurde mit der Proliferation in Verbindung gebracht, während die Aktivierung der beiden Stresskinasen mit Apoptose und Hemmung der Proliferation. Cooper et al., 2004 konnten aufzeigen, dass Arsenit in Konzentrationen von 100µM in HaCat Zellen (spontane, immortalisierte, menschliche Keratinozyten Zelllinien) eine schnelle Aktivierung der p38 und ERK verursacht. Weiterhin haben sie auch eine erhöhte Produktion von Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9, ein AP-1 reguliertes Gen-Produkt, nachgewiesen. Eine Ansammlung der Forschungsdata deutet darauf hin, dass Arsenit durch Modulierung der Signaltransduktion auch tumorpromovierende Eigenschaften besitzt [Simeonova et al., 2000; Waalkes et al., 2000].

Bezüglich der Zielmoleküle der Signaltransduktionskaskaden wurde berichtet, dass Arsenit AP-1 aktiviert als Folge der Erhöhung der Expression von c-fos und c-jun. Die Protooncogene *c-jun* und *c-fos* codieren Proteine, die sich unter Bildung des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1 zusammenlagern, der an einer Nucleotidsequenz in den Promotoren zahlreicher Gene gebunden wird [Cavigelli et al., 1996; Parrish et al., 1999; Hu et al., 2002; Luster et al., 20004].

Andere Autoren haben bestätigt, dass Arsenit c-fos [*Ishikawa et al., 1999*] oder beide c-fos und c-jun Genexpression und AP-1 DNA Bindung verursacht [*Simeonova et al., 2000*].

Arsenit hat variierende Effekte auf NF-kB- Aktivität gezeigt: Aktivierung [*Barchowsky et al., 1996*], Unterdrückung [*Roussel et al., 2000; Kapahi et al., 2000*] oder fehlende Effekte [*Cavigelli et al. 1996; Wesselborg et al., 1997*]. Es gibt Beweise, dass Arsenit Inhibitor Kappa Kinase (IKK) unterdrückt. Kapahi et al., 2000 berichten, dass Konzentrationen von mehr als 10 μM benötigt werden, um eine signifikante Hemmung der Kinase-Aktivität zu erzielen. Experimente mit kultivierten Myelom-Zellen zeigen, dass Arsentrioxid die durch TNF-alpha vermittelte NF-kB Aktivierung in klinisch relevanten Konzentrationen (2-5 μM) [*Hayashi et al., 2002*] vorbeugt.

Ebenfalls wurde eine Aktivierung des egr-1 Gens durch Arsenit beobachtet [*Bernstam et al, 2000; Simeonova et al., 2000*]. Al-Sarraj et al., 2004 haben gezeigt, dass Arsenit eine vorübergehende Erhöhung der Bildung von Egr-1 in human HaCaT Keratinocyten verursacht . Weiter wurde bewiesen, dass die Aktivierung sowohl des EGF-Rezeptors als auch der ERK-Kaskade essentiell für die Induktion der egr-1 Expression durch Arsenit ist.

B.9.2 Wirkung von Arsen-Verbindungen auf Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose

Die meist bekannte Anwendung von Arsen in der Krebstherapie ist die erfolgreiche Nutzung von Arsentrioxid in APL [*Agis et al., 1999; Soignet et al., 1998; Lin et al., 2000; Novick et al., 2000; Camacho et al., 2000; Che-Pin et al., 2000; Zhang et al., 2001*].

Soignet et al., 1998 zeigten in ihren klinischen Untersuchungen mit rückfälligen APL-Patienten, dass die Reaktion auf Arsentrioxid durch erhöhte Expression von Proenzymen Caspases 2 und 3 und die Aktivierung von Caspases 1 und 2 begleitet wurden. Experimente mit kultivierten Myelom-Zellen zeigen, dass die Induktion der Apoptose durch Arsentrioxid in klinisch relevanten Konzentrationen (2–5 μM) über die Caspase-9 Aktivierung verursacht wird und in Kombination mit Dexamethason zu einer additiven Wirkung kommt [*Hayashi et al., 2002*].

Folglich teilt Arsenit paradoxerweise mehrere Eigenschaften eines Tumorpromotors und Zytostatikums. Die Zellproliferation wird durch Arsenit erhöht wie sich in den Blasen von Mäusen gezeigt hat, deren Trinkwasser mit Arsenit behandelt wurde. Erhöhte Zellproliferation zeigt sich auch in mit Arsen behandelten epithelialen Zellen der menschlichen Blase [*Simeonova et al., 2000*]. Im Gegensatz führt die Kombination von Tretionin (ATRA) und Arsentrioxid zu einer beschleunigten Tumorrepression als Folge von erhöhter Differenzierung und Apoptose [*Lallemant-Breitenbach et al., 1999*].

McCabe et al., 2000 haben beschrieben, dass Arsenit 1 μ M in myelomonozytären Leukämie Zellen (U937) die Induktion der Differenzierung durch Vitamin-D fördert. Weiter wurde die Erhöhung von zwei Markern der monozytäre Differenzierung durch Arsenit-Exposition nachgewiesen.

Ebenfalls wurde berichtet, dass 6 μ M Arsenit granulozytäre Differenzierung in HL60 Zellen induziert [*Richards et al., 1988*]. Anderen Autoren haben gezeigt, dass Arsenit nicht nur in hämatopoetischen System Differenzierung induzieren kann. Salazard et al., 2004 demonstrieren, dass Arsenit in Konzentrationen zwischen 0,25-0,5 μ M in 3T3-F442A Präadipozyten Zellen die Expression von Genen induziert, welche für die Adipozyten Differenzierung erforderlich sind.

B.10 Fragestellung

Wie in dem vorherigen Kapitel erläutert wurde, hat das nicht-genotoxische kanzerogen Natriumarsenit eine grosse toxikologische Bedeutung als Umweltgift. Die meisten Arsenverbindungen sind potente Stoffwechselgifte, welche in zahlreiche biochemische Prozesse eingreifen, indem sie Sulphydryl-Gruppen von Enzymen und anderen Proteinstrukturen blockieren. Die Entdeckung des therapeutischen Effektes von Arsentrioxid (ATO) bei akuter promyelozytären Leukämie hat diese „alte“ Substanz zu neuem Leben erweckt [Zhang *et al.*, 2001]. Arsenit beeinflusst spezifische Zell-Signaltransduktionswege, welche an der Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind. Diese Eigenschaften machen das Arsenit zu einer interessanten Substanz für die Signaltransduktionsforschung und für die Entwicklung potentieller neuer Medikamente in der Behandlung neoplastischer Erkrankungen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wirkung von Natriumarsenit auf Signaltransduktionsvorgänge in zwei hämatopoetischen Zellsystemen analysiert werden. Die Erythropoetin-sensitiven ELM-I-1 Zellen der Maus stellen ein geeignetes Modell für die isolierte Untersuchung der erythroiden Entwicklung dar [Shiozaki *et al.*, 1990]. Die K562 Zellen wurden aus einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie isoliert [Lozzio *et al.*, 1975], und sind interessant in Bezug auf die therapeutische Anwendung von Arsenit bei Leukämie.

Es soll der Einfluss von Natriumarsenit in diesen Zellen auf MAP-Kinase-Kaskaden und die daraus resultierende Genexpression untersucht werden. Ebenfalls soll bei therapeutisch relevanten Konzentrationen von Arsenit die Induktion der erythroiden Differenzierung im Hinblick auf die Leukämietherapie untersucht werden.

Im einzelnen handelt es sich um die folgenden Punkte:

1. Der Einfluss von Arsenit auf die Phosphorylierung und Aktivität von MAP-Kinasen. Hierzu werden Western Blot-Analyse und Immunkomplex-Kinase-Assay verwendet.

2. Der Einfluss von Arsenit auf die Transkription: Reporter-gen-Assays mit der Verwendung von spezifischen Promotor-Sequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren.
3. Der Einfluss von Arsenit auf die Induktion der Zielgene von Signaltransduktionskaskaden: Northern Blot-Analyse zum Nachweis von *egr-1*-mRNA.
4. Der Einfluss von Arsenit auf die erythroide Differenzierung: DFA-Färbung zum Nachweis der Hämoglobinproduktion.

Es wird zum Ziele gesetzt weitere Einblicke in die molekularen Wirkungsmechanismen von Arsenit zu gewinnen. Die Untersuchungen der Wirkung von Arsenit auf die erythroide Differenzierung sollen neue Möglichkeiten der Differenzierungstherapie von Leukämie durch Arsenit aufzeigen.

C Material und Methoden

C.1 Materialien

C.1.1 Geräte

- Zentrifugen: EBA 12R (Hettich, Tuttlingen), Modell GS-6 und J2-21 M (Beckman Instruments, München), Kühlzentrifuge Biofuge 15R (Heraeus, Langenselbold)
- Gel print 2000i-Dokumentationssystem + Transiluminator mit integriertem Weißlichttisch (MWG Biotech, Ebersberg)
- Gelrockner, Gelair (Bio-Rad, München)
- Hybridisierungssofen (AGS, Heidelberg)
- One-Dscan software Scanalytics (Billerica, MA, USA)
- DU-64 Spectrophotometer mit Quant I Soft-Pac (Beckmann Instruments, München)
- Western Blot-Apparatur (Mini Protean II) (Bio-Rad, München)
- RNA-Elektrophoresekammer (Horizon 11-14) (AGS, Heidelberg)
- Luminometer/Luminoskan Ascent (Labsystems, Bremen)
- Licht-/Fluoreszenzmikroskop AxioCam/Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena)
- Gene Pulser II und Capacitance Extender Plus (Bio-Rad, München)
- Spannungsquellen: PowerPac Basic (Bio-Rad, München), Sartophor 3000 (Sartorius, Goettingen)
- Radioaktiver Monitor series 900 mini-monitor (Mini-Instruments Ltd)
- Rotilabo-Block-Heater H 250 (Roth, Karlsruhe)

C.1.2 Substanzen und Chemikalien

Alle Chemikalien werden, sofern nicht anders angegeben, in der Reinheitsstufe „z.A.“ von den Firmen Merck, Darmstadt; Biomol, Hamburg; Bio-Rad, München; Sigma-Aldrich, Deisenhofen; Fluka, Neu-Ulm bezogen.

Für molekularbiologische Reaktionsansätze wird „Aqua ad injectabilia“ der Firma Braun, Melsungen benutzt.

Chemikalien

- [α - 32 P]dCTP (ICN Pharmaceuticals, Irvine, CA, USA)
- [γ - 32 P]-ATP (ICN, Eschwege)
- Acrylamid (Biomol, Hamburg)
- Agarose (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Ammoniumpersulfat (Bio-Rad, München)
- Aprotinin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 8-Bromoadenosine 3'-5'-Cyclic Monophosphate (Sigma, München)
- Benzamidin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck, Darmstadt)
- Erythropoietin (rekombinant humanes) (Roche, Mannheim)
- ECL-Entwickler-Kit (Amersham Life Science, Braunschweig)
- EDTA (Merck, Darmstadt)
- Egr-1 2,6 kb PstI Fragment mouse erg-1 cDNA (PD Dr. A. Sellmayer, Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Universität München)
- Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Glyoxal (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Guanidin-Thiocyanat (Fluka, Neu-Ulm)
- Human beta-Aktin cDNA 1,2-kb PstI Fragment (Dr. T. Braun, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Universität Braunschweig)
- Isoamylalkohol (Merck, Darmstadt)

- Isopropanol (Fluka, Neu-Ulm)
- Leupeptin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg)
- Methanol (UKE, Apotheke)
- Milchpulver (Nestlé, Frankfurt a.M.)
- Natriumarsenit (Sigma, München)
- NaCl (Merck, Darmstadt)
- Natriumazid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavone) (Calbiochem, Darmstadt)
- Penicillin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Phenol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Salzsäure (konz) (Merck, Darmstadt)
- TPA (o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) (ICN Biomedicals, Amsterdam)
- *trans*-Reporterplasmide ELK-1, ATF2 und CREB (Stratagene, CA, USA)
- TEMED (Bio-Rad, München)
- Tris (Merck, Darmstadt)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- UO126 MEK ½ Inhibitor (Cell Signalling Technology, MA, USA)
- Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt)

Antikörper

- anti-pERK-IgG (monoclonal, Maus) (Santa Cruz, CA, USA)
- anti-ERK 1-IgG (polyclonal, Kaninchen) (Santa Cruz, CA, USA)
- anti-pJNK-IgG (monoclonal, Maus) (Santa Cruz, CA, USA)
- anti-p38-IgG (polyclonal, Kaninchen) (Santa Cruz, CA, USA)
- anti-Egr-1-IgG (polyclonal, Kaninchen) (Santa Cruz, CA, USA)
- anti-JNK1-IgG (polyclonal, Ziege) (Santa Cruz, CA, USA)
- anti-JNK2-IgG (polyclonal, Kaninchen) (Santa Cruz, CA, USA)

Zellkultur

- α -MEM-Medium (Gibco- Invitrogen, Karlsruhe)
- RPMI-Medium (Gibco- Invitrogen, Karlsruhe)
- Lipofectamine mit PLUS Reagent (Invitrogen, Karlsruhe)
- Fetales Kälberserum (Gibco- Invitrogen, Karlsruhe)
- Pferdeserum (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)

Weitere Materialien

- 24-Kavitäten Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden)
- Röntgenfilme (Fuji, Tokio, Japan)
- Zellkulturflaschen 80 cm² bzw. 25 cm² (Nunc, Wiesbaden)

C.1.3 Zelllinien

K562-Zellen sind menschliche Leukämiezellen, die sich in einem pluripotenten Differenzierungsstadium befinden und sich sowohl zu erythroiden als auch zu myeloiden Zellen entwickeln können. Sie wurden aus einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) isoliert [Lozzio *et al.*, 1975]. Bei über 90 Prozent der CML Patienten ist die Bildung des Philadelphia-Chromosoms der auslösende Faktor. Das Philadelphia-Chromosom entsteht, wenn sich in einer der Stammzellen des Knochenmarks, aus denen die weißen Blutzellen hervorgehen, ein genetischer Unfall ereignet: Während sich die Zelle teilt, erhält Chromosom 9 fälschlicherweise ein Stück von Chromosom 22 und dieses umgekehrt ein Stück von Chromosom 9. Durch diese Translokation geraten auf Chromosom 22 zwei Gene in unmittelbare Nachbarschaft, die normalerweise nur getrennt voneinander vorkommen. Das Produkt dieses "Fusionsgens" (bcr-abl Fusionsprotein) ist ein abnormer Eiweißstoff, der die Blutzellen dazu antreibt, sich ungebremst zu teilen [Konopka *et al.*, 1985]

K562 Zellen werden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in RPMI-Medium gehalten, das 10% fetales Kälberserum, 2mM Glutamin, 50 units/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin enthält.

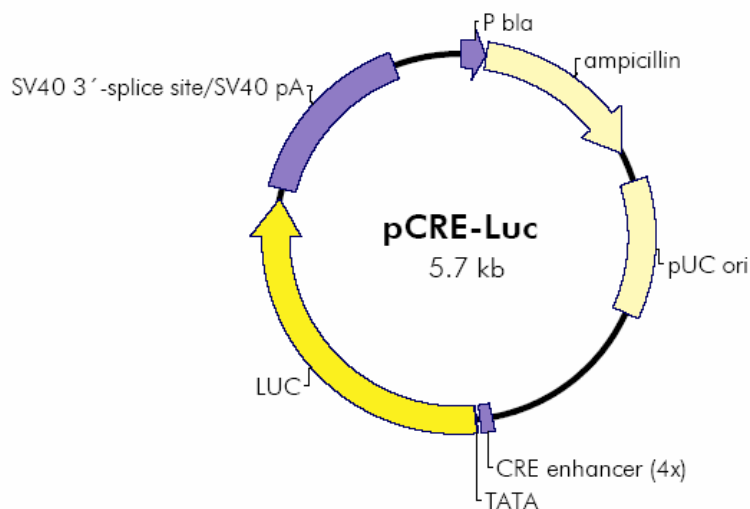
ELM-I-1 Zellen sind Erythroleukämiezellen, die aus der Maus isoliert wurden [Shiozaki *et al.*, 1990]. Sie sind Erythropoietin-sensitiv und stellen neben den K562 Zellen ein gutes Modell für die isolierte Untersuchung der erythroiden Differenzierung dar. Die werden in α -Medium mit 10% Pferdeserum und in den erwähnte Konzentrationen an Glutamin, Penicillin und Streptomycin wie das RPMI-Medium gehalten.

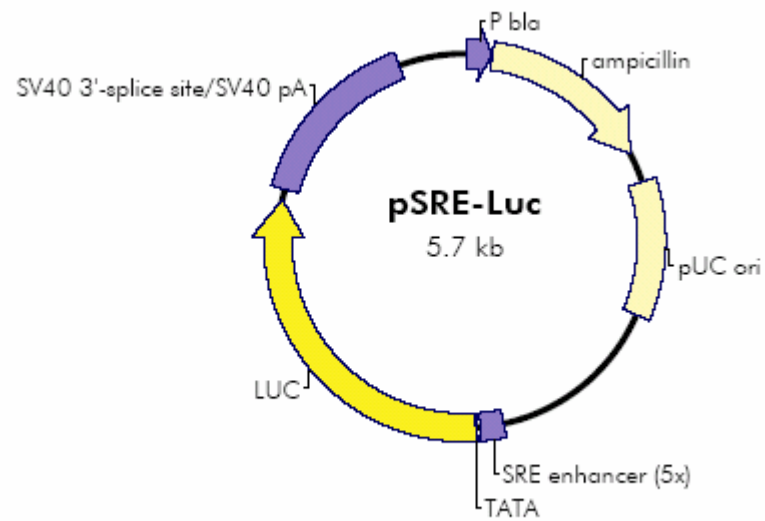
Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. W. Ostertag, Heinrich Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie (Hamburg) zur Verfügung gestellt.

C.1.4 Reportergen-Plasmide und *Trans*-Aktivator-Plasmide

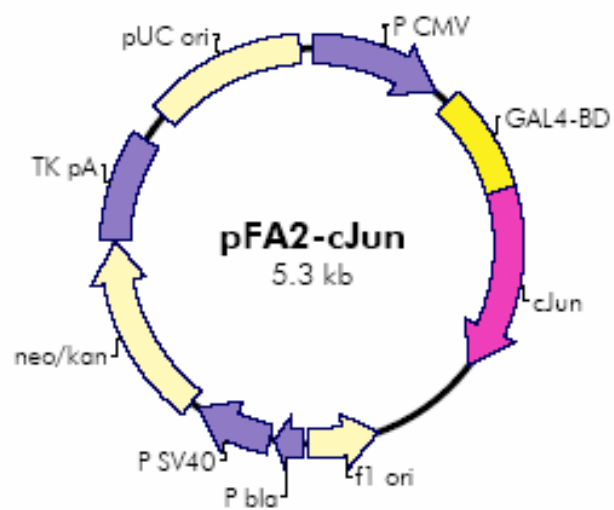
Reportergene sind ein wichtiges Instrument zur Analyse regulatorisch aktiver Promotor- und Enhancerbereiche. Die Quantifizierung des Genreporterproteins durch den biochemischen Nachweistest liefert dabei indirekt Informationen über die Transkriptionsaktivität des vorgeschalteten zu untersuchenden Promotors, der die Expressionsstärke des Reporterproteins gesteuert hat.

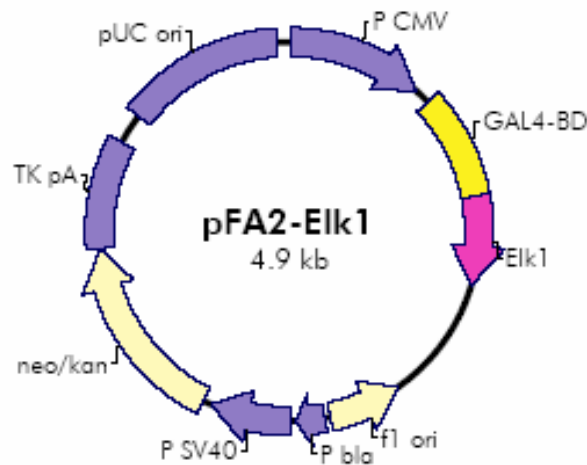
Bei *cis*-Reportersystem werden zwei Reportergenplasmide, pCRE-Luc und pSRE-Luc (Fa. Stratagene), verwendet.





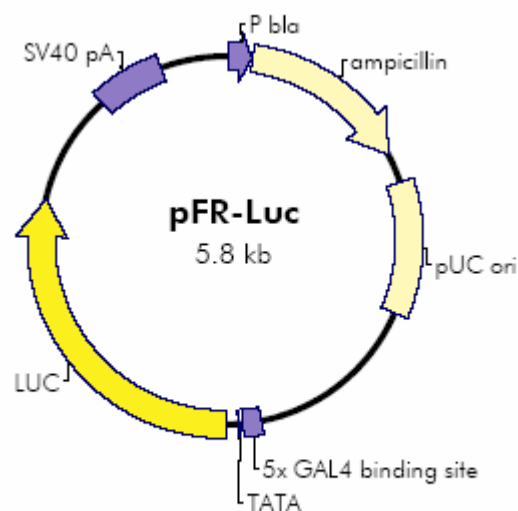
Verwendet werden auch die Pathdetect *trans*-Reportersysteme Elk-1 und c-Jun.





Das *trans*-Reportersystem beinhaltet ein spezifisches fusions *trans*-Aktivator Plasmid, welches eine Aktivierungsdomäne des Transkriptionsaktivators Elk-1 und c-Jun besitzt. Dieses ist direkt mit der Hefe GAL4 DNA-Bindungsdomäne verbunden. Als Promotor für das Fusionsprotein dient der Promotor des Cytomegalievirus, um die konstitutive Expression des *trans*-Aktivator Fusionsproteins zu gewährleisten.

Als zweites Plasmid im *trans*-Reportersystem dient das pFR-Luc Plasmid, welches einen synthetischen Promotor mit fünf Tandem-Wiederholungen der Hefe GAL4 DNA-Bindungsdomäne beinhaltet. Dieser Promotor kontrolliert die Expression des Luziferase-Genes von *Photinus pyralis* (Amerikanische Feuerfliege).



Die beiden Plasmide werden in die Zelle co-transfiziert und das *trans*-Aktivator fusionsprotein wird über den Promotor des Cytomegalievirus konstitutiv exprimiert. Die Aktivierungsdomäne des Fusionsproteins wird durch die entsprechende Kinase in der Zelle phosphoryliert. Zwei aktivierte Fusionsproteine bilden ein Dimer, welches mit seinen GAL4 DNA-Bindungsdomänen an die Bindungsdomänen im pFR-Luc-Reporter Plasmid binden kann. Dies führt zur Expression des Luziferase Genes, das in einem Luziferase-Assay quantifiziert werden kann (Abb. 8).

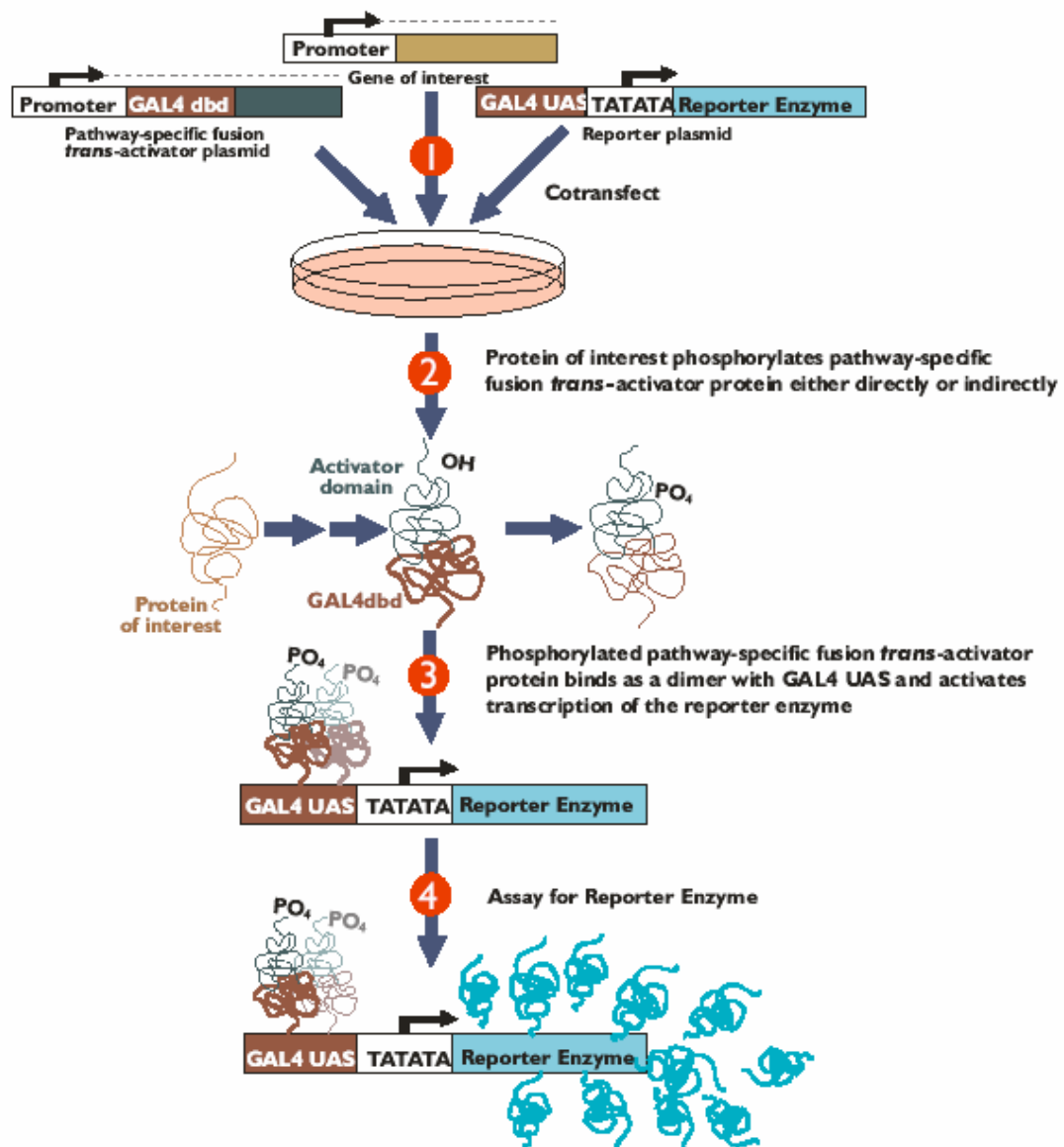


Abb. 8 *In vivo* Signaltransduktionsweg des *trans*-Reportersystemes

C.2 Methoden

C.2.1 Molekularbiologische Methoden: Proteine

C.2.1.1 Western-Blot-Analyse

Der Western Blot ist ein sehr empfindliches und spezifisches Verfahren zum Proteinnachweis. Es verbindet die hohe Trennschärfe der Gelelektrophorese mit der Spezifität der Antikörpererkennung und der Empfindlichkeit von Enzymtests. Dabei wird zunächst Protein isoliert, unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Die Proteine lassen sich dann mit spezifischen Bindungseigenschaften über Antikörper direkt auf der Membran nachweisen.

C.2.1.1.1 Protein-Isolierung

Für jeden Ansatz werden 1×10^6 Zellen ausplattiert und am nächsten Tag mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Nach der Behandlung werden die Zellen geerntet und in 10ml kaltem PBS für 5min bei 200g gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 90µl P-RIPA-Lysispuffer resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (12min, 12000g, 4°C) wird das nicht gelöste Zellmaterial entfernt. 73µl des Überstandes werden mit 23,33 Laemmli III versetzt, für 5min bei 100°C erhitzt und anschließend weitere 5min auf Eis inkubiert. Die Proben werden bei -20°C aufbewahrt.

RIPA-Puffer	Tris-HCl	5mM pH7,4
	NaCl	15mM
	EGTA	100mM
	Nonidet P-40	1%
	Natriumdeoxycholsäure	10%
P-RIPA-Lysispuffer (mit Protease-Inhibitoren)	RIPA +	
	Aprotinin	10µg/ml
	Leupeptin	10µg/ml
	Na ₃ VO ₄ (Natriumvanadat)	1mM
	Benzamidin	10mM
	PNPP (p-Nitrophenylphosphat)	1mM
	Natriumpirophosphat	10mM
	Beta-Glycerophosphat	40mM
	NaF	1mM
	PMSF (Phenylmethylsulfonylfourid)	1mM

Laemmli III	1M Tris-HCl pH 6.8	180mM
	SDS	6% (w/v)
	Glycerol	45% (w/v)
	EDTA	22,5mM
	Bromphenolblau	0,0015% (w/v)
	Beta-Mercaptoethanol	

1xPBS	NaCl	135mM
	KCl	2,7mM
	Na ₂ HPO ₄	9mM
	KH ₂ PO ₄	1,5mM

C.2.1.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Die Bestimmung beruht darauf, dass das Absorptionsmaximum des im Bradford-Reagenz enthaltenen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 sich in Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu von 465 zu 595nm verschiebt [Bradford, 1976]. Grund dafür ist vermutlich die Stabilisierung des Farbstoffes in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine.

Für die Kalibrierkurve werden Lösungen mit 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 und 10µg BSA pro ml angesetzt. Von den Zelllysaten werden jeweils 1,5µl abgenommen und mit 500µl Wasser verdünnt. Die zu bestimmenden Proben werden ebenso wie die BSA-Lösungen 1:1 mit Bradford-Reagenz gemischt und nach etwa 5min bei 595nm gemessen. Anhand der Kalibrierkurve werden die Proteinkonzentrationen der Zelllysate berechnet.

C.2.1.1.3 Elektrophorese und Blot

Hierbei werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. SDS denaturiert Proteine, d.h. verursacht die Dissoziation multimerer Proteine in ihre Untereinheiten und zwingt alle Polypeptidketten in eine gestreckte Konformation mit gleichem Ladungs-Masse-Verhältnis.

Jeweils 40µg Protein werden bei 27mA in 90min aufgetrennt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der getrennten Proteine bei 250mA in 110min auf eine PVDF-Membran (Millipore, Eschborn). Diese Membran besitzt eine sehr hohe Bindungskapazität, eine gute Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln und ein gutes Signal/Hintergrund-Verhältnis mit Chemolumineszenz-Detektionssystemen. Vor der Verwendung muss die PVDF-Membran erst noch für eine Minute mit Methanol benetzt werden. Nach Beendigung des Blotvorganges wird die Membran 3x5min in TBS gewaschen und über Nacht getrocknet, um den Verlust an geblotteten Proteinen zu reduzieren. Die getrocknete PVDF-Membran wird mit der Zugabe von Methanol und anschließendem Waschvorgang in TBS wieder rehydratisiert. Danach erfolgt eine weitere Waschung mit 0,1%igem TBS-Tween-20 für 10min. Die Membran wird anschließend in einer Blockinglösung für 1h bei Raumtemperatur abgesättigt. Im Anschluss daran wird die Membran mit einer Lösung 1:200 verdünnt von Primärantikörpern bestehend aus anti-(pERK), anti-(pJNK), anti-(p38), anti-(Egr-1) und anti-(ERK1) in Blockinglösung für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Spülen für 3x15min in 0,1%igem TBS-Tween-20 erfolgt für eine weitere Stunde die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG 1:6666 oder anti-Kaninchen-IgG 1:10000) in Blockinglösung ohne Natriumazid. Nicht gebundener Antikörper wird durch Spülen der Membran für 3x20min mit TBS-Tween-20 entfernt. Anschließend erfolgt die Visualisierungsreaktion mit dem ECL-Detektionssystem, wobei die entstehende Chemolumineszenz durch Exposition eines Röntgenfilms dokumentiert wird (Abb. 9).

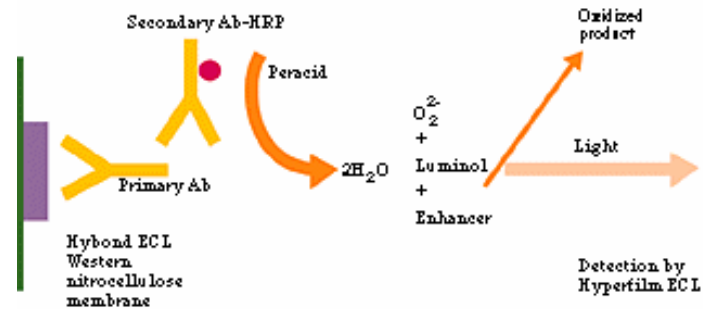


Abb. 9 Prinzip des ECL Detektionssystem

Um sequenzielle Behandlung der Membran mit anderen Antikörper zu ermöglichen, soll die Peroxidase-Aktivität zerstört werden. Daher wird die Membran für 30min in einer H_2O_2 -Lösung geschüttelt und anschließend 3x10min mit TBS gewaschen. Für die Dokumentation wird das Gel print 2000i-System verwendet.

5% SDS-Polyacryl-Amidgel	40% Acrylamid (Acrylamid :5%	
	Bisacrylamid = 37,5:1)	
	Tris-HCl	125mM pH 6,8
	SDS	0,1%
	Ammoniumpersulfat	0,1%
10% SDS-Polyacryl-Amidgel	40% Acrylamid (s.o)	10%
	Tris-HCl	375mM pH 8,8
	SDS	0,1%
	Ammoniumpersulfat	0,1%
	TEMED	0,07%
Elektrophoresepuffer	Tris-OH	25mM
	Glycin	0,2M
	SDS	0,1%

Blotpuffer	Tris-OH	25mM
	Glycin	0,2M
	Methanol	15%
1xTBS pH7,4	Tris-OH	50mM
	NaCl	0,2M
Blockinglösung	Milchpulver	5%
	Tween-20	0,1%
	Natriumazid	0,02
	In 1xTBS	
H_2O_2 -Lösung	H_2O_2	0,5%
	Tween-20	0,1%
	In 1xTBS	

C.2.1.2 Immunkomplex-Kinase-Assay

Das Prinzip des funktionellen Assays zur Überprüfung der MAP-Kinase-Aktivität beruht auf der enzymatischen Aktivität dieser spezifischen Kinasen. Durch eine Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern wird die untersuchte MAP-Kinase aus einer definierten Menge Zelllysats isoliert. In Gegenwart von radioaktiv markiertem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP wird der Immunpräzipitationskomplex mit einem spezifischen Substrat inkubiert. Die Proben werden in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Signale auf einem Film sichtbar gemacht.

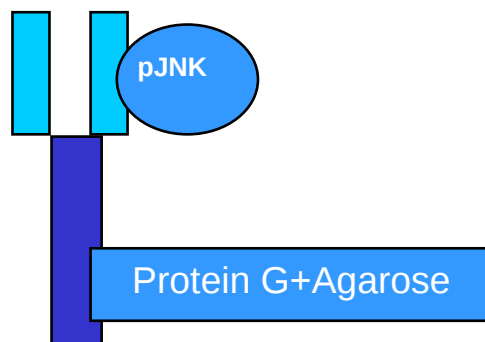


Abb. 10 Prinzip des Kinaseassays

Für jeden Ansatz werden 1×10^7 Zellen ausplattiert und am nächsten Tag mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Nach der Behandlung werden die Zellen geerntet und in 10ml kaltem PBS für 5min bei 200g gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 1ml Lysispuffer resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (12min, 12000g, 4°C) wird das nicht gelöste Zellmaterial entfernt. Anschließend wird das Zellextrakt für eine Stunde mit polyklonalem JNK1 Antikörper (Ziege) und polyklonalem JNK2 Antikörper (Kaninchen) (Santa Cruz, CA, USA) behandelt. Im Anschluss daran wird Protein G PLUS Agarose (Santa Cruz, CA, USA) dazugegeben und bei 4°C zwei weitere Stunden inkubiert. Es folgen zwei Waschschriffe mit Lysis-Puffer und zwei mit Kinase-Puffer, wobei der Komplex immer 5min bei 2500g und 4°C abzentrifugiert wird.

Anschließend werden die gewaschenen Immunpräzipitate mit 20µM ATP, 1mg c-jun-Substrat und 0,5 µCi [γ 32 P] ATP (ICN Pharmaceuticals. Irvine, CA, USA) in 20µl Kinase-Puffer bei 30°C für 30min inkubiert. Die Reaktion wird dann mit 10µl 3xLaemmli gestoppt und die Proben bei 95°C 3min erhitzt. Die Auftrennung der Proben findet in einem 10%igen Polyacrylamidgel statt. Das Gel wird anschließend 2X5min mit Wasser gewaschen, dann eine Stunde in Fixierlösung fixiert und zum Schluss in Folie eingeschweißt, getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert.

Lysis-Puffer	Tris-HCl (pH 7.5)	20mM
	NaCl	150mM
	EDTA	1mM
	EGTA	1mM
	β-glycerophosphate	1mM
	Natrium pyrophosphate	25mM
	Na ₃ VO ₄	1mM
	Triton X-100	1% (v/v)
	Leupeptin	10µg/ml
	Aprotinin	10µg/ml
	Antipain	10µg/ml
	Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	1mM
Kinase-Puffer	Tris-HCl (pH 7.5)	25mM
	MgCl ₂	10mM
	β-glycerophosphate	5mM
	Na ₃ VO ₄	0,1mM
	Dithiothreitol (New England BioLabs)	2mM
Laemmli III	Wie unter C.2.1.1.1 Protein-Isolierung	
1x PBS		
10% Polyacrylamidgel	Wie unter C.2.1.1.3 Elektrophorese und Blot	0,5%
Fixierlösung	Methanol	10%
	Eis-Essig	10%

C.2.2 Molekularbiologische Methoden: RNA

C.2.2.1 Northern Blot-Analyse

Die Northern Blot-Analyse dient dazu, die Expression eines bestimmten Gens in verschiedenen Zelllinien oder Geweben auf der Ebene der Transkription qualitativ oder quantitativ zu bestimmen. Hierbei lässt sich eine bestimmte RNA in einem RNA-Gemisch nachweisen. Für den Nachweis wird die gesamte RNA zunächst isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Filter übertragen. Der Filter wird mit einer markierten DNA-Sonde inkubiert. Die Hybride lassen sich autoradiographisch nachweisen.

C.2.2.1.1 Isolierung von RNA

Die Extraktion der RNA erfolgt nach der Methode von *Chomczynski und Sacchi, 1987*. Für jeden Versuch werden 1×10^7 Zellen pro Ansatz ausplattiert und nach 12h mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit werden die Zellen geerntet und 5min bei 200g abzentrifugiert. Das Pellet wird in Solution D resuspendiert und dann nacheinander 100µl Natriumacetat 2M pH4, 1ml Phenol und 200µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben. Die Mischung wird 15min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bis zur Phasentrennung zentrifugiert (60min, 3000g, 4°C). Die obere, wässrige Phase, in welcher sich die RNA befindet, wird abpipettiert und mit 1ml Isopropanol versetzt. Die Ausfällung der RNA erfolgt bei -20°C für 5h. Im Anschluss daran wird bei 4°C 15min bei 1000g zentrifugiert, das Pellet in 300µl Solution D resuspendiert, mit 300µl Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C erneut gefällt. Danach wird die RNA wieder abzentrifugiert (15min, 1000g, 4°C) und das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen. Die RNA wird anschließend getrocknet und in 110ml 0,5%igem SDS gelöst. Um eine vollständige Lösung der RNA zu erreichen, wird die Mischung kurz auf 56°C erwärmt.

Solution D	Guanidin-Thiocyanat	4M
	Natriumcitrat	25mM
	Sarcosyl	0,5%
	2-Mercaptoethanol	0,1M
Natriumacetat-Puffer I	2M pH4	
Natriumacetat-Puffer II	3M pH5,5	

C.2.2.1.2 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Die Konzentrationsbestimmung von RNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260nm, wofür die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind. Die Absorption wird photometrisch in Quarzküvetten gemessen, die 1cm breit sind. Eine Extinktion von 1,0 entspricht ungefähr einer Konzentration an RNA von 40µg/ml.

Zur RNA-Qualitätskontrolle wird zusätzlich das Verhältnis OD260nm/OD280nm ermittelt. Zweimal 5µl der Probe werden für diesen Zweck verwendet. 40-60µg RNA werden mit dem 0,1fachen Volumen Natriumacetat 3M pH5,5 und dem doppelten Volumen Ethanol bei –80°C über Nacht ausgefällt. Die restlichen Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

C.2.2.1.3 Glyoxalisierung, Elektrophorese und Blot

Zuerst wird die RNA 15min abzentrifugiert und das Pellet getrocknet. Anschließend wird die RNA mit dem Glyoxalisierungs-Mix 50min bei 56°C glyoxalisiert. Zuvor werden jedoch pro Ansatz zweimal 1,5µl RNA-Probe entnommen und bei 260nm photometrisch bestimmt. Aliquots von 40µg werden mit 3,4µl Probenpuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben laufen zuerst für 30min bei 30V und dann für weitere 4h bei 40V. Im Anschluß daran transferiert man die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren auf eine Nylon-Membran (Biodyne A, Gelman Laboratory). Der Transfervorgang verläuft im 20xSSC-Pufferstrom über Nacht.

Glyoxalisierungs-Mix	Glyoxal	7,5%
	DMSO (Dimethylsulfoxid)	50%
	Natriumphosphat	0,5µM
	In A.ad inject.	
Elektrophoresepuffer	Natriumphosphatpuffer 0,01 M pH7	
Probenpuffer	Ficoll	10%
	Bromphenolblau	0,4%
	Na ₂ HPO ₄	0,01M
20xSSC	NaCl	3M
	Trinatriumcitrat	0,3M

C.2.2.1.4 Hybridisierung

Nach dem Transfer muss die RNA auf der Membran fixiert werden. Hierbei wird die RNA für 2h bei 80°C und Unterdruck fixiert, wobei die Glyoxalreste entfernt werden.

Bei dem Hybridisierungsverfahren erfolgt die Detektion der zu analysierenden RNA über die sequenzspezifische Anlagerung von komplementären, markierten Nukleinsäure-Sonden. Die Membran wird 6h bei 42°C mit einer Prähybridisierungslösung geblockt, um die Sättigung unspezifischer Bindungsstellen zu erzielen. Anschließend wird die Membran erneut in einer Prähybridisierungslösung, die die radioaktiv markierte und bei 100°C denaturierte DNA-Sonde enthält, für 18h bei 42°C inkubiert.

Prähybridisierungslösung	Formamid	50%
	Heringssperma-DNA	300µg/ml
	BSA (Bovines Serumalbumin)	0,01%
	Ficoll	0,01%
	PVP (Polyvinylpyrrolidon)	0,01%
	SDS	0,2%
	Natriumphosphat	0,05M pH 6,5
	SSC	5x

Die Markierung der DNA-Sonden (mit radioaktivem [α -³²P]dCTP) erfolgt mit dem Multiprime DNA-labelling System von Amersham und wird auf eine Sephadex G-50 Saule von Pharmacia gereinigt. Nicht oder unspezifisch gebundene Sonde wird durch folgende Waschschrte entfernt.

Lösung	Temperatur	Zeit
2 x SSC/0,1% SDS	20°C	30 min
2 x SSC/0,1% SDS	50°C	60 min
0,5 x SSC/0,1% SDS	50°C	30 min
0,2 xSSC/0,1% SDS	55°C	30 min

Die gesuchte Zielsequenz wird nun durch den Nachweis der spezifischen Bindungen der markierten Sonde identifiziert, welche durch Autoradiographie sichtbar gemacht wird. Die Autoradiographie erfolgt mit Röntgenfilmen, die zur Dokumentation dauerhaft aufbewahrt werden können. Die DNA-Sonden egr-1 und β -Aktin mRNA werden in diesem Fall verwendet.

C.2.3 Reporter-gen-Assay

C.2.3.1 Elektroporation von *E.coli* XL-1 blue

Plasmide können in Bakterien durch Antibiotika-Selektion vermehrt werden. Die eingesetzten Reporter-gen-Plasmide werden in *E.coli* XL-1 blue transformiert (Elektroporation). Für die Elektroporation werden Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und nach Möglichkeit salzfrei eingefroren. 40µl XL-1 blue-Alliquots (ca. 1×10^{10} Bakterien) werden in vorgekühlte 1mm Küvetten überführt und einmal mit 10ng/µl Plasmid bei 1,7kV und 25µF gepulst. Hierbei bilden sich Poren in den Bakterien, durch welche die DNA in die Zelle hineinwandert. Nach dem Pulsen werden sofort 960µl SOC-Lösung (37°C) zugegeben. Im Anschluß daran werden sie für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Auf die Agarplatten werden zwischen 50 oder 100µl Ansatz ausplattiert. Nach Antibiotika-Selektion werden resistente weiße Kolonien zur Amplifikation der Plasmide in Flüssigmedium (100ml LB-Ampicillin bzw. Kanamycin) überimpft.

SOC-Lösung (pH 7.0)	Bacto-tryptone	20g
	Bacto-Hefe-Extrakt	5g
	NaCl	8,6mM
	250mM KCl	10mM
	1 M Glucose	20ml
	2 M MgCl ₂ x6H ₂ O	5ml
	950ml H ₂ O auf pH7 einstellen, dann auf 1000ml	
LB-Medium	Bacto-tryptone	10g
	Bacto-Hefe-extrakt	5g
	NaCl	171mM
	950ml H ₂ O auf pH 7 einstellen, dann auf 1000ml	
LB-Agar	LB-Medium + 15g Bacto-Agar/liter	
Ampicillin, Kanamycin	50µg/ml	

C.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Endotoxine kommen in der Zellwand gramnegativer Bakterien und Blaualgen vor und bilden mit Eiweißen und Fettverbindungen die äußere Membran.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgt unter Verwendung des EndoFree Plasmid Maxi Kits der Fa.Qiagen, da Endotoxine die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen können.

Die Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse der Zellen freigesetzt, wobei Zellwandbestandteile sowie genomische DNA sedimentiert werden. Die enthaltene Plasmid-DNA wird nun selektiv an ein Trägermaterial gebunden und durch Waschen von Verunreinigungen (RNA, Proteine) befreit. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt unter einer erhöhten Ionkonzentration mit anschließender Präzipitation durch Isopropanol. Das in der gefällten DNA enthaltene Salz wird durch Waschen mit 70%igem Ethanol entfernt.

C.2.3.3 Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen erfolgt photometrisch, wobei $A_{260\text{nm}} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Bei einem Quotienten von $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8 - 2,0$ kann von einer proteinfreien DNA-Lösung ausgegangen werden.

C.2.3.4 Transiente Transfektion von K562 und ELM-I-1 Zellen mit Reporter-Plasmiden

Reporterassay-Technik ermöglicht, Signaltransduktionswege *in vivo* zu untersuchen. Bei einer transienten Transfektion erfolgt kein stabiler Einbau der Plasmid-DNA in das Genom. Es wird im Gegensatz zur stabilen Transfektion kein Resistenz-Gen kotransfiziert. Somit entfällt die lange Selektionsphase, und das Isolieren bzw. Charakterisieren von Einzelklonen wird hinfällig.

Alle Transfektionen werden mit dem LipofectamineTM Transfektionsreagenz (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. LipofectamineTM ist ein kationisches, lipidbasierendes Transfektionsreagenz, das zuerst die Fremd-DNA komplexiert und diese dann während der Transfektion durch die Zellmembran in das Cytoplasma transportiert. LipofectamineTM wird mit PlusTM Reagenz (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) kombiniert, um eine erhöhte Expression des Produktes zu ermöglichen. Nach einer Lipofektion, die unter serumfreien Bedingungen durchgeführt wird, ist es besonders wichtig, die Zellen noch einige Zeit in Vollmedium zu halten.

Die Transfektion der K562- und ELM-I-Zellen wird in 24-Well-Kulturschalen durchgeführt. Die Zellen werden in einem Gesamtvolumen von jeweils 2ml RPMI- bzw. α -MEM-Medium mit Pferdeserum ausgesät. Nach der Kultivierung über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ hatten die Zellen 70-80% Konfluenz erreicht und konnten nun mit den Vektorkonstrukten transfiziert werden.

Lösung A	1µg Plasmid	3µl PLUS Reagenz	50µl OPTIMEM-Medium
Lösung B		2µl Lipofectamine	50µl OPTIMEM-Medium

Die Transfektionsansätze werden entsprechend der Tabelle in Eppendorf-Reaktionsgefäßen hergestellt. Die Lösung A wird 15min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird mit der Lösung B gemischt und weitere 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Transfektionsansatz (Lösung A+ Lösung B) den einzelnen Kavitäten, die vorher mit 3x2ml OPTIMEM-Medium gewaschen und mit 400µl OPTIMEM gefüllt werden, zugegeben. Die Transfektionslösung wird nach 3h entfernt und durch 2ml frisches, komplettes Medium ersetzt. Nach 12h werden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt und nach weiteren 7h das Reporterprotein gemessen.

C.2.3.6 Detektion und Quantifizierung des Reporterproteins Luziferase

Beim Luziferase-System dient ein Biolumineszenz hervorrufendes Gen als Reporter. Derartige Gene (*luc*-Gene) kodieren für Luziferase und kommen in der Natur beispielsweise bei Glühwürmchen, Leuchtkäfern (Firefly-Luziferase) oder Leuchtbakterien (bakterielle Luziferase) vor. Wird dann Luziferase in transfizierten Zellen als Reporterprotein gebildet, kann die Aktivität des Enzyms *in vitro* durch eine Biolumineszenzreaktion in den Zelllysaten gemessen werden. Firefly-Luziferase wandelt Luziferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg²⁺ in Oxyluciferin und CO₂ um. Hierbei wird Licht bei 562nm emittiert, das in einem Luminometer gemessen werden kann (Abb. 11).

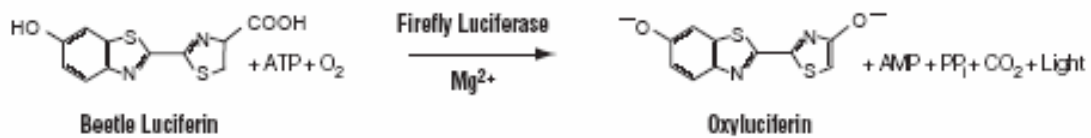


Abb. 11 Biolumineszenz Reaktion katalysiert durch die Luziferase

C.2.3.6 Luziferase-Bestimmung

Für die Messung der Luziferase-Aktivität wird zuerst das Medium entfernt und die Zellen 2x mit 2ml PBS gewaschen. Anschließend werden 300µl 1xRLB (Fa) dazugegeben und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zelllysats wird in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und nach der Homogenisierung 3min bei 12000g und 4°C abzentrifugiert. Anschließend werden 20µl vom Überstand mit 100µl Luciferase-Assay-Reagenz gemischt. Die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wird in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten 10sec mit Hilfe eines Luminometers durchgeführt. Die relative Lichtemission wird auf die Proteinkonzentration relativiert.

Von den Ergebnissen aller Experimente werden die Mittelwerte und Standardabweichungen vom Mittelwert berechnet.

C.2.4 Methoden zur Beurteilung von Differenzierung

Da sich sowohl K562 als auch ELM-I-1-Zellen zu erythroiden Zellen entwickeln können, wird in beiden Zelllinien die 2,7-Diaminofluoren-Färbung durchgeführt.

Diese Methode dient dem histochemischen Nachweis von Hämoglobin in erythroiden Zellen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Vorhandensein einer Pseudoperoxidase in Hämoglobin, welche mit 2,7-Diaminofluoren als Wasserstoffdonator in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Bildung von Fluorenblau aus Diaminofluoren katalysiert [Kaiho et al., 1985].

$1,7 \times 10^5$ Zellen werden in 5ml Medium ausplattiert, mit den Versuchssubstanzen behandelt und für 3 Tage inkubiert. Für den Nachweis von Hämoglobin werden 100µl 200mM Tris-HCl (pH7.5), 10µl Diaminofluoren (100mg in 10ml 90%iger Essigsäure) und 1µl 30%iges Wasserstoffperoxid zusammenpipettiert. 100µl von dieser Lösung werden mit 100µl Zellsuspension vermischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran erfolgt die Auszählung der Zellen in der Neubauerzählkammer. Im Rahmen der Auswertung wurden die positiven und die negativen Zellen gezählt und einander gegenübergestellt.

D Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Natriumarsenit auf Signaltransduktionsvorgänge in hämatopoetischen Zellen untersucht. Im ersten Abschnitt wurde mit Hilfe von Western und Northern-Blot-Analyse die Wirkung von Natriumarsenit auf MAP-Kinase-Kaskaden und auf die Induktion der *egr-1* Expression untersucht. Überdies wurden MEK-Inhibitoren PD 98059 und UO126 eingesetzt um zu klären, welche MAP-Kinase für die Induktion der *egr-1* Expression verantwortlich ist. Weiterhin wurde mit Hilfe von Reporter-Gen-Assay untersucht, welche der regulatorischen Sequenzen in der Promotorregion für die Induktion der *egr-1*-Expression verantwortlich sind.

Im zweiten Abschnitt wurde die Wirkung von Natriumarsenit auf die erythroide Differenzierung in therapeutisch relevanten Konzentrationen getestet. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von Arsenit auf die Elk-1- und SRE-vermittelte Genexpression untersucht als mögliche Ursache für die Wirkung auf die Differenzierung. Vergleichende Untersuchungen wurden mit Arsenitrioxid durchgeführt, da diese Arsen-Verbindung bereits als potentiell Zytostatikum in klinischer Prüfung befindet.

D.1 Wirkung von Natriumarsenit auf MAP-Kinase vermittelte Signaltransduktionswege

Im Folgenden sollen die Effekte von Natriumarsenit auf die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskaden (MAP-Kinase-Kaskaden) und die daraus resultierende Induktion der Genexpression (*egr-1*) in ELM-I-1 Zellen und K562 Zellen untersucht werden. *Egr-1* gehört zu den „immediate early response“ Genen und ist ein wichtiges signalgesteuertes Gen, welches über MAP-Kinasen reguliert wird. Da in der Promotor-Region von *egr-1* sowohl mehrere SRE (serum response element)- als auch CRE (cAMP-response element) Bindungsstellen zu finden sind, wurde anschließend untersucht, welche von diesen regulatorischen Sequenzen für die Induktion der *egr-1* Expression verantwortlich ist.

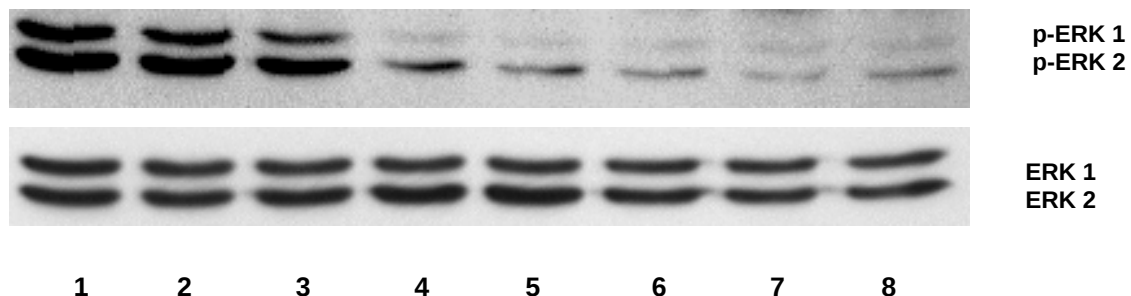
D.1.1 Einfluss von Natriumarsenit auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen

Mit Hilfe der Westernblot-Analyse wurde die Phosphorylierung und Aktivierung von MAP-Kinasen (ERK1/2, JNK und p38) sowohl in ELM-I-1 als auch in K562 Zellen nach der Behandlung mit Arsenit verfolgt. Zuerst wurde die Wirkung von Arsenit in einem Konzentrationsbereich von 1µM bis 50µM untersucht. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an Arsenit für eine Stunde behandelt. Ebenfalls wurde die Kinetik der Wirkung von Arsenit auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen untersucht. Zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen 15 min und vier Stunden) wurde der Phosphorylierungszustand der MAP-Kinasen nach der Behandlung mit 50 µM Arsenit untersucht.

D.1.1.1 Wirkungen verschiedener Arsenit-Konzentrationen auf die Phosphorylierung der ERK MAP-Kinasen in ELM-I-1 und K562 Zellen

ELM-I-1 und K562 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an Arsenit für eine Stunde behandelt. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers für pERK wurde die Phosphorylierung von ERK nachgewiesen. Als interne Kontrolle für die Auswertung wurde die gleiche Membran mit ERK1 Antikörper behandelt und die Signale auf die jeweilige interne Kontrolle bezogen. Die ERK1 Antikörper reagiert auch mit ERK2. Diese Isoform ist in den untersuchten Zellen, besonders in K562 Zellen, viel stärker exprimiert (Abb.12).

A. ELM-I-1 Zellen



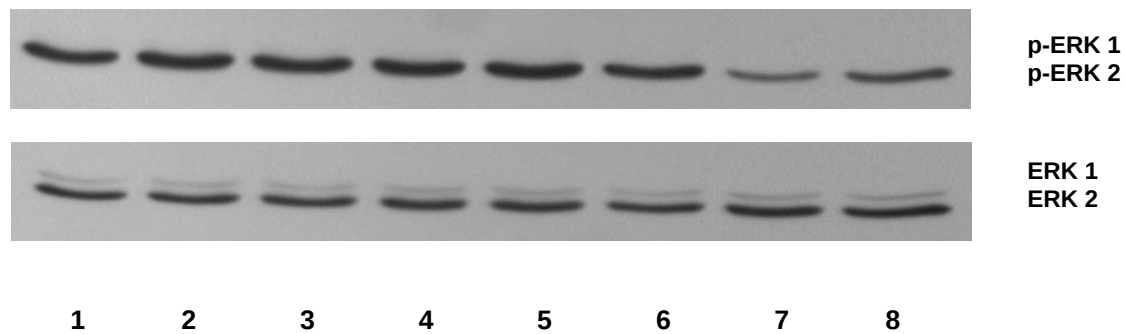
B. K562 Zellen

Abb. 12 Western-Blot-Analyse von ERK1/2 aus ELM-I-1 Zellen und K562 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Arsenitkonzentrationen für eine Stunde.

Spur: **1** Kontrolle, **2** Arsenit 1µM, **3** Arsenit 2,5µM, **4** Arsenit 5µM, **5** Arsenit 7,5µM, **6** Arsenit 12,5µM, **7** Arsenit 25µM, **8** Arsenit 50µM.

Für jeden Ansatz wurden 1×10^6 Zellen ausplattiert und mit den angegebenen Konzentrationen an Arsenit behandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. 40µg Protein wurden dann in einem 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss daran auf eine PVDF-Membran geblottet. Daraufhin erfolgte die Behandlung der Membran mit Antikörpern gegen p-ERK und anschließend mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach Detektion mit dem ECL-System wurde eine Autoradiographie aufgenommen. Die p-ERK Signale wurden durch Behandlung mit H_2O_2 entfernt und die gleiche Membran wurde anschließend mit ERK 1 Antikörper behandelt. Diese Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Versuchen bestätigt.

In ELM-I-1 Zellen ist eine Abnahme der ERK-Phosphorylierung schon bei niedrigen Arsenit-Konzentrationen von 5µM zu erkennen, welche um so stärker war, je mehr Arsenit eingesetzt wurde. In K562 Zellen fängt die Abnahme der ERK-Phosphorylierung bei 12,5µM an.

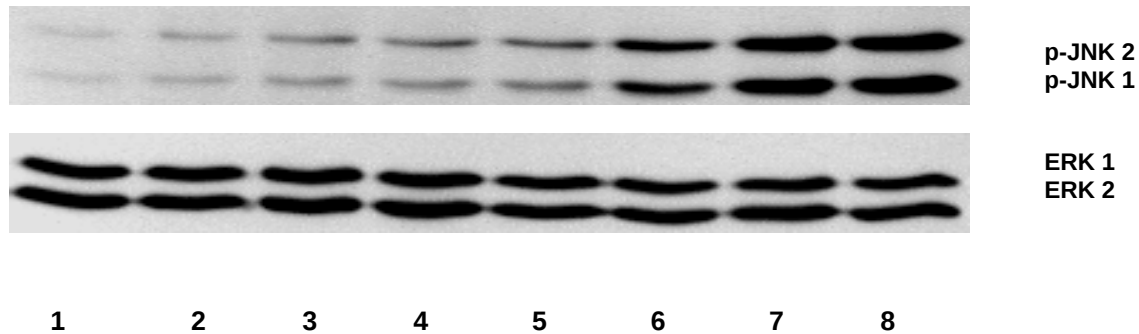
D.1.1.2 Wirkungen verschiedener Arsenit-Konzentrationen auf die Phosphorylierung von JNK-Kinase in ELM-I-1 und K562 Zellen

Es ist bereits bekannt, dass die JNK-Kaskade durch chemischen und physikalischen Stress stimuliert wird [Davis, 2000]. Aus diesem Grund befassten sich weitere Versuche mit der Wirkung von Natriumarsenit auf die Phosphorylierung der Stresskinase JNK.

Für die Untersuchung der Wirkung von Arsenit auf die JNK wurden wieder Konzentrationen von 1µM bis 50µM ausgewählt. Die Zellen wurden eine Stunde lang mit Arsenit inkubiert. Anschließend wurde die Phosphorylierung der JNK mit Hilfe von Western-Blot-Analyse untersucht.

Dazu wurde ein Antikörper gegen Phospho-JNK verwendet (Abbildung 13). Als interne Kontrolle wurde auch in diesen Versuchen ERK1 und ERK2 nachgewiesen.

A. ELM-I-1 Zellen



B. K562 Zellen

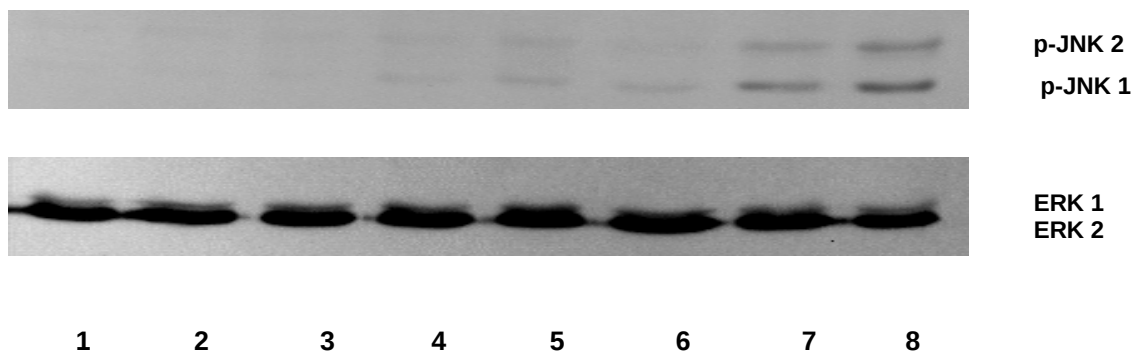


Abb. 13 Western-Blot-Analyse von JNK1/2 aus ELM-I-1 und K562 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Arsenitkonzentrationen für eine Stunde.

Spur: 1 Kontrolle, 2 Arsenit 1 μM , 3 Arsenit 2,5 μM , 4 Arsenit 5 μM , 5 Arsenit 7,5 μM , 6 Arsenit 12,5 μM , 7 Arsenit 25 μM , 8 Arsenit 50 μM .

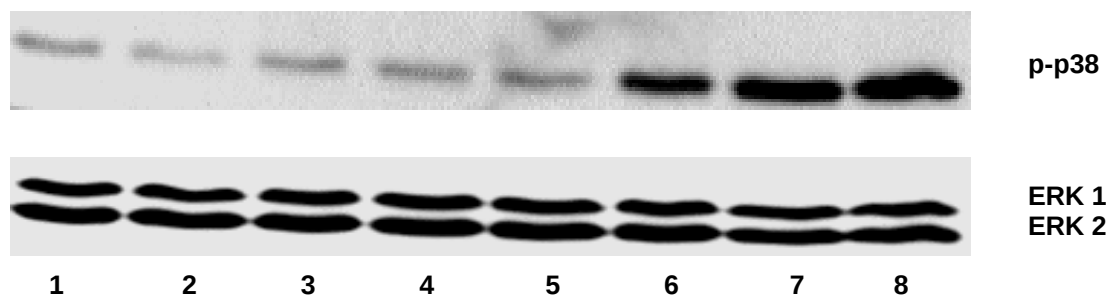
Nach Behandlung von ELM-I-1 und K562 Zellen für eine Stunde mit Arsenit wurde das zelluläre Protein isoliert und ein Westernblot-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe der spezifischen Antikörper für pJNK wurde die Phosphorylierung nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Versuchen bestätigt.

Die Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Aktivierung der JNK in beiden Zelllinien. In einem weiteren Versuch wurde Arsenit bei einer Konzentration von 100 μM auf die JNK-Phosphorylierung getestet. Dieser Versuch zeigte, dass die JNK-Aktivierung bei 50 μM Arsenit ihr Maximum erreicht.

D.1.1.3 Wirkungen verschiedener Arsenit-Konzentrationen auf die Phosphorylierung von p38 MAP-Kinasen in ELM-1 und K562 Zellen

In der Literatur gibt es Hinweise dafür, dass Arsenit konzentrations-abhängigen und zellspezifischen Einfluss auch auf die p38-Kaskade hat [Kietzmann *et al.*, 2003; Duyndam *et al.*, 2003; Drobna *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002]. Um festzustellen, welche Wirkung Arsenit in den untersuchten Zelllinien auf die p38-Kaskade hat, wurden die Zellen in einem Konzentrationsbereich von 1 μ M bis 50 μ M für eine Stunde behandelt und die Phosphorylierung von p38 mit Hilfe der Western-Blot-Analyse untersucht (Abb.14). Auch hier wurde ERK 1 und ERK 2 als interne Protein-Kontrolle nachgewiesen.

A. ELM-I-1



B. K562 Zellen

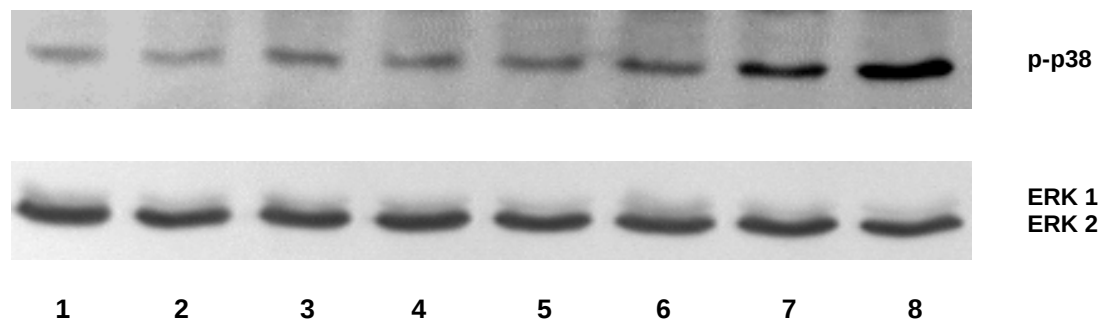


Abb. 14 Western-Blot-Analyse von p38 aus ELM-I-1 und K562 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Arsenitkonzentrationen für eine Stunde.

Spur: 1 Kontrolle, 2 Arsenit 1 μ M, 3 Arsenit 2,5 μ M, 4 Arsenit 5 μ M, 5 Arsenit 7,5 μ M, 6 Arsenit 12,5 μ M, 7 Arsenit 25 μ M, 8 Arsenit 50 μ M. Nach einer Stunde erfolgte die Proteinisolierung und eine Elektrophorese mit 40 μ g Protein je Spur. Die Durchführung des Western Blot erfolgte auf die bereits beschriebene Weise. Diese Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Versuchen reproduziert.

Wie aus der Abbildung 14 ersichtlich ist, findet sich in dem Beobachtungszeitraum eine gesteigerte Menge an phosphoryliertem p38 gegenüber der Kontrolle. Bei 12,5µM fängt die Aktivierung an, welche bis 50µM zunimmt.

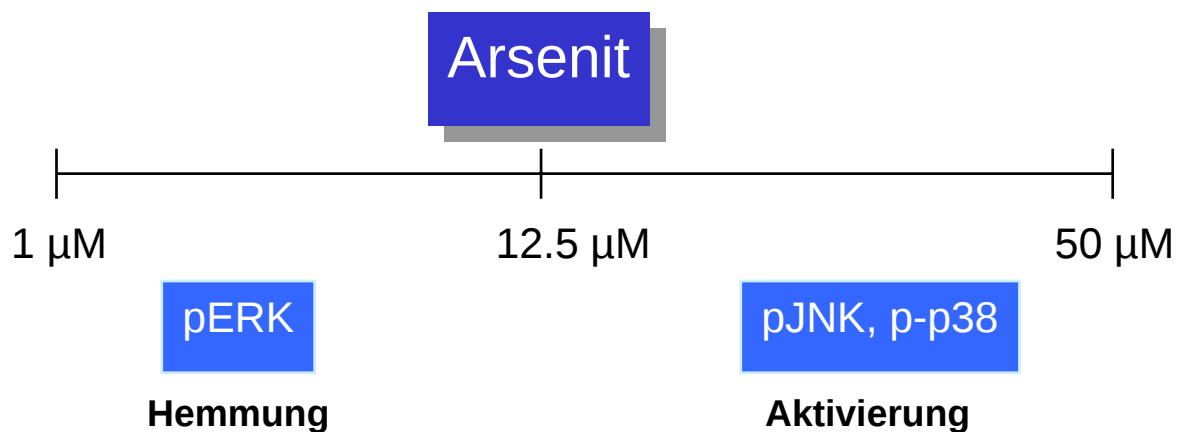


Abb. 15 Wirkung von Natriumarsenit auf die MAP-Kinasen

Insgesamt ist festzustellen, dass sowohl in ELM-I-1 als auch in K562 Zellen eine konzentrationsabhängige Aktivierung der beiden Stresskinasen (JNK und p38) durch Arsenit zwischen 12,5µM und 50µM nachzuweisen ist, während die ERK-Phosphorylierung unterdrückt wird. Die Hemmung von ERK-Phosphorylierung konnte bereits ab 5µM Arsenit in ELM-I-1 Zellen beobachtet werden (siehe Abb.15).

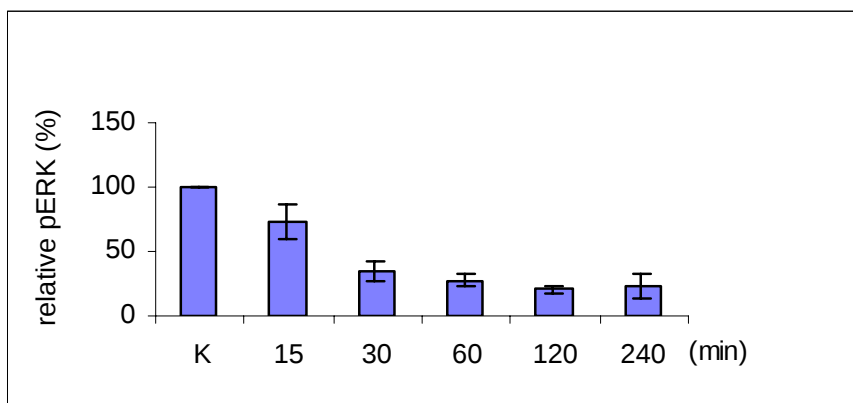
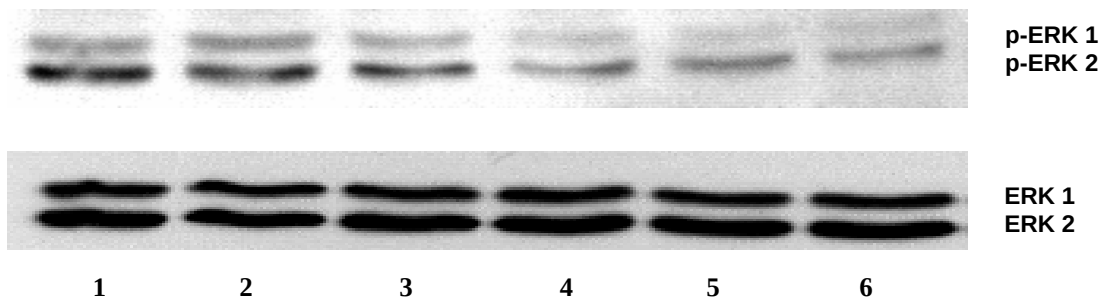
D.1.1.4 Kinetik der Arsenit-Wirkung auf die ERK-Kaskade

Nachdem die Untersuchungen zeigten, dass Arsenit in beiden Zelllinien eine ähnliche Wirkung auf die MAP-Kinasen hat, und zwar eine konzentrationsabhängige Aktivierung von JNK und p38 sowie eine Hemmung von ERK, wurde die Kinetik dieser Wirkungen weiter analysiert.

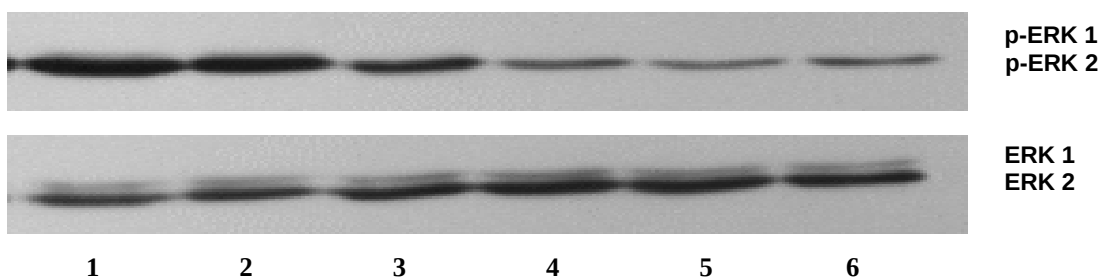
Die Resultate bezüglich der konzentrationsabhängigen Effekte von Arsenit dienten als Grundlage für die Auswahl der Konzentration von 50µM, da bei dieser Konzentration sowohl die Aktivierung von JNK und p38 als auch die Hemmung der ERK ihr jeweiliges Maximum erreichen.

Wieder erfolgte eine Western-Blot-Analyse der ERK1/2 Phosphorylierung. Zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen 15min und vier Stunden) wurde der Phosphorylierungszustand von ERK1/2 unter dem Einfluss von 50 μ M Arsenit untersucht (siehe Abb. 16).

A. ELM-I-1



B. K562 Zellen



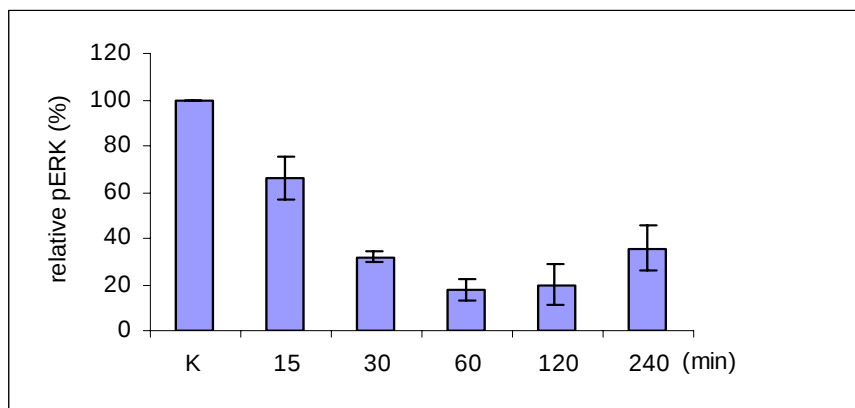


Abb. 16 Western-Blot-Analyse von ERK1/2 aus ELM-I-1 und K562 Zellen nach Behandlung mit Arsenit 50μM.

Spur: **1** Kontrolle, **2** Arsenit 15min, **3** Arsenit 30min, **4** Arsenit 60min, **5** Arsenit 120min, **6** Arsenit 240min.

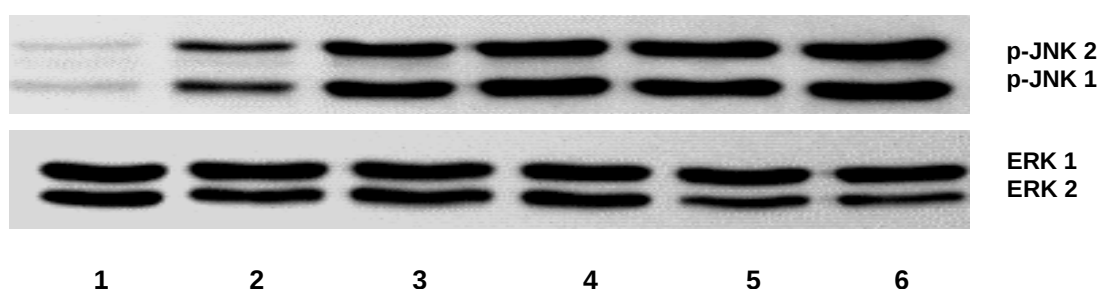
Die Zellen wurden bis zu den dargestellten Zeitpunkten mit 50μM Arsenit behandelt und gemeinsam nach Ablauf der Zeit geerntet. Die Durchführung der Western Blot-Analyse erfolgte auf die bereits beschriebene Weise. Die Säulendiagramme zeigen die Menge an pERK in ELM-I-1 und K562 Zellen und stellen den Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Die Kontrolle wurde auf 100% festgelegt.

Die Hemmung von ERK-Phosphorylierung beginnt in beiden Zelllinien ab 15min und bleibt über den Zeitraum von 240min erniedrigt.

D.1.1.5 Kinetik der Arsenit-Wirkung auf die JNK MAP-Kinasen

In weiteren Versuchen wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse der Einfluss von 50 μM Arsenit auf die JNK-Phosphorylierung über den gleichen Zeitraum verfolgt. Als interne Kontrolle für die Auswertung wurde jeweils die gleiche Membran mit ERK1 spezifischem Antikörper behandelt und die Intensität der pJNK-Signale auf diese interne Kontrolle bezogen.

A. ELM-I-1



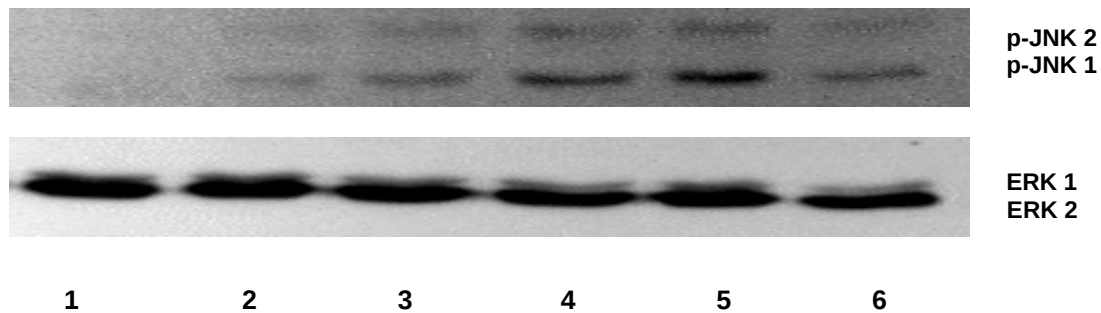
B. K562 Zellen

Abb. 17 Western-Blot-Analyse von JNK1/2 aus ELM-I-1 und K562 Zellen nach Behandlung mit Arsenit 50 μ M

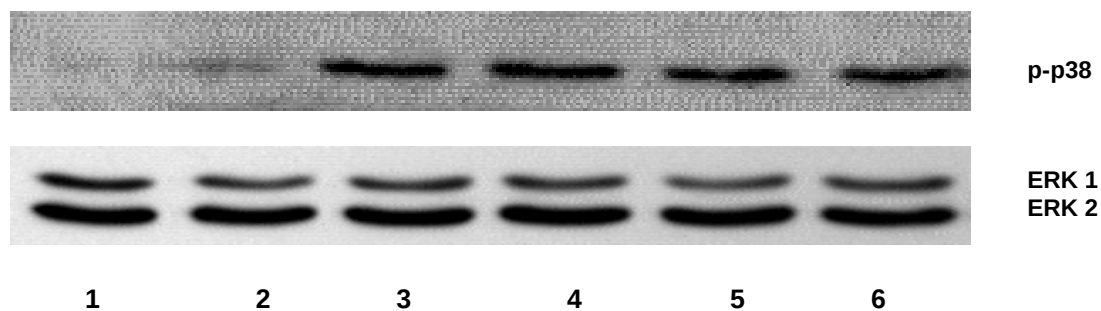
Spur: 1 Kontrolle, 2 Arsenit 15min, 3 Arsenit 30min, 4 Arsenit 60min, 5 Arsenit 120min, 6 Arsenit 240min.

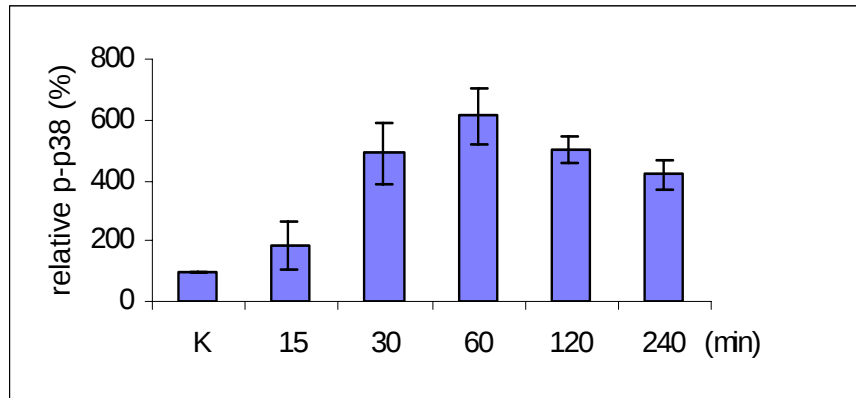
Die Zellen wurden zu den dargestellten Zeitpunkten mit 50 μ M Arsenit behandelt und gemeinsam nach Ablauf der Zeit geerntet. Die Durchführung des Western Blots erfolgte auf die bereits beschriebene Weise. Diese Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Versuchen reproduziert.

Diese Ergebnisse zeigten eine JNK- Aktivierung in beiden Zelllinien bereits ab 15min, welche bis zu 240min andauert (Abb.17).

D.1.1.6 Kinetik der Arsenit-Wirkung auf die p38 MAP-Kinase

Anhand der Western-Blot-Analyse wurde zwischen 15min und vier Stunden der Phosphorylierungszustand von p38 unter dem Einfluss von 50 μ M Arsenit untersucht. Die Phosphorylierung der p38 wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Phospho-p38 nachgewiesen und ERK1 und ERK2 Protein wurde wieder als interne Kontrolle untersucht (siehe Abbildung 18).

A. ELM-I-1



B. K562 Zellen

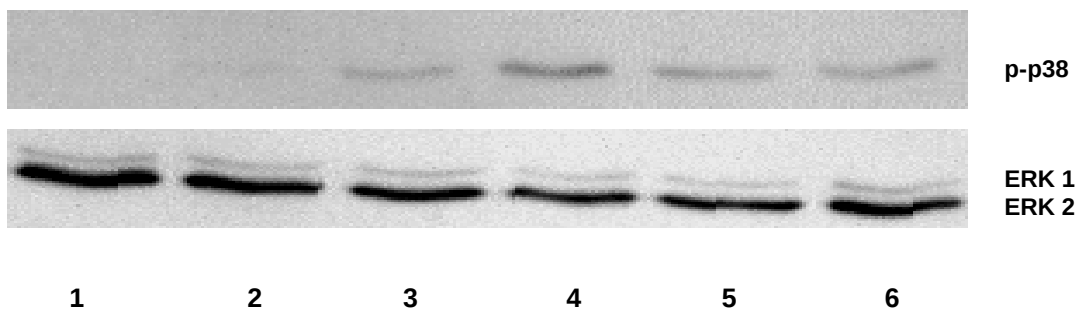


Abb. 18 Western-Blot- Analyse von p38 aus ELM-I-1 und K562 Zellen nach Behandlung mit Arsenit 50 μ M

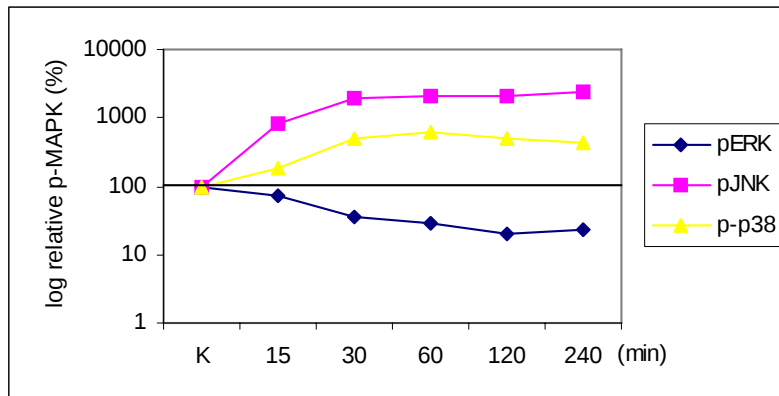
Spur: **1** Kontrolle, **2** Arsenit 15min, **3** Arsenit 30min, **4** Arsenit 60min, **5** Arsenit 120min, **6** Arsenit 240min.

Die Durchführung des Western Blots erfolgte auf die bereits beschriebene Weise. Die Säulendiagramme zeigen die Menge an p-p38 in ELM-I-1 Zellen und stellen den Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Die Kontrolle wurde auf 100% festgelegt. Bei K562 Zellen wurde der Versuch mit den gleichen Ergebnis wiederholt

Wie aus Abb.18 hervorgeht, fängt die Aktivierung von p38 in beiden Zelllinien ab 15min an, hat ihren Höhepunkt nach einer Stunde und nimmt dann langsam ab. Die p38-Aktivierung bleibt bis 4 Stunden erhöht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die erhöhte JNK und p38-Phosphorylierung durch Arsenitbehandlung mindestens bis zu vier Stunden anhielt. Die ERK- Aktivierung verhielt sich dem genau entgegengesetzt. Nach 15min wurde statt einer Aktivierung eine Hemmung festgestellt. Diese Effekte waren in beiden Zelllinien sehr ähnlich (Abb.19).

A. ELM-I-1 Zellen



B. K562 Zellen

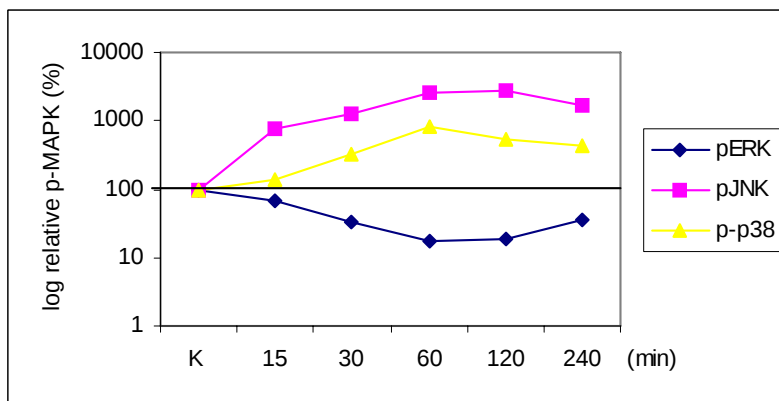


Abb. 19 Kinetik der Wirkung von Natriumarsenit auf die Phosphorylierung von ERK 1/2, JNK und p38 MAP-Kinasen

Die Diagramme zeigen die Menge an pERK, pJNK und p-p38 in ELM-I-1 und K562 Zellen und stellen den Mittelwert aus jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt.

D.1.2 Einfluss von Natriumarsenit auf die Aktivität von MAP-Kinasen

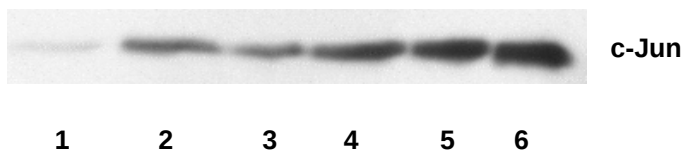
Da die vorangegangenen Versuche zeigen, dass Arsenit zeit- und konzentrationsabhängig die Phosphorylierung der Stresskinasen JNK und p38 verstärkt, wurde in weiteren Untersuchungen mit Hilfe von Immunkomplex-Kinase-Assay in beiden Zellen die Aktivität von JNK und in ELM-I-1 Zellen, die Aktivität von p38 untersucht.

D.1.2.1 Einfluss von Natriumarsenit auf die JNK-Aktivität

Ein wichtiges Substrat für JNK ist c-Jun, das durch diese Kinase an den N-terminalen Serin-Resten S63 und S73 phosphoryliert und dadurch aktiviert wird [Minden *et al.*, 1994].

Um den Einfluss von Arsenit auf die JNK-Aktivität zu untersuchen, wurden K562-Zellen mit Arsenit in einem Konzentrationsbereich von 5µM bis 50µM für eine Stunde inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Aktivität der immunpräzipitierten JNK wurde in *in vitro* Kinase-Assay mit ATP [γ - 32 P] und c-Jun als Substrat (Kapitel C.2.1.2) analysiert. Die Phosphorylierungsansätze wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das radioaktiv-markierte c-Jun autoradiographisch detektiert. Abbildung 9 zeigt einen repräsentativen Versuch mit ELM-I-1 bzw. K562 Zellen (n = 2).

A. ELM-I-1



B. K562 Zellen

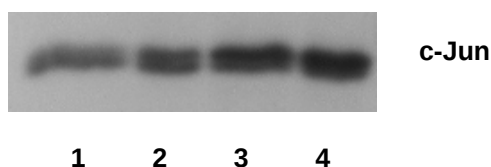


Abb. 20 JNK-Aktivität in ELM-I-1 und K562-Zellen nach Behandlung mit Arsenit.

Spur (A): **1** Kontrolle, **2** Arsenit 5µM, **3** Arsenit 12,5µM, **4** Arsenit 25µM, **5** Arsenit 50µM, **6** Arsenit 100µM. (B) **1** Kontrolle, **2** Arsenit 5µM, **3** Arsenit 15µM, **4** Arsenit 50µM.

ELM-I-1 und K562 Zellen wurden für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen Arsenit behandelt und die JNK-Aktivität in einem *in vitro* Kinase-Assay mit c-Jun als Substrat bestimmt. Die Visualisierung des phosphorylierten c-Juns erfolgte über Autoradiographie.

Die Behandlung der Zellen mit Arsenit führte zu einer deutlichen Zunahme der JNK-Aktivität.

Es ist zu erkennen, dass die JNK-Aktivität in beiden Zelllinien durch Arsenit konzentrationsabhängig stimuliert wird.

Ebenfalls wurde in K562 Zellen eine JNK-Reaktion mit ATF2 als Substrat analysiert. Der Transkriptionsfaktor ATF2 wird auch durch JNK aktiviert [Van Dam *et al.*, 1995; Livingstone *et al.*, 1995]. Die Zellen wurden ähnlicherweise eine Stunde mit Arsenit 50µM inkubiert, die JNK-Proteine mit Antikörpern immunpräzipitiert und ein Mix aus ATF2 Substrat, ATP und radioaktiv markierten ATP [γ - 32 P] hinzugegeben. Die Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt und das radioaktiv-markierte ATF2 autoradiographisch detektiert.

K562 Zellen

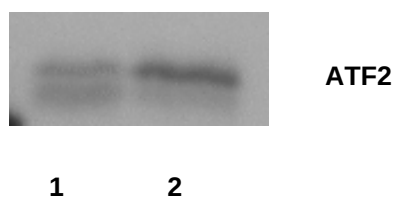


Abb. 21 JNK-Aktivierung in K562-Zellen nach Behandlung mit Arsenit 50µM

Spur: 1 Kontrolle, 2 Arsenite 50µM.

K562 Zellen wurden für eine Stunde mit Arsenit 50µM behandelt und die JNK-Aktivität in einem *in vitro* Kinase-Assay mit ATF2 als Substrat bestimmt. Die Visualisierung des phosphorylierten ATF2's erfolgte über Autoradiographie. Deutlich ist eine Zunahme der JNK-Aktivität zu erkennen.

Wie Abb. 21 zeigt, konnte bei einer Arsenitkonzentration von 50µM, eine deutliche Zunahme der JNK- Aktivität festgestellt werden.

D.1.2.2 Einfluss von Natriumarsenit auf die p38-Aktivität

In vitro Kinase-Assays wurden durchgeführt um die Wirkung von Arsenit auf die p38-Aktivität zu überprüfen. p38 aktiviert die MAPKAP-Kinase 2, die ihreseits das kleine Hitzeschockprotein Hsp 27 phosphoryliert [Rouse *et al.*, 1994]. MAPKAP-Kinase 2 wird lediglich nach der zellulären Antwort auf Stress, etwa durch Hitzeschock oder Zytokine wie TNF alpha, über p38 aktiviert [Rouse *et al.*, 1994; Engel *et al.*, 1995]. Deshalb wird häufig die MAPKAP-Kinase 2 Aktivität als Maß für die Aktivität von p38 herausgezogen.

Die Aktivität der immunpräzipitierten MAPKAP-Kinase 2 wurde in einem *in vitro* Kinase-Assay (Kapitel C.2.1.2) in ELM-I-1 Zellen analysiert. Dabei wurde Hsp27 als Substrat eingesetzt. Die ELM-I-1 Zellen wurden 30min mit SB 203580 und anschließend für eine Stunden mit Arsenit inkubiert.

Die Phosphorylierungsansätze wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das radioaktiv-markierte Hsp 27 autoradiographisch detektiert (Abb. 23).

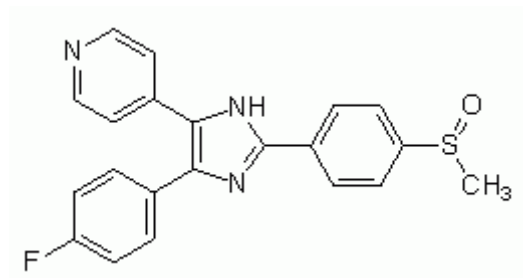


Abb. 22 Struktur von SB 203580

SB 203580, ein spezifischer p38 Inhibitor, wirkt im Gegensatz zu den MEK Inhibitoren als kompetitiver Inhibitor [Frantz *et al.*, 1998]. Diese binden in die für ATP vorgesehene Tasche von p38 [Tong *et al.*, 1997]. Nur wenige andere Kinasen werden durch diese Substanz bei sehr viel höheren Konzentrationen beeinflusst [Cuenda *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 2000].

ELM-I-1 Zellen

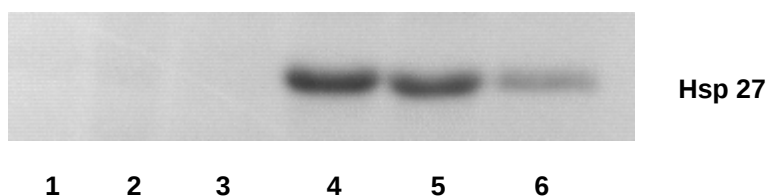


Abb. 23 MAPKAP-Kinase 2-Aktivierung über p38-Aktivierung in ELM-I-1 Zellen nach Behandlung mit Arsenit 50μM

Spur: **1** Kontrolle, **2** SB 98059 2.5 μM, **3** SB 5μM, **4** Arsenit 50μM, **5** Arsenit 50μM + SB 98059 2.5μM, **6** Arsenit 50μM + SB 5μM.

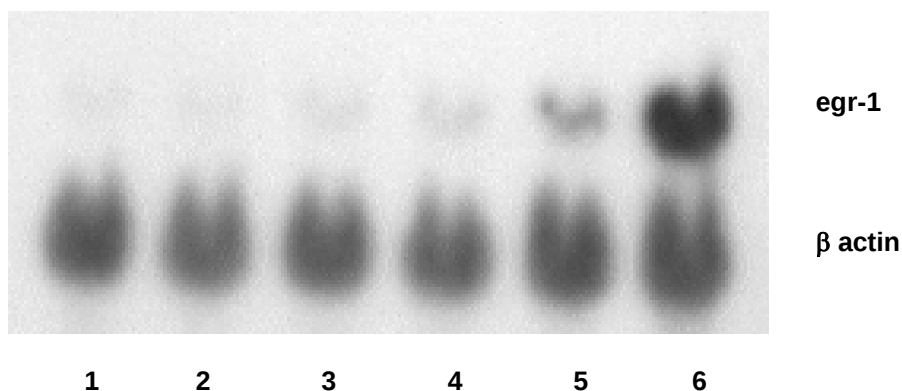
ELM-I-1 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an SB für 30min behandelt und anschließend für eine Stunde mit Arsenit inkubiert. Die p38-Aktivität wurde in einem *in vitro* Kinase-Assay mit Hsp 27 als Substrat bestimmt. Die Visualisierung des phosphorylierten Hsp 27's erfolgte über Autoradiographie.

Wie aus Abb. 23 hervorgeht, lag in Arsenit-behandelten ELM-I-1 Zellen aktive p38-Kinase vor, die über Aktivierung von MAPKAP-Kinase 2 zu einer erhöhten Phosphorylierung von Hsp 27 führte.

D.1.3 Einfluss von Natriumarsenit auf die *egr-1* Expression

Der nächste Schritt geht der Frage nach, wie Arsenit über MAP-Kinase-Kaskaden die Genexpression beeinflusst. Durch Northern-Blot-Analysen wurde die Wirkung von Arsenit auf die Expression von *egr-1*, ein wichtiges durch MAP-Kinasen gesteuertes Gen, untersucht. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Arsenit für drei Stunden inkubiert. Es wurde dann RNA isoliert, diese in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und anschließend mit radioaktiv markierten *egr-1* und β actin- DNA-Sonden hybridisiert.

A. ELM-I-1 Zellen



B. K562 Zellen

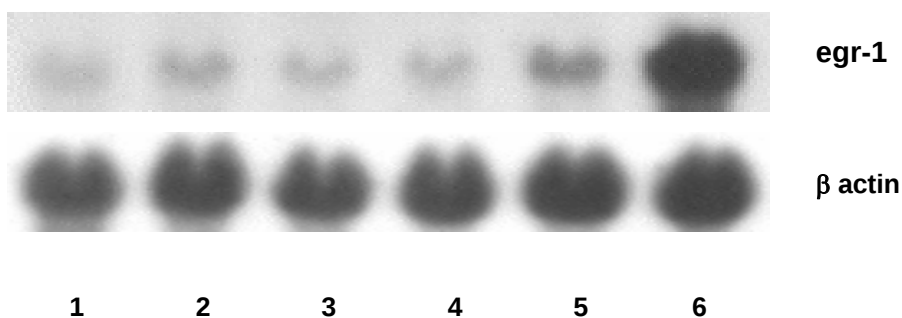


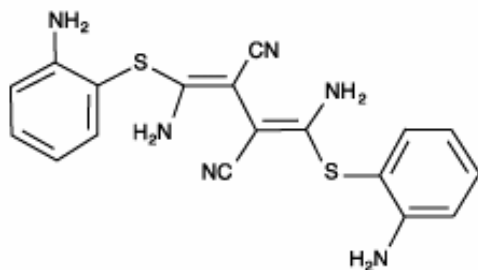
Abb. 24 Northern Blot-Analyse von *egr-1* aus ELM-1 Zellen und K562 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Arsenitkonzentrationen für drei Stunden.

Spur: **1** Kontrolle, **2** Arsenit 1 μ M, **3** Arsenit 2,5 μ M, **4** Arsenit 5 μ M, **5** Arsenit 15 μ M, **6** Arsenit 50 μ M. Für jeden Ansatz wurden 1 $\times 10^6$ Zellen ausplattiert und mit den angegebenen Konzentrationen an Arsenit behandelt. Nach drei Stunden wurden die Zellen geerntet und RNA isoliert. Es wurden 60 μ g RNA pro Ansatz für die Glyoxalisierung eingesetzt und anschließend 40 μ g davon in 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde auf eine Nylon-Membran geblottet und die RNA zwei Stunden bei 80°C unter vermindertem Druck darauf fixiert. In Anschluß daran folgte die Hybridisierung der Membran mit P32-markiertem *egr-1* bzw. β actin-DNA-Sonden. Diese Ergebnisse waren in mehreren Versuchen reproduzierbar.

Es wurde sowohl in ELM-I-1, als auch in K562 Zellen in einem Konzentrationsbereich von 15µM bis 50µM eine Hochregulierung der *egr-1* Expression beobachtet (Abb. 24).

Die *egr-1* Genexpression wird durch verschiedene Kinasen, einschließlich der ERK und JNK sowie durch p38 MAP-Kinasen vermittelt. Einmal aktiviert, führen die MAP-Kinasen zu Interaktionen zwischen den ternären Komplex Faktoren (TCF) und den Serum Response Faktoren (SRF), die durch die Bindung an das SRE innerhalb des Promotors, die Egr-1 Transkription aktivieren [Treisman, 1995; Lim et al., 1998; Guha et al., 2001; Cibelli et al., 2002].

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Arsenit die Expression von *egr-1* in beiden Zellen induziert, sollte nun untersucht werden, welche MAP-Kinase für die Induktion der *egr-1* Expression verantwortlich ist. Um die Rolle der ERK1/2 MAP-Kinase-Kaskade zu klären, wurden die Zellen für 30min mit MEK1/2-Inhibitoren (PD98059; Dudley et al., 1995, UO126; Favata et al., 1998), und anschließend für drei Stunden mit Arsenit inkubiert.



Ab. 25 Struktur von UO126

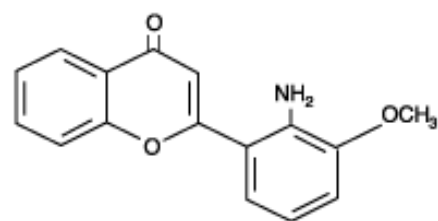


Abb. 26 Struktur von PD 98059

PD 98059 (2-(2-Amino-3-Methoxy)-Falvon), ein synthetischer Inhibitor des MAPK-Signalweges, hemmt spezifisch die Aktivität von MEK1 und in geringerem Ausmass von MEK2, ohne dabei andere MAPK, wie z.B. die JNK oder die p38 MAPK zu beeinflussen [Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995]. Im Gegensatz zu PD 98059 hemmt UO126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien) sowohl MEK1 als auch MEK2 im gleichen Maße und weist gegenüber dem MEK-Wildtyp und der MEK-Mutation eine viel höhere Affinität auf.

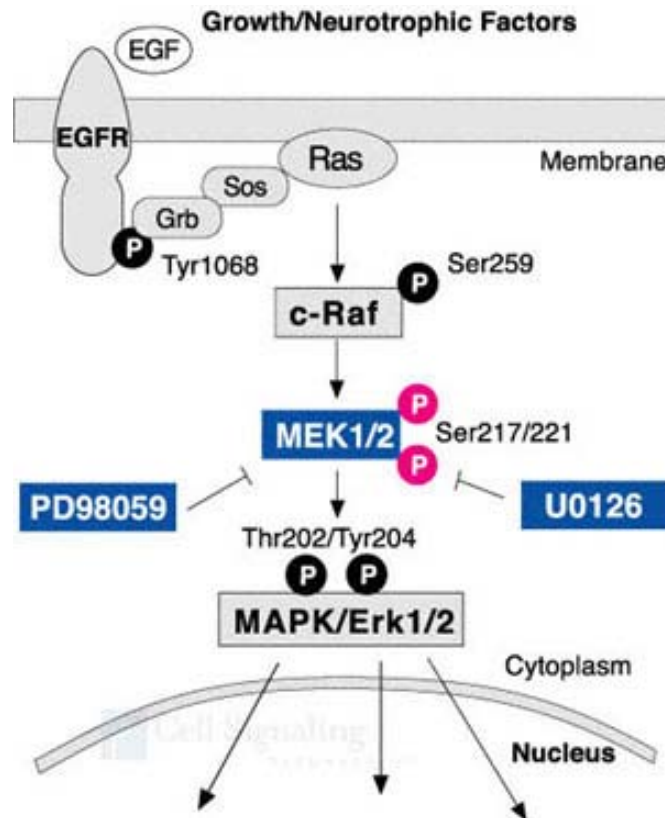


Abb. 27 Angriffspunkte von UO126 und PD 98059

Zum Nachweis der Wirkung von PD 98059 auf die *egr-1* Expression wurde die Konzentration 30 μ M ausgewählt, deren Auswirkung einerseits auf die basale- und andererseits auf die Arsenit-induzierte *egr-1* Genexpression verglichen wurde.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen, dass heißt wiederum Vorinkubation für 30 min mit UO126 und daraufhin Stimulation für weitere 60 min mit Arsenit, wurde die Wirkung von MEK1/2 Inhibitor UO126 auch die Genexpression untersucht. Die Konzentrationen wurde niedriger ausgewählt (2 μ M), da bekannt ist, dass UO126 die ERK Phosphorylierung über MEK1/2 in niedrigeren Konzentrationen stärker inhibiert als PD98059 [Favata et al., 1998].

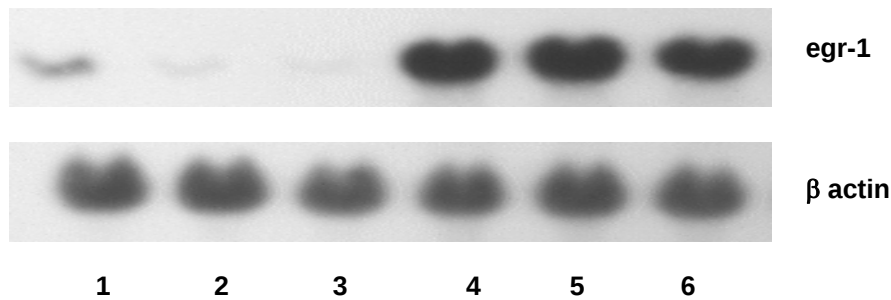
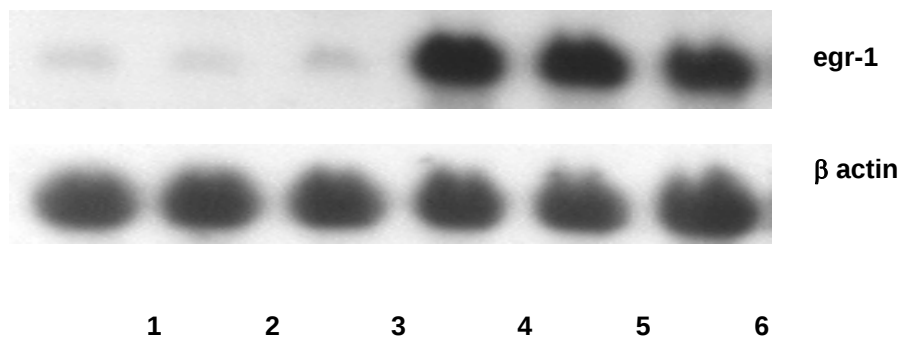
A. ELM-I-1**B. K562 Zellen**

Abb. 28 Northern Blot-Analyse der Wirkung von PD 98059 und UO126 in Kombination mit Arsenit 50μM auf egr-1 in ELM-I-1 und K562 Zellen

Spur: **1** Kontrolle, **2** PD 98059 30μM, **3** Uo126 2μM, **4** Arsenit 50μM, **5** Arsenit 50μM + PD 98059 30μM, **6** Arsenit 50μM + UO126 2μM.

Für jeden Ansatz wurden 1×10^6 Zellen ausplattiert mit den angegebenen Konzentrationen an PD 98059 und UO126 für 30min behandelt und anschließend für eine Stunde mit Arsenit inkubiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie unter Abb. 23 beschrieben. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch mit $n=2$.

Bereits die Kontrolle wies eine niedrige basale egr-1-Expression auf, die durch Inkubation mit PD98059 bzw. UO126 stark gehemmt wurde. Die Induktion der egr-1-Expression durch Arsenit konnte aber in beiden Zelllinien nicht mit den MEK1/2-Inhibitoren PD 98059 und UO126 verhindert werden (Abb.27). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Arsenit-Induktion der egr-1-Expression nicht durch die ERK1/2 MAP-Kinase-Kaskade sondern möglicherweise durch JNK und p38 MAP-Kinasen vermittelt wird. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass Arsenit die ERK1/2 Phosphorylierung hemmt, während die Phosphorylierung und Aktivität der Stress-Kinasen durch Arsenit erhöht ist (Abb. 13, 14, 20 und 23).

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Kinase-Inhibitoren wurden Versuche durchgeführt, die parallel die Inhibition der TPA-induzierten *egr-1* Expression analysierten. Die PD 98059 und UO126 in den untersuchten Konzentrationen waren hier in der Lage, die TPA-vermittelte *egr-1*-Expression zu unterdrücken.

D.1.4 Wirkung von Natriumarsenit auf die Transkription über SRE oder CRE

In der Promotor-Region von *egr-1* sind mehrere SRE (serum response element) und auch CRE (cAMP-response element) Bindungsstellen zu finden. In weiteren Versuchen wurde mit Hilfe von Reporter-Gen-Assay untersucht, welche von diesen regulatorischen Sequenzen für die Induktion der *egr-1*-Expression verantwortlich ist (siehe Abb. 29).

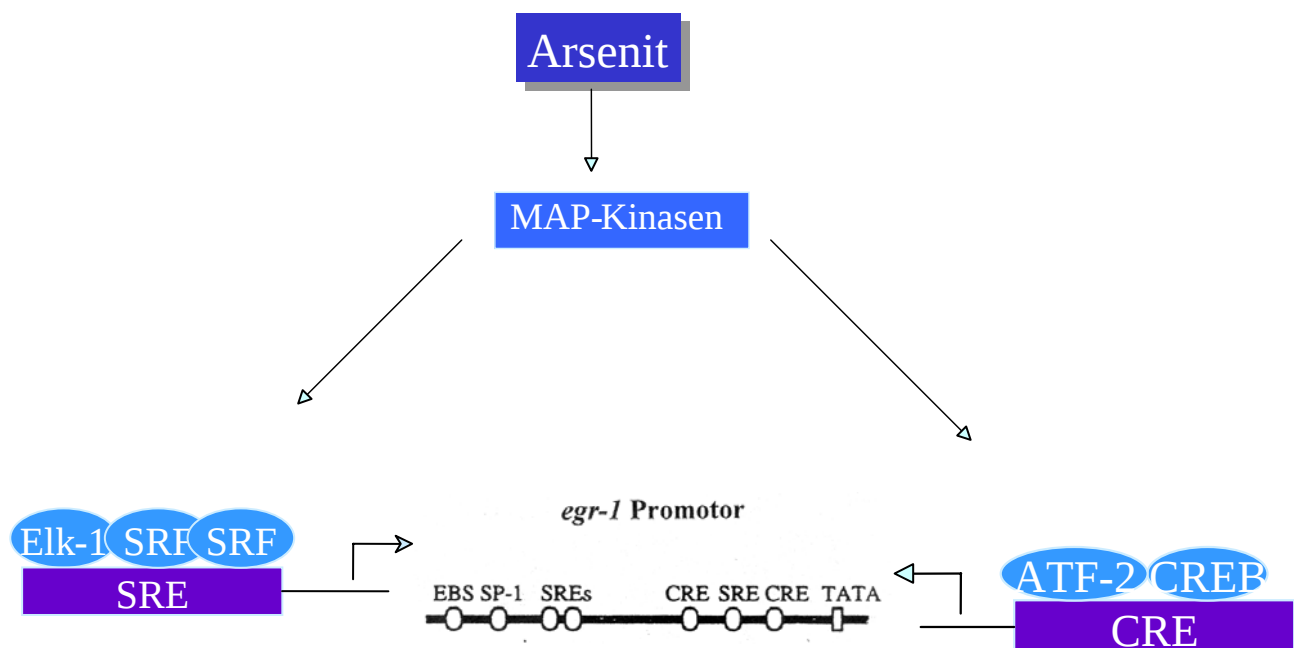


Abb. 29 Wirkung von Arsenit auf die *egr-1* Expression über die MAP-Kinasen

Die Transfektion erfolgte wie in Kapitel C.2.3.1 beschrieben mit der Verwendung von Lipofektamin. Wegen Probleme mit der Transfektion von ELM-I-1 Zellen wurden Reporter-Gen-Assays mit den Reporter-Gen-Plasmiden pCRE-Luc und pSRE-Luc nur in K562 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden sieben Stunden mit 50µM Arsenit inkubiert, geerntet, lysiert und anschließend der Überstand für den Luziferase Assay eingesetzt.

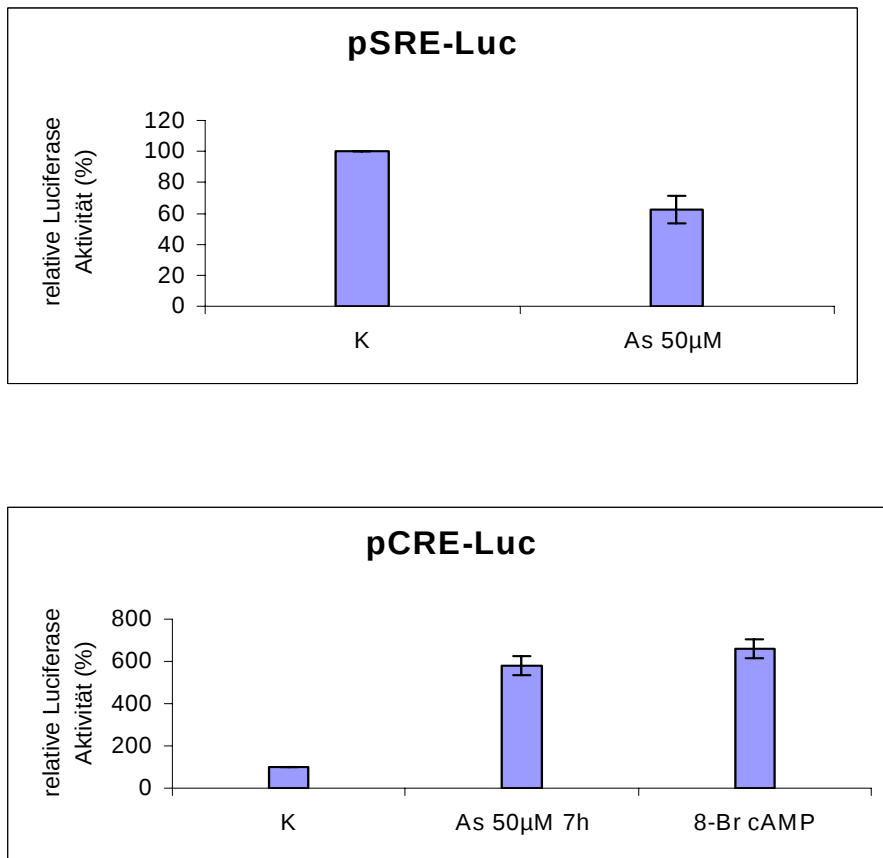


Abb. 30 Luziferase Aktivität in K562 Zellen nach Transfektion mit pSRE-Luc bzw pCRE-Luc Plasmid

Die Zellen wurden für sieben Stunden mit Arsenit 50µM behandelt. Für des Luziferase Assay wurden 20µl Zellsuspension mit 100µl Luziferase-Reagenz gemischt und 1min die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt und die Luziferase Werte auf die Proteinkonzentration bezogen. 8-Br- cAMP (500µM) wurde als CRE Positivkontrolle eingesetzt. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Die Ergebnisse zeigten eine CRE-Aktivierung, während gleichzeitig die basale SRE-Aktivität durch Arsenit gehemmt wurde. Dies deutet darauf hin, dass die *egr-1* Expression nicht über SRE, sondern möglicherweise über CRE erfolgt.

Ebenfalls wurde eine Analyse mit dem *c-Jun trans*-Reportersystem durchgeführt, um die *in vivo* Aktivierung der JNK durch Arsenit in Reporter-gen-Assay zu untersuchen (siehe Abb. 31). Das *trans*-Reportersystem beinhaltet ein spezifisches *trans*-Aktivator Plasmid, welches für ein Fusionsprotein kodiert mit der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsaktivators *c-Jun*.

Als zweites Plasmid dient das pFR-Luc Plasmid, welches einen synthetischen Promotor beinhaltet. Dieser Promotor kontrolliert die Expression des Luziferase-Genes von *Photinus pyralis* (Amerikanische Feuerfliege). Die beiden Plasmide werden in die Zelle co-transfiziert und das *trans*-Aktivator Fusionsprotein wird über den Promotor des Cytomegalievirus konstitutiv exprimiert.

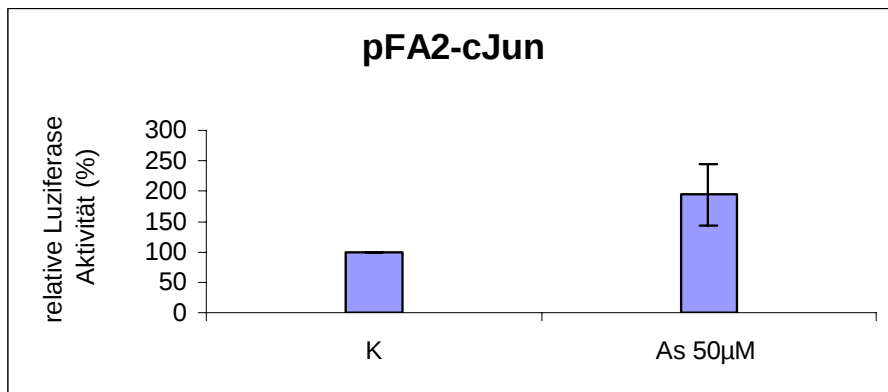


Abb. 31 Luziferase Aktivität in K562 Zellen nach Transfektion mit pFA2-cJun Plasmid

Die Zellen wurden für sieben Stunden mit Arsenit 50µM behandelt. Für den Luziferase Assay wurden 20µl Zellsuspension mit 100µl Luziferase-Reagenz gemischt und daraufhin 1min die Biolumineszenz in Luminometer gemessen. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt und die Luziferase Werte auf die Proteinkonzentration bezogen. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Wie aus den gezeigten Daten hervorgeht, konnten die Ergebnisse aus dem Kinase-Assay (Abb.20) bestätigt werden. Der Signaltransduktionsweg wurde durch Arsenit über die JNK aktiviert und dadurch c-Jun phosphoryliert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass Natriumarsenit in zwei unterschiedlichen, hämatopoetischen Zelllinien, die MAP-Kinase-Kaskaden und die *egr-1* Expression auf gleiche Weise beeinflusst.

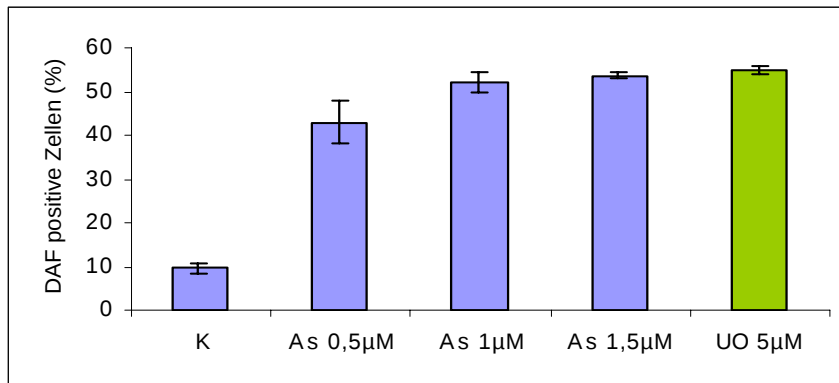
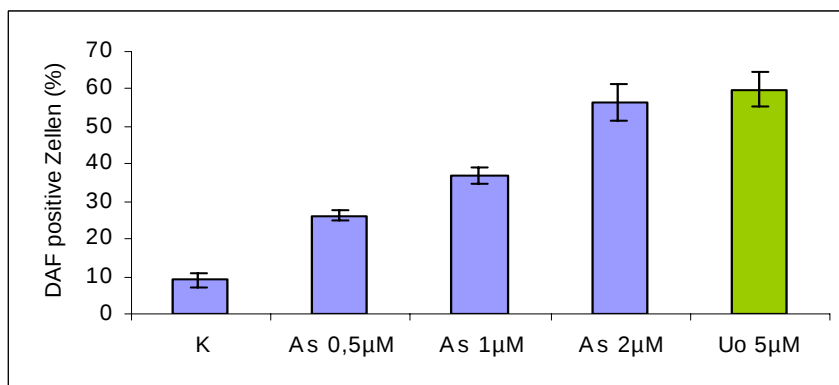
In Reporter-gen-Assay konnte eine Aktivierung der Stresskinase JNK und eine Hochregulierung der Genexpression über CRE durch Arsenit gezeigt werden. Gleichzeitig wurde die SRE vermittelte Genexpression durch Arsenit unterdrückt. Diese Wirkung korrelierte mit der Hemmung der ERK-Phosphorylierung durch Arsenit.

D.2 Wirkung von Natriumarsenit auf die erythroide Differenzierung

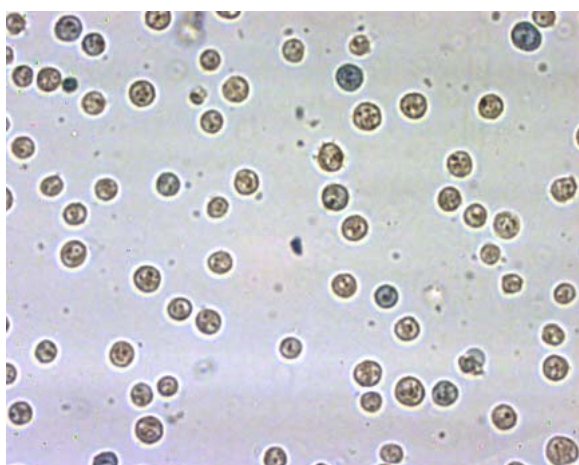
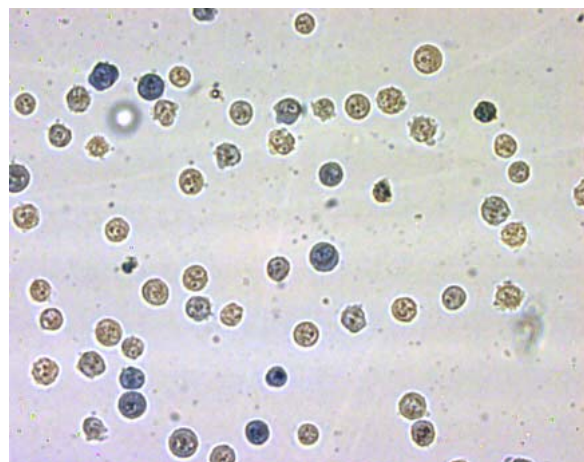
Der therapeutische Effekt von Arsen-Verbindungen bei APL könnte unter anderem auf der Induktion der Differenzierung basieren [Zhang et al., 2001]. Es erscheint in diesem Zusammenhang interessant, mögliche Wirkungen dieser Verbindungen auf die Zell-Differenzierung zu untersuchen. Die ELM-I-1 Zellen stellen ein geeignetes Modell für die isolierte Untersuchung der erythroiden Entwicklung dar [Shiozaki et al., 1990]. Die K562 Zellen, welche sich in einem pluripotenten Differenzierungsstadium befinden, können sich sowohl zu erythroid als auch zu megakariozytär differenzieren. Diese Zelllinie ist besonders interessant in Bezug auf die therapeutische Anwendung von Arsenit bei Leukämie. Untersucht wurde auch bei diesen Zellen die erythroide Differenzierung, da das bereits zugelassene Medikament bei CML, Imatinib in K562 Zellen ebenfalls erythroide Differenzierung induziert [Jacquel et al., 2003; Kohmura et al., 2004; Kuzelova et al., 2005]. Der Nachweis von Hämoglobin erfolgte über die DAF-Färbung und diente als Marker für die beginnende Ausreifung der erythroiden Zellen. Dabei macht man sich die Pseudoperoxidase-Aktivität des Hämoglobins zu Nutze, die die Bildung von Fluorenblau in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid aus 2,7-Diaminofluoren katalysiert. Die Auswertung der positiven Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

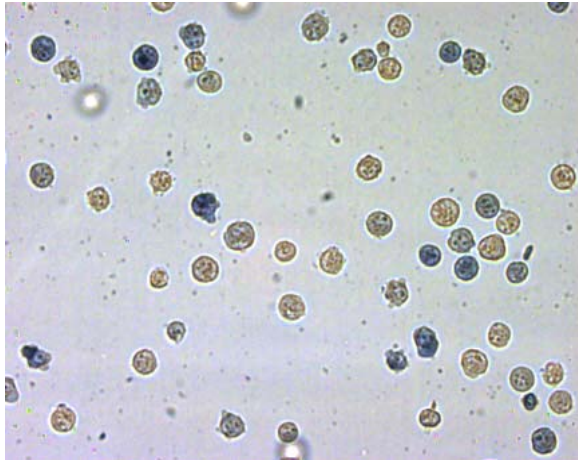
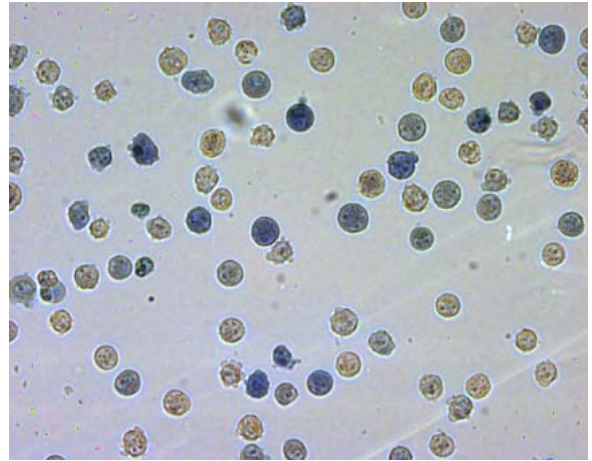
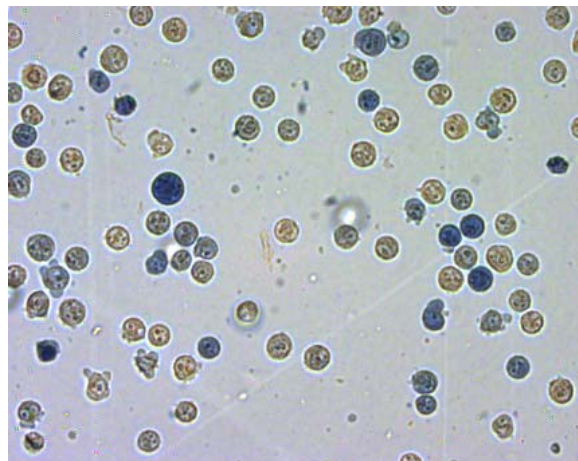
D.2.1 Induktion der Differenzierung von K562 und ELM-I-1 Zellen durch Natriumarsenit.

Es wurde die Wirkung von Natriumarsenit in einem Konzentrationsbereich von 0,5µM bis 2µM untersucht (Abb. 32 und 33). Als Positivkontrolle wurde der MEK Inhibitor UO126 verwendet, welcher die erythroide Differenzierung durch Inhibition der ERK-Kaskade in diesen Zellen stimuliert [Witt et al., 2000; Schaefer et al., 2004].

A. ELM-I-1**B. K562****Abb. 32 Differenzierung von ELM-I-1 und K562 Zellen nach dreitägiger Behandlung mit Arsenit**

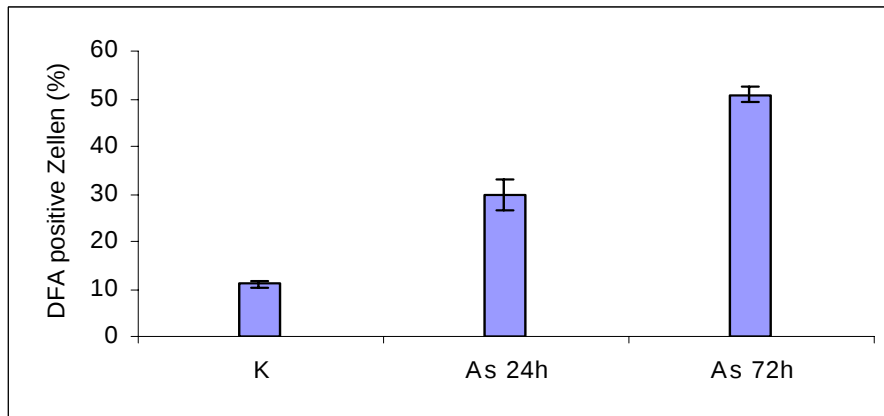
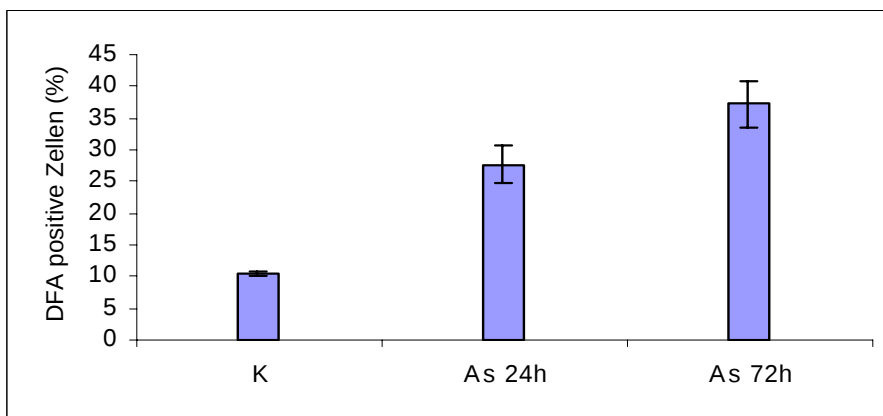
Es wurden 2×10^5 Zellen pro Ansatz in 5ml Medium ausplattiert und mit Arsenit (As) in Konzentration zwischen 0,5µM bis 2µM inkubiert. UO126 (UO) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Nach drei Tagen wurde die Hämoglobinproduktion mit Hilfe der DAF-Färbung detektiert. Die angefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und auf die Gesamtzellzahl bezogen. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

**Abb. 33A K562 Zellen unbehandelt****Abb. 33B K562 Zellen behandelt mit As (0,5µM)**

**Abb. 33C K562 Zellen behandelt mit As (1µM)****Abb.33D K562 Zellen behandelt mit As (2µM)****Abb. 33E K562 Zellen behandelt mit UO126 (5µM)**

Bereits bei einer Arsenitkonzentration von 0,5µM konnte eine deutliche Induktion der Differenzierung festgestellt werden, welche mit zunehmender Konzentration weiter anstieg. Die höchste eingesetzte Konzentration von 2µM Arsenit erwies sich als ähnlich starker Induktor der Differenzierung wie der MEK Inhibitor UO126.

Um eventuell in einem kürzeren Zeitraum eine Induktion der Differenzierung durch Arsenit festzustellen, wurde die Differenzierungsinduktion auch nach 24 Stunden untersucht (Abb. 34).

A. ELM-I-1**B. K562 Zellen****Abb. 34 Differenzierung von ELM-I-1 und K562 Zellen nach Behandlung mit Arsenit**

Es wurden 2×10^5 Zellen pro Ansatz in 5ml Medium ausplattiert und mit Arsenit $1 \mu\text{M}$ für 24 und 72 Stunden inkubiert. Die Hämoglobinproduktion wurde mit Hilfe der DAF-Färbung detektiert. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Die Ergebnisse zeigten, dass Arsenit bereits innerhalb dieser kurzen Zeitspanne, sowohl in ELM-I-1 als auch K562 Zellen eine deutliche Stimulation der Hämoglobinproduktion bewirkte.

D.2.2 Wirkung von Natriumarsenit auf die Transkription

Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand die Fragestellung, ob Arsenit in niedrigen, differenzierungsinduzierenden Konzentrationen die Elk-1/SRE vermittelten Genexpression beeinflusst. Dazu wurde das Elk-1 *trans* Reportersystem und das SRE *cis*-Reportersystem verwendet.

Der Ternärkomplexfaktor Elk-1 ist nicht nur ein wichtiges Substrat der ERK-Kaskade, sondern auch von JNK und p38. Phosphoryliertes ELK-1 bindet zusammen mit zwei Molekülen des Serum-Response-Faktors (SRF) an SRE und stimuliert die Transkription.

K562 Zellen wurden mit einem Elk-1 *trans*-Aktivator Plasmid transfiziert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Elk-1 Phosphorylierung wurde durch die Luziferase-Aktivität eines cotransfizierten Reporter-Plasmids mit dem Luziferase-Reportergen bestimmt.

Die Zellen wurden 24 Stunden in einem Konzentrationsbereich von 0,5µM bis 2µM mit Arsenit inkubiert, geerntet, lysiert und anschließend auf Luziferase-Aktivität getestet (Abb. 35).

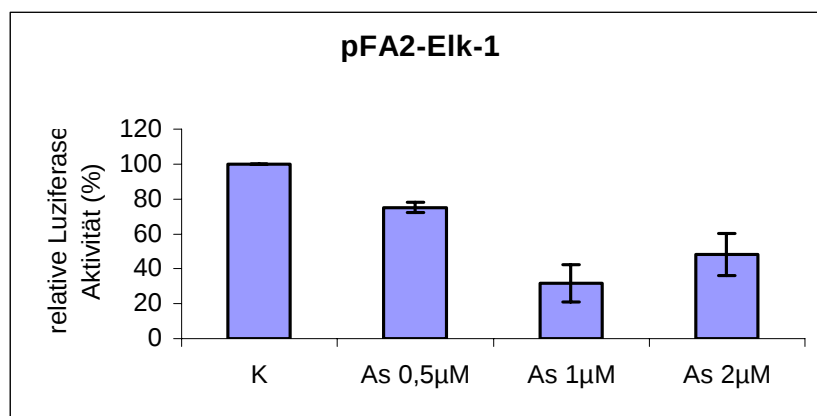


Abb. 35 Luziferase Aktivität in K562 Zellen nach Transfektion mit pFA2-Elk-1 Plasmid

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Arsenit in Konzentration zwischen 0,5µM bis 2µM inkubiert. Für den Luziferase Assay wurden 20µl Zellsuspension mit 100µl Luziferase-Reagenz versetzt und anschließend für 1min die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt und die Luziferase Werte auf die Proteinkonzentration bezogen. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Aus Abb. 35 geht hervor, dass die Elk-1-Aktivität durch Arsenit gehemmt wurde.

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung von Arsenit auch direkt auf die SRE-vermittelte Genexpression mit Hilfe des SRE *cis*-Reportersystems untersucht.

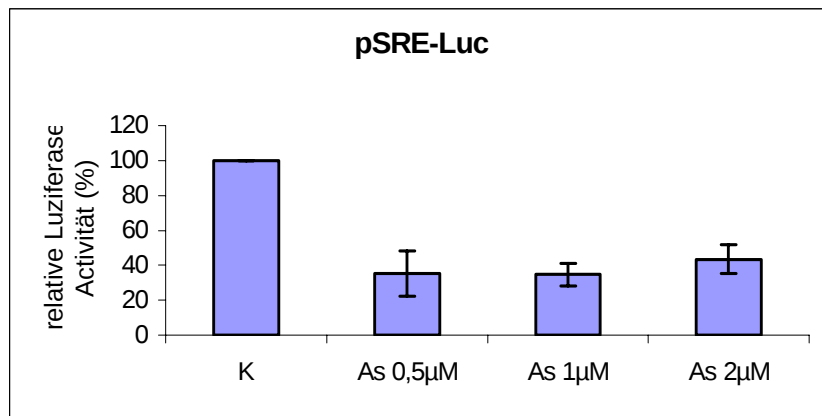


Abb. 36 Luziferase Aktivität in K562 Zellen nach Transfektion mit pSRE-Luc Plasmid

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Arsenit in Konzentration zwischen 0,5µM bis 2µM inkubiert. Für den Luziferase Assay wurden 20µl Zellsuspension mit 100µl Luziferase-Reagenz gemischt und anschließend für 1min die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt und die Luziferase Werte auf die Proteinkonzentration bezogen. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Die Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit der Untersuchung der Elk-1-Aktivität eine Abnahme der SRE-vermittelte Genexpression in Arsenit-behandelten Zellen (Abb.36).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Induktion der Differenzierung durch Arsenit durch die Unterdrückung der Aktivität des Elk-1 Transkriptionsfaktors mit anschließender Hemmung der SRE- vermittelten Genexpression zustande kommt.

Parallel wurde die Wirkung von Arsenit auf die CRE (cAMP-response element)-vermittelte Genexpression ebenfalls untersucht. An der regulatorischen Sequenz CRE bindet sowohl CREB (CRE-Bindeprotein) als auch ATF2. Einerseits aktiviert ein hoher cAMP-Spiegel die Proteinkinase A, die ihrerseits das CREB phosphoryliert, welche an CRE gebunden ist. Andererseits kann CRE durch den Transkriptionsfaktor ATF2 aktiviert werden, welcher wiederum durch JNK oder p38 phosphoryliert werden kann.

Die Wirkung von Arsenit ($50\mu\text{M}$) auf die CRE-vermittelte Genexpression in K562 Zellen wurde bereits demonstriert (Abb.30).

Um festzustellen, ob Arsenit auch in niedrigeren Konzentrationen einen Einfluss auf CRE hat, wurden weitere Reporter-gen-Assays mit dem Reporter-gen-plasmid pCRE-Luc in K562 Zellen durchgeführt.

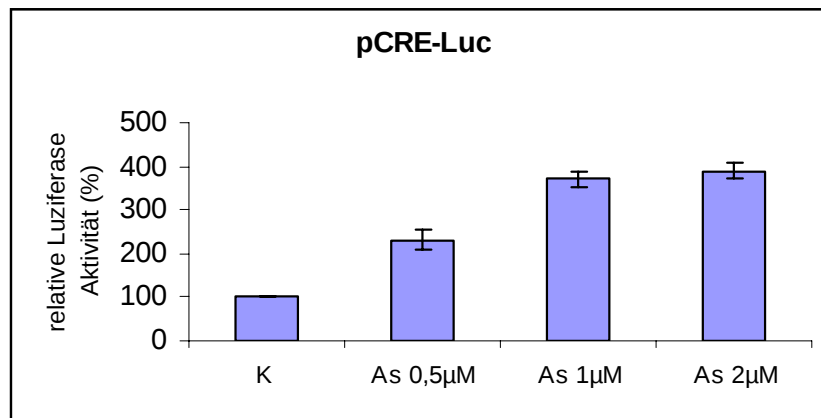


Abb. 37 Luziferase Aktivität in K562 Zellen nach Transfektion mit pCRE-Luc Plasmid

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Arsenit in Konzentration zwischen $0,5\mu\text{M}$ bis $2\mu\text{M}$ inkubiert. Für den Luziferase Assay wurden $20\mu\text{l}$ Zellsuspension mit $100\mu\text{l}$ Luziferase-Reagenz gemischt und anschließend für 1min die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt und die Luziferase Werte auf die Proteinkonzentration bezogen. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Wie in Abb.37 zu sehen ist, wurde eine CRE-Aktivierung durch Arsenit auch in Konzentrationen zwischen $0,5\mu\text{M}$ und $2\mu\text{M}$ festgestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Natriumarsenit in therapeutisch relevanten, niedrigen Konzentrationen ($0,5\mu\text{M}$ - $2\mu\text{M}$) [Zhang *et al.*, 2001] erythroide Differenzierung induziert. Im gleichen Konzentrationsbereich wurde eine Unterdrückung der Aktivität des Elk-1 Transkriptionsfaktors festgestellt, welche mit der Hemmung der SRE-vermittelten Genexpression korreliert. Gleichzeitig erfolgt eine Stimulierung der Genexpression über CRE durch Arsenit

D.3 Wirkung von Arsentrioxid auf die erythroide Differenzierung

Lange als Arzneimittel in Vergessenheit geraten, erlebt Arsentrioxid in der onkologischen Hämatologie ein Revival. Mit Arsentrioxid (ATO) hat man eine Remission und Konsolidierung bei erwachsenen Patienten mit akuter Promyelozyten-Leukämie (APL) nachgewiesen. Neulich wird der mögliche Einsatz dieser Substanz auch bei CML diskutiert [Hu et al., 2000; Übersichtarbeit von Waxman et al., 2001]. Da die bisherigen Untersuchungen mit Natriumarsenit durchgeführt wurden, erscheint wichtig die Wirkung von Arsentrioxid auf die Differenzierung in K562 Zellen im Vergleich mit Natriumarsenit zu untersuchen.

Es wurde die Wirkung von Arsentrioxid in einem Konzentrationsbereich von 0,5µM bis 2µM untersucht. Als Positivkontrolle wurde auch in diesen Versuchen der MEK Inhibitor UO126 verwendet.

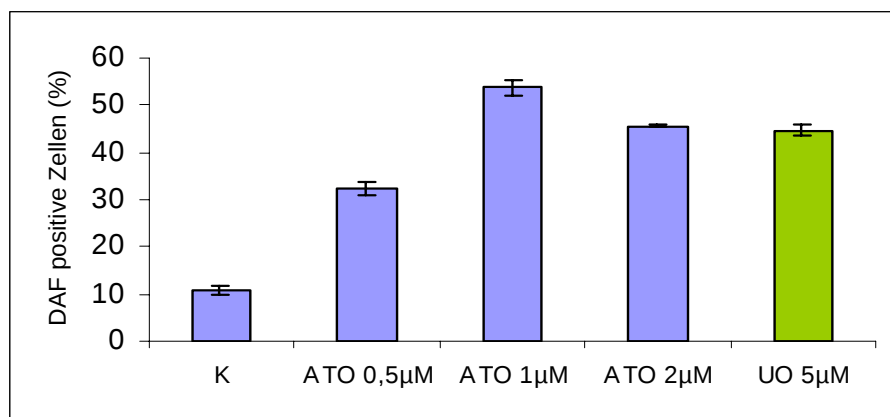


Abb. 38 Differenzierung von K562 Zellen nach dreitätiger Behandlung mit Arsentrioxid (ATO)

Es wurden 2×10^5 Zellen pro Ansatz in 5ml Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Arsentrioxid in Konzentration zwischen 0,5µM bis 2µM behandelt. UO126 wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Nach drei Tagen wurde die Hämoglobinproduktion mit Hilfe der DAF-Färbung detektiert. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen berechnet.

Die Abbildung 38 zeigt eine Induktion der Differenzierung bereits bei 0,5µM, welche mit zunehmender Konzentration ansteigt. ATO zeigt die gleiche Wirkung wie Natriumarsenit.

E Diskussion

E.1 Wirkung von Natriumarsenit auf die MAP-Kinasen in ELM-I-1 und K562 Zellen

Die Bedeutung von MAP-Kinase Signalwegen für verschiedene zelluläre Prozesse wird auf vielen Gebieten der biomedizinischen Forschung intensiv untersucht. Die essentielle Rolle der MAP-Kinasen in der Signaltransduktion bedingt die Notwendigkeit einer genauen Regulation dieser Kinasen, um den Ablauf der normalen zellulären Vorgänge zu gewährleisten und pathologische Zustände zu vermeiden. Die Aktivierung der MAP-Kinasen führt unter anderen zur Proliferation, Differenzierung oder Apoptose [Lau et al., 2004; Luster et al., 2004]. So konnte bei den Untersuchungen verschiedener neoplastischer Krankheitsbilder, wie akute Leukämie, eine erhöhte ERK1/2 Aktivierung nachgewiesen werden [Kim et al., 1999]. Die Aufklärung der Regulation von MAP-Kinase Signalwegen und der daraus resultierenden Genexpression trägt somit auch zum besseren Verständnis bestimmter Krankheiten bei.

Arsen erhöht das Risiko an Lungen-, Haut- und Blasenkrebs zu erkranken [Chen et al., 1990; Bates et al., 1992; Jager et al., 1997]. Die menschliche Arsen-Exposition durch kontaminiertes Trinkwasser in vielen Ländern stellt noch immer ein großes gesundheitliches Problem dar [Tchounwou et al., 1999; Buchet et al., 2000]. Um die Arsen- verursachte Toxizität besser zu verstehen, wird die Wirkung von Arsenit weltweit in vielen Laboratorien untersucht.

Die Entdeckung des therapeutischen Effektes von Arsentrioxid (ATO) bei akuter promyelozytärer Leukämie hat diese „alte“ Substanz zu neuem Leben erweckt [Zhang et al., 2001]. Der potentielle Arzneistoff wird in klinischen Studien getestet an Patienten mit akuter promyelozytärer Leukämie (APL), bei der die Therapie mit Standardtherapeutika versagt hat. 20 bis 30 Prozent der APL-Patienten sprechen auf die Standardtherapie mit konventionellen Zytostatika und Retinoiden (Tretionin: ATRA) nicht an. Für diese Gruppe stellt nun das Arsentrioxid eine vielversprechende Alternative dar.

Es ist bereits bekannt, dass Arsenit Signaltransduktionswege der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflusst. Viele Forschungsgruppen untersuchen die Mechanismen der Wirkung von Arsenit auf die MAP-Kinasen. Neue Erkenntnisse in diesem Zusammenhang können nicht nur von toxikologischer Bedeutung sein, sondern auch therapeutisch interessante Einblicke erbringen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Natriumarsenit auf die MAP-Kinasen in zwei hämatopoetischen Zellsystemen untersucht. Die Erythropoetinsensitiven ELM-I-1 Zellen der Maus stellen ein geeignetes Modell für die isolierte Untersuchung der erythroiden Entwicklung dar [Shiozaki et al., 1990]. Die K562 Zellen wurden aus einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie isoliert [Lozzio et al., 1975], und sind interessant in bezug auf die therapeutische Anwendung von Arsenit bei Leukämie.

Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass Arsenit die Aktivität aller drei MAP-Kinasen beeinflusst, allerdings abhängig von dem Zelltyp, der Länge und der Dosis der Exposition [Lim et al., 1998; Porter et al., 1999; Simeonova et al., 2000; Lau et al., 2004]. So wurde von der Arbeitsgruppe Ludwig et al., 1998 gezeigt, dass Arsenit (500µM) die ERK- und p38 MAP-Kinasen in Abhängigkeit von der Zeit in verschiedenen menschlichen Zelllinien aktiviert. Ebenfalls entdeckten Hossain et al., 2000, dass 100µM Arsenit eine Erhöhung der Phosphorylierung von ERK, JNK und p38-Kinasen hervorruft. Die Phosphorylierung von JNK und deren Substrat c-Jun konnte aber schon nach 1 Stunde Inkubation mit 10µM Arsenit gezeigt werden. Porter et al., 1999 beschreiben auch in menschlichen embryonalen Nierenzellen, dass Arsenit und Arsenat (100-300µM) JNK stimuliert. Eine andere Forschungsgruppe hat eine JNK und p38 Aktivierung bei höheren Arsenitkonzentrationen (500µM) und zeitabhängig in NIH3T3 Mäusefibroblasten festgestellt, während die ERK-Kaskade keine Änderung zeigte [Lim et al., 1998].

In einer weiteren Studie wurde demonstriert, dass die Arsenit-Behandlung von menschlichen bronchialen epithelialen Zellen (BEAS) zu einer direkten Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors führt. Außerdem bewirkt die Arsenit-Behandlung die Aktivierung von MEK1/2 und dadurch als Folge die Phosphorylierung von ERK und Elk-1 [Wu et al., 1999].

Vorangegangene Studien dieser Gruppen zeigen, dass in der selben Zelllinie eine akute Exposition durch 500µM Arsenit die ERK2-, JNK- und p38-Kinasen sowie die Transkriptionfaktoren ATF-2 und c-Jun aktiviert, aber nicht den Transkriptionfaktor Elk-1 [Samet et al., 1998]. Cooper et al., 2004 konnten aufzeigen, dass Arsenit in einer Konzentration von 100µM in HaCat Zellen (spontane, immortalisierte, menschliche Keratinozyten Zelllinien) eine schnelle Aktivierung der p38 und ERK bewirkt.

Im Gegensatz zu diesen Literaturdaten wurde in der vorliegenden Arbeit eine konzentrationsabhängige Hemmung von ERK in ELM-I-1 und in K562 Zellen unter der Wirkung von Arsenit mit Hilfe von Western Blot-Analyse nachgewiesen. Diese Hemmung konnte in ELM-I-1 Zellen bereits nach einer Stunde und ab einer Konzentration von 5µM festgestellt werden, während in K562 Zellen eine Abnahme ab 12,5µM zu verzeichnen war. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, aber in niedrigeren Konzentrationen wurde eine Aktivierung sowohl der JNK als auch der p38 MAP-Kinasen in beiden Zelllinien nachgewiesen. Die konzentrationsabhängige Aktivierung beider Stresskinasen wurde ab 5µM gezeigt. Die maximale Wirkung wurde mit 50µM Arsenit erreicht. In einer Zeitspanne von 15 min bis vier Stunden war die Phosphorylierung der JNK und p38 durch Arsenit 50µM stark erhöht, während die ERK-Phosphorylierung gehemmt wurde.

Unsere Ergebnisse bestätigen demnach die Aktivierung der Stresskinasen durch Arsenit und zeigen eine Hemmung der ERK-Kaskade in den untersuchten Zellsystemen. Wie oben beschrieben haben die meisten Forschungsgruppen über eine Aktivierung der ERK-Kaskade durch Arsenit in nicht hämatopoetischen Zellen berichtet. Nur zwei Studien sind bekannt, die die Hemmung der ERK-Kaskade durch höhere Arsenitkonzentrationen beschreiben. Daum et al., 2001 haben die Hemmung der ERK durch 300µM Arsenit auf der Ebene von Ras in SMCs (glatte Muskulatur Zellen) beobachtet. Doza et al., 1998 haben gezeigt, dass 500 µM Arsenit in Fibroblasten ebenfalls auf Ras-Ebene die ERK-Kaskade blockiert. In unseren Versuchen mit hämatopoetischen Zellen erwiesen sich diese Arsenitkonzentrationen als hochgradig zytotoxisch.

Unsere Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, dass die verschiedenen biologischen Effekte, welche durch Arsen hervorgerufen werden, auf die Beeinflussung von Signaltransduktionswegen zurückzuführen sind. Die Tatsache, dass Arsenit ein nicht genotoxisches Kanzerogen ist, wird unterstützt durch die Beobachtungen in nicht hämatopoetischen Zellen, in welchen man eine Aktivierung der ERK-Kaskade beobachtet hat. Interessanterweise in hämatopoetischen Zelllinien (ELM-I-1 und K562 Zellen) wurde eine Hemmung der ERK-Kaskade festgestellt, was eher für einen zytostatischen Effekt spricht, ausgerechnet in diesem Zellsystem wo Arsenit nicht als Kanzerogen betrachtet werden kann, da sich die Zellen in konstanter Teilung befinden.

Die Hemmung der ERK-Kaskade durch Arsenit in Leukämiezellen in niedrigeren Konzentrationen deutet darauf hin, dass diese Wirkung für die zytostatischen Effekte von Arsenit bei der Behandlung von Leukämie von Bedeutung sein kann. Als Arsen-Verbindung wurde bis jetzt bei akuter promyelozytärer Leukämie (APL) Arsentrioxid, ATO klinisch getestet. In der letzten Zeit interessiert man sich für Arsenit zunehmend auch im Zusammenhang mit CML.

Für die chronische myeloische Leukämie ist die Bildung des Philadelphia-Chromosoms der häufigste auslösende Faktor. Dabei handelt es sich um ein verkürztes Chromosom 22. Es entsteht, wenn die Enden von Chromosom 22 und Chromosom 9 gegeneinander ausgetauscht werden. Durch diese Translokation geraten auf Chromosom 22 zwei Gene in unmittelbare Nachbarschaft, die normalerweise nur getrennt voneinander vorkommen. Das Produkt dieses Fusionsgens (Bcr-Abl Fusionsprotein) ist eine aktive Tyrosinkinase, die eine unkontrollierte Teilung von Leukämiezellen verursacht [Konopka *et al.*, 1985]. Mehrere Autoren haben aber in verschiedenen Bcr-Abl-positiven subklonen von CML-relevanten K562 Zellen eine erhöhte Aktivierung von Ras gezeigt [Mizuschi *et al.*, 2005; Mandanas *et al.*, 1993]. Der genaue Mechanismus der Aktivierung von Ras durch Bcr-Abl ist jedoch noch ungeklärt.

Der Wirkstoff Imatinib, seit November 2001 in Deutschland mit dem Handelsnamen Glivec zugelassen, hemmt die Tyrosinkinase-Aktivität von Bcr-Abl-Protein, indem er mit ATP um dessen Bindungstasche konkurriert und somit die Phosphorylierung von Substratproteinen und die nachfolgenden Signaltransduktionswege blockiert. Es ist bekannt, dass Imatinib in K562 Zellen die ERK-Kaskade unterdrückt, die p38 aktiviert und die erythroide Differenzierung induziert [Kohmura et al., 2004].

Da die ERK Signaltransduktionskaskade die erythroide Differenzierung negativ reguliert und p38 an der Induktion der Differenzierung beteiligt ist, liegt nahe, dass Imatinib durch die Wirkung auf MAPK-Kaskaden erythroide Differenzierung induziert [Whalen et al., 1997; Witt et al., 2000; Uchida et al., 2001; Matsuzaki et al., 2000; Schaefer et al., 2004]. Die Hemmung der ERK-Kaskade könnte außerdem die proliferationshemmende und apoptotische Wirkung von Imatinib erklären.

Im Hinblick auf die potentielle Anwendung von Arsenit in der Leukämietherapie ist interessant, dass diese Substanz ebenfalls eine Hemmung der ERK-Kaskade verursacht und dadurch proliferationshemmende, differenzierungsinduzierende und apoptotische Signale in Gang setzen könnte.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass Natriumarsenit in ELM-1 und in K562 Zellen die gleichen Effekte auf MAPK-Kaskaden ausübt: eine konzentrationsabhängige Aktivierung von JNK und p38 zwischen 12,5µM und 50µM und eine Hemmung von ERK bereits ab 5µM. Die Induktion der erythroiden Differenzierung in diesen Zellen ist möglicherweise in diesen Effekten begründet. Die Tatsache, dass Arsenit in Leukämiezellen die ERK-Kaskade hemmt, könnte proliferationshemmende, differenzierungsinduzierende und apoptotische Wirkung dieser Substanz bei einer therapeutischen Anwendung erklären. Diese Ergebnisse liefern deshalb neue Information über die Wirkungsmechanismen von Arsenit in hämatopoetischen Zellen in bezug auf die Leukämietherapie.

E.2 Mechanismen der Natriumarsenit-vermittelten Induktion der *egr-1* Expression

Der Transkriptionsfaktor Egr-1 (early growth response-1) gehört zu den DNA-bindenden Zinkfingerproteinen und stellt einen induzierbaren Transkriptionsfaktor dar. Egr-1 reguliert die Expression vieler Gene, die in der Zellproliferation, der Differenzierung und in inflammatorischen Vorgängen involviert sind [Sukhatme et al., 1988; Nguyen et al., 1993].

Das *egr-1* Gen ist ein typisches, frühansprechendes Gen (immediately early growth gene), das unter anderen durch Wachstumsssfaktoren, inflammatorische Zytokine und differenzierungsinduzierende Signale aktiviert wird. Es gibt Hinweise für eine Beteiligung des *egr-1* Gens an der Regulation der Proliferation [Perez-Castillo et al., 1993; Hu und Levin, 1994]; Apoptose [Muthukkmat et al., 1995] und Differenzierung bestimmter hämatopoetischer Zellen wie Monozyten und Megakaryozyten [Nguyen et al., 1993; Krishnaraju et al., 1995 Krishnaraju et al., 1998; Krishnaraju et al., 2001]. Ebenfalls wird *egr-1*-Gen unter bestimmten Bedingungen eine Tumorsuppressor-Funktion zugesprochen [Huang et al., 1995; Liu et al., 1996]. In einer kürzlich verfassten Studie haben de Belle et al., 2003 ein neues Egr-1 Zielgen identifiziert und kloniert, das sie als TOE1 bezeichneten (Target of Egr-1). Das Protein TOE1 zeichnete sich durch die Induktion von p21 (ein Protein, das den Zellzyklus in der G1 Phase stoppt) und durch seine Fähigkeit die Kolonienbildung zu hemmen als Inhibitor des Zellwachstums aus.

Untersuchungen in K562 Zellen zeigten, dass die Expression des *egr-1* Gens an der megakaryozytären Differenzierung beteiligt ist und diese von einer Suppression erythroider Marker begleitet wird [Cheng et al., 1994]. Die Gruppe um Krishnaraju hat gezeigt, dass *egr-1* die Ausbildung von Makrophagen auf Kosten der granulozytären oder erythroiden Zellreihen bevorzugt [Krishnaraju et al., 2001]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass *egr-1* die erythroide Differenzierung negativ reguliert.

Die *egr-1* Genexpression wird durch alle drei wichtigen MAP-Kinasen, ERK, JNK und p38 vermittelt. Einmal aktiviert, führen diese Kinasen zur Phosphorylierung des ternär Komplex Faktors Elk-1, der mit zwei Serum Response Faktoren (SRF), an das SRE (serum response element) innerhalb des *egr-1* Promotors bindet und die Transkription aktiviert [Treisman et al., 1995; Lim et al., 1998; Guha et al., 2001; Cibelli et al., 2002; Wu et al., 2002]. Weiterhin ist bekannt, dass die Induktion der *egr-1* Expression auch durch CRE (cAMP-response element) erfolgt [Rolly et al., 1999; Russel et al., 2003; Dziema et al., 2003]. In der Promotor-Region von *egr-1* sind mehrere SRE und auch CRE Bindungsstellen zu finden. Die SRE stellen starke Regulatoren der *egr-1* transkriptionalen Aktivität dar. Die Aktivierung von SRE ohne CRE Aktivierung ist ausreichend für die maximale Expression von *egr-1* [McMahon et al., 1995].

Al-Sarray et al., 2004 haben neulich berichtet, dass Arsenit die *egr-1* Expression in menschlichen HaCaT Keratinozyten induziert. Für diese Hochregulierung ist offensichtlich die ERK-Kaskade verantwortlich, da die *Egr-1* Synthese komplett mit PD 98059, einem Inhibitor der ERK-Kaskade, gehemmt werden konnte. Kawasaki et al., 1996 und Lim et al., 1998 haben dagegen gezeigt, dass Arsenit in Fibroblasten von Ratten, 3Y1 Zellen und in NIH3T3 Mäusefibroblasten die *egr-1* Expression durch JNK und p38 induziert.

Um die durch MAP-Kinasen vermittelte Genexpression zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Arsenit auf die Induktion der *egr-1* Expression untersucht. In ELM-I-1 und K562 Zellen konnte eine Induktion der *egr-1* Expression durch Arsenit in einem Konzentrationsbereich von 15µM bis 50µM nachgewiesen werden die mit der Aktivierung der Stresskinasen korrelierte. Unsere Ergebnisse bestätigen auch in hämatopoetischen Zellen, dass Arsenit die *egr-1* Expression induziert. Die Wirkung von Arsenit war durch MEK1/2-Inhibitoren wie PD98059 und UO126 nicht antagonisierbar. Die basale *egr-1* Expression wurde jedoch durch diese Substanzen stark unterdrückt.

Obwohl die basale *egr-1* Expression in ELM-I-1 Zellen über die ERK-Kaskade reguliert wird [Schaefer et al., 2004], ist dieser Signalweg offensichtlich an der Induktion der *egr-1* Expression durch Arsenit nicht beteiligt. Die negativen Ergebnisse mit den MEK1/2-Inhibitoren deuten darauf hin, dass die Arsenit gesteuerte Induktion der *egr-1*-Expression nicht durch Raf-MEK-ERK sondern durch die Stresskinasen erfolgt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass Arsenit die ERK1/2-Phosphorylierung in den untersuchten Zellen hemmt während die JNK und p38 MAP-Kinasen aktiviert (Abb. 13 und 14). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein, die in Ratenfibroblasten und in NIH3T3 Zellen die Induktion der *egr-1* Expression durch Arsenit ebenfalls mit den Stresskinasen in Verbindung gebracht haben [Kawasaki et al., 1996; Lim et al., 1998].

In weiteren Versuchen wurde mit Hilfe von Reporter-gen-Assay untersucht, welche von den regulatorischen Sequenzen im *egr-1* Promotor für die Induktion der *egr-1*-Expression durch Arsenit verantwortlich ist. Die Reporter-gen-Analysen in K562 Zellen zeigten, dass Arsenit die basale SRE-Aktivität unterdrückt. Für die Induktion der *egr-1* Genexpression über SRE ist der Ternärkomplexfaktor Elk-1 verantwortlich, ein wichtiges Substrat der drei MAP-Kinasen. Die Unterdrückung der SRE-vermittelten Genexpression durch Arsenit schließt aus, dass die *egr-1* Expression über dieses regulatorische Element durch Stresskinasen als Folge einer Elk-1 Phosphorylierung induziert wird. Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass selbst wenn SRE durch Arsenit unterdrückt ist, wird trotzdem die *egr-1* Expression über andere Wege induziert.

Obwohl die Beteiligung der Stresskinasen an der Induktion der *egr-1* Expression durch Arsenit auch von anderen Autoren nachgewiesen ist, sind die regulatorischen Sequenzen in dem *egr-1* Promotor, die für die Hochregulierung der *egr-1* Expression verantwortlich sind, bis jetzt nicht ausführlich untersucht. Es gibt aber bereits Beobachtungen mit Hilfe von Reporter-gen-Analyse, dass Arsenit die Genexpression über CRE induzieren kann [Kietzmann et al., 2003].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Aktivierung der CRE-vermittelten Genexpression durch Arsenit. Dies deutet darauf hin, dass dieses regulatorisches Element für die Arsenit Induktion der *egr-1* Expression über Stresskinasen verantwortlich ist.

An der regulatorischen Sequenz CRE bindet sowohl CREB (c-AMP Bindeprotein) als auch ATF2. Einerseits führt die CREB Phosphorylierung durch Proteinkinase A oder durch andere Kinasen zur Aktivierung von CRE. Andererseits kann CRE durch den Transkriptionsfaktor ATF2 aktiviert werden, welcher wiederum durch JNK oder p38 phosphoryliert wird. In vitro Kinase Assay-Untersuchungen zeigten eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF2 über JNK durch Arsenit. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Arsenit in K562 Zellen die *egr-1* Expression Stresskinasen-abhängig über CRE induzieren kann.

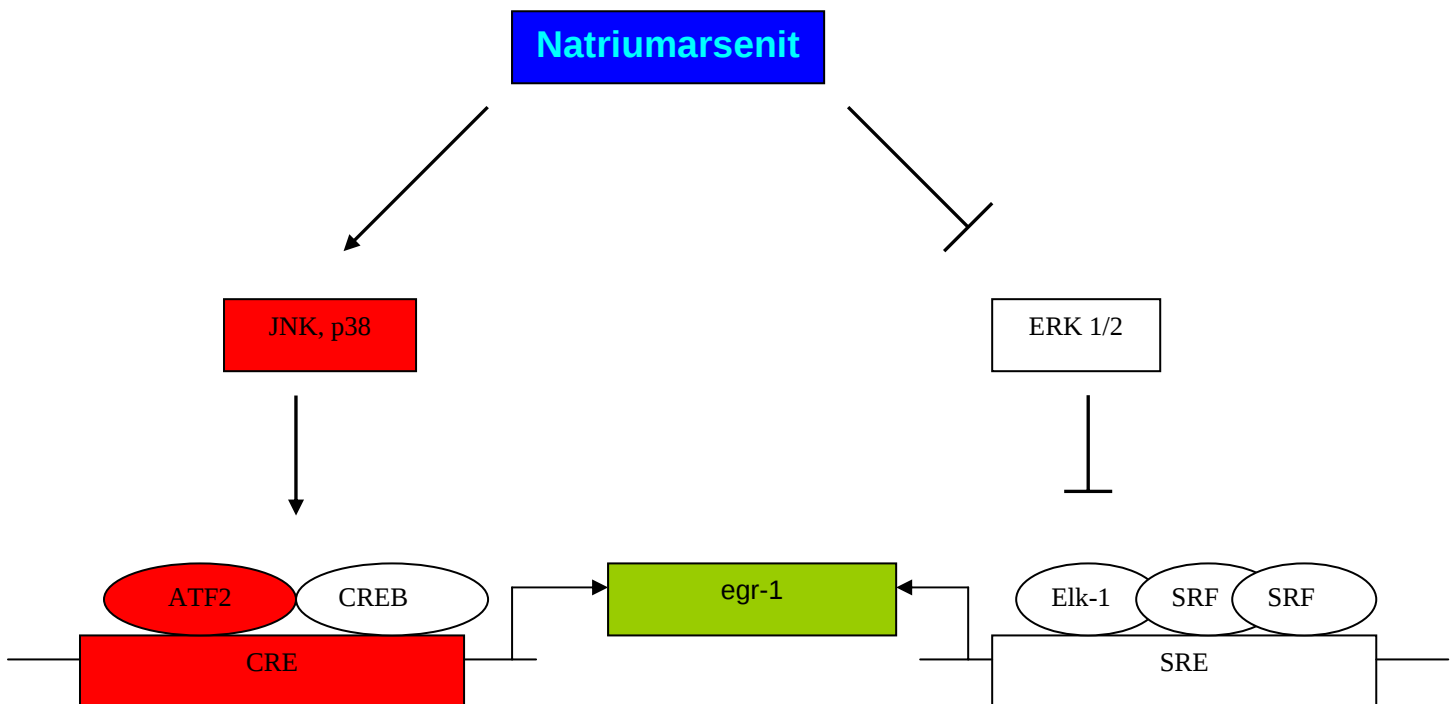


Abb 39 Wirkung von Arsenit auf die MAP-Kinasen und auf die Induktion der *egr-1* Expression

Als Schlussfolgerung kann festgestellt werden, dass Arsenit in ELM-1- und K562 Zellen die egr-1 Expression in einem Konzentrationsbereich von 15µM bis 50 µM hochreguliert. Arsenit induziert die egr-1 Expression nicht über die Raf-MEK-ERK-Kaskade, sondern offensichtlich durch Aktivierung der Stresskinasen JNK und p38, die die Induktion der egr-1 Expression über CRE bewirken.

E.3 Induktion der erythroiden Differenzierung durch Arsenit

Dass man mit Arsen den perfekten Mord begehen kann, hat Agatha Christie eindrucksvoll beschrieben. Jetzt allerdings zeigt Arsen auch sein zweites Gesicht: Das gefürchtete Element kann nämlich Leben retten, und zwar bei Patienten mit Leukämie. Arsen-Verbindungen werden für zusätzliche Behandlung für akute promyelozytäre Leukämie (APL) neben der konventionellen Chemotherapie verwendet. Besonders effektiv ist die Kombination mit Vitamin A. Jährlich erkranken 20.000 Menschen weltweit an APL. Die Initialbehandlung bezieht Chemotherapie und all-trans-Retinsäure, ATRA mit ein, die oxidierte Form von Vitamin A. Diese Kombination erzielt eine Überlebensrate zwischen 60 und 80 Prozent. Im Vergleich dazu erreicht die Arsen-Therapie ein Überleben von 88,5 Prozent der Patienten nach 34 Monaten. Es handelt sich um eine Monotherapie mit Arsentrioxid, die ohne die konventionelle Chemotherapie auskommt. Knochenmarkstransplantationen könnten weitgehend vermieden werden [Chen et al., 1997; Wang et al., 2000; Chen et al., 2001].

Der therapeutische Effekt von Arsentrioxid (ATO) bei APL könnte neben der Hemmung der Zellproliferation auf der Induktion der Differenzierung und/oder Apoptose basieren [Chen et al., 1997; Soignet et al., 1998; Shao et al., 1998; Zhang et al., 2001]. ATO hemmt das Zellwachstum und fördert die Apoptose aber nicht nur in APL Zellen. Neulich interessiert man sich für ATO zunehmend auch im Zusammenhang mit CML, da diese Substanz in Bcr-Abl-positiven Zellen ebenso wirkungsvoll ist [Puccetti et al., 2000; Perkins et., 2000; Nimmanapalli et al., 2001].

Die ersten Ansätze für eine Arsentherapie bei CML gehen bereits auf frühere Zeiten zurück [Übersichtarbeit von Waxman et al., 2001]. Neuere klinische Studien aus China haben bewiesen, dass nach zweiwöchiger Behandlung mit ATO eine komplette Remission bei 74% der CML-Patienten erzielt werden kann [Hu et al., 2000]. Darüber hinaus zeigte man in Experimenten mit K562 Zellen, dass die Behandlung mit einer Kombination von ATO und Imatinib einen synergistischen Effekt bei der Hemmung der Zellproliferation hat [La Rosée et al., 2001].

Bis jetzt gibt es in der Literatur keinen Hinweis auf mögliche Wirkungen von ATO auf die Differenzierung von K562 Zellen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zum Ziele gesetzt, die Wirkung von Natriumarsenit und ATO auf die Induktion der Differenzierung im K562- und ELM-I-1 Zellen zu untersuchen. Die K562 Zellen, die sich in einem pluripotenten Differenzierungsstadium befinden, können sich sowohl erythroid als auch megakaryozytär differenzieren. Untersucht wurde auch bei diesen Zellen die erythroide Differenzierung, da das bereits zugelassene Medikament bei CML, Imatinib, ebenfalls erythroide Differenzierung induziert. Die ELM-I-1 Zellen stellen, wie oben erwähnt, ein geeignetes Modell für die isolierte Untersuchung der erythroiden Entwicklung dar, weil diese Zellen nur die terminale erythroide Differenzierung durchlaufen und durch den physiologischen Regulator der erythroiden Differenzierung, Erythropoetin stimulierbar sind [Shiozaki et al., 1990].

Die Untersuchungen mit niedrigen, therapeutisch relevanten Konzentrationen (0,5mM-2µM) [Zhang et al., 2001] zeigten, dass Natriumarsenit in K562- und ELM-I-1- Zellen, erythroide Differenzierung induziert. Die Wirkung von Arsentrioxid (ATO) auf die Differenzierung in K562 Zellen wurde vergleichsweise untersucht und festgestellt, dass ATO mit der gleichen Konzentrationsabhängigkeit wie Natriumarsenit die erythroide Differenzierung induziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit ATO zeigen, dass diese Substanz in K562 Zellen eine ähnliche Wirkung wie Imatinib auf die erythroide Differenzierung hat und unterstützen die Vorstellung, dass ATO eine vielversprechende Substanz auch für die CML-Therapie darstellt [O'Dwyer, 2002; La Rosee et al., 2002].

Interessant ist in diesem Zusammenhang der mögliche Wirkungsmechanismus von Arsenit. Mehrere Forschergruppen haben demonstriert, dass die Inhibition der ERK/MAP-Kinasen die erythroide Entwicklung induziert und fördert [Whalen et al., 1997; Witt et al., 2000; Miyazaki et al., 2001; Schaefer et al., 2004]. Es konnte in Reporter-gen-Studien gezeigt werden, dass die Induktion der Differenzierung durch Arsenit (0.5µM-2µM) mit einer Abnahme sowohl der Elk-1 als auch der SRE-vermittelten Genexpression korrelierte. Der Ternärkomplexfaktor Elk-1 ist ein wichtiges Zielprotein der ERK-Kaskade.

Tatsächlich wurde eine Hemmung der ERK-Phosphorylierung durch Arsenit in K562 Zellen bei höheren Arsenitkonzentrationen beobachtet, nicht aber bei niedrigen, differenzierungsinduzierenden Konzentrationen ($0,5\mu\text{M}$ - $2\mu\text{M}$). Es ist anzunehmen, dass die höhere Zelldichte in Kurzzeit-Versuchen dafür verantwortlich ist. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass die chronische Exposition in niedriger Konzentration möglicherweise ähnliche Effekte hervorruft, wie jene durch akute Exposition von höheren Arsenit-Konzentrationen verursacht werden.

Die Ergebnisse deuten deshalb darauf hin, dass die Induktion der Differenzierung durch Arsenit vor allem durch eine Unterdrückung der ERK-Kaskade und SRE-vermittelten Genexpression eingeleitet wird.

Im Übereinstimmung mit den Ergebnisse mit höheren Arsenitkonzentrationen wurde gleichzeitig eine Aktivierung der Genexpression über CRE beobachtet. Wie bereits diskutiert, spielen bei der Induktion von CRE durch Arsenit die Stresskinasen eine Rolle. Da es bekannt ist, dass die p38 die Entwicklung von Erythrozyten aus Vorläuferzellen fördert [Nagata et al., 1998; Witt et al., 2000; Miyazaki et al., 2001; Sawafuji et al., 2003], liegt nahe, dass die Aktivierung von p38 ebenfalls zu dem differenzierungsinduzierenden Potential von Arsenit beiträgt.

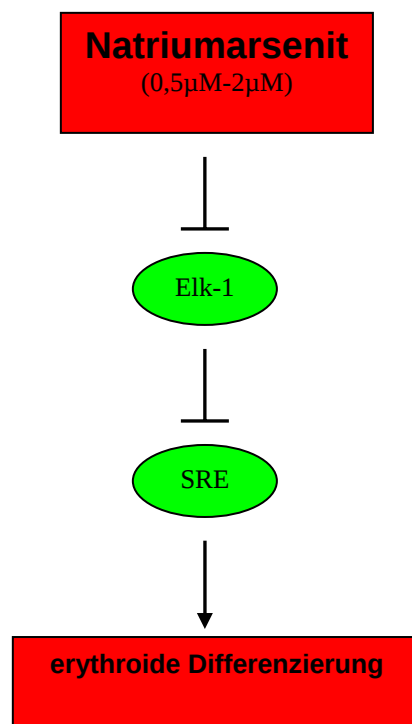


Abb. 40 Induktion der Differenzierung durch Arsenit

Insgesamt lässt sich aus den in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnissen schließen, dass Natriumarsenit in K562- und ELM-I-1 Zellen in Konzentrationen von 0,5µM bis 2µM die erythroide Differenzierung induziert. Die Induktion der Differenzierung durch Arsenit in K562 Zellen kommt offensichtlich durch die Unterdrückung der ERK-Kaskade und der Elk-1/SRE-vermittelten Genexpression zustande, könnte aber auch eine p38 Aktivierung dazu beitragen. Die Ergebnisse untermauern die Vorstellung, dass die Induktion der Differenzierung in der CML-Therapie einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt.

E. 4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Informationen über die Wirkung von Arsenit auf Signaltransduktionsvorgänge in hämatopoetischen Zellen, die interessante Ansätze für weitere Untersuchungen bieten.

Im Zusammenhang mit der Wirkung von Arsenit auf die MAPK-Kaskaden bleibt zu klären, über welchen Mechanismus Arsenit sowohl die Hemmung von ERK-Kaskade als auch die Aktivierung von Stress-Kinasen verursacht. In Frage kommende Mechanismen sind die mögliche Aktivierung von PKA, welche eine Raf-Hemmung als Folge hat und dadurch die Unterdrückung der ERK-Kaskade verursachen kann. Als weitere Möglichkeit denken wir an eine Stress-Kinase vermittelte Induktion von MAP-Kinase-Phosphatase-1, durch welche die Aktivität von ERK 1/2 herabreguliert wird.

Weitere Ergebnisse der Dissertation zeigen, dass Natriumarsenit und ATO in therapeutisch relevanten Konzentrationen erythroide Differenzierung induzieren und unterstützen die Vorstellung, dass der Einsatz von Arsen-Verbindungen eine vielversprechende Möglichkeit neben Imatinib in der CML-Therapie darstellt. Interessant ist ebenfalls die Frage ob der *egr-1* Transkriptionsfaktor für die beobachteten regulatorischen Effekte auf die erythroide Differenzierung verantwortlich ist.

Es soll der Einfluss von Arsenit auf andere Differenzierungsvorgänge in Leukämiezellen untersucht werden um zu klären, ob Arsenit eine spezifische Wirkung auf die erythroide Differenzierung hat, oder eher allgemein Differenzierungsvorgänge fördert.

Es wäre weiterhin wichtig in bezug auf die potentielle therapeutische Wirkung von Arsenit die Differenzierungsinduktion mit der Förderung der Apoptose zu vergleichen, da beide Vorgänge in der therapeutischen Wirkung von Imatinib und Arsenit diskutiert werden.

F Literaturverzeichnis

Agis, H., Weltermann, A., Mitterbauer, G., Thalhammer, R., Edelhauser, M., Seewann, H.L., Valent, P., Lechner, K., Fonatsch, C., Geissler, K. (1999). Successful treatment with arsenic trioxide of a patient with ATRA-resistant relapse of acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol* 78, 329-32.

Ahn, N.G., Seger, R., Bratlien, R.L., Diltz, C.D., Tonks, N.K., Krebs, E.G. (1990). Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* 266, 4220-7.

Ahsan, H., Perrin, M., Rahman, A., Parvez, F., Stute, M., Zheng, Y., Milton, A.H., Brandt-Rauf, P., van Geen, A., Graziano, J. (2000). Associations between drinking water and urinary arsenic levels and skin lesions in Bangladesh. *J Occup Environ Med* 42, 1195–1201.

Al-Sarraj, A. and Thiel, G. (2004). The zinc finger transcription factor Egr-1 is upregulated in arsenite-treated human keratinocytes. *J Mol Med* 82, 530-8.
Aronson, S.M. (1994). Arsenic and old myths. *R I Med* 77, 233-234.

Bachleitner-Hofmann, T., Gisslinger, B., Grumbeck, E., Gisslinger, H. (2001). Arsenic trioxide and ascorbic acid: synergy with potential implications for the treatment of acute myeloid leukaemia? *Br J Haematol* 112, 783-6.

Barchowsky, A., Dudek, E.J., Treadwell, M.D., Wetterhahn, K.E. (1996). Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 21, 783-90.

Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A.K. (2001.) Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic *Mutat Res* 488, 171-94.

Bates, M.N., Smith, A.H., Hopenhayn, Rich. C. (1992). Arsenic ingestion and internal cancers: *Am J Epidemiol* 135, 462–476.

Bernstam, L. and Nriagu, J. (2000). Molecular aspects of arsenic stress. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 3, 293-322.

Binder, S., Forney, D., Kaye, W., Paschal, D. (1987). Arsenic exposure in children living near a former copper smelter. *Bull Environ Contam Toxicol* 39, 114–121.

Bode, A.M. and Dong, Z. (2002). The paradox of arsenic: molecular mechanisms of cell transformation and chemotherapeutic effects. *Crit Rev Oncol Hematol* 42, 5-24.

Boulton, T.G., Nye S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D. (1991). ERKs : a family of protein-serin/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.

Buchet, J. and Lison, D. (2000). Clues and uncertainties in the risk assessment of arsenic in drinking water. *Food Chem Toxicol* 38, S81-5.

Camacho, L.H., Soignet, S.L., Chanel, S., Ho, R., Heller, G., Scheinberg, D.A., Ellison, R., Warrell, R.P. Jr. (2000). Leukocytosis and the retinoic acid syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *J Clin Oncol* 18, 2620-5.

Cavigelli, M., Li, W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K., Karin, M. (1996). The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J* 15, 6269-6279.

Chen, N.Y., Ma, W.Y., Huang, C., Ding, M., and Dong, Z. (2000). Activation of PKC is required for arsenite-induced signal transduction. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19, 297-305.

Chen, W., Martindale, J.L., Holbrook, N.J., Liu, Y. (1998). Tumor promoter arsenite activates extracellular signal-regulated kinase through a signaling pathway mediated by epidermal growth factor receptor and Shc. *Mol Cell Biol* 18, 5178-88.

Chen, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. (1998). Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 177, 324-33.

Chen, Z., Chen, G.Q., Shen, Z.X., Chen, S.J., Wang, Z.Y. (2001). Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic compounds: in vitro and in vivo studies. *Semin Hematol* 38, 26-36.

Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W. (1997). Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89, 3345-3353.

Chen, C.J and Wang, C.J. (1990). Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res* 50, 5470-4.

Cheng, T., Wang, Y., Dai, W. (1994). Transcription factor *egr-1* is involved in phorbol 12-myristate 13-acetate-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem* 269, 30848-53.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Chowdhury, U.K., Biswas, B.K., Chowdhury, T.R., Samanta, G., Mandal, B.K., Basu, G.C., Chanda, C.R., Lodh, D., Saha, K.C., Mukherjee, S.K., Roy, S., Kabir, S., Quamruzzaman, Q., Chakraborti, D. (2000). Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India. *Environ Health Perspect* 108, 393-397.

Cibelli, G., Policastro, V., Rossler, O.G., Thiel, G. Nitric oxide-induced programmed cell death in human neuroblastoma cells is accompanied by the synthesis of *Egr-1*, a zinc finger transcription factor.

- Clifton, A.D., Young, P.R., Cohen, P. (1996). A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett* 392, 209-214.
- Cooper, K.L., Myers, T.A., Rosenberg, M., Chavez, M., Hudson, L.G. (2004). Roles of mitogen activated protein kinases and EGF receptor in arsenite-stimulated matrix metalloproteinase-9 production. *Toxicol Appl Pharmacol* 200, 177-85.
- Crecelius, E.A., Johnson, C.J., Hofer, G.C. (1974). Contamination of soils near a copper smelter by arsenic, antimony and lead. *Water Air Soil Pollution* 3, 337-342.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R., Lee, J.C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364, 229-33.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351, 95-105.
- Daum, G., Pham, J., Deou, J. (2001). Arsenite inhibits Ras-dependent activation of ERK but activates ERK in the presence of oncogenic Ras in baboon vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell Biochem* 217, 131-136.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 39-52.
- De Belle, I., Wu, J.X., Sperandio, S., Mercola, D., Adamson, E.D. (2003). In vivo cloning and characterization of a new growth suppressor protein TOE1 as a direct target gene of Egr1. *J Biol Chem* 278, 14306-12.
- Dickerson, O.B. (1980). Arsenic. In: Waldron HA (ed) *Metals in the environments*. Academic Press, New York.
- Doza, Y.N., Hall-Jackson, C.A., Cohen, P. (1998). Arsenite blocks growth factor induced activation of the MAP kinase cascade, upstream of Ras and downstream of Grb2-Sos. *Oncogene* 17, 19-24.
- Drobna, Z., Jaspers, I., Thomas, D.J., Styblo, M. (2003). Differential activation of AP-1 in human bladder epithelial cells by inorganic and methylated arsenicals. *FASEB J* 17, 67-9.
- Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., Saltiel, A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci* 92, 7686-9.
- Duyndam, M.C., Hulscher, S.T., van der Wal, E., Pinedo, H.M., Boven, E. (2003). Evidence for a role of p38 kinase in hypoxia-inducible factor 1-independent induction of vascular endothelial growth factor expression by sodium arsenite. *J Biol Chem* 278, 6885-95.
- Dziema, H., Oatis, B., Butcher, G.Q., Yates, R., Hoyt, K.R., Obrietan, K. (2003). The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 17, 1617-27.

Engel, K., Ahlers, A., Brach, M. A., Herrmann, F., and Gaestel, M. (1995). MAPKAP kinase 2 is activated by heat shock and TNF- α : in vivo phosphorylation of small heat shock protein results from stimulation of the MAP kinase cascade. *J Cell Biochem* 57, 321-30.

Enslen, H., Raingeaud, J., Davis, R.J. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activate protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 273, 1741-1748.

Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., Trzaskos, J.M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273, 18623-32.

Frantz, B., Klatt, T., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Williams, H., Tocci, M.J., O'Keefe, S.J., O'Neill, E.A. (1998). The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochem* 37, 13846-53.

Gebel, T. (1997.) Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chem Biol Interact* 107, 131-44.

Gebel, T., Becher, H. (2000). Arsen. In: Wichmann HE, Schlipkötter WH, Füllgraff G (Hrsg) *Handbuch der Umweltmedizin*. Ecomed, Landsberg.

Grad, J.M., Bahlis, N.J., Reis, I., Oshiro, M.M., Dalton, W.S., Boise, L.H. (2001). Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Blood* 98, 805-13.

Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F.F., Zamir, I., Seiser, C., Grignani, F., Lazar, M.A., Minucci, S., Pelicci, P.G. (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 815-8.

Guha, M., O'Connell, M.A., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S.F., Stern, D., Mackman, N. (2001). Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98, 1429-39.

Hayashi, T., Hideshima, T., Akiyama, M., Richardson, P., Schlossman, R.L., Chauhan, D., Munshi, N.C., Waxman, S., Anderson, K.C. (2002). Arsenic trioxide inhibits growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Mol Cancer Ther* 1, 851-60.

Heidenreich, O., Neininger, A., Schratt, G., Zinek, R., Cahill, M.A., Engel, K., Kotlyarow, A., Kraft, R., Kostka, S., Gaestel, M., Nordheim, A. (1999). MAPKAP Kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 274, 1434-1443.

Hossain, K., Akhand, A.A., Kato, M., Du, J., Takeda, K., Wu, J., Takeuchi, K., Liu, W., Suzuki, H., Nakashima, I. (2000). Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of c-Jun amino-terminal kinase. *J Immunol* 165, 4290-7.

Hu, Y., Jin, X., Snow, E.T. (2002). Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappaB DNA binding activity and related gene expression. *Toxicol Lett* 133, 33-45.

Hu, X.C., Zhang, C., Li, J.M. (2000). Use of arsenic trioxide in the treatment of chronic myelogenous leukemia: clinical efficacy in 34 patients. In: Program and Abstracts: Advances in Cancer Differentiation Therapy-A Meeting Combining the East and the West. Shanghai, China, 14a.

Hu, R.M. and Levin, E.R. (1994). Astrocyte growth is regulated by neuropeptides through Tis 8 and basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest* 93, 1820-7.

Huang, C., Ma, W.Y., Li, J., Dong, Z. (1999). Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res* 59, 3053-8.

Huang, C., Ma, W.Y., Li, J., Goranson, A., Dong, Z. (1999). Requirement of Erk, but not JNK, for arsenite-induced cell transformation. *J Biol Chem* 274, 14595-601.

Huang, R.P., Liu, C., Fan, Y., Mercola, D., Adamson, E.D. (1995). Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res* 55, 5054-62.

Iordanov, M.S. and Magun, B.E. (1999). Different mechanisms of c-Jun NH(2)-terminal kinase-1 (JNK1) activation by ultraviolet-B radiation and by oxidative stressors. *J Biol Chem* 274, 25801-6.

Ishikawa, T., Igarashi, T., Hata, K., Fujita, T. (1999). c-fos induction by heat, arsenite, and cadmium is mediated by a heat shock element in its promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 566-71.

Jager, J.W. and Ostrosky-Wegman, P. (1997). Arsenic: a paradoxical human carcinogen. *Mutat Res* 386, 181-4.

Jacquel, A., Herrant, M., Legros, L., Belhacene, N., Luciano, F., Pages, G., Hofman, P., Auberger, P. (2003). Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J* 17, 2160-2.

Janknecht, R., Hunter, T. (1997). Convergence of MAP Kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J* 16, 1620-1627.

Kaiho, S.I. and Mizuno, K. (1985). Sensitive Assay system for detection of hemoglobin with 2,7-diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythroidifferentiation. *Anal Biochem* 149, 117-120.

Kapahi, P., Takahashi, T., Natoli, G., Adams, S. R., Chen, Y., Tsien, R. Y., and Karin, M. (2000). Inhibition of NF κ B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of I κ B kinase. *J. Biol Chem* 275, 36062-36066.

Kawasaki, H., Moriguchi, T., Matsuda, S., Li, H.Z., Nakamura, S., Shimohama, S., Kimura, J., Gotoh, Y., Nishida, E. (1996). Ras-dependent and Ras-independent activation pathways for the stress-activated-protein-kinase cascade. *Eur J Biochem* 241, 315-21.

Kevekordes, S., Suchenwirth, R., Gebel, T., Demuth, J., Dunkelberg, H., Kuntzel, H. (1998). Trinkwassergewinnung unter Berücksichtigung geogener Arsenbelastungen. *Gesundheitswesen* 60, 580–585.

Kharbanda, S., Saleem, A., Emoto, Y., Stone, R., Rapp, U., Kufe, D.J. (1994). Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 269, 872-878.

Kietzmann, T., Samoylenko, A., Immenschuh, S. (2003). Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 278, 17927-36.

Kim, J.Y., Choi, J.A., Kim, T.H., Yoo, Y.D., Kim, J.I., Lee, Y.J., Yoo, S.Y., Cho, C.K., Lee, Y.S., Lee, S.J. (2002). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the cell growth inhibition by sodium arsenite. *J Cell Physiol* 190, 29-37.

Kim, S.C., Hahn, J.S., Min, Y.H., Yoo, N.C., Ko, Y.W., Lee, W.J. (1999). Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood* 93, 3893-9.

Konopka, J. B., Watanabe, S. M., Singer, J. W., Collins, S. J., Witte, O. N. (1985). Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic Myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc Natl Acad Sci* 82, 1810-1814.

Kohmura, K., Miyakawa, Y., Kawai, Y., Ikeda, Y., Kizaki, M. (2004). Different roles of p38 MAPK and ERK in STI571-induced multi-lineage differentiation of K562 cells. *J Cell Physiol* 198, 370-6.

Konopka, J.B and Witte, O.N. (1985). Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol Cell Biol* 5, 3116-23.

Krishnaraju, K., Hoffman, B., Liebermann, D.A. (1998). The zinc finger transcription factor Egr-1 activates macrophage differentiation in M1 myeloblastic leukemia cells. *Blood* 92, 1957-66.

Krishnaraju, K., Nguyen, H.Q., Liebermann, D.A., Hoffman, B. (1995). The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 15, 5499-507.

- Krishnaraju, K., Hoffman, B., Liebermann, D.A. (2001). Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood* 97, 1298-305.
- Kuzelova, K., Grebenova, D., Marinov, I., Hrkal, Z. (2005). Fast apoptosis and erythroid differentiation induced by imatinib mesylate in JURL-MK1 cells. *J Cell Biochem* 95, 268-80.
- La Rosee, P., Johnson, K., Moseson, E.M. (2001). Preclinical evaluation of the efficacy of STI571 in combination with a variety of novel anticancer agents. *Blood* 98, 839a.
- La Rosee, P., Johnson, K., O'Dwyer, M.E., Druker, B.J. (2002). In vitro studies of the combination of imatinib mesylate (Gleevec) and arsenic trioxide (Trisenox) in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 30, 729-37.
- Lallemant-Breitenbach, V., Guillemain, M.C., Janin, A., Daniel, M.T., Degos, L., Kogan, S.C., Bishop, J.M., de Thé, H. (1999). Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 189, 1043-52.
- Länderausschuss für Immissionsschutz (LAI). (1993). Krebsrisiko durch Luftverunreinigungen. Materialienband I und II. Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen, Eigenverlag, Düsseldorf.
- Lau, A.T., Li, M., Xie, R., He, Q.Y., Chiu, J.F. (2004). Opposed arsenite-induced signaling pathways promote cell proliferation or apoptosis in cultured lung cells. *Carcinogenesis* 25, 21-8.
- Lim, C.P., Jain, N., Cao, X. (1998) Stress-induced immediate-early gene, *egr-1*, involves activation of p38/JNK1. *Oncogene* 16, 2915-26.
- Lin, C.P., Huang, M.J., Chang, I.Y., Lin, W.Y. (2000). Successful treatment of all-trans retinoic acid resistant and chemotherapy naive acute promyelocytic patients with arsenic trioxide-two case reports. *Leuk Lymphoma* 38, 191-4.
- Liu, Y., Guyton, K.Z., Gorospe, M., Xu, Q., Lee, J.C., Holbrook, N.J. (1996). Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Radic Biol Med* 21, 771-81.
- Liu, C., Adamson, E., Mercola, D. (1996). Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci* 93, 11831-6.
- Livingstone, C., Patel, G., and Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J* 14, 1785-97.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. (2001). *Molekulare Zellbiologie*, 4 Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Lozzio, C.B and Lozzio B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.

Ludwig, S., Hoffmeyer, A., Goebeler, M., Kilian, K., Hafner, H., Neufeld, B., Han, J., Rapp, U.R. (1998). The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. *J Biol Chem* 273, 1917-22.

Luechtrath, H. (1983). The consequences of chronic arsenic poisoning among Moselle wine growers. Pathoanatomical investigations of post-mortem examinations performed between 1960 and 1977. *J Cancer Res Clin Oncol* 105, 173–182.

Luster, M.I., Simeonova, P.P., (2004). Arsenic and urinary bladder cell proliferation. *Toxicol Appl Pharmacol* 198, 419-23.

Mandanas, R.A., Leibowitz, D.S., Gharehbaghi, K., Tauchi, T., Burgess, G.S., Miyazawa, K., Jayaram, H.N., Boswell, H.S. (1993). Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood* 82, 1838-47.

Matschulat, J. (2000). Arsenic in the geosphere. *Sci Total Environ* 249, 297-312.

Matsuzaki, T., Aisaki, K., Yamamura, Y., Noda, M., Ikawa, Y. (2000.) Induction of erythroid differentiation by inhibition of Ras/ERK pathway in a friend murine leukemia cell line. *Oncogene* 19, 1500-1508.

McCabe, M.J. Jr, Singh, K.P., Reddy, S.A., Chelladurai, B., Pounds, J.G., Reiners, J.J. Jr, States, J.C. (2000) Sensitivity of myelomonocytic leukemia cells to arsenite-induced cell cycle disruption, apoptosis, and enhanced differentiation is dependent on the inter-relationship between arsenic concentration, duration of treatment, and cell cycle phase. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 724-33.

McMahon, S.B., Monroe, J.G. (1995). A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of *egr-1* through selective serum response elements following antigen receptor cross-linking in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 15, 1086-93.

Melemed, A.S., Ryder, J.W., Vik, T.A. (1997). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is involved in and sufficient for megakaryocytic differentiation of CMK cells. *Blood* 90, 3462-70.

Miller, W:H Jr. (2002). Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist* 7 Suppl , 14-9

Minden, A., Lin, A., Smeal, T., Derijard, B., Cobb, M., Davis, R., and Karin, M. (1994). c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the Jnk subgroup but not the Erk subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 14, 6683-8.

Miyasaki, R., Ogata, H., Kobayashi, Y. (2001). Requirement of thrombopoietin-induced activation of ERK for megakaryocyte differentiation and of p38 for erythroid differentiation. *Ann Hematol* 80, 284-91.

- Mizuchi, D., Kurosu, T., Kida, A., Jin, Z.H., Jin, A., Arai, A., Miura, O. (2005). BCR/ABL activates Rap1 and B-Raf to stimulate the MEK/Erk signaling pathway in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 645-51.
- Muthukkumar, S., Nair, P., Sells, S.F., Maddiwar, N.G., Jacob, R.J., Rangnekar, V.M. (1995). Role of EGR-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6. *Mol Cell Biol* 15, 6262-72.
- National Research Council. (1999). Arsenic in drinking water. National Academy Press, Washington DC.
- Nagata, Y., Takahashi, N., Davis, R.J., Todokoro, K. (1998). Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 92, 1859-69.
- Nguyen, H.Q., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D.A. (1993). The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 72, 197-209.
- Nimmanapalli, R., Bali, P., O'Bryan, E. (2001). Mechanism by which arsenic trioxide downregulates Bcr-Abl levels and potentiates Gleevec-induced apoptosis of Bcr-Abl positive human leukemia cells. *Clin Cancer Res* 7(suppl),37.
- Niu, C., Yan, H., Yu, T., Sun, H.P., Liu, J.X., Li, X.S., Wu, W., Zhang, F.Q., Chen, Y., Zhou, L., Li, J.M., Zeng, X.Y., Yang, R.R., Yuan, M.M., Ren, M.Y., Gu, F.Y., Cao, Q., Gu, B.W., Su, X.Y., Chen, G.Q., Xiong, S.M., Zhang, T.D., Waxman, S., Wang, Z.Y., Chen, Z., Hu, J., Shen, Z.X., Chen, S.J. (1999). Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 94, 3315-24.
- Novick, S.C. and Warrell, R.P. Jr. (2000). Arsenicals in hematologic cancers. *Semin Oncol* 27, 495-501.
- Nuntharatanapong, N., Chen, K., Sinhaseni, P., Keaney, J.F. Jr. (2005). EGF receptor-dependent JNK activation is involved in arsenite-induced p21Cip1/Waf1 upregulation and endothelial apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H99-H107.
- O'Dwyer, M. (2002). Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. *Oncologist* 7 Suppl, 30-8.
- Parrish, A.R., Zheng, X.H., Turney, K.D., Younis, H.S., Gandolfi, A.J. (1999). Enhanced transcription factor DNA binding and gene expression induced by arsenite or arsenate in renal slices. *Toxicol Sci* 50, 98-105.
- Perez-Castillo, A., Pipaon, C., Garcia, I., Alemany, S. (1993). NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 268, 19445-50.
- Perkins, C., Kim, C.N., Fang, G. (2000). Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x_L. *Blood* 95, 1014-1022.

Porter, A. C., Fanger, G.R., Vaillancourt, R.R. (1999). Signal transduction pathways regulated by arsenate and arsenite *Oncogene* 18, 7794-7802.

Puccetti, E., Guller, S., Orleth, A. (2000). Bcr-Abl mediates arsenic trioxide-induced apoptosis independently of its aberrant kinase activity. *Cancer Res* 60, 3409-3413.

Rahman, M.M., Chowdhury, U.K., Mukherjee, S.C., Mondal, B.K., Paul, K., Lodh, D., Biswas, B.K., Chanda, C.R., Basu, G.K., Saha, K.C., Roy, S., Das, R., Palit, S.K., Quamruzzaman, Q., Chakraborti, D. (2001). Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India. *J Toxicol Clin Toxicol* 39, 683–700.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270, 7420-7426.

Richards, F.M., Watson, A., Hickman, J.A. (1988). Investigation of the effects of heat shock and agents which induce a heat shock response on the induction of differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res* 48, 6715-20.

Roussel, R.R. and Barchowsky, A. (2000). Arsenic inhibits NF-kappaB-mediated gene transcription by blocking IkappaB kinase activity and IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *Arch Biochem Biophys* 377, 204-12.

Rolli, M., Kotlyarov, A., Sakamoto, K.M., Gaestel, M., Neininger, A. (1999). Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promoter element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *J Biol Chem* 274, 19559-64.

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-37.

Russell, D.L., Doyle, K.M., Gonzales-Robayna, I., Pipaon, C., Richards, J.S. (2003). Egr-1 induction in rat granulosa cells by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: combinatorial regulation by transcription factors cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulatory element binding protein, serum response factor, sp1, and early growth response factor-1. *Mol Endocrinol* 17, 520-33.

Salazard, B., Bellon, L., Jean, S., Maraninchi, M., El-Yazidi, C., Orsiere, T., Margotat, A., Botta, A., Berge-LeFranc, J.L. (2004). Low-level arsenite activates the transcription of genes involved in adipose differentiation. *Cell Biol Toxicol* 20, 375-85.

Samet, J.M., Graves, L.M., Quay, J., Dailey, L.A., Devlin, R.B., Ghio, A.J., Wu, W., Bromberg, P.A., Reed, W. (1998). Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol* 275, L551-8.

Sanchez, I., Hughes, R.T., Mayer, B.J., Yee, K., Woodgett, Y.R., Avruch, J., Kyriakis, J.M., Zon, L.I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress activated pathway regulating transcription factor c-jun. *Nature* 372, 794-798.

Sawafuji, K., Miyakawa, Y., Kizaki, M., Ikeda, Y. (2003). Cyclosporin A induces erythroid differentiation of K562 cells through p38 MAPK and ERK pathways. *Am J Hematol* 72, 67-9.

Schaefer, A., Kósa, F., Bittorf, T., Magócsi, M., Rosche, A., Ramirez-Chávez, Y., Marotzki, S., Marquardt, H. (2004). Opposite effects of inhibitors of mitogen-activated protein kinase pathways on the *egr-1* and beta-globin expression in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. *Cell Signal* 16, 223-34.

Schenk, P.W. and snaar-Jagalska, B.E. (1999). Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochem Biophys Acta* 1119, 1-24.

Shao, W., Fanelli, M., Ferrara, F.F. (1998). Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR α protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst* 90, 124-133.

Shibata, Y., Morita, M., Fuwa, K. (1992). Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions. *Adv Biophys* 28, 31–80.

Shiozaki, M., Itoh, K., Mori, K.J. (1990). Proliferation and differentiation of erythroleukemia cell line (ELM-I-1) in response to erythropoietin and interleukin 3. *Leukemia Res* 14, 287-291.

Simeonova, P. P., Wang, S., Toriuma, W., Kommineni, V., Matheson, J., Unimye, N., Kayama, F., Harki, D., Ding, M., Vallyathan, V., Luster, M. I. (2000) Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Res* 60, 3445-3453.

Simeonova, P.P. and Luster, M.I. (2000). Mechanisms of arsenic carcinogenicity: genetic or epigenetic mechanisms?. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19, 281-286.

Soignet, S..L, Maslak, .P, Wang, Z.G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L.J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabrilove, J., Scheinberg, D.A., Pandolfi, P.P., Warrell, R.P. Jr. (1998). Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 339, 1341-8.

Sukhatme, V.P., Cao, X.M., Chang, L.C., Tsai-Morris, C.H., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C., Cohen, D.R., Edwards, S.A., Shows, T.B., Curran, T., Le Beau, M.M, Adamson, E.D. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with *c-fos* during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53, 37-43.

Tanaka-Kagawa, T., Hanioka, N., Yoshida, H., Jinno, H., Ando, M. (2003). Arsenite and arsenate activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 by an epidermal growth factor receptor-mediated pathway in normal human keratinocytes. *Br J Dermatol* 149, 1116-27.

Tchounwou, P.B., Wilson, B., Ishaque, A. (1999). Important considerations in the development of public health advisories for arsenic and arsenic-containing compounds in drinking water. *Rev Environ Health* 14, 211-29.

Tong, L., Pav, S., White, D.M., Rogers, S., Crane, K.M., Cywin, C.L., Brown, M.L., Pargellis, C.A. (1997). A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol* 4, 311-6.

Treisman, R. (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J* 14, 4905-13.

Trouba, K.J. and Germolec, D.R. (2004). Micromolar concentrations of sodium arsenite induce cyclooxygenase-2 expression and stimulate p42/44 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol Sci* 79, 248-57.

Trouba, K.J., Glanzer, J.G., Vorce, R.L. (1999). Wild-type and Ras-transformed fibroblasts display differential mitogenic responses to transient sodium arsenite exposure. *Toxicol Sci* 50, 72-81.

Trouba, K.J., Wauson, E.M., Vorce, R.L. (2000). Sodium arsenite-induced dysregulation of proteins involved in proliferative signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 164, 161-70.

Turpeinen, R., Panssar-Kallio, M., Haggblom, M., Kairesalo, T. (1999). Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Regul Toxicol Pharmacol* 30, 117–129.

Uchida, M., Kirito, K., Shimizu, R., Miura, Y., Ozawa, K., Komatsu, N. (2001). A functional role of mitogen-activated protein kinases, erk1 and erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: a possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int J Hematol* 73, 78-83.

Ullrich, A., Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-12.

Umweltbundesamt. (1983.) Umwelt- und Gesundheitskriterien für Arsen. Erich Schmidt, Berlin.

van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., and Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* 14, 1798-811.

Waalkes, M.P., Fox, D.A., States, J.C., Patierno, S.R., McCabe, M.J. Jr. (2000). Metals and disorders of cell accumulation: modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxicol Sci* 56, 255-61.

Wang, X.Z., Ron, D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Science* 272, 1347-1349.

Wang, Z.Y. and Chen, Z. (2000). Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet Oncol* 1, 101-6.

- Waxman, S, Anderson, K.C. (2001). History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *The Oncologist* 6(suppl 2), 3–10.
- Wesselborg, S., Bauer, M.K., Vogt, M., Schmitz, M.L., Schulze-Osthoff, K. (1997). Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem* 272, 12422-9.
- Whalen, A.M., Galasinski, S.C., Shapiro, P.S., Nahreini, T.S., Ahn, N.G. (1997), Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated kinase kinase. *Mol Cell Biol* 17, 1947-1958.
- Witt, O., Sand, K., Pekrun, A. (2000). Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* 95, 2391-6.
- Wu, W., Graves, L.M., Japers, I., Devlin, R, B., Reed, W., and Samet, J.M. (1999). Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals *Am J phisiol* 277, L924-L931.
- Wu, S.Q., Minami, T., Donovan, D.J., Aird, W.C. (2002). The proximal serum response element in the Egr-1 promoter mediates response to thrombin in primary human endothelial cells. *Blood* 100; 4454-61.
- Zhang, T.D., Chen, G.Q., Wang, Z.G., Wang, Z.Y., Chen, S.J., Chen, Z. (2001). Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 20, 7146-53.
- Zhu, Q., Zhang, J.W., Zhu, H.Q., Shen, Y.L., Flexor, M., Jia, P.M., Yu, Y., Cai, X., Waxman, S., Lanotte, M., Chen, S.J., Chen, Z., Tong, J.H. (2001). Synergic effects of arsenic trioxide and cAMP during acute promyelocytic leukemia cell maturation subtends a novel signaling cross-talk. *Blood* 99, 1014-22.

G Anhang

G.1 Abkürzungen

8-Br-cAMP	8-Bromoadenosine 3'-5'-Cyclic Monophosphat
A260/280	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
AP1	Aktivator Protein 1
APL	Akute promyelozytäre Leukämie
ATF 2	Activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
Bcr-abl	Break point cluster region-Abelson-Leukämie-Virus-Homolog
BSA	Bovin serumalbumin
cAMP	cyclic Adenosin-Mono-Phosphat
ChOP	CCAAT/enhancer binding homologous protein
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CRE	cAMP-response element
DAF	Diaminoflouren
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/RNA	Desoxyribonukleinsäure/Ribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemielumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EGF	Epidermal growth factor
egr-1	Early growth response-1-Gen
Egr-1	Early growth response-1-Transkriptionsfaktor
Epo	Erythropoetin
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
Grb2	Growth-factor receptor-bound-protein 2
Hsp27	Heat shock protein 27
IL	Interleukin
JNK	c-jun N-terminale Kinase
MAPK (-K-K)	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (-kinase-kinase)
MEK	MAPK/ERK Kinase

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PBS	Phosphat-buffered saline
PD 98059	2'-Amino-3'-methoxyflavon
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PVDF	Poly-vinylidenfluorid
RIPA-puffer	Radioimmunoprecipitationassay-puffer
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SB 203580	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRE	serum response element
SRF	Serum Response Faktor
TBS	Tris-buffered saline
TCF	Ternärkomplexfaktor
TPA	o-Tetradecanoylphosphat
UO126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien)

Danksagung

Ich danke sehr herzlich dem Direktor der Abteilung für Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Herrn Prof. Dr. H. Marquardt, dass er es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit im Bereich der Toxikologie und Signaltransduktion anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. A. Schaefer danke ich sehr herzlich, insbesondere für sein ständig offenes Ohr den kleinen und großen Probleme in Labor gegenüber. Bedanken möchte mich auch für sein Verständnis, seine Geduld sowie für seine freundliche und kreative Diskussionsbereitschaft.

Für das Korrekturlesen und die Unterstützung dieser Arbeit danke ich Annegret Ruge, Jana Henessen, Angelika Piasecki, Dr. Roquelina Beldarrain, Dr. Leticia Oliveira, Monika Fritz, Eduardo García, Michael Hong und Edward Harris. Nicht zuletzt danke ich Carola Grimm sehr herzlich für seine Unterstützung sowie für seine fachüberreifende Hilfsbereitschaft

Mis mas sinceros agradecimientos a mis padres, los cuales con su gran amor y apoyo han hecho posible que haya llegado hasta aqui. A mi padre por su ternura y amor sin limites. A mi mamita por la fuerza, el optimismo y el aporte de sus ideas y su experiencia.

Mi agradecimiento muy especial a mi esposo Ricardo Alvarez, gracias por tu apoyo incondicional, tu carino y tu amor. Gracias por ayudarme a sonreir a pesar de todo el cansancio y la tristeza. Gracias por estar simplemente ahi, siempre.

Gracias a mi Paolo por recordarme dia a dia que la vida tiene color, gracias por recordarme que porque él existe merece la pena seguir luchando y por sobre todo seguir viviendo.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Yoandra Ramirez

Anschrift: Reesestrasse 5
22083 Hamburg
Tel. (040) 434567

Geburtsdatum/-Ort: 12.11.1972 in Havanna, Kuba

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: kubanisch

Bildungsweg

Schulischer Bildungsweg

09/77-07/84 Grundschohle Pedro Maria, Havanna

09/84-07/90 Vladimir Ilich Lenin-Gymnasium und Abitur, Havanna

Studium

09/91-07/94 Studium der Biochemie, Universität Havanna, Kuba (kein Abschluss)

10/96-11/01 Studium der Chemie, Universität Hamburg

11/01– 15/05 Dissertation, durchgeführt im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. A. Schaefer, Universität Hamburg
Thema: Wirkung von Arsenit auf die MAP-Kinase-Kaskaden vermittelte Genexpression und auf die erythroide Differenzierung in Leukämiezellen

Beruflicher Werdegang / Lehrtätigkeiten:

12/98-02/99	Assistentin des Physikalische Chemie Praktikums für Medizinstudenten, Universität Hamburg
12/99-02/00	Assistentin des Chemie Praktikums für Medizinstudenten, Universität Hamburg
11/01-09/02	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projektes, Universität Hamburg
10/02-06/05	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen eines von Philips Morris geförderten Projektes, Umweltmedizin Hamburg e.V

Sprachkenntnisse

Spanisch und Englisch

Zusatzqualifikationen

Umfangreiche Kenntnisse im MS Office (Word, Excel, Power Point)

Veröffentlichungen

Schaefer A, Kósa F, Bittorf T, Magócsi M, Rosche A, Ramirez-Chavez Y, Marotzki S, Marquardt H; Opposite effects of inhibitors of mitogen-activated protein kinase pathways on the egr-1 and beta-globin expression in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. Cell Signal. 2004 Feb;16(2):223-34.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen außer den angegebenen Hilfsmitteln verwendet habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingerichtet habe.

Hamburg, November 2005