

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin des  
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

Direktor: Prof. Dr. R. Schneppenheim

**Einfluss von Arsentrioxid und L-S-Buthionin-Sulfoximin  
auf Neuroblastomzellen in vitro**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Sarah Bauer  
aus Nürnberg

Hamburg, 2008

Angenommen von der medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 01.04.2009

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Erttmann  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. N. Kröger  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. W. Fiedler

Den Eltern gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b>	<b>6</b>
<b>A. HYPOTHESE</b>	<b>7</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
1.1 WARUM WERDEN NEUE THERAPIEANSÄTZE BEIM NEUROBLASTOM BENÖTIGT?	8
1.2 ARSENTRIOXID – BISHERIGER EINSATZ IN DER MEDIZIN	11
1.3 ARSENTRIOXID - EIN GEEIGNETES MEDIKAMENT ZUR BEHANDLUNG DES NEUROBLASTOMS?	12
<b>2. MATERIAL</b>	<b>14</b>
2.1 SUBSTANZEN	14
2.2 REAGENZIEN UND HILFSMITTEL	14
2.3 GERÄTE	15
2.4 ZELL-LINIEN	15
<b>3. METHODEN</b>	<b>17</b>
3.1 ZELL-KULTIVIERUNG	17
3.2 PROLIFERATIONSASSAY	17
3.2.1 DOSIS/WIRKUNGSBEZIEHUNG ARSENTRIOXID	17
3.2.2 ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID UNTER EINFLUSS VON BUTHIONIN-SULFOXIMIN	20
3.2.3 KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES EINFLUSSES VON BSO AUF DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID	20
3.3 GLUTATHION-ASSAY	20
3.3.1 BESTIMMUNG DER BASALEN GLUTATHIONKONZENTRATION	22
3.3.2 BESTIMMUNG DER GLUTATHIONKONZENTRATION UNTER EINFLUSS VON BSO	22
3.3.3 BESTIMMUNG DER GLUTATHIONKONZENTRATION IN ABHÄNGIGKEIT DER BSO-KONZENTRATIONEN	23
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>24</b>
4.1 ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID	24
4.1.1 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE LA-N-1	24
4.1.2 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE LA-N-5	25
4.1.3 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE HSJD	26
4.1.4 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE SH-SY5Y	27
4.1.5 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE LS	28
4.1.6 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE MDA-MB-231	29
4.1.7 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE MEWO	30
4.1.8 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE HT-29	31
4.1.9 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE HL-60	32
4.1.10 EINFLUSS VON ARSENTRIOXID AUF DIE ZELL-LINIE HEP-G2	33

4.1.11	ZUSAMMENFASSUNG DER ZYTOTOXISCHEN WIRKUNG VON ARSENTRIOXID	34
<b>4.2</b>	<b>INTRAZELLULÄRE GLUTATHIONKONZENTRATION VS. ZYTOTOXIZITÄT VON ARSENTRIOXID</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>EINFLUSS VON BSO AUF DIE INTRAZELLULÄRE GLUTATHIONKONZENTRATION</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>EINFLUSS VON BSO AUF DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID</b>	<b>37</b>
4.5	KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES EINFLUSSES VON BSO AUF DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID	38
4.5.1	KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES EINFLUSSES VON BSO AUF DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID BEI LA-N-1	38
4.5.2	KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES EINFLUSSES VON BSO AUF DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID BEI LS	39
4.5.3	KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES EINFLUSSES VON BSO AUF DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID BEI MDA-MB-231	40
4.5.4	KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES EINFLUSSES VON BSO AUF DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID BEI HL-60	41
<b>4.6</b>	<b>ABHÄNGIGKEIT DER GLUTATHIONKONZENTRATION VON DER BSO-KONZENTRATION</b>	<b>42</b>
<b>4.7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS GLUTATHIONBESTIMMUNG UND PROLIFERATIONSASSAY MIT BSO</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>DISKUSSION DER METHODEN</b>	<b>45</b>
5.1.1	MTT-ASSAY	45
5.1.2	GLUTATHION-ASSAY	46
<b>5.2</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
5.2.1	ARSENTRIOXID	47
5.2.2	GLUTATHION	59
5.2.3	BUTHIONIN-SULFOXIMIN	63
5.2.4	ZUSAMMENFASSUNG	68
5.2.5	AUSBLICK / PERSPEKTIVEN	69
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>92</b>
<b>10.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>93</b>

## I. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APL	akute Promyelozytenleukämie
AT	Arsentrioxid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSO	Buthionin-Sulfoxinim
°C	Grad Celsius
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
EBRT	external beam radiation therapy
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetal calf serum
ID50	inhibition dose 50
INSS	International Neuroblastoma Staging System
M	molar = Mol pro Liter
MIBG	Methyljodbenzylguanidin
MRP	Multidrug Resistance associated Protein
MTT-Test	Zytotoxizitäts-Test (MTT= 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
μ	mikro
n	Anzahl der Versuche
nm	nanometer
PBS	phosphate buffered saline
ROS	reactive oxygen spezies
RPMI	Zellkulturmedium, am <b>Roswell Park Memorial Institute</b> entwickelt
SD	Standard deviation = Standardabweichung
Tab(b).	Tabelle(n)
U/min.	Umdrehungen pro Minute
Vgl.	vergleiche
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **A. Hypothese:**

Das bisher bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL) erfolgreich eingesetzte Medikament Arsenitrioxid entfaltet seine zytotoxische Wirkung über die Bildung von Oxyradikalen (ROS = reaktive oxygen spezies).

Katecholaminproduzierende Neuroblastomzellen stehen unter einem hohen Oxyradikaldruck. Entsprechend ist eine reduzierte Kapazität ihres antioxidativen Systems und daher eine hohe Sensitivität für die Wirkung von Arsenitrioxid zu erwarten.

Buthionin-Sulfoximin (BSO) senkt als Inhibitor der Gamma-Glutamylcystein-Synthetase den intrazellulären Glutathiongehalt und kann somit mit Arsenitrioxid einen additiven zytotoxischen Effekt entfalten oder als Chemosensitizer an Tumorzellen mit glutathionbedingter Resistenz gegen Arsenitrioxid wirken.

## **1. Einleitung**

### **1.1 Warum werden neue Therapieansätze beim Neuroblastom benötigt?**

Neuroblastome sind maligne Tumoren des sympathischen Nervensystems embryonalen Ursprungs und die häufigsten extrakraniellen soliden Tumoren im Kindesalter (8% aller Malignome laut Kinderkrebsregister Mainz, Jahresbericht 2004). Da sie embryonalen Ursprungs sind, ist ihr Auftreten auf das frühe Kindesalter konzentriert. Die Prävalenz liegt bei 1/7000 Lebendgeburten, das mediane Alter liegt bei 22 Monaten, 97% aller Erkrankten sind jünger als 10 Jahre. Neuroblastome weisen mannigfaltige Lokalisationen auf, da sie überall dort auftreten können, wo sich sympathisches Gewebe befindet (Nebennieren, zervikaler, thorakaler und abdomineller Grenzstrang, Paraganglien). Etwa die Hälfte aller Neuroblastome ist bei Diagnosestellung bereits metastasiert. Metastasen werden in regionalen und entfernten Lymphknoten, Knochenmark, Knochen, Leber oder Haut beobachtet, seltener im ZNS, höchst selten in der Lunge. Symptome variieren je nach Ort des Primärtumors bzw. der Metastasen. Etwa 90 bis 95% der Neuroblastome produzieren Katecholamine, was zu einem Anstieg der Metaboliten im Urin führt und als Diagnosekriterium herangezogen wird. Die Stadieneinteilung erfolgt nach den INSS-Kriterien (International Neuroblastoma Staging System, Brodeur et al. 1993), die auf klinischen, radiologischen und chirurgischen Befunden basieren. Man unterscheidet die Stadien 1 bis 4 und 4S (siehe Tabelle 1). In Stadium 1 und 2 ist der Tumor lokalisiert und überschreitet nicht die Mittellinie, die im Stadium 3 überschritten wird, in Stadium 4 ist der Tumor disseminiert. Stadium 4S ist eine Sonderform. Hierbei ist der Primärtumor lokalisiert entsprechend den Stadien 1 und 2, allerdings besteht eine Metastasierung ausschließlich in Leber, Haut oder Knochenmark. Dieses Stadium wird insbesondere bei Säuglingen beobachtet und hat eine gute Prognose.



Stage	Definition
1	Localized tumor with complete gross excision, with or without microscopic residual disease; representative ipsilateral lymph nodes negative for tumor microscopically (nodes attached to and removed with the primary tumor may be positive).
2A	Localized tumor with incomplete gross excision; representative ipsilateral nonadherent lymph nodes negative for tumor microscopically.
2B	Localized tumor with or without complete gross excision, with ipsilateral nonadherent lymph nodes positive for tumor. Enlarged contralateral lymph nodes must be negative microscopically.
3	Unresectable unilateral tumor infiltrating across the midline,* with or without regional lymph node involvement; or localized unilateral tumor with contralateral regional lymph node involvement; or midline tumor with bilateral extension by infiltration (unresectable) or by lymph node involvement.
4	Any primary tumor with dissemination to distant lymph nodes, bone, bone marrow, liver, skin and/or other organs (except as defined for stage 4S).
4S	Localized primary tumor (as defined for stage 1, 2A or 2B), with dissemination limited to skin, liver, and/or bone marrow† (limited to infants < 1 year of age).

Tab. 1: INSS-Stadieneinteilung beim Neuroblastom. (aus: Brodeur et al. (1993), J Clin Oncol, 11: 1466-1477)

Die Prognose ist zum einen stadienabhängig, zum anderen insbesondere bei Stadium 3 und 4 altersabhängig. Ungünstig erweist sich dabei das Auftreten bei Kindern über einem Jahr. Des Weiteren spielen molekulargenetische Faktoren eine bedeutende Rolle für die Prognose (MYCN-Onkogen-Amplifikation, Chromosom 1-p-Deletion) (Brodeur et al. 1997 in: Pizzo/Poplack, Principles and Practice of Pediatric Oncology). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate für alle Stadien liegt im Mittel bei 78% (laut Kinderkrebsregister Mainz, Jahresbericht 2004). In den Stadien 1 bis 3 und 4S ist die Prognose sehr gut, während es bei Patienten im Stadium 4 trotz intensiver Therapie häufig zu Rezidiven kommt.

Es hat sich gezeigt, dass sich im Hinblick auf die Therapie die Einteilung in unterschiedliche Risikogruppen als sinnvoll erweist, wobei die Prognosefaktoren als therapiestratifizierende Marker dienen. Nach dem aktuellen Studienprotokoll der NB 2004 Studie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie wird in „low-risk“- „medium-risk“- und

„high-risk“-Gruppen unterteilt. Die „low-risk“-Gruppe umfasst Stadien 1, 2, das Stadium 3 unter zwei Jahren und das Stadium 4S jeweils ohne MYCN-Amplifikation bzw. 1-p-Deletion. In dieser Gruppe ist die Prognose nach alleiniger chirurgischer Entfernung des Primärtumors auch bei Vorliegen eines Residualtumors mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 97% (Studiendaten NB 97-Studie in: Studienprotokoll NB 2004) exzellent. Diese Patienten werden daher nach dem aktuellen Studienprotokoll ausschließlich chirurgisch behandelt. Die „medium-risk“-Gruppe umfasst Stadien 2, 3 ohne MYCN-Amplifikation aber mit 1-p-Deletion, Stadium 3 über zwei Jahre ohne MYCN-Amplifikation bzw. 1-p-Deletion und Säuglinge im Stadium 4 ohne MYCN-Amplifikation. Diese Patienten werden nach chirurgischer (Teil-)Entfernung mit komplexer Chemotherapie gefolgt von 13-cis-Retinsäure behandelt. Die Drei-Jahres-Überlebensrate liegt bei dieser Gruppe bei 83% (Studiendaten NB 97-Studie in: Studienprotokoll NB 2004). Die „high-risk“-Gruppe umfasst Stadium 4 Patienten über ein Jahr oder Patienten aller Stadien mit MYCN-Amplifikation. Im aktuellen Studienprotokoll der NB 2004 Studie werden „high-risk“-Patienten nach chirurgischer Behandlung zunächst mit mehreren Zyklen Chemotherapie (zwei Zyklen Topotecan + Cyclophosphamid + Etoposid; drei Zyklen Cisplatin + Etoposid + Vindesin; drei Zyklen Vincristin + Dacarbacin + Ifosfamid + Doxorubicin) und ggf. MIBG-Radiotherapie<sup>1</sup> unterstützt von Megatherapie (Melphalan + Carboplatin + Etoposid hochdosiert gefolgt von autologer Stammzelltransplantation), gefolgt von neun Zyklen 13-cis-Retinsäure und EBRT<sup>2</sup> behandelt. Durch diese intensive Therapie, die mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen kann, konnte in den letzten Jahren die Prognose zwar verbessert werden (Fünf-Jahres-Überlebensrate: 44%, Berthold et al. 2003 und 2005), dennoch erleidet - wie bereits erwähnt – ein großer Teil der Patienten einen Rückfall (Fünf-Jahres-rückfallfreies-Überleben: 33%, Berthold et al. 2003 und 2005) und konsekutiv ein Fortschreiten der Erkrankung, die für eine weitere Therapie refraktär ist. Ein wesentlicher Faktor für das Therapieversagen ist die Entwicklung einer Resistenz gegen verschiedene funktionell unabhängige Zytostatika (Keshelava et al. 1998). Aufgrund dessen

---

<sup>1</sup> Radioaktiv markiertes Methyljodbenzylguanidin (MIBG) lagert sich hauptsächlich an Neuroblastomzellen an. Die radioaktive Dosis wird dabei so hoch gewählt, dass die Tumorzellen durch die Anreicherung von MIBG im Tumorgewebe zerstört werden.

<sup>2</sup> Externe Bestrahlung (External Beam Radiation Therapy)

ist es erforderlich, neue alternative Therapiemöglichkeiten insbesondere für die „high-risk“-Neuroblastom-Patienten zu entwickeln.

## **1.2 Arsentrioxid – bisheriger Einsatz in der Medizin**

Arsentrioxid ist ein bereits seit Jahrhunderten bekanntes Medikament. Hippokrates nutzte arsensulfidhaltige Salben (Realgar, Orpiment), um Ulzera zu behandeln. Im 18. und 19. Jahrhundert wurden Arsenverbindungen bei zahlreichen Erkrankungen angewandt. Sie wurden unter anderem als Antipyretikum, Antiseptikum, Antiplasmodikum, Enthaarungsmittel, Sedativum und Tonikum eingesetzt. Eine von Thomas Fowler im 18. Jahrhundert entwickelte Lösung aus Arsentrioxid in Kaliumbikarbonat (Fowler's Solution) kam bei Asthma, Chorea, Ekzemen, Pemphigus, Psoriasis, Anämie, M. Hodgkin und Leukämie zum Einsatz. Noch bis ins 20. Jahrhundert war Arsentrioxid das Medikament zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie.

Paul Ehrlich nutzte Arsenderivate zur Behandlung von Infektionen. Seine 1909 entwickelte auf Arsentrioxid basierende Zubereitung Salvarsan (auch bekannt als „Magic Bullet,“ oder „compound 606“) hatte einen relativ selektiven anti-sporochätären Effekt und wurde zur Behandlung der Syphilis eingesetzt. Organische Arsenikzubereitungen wurden und werden noch heute zur Behandlung der Trypanosomiasis eingesetzt (Waxman et al. 2001). Mit der Entwicklung der modernen Pharmakologie geriet Arsentrioxid allerdings in der westlichen Medizin ab dem 20. Jahrhundert als potenzielles Medikament mehr und mehr in Vergessenheit.

In der Traditionellen Chinesischen Medizin ist Arsen seit Jahrhunderten ein Bestandteil in der Behandlung von Zahnerkrankungen, Psoriasis, rheumatischen Erkrankungen und Syphilis. Arsentrioxid taucht bereits im „Compendium of Materia Medica“ von Li Shizhen aus dem 16. Jahrhundert auf (Zhang TD et al. 2001). So ist es nicht verwunderlich, dass Studien aus China an der Harbin Medical University in den 1970er Jahren zur Wiederentdeckung von Arsentrioxid zur Behandlung der Leukämie, speziell der akuten

Promyelozytenleukämie (APL) führten (Zhang TD et al. 1984 bzw. 2001). Aufgrund der durchgehend guten Ergebnisse in weiteren klinischen Studien aus China und den USA, bei denen sich herausstellte, dass niedrige Dosen Arsentrioxid eine komplette Remission bei minimaler Toxizität herbeiführen können, ist es seit September 2000 für die Behandlung der rezidivierten oder refraktären APL durch die US Food and Drug Administration zugelassen, was das Interesse an diesem Medikament auch in der westlichen Medizin wieder geweckt hat.

### **1.3 Arsentrioxid - ein geeignetes Medikament zur Behandlung des Neuroblastoms?**

Verschiedene präklinische Studien haben sich mit den Wirkmechanismen Arsentrioxids befasst. An APL-Zellen wurde nachgewiesen, dass ein entscheidender Wirkmechanismus die Bildung von Oxyradikalen (ROS = reactive oxygen species) ist, die wiederum über die Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmembran die Apoptose induzieren können (Jing et al 1999). Da der Großteil der Neuroblastomzellen - wie bereits erwähnt - Katecholamine produziert, die über Autooxidation ebenfalls zu einer Erhöhung von intrazellulären ROS und somit zu einer reduzierten Kapazität ihres antioxidativen Systems führen, ist die Anwendung von Arsentrioxid gerade beim Neuroblastom vielversprechend.

Ein entscheidender Bestandteil des antioxidativen Systems ist das Glutathion. Es wurde bereits gezeigt, dass für Arsentrioxid empfindliche APL-Zellen einen niedrigeren intrazellulären Gehalt an Glutathion aufwiesen als resistente Zellen (Jing et al. 1999). Neuroblastomzellen dürften aufgrund der bei der Katecholaminsynthese entstehenden ROS ein bereits stark ausgelastetes antioxidatives System und damit einen geringeren Glutathiongehalt als andere Zellen aufweisen. Folglich müsste eine Korrelation zwischen Glutathiongehalt und Empfindlichkeit für Arsentrioxid bestehen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass in vorausgegangenen Arbeiten ein zytotoxischer Effekt durch Arsentrioxid an Neuroblastomzellen in vitro bereits nachgewiesen wurde und dieser eine Abhängigkeit von der intrazellulären Glutathionkonzentration

zeigte (Akao et al.1999). Dies soll in der vorliegenden Arbeit an Neuroblastom- und anderen Tumorzellen hinterfragt werden.

Es konnte in vorherigen Arbeiten außerdem gezeigt werden, dass BSO, ein spezifischer Inhibitor der Gamma-Glutamylcystein-Synthetase - dem entscheidenden Enzym in der Glutathionsynthese - die Empfindlichkeit für Arsenitoxid an APL-Zellen steigern konnte (Dai et al. 1999). Die vorliegende Arbeit soll vor diesem Hintergrund aufdecken, ob BSO in vitro einen additiven zytotoxischen Effekt auf die Wirkung von Arsenitoxid auf Neuroblastomzellen ausübt und somit über die Senkung des intrazellulären Glutathiongehalts als Chemosensitizer an Tumorzellen mit glutathionbedingter Resistenz gegen Arsenitoxid einsetzbar ist.

## 2. Material

### 2.1 Substanzen

- Arsentrioxid (Trisenox; 1mg/ml; Fa. Cell Therapeutics, Seattle)

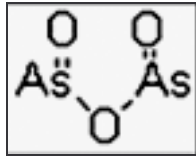


Abb.1: Arsentrioxid (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): Strukturformel; Molgewicht: 197.8 g/mol)

- Buthionin-Sulfoximin (BSO, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

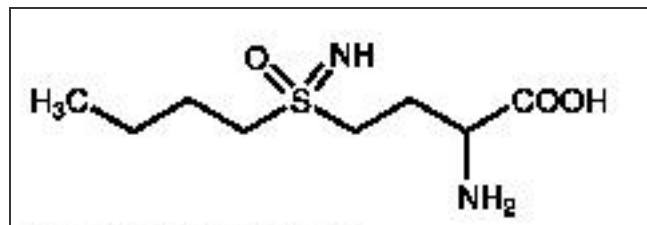


Abb.2: BSO: Strukturformel; Molgewicht: 222,3g/mol

### 2.2 Reagenzien und Hilfsmittel

- 96-Well-Platten (Nunclon Surface, Fa. Nunc, Roskilde, DK)
- 6-Well-Platten (Nunclon Surface, Fa. Nunc, Roskilde, DK)
- Kunststoff-Einmal-Küvetten
- Zellkulturflaschen (Cellstar: 661175, 175cm<sup>2</sup> und 658175, 75cm<sup>2</sup>; Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen)
- Nährmedium (RPMI 1640 + L-Glutamin, Fa. Gibco, Schottland; McCoy's 5A + L-Glutamin, Fa. Gibco, Schottland)
- Fetales Kälberserum (Fa. Gibco, Schottland, Katalog-Nr.: 10106-185)
- Penicillin-Streptomycin Sol. (Fa. Gibco, Schottland, Katalog-Nr.: 15140-122)
- Trypsin/EDTA (Fa. PAA, Pasching, ÖR, Katalog-Nr.: L11-004)
- MEM-Sodium-Pyruvat (Fa. Gibco, Schottland)
- Trypan Blau C.I.23850 (Fa. Serva, Heidelberg)

- Glutathion-Assay-Kit (Fa. Calbiochem, Katalog-Nr.: 354102)
- Glutathion, reduziert (GSH), Reinheit > 98% (Fa. Calbiochem, Katalog-Nr.: 3541)
- Metaphosphorsäure (MPA), Reinheit 33-37% (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Cell Titer 96 Non Radioactive Cell Proliferation Assay (Fa. Promega, USA, Katalog-Nr.: G5401)
- Aqua bidest (UKE, Hamburg)

### 2.3 Geräte

- Anthos ht-III-96-Well-Platten Reader (Fa. Anthos)
- Spektrophotometer
- Begasungsbrutschrank B5060 EK-CO2 (Fa. Heraeus, Hannover)
- Rotanta-96R-Zentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen)
- Eppendorf Centrifuge 5415 (Fa. Eppendorf)
- Sterilwerkbank Class II Type A/B3 (Fa. Nuaire, Plymouth, USA)
- Mikroskop 473010-9901 (Fa. Zeiss, Jena)
- Aufsichtmikroskop Wilovert A (Fa. Hund, Wetzlar)
- Kühl-Gefrier-Kombination KGE 3411 (Fa. Bosch)

### 2.4 Zell-Linien

Die Versuche wurden an folgenden Zell-Linien durchgeführt:

- **LA-N-1:** humanes Neuroblastom; 1977 R. C. Seeger, Children's Hospital Los Angeles
- **LA-N-5:** humanes Neuroblastom; 1977 R. C. Seeger, Children's Hospital Los Angeles
- **LS:** humanes Neuroblastom; Herkunft: abdominaler Tumor (Stadium III) eines 16 Monate alten Mädchens; 1989 G. Rudolph, Universität Tübingen, Deutschland

- **SH-SY5Y:** humanes Neuroblastom; Herkunft: klonale Unterlinie der Neuroepitheliom-Zell-Linie SK-N-SH (Knochenmarksbiopsie eines vierjährigen Mädchens mit metastasiertem Neuroblastom; 1970 Dr. J. Heikkilä, Universität Turku, Finnland)
- **HSJD:** humanes Neuroblastom; Herkunft: Knochenmarksbiopsie eines drei Jahre und neun Monate alten Mädchens mit knochenmarksinfiltriertem Neuroblastom; 2002 G. Looft, Universität Hamburg, Deutschland
- **HL-60:** humane akute myeloische Leukämie; Herkunft: peripheres Blut einer 35-jährigen Frau mit akuter myeloischer Leukämie (AML Fab M2), 1976 DMSZ. Die HL-60 wurde mittlerweile zwar unter Fab M2 eingeordnet (Dalton et al. 1988), weist aber in ihrem Reaktionsverhalten eher die Merkmale einer Promyelozytenleukämie (Fab M3) auf und kann daher als Referenz-Zell-Linie für die akute Promyelozytenleukämie angesehen werden.
- **MeWo:** humanes malignes Melanom; 1978 Prof. C. Grose
- **MDA-MB-231:** humanes Mammakarzinom; Herkunft: Primärtumor einer 51-jährigen Kaukasierin mit Mamma-Adenokarzinom; Cailleau (CLS)
- **HT-29:** humanes Kolon Karzinom; Herkunft: Primärtumor einer 44-jährigen Kaukasierin mit Kolon-Adenokarzinom; 1964 Dr. H.G. Drexler, DSMZ, Braunschweig, Deutschland
- **Hep-G2:** humanes hepatozelluläres Karzinom; Herkunft: Tumorgewebe eines 15-jährigen argentinischen Jungen mit hepatozellulärem Karzinom; 1975, ATCC, Rockville, Maryland, USA



### **3. Methoden**

#### **3.1 Zell-Kultivierung**

Die Kultivierung erfolgte in Kulturmedium bestehend aus RPMI bzw. McCoy's 5A + 1% Penicillin-Streptomycin + 1% Sodium-Pyruvat + 10% bzw. 20% fetalem Kälberserum bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kulturflaschen im Brutschrank. Das Medium wurde zweimal wöchentlich durch neues ersetzt. Abhängig von der Generationszeit der jeweiligen Zell-Linie erfolgte die „Ausdünnung“ der Zellen ein- bis zweimal wöchentlich. Dafür musste das gebrauchte Medium abdekantiert werden. Die Zellen wurden mit 10 ml RPMI ohne Zusätze gewaschen und dann mittels 5 ml Trypsin von der Flasche abgelöst. Das Ablösen wurde mit Hilfe des Aufsichtmikroskops kontrolliert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen mit 10 ml Kulturmedium aufgenommen, um den Zellverdau zu stoppen und bei 960 U/min. (130xg) für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 10 ml Kulturmedium aufgenommen und je nach Zelldichte anteilig erneut in mit 100 ml Kulturmedium gefüllte Zellkulturflaschen pipettiert.

#### **3.2 Proliferationsassay**

##### **3.2.1 Dosis/Wirkungsbeziehung Arsentrioxid**

Die Verdünnungsreihe für den Proliferationsassay wurde für jede Zell-Linie jeweils auf 96-Well-Platten angesetzt. Das Arsentrioxid wurde mit Kulturmedium auf die entsprechende Konzentration verdünnt, wovon 10 µl pro Well (von 100 µl Gesamtinhalt) eingesetzt wurden. Dabei lag die Endkonzentration zwischen 0,5 und 100 µM.

Die für den Assay einzusetzenden Zellen wurden stets in der logarithmischen Wachstumsphase abgeerntet. Dazu mussten sie von der Kulturflasche abgelöst werden. Dies erfolgte wie im Abschnitt Zell-Kultivierung beschrieben. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der homogenen Zellsuspension entnommen und mit 90 µl Trypan-blau gemischt. Hiervon wurden wiederum 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert, um die Zellen unter dem

Lichtmikroskop bei 125facher Vergrößerung auszuzählen. Inzwischen wurde die Zellsuspension bei 960 U/min. (130xg) zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abpipettiert und das Pellet erneut mit so viel Medium aufgenommen, dass eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml entstand. Von dieser Zellsuspension wurden 90 µl pro Well eingesetzt. Die Ansätze wurden für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei eine feuchte Kammer die Austrocknung verhinderte.

Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Zellzahl bzw. die metabolische Aktivität der verbliebenen intakten Zellen mittels MTT-Test (Cell-Titer 96, Promega) bestimmt. Dieser nutzt die Eigenschaft lebender Zellen, Tetrazolium-Salz in ein Formazan-Produkt umzuwandeln, welches photometrisch bei 570 nm in einem 96-Well-Platten-Reader gemessen werden kann. Dabei ist die Absorption direkt proportional zur verbliebenen Zellzahl. Gemäß Vorgaben des Herstellers wurden nach erfolgter Inkubation 15 µl „Dye Solution“ in jedes Well pipettiert und für vier Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Anschließend wurden pro Well 100 µl der „Stop Solution“ hinzugefügt. Nach wiederum zweistündiger Inkubation wurde der Inhalt der Wells mittels Multikanal-Pipette gemischt und anschließend die Absorption bei 570 nm im Anthos-Photometer gemessen. Anhand mit definierter Zellzahl bestückter Wells wurde eine Standardkurve ermittelt, mittels derer die Zellzahl bestimmt werden konnte.

Die graphische Darstellung des Proliferationsassays erfolgte anhand von Dosis-Wirkungskurven. Dabei wurden die Zellzahlen der arsen trioxidfreien Kontrollansätze als 100 Prozent definiert. Die Arsen trioxid-Konzentration, bei der die Zahl überlebender Zellen 50% der Kontrolle ausmacht (=ID<sub>50</sub>) ist Maß für die Wachstumshemmung. Sie ist bei sensitiven Zellen niedrig und entsprechend bei resistenten hoch.

Zur Kontrolle der mittels Photometer gemessenen Aktivitätswerte wurden Stichproben mit der herkömmlichen mikroskopischen Methode der Zellzählung gemacht. Der Ansatz dafür erfolgte auf Sechs-Well-Platten mit 2,5 ml Gesamtvolumen, wovon 250 µl in Kulturmedium gelöstes Arsen trioxid in definierter Konzentration und 2250 µl Zellsuspension waren. Die Ansätze wurden parallel

zu den Ansätzen auf den 96-Well-Platten für 48 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Zur Zellzahl-Bestimmung mussten die Zellen von der Platte abgelöst werden. Hierfür wurde das im Well befindliche Medium abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde jedes Well mit 2 ml RPMI ohne Zusätze gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin abgelöst und anschließend mit je 2 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 960 U/min. (130xg) für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 500 µl Kulturmedium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl mit 90 µl Trypan-blau gemischt. Davon wurden wiederum 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und mit dem Mikroskop bei 10facher Vergrößerung ausgezählt. Es zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen aus dem MTT-Assay und der herkömmlichen Methode (siehe Abb. 3).

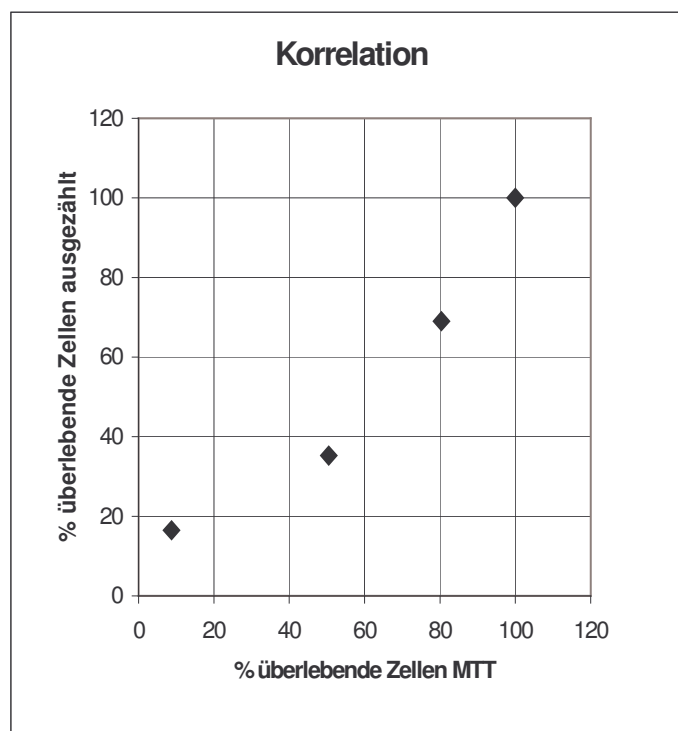


Abb. 3: Korrelation: Darstellung der Korrelation zwischen herkömmlicher Zellzählung mittels Trypan-blau-Färbung (Ordinate) und dem MTT (Abszisse) anhand von vier Stichproben (hier der Melanom-Zell-Linie MeWo). Die arsenitoxidfreie Kontrolle entspricht bei beiden Methoden jeweils 100%. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,9873.

### 3.2.2 Zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid unter dem Einfluss von BSO

Dieser Proliferationsassay wurde wie in 3.2.1 beschrieben durchgeführt, allerdings unter dem Einfluss folgender Substanzen:

- nur Arsentrioxid in Höhe der Konzentration der jeweiligen ID 50:  
LA-N-1: 3,5  $\mu\text{M}$ ; LA-N-5: 4  $\mu\text{M}$ ; LS: 15  $\mu\text{M}$ ; SH-SY5Y: 4  $\mu\text{M}$ ;  
HSJD: 4,5  $\mu\text{M}$ ; HT-29: 5  $\mu\text{M}$ ; MeWo: 5  $\mu\text{M}$ ; MDA-MB-231: 12,5  $\mu\text{M}$ ;  
Hep-G2: 8  $\mu\text{M}$ ; HL-60: 2  $\mu\text{M}$
- nur BSO [100  $\mu\text{M}$ ]
- BSO [100  $\mu\text{M}$ ] + Arsentrioxid [ID 50]

Das BSO wurde vor dem Hinzugeben in Medium gelöst und auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Zusatz angelegt.

### 3.2.3 Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid

Die Durchführung erfolgte gemäß 3.2.1, allerdings wurde eine Verdünnungsreihe mit BSO (Konzentrationen zwischen 0,1 und 600  $\mu\text{M}$ ) angesetzt. Jedem Well wurde zusätzlich Arsentrioxid in der Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  zugegeben. Hierfür wurden BSO und Arsentrioxid jeweils in 10  $\mu\text{l}$  Medium in entsprechender Konzentration gelöst und in jedes Well vorgelegt. Anschließend wurden 80  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit einer Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml dazu pipettiert. Auch hierbei wurden Kontrollen unter Zusatz von ausschließlich 2  $\mu\text{l}$  Arsentrioxid angelegt.

### 3.3 Glutathion-Assay

Die Bestimmung der Glutathionkonzentration erfolgt mittels eines kommerziell erhältlichen „Glutathione Assay Kit“. Bei dieser Methode bindet 4-Chloro-1-Methyl-7-Trifluoromethyl-Quinolinium-Methylsulfat (Reagenz 1) an die SH-

Gruppe von Merkaptanen. Anschließend vermittelt 30% NaOH (Reagenz 2) spezifisch die Umwandlung der mit Glutathion substituierten Reaktionsprodukte in ein chromophores Thion mit einer maximalen Absorption von 400 nm. Vor der eigentlichen Bestimmung der Glutathionkonzentration wurde eine Standardkurve erstellt. Hierfür wurden neun Proben mit einer definierten Glutathionkonzentration (0; 5; 7,5; 10; 20; 40; 60; 80; 100  $\mu\text{M}$ ) angesetzt. Dafür wurde das Glutathion mittels gelöster Metaphosphorsäure (MPS: 5g in 100 ml Wasser) auf eine Konzentration von 0,5 mM verdünnt und mit dem Puffer aus dem Kit auf die obigen Konzentrationen weiter verdünnt (insgesamt 900  $\mu\text{l}$ ). Anschließend wurden zunächst Reagenz 1, dann Reagenz 2 hinzu pipettiert (jeweils 50  $\mu\text{l}$ ), gemischt und für 10 Minuten im Dunkeln bei  $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Absorption der jeweiligen Glutathionkonzentration wurde bei 400 nm in 1-ml-Kunststoff-Einmalküvetten im Spektrophotometer bestimmt.

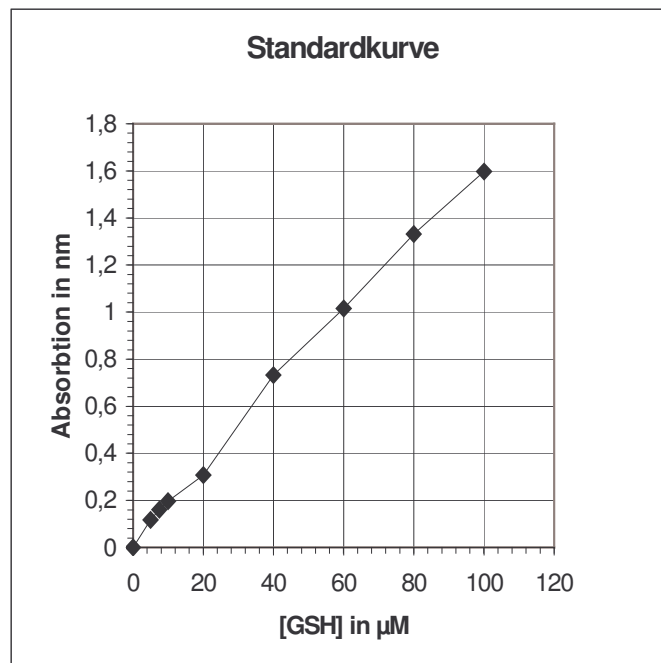


Abb. 4: Standardkurve: Darstellung der glutathionbedingten Absorption (Ordinate) bei 400 nm in Relation zur Glutathionkonzentration (Abszisse). Diese wurde vor der Messung in definierter Höhe angelegt. Die Kurve zeigt ziemlich genau eine lineare Gerade durch die Messpunkte.

### **3.3.1 Bestimmung der basalen Glutathionkonzentration pro Zell-Linie**

Für den Glutathion-Assay wurden die Zellen der unterschiedlichen Zell-Linien in jeweils gleicher Zellzahl eingesetzt. Dafür wurde nach Ablösen der Zellen die Zahl der intakten Zellen nach Typanblau-Färbung unter dem Mikroskop mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die eingesetzte Zellzahl lag zwischen  $3 \times 10^6$  und  $3 \times 10^7$  Zellen je nach Zell-Linie.

Die Zellen wurden dann in 500  $\mu$ l MPS aufgelöst und anschließend für 10 Minuten bei 3000xg und 4°C zentrifugiert. Von dem klaren Überstand wurden je nach Versuch zwischen 140 und 300  $\mu$ l für die Glutathion-Bestimmung eingesetzt. Die Probe wurde auf 900  $\mu$ l Endvolumen mit Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde je 50  $\mu$ l des Reagenz 1, dann 50  $\mu$ l des Reagenz 2 dazu pipettiert und gut gemischt. Der gesamte Ansatz erfolgte bei 4°C im Eiswasser.

Nach Zugabe des Reagenz 2 wurden die Proben bei  $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$  für mindestens zehn Minuten und höchstens eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 400 nm im Spektrophotometer gemessen. Hierfür wurden 1-ml-Kunststoff-Einmalküvetten verwendet. Mittels der Standardkurve wurde die Glutathionkonzentration in  $\mu\text{M}/10^6$  Zellen abgelesen.

### **3.3.2 Bestimmung der Glutathionkonzentration unter Einfluss von BSO**

Die Bestimmung der Glutathionkonzentration erfolgte wie in 3.3 beschrieben, allerdings wurden die Zellen zuvor für 48 Stunden mit BSO (100  $\mu\text{M}$ ) in 50 ml-Zellkulturflaschen (20 ml Kulturmedium) inkubiert. Es erfolgte eine Kontrolle ohne Zusatz.

### **3.3.3 Bestimmung der Glutathionkonzentration in Abhängigkeit der BSO-Konzentration**

Die Bestimmung der Glutathionkonzentration erfolgte ebenfalls wie in 3.3.1 beschrieben mit folgenden Änderungen:

- a) Die eingesetzten Zellen wurden zuvor für 48 Stunden unter Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen BSO (0,25; 0,5; 5,0; 50  $\mu\text{M}$ ) in 250 ml-Zellkulturflaschen (75 ml Kulturmedium) inkubiert.
- b) Die für die Glutathion-Bestimmung eingesetzte Zellzahl lag je nach Zell-Linie zwischen  $1 \times 10^6$  und  $3 \times 10^7$  Zellen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid

#### 4.1.1 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie LA-N-1

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 0,5; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 7,5; 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Neuroblastom-Zell-Linie LA-N-1 eine **ID50** von **2,8  $\mu\text{M}$** . Der Varianzkoeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 6,5; 8,1; 11,9; 14,5; 6,0; 7,1; 4,6; 14,3 und 23,5%.

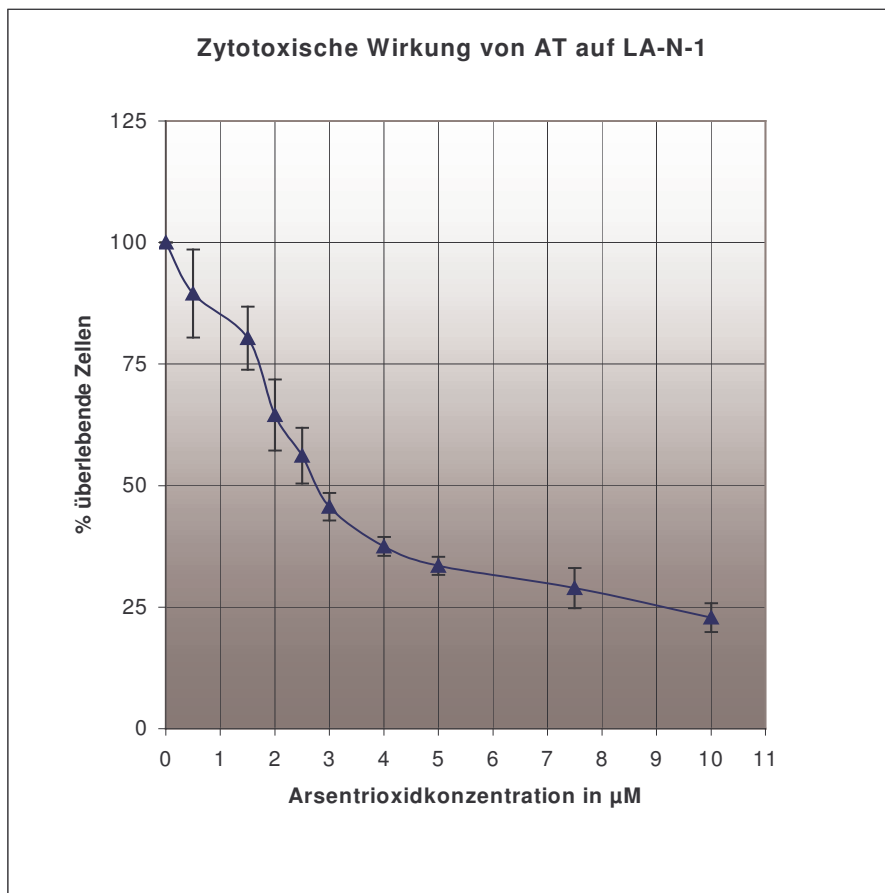


Abb. 5: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48 Stunden Inkubationszeit der Neuroblastom-Zell-Linie LA-N-1. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelationskoeffizient bei 0,971 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.



#### 4.1.2 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie LA-N-5

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 0,5; 1; 2; 2,5; 3,5; 4; 5 und 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Neuroblastom-Zell-Linie LA-N-5 eine **ID50** von **4  $\mu\text{M}$** . Der Varianzkoeffizient aus n=12 Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 8,9; 6,1; 9,4; 10,8; 10,8; 21,1; 18,5 und 13,4%.

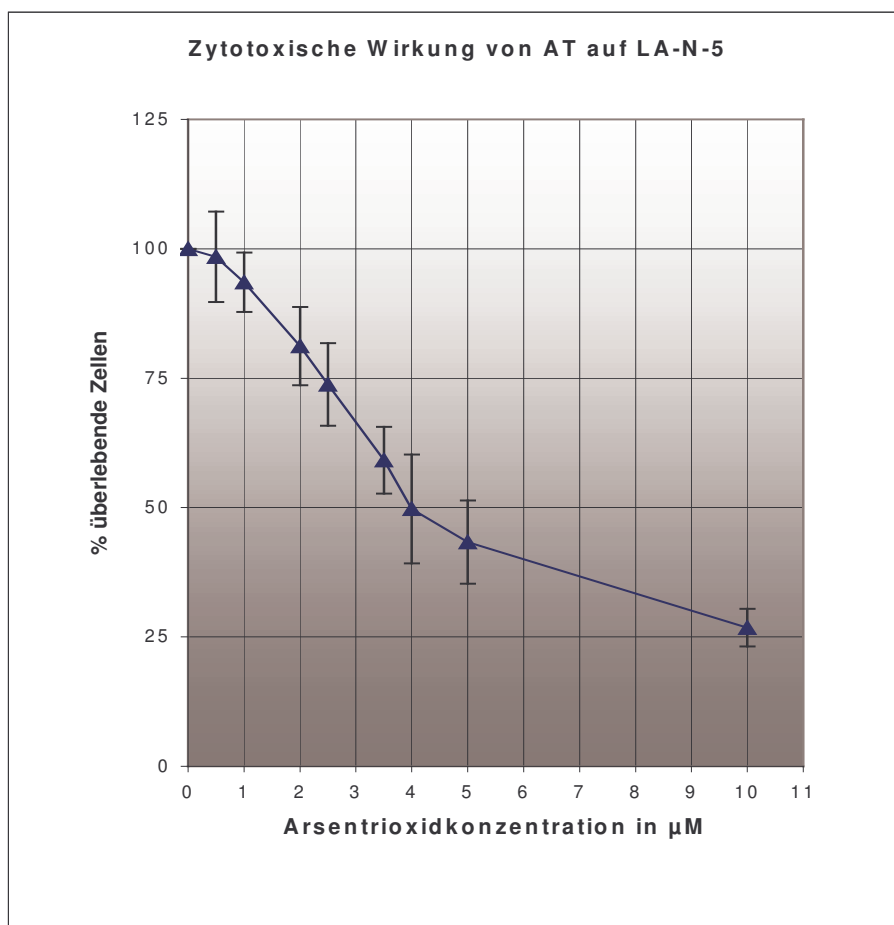


Abb. 6: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der Neuroblastom-Zell-Linie LA-N-5. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelations-Koeffizient bei 0,955 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.

### 4.1.3 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie HSJD

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 10 und 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Neuroblastom-Zell-Linie HSJD eine **ID50** von **5  $\mu\text{M}$** . Der Varianzkoeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 9,8; 8,7; 15,1; 15,4; 14,9; 25,2; 30,0; 27,4; 28,0 und 29,0%.

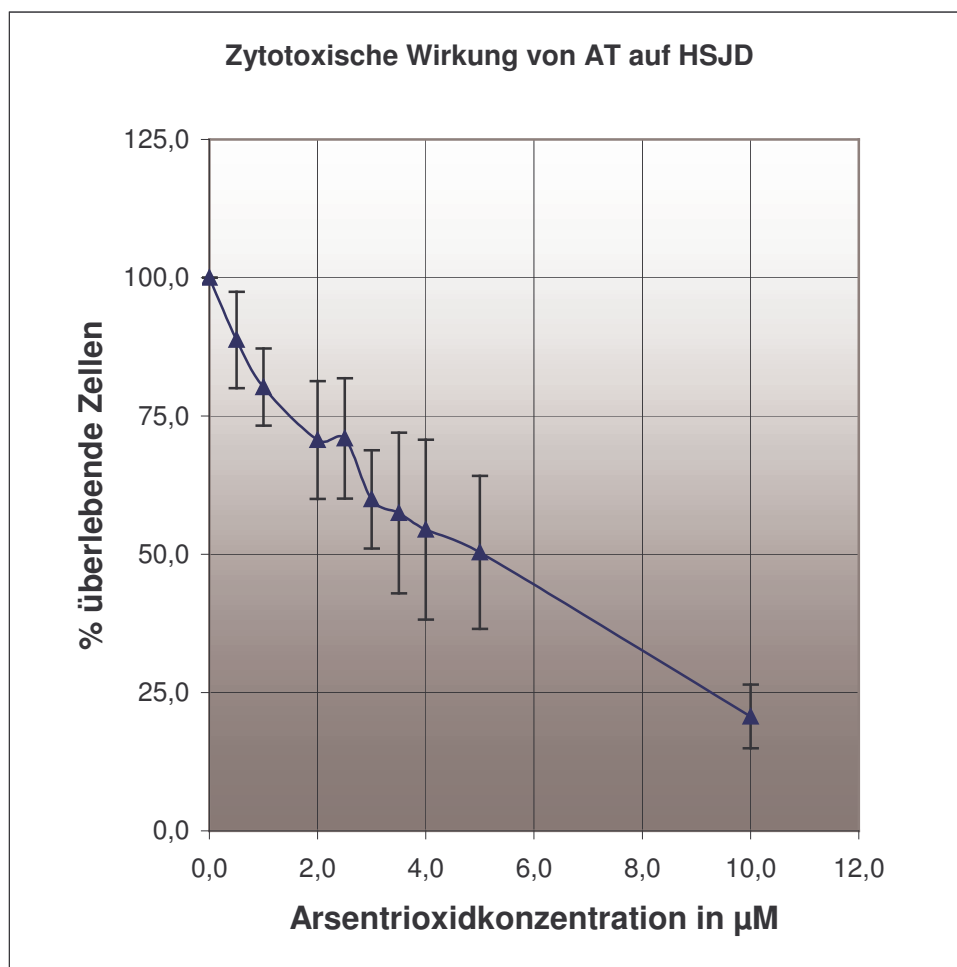


Abb. 7: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der Neuroblastom-Zell-Linie HSJD. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelations-Koeffizient bei 0,906 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.

#### 4.1.4 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie SH-SY5Y

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 7,5 und 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Neuroblastom-Zell-Linie SH-SY5Y eine **ID50** von **5,25  $\mu\text{M}$** . Der Varianz-Koeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 6,2; 7,5; 4,7; 8,2; 4,7; 7,1; 9,9; 4,9; 8,8; 5,0 und 16,1%.

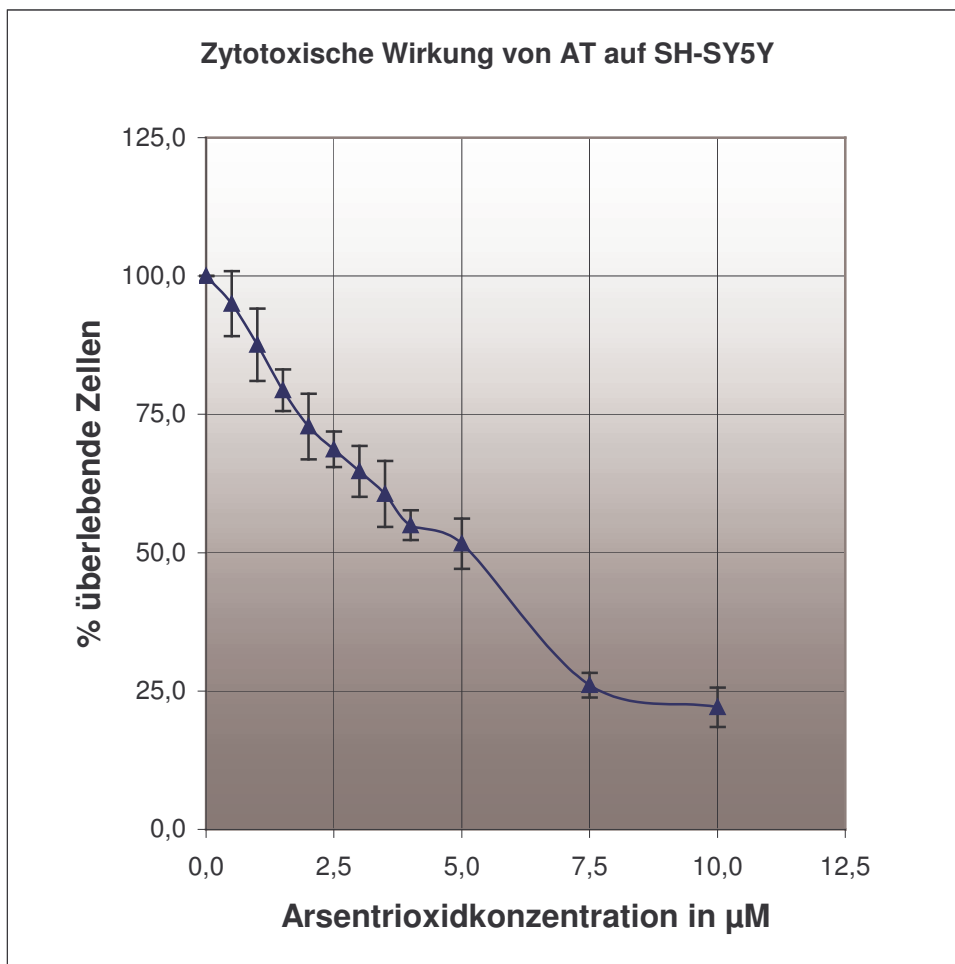


Abb. 8: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der Neuroblastom-Zell-Linie SH-SY5Y. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelations-Koeffizient bei 0,974 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.

#### 4.1.5 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie LS

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 0,5; 1,5; 2,5; 5; 6; 7,5; 10; 11; 12; 15; 17,5; 20 und 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Neuroblastom-Zell-Linie LS eine **ID50** von **15  $\mu\text{M}$** . Der Varianz-Koeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 8,9; 4,8; 11,8; 13,6; 11,6; 7,3; 12,4; 10,6; 21,9; 22,2; 22,6 und 13,6%.

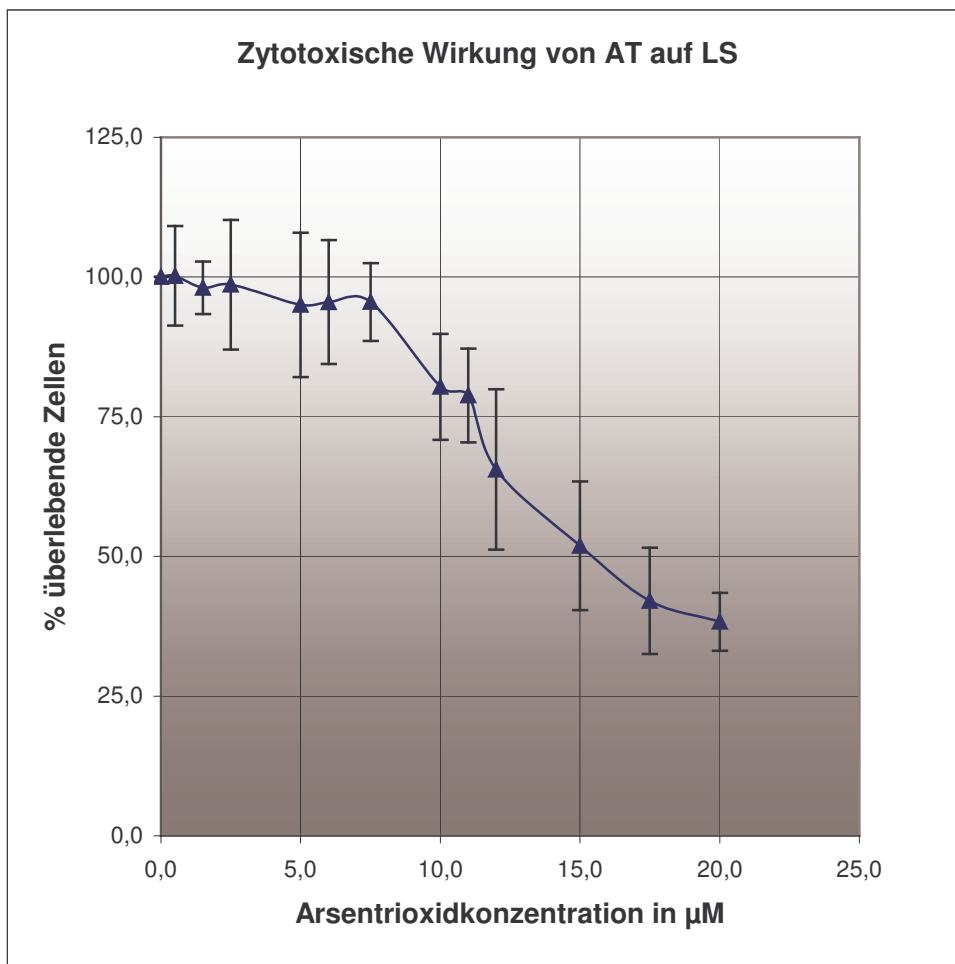


Abb. 9: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der Neuroblastom-Zell-Linie LS. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelations-Koeffizient bei 0,974 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.

#### 4.1.6 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie MDA-MB-231

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 1; 2,5; 3; 5; 7,5; 10; 15 und 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Mammakarzinom-Zell-Linie MDA-MB-231 eine **ID50** von **10  $\mu\text{M}$** . Der Varianz-Koeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 5,3; 8,7; 3,0; 8,3; 18,2; 12,9; 13,4 und 8,9%

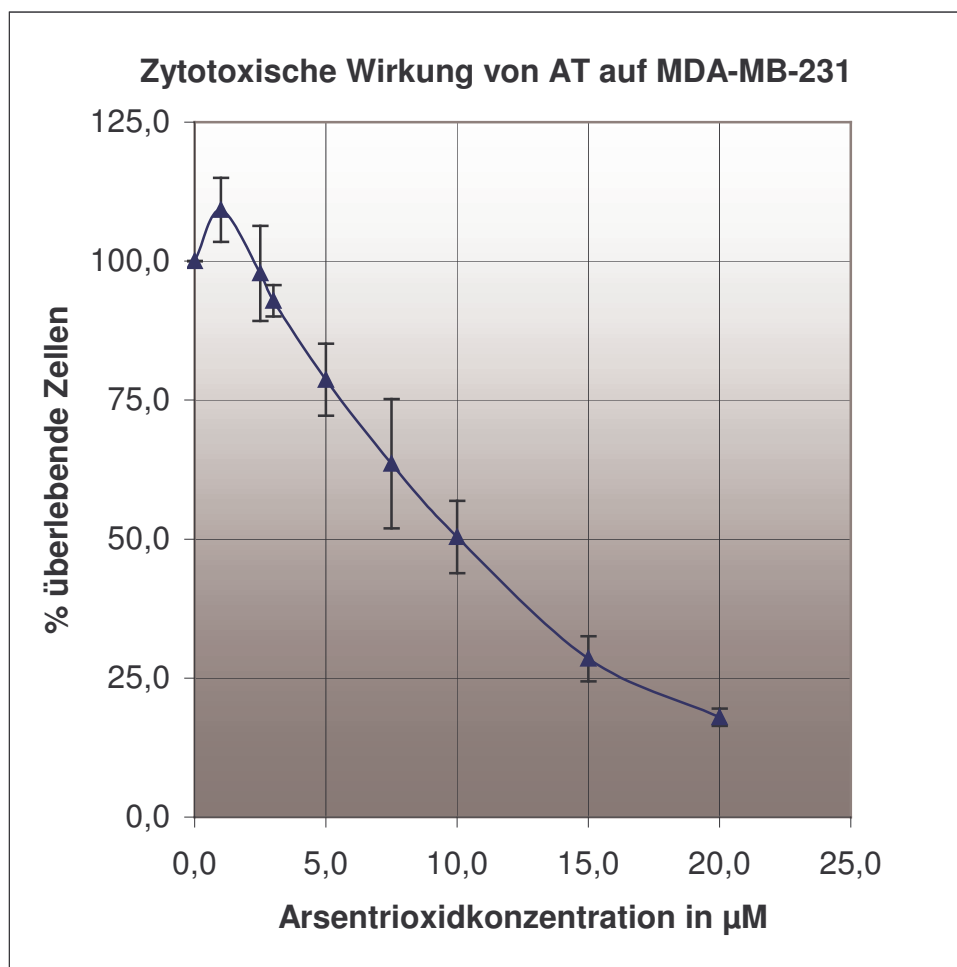


Abb. 10: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der Mammakarzinom-Zell-Linie MDA-MB-231. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelations-Koeffizient bei 0,907 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.

#### 4.1.7 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie MeWo

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 4,5; 5; 10 und 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Melanom-Zell-Linie MeWo eine **ID50** von **4,5  $\mu\text{M}$** . Der Varianzkoeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 6,5; 8,1; 11,9; 14,5; 6,0; 7,1; 4,6; 14,3 und 23,5%.

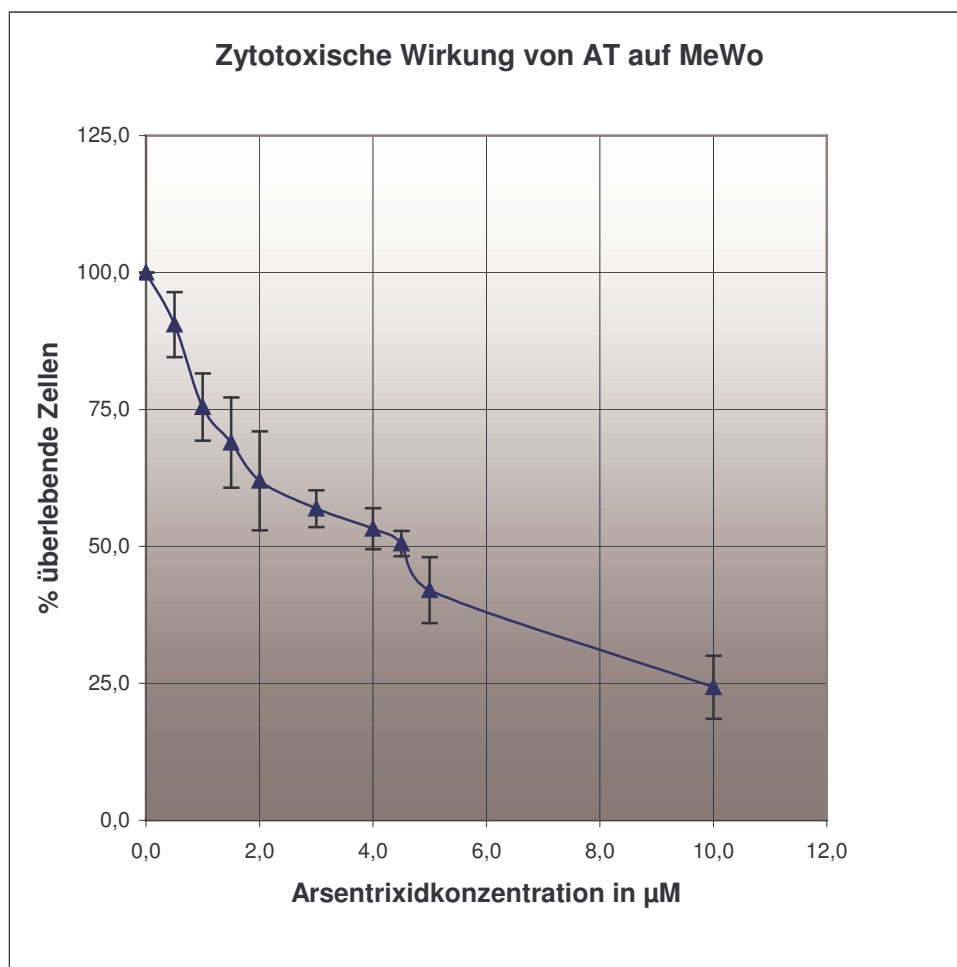


Abb. 11: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der Melanom-Zell-Linie MeWo. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelationskoeffizient bei 0,987 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.

#### 4.1.8 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie HT-29

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 7; 10; und 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Kolonkarzinom-Zell-Linie HT-29 eine **ID50** von **5  $\mu\text{M}$** . Der Varianzkoeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 4,9; 5,9; 6,9; 5,0; 3,9; 5,6; 25,6; 11,4 und 26,8%.

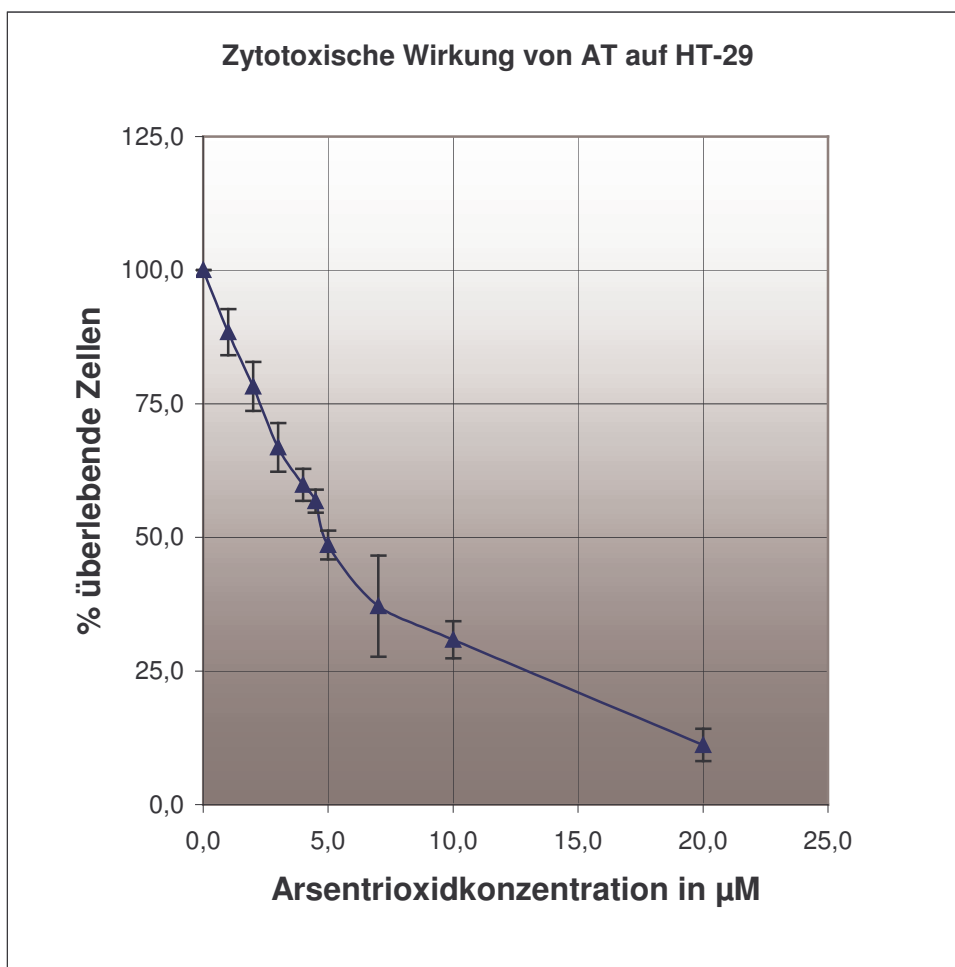


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der Kolonkarzinom-Zell-Linie HT-29. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelations-Koeffizient bei 0,888 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.

#### 4.1.9 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie HL-60

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 4,5 und 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Zell-Linie einer akuten myeloischen Leukämie HL-60 eine **ID50** von **2  $\mu\text{M}$** . Der Varianzkoefizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 12,0; 10,3; 8,4; 8,4; 6,4; 13,3; 12,; 18,7; 20,7%.

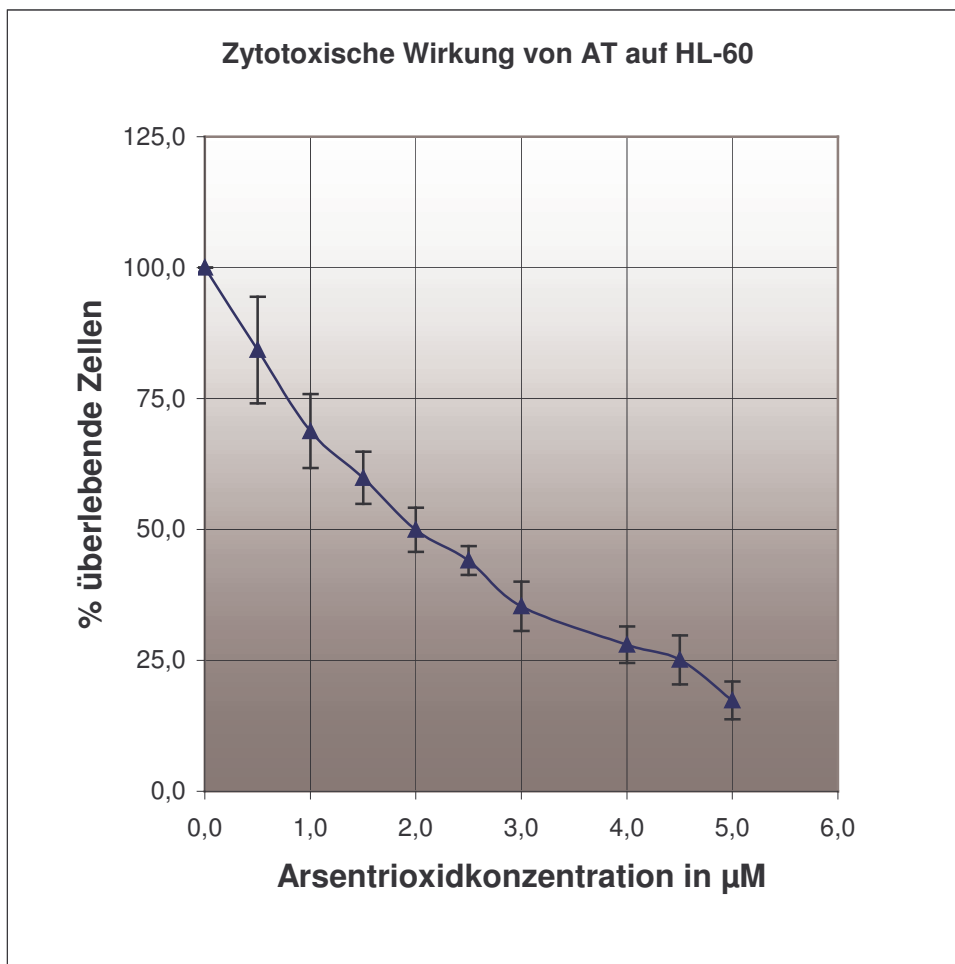


Abb. 13: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der myeloischen Zell-Linie HL-60. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelations-Koeffizient bei 0,972 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.



#### 4.1.10 Einfluss von Arsentrioxid auf die Zell-Linie Hep-G2

Bei den Versuchsansätzen wurden Arsentrioxidkonzentrationen von 0; 5; 8; 9; 10; 12,5; 15; 17,5 und 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt sich für die Zell-Linie eines hepatozellulären Karzinoms Hep-G2 eine **ID50** von **8  $\mu\text{M}$** . Der Varianzkoeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 0; 40,7; 34,2; 23,4; 12,9; 14,0; 7,3; 16,8; 91,7%.

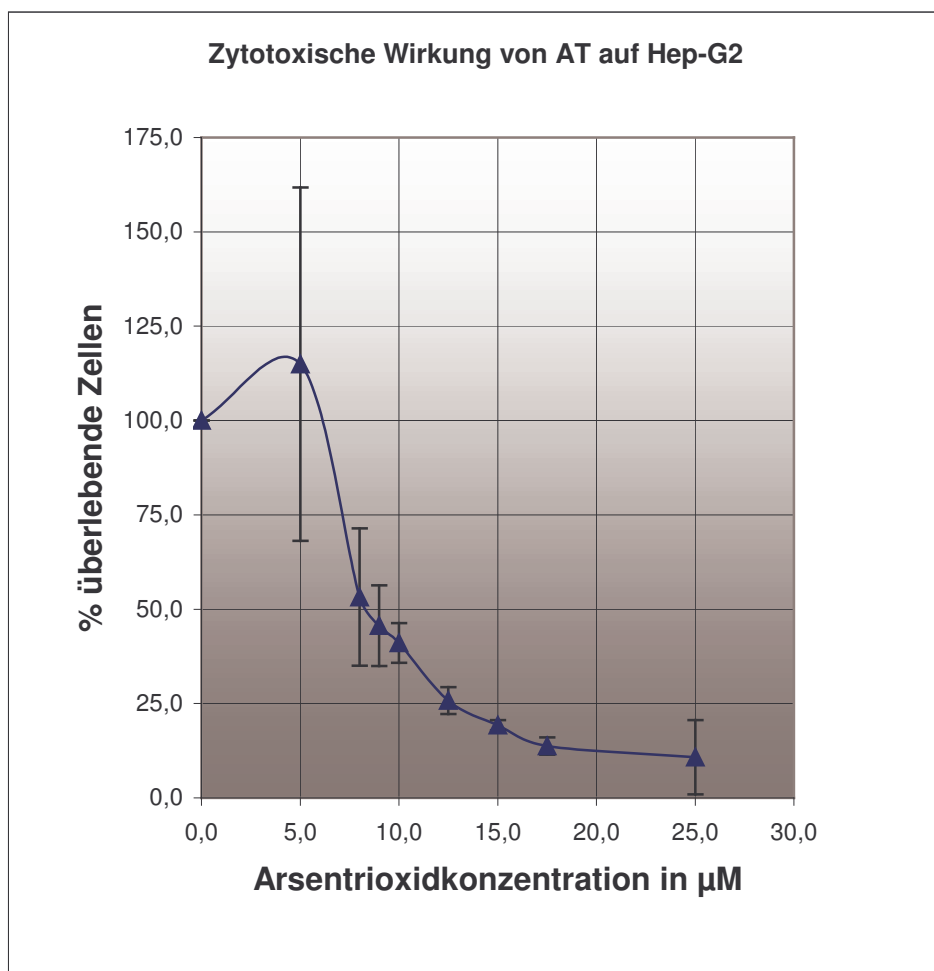


Abb.14: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid nach 48-stündiger Inkubationszeit der Zell-Linie eines hepatozellulären Karzinoms Hep-G2. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Stichproben unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei der Korrelationskoeffizient bei 0,943 lag. Jeder Messpunkt ergibt sich als Mittelwert  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten. Die Messpunkte sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%) angegeben. AT = Arsentrioxid.

#### 4.1.11 Zusammenfassung der Ergebnisse der zytotoxischen Wirkung von Arsentrioxid

Die Tabelle zeigt die ID50 der verschiedenen getesteten Zellen in aufsteigender Reihenfolge. Die sensitivste Zell-Linie ist die AML-Zell-Linie (HL-60) mit einer ID50 von 2,0  $\mu\text{M}$ . Der Großteil der Neuroblastom-Zell-Linien (LA-N-1, LA-N-5, HSJD, SH-SY5Y) liegt mit der ID50 zwischen 2,8 und 5,3  $\mu\text{M}$ . In demselben Konzentrationsbereich liegt die ID50 der Melanom-Zell-Linie (MeWo) und die der Kolonkarzinom-Zell-Linie (HT-29). Weniger sensitiv sind die Zell-Linie des hepatozellulären Karzinoms (Hep-G2), die Mammakarzinom-Zell-Linie (MDA-MB-231) und eine der Neuroblastom-Zell-Linien (LS) mit einer ID50 im Bereich von 8,0 und 15  $\mu\text{M}$ .

Zell-Linie	Ursprungsgewebe	ID50 in $\mu\text{M}$
HL-60	AML	2,0
LA-N-1	Neuroblastom	2,8
LA-N-5	Neuroblastom	4,0
MEWO	Melanom	4,5
HSJD	Neuroblastom	5,0
HT-29	Colon-Ca	5,0
SH-SY5Y	Neuroblastom	5,3
Hep-G2	Hepatozell. Ca	8,0
MDA-MB-231	Mamma-Ca	10,0
LS	Neuroblastom	15,0

Tab.2: In der Tabelle ist die jeweilige ID50 von Arsentrioxid bei den unterschiedlichen getesteten Zell-Linien aufgeführt. Diese wurde anhand der Dosis-Wirkungskurve aus dem Proliferationsassay ermittelt. Sie entspricht der Arsentrioxidkonzentration, bei der die Zellzahl bzw. die metabolische Zellaktivität noch 50% der Kontrolle ausmacht. AML = akute myeloische Leukämie, Ca = Karzinom.

## 4.2 Intrazelluläre Glutathionkonzentration vs. Zytotoxizität von Arsentrioxid

Die Messung der basalen Glutathionkonzentration ergab einen Zusammenhang zwischen Glutathiongehalt einer Zell-Linie und ihrer ID50 bzw. Empfindlichkeit für Arsentrioxid (siehe Tabelle). Je höher die Glutathionkonzentration, desto geringer war die Empfindlichkeit für Arsentrioxid.

Zell-Linie	[GSH] $\mu\text{M}$	ID 50
	$10^6$ Zellen	$\mu\text{M}$
LA-N-1	8,75	2,8
HT-29	14,91	5,0
SH-SY5Y	15,41	5,3
LA-N-5	16,61	4,0
HSJD	19,32	5,0
MeWo	19,96	4,5
Hep-G2	21,76	8,0
LS	25,83	15,0
MDA-MB-231	26,35	10,0

Tab. 3: Die Tabelle stellt die jeweilige ID50 für Arsentrioxid je Zell-Linie ihrer basalen Glutathionkonzentration in  $\mu\text{M}$  pro  $10^6$  Zellen gegenüber. Die Glutathionbestimmung erfolgte in n=9 Einzelversuchen mittels Spektrophotometer bei 400 nm (Glutathion-Assay-Kit, Calbiochem). Die Glutathionkonzentration wurde mittels Standardkurve aus der Absorption abgelesen bzw. berechnet. Die Varianzkoeffizienten liegen bei (in Reihenfolge der Tabelle von oben nach unten angegeben): 15,3; 22,1; 19,5; 22,8; 13,5; 9,9; 17,2; 10,8 und 7,3%.

### 4.3 Einfluss von BSO auf die intrazelluläre Glutathionkonzentration

Die Messung der Glutathionkonzentration nach 48-stündiger Inkubation mit BSO (100  $\mu$ M) ergab bei allen getesteten Zell-Linien ein Absinken derselben (siehe Abb. 15).

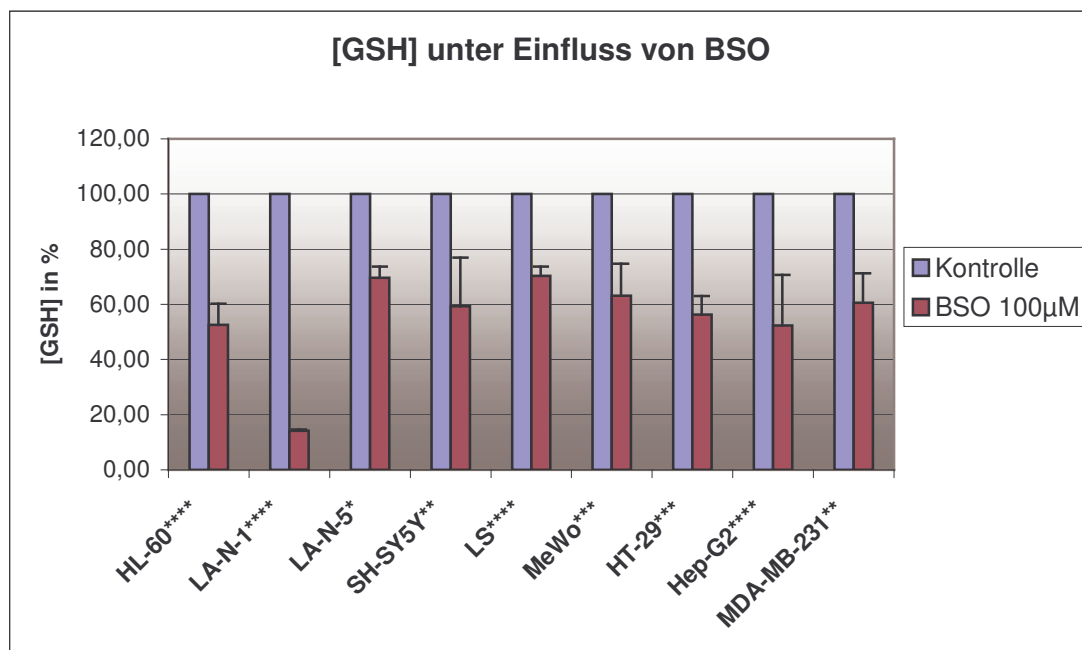


Abb.15: Dargestellt ist die Veränderung der Glutathionkonzentration nach 48-stündiger Inkubation mit BSO. Die Messwerte ergeben sich aus den Mittelwerten  $\pm$  SD aus n=2-8 Einzelversuchen (\*n=2; \*\*n=4; \*\*\*n=6; \*\*\*\*n=8) und sind als Prozentsatz der Glutathionkonzentration verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (100%) angegeben.

#### 4.4 Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid

Der Vergleich der Wachstumshemmung durch Arsentrioxid allein mit der durch Arsentrioxid unter dem Einfluss von BSO ergab bei allen getesteten Zell-Linien einen additiven zytotoxischen Effekt von Arsentrioxid mit BSO. Der Unterschied in der zytotoxischen Wirkung zwischen Arsentrioxid allein und der Kombination von Arsentrioxid und BSO ist signifikant ( $p < 0,01$ ).

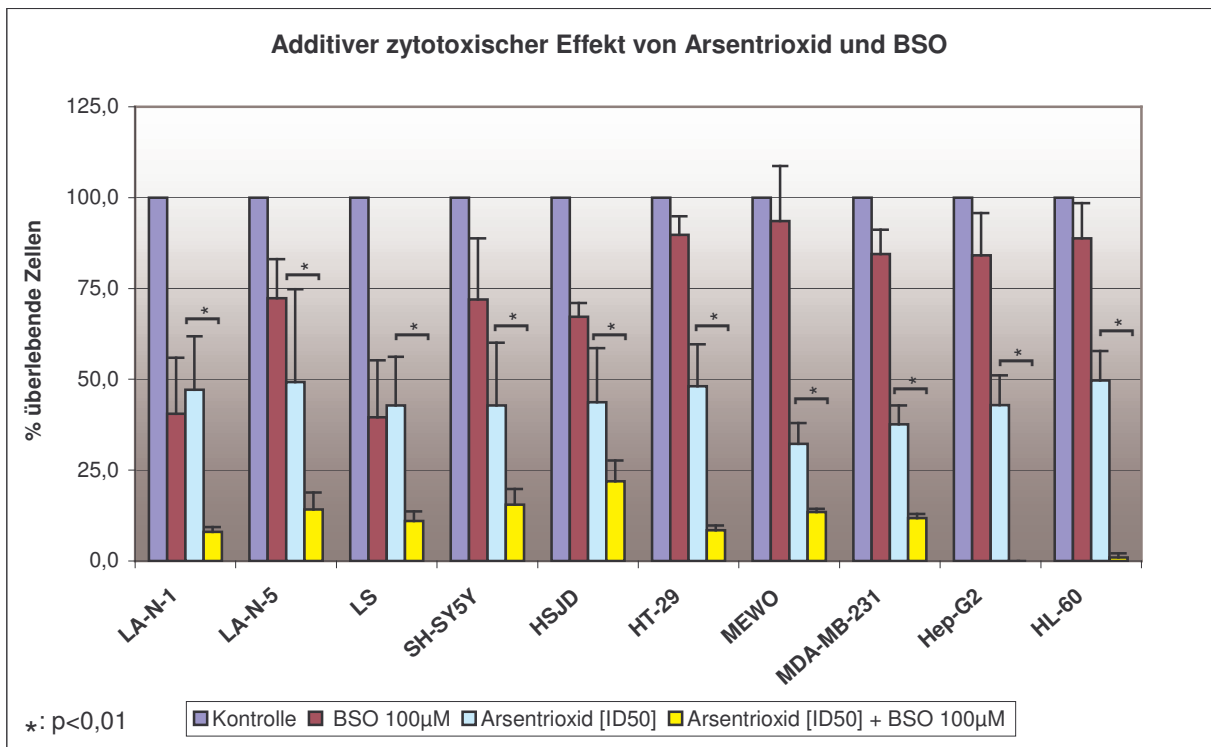


Abb.16: Balkendiagramm mit Vergleich der überlebenden Zellen aller getesteten Zell-Linien für Arsentrioxid und BSO jeweils allein und für die Coinkubation Arsentrioxid/BSO nach 48-stündiger Inkubationszeit. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Die Messwerte ergeben sich aus den Mittelwerten  $\pm$  SD von jeweils zwischen acht und 16 Einzelwerten und sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (100%) angegeben. Die Zellzahl bei den Zell-Linien Hep-G2 und HL-60 war bei der Kombination von Arsentrioxid und BSO (gelber Balken) so gering, dass sie nicht mehr graphisch dargestellt werden konnte. Die mit \* gekennzeichneten Unterschiede im t-Test signifikant ( $p < 0,01$ ).

## 4.5 Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid

### 4.5.1 Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid bei LA-N-1

Bei den Versuchsansätzen wurde eine Kombination aus BSO in den Konzentrationen 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1  $\mu\text{M}$  und jeweils 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid eingesetzt. Eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  entspricht der ID-50-Konzentration für Arsentrioxid bei der empfindlichsten getesteten Zell-Linie (HL-60). In Abbildung 17 wird die eingesetzte Arsentrioxidkonzentration durch eine rote Linie in der Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid markiert. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve für BSO unter dem Einfluss von Arsentrioxid ergibt sich bei einer BSO-Konzentration von **0,5  $\mu\text{M}$**  der Minimalwert an überlebenden Zellen. Der Varianzkoeffizient aus  $n=12$  Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 30,6; 9,5; 13,0; 6,3; 11,7 und 6,1%.

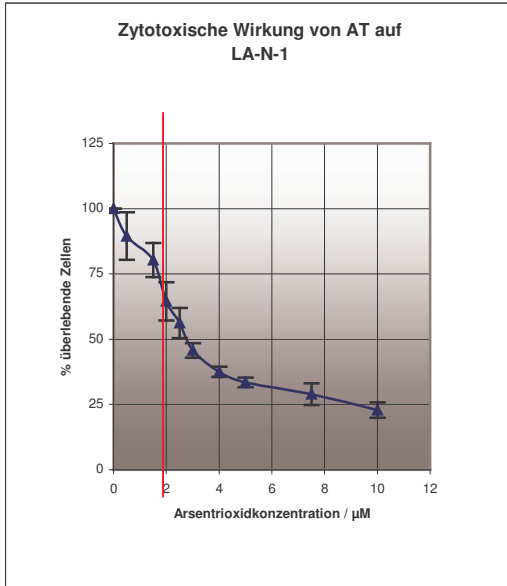


Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid bei der Neuroblastom-Zell-Linie LA-N-1 (Proliferationsassay - vgl. Abb. 5); Die rote Linie markiert die im Versuch (Abb. 18) eingesetzte Arsentrioxidkonzentration.

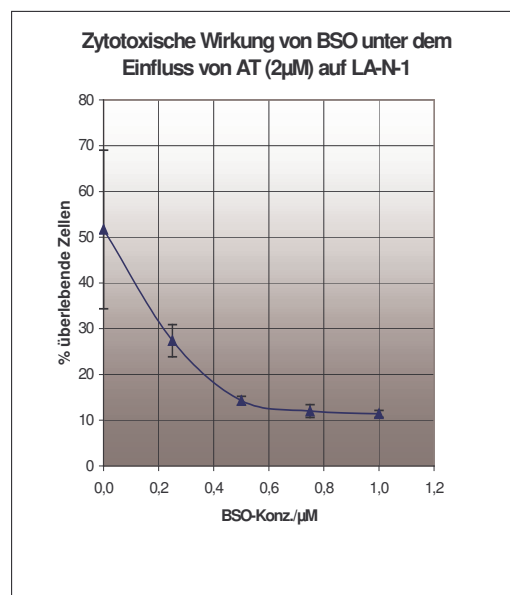


Abb. 18: Dosis-Wirkungs-Kurve für BSO unter dem Einfluss von Arsentrioxid [2  $\mu\text{M}$ ] nach 48-stündiger Inkubationszeit bei LA-N-1. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Die Messpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten und sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (100%) angegeben.

#### 4.5.2 Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid bei LS

Bei den Versuchsansätzen wurde eine Kombination aus BSO in den Konzentrationen 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 5; 7,5; 10  $\mu\text{M}$  und jeweils 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid eingesetzt. Eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  entspricht der ID-50-Konzentration für Arsentrioxid bei der empfindlichsten getesteten Zell-Linie (HL-60). In Abbildung 19 wird die eingesetzte Arsentrioxidkonzentration durch eine rote Linie in der Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid markiert. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve für BSO unter dem Einfluss von Arsentrioxid ergibt sich bei einer BSO-Konzentration von **5  $\mu\text{M}$**  der Minimalwert an überlebenden Zellen. Der Varianzkoeffizient aus n=12 Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 4,1; 2,8; 3,0; 4,6; 6,1; 4,1; 11,5; 4,1 und 18,2%.

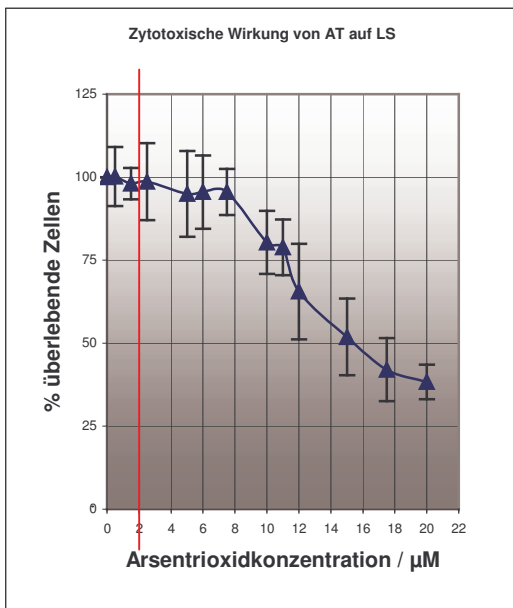


Abb. 19: Dosis-Wirkungskurve für Arsentrioxid bei der Neuroblastom-Zell-Linie LS (Proliferationsassay – vgl. Abb. 9); Die rote Linie markiert die im Versuch (Abb. 20) eingesetzte Arsentrioxidkonzentration.

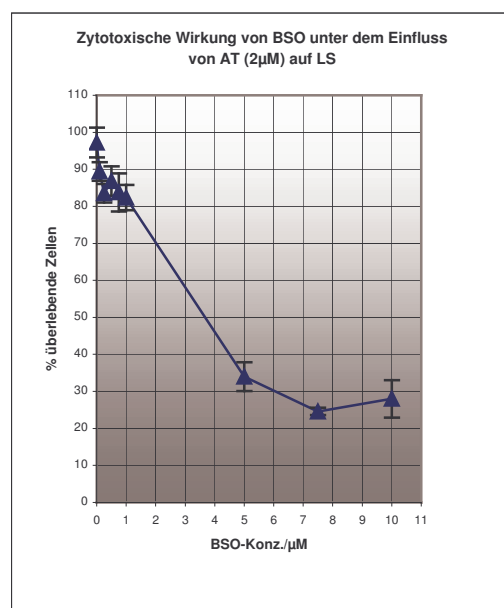


Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Kurve für BSO unter dem Einfluss von Arsentrioxid [2  $\mu\text{M}$ ] nach 48-stündiger Inkubationszeit bei LS . Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Die Messpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten und sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (100%) angegeben.

### 4.5.3 Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid bei MDA-MB-231

Bei den Versuchsansätzen wurde eine Kombination aus BSO in den Konzentrationen 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 5  $\mu\text{M}$  und jeweils 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid eingesetzt. Eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  entspricht der ID-50-Konzentration für Arsentrioxid bei der empfindlichsten getesteten Zell-Linie (HL-60). In Abbildung 21 wird die eingesetzte Arsentrioxidkonzentration durch eine rote Linie in der Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid markiert. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve für BSO unter dem Einfluss von Arsentrioxid ergibt sich bei einer BSO-Konzentration von **0,5  $\mu\text{M}$**  der Minimalwert an überlebenden Zellen. Der Varianzkoeffizient aus n=12 Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 13,2; 4,8; 10,7; 7,7; 10,2; 9,1 und 11,1%.

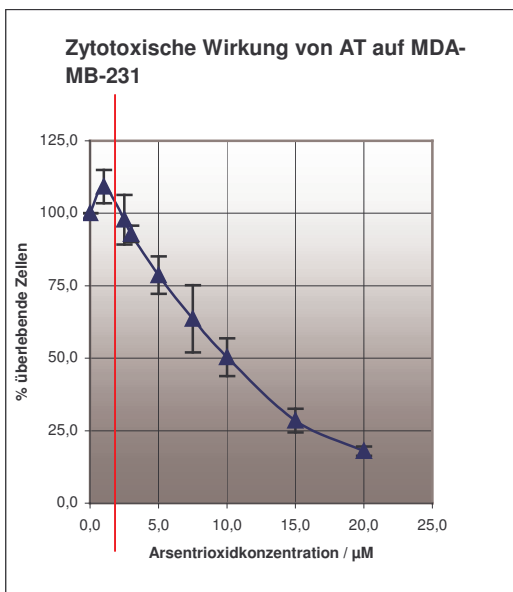


Abb. 21: Dosis-Wirkungskurve für Arsentrioxid bei der Mammakarzinom-Zell-Linie MDA-MB-231 (Proliferationsassay - vgl. Abb. 10); Die rote Linie markiert die im Versuch (Abb. 22) eingesetzte Arsentrioxidkonzentration.

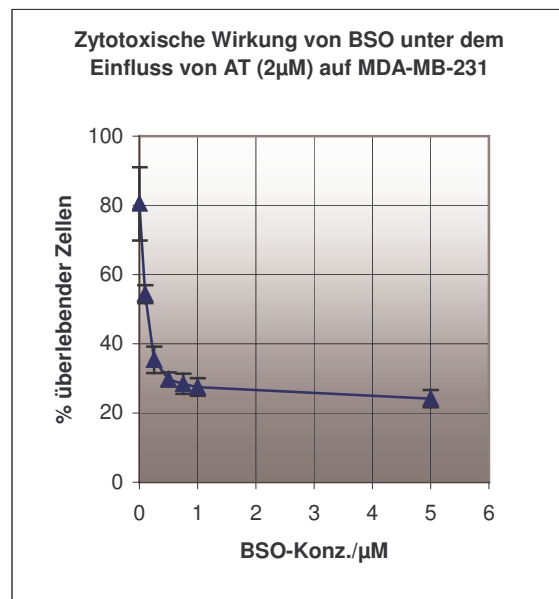


Abb.22: Dosis-Wirkungs-Kurve für BSO unter dem Einfluss von Arsentrioxid [2  $\mu\text{M}$ ] nach 48-stündiger Inkubationszeit bei MDA-MB-231. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Die Messpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten und sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (100%) angegeben.



#### 4.5.4 Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid bei HL-60

Bei den Versuchsansätzen wurde eine Kombination aus BSO in den Konzentrationen 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 5  $\mu\text{M}$  und jeweils 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid eingesetzt. Eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  entspricht der ID-50-Konzentration für Arsentrioxid bei der empfindlichsten getesteten Zell-Linie (HL-60). In Abbildung 23 wird die eingesetzte Arsentrioxidkonzentration durch eine rote Linie in der Dosis-Wirkungs-Kurve für Arsentrioxid markiert. Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve für BSO unter dem Einfluss von Arsentrioxid ergibt sich bei einer BSO-Konzentration von **0,75  $\mu\text{M}$**  der Minimalwert an überlebenden Zellen. Der Varianzkoeffizient aus n=12 Einzelversuchen liegt für die oben genannten Konzentrationen bei (in gleicher Reihenfolge wie oben angegeben): 5,0; 12,8; 6,3; 11,7; 6,1 und 6,1%.

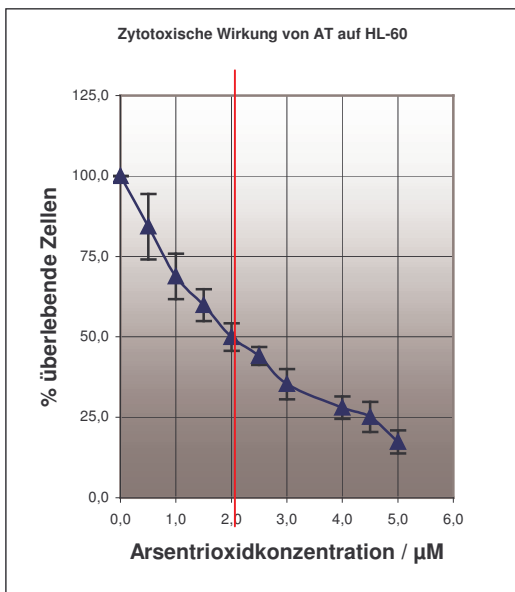


Abb. 23: Dosis-Wirkungskurve für Arsentrioxid bei der APL-Zell-Linie HL-60 (Proliferationsassay - vgl. Abb. 13); Die rote Linie markiert die im Versuch (Abb. 24) eingesetzte Arsentrioxidkonzentration.

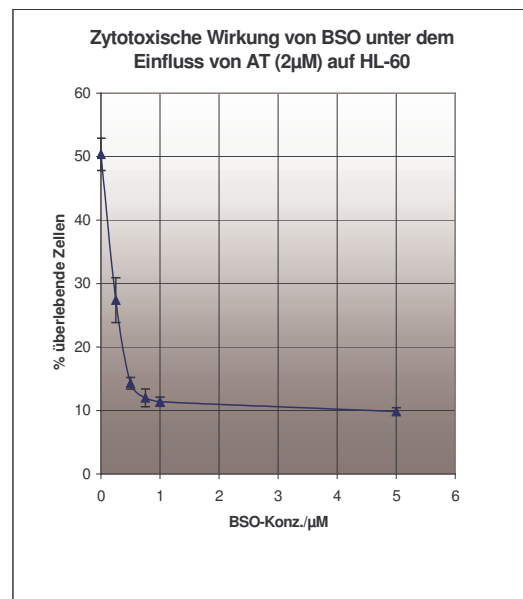


Abb. 24: Dosis-Wirkungs-Kurve für BSO unter dem Einfluss von Arsentrioxid [2  $\mu\text{M}$ ] nach 48-stündiger Inkubationszeit bei HL-60. Die Messung erfolgte mittels MTT-Test. Die Messpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten  $\pm$  SD von 12 Einzelwerten und sind als Prozentsatz überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (100%) angegeben.

## 4.6 Abhängigkeit der Glutathionkonzentration von der BSO- Konzentration

Vor Bestimmung der Glutathionkonzentration wurden die Zell-Linien LA-N-1, LS, HL-60 und MDA-MB-231 für 48 Stunden mit folgenden BSO-Konzentrationen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert: 0; 0,25; 0,5; 5 und 50 µM. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen BSO-Konzentration, Glutathionkonzentration und der Anzahl überlebender bzw. metabolisch aktiver Zellen im Proliferationsassay unter dem Einfluss von 2 µM Arsentrioxid. Je höher die eingesetzte BSO-Konzentration, desto geringer war die Glutathionkonzentration und desto geringer war auch die Zahl der überlebenden Zellen.

### LA-N-1:

BSO Konz. / µM	Glutathion Konz. / %	überlebende Zellen / %
Kontrolle	100	100
0,25	92	27
0,5	91	14
5	52	10
50	0	9

### HL-60:

BSO Konz. / µM	Glutathion Konz. / %	überlebende Zellen / %
Kontrolle	100	100
0,25	123	27
0,5	87	14
5	49	10
50	0	0

### LS:

BSO Konz. / µM	Glutathion Konz. / %	überlebende Zellen / %
Kontrolle	100	100
0,25	88	84
0,5	109	87
5	21	34
50	0	25

### MDA-MB-231:

BSO Konz. / µM	Glutathion Konz. / %	überlebende Zellen / %
Kontrolle	100	100
0,25	84	35
0,5	66	30
5	25	24
50	0	28

Tabb. 4 - 7: Dargestellt ist die Glutathionkonzentration nach 48-stündiger Inkubation mit BSO in Relation zur Zahl überlebender Zellen im Proliferationsassay bei verschiedenen BSO-Konzentrationen (kombiniert mit jeweils 2 µM Arsentrioxid, vgl. 4.5). Die Glutathion-Bestimmung erfolgte in n=4 Einzelversuchen mittels Spektrophotometer bei 400 nm (Glutathion-Assay-Kit, Calbiochem). Aus der Absorption lässt sich anhand der Standardkurve die Glutathionkonzentration ablesen.

## **4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Glutathionbestimmung und Proliferationsassay mit BSO**

### **Beziehung zwischen Glutathionkonzentration und Sensitivität für**

**Arsentrioxid:** Die Glutathionbestimmung hat ergeben, dass die für Arsentrioxid sensitiven Zellen eine geringere basale intrazelluläre Glutathionkonzentration aufweisen als die resistenten.

**Einfluss von BSO auf die Glutathionkonzentration:** BSO konnte nach 48-stündiger Inkubation bei allen getesteten Zell-Linien die intrazelluläre Glutathionkonzentration im Vergleich zum Ausgangswert reduzieren.

### **Additiver zytotoxischer Effekt von Arsentrioxid und BSO:**

Im Proliferationsassay zeigte sich durch BSO bei allen getesteten Zell-Linien ein additiver zytotoxischer Effekt mit Arsentrioxid. Sowohl bei den für Arsentrioxid sensitivsten Zell-Linien LA-N-1 und HL-60 als auch bei den resistenten Zell-Linien LS und MDA-MB-231 bewirkte BSO eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve. Eine niedrige Arsentrioxidkonzentration, die außerhalb des unter physiologischen Bedingungen therapeutischen Bereichs lag, konnte durch Coinkubation mit BSO in diesen gehoben werden. Außerdem zeigte sich, dass sowohl der additive zytotoxische Effekt als auch die Senkung der intrazellulären Glutathionkonzentration durch BSO dosisabhängig sind und negativ korrelieren: Je höher die eingesetzte BSO-Konzentration, desto geringer war die Glutathionkonzentration und umso stärker wiederum die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid.

## **5. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob Arsentrioxid ein potenziell geeignetes Medikament zur Behandlung des Neuroblastoms ist. Dabei wurde mittels Proliferationsassay die Wachstumshemmung durch Arsentrioxid an Neuroblastomzellen in vitro getestet.

Außerdem sollte – im Hinblick auf die Hypothese, dass Arsentrioxid seine Wirkung über die Produktion von freien Sauerstoffradikalen erzielt - überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Glutathionkonzentration und der Empfindlichkeit für Arsentrioxid besteht.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob mithilfe eines Inhibitors der Glutathionsynthese, dem Buthionin-Sulfoximin (BSO) zum einen die intrazelluläre Glutathionkonzentration reduziert und zum anderen ein additiver zytotoxischer Effekt für Arsentrioxid an Neuroblastomzellen erzielt werden kann.

Zuletzt sollte ebenfalls mittels Proliferationsassay die Wirkung von Arsentrioxid zum Vergleich an weiteren malignen Zellen getestet werden. Dabei sollte ermittelt werden, ob BSO bei für Arsentrioxid resistenten Zellen als Chemosensitizer eingesetzt werden kann.

## 5.1 Diskussion der Methoden

### 5.1.1 MTT-Assay

Wie schon im Abschnitt Methoden beschrieben, erfolgte die Auswertung des Proliferationsassay mittels MTT-Assay, wobei ein Stoffwechselprodukt der Zelle nämlich Formazan photometrisch bei 570 nm als Maß für die Zell-Aktivität gemessen wurde. Der Assay detektiert also nicht die absolute Anzahl überlebender Zellen, sondern nur die verbliebene Stoffwechselaktivität. Diese korreliert aber mit der Anzahl tatsächlich überlebender Zellen, wenn man davon ausgeht, dass eine Zelle, die keine Stoffwechselaktivität zeigt, auch nicht mehr intakt ist. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden parallel zu dem MTT-Assay Stichproben mit der herkömmlichen Methode der Zellzählung (Trypan-blau-Färbung, Auszählen unter dem Mikroskop mittels Neubauer-Zählkammer) genommen und die Ergebnisse beider Methoden verglichen. Der Korrelationskoeffizient lag zwischen 0,8 und 0,99, was für eine hohe Übereinstimmung spricht und somit die Validität des MTT-Assays nachweist.

Lediglich bei sehr hohen Arsen trioxid-Konzentrationen und somit sehr wenigen überlebenden Zellen zeigen sich größere Unterschiede, da bei der herkömmlichen Methode durch das Ablösen immer Zellen verloren gehen und auch nur ein Bruchteil der eigentlichen Menge ausgezählt wird. Somit können hierbei weniger Zellen detektiert werden. Beim MTT-Assay verbleiben alle Zellen im Well, es gehen also keine Zellen verloren. Bei sehr geringen Zellzahlen macht sich dieser Fehler der herkömmlichen Methode natürlich stärker bemerkbar als bei hohen Zellzahlen. So erreicht die Dosis-Wirkungs-Kurve beim MTT-Assay nicht die Null-Linie, was auch plausibel erscheint, da ja jede Zellpopulation inhomogen ist und sich in dieser auch immer einige resistente Zellen befinden. Beim Auszählen unter dem Mikroskop wird hingegen die Null-Linie erreicht, was mit der geringeren Sensitivität zusammenhängt.

Des Weiteren unterscheidet der MTT-Assay nicht zwischen Apoptose und Nekrose, was aber für unsere Fragestellung unerheblich ist, zumal in zahlreichen Arbeiten bereits übereinstimmend nachgewiesen wurde, dass Arsen trioxid seine Wirkung über die Induktion der Apoptose entfaltet (Miller et

al. 2002, Li et al. 2004, Chen GQ et al. 1997, Shao et al. 1998, Dai et al. 1999, Perkins et al. 2000). Die Induktion der Apoptose erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. Zum einen führt Arsenitrioxid zur Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials (Jing Y et al. 1999, Perkins et al. 2000) und zum anderen zu einer verstärkten Bildung von Wasserstoffperoxid (Hussein et al. 2004, Jing Y et al. 1999, Jung et al. 2006). Außerdem wurde gezeigt, dass es zur Induktion der Kaspasenaktivierung führt (Li et al. 2004, Jing Y et al. 1999, Kitamura et al. 2000, Grad et al. 2001, Park et al. 2001, Jung et al. 2006, Cheung et al. 2007) aber auch kaspaseunabhängige Wege der Apoptoseinduktion wurden aufgezeigt (McCafferty-Grad et al. 2003, Körper et al. 2004). Außerdem wurde die Apoptoseinduktion durch Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase nachgewiesen (Huang et al. 1999, Davison et al. 2004, Jung et al. 2006), durch Modulation der Bcl-2 Expression (Chen GQ et al. 1996, Zhang Y et al. 2003, Ryu et al. 2005), durch Inhibition der Telomerase-Aktivität (Chou et al. 2005) und durch Inhibition der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB (nuclear factor kappa B) induzieren (Kapahi et al. 2000, Mathas et al. 2003). Aufgrund dieser umfassenden Datenlage und der Tatsache, dass es uns im Hinblick auf die klinische Anwendung letztlich als nicht entscheidend erscheint, ob der zytotoxische Effekt von Arsenitrioxid zu Apoptose oder Nekrose führt, wurde aus ökonomischen Gründen auf die zusätzliche FACS (=fluorescence activated cell sorting)-Analyse verzichtet.

### **5.1.2 Glutathion-Assay**

Die Glutathion-Bestimmung erfolgte - wie im Methodenteil beschrieben - mit einem kommerziell erhältlichen Kit, mittels dessen Glutathion photometrisch bei 400 nm bestimmt werden kann. Um die absoluten Glutathionkonzentrationen der unterschiedlichen Zell-Linien miteinander vergleichen zu können, musste exakt dieselbe Zellzahl vorliegen. Da das nicht möglich ist, kommt es zu nicht vermeidbaren Schwankungen, die aber durch exaktes Auszählen so gering wie möglich gehalten wurden. Dennoch sind die Varianzkoeffizienten mit Werten zwischen 7,3 und 22,8% relativ hoch, liegen aber trotzdem noch im Rahmen der akzeptablen Werte bei Versuchen mit biologischem Material.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Arsentrioxid

Arsentrioxid ist ein Medikament, das gegenwärtig zur Behandlung der refraktären oder rezidivierten akuten Promyelozytenleukämie (APL) eingesetzt wird. Hierfür werden komplette Remissionsraten von 87% erzielt. Daher ist Arsentrioxid seit dem Jahr 2000 durch die Food and Drug Administration der USA für diese Indikation zugelassen.

#### Klinische Studien bei der akuten Promyelozytenleukämie

Bereits in den 70er Jahren beschäftigten sich Zhang et al. von der Harbin Medical University in China mit dem Einsatz von Arsentrioxid in einer Mixtur genannt „Ailing-1“ bei verschiedenen Krebsarten. Unter den getesteten malignen Erkrankungen sprach die APL am besten auf die Therapie mit Arsentrioxid an (Zhang et al. 1984 bzw. 2001).

Gereinigtes Arsentrioxid als Monotherapie bei der APL wurde erstmals 1996 durch Zhang et al. unter Studienbedingungen bei 30 unbehandelten Patienten (komplette Remission: 73%) und 42 Rezidiv-Patienten (komplette Remission: 52%) erfolgreich eingesetzt. Die Verabreichung erfolgte intravenös. In weiteren folgenden Studien aus Shanghai (Shen et al. 1997) und den USA (Soignet et al. 1998) bestätigte sich die Wirksamkeit von Arsentrioxid bei der APL mit kompletten Remissions-Raten zwischen 85 und 92%. Es konnte gezeigt werden, dass eine intravenöse Verabreichung von 0,15 mg/kg/d über ein bis zwei Stunden zu den besten Ergebnissen führte.

In einer weiteren Studie aus China wurden 47 Patienten mit rezidivierter APL mit Arsentrioxid behandelt. Die Ergebnisse bestätigten die Wirksamkeit von Arsentrioxid bei der APL (komplette Remission: 85%). Nach zwei Jahren waren 42% der Patienten frei von Krankheitszeichen und die Überlebensrate lag bei 50% (Niu et al. 1999).

Die US Food and Drug Administration ließ schließlich – wie eingangs erwähnt – im Jahr 2000 das Arsenitrioxid zur Behandlung der rezidivierten APL zu. Die wichtigsten vorgelegten Daten zur klinischen Wirksamkeit bestanden aus zwei randomisierten Studien (Soignet et al. 1998 und 2001) an insgesamt 52 APL-Patienten, die nach einer Retinoid- und Anthracyclin-Chemotherapie ein Rezidiv erlitten hatten oder für die eine anthracyclinbasierte Chemotherapie kontraindiziert war. An die Induktionstherapie mit 0,15-0,16 mg/kg/d schloss nach Vollremission eine Konsolidierungs- und eine Erhaltungstherapie an. Im Mittel wurden 57 Tage bis zur Vollremission bei einer kompletten Remissions-Rate von 87% benötigt. Zum Zeitpunkt der letzten Kontrolle blieben 55% der Patienten mit Vollremission frei von Krankheitszeichen. Die Überlebensrate lag nach einem Nachsorgezeitraum von 18 Monaten bei 69% der Patienten (Soignet et al. 1998 und 2001).

Weitere Studien bestätigten die Ergebnisse: Am M. D. Anderson Cancer Center wurde eine Studie an 12 Patienten mit rezidivierter APL durchgeführt. Sie erhielten ebenfalls 0,15 mg/kg Arsenitrioxid täglich über maximal 60 Tage. Alle Patienten erreichten eine komplette Remission im Mittel in 52 Tagen. Anschließend erhielten alle Patienten weitere Chemotherapie entweder mit Arsenitrioxid allein oder mit anderen Chemotherapeutika kombiniert bzw. nur mit all-trans-Retinsäure und Idarubicin. Im anschließenden Follow-up nach im Mittel 24 Monaten bestand noch bei acht Patienten eine komplette Remission (Lazo et al. 2003).

In einer Studie von Shen et al. konnte gezeigt werden, dass Arsenitrioxid auch in niedriger Dosierung effektiv gegen APL einsetzbar ist. Sie behandelten 20 Patienten mit rezidivierter APL mit täglich 0,08 mg/kg Arsenitrioxid i.v. über 28 Tage. 80% der Patienten erreichten eine komplette Remission und die Zwei-Jahres-Überlebensrate war mit 61% vergleichbar mit der bei konventioneller Dosierung (Shen et al. 2001).

Zwei aktuellere Studien konnten eine Wirksamkeit bei neu diagnostizierten APL-Patienten nachweisen. Mathews et al. veröffentlichten 2006 eine Untersuchung bei 72 neu diagnostizierten APL-Patienten zur Behandlung mit



Arsentrioxid. Die komplette Remissions-Rate lag bei 86%. Beim Follow-up nach im Mittel 25 Monaten waren von diesen Patienten noch 97% am Leben und 89% in kompletter Remission (Mathews et al. 2006). Estey et al. behandelten ebenfalls nicht vorbehandelte Patienten mit 0,15 mg/kg Arsentrioxid und 45 mg/m<sup>2</sup> all-trans-Retinsäure (ATRA). Auch hier konnte ein Ansprechen nachgewiesen werden (96% komplette Remission) (Estey et al. 2006).

### Klinische Studien beim Multiplen Myelom

Parallel zu den genannten Studien bei der APL wurden klinische Studien zum Einsatz von Arsentrioxid beim Multiplen Myelom (Plasmozytom) mit weniger durchschlagendem Erfolg durchgeführt (Bahlis et al. 2002, Munshi et al. 2002, Hussein et al. 2004, Rousselot et al. 2004, Abou-Jawde et al. 2006, Berenson et al. 2006). Bahlis et al. führten eine durch das National Cancer Institute/Cancer Therapy Evaluation Program gesponserte Phase I/II Studie zur Behandlung mit Arsentrioxid kombiniert mit Ascorbinsäure bei sechs Patienten mit rezidiviertem oder therapierefraktärem Multiplen Myelom durch. Es stellte sich heraus, dass bei einer täglichen Dosierung von 0,25 mg/kg Arsentrioxid kombiniert mit 1000 mg Ascorbinsäure für 25 Tage keine dosisbegrenzende Toxizität auftrat. Die Pharmakokinetik von Arsentrioxid wurde durch Ascorbinsäure nicht beeinflusst, allerdings waren erhöhte Ascorbinsäurespiegel mit einem Abfall der intrazellulären Glutathionkonzentration assoziiert. Bei zwei der sechs eingeschlossenen Patienten zeigte die Behandlung ein partielles Ansprechen, bei den übrigen war die Erkrankung gleichbleibend. Inwiefern Ascorbinsäure die klinische Effizienz von Arsentrioxid erhöhen kann, ist noch Bestandteil der Untersuchung in der Phase II Studie, deren Ergebnisse noch ausstehen (Bahlis et al. 2002).

In einer weiteren Phase II Studie erhielten 14 Patienten ausschließlich Arsentrioxid in einer täglichen Dosierung von 0,15 mg/kg Körpergewicht intravenös über 60 Tage und weitere 30 Tage bei Ansprechen. Insgesamt sprachen 43% der Patienten auf die Therapie an – bei acht zeigte sich keine Wirkung (Munshi et al. 2002). Hussein et al. führten eine Multicenter Phase II Studie durch, bei der 0,25 mg/kg Körpergewicht pro Tag über fünf Tage die

Woche für eine Dauer von zwei Wochen eingesetzt wurden, danach wurde zwei Wochen pausiert. Ein Ansprechen zeigte sich bei 33% der Patienten (Hussein et al. 2004). Rousselot et al. setzten eine geringere Dosis Arsentrioxid (0,15 mg/kg/d) im Mittel über 38 Tage an 10 Patienten mit fortgeschrittenem Multiplen Myelom ein. Hierbei konnte allerdings kein signifikantes Ansprechen nachgewiesen werden (Rousselot et al. 2004).

Abou-Jawde et al. untersuchten bei 20 Patienten mit rezidiviertem oder therapierefraktärem Multiplen Myelom die Behandlungsmöglichkeit mit Arsentrioxid kombiniert mit Ascorbinsäure und Dexamethason. Ein Ansprechen auf die Therapie zeigte sich bei 30% der Patienten, bei 80% blieb die Erkrankung stabil. Die mittlere Zeitspanne ohne Krankheitsprogression lag bei 316 Tagen - bei den Patienten, die ein Ansprechen auf die Therapie gezeigt hatten, bei 584 Tagen (Abou-Jawde et al. 2006).

Wu et al. untersuchten an 20 vorbehandelten Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Multiplen Myelom die Behandlungseffizienz von Arsentrioxid ebenfalls kombiniert mit Dexamethason und Ascorbinsäure. Es zeigte sich bei dieser Kombination ein mäßiges Ansprechen (40%) bei signifikanter Toxizität (Wu et al. 2006).

Berenson et al. untersuchten die Kombination von Arsentrioxid, Ascorbinsäure und Melphalan. 48% der 65 Patienten sprachen auf die Behandlung an. Die mittlere progressionsfreie Zeitspanne lag bei sieben Monaten, die mittlere Überlebenszeit bei 19 Monaten (Berenson et al. 2006).

#### Klinische Studien bei weiteren Malignomen

In klinischen Phase I und II Studien wurde die Wirksamkeit von Arsentrioxid außerdem bei weiteren Malignomen untersucht. Ein moderater Effekt zeigte sich bei Myelodysplastischen Syndromen (Schiller et al 2006, Vey et al. 2006). Darüber hinaus konnte eine Wirksamkeit nachgewiesen werden bei der mit dem humanen T-Zell-lymphotropen Virus Typ I assoziierten adulten T-Zell-Leukämie (Kombination mit Interferon alpha; Hermine et al. 2004), bei hautinfiltrierendem Brustkrebs (topisch, kombiniert mit Bestrahlung, Pilotstudie, Lai et al. 2003) und bei Kopf- und Nackenkrebs (Phase I, kombiniert mit Bestrahlung und Hyperthermie, Huilgol 2006). Keine Wirkung zeigte

Arsentrioxid hingegen bei akuter lymphatischer B- und T-Zell-Leukämie (Litzow et al. 2006), Keimzellmalignomen (Beer et al. 2006), Hepatozellulärem Karzinom (Lin et al. 2007), metastasiertem Melanom (Kim et al. 2005) und bei metastasiertem Nierenzellkarzinom (Vuky et al. 2002).

### Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

In der bereits erwähnten chinesischen Studie (Shen et al. 1997) wurde auch die Pharmakokinetik von Arsentrioxid untersucht. Es konnten maximale Plasmaspiegel von 6,85  $\mu\text{M}$  (range: 5,54 bis 7,30  $\mu\text{M}$ ) vier Stunden nach intravenöser Gabe von 10 mg Arsentrioxid erzielt werden. Die alpha- und beta-Halbwertszeit lag bei 0,89 + 0,29 und 12,13 + 3,31 Stunden respektive. Kontinuierliche Gabe führte nicht zur Akkumulation im Blutplasma. Die tägliche Ausscheidung im Urin stieg auf ein bis acht Prozent der täglichen Dosis und fiel nach dem Absetzen wieder ab, wobei die Ausscheidung über den Urin weiterging. Nielsen und Uthus stellten fest, dass die Exkretion von Arsen im Stuhl (900 mg/d) um einiges höher war als im Urin (50 mg/d), so dass möglicherweise der Großteil des Arsens über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden wird (aus Shen et al. 1997). Der Arsengehalt in Haaren und Nägeln stieg fortschreitend an und war während der Infusionstage fünf bis siebenmal höher als der Grundwert, was für eine Akkumulation in diesen Geweben spricht. Nach dem Absetzen zeigte sich aber wiederum eine abfallende Tendenz (Shen et al. 1997).

Fukai et al. untersuchten den Metabolismus von Arsentrioxid. In dieser Studie wurden die Konzentrationen von Arsentrioxid und seinen methylierten Metaboliten über 24 h nach Arsentrioxidgabe im Serum und im Urin gemessen. Es stellte sich heraus, dass Arsentrioxid über die Leber durch Methylierung zunächst zu Natriummethylarsenat (MMAs) und schließlich zu Dimethylarsensäure (DMAs) metabolisiert wird (s. Abb. 25). Zunächst kam es nach zwei Stunden zu einem Anstieg der Metaboliten im Serum, die Konzentration blieb aber dann für 24 Stunden annähernd konstant (Fukai et al. 2006).

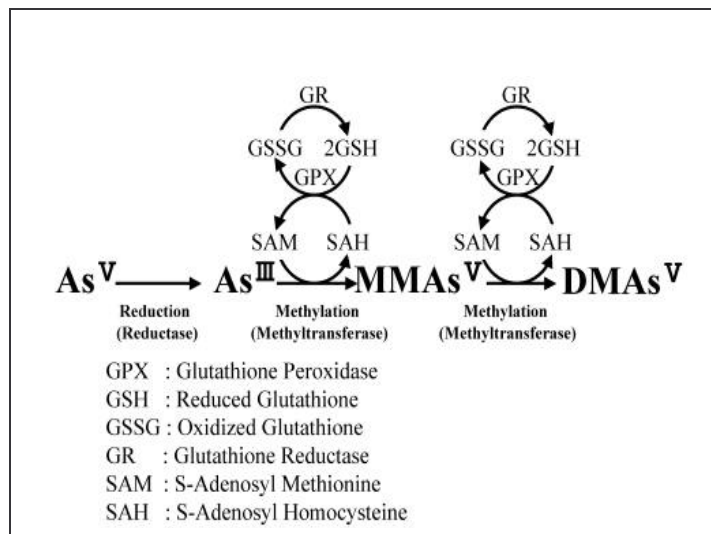


Abb. 25: Biotransformation von anorganischem Arsen beim Menschen. Arsenat wird zu Arsenit reduziert und anschließend methyliert, wobei monomethylierte und dimethylierte Metaboliten entstehen (Aus: Fukai et al.; Biol Pharm Bull. 2006 May; 29(5):1022-7).

Fujisawa et al. untersuchten die Pharmakokinetik bei japanischen Patienten vor dem Hintergrund, dass diese über die Nahrung (Seefisch) größere Mengen Arsen aufnehmen als Westeuropäer. Es wurde kein Unterschied in der Pharmakokinetik zu der bei Westeuropäern festgestellt (Fujisawa et al. 2007).

### Nebenwirkungen

In der klinischen Multicenter-Studie von Soignet et al. an Patienten mit refraktärer bzw. rezidivierter APL wurden die Nebenwirkungen bei einer Dosierung von 0,15 mg/kg Körpergewicht ermittelt. Die häufigsten Nebenwirkungen waren gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit (75%), Erbrechen (58%), Diarrhöe (53%)), außerdem Husten (65%), Müdigkeit (63%), Fieber (63%), Kopfschmerzen (60%), Tachykardie (55%); Leukozytose (50%) und Hypokaliämie (50%). Des Weiteren wurden abdominelle Schmerzen, Ödeme, Dyspnoe, Pruritus, und Schwindel beschrieben. Als gefährliche Nebenwirkungen sind zum einen das sogenannte APL-Differentiation-Syndrom beschrieben worden, bei dem Fieber, Dyspnoe, Gewichtszunahme, pulmonale Infiltrationen, Pleura-/Perikarderguss und Leukozytose auftreten. Das APL-

Differentiation-Syndrom trat in der US-Multicenter Studie bei 23% der APL-Patienten auf. Es konnte erfolgreich mit Dexamethason behandelt werden. Es gab keinen Todesfall und die Arsentrioxidtherapie musste nicht unterbrochen werden. Eine Leukozytose trat bei 50% der Patienten während der Induktionstherapie auf, diese ging aber während der Behandlung zurück. Dieses Syndrom ist bisher nur bei APL-Patienten beschrieben worden – es scheint also speziell dort aufzutreten. Beim Neuroblastom wäre es höchstwahrscheinlich nicht zu erwarten.

Außerdem wurden EKG-Veränderungen (QT-Verlängerung, kompletter AV-Block) beschrieben, bei denen die Gefahr für eine ventrikuläre Torsade-de-pointes-Tachykardie besteht (Soignet et al. 2001).

Barbey et al. untersuchten mögliche EKG-Veränderungen, während der Therapie mit Arsentrioxid. Bei Patienten mit APL, von denen 50% mit Anthrazyklinen vorbehandelt waren, wiesen 26 eine QTc-Verlängerung von über 500 ms auf. Eine Verlängerung der absoluten QT-Zeit über 500 ms zeigte sich nur bei drei Patienten. Insgesamt wiesen aber 69% der Patienten eine Verlängerung ihrer QTc-Zeit auf. Bei lediglich einem am Monitor befindlichen Patienten wurde eine asymptotische sieben Schläge lange Torsade-de-pointes-Tachykardie aufgezeichnet, die spontan sistierte. Nach dem Absetzen waren die Veränderungen wieder reversibel. Ansonsten traten bei keinem der Patienten Arrhythmien, Symptome oder gar ein plötzlicher Herztod auf (Barbey et al. 2001). Naito et al. beschrieben bei zwei Patientinnen mit APL das Auftreten einer Torsade-de-pointes-Tachykardie unter Behandlung mit Arsentrioxid; dabei war die eine Patientin allerdings gleichzeitig mit Fluconazol behandelt worden und die andere hatte eine Kardiomyopathie (Naito et al. 2006). Singer et al. veröffentlichten 2003 in einer Analyse von 2900 Patienten, dass seit Zulassung des Medikaments im Jahr 2000 kein Tod durch arsentrioxidinduzierte Arrhythmie aufgetreten sei (Singer et al. 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die EKG-Veränderungen mehr ein elektrophysiologisches als ein klinisches Problem sind.

In Bezug auf den plötzlichen Herztod liegen allerdings Ergebnisse von Westervelt et al. aus einer Phase I/II-Studie vor, die im Gegensatz zu denen der vorherigen US-Studien von Barbey et al. und Soignet et al. und der Analyse von

Singer et al. stehen. Zehn Patienten erhielten monatlich ein bis vier Zyklen mit einer täglichen Infusion von 0,1 mg/kg Arsentrioxid. Drei der zehn Patienten starben plötzlich während des ersten Behandlungszyklusses. Bei zwei Patienten wurde in der Autopsie keine Todesursache gefunden, so dass ein plötzlicher Herztod vermutet wurde. Bei dem dritten Patienten wurde auf die Autopsie verzichtet – er hatte eine Asystolie gezeigt und starb unter kardialer Telemetrie. Auffällig war, dass alle drei Patienten adipös, jung und Afroamerikaner waren, was natürlich Zufall sein kann, aber auch auf eine mögliche genetische Disposition für die erhöhte Toxizität von Arsentrioxid hinweisen kann. Unterschiede in der Pharmakokinetik wurden allerdings nicht festgestellt, wobei aber die unterschiedlichen Methylierungsformen nicht im Einzelnen untersucht wurden (Westervelt et al. 2001). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass in jedem Fall Vorsicht bei dem Einsatz von Arsentrioxid vor allem bei Patienten mit kardialen Vorerkrankungen geboten ist.

In verschiedenen Studien wurde die Hämatotoxizität von Arsentrioxid untersucht. Bei 14 vorbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom, die mit 0,15 mg/kg Körpergewicht behandelt wurden, trat bei elf Patienten eine Neutropenie mit weniger als 1000/ $\mu$ L auf, so dass die Gabe eines Granulozytenstimulationsfaktors nötig war (Munshi et al. 2002). Hussein et al. behandelten 24 Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Multiplem Myelom mit täglich 0,25 mg/kg Arsentrioxid. Bei 16 von 24 Patienten trat eine Neutropenie (Grad 3 und 4) auf und je drei Patienten bekamen eine Anämie bzw. Thrombozytopenie (Hussein et al. 2004). List et al. untersuchten den hämatotoxischen Effekt von Arsentrioxid bei 40 Patienten mit Myelodysplastischen Syndromen. Bei jeweils drei Patienten traten Neutropenie bzw. Thrombozytopenie und bei jeweils zwei Patienten eine Leukopenie bzw. Panzytopenie auf (List et al. 2003).

Bei Patienten mit soliden Tumoren waren hämatotoxische Nebenwirkungen gering. Von 53 Patienten mit fortgeschrittenem Leber-, Gallenblasen-, Prostata- und metastasiertem Nierenzellkarzinom trat bei keinem Patienten eine Thrombopenie und nur bei 13% eine dritt- bis viertgradige Neutropenie auf. Dies war unabhängig vom Dosisschema (Douer et al. 2005).

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass Arsentrioxid auch bei höheren Dosen im Vergleich zur Chemotherapie nur zu geringerer Myelosuppression führt. Die Myelosuppression bzw. hämatotoxische Nebenwirkungen treten eher bei hämatologischen malignen Erkrankungen als bei soliden malignen Tumoren auf. Beim Neuroblastom als solidem Tumor dürfte also ein geringes Risiko für hämatotoxische Nebenwirkungen bzw. Myelosuppression bestehen.

Au et al. beschrieben das Auftreten von Varizella-Zoster-Virus-Reaktivierung bei elf von 44 mit Arsentrioxid behandelten APL-Patienten im Mittel 56 Tage nach Behandlung. Im ersten Jahr nach der Behandlung ergab sich insgesamt ein Risiko von 26%, danach traten keine Fälle mehr auf (Au et al. 2005). Auch Nouri et al. beschrieben das Auftreten von Varizella-Zoster-Virus-Reaktivierung und außerdem Herpes-simplex-Infektionen unter Arsentrioxidtherapie (Nouri et al. 2006). Somit scheint Arsentrioxid einen supprimierenden Effekt auf das Immunsystem mit konsekutiver Prädisposition für Virusinfektionen zu haben.

Alle genannten Nebenwirkungen waren reversibel und eine Unterbrechung der Therapie aufgrund der Nebenwirkungen wurde in der Regel nicht erforderlich.

Die Studien zeigen also, dass Arsentrioxid relativ geringe und reversible Nebenwirkungen bei einer praktikablen Dosierung aufweist und prinzipiell ein geeignetes Medikament als Alternative zu den klassischen Chemotherapeutika ist.

#### Präklinische Studien an weiteren malignen Zellen

In zahlreichen präklinischen Studien wurde die Zytotoxizität von Arsentrioxid an Zellen verschiedener anderer als der bisher beschriebenen Malignome nachgewiesen, darunter verschiedene non-APL-Leukämie- und Lymphomzellen (Zhu et al. 1999, Puccetti et al. 2000), außerdem Zellen solider Tumoren wie Neuroblastom (Akao et al. 1999, Ora et al. 2000, Karlsson et al. 2004, Ryu et al. 2005, Jung et al. 2006, Cheung et al. 2006), Ewing-Sarkom (Jung et al. 2006), PNET = primitive neuroektodermale Tumoren (Jung et al. 2006) und Tumoren aus Prostata, Nieren, Zervix und Blase (Murgo et al. 2001).

## Wirkmechanismus

Zunächst ging man davon aus, dass Arsentrioxid speziell bei der APL wirksam sei, da es das für APL-spezifische Genprodukt, das PML-RARalpha-Fusions-Protein reduziert (Chen GQ et al. 1996 und 1997, Shao et al. 1998). Dieses Protein blockiert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die für die myeloische Differenzierung entscheidend sind. Das zugrunde liegende Fusionsgen beruht auf einer Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17. Miller et al. zeigten, dass Arsentrioxid mit dem PML-Teil des Fusionsproteins interagiert und so verhindert, dass das Protein seine antidifferenzielle Wirkung entfalten kann (Miller et al. 2002).

Davison et al. konnten aber zeigen, dass die Interaktion mit dem PML-RARalpha-Fusions-Protein nicht der einzige Wirkmechanismus ist. Sie konnten nachweisen, dass bei Arsentrioxid-*resistenten* NB4 Zellen der akuten Promyelozytenleukämie das PML-RARalpha ebenso abgebaut wurde wie bei den sensitiven Parentalzellen. So konnte also gezeigt werden, dass Arsentrioxid neben der spezifischen Wirkung auf das PML-RARalpha-Fusions-Protein bei der APL noch weitere Effekte erzielen muss, die davon unabhängig sind (Davison et al. 2002).

Auf der Suche nach möglichen Wirkmechanismen wurde gezeigt, dass Arsentrioxid in klinisch relevanten Konzentrationen *in vitro* nicht nur auf medikamentensensitive Neuroblastomzellen, sondern auch auf multiresistente p53-mutierte/deletierte Zell-Linien wie LA-N-1 zytotoxisch wirkte (Akao et al. 1999, Ora et al. 2000, Karlsson et al. 2004). Somit wurde nachgewiesen, dass Arsentrioxid unabhängig von der p53-Funktion wirkt und so einen anderen zytotoxischen Mechanismus als herkömmliche Chemotherapeutika nutzt. Multiresistente Neuroblastomzellen haben häufig eine Mutation bzw. eine Deletion im p53-Gen, so dass konventionelle Chemotherapeutika keine Wirkung zeigen (Keshelava et al. 2001; Tweddle et al. 2001). Als Wirkmechanismen wurde dem Arsentrioxid die proteolytische Aktivierung von Bax, Herunterregulierung von Bcl-2 und Aktivierung von Kaspase 3 nachgewiesen (Ora et al. 2000, Jiang et al. 2001, Nakagawa et al. 2002,



Karlsson et al. 2004, Jung et al. 2006). Da bei Kindern gewöhnlich zur Behandlung Medikamente eingesetzt werden, die die herkömmliche Wirkung abhängig von der p-53-Funktion entfalten (Karlsson et al. 2004), ist ein Medikament wie das Arsentrioxid, das einen anderen Wirkmechanismus aufweist, daher besonders viel versprechend für den Einsatz beim Neuroblastom.

Ein weiterer wesentlicher Effekt scheint der Einfluss auf das zelluläre Redox-System zu sein. Wie in anderen präklinischen Studien bereits gezeigt wurde, stieg während der Behandlung mit Arsentrioxid der intrazelluläre Gehalt an  $H_2O_2$  an; Antioxidanzien wie N-Acetylcystein konnten diesen Effekt rückgängig machen (Wang et al. 1996, Chen YC et al. 1998, Kim et al. 2005). Die Produktion von ROS führt zur Akkumulation von  $H_2O_2$  über die Aktivierung von flavoprotein-abhängigen superoxid-produzierenden Enzymen wie  $NADP^+$  (NADPH) und Oxidase.  $H_2O_2$  wiederum führt über die Oxidation von Thiolen in der Mitochondrienmembran zum Verlust des Membranpotenzials, gefolgt von Cytochrom-C-Freisetzung, Kaspase-3-Aktivierung und DNA-Fragmentierung (Jing et al. 1999, Larochette et al. 1999, Shen et al. 2000). Shen et al. untersuchten die Wirkung von Arsentrioxid an Ösophaguskarzinomzellen und beobachteten die Veränderung an den Mitochondrien der behandelten Zellen in Form von Aggregation und Akkumulation von elektronenmikroskopisch verdichteter amorpher Substanz, Anschwellung und Platzen der Mitochondrien zwei Stunden nach Behandlung, was wiederum zur Apoptose führte (Shen et al. 2000). Davison et al. zeigten ebenfalls, dass bei sensitiven Zellen als Antwort auf die Arsentrioxid-Exposition ROS generiert wurden und intrazellulär akkumulierten. Diese ROS-Akkumulation erfolgte aber nicht in resistenten Subklonen (Davison et al. 2002).

Neuroblastomzellen stehen aufgrund der Katecholaminproduktion schon unter physiologischen Bedingungen unter einem hohen Oxyradikaldruck. Bei der Oxidation von Dopamin und anderen Katecholaminzwischenprodukten entstehen Peroxide, Hydroxylradikale, Superoxide und freie Radikale (Tiffany-Castigleoni 1982, Ginuta et al. 1991).

Außerdem verfügen Neuroblastomzellen über einen hohen Anteil an Ferritin. Inacu et al. zeigten, dass gerade bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien (Stage III und IV) der Anteil von Ferritin bzw. Eisenverbindungen in den Tumorzellen und ebenfalls der Serum-Ferritin-Spiegel (bei den meisten Stage IV Patienten) erhöht war. Dies führt neben der Katecholaminproduktion ebenfalls zu einer Erhöhung des Oxyradikalgehalts, da reduzierte Metalle wie  $\text{Fe}^{2+}$  in der Fenton-Reaktion zur Oxidation neigen:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$  (Iancu et al. 1988).

Dieser hohe Oxyradikaldruck lässt den Rückschluss zu, dass bei Neuroblastomzellen eine hohe Auslastung des antioxidativen Systems, auf das im Folgenden noch genauer eingegangen werden soll, besteht. Wenn aber das antioxidative System bereits unter physiologischen Bedingungen ausgelastet ist, liegt es nahe, dass Arsentrioxid über die ROS-Produktion beim Neuroblastom eine entsprechend starke Wirkung erzielen muss.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Wirksamkeit des Arsentrioxids bei Neuroblastom bestätigt werden. Mit einer ID50 zwischen 2,8 und 5  $\mu\text{M}$  liegt diese bei vier von fünf getesteten Neuroblastomzellen im Bereich der physiologischen Konzentration, also dem klinisch erreichbaren Serumspiegel (ca. 6  $\mu\text{M}$  – vgl. Abschnitt Pharmakokinetik und Pharmakodynamik). Lediglich bei der LS-Zell-Linie lag die ID50 mit 15  $\mu\text{M}$  außerhalb des physiologischen Bereichs. Interessanterweise produzieren die Zellen dieser Zell-Linie im Gegensatz zu den anderen getesteten Neuroblastom-Zell-Linien keine Katecholamine. Sie synthetisieren zwar DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin), wandeln dieses aber nicht weiter in Dopamin und Katecholamine um (Kuci et al. 2002). Möglicherweise verfügt diese Zell-Linie aber auch über ein besonders effektives *antioxidatives* System, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

### 5.2.2 Glutathion

Glutathion ist ein aus Glycin, Glutamat und Cystein bestehendes Tripeptid, das eine wesentliche Rolle beim Abbau von intrazellulären ROS spielt. Es kann mit seinen Schwefelwasserstoffgruppen Radikale und Peroxide reduzieren, da es zu Autooxidation neigt (Meister et al. 1983 und 1988). Wenn also Arsentrioxid seine Wirkung unter anderem über die Produktion von ROS entfaltet, liegt es nahe, dass die Wirksamkeit von Arsentrioxid umso stärker ist, je geringer die Konzentration an intrazellulären Antioxidanzien ist, wobei hier insbesondere das Glutathion zu nennen ist.

Dai et al. untersuchten den Glutathiongehalt von APL-Zellen im Zusammenhang mit deren Empfindlichkeit für Arsentrioxid. Es stellte sich heraus, dass die hoch sensiblen APL-Zellen den niedrigsten Glutathiongehalt aufwiesen und dass der Glutathiongehalt bei anderen Zell-Linien umgekehrt mit der Sensitivität für Arsentrioxid korrelierte. Eine experimentelle Erhöhung des Glutathiongehalts senkte die Empfindlichkeit für Arsentrioxid (Dai et al. 1999). Yang et al. untersuchten verschiedene Karzinomzellen und fanden ebenfalls heraus, dass je niedriger der Glutathiongehalt, desto höher die Empfindlichkeit für Arsentrioxid (Yang et al. 1999). Nakagawa et al. konnten diesen Zusammenhang an Kolonkarzinomzellen nachweisen. Außerdem zeigten sie, dass die Produktion von ROS nach Behandlung mit Arsentrioxid anstieg (Nakagawa et al. 2002).

Auch Seo et al. stellten fest, dass die Wirksamkeit von Arsentrioxid bei multiresistenten Leukämiezellen umso höher war, je geringer die Glutathionkonzentration (Seo et al. 2005).

Kitamura et al. und Davison et al. verglichen die basale Glutathionkonzentration zwischen den für Arsentrioxid sensitiven APL-Parentalzellen und resistenten Subklonen. Sie fanden heraus, dass bei den arsentrioxid-resistenten Subklonen eine höhere basale intrazelluläre Glutathionkonzentration bestand als bei den sensitiven Parentalzellen. Eine Senkung des Glutathiongehalts wiederum führte auch in den resistenten Subklonen zu deutlicher Wachstumshemmung - konnte

also die Empfindlichkeit wieder herstellen - und zu erhöhter ROS-Formation (Kitamura et al. 2000, Davison et al. 2003).

An Neuroblastomzellen zeigten erstmals Akao et al., dass die für Arsentrioxid sensitiven Zell-Linien einen geringeren Glutathiongehalt aufwiesen als die resistenten. N-Acetylcystein, das dem Körper Cystein zur Glutathionbildung zur Verfügung stellt, schützte die Neuroblastomzellen vor der arsentrioxid-induzierten Apoptose (Akao et al. 2000).

Zusätzlich zu den genannten Mechanismen kann Glutathion Tumorzellen auf verschiedene andere Weisen vor zytotoxischen Agenzien wie Arsentrioxid schützen. Zum einen beeinflusst die intrazelluläre Glutathionkonzentration den MRP1 (multidrug resistance-associated protein)-vermittelten Anionen-Transport. Durch Senken des Glutathiongehalts konnte dieser Anionen-Transport reduziert, durch Erhöhung gesteigert werden (Bagri et al. 2001). Dieser Transporter ist auch für den Arsentrioxid-Efflux zuständig, wie Lorico et al. zeigten. Sie wiesen nach, dass bei geringer Glutathionkonzentration der Arsentrioxid-Efflux schlechter war als bei höherer Glutathionkonzentration (Lorico et al. 2002). Gleichermaßen stellten Seo et al. fest, dass die MRP1-abhängige Resistenz von multiresistenten Leukämiezellen durch Senken des intrazellulären Glutathiongehalts überwunden werden konnte (Seo et al. 2005). Je höher also die Glutathionkonzentration ist, desto besser können Substanzen wie Arsentrioxid wieder aus der Zelle ausgeschleust werden.

Des Weiteren spielt Glutathion eine Rolle im Arsenabbau. Die Metabolisierung von Arsen wird - wie bereits beschrieben - durch Redox-Reaktionen und Methylierung erreicht, woran auch reduziertes Glutathion beteiligt ist (vgl. Abb. 25 auf Seite 46). Außerdem bindet Glutathion das Arsentrioxid, indem es mit ihm einen Komplex ( $\text{As}(\text{SG})_3$ ) bildet. Diese Komplexbildung beschrieben Scott et al. bei einem molaren Verhältnis Arsen zu Glutathion von mindestens 1:2. Darüber hinaus werden auch die methylierten Metaboliten MMA und DMA über die Bindung an Glutathion eliminiert. Sie binden zunächst an die Thiol-Gruppe, gefolgt von einer Verschiebung an das Kohlenstoffatom an der Sulfhydryl-Gruppe des Cysteinyl-Restes (Scott et al. 1993).

Der Abbau von ROS benötigt zur Katalyse außerdem die Glutathionperoxidase (Jing et al. 1999). Jing et al. zeigten an APL-Zellen, dass in vitro eine erhöhte Empfindlichkeit für Arsentrioxid besteht, wenn die intrazelluläre Glutathionperoxidasekonzentration niedrig ist (Empfindlichkeit für Arsentrioxid ID50 0,5-1µM). In diesen Zellen war auch der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt höher als in anderen Leukämie-Zellen, bei denen zugleich auch eine höhere Arsentrioxidkonzentration (über 2 µM) zur Wachstumshemmung erforderlich war. Mit Selenit konnte die Aktivität der Glutathionperoxidase erhöht und als Folge die Empfindlichkeit für Arsentrioxid gesenkt werden. Umgekehrt konnte wiederum die Empfindlichkeit durch Mercaptobernsteinsäure, einen Inhibitor der Glutathionperoxidase, für Arsentrioxid gesteigert werden (Jing et al. 1999).

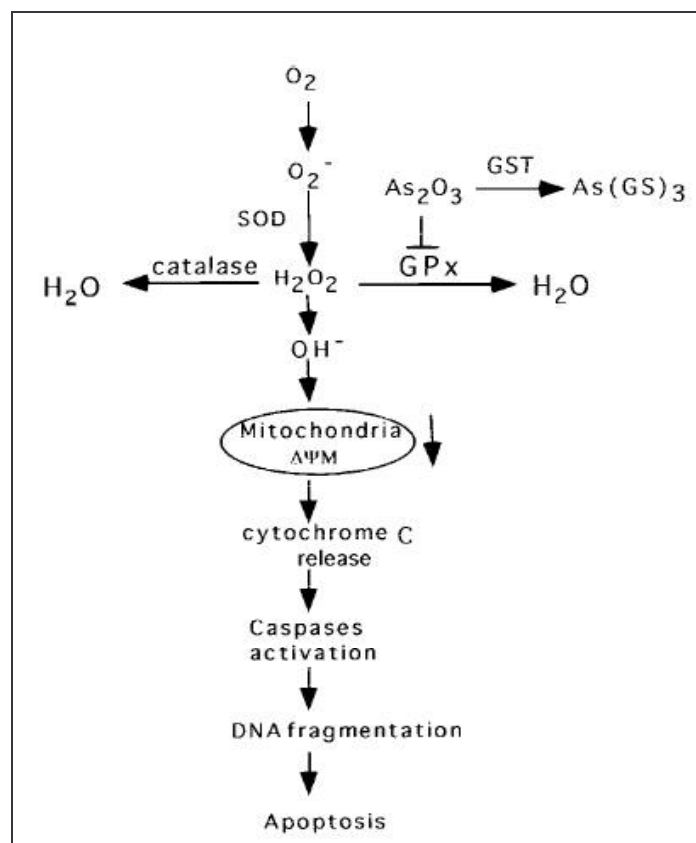


Abb. 26: Schematische Darstellung der Vorstellung über die Apoptoseinduzierung durch Arsentrioxid. GST: Glutathion-S-Transferase, GPx: Glutathionperoxidase, SOD: (aus: Jing et al. Blood. 1999 Sep 15;94(6):2102-11)

Es konnte also bereits gezeigt werden, dass die intrazelluläre ROS-Akkumulation ein entscheidender Wirkmechanismus des Arsentrioxids ist und diese wiederum direkt von der intrazellulären Glutathionkonzentration abhängt.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich bei den getesteten Zell-Linien ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit für Arsentrioxid und dem intrazellulären Glutathiongehalt feststellen. Die empfindlichste Neuroblastom-Zell-Linie LA-N-1 (ID50: 2,8  $\mu\text{M}$ ) weist die niedrigste Glutathionkonzentration auf. Die Neuroblastom-Zell-Linien mit einer ID50 zwischen 4,0 und 5,3  $\mu\text{M}$  liegen mit ihrer basalen Glutathionkonzentration in der Mitte. Und die am wenigsten empfindliche Neuroblastom-Zell-Linie LS (ID50: 15  $\mu\text{M}$ ) weist die höchste intrazelluläre Glutathionkonzentration auf. Dies bestätigt die Hypothese, dass die LS-Zell-Linie über ein besonders ausgeprägtes antioxidatives System verfügt.

Zusätzlich zu den Neuroblastomzellen wurden in der vorliegenden Arbeit zum Vergleich verschiedene andere maligne Zellen eingesetzt, bei denen ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Empfindlichkeit für Arsentrioxid und der Glutathionkonzentration ermittelt werden konnte. Wir setzten eine Kolonkarzinom-Zell-Linie (HT-29) und eine Melanom-Zell-Linie (MeWo) ein, bei denen wir eine ähnliche Empfindlichkeit für Arsentrioxid vermuteten wie beim Neuroblastom. Beim Melanom entstehen während der Melaninsynthese - genau wie bei der Katecholaminsynthese – ROS (Bailey et al. 1998), was wiederum zur Auslastung des antioxidativen Systems führt.

An Kolonkarzinomzellen zeigten Nakagawa et al. bereits, dass diese empfindlich auf Arsentrioxid reagierten (ID50 2  $\mu\text{M}$ ) und dass die Produktion von ROS nach Behandlung mit Arsentrioxid anstieg (Nakagawa et al. 2002). Bei den vorliegenden Versuchen bestätigte sich die Hypothese an beiden Zell-Linien. Die Melanom-Zell-Linie lag mit einer ID50 von 4,5  $\mu\text{M}$  im Bereich des unter physiologischen Bedingungen erreichbaren Serumspiegels ebenso die Kolonkarzinom-Zell-Linie mit einer ID50 von 5,0  $\mu\text{M}$ .

Die Bestimmung der basalen Glutathionkonzentration bei der Melanom- und bei der Kolonkarzinom-Zell-Linie erbrachte auch hier einen Zusammenhang mit der ID50 – je niedriger der Glutathiongehalt war, desto niedriger auch die ID50.

Ebenso verhielt es sich mit den Zell-Linien, die in den Versuchen die höchste ID50 für Arsentrioxid aufgewiesen hatten, nämlich die Mammakarzinom-Zell-Linie (MDA-MB-231) und die Zell-Linie des hepatozellulären Karzinoms (Hep G2). Bei diesen Zell-Linien wurde im Vergleich zu den empfindlicheren die höchste Glutathionkonzentration gemessen.

Wir konnten also zeigen, dass die Wirksamkeit von Arsentrioxid umso besser ist, je geringer die intrazelluläre Glutathionkonzentration ist. Dies stützt die Hypothese, dass ein entscheidender Wirkmechanismus von Arsentrioxid die Erhöhung von intrazellulären ROS ist.

### 5.2.3 Buthionin-Sulfoximin (BSO)

Wenn nun - wie bewiesen - ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Glutathionkonzentration und der Wirksamkeit von Arsentrioxid besteht, muss dessen Effektivität steigerbar sein, wenn man die Glutathionkonzentration senkt.

BSO ist ein spezifischer Inhibitor der Glutathionsynthese. Es hemmt kompetitiv das für die Glutathion-de-novo-Synthese entscheidende Enzym, die Gamma-Glutamylcystein-Synthetase (=Glutamate-cysteine-ligase) (Griffith et al.1979, Meister et al. 1983 und 1988).

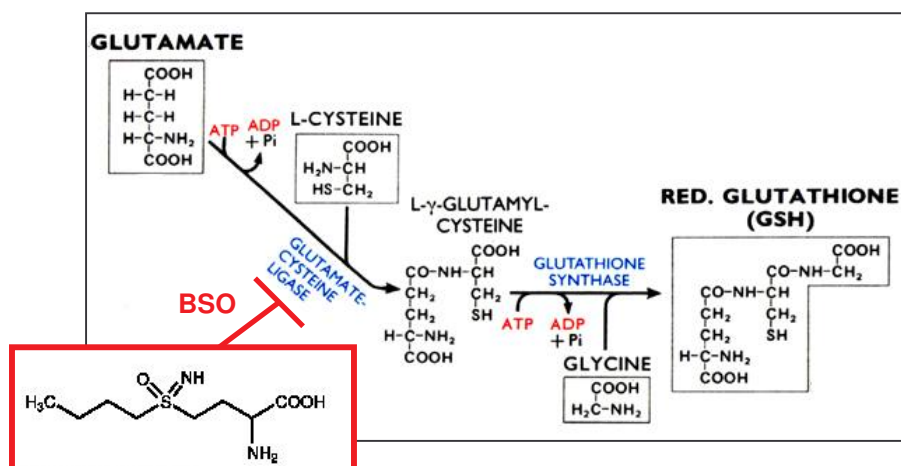


Abb. 27: Mechanismus der Glutathionsynthese. Hemmung durch BSO

## Präklinische Studien

Vorausgegangene Versuche zur zytotoxischen Wirkung von BSO allein zeigten, dass BSO in vitro eine minimale zytotoxische Wirkung an Tumorzellen aufweist mit Ausnahme des Melanoms und des Neuroblastoms. So zeigten Prezioso et al., dass bei Melanomzellen die IC<sub>90</sub> für BSO bei unter 100 µM lag und mit erhöhter Pigmentation einherging. Eine Erklärung könnte - wie bereits erwähnt - sein, dass während der Melaninsynthese - ähnlich wie beim Neuroblastom bei der Katecholaminsynthese - ebenfalls Chinone entstehen, die die ROS-Bildung fördern. BSO steigerte die Wirkung von 3,4-Dihydroxybenzylamin vierfach und von Melphalan dreifach in vitro und zeigte in vivo am Mausmodell Antimelanom-Aktivität (Prezioso et al 1992).

Beim Neuroblastom war durch BSO allein ebenfalls ein zytotoxischer Effekt zu erwarten, da das Glutathion ein entscheidender Mediator im Abbau der während der Katecholaminsynthese entstehenden ROS ist. Anderson et al. zeigten, dass BSO bei 18 Neuroblastom-Zell-Linien eine zytotoxische Wirkung erzielte (ID<sub>90</sub> zwischen 2,1 µM und 1000 µM) und wiesen unter dem Einfluss von BSO eine erhöhte ROS-Bildung nach. Der maximale Zelltod erfolgte nach 48 Stunden. Der Effekt konnte mit Antioxidanzien wie Glutathion selbst, Vitamin E und Vitamin C rückgängig gemacht werden, was den Wirkmechanismus bestätigte (Anderson et al.1999).

Für die Kombination von BSO mit verschiedenen Chemotherapeutika liegen präklinische Studien vor, die zeigen, dass BSO die Wirksamkeit dieser Therapeutika steigern kann. Ozols et al. zeigten bereits, dass durch Reduzierung der Glutathionkonzentration mittels BSO die Wirksamkeit von Melphalan um das 3,6fache bei Ovarialkarzinom-Zellen in vitro und auch in vivo an Mäusen gesteigert werden kann, ohne dass die Toxizität von Melphalan gesteigert wurde (Ozols et al 1987). Lee et al. untersuchten die Beziehung zwischen der Glutathiondepletion mit BSO und der Sensitivität für Doxorubicin. Die Zytotoxizität konnte signifikant erhöht werden und war umgekehrt proportional zum intrazellulären Glutathiongehalt (Lee et al. 1988). Vanhoefer et al. wiesen nach, dass in vivo am Mausmodell durch die Senkung des Glutathiongehalts eine MRP1-vermittelte Resistenz gegen Doxorubicin



mittels BSO umgekehrt werden konnte (Vanhoefer et al. 1996). Wie bereits beschrieben, ist das Glutathion eine regulatorische Determinante für das MRP1. Bisherige In-vitro-Untersuchungen zur Kombination von Arsenitoxid und BSO an verschiedenen malignen Zellen, darunter B-Zell-Lymphomzellen, Plasmozytom-, Blasenkarzinom-, Nierenkarzinom-, Kolonkarzinom-, Mammakarzinom-, Zervixkarzinom, Prostatakarzinom- und Lungenkarzinom-Zellen zeigten ebenfalls, dass BSO den zytotoxischen Effekt von Arsenitoxid steigern kann (Dai et al. 1999, Yang et al. 1999, Nakagawa et al. 2002, Gartenhaus et al. 2002, Maeda et al. 2004). Jüngste Untersuchungen an Leukämie- und Lymphomzellen von Chen et al. zeigten ebenfalls, dass 10 µM BSO den intrazellulären Glutathiongehalt senken und in Kombination mit 1 µM Arsenitoxid auch bei zuvor resistenten Zellen zur Apoptose führen kann. Dieser Synergismus – nicht aber Arsenitoxid allein - korrelierte mit einer Aktivierung der c-JUN NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase, zu einer erhöhten Expression von death-receptor-5 und Kaspase-8-Spaltung (Chen et al. 2006). Im Mausmodell untersuchten Lee et al. die Wirkung von Arsenitoxid an AML (akute myeloische Leukämie)-Zellen in vivo. Die Zellen entwickelten in vivo eine Resistenz gegen Arsenitoxid, die durch BSO wieder rückgängig gemacht werden konnte. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein kompensatorischer Anstieg des Glutathions auf Arsenitoxid für die Resistenzentwicklung verantwortlich ist, dem aber mittels BSO entgegen gewirkt werden kann (Lee et al. 2006).

Es liegen verschiedene Untersuchungen vor, die sich mit dem Effekt von BSO auf normales Gewebe im Vergleich zu Tumorgewebe befassten. Lee et al. untersuchten die Effekte von BSO auf den Glutathiongehalt in verschiedenen normalen Geweben. Sie stellten fest, dass die unterschiedlichen Gewebe signifikant unterschiedlich auf BSO reagieren. Am stärksten wurde das Glutathion in der Niere (80%), Leber (74%) und Knochenmark (83%) abgebaut, gefolgt von Herz (54%), Lunge (40%) und zuletzt den roten Blutkörperchen (13%). Eine Untersuchung der Dosis-Depletions-Beziehung zeigte, dass für Tumorzellen niedrigere BSO-Konzentrationen benötigt werden als für normales Gewebe (Lee et al. 1987).

Watanabe et al. untersuchten die Toxizität von BSO an gesunden Mäusen. Sie verabreichten den Mäusen 14 Tage lang BSO im Trinkwasser. Die

Glutathionkonzentration sank unter 50% in Leber, Niere, Lunge, Herz, Milz, Pankreas, Intestinaltrakt, Skelettmuskel, Plasma und Blutzellen unter Gabe von 20 mM BSO über eine 24-stündige Periode. Es zeigte sich keine Toxizität bei dieser Konzentration. Erst bei einer Gabe von 30 mM kam es zu einem Gewichtsverlust der Leber (Watanabe et al. 2003).

Kramer et al. verglichen die Toxizität von Melphalan nach Vorbehandlung mit BSO gegenüber Tumorgewebe (Leukämiezellen) und normalem Gewebe bei Mäusen. Sie verabreichten das BSO über multiple Injektionen (fünfmal 450 mg/kg intraperitoneal alle sechs Stunden). Es stellte sich heraus, dass die Vorbehandlung mit BSO zu einer deutlich reduzierten Erholung der peripheren weißen Blutkörperchen bei Melphalan-Dosierung auf Höhe der ID10 führte. Außerdem konnte BSO in Bezug auf die Antitumor-Aktivität den therapeutischen Index (LD10/ED50) für Melphalan von 3,6 auf 6,5 erhöhen (Kramer et al. 1987).

### Klinische Studien

In klinischen Studien (drei Phase I Studien der Uni Wisconsin und des Fox-Chase Cancer Center) wurde zunächst BSO mit Melphalan kombiniert eingesetzt. BSO wurde bei 28 Patienten mit refraktären malignen Erkrankungen zunächst in einer 30-minütigen Infusion als Bolus alle 12 Stunden über eine Woche verabreicht, gefolgt in Woche zwei von entweder Melphalan allein (15 mg/m<sup>2</sup> intravenös) oder zusammen mit BSO (1,5 g/m<sup>2</sup> bis 13.104 g/m<sup>2</sup>) wie in Woche eins. Es konnten maximale Serumspiegel für BSO von 4 bis 8 mM erreicht werden, die allerdings mit einer Halbwertszeit von unter zwei Stunden schnell abfielen und eine biexponentielle Elimination zeigten. Zwölf Stunden nach der sechsten BSO-Dosis trat der maximale Glutathionabfall (gemessen in peripheren mononukleären Zellen) auf, der nicht dosisabhängig war (40% des basalen Werts). Mehr als sechs Dosen führten nicht zu einem weiteren Abfall. Für BSO konnte eine gute Verträglichkeit nachgewiesen werden. Während der Infusionen traten lediglich gelegentliche Übelkeit und Erbrechen auf. Bei der Kombinationsgabe von BSO und Melphalan kam es allerdings zu einer signifikant (P<0,001) stärkeren Leukopenie und Thrombopenie als bei Melphalan allein. Weitere toxische Effekte traten nicht auf (Bailey et al. 1994).

In einer zweiten Studie wurden 41 Patienten mit Ovarialkarzinom und kleinzelligem Lungenkarzinom nach obigem Schema und einer BSO-Dosis von 1,5 bis 17 g/m<sup>2</sup> behandelt. Der Glutathiongehalt in den peripheren mononukleären Zellen bzw. Tumorbiopsien fiel über 36 bis 72 Stunden kontinuierlich ab und erlangte den Tiefstwert am dritten Tag von etwa 10% der Kontrolle bei BSO-Dosen von  $\geq 7,5$  g/m<sup>2</sup>. Bei einer Dosis von 13 g/m<sup>2</sup> lag der Wert bei unter 20%. Mittlere Halbwertszeit war 1,39 Stunden und 1,89 Stunden für R-BSO und S-BSO, respektive. Einzige Nebenwirkungen waren auch hier Übelkeit und Erbrechen (Grad I oder II) bei 50% der Patienten (Gallo et al. 1995, O'Dwyer et al. 1996). Aufgrund der Beobachtung, dass BSO so rasch eliminiert wurde, führten Bailey et al. eine weitere Studie durch, bei der sie das BSO kontinuierlich über 24 bis 72 Stunden verabreichten. Dabei wurde mit einer initialen 30-minütigen Infusion von 3,0 g/m<sup>2</sup> BSO begonnen und kontinuierlich eine Rate von 0,75 g/m<sup>2</sup> pro Stunde über ein, zwei oder drei Tage verabreicht. In der ersten Woche erhielten die Patienten BSO allein, danach in Kombination mit 15 mg/m<sup>2</sup> Melphalan in Woche zwei bis drei, die Kombination aus BSO und Melphalan wurde nach vier Wochen wiederholt. Durch die kontinuierliche Infusion konnte der Glutathiongehalt auf unter 10% gesenkt werden. Die toxischen Effekte waren auch hier gering, obgleich BSO kombiniert mit Melphalan gelegentlich eine schwere Myelosuppression (Grad 4) und geringgradig Übelkeit und Erbrechen hervorrief (Bailey et al. 1997, 1998).

### Eigene Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von BSO auf die intrazelluläre Glutathionkonzentration untersucht. Wir konnten nachweisen, dass bei allen eingesetzten Zell-Linien die Glutathionkonzentration nach 48-stündiger Inkubation mit 100  $\mu$ M BSO signifikant abnahm.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigten bei allen getesteten Zell-Linien, dass ein signifikanter additiver zytotoxischer Effekt schon bei einer BSO-Konzentration von einem Zehntel des physiologisch erreichbaren Serumspiegels erzielt werden kann. Nach 48-stündiger Koinkubation der Zellen mit 100  $\mu$ M BSO und Arsentrioxid in jeweiliger ID-50-Konzentration zeigte sich ein deutlicher additiver Effekt. Es kam zur Reduzierung der überlebenden

Zellen von einem Wert von circa 50% bei Arsentrioxid allein auf ca. 10% bei Koinkubation mit BSO.

Unsere Versuche zeigten auch, dass BSO allein bei Neuroblastomzellen einen zytotoxischen Effekt erzielt. Am sensitivsten reagierte - wie auch schon beim Arsentrioxid - die LA-N-1-Zell-Linie. Bei 100  $\mu$ M BSO lag die Zahl der überlebenden Zellen hier noch bei 40%, bei den übrigen Neuroblastomzellen bei ca. 60%. Bei den anderen getesteten Zell-Linien zeigte sich kein zytotoxischer Effekt durch BSO allein.

An den für Arsentrioxid in vitro weniger empfindlichen Zell-Linien, bzw. den Zell-Linien, bei denen unter physiologischen Bedingungen in vivo eine primäre Resistenz zu postulieren wäre, nämlich die Zell-Linien LS, MDA-MB-231 und Hep-G2, konnten wir zeigen, dass BSO als Chemosensitizer an Tumorzellen mit glutathionbedingter Resistenz gegen Arsentrioxid wirkt. Die ID50 für Arsentrioxid konnte bei den drei Zell-Linien durch Koinkubation mit BSO auf den Wert der am sensitivsten reagierenden Zell-Linie, nämlich der APL-Zell-Linie HL 60 gesenkt werden.

#### **5.2.4 Zusammenfassung**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass Arsentrioxid im pharmakologisch relevanten Konzentrationsbereich einen zytotoxischen Effekt auf Neuroblastomzellen in vitro hat. Dies trifft ebenfalls für Melanom- und Kolonkarzinomzellen zu. Indirekt konnten wir zeigen, dass sich dieser Effekt aufgrund arsentrioxidbedingter Bildung von ROS einstellt, indem wir eine negative Korrelation zwischen der Sensitivität der Zell-Linien für Arsentrioxid und dem intrazellulären Glutathiongehalt bei allen getesteten Zell-Linien nachwiesen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch BSO der intrazelluläre Glutathiongehalt bei allen getesteten Zell-Linien signifikant reduziert und durch die Kombination von BSO und Arsentrioxid ein additiver zytotoxischer Effekt an Neuroblastomzellen erzielt werden kann.

Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass BSO an Tumorzellen mit glutathionbedingter Resistenz gegen Arsentrioxid über eine signifikante Reduktion des Glutathiongehalts als effektiver Chemosensitizer wirkt.

Die bisherige Datenlage belegt außerdem, dass Arsentrioxid eine praktikable Dosierung bei relativ geringer Toxizität aufweist und prinzipiell eine geeignete Alternative zu den herkömmlichen Chemotherapeutika ist. BSO als mögliche Comedikation weist ebenfalls eine geringe Toxizität auf. Eine Schwierigkeit für den klinischen Einsatz von BSO ist allerdings die rasche Elimination, die aber durch kontinuierliche Verabreichung über wenige Tage umgangen werden kann.

### **5.2.5 Ausblick / Perspektiven**

Viel versprechend ist vor allem der Einsatz der Kombination von Arsentrioxid und BSO beim Neuroblastom. Die hypothetischen Überlegungen decken sich mit den Ergebnissen der *in vitro* Versuche. Die Behandlung von Neuroblastomen mit Arsentrioxid und vorangegangener Sensitivierung mit BSO müsste nun zunächst anhand von Tierversuchen und schließlich mittels klinischer Studien untersucht werden.

Ora et al. untersuchten bereits den *in vivo* Effekt von Arsentrioxid allein auf Neuroblastome *in vivo* an Nacktmäusen. Das Tumorwachstum wurde zwar reduziert, eine komplette Remission stellte sich allerdings bei den eingesetzten Dosierungen von täglich 200 µg Arsentrioxid nicht ein (Ora et al. 2000). Eine Untersuchung über die Kombination von Arsentrioxid mit BSO müsste allerdings noch durchgeführt werden.

Aufbauend auf unseren Ergebnissen könnten außerdem klinische Studien zeigen, ob sich diese Kombination bei der Behandlung des Neuroblastoms als effektiv erweist und ob es Wechselwirkungen zwischen Arsentrioxid und BSO gibt, die sich möglicherweise auf Pharmakokinetik, -dynamik und Nebenwirkungen auswirken.

Eine klinische Phase II Studie für Arsentrioxid allein bei Patienten mit fortgeschrittenem Neuroblastom oder anderen soliden pädiatrischen Tumoren läuft seit dem Jahr 2001 am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York. (Kushner B et al.), von der bisher allerdings noch keine veröffentlichten Ergebnisse vorliegen.

Seit 2005 läuft ebenfalls am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center außerdem eine Phase II Studie bei der <sup>131</sup>Jod-Metajodbenzylguanidin und Arsentrioxid zur Behandlung von Patienten mit rezidiviertem, fortschreitendem oder refraktärem Neuroblastom oder malignem Phäochromozytom oder Paragangliom untersucht wird (Shakeel Modak et al., Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York). Ergebnisse liegen auch hier noch nicht vor.

In Bezug auf die Behandlung des Neuroblastoms mit BSO läuft seit 2000 eine klinische Phase I Studie, bei der die Therapie mit einer Kombination von Melphalan und BSO gefolgt von Knochenmarks- oder peripherer Stammzelltransplantation bei Kindern mit resistentem oder rezidiviertem Neuroblastom untersucht wird (Villablanca JG et al., Children's Hospital Los Angeles). Die Dosierung des BSOs erfolgt wie schon in der Studie von Bailey beschrieben mit einem Bolus über 30 Minuten, gefolgt von einer kontinuierlichen Gabe über 72 Stunden. Auch hier liegen noch keine Veröffentlichungen der Ergebnisse vor.

Die Auswertung der Ergebnisse dieser drei Studien kann Hinweise für mögliche Studiendesigns geben.

## **6. Zusammenfassung**

**HINTERGRUND:** Arsenitrioxid induziert die klinische Remission bei akuter Promyelozytenleukämie (APL) durch die intrazelluläre Bildung von Oxyradikalen (ROS = reactive oxygen species). Da katecholaminproduzierende Neuroblastomzellen während der Katecholaminsynthese schon von vorn herein hohen Oxyradikalkonzentrationen ausgesetzt sind, ist bei diesen Zellen eine im Vergleich zu anderen malignen Zellen höhere Empfindlichkeit für Arsenitrioxid zu erwarten. Außerdem kann vermutet werden, dass die Empfindlichkeit verschiedener Tumorzellen für Arsenitrioxid umgekehrt mit deren antioxidativer Kapazität korreliert. Diese Hypothese wurde durch die folgenden Ergebnisse bestätigt.

**ERGEBNISSE:** Das Wachstum der Neuroblastom-Zell-Linien LA-N-1, LA-N-5, SH-SY5Y und HSJD konnte durch Arsenitrioxid in Konzentrationen, die mit klinisch erreichbaren Serumspiegeln bei APL-Patienten vergleichbar sind, deutlich gehemmt werden (ID 50: 2,8  $\mu\text{M}$ , 4,0  $\mu\text{M}$ , 5,3  $\mu\text{M}$  und 5,0  $\mu\text{M}$  respektive). Der wachstumshemmende Effekt korrelierte umgekehrt mit dem intrazellulären Gehalt an Glutathion, einem entscheidenden intrazellulären Antioxidanz. Im Gegensatz dazu waren die Mammakarzinom-Zell-Linie MDA-MB-231 und die Zell-Linie eines hepatozellulären Karzinoms Hep G2 hoch resistent gegen Arsenitrioxid (ID 50: 10,0  $\mu\text{M}$ , 8,0  $\mu\text{M}$  respektive). BSO – ein spezifischer Inhibitor der Glutathionsynthese – konnte diese Resistenz komplett aufheben.

**SCHLUSSFOLGERUNG:** Wir zeigten (a), dass Arsenitrioxid aufgrund seiner ROS-bildenden Aktivität ein viel versprechendes neues Medikament zur Behandlung des Neuroblastoms sein könnte und (b), BSO ein potenter Chemosensitizer für maligne Zellen mit immanenter glutathionbedingter Resistenz gegen ROS-bildende Medikamente wie Arsenitrioxid ist.

## **6. Summary**

**BACKGROUND:** Arsenic trioxide induces clinical remission in acute promyelocytic leukemia (APL) by the generation of intracellular reactive oxygen species (ROS). As neuroblastoma cells are already exposed to high levels of ROS during the synthesis of catecholamines a higher sensitivity of neuroblastoma cells for arsenic trioxide may be expected compared with other malignant cells. Moreover, it may be assumed that the sensitivity of different tumor cells for arsenic trioxide is inversely correlated with their radical scavenging capacity. This hypothesis has been confirmed by the following.

**RESULTS:** Proliferation of the neuroblastoma cell lines LA-N-1, LA-N-5, SH-SY5Y and HSJD could be inhibited by arsenic trioxide concentrations, which are comparable with tolerable serum levels in APL-patients (50 % inhibitory concentration (ID 50): 2,8  $\mu\text{M}$ , 4,0  $\mu\text{M}$ , 5,3  $\mu\text{M}$  and 5,0  $\mu\text{M}$  respectively). The antiproliferative effect of arsenic trioxide did inversely correlate with the intracellular concentration of glutathione (GSH), which is the main ROS-scavenger. In contrast the breast carcinoma MDA-MB-231 and the hepatocellular carcinoma cell line Hep-G2 have been highly resistant against arsenic trioxide (ID 50: 10,0  $\mu\text{M}$ , 8,0  $\mu\text{M}$  resp.). This resistance could be completely reversed by buthionine sulfoximine which is a potent inhibitor of GSH-synthesis.

**CONCLUSION:** We showed (a) that arsenic trioxide may be a promising new agent for neuroblastoma therapy due to its ROS-generating activity and (b) that buthionine sulfoximine is a potent chemosensitizer of malignant cells with GSH-mediated innate resistance against ROS-generating agents like arsenic trioxide.



## **7. Literaturverzeichnis**

Abou-Jawde RM, Reed J, Kelly M, Walker E, Andresen S, Baz R, Karam MA, Hussein M (2006) Efficacy and safety results with the combination therapy of arsenic trioxide, dexamethasone, and ascorbic acid in multiple myeloma patients: a phase 2 trial. *Med Oncol.* 23(2):263-72

Akao Y, Mizoguchi H, Kojima S, Naoe T, Ohishi N, Yagi K (1998) Arsenic induces apoptosis in B-cell leukaemic cell lines in vitro: activation of Kaspases and down-regulation of Bcl-2 protein. *Br J Haematol.* 102(4):1055-60

Akao Y, Nakagawa Y, Akiyama K (1999) Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of Kaspase 3 in vitro. *FEBS Lett* 455:59–62

Akao Y, Yamada H, Nakagawa Y (2000) Arsenic-induced apoptosis in malignant cells in vitro. *Leuk Lymphoma.* 37(1-2):53-63

Anderson CP, Tsai J, Chan W, Park CK, Tian L, Lui RM, Forman HJ, Reynolds CP (1997) Buthionine sulphoximine alone and in combination with melphalan (L-PAM) is highly cytotoxic for human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer* 33(12):2016-9

Anderson CP, Tsai JM, Meek WE, Liu RM, Tang Y, Forman HJ, Reynolds CP (1999) Depletion of glutathione by buthionine sulfoximine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis. *Exp Cell Res* 10;246(1):183-92

Au WY, Kwong YL (2005) Frequent varicella zoster reactivation associated with therapeutic use of arsenic trioxide: portents of an old scourge. *J Am Acad Dermatol* 53 (5):890-2

- Bagrij T, Klokouzas A, Hladky SB, Barrand MA (2001) Influences of glutathione on anionic substrate efflux in tumour cells expressing the multidrug resistance-associated protein, MRP1. *Biochem Pharmacol* 62(2):199-206
- Bahlis NJ, McCafferty-Grad J, Jordan-McMurry I, Neil J, Reis I, Kharfan-Dabaja M, Eckman J, Goodman M, Fernandez HF, Boise LH, Lee KP (2002) Feasibility and correlates of arsenic trioxide combined with ascorbic acid-mediated depletion of intracellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 8(12):3658-68
- Bailey HH, Mulcahy RT, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Tombes MB, Wilding G, Pomplun M, Spriggs DR (1994) Phase I clinical trial of intravenous L-buthionine sulfoximine and melphalan: an attempt at modulation of glutathione. *J Clin Oncol* 12(1):194-205
- Bailey HH, Ripple G, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Feierabend C, Mahvi D, Schink J, Pomplun M, Mulcahy RT, Wilding G (1997) Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J Natl Cancer Inst* 89(23):1789-96
- Bailey HH (1998) L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chem Biol Interact* 111-112:239-54
- Barbey JT, Pezzullo JC, Soignet SL (2003) Effect of arsenic trioxide on QT interval in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 21(19):3609-15
- Barbey JT, Soignet S (2001) Prolongation of the QT interval and ventricular tachycardia in patients treated with arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *Ann Intern Med* 135(9):842-3
- Barbey JT (2001) Cardiac toxicity of arsenic trioxide. *Blood* 98(5):1632; author reply 1633-4

- Beer TM, Tangen CM, Nichols CR, Margolin KA, Dreicer R, Stephenson WT, Quinn DI, Raghavan D, Crawford ED (2006) Southwest Oncology Group phase II study of arsenic trioxide in patients with refractory germ cell malignancies. *Cancer* 106(12):2624-9
- Berenson JR, Boccia R, Siegel D, Bozdech M, Bessudo A, Stadtmauer E, Talisman Pomeroy J, Steis R, Flam M, Lutzky J, Jilani S, Volk J, Wong SF, Moss R, Patel R, Ferretti D, Russell K, Louie R, Yeh HS, Swift RA (2006) Efficacy and safety of melphalan, arsenic trioxide and ascorbic acid combination therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a prospective, multicentre, phase II, single-arm study. *Br J Haematol* 135(2):174-83
- Berthold F, Boos J, Burdach S, Erttmann R, Henze G, Hermann J, Klingebiel T, Kremens B, Schilling FH, Schrappe M, Simon T, Hero B (2005) Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 6(9):649-58
- Berthold F, Hero B, Kremens B, Handgretinger R, Henze G, Schilling FH, Schrappe M, Simon T, Spix C (2003) Long-term results and risk profiles of patients in five consecutive trials (1979-1997) with stage 4 neuroblastoma over 1 year of age. *Cancer Lett.* 197(1-2):11-7
- Berthold F et al (2004) NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma. Universitätskinderklinik Hämatologie / Onkologie Köln
- Brodeur GM, Castleberry RP (1997) Neuroblastoma In: Pizzo PA, Poplack DG (Hrsg.) *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, Lippincott-Raven-Publishers, Philadelphia, S. 761-792

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NLT, Castel V, Castleberry RP, de Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg H, Kaneko M, Kemshead J, Lampert F, Lee REJ, Look ATH, Pearson AD, Philip T, Roald B, Sawada T, Seeger RC, Tsuchida Y, Voute PA (1993) Revision of the International Criteria for Neuroblastoma Diagnosis, Staging and Response to Treatment. *J Clin Oncol*, 11: 1466-1477

Camacho LH, Soignet SL, Chanel S, Ho R, Heller G, Scheinberg DA, Ellison R, Warrell RP Jr (2000) Leukocytosis and the retinoic acid syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *J Clin Oncol* 18(13):2620-5

Chen D, Chan R, Waxman S, Jing Y (2006) Buthionine sulfoximine enhancement of arsenic trioxide-induced apoptosis in leukemia and lymphoma cells is mediated via activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and up-regulation of death receptors. *Cancer Res* 66(23):11416-23

Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, Han ZG, Ni JH, Shi GY, Jia PM, Liu MM, He KL, Niu C, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Paul P, Naoe T, Kitamura K, Miller W, Waxman S, Wang ZY, de The H, Chen SJ, Chen Z (1997) Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89(9):3345-53

Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xiong SM, Shen ZX, Sun GL, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Gazin C, Naoe T, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z (1996) In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 88: 1052 - 1061

- Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK (1998) Involvement of reactive oxygen species and Kaspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 177(2):324-33
- Chen Z, Shen ZX, Chen SJ, Wang ZY (2001) Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic compounds: in vitro and in vivo studies. *Semin Hematol* 38(1):26-36
- Cheung WM, Chu PW, Kwong YL (2007) Effects of arsenic trioxide on the cellular proliferation, apoptosis and differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett* 246(1-2):122-8
- Chou WC, Dang CV (2005) Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies. *Curr Opin Hematol* 12(1):1-6
- Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y (1999) Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 93(1):268-77
- Dalton WT Jr, Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3 *Blood* 71(1):242-7
- Davison K, Cote S, Mader S, Miller WH (2003) Glutathione depletion overcomes resistance to arsenic trioxide in arsenic-resistant cell lines. *Leukemia* 17(5):931-40
- Davison K, Mann KK, Miller WH Jr (2002) Arsenic trioxide: mechanisms of action. *Semin Hematol* 39(2 Suppl 1):3-7
- Davison K, Mann KK, Waxman S, Miller WH Jr (2004) JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 103(9):3496-502

Douer D, Tallman MS (2005) Arsenic trioxide: new clinical experience with an old medication in hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 23(10):2396-410  
Review

Estey E, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Faderl S, Verstovsek S, Jones D, Kantarjian H (2006) Use of all-trans retinoic acid plus arsenic trioxide as an alternative to chemotherapy in untreated acute promyelocytic leukemia. *Blood* 107(9):3469-73

Fujisawa S, Ohno R, Shigeno K, Sahara N, Nakamura S, Naito K, Kobayashi M, Shinjo K, Takeshita A, Suzuki Y, Hashimoto H, Kinoshita K, Shimoya M, Kaise T, Ohnishi K (2007) Pharmacokinetics of arsenic species in Japanese patients with relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *Cancer Chemother Pharmacol* 59(4):485-93

Fukai Y, Hirata M, Ueno M, Ichikawa N, Kobayashi H, Saitoh H, Sakurai T, Kinoshita K, Kaise T, Ohta S (2006) Clinical pharmacokinetic study of arsenic trioxide in an acute promyelocytic leukemia (APL) patient: speciation of arsenic metabolites in serum and urine. *Biol Pharm Bull* 29(5):1022-7

Gallo JM, Brennan J, Hamilton TC, Halbherr T, Laub PB, Ozols RF, O'Dwyer PJ (1995) Time-dependent pharmacodynamic models in cancer chemotherapy: population pharmacodynamic model for glutathione depletion following modulation by buthionine sulfoximine (BSO) in a Phase I trial of melphalan and BSO. *Cancer Res* 55(20):4507-11

Gartenhaus RB, Prachand SN, Paniaqua M, Li Y, Gordon LI (2002) Arsenic trioxide cytotoxicity in steroid and chemotherapy-resistant myeloma cell lines: enhancement of apoptosis by manipulation of cellular redox state. *Clin Cancer Res* 8(2):566-72

- Giunta S, Galeazzi L, Groppa G (1991) An in vitro bacterial model of cytotoxicity to living cells caused by dopamine and 6-hydroxydopamine oxidation at physiological pH. *Free Radic Biol Med* 10(5):297-303
- Grad JM, Bahlis NJ, Reis I, Oshiro MM, Dalton WS, Boise LH (2001) Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Blood* 98(3):805-13
- Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF (1978) Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol* 14(4):644-53
- Griffith OW, Meister A (1979) Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(11):5606-10
- Griffith OW, Meister A (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254(16):7558-60
- Griffith OW (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 257(22):13704-12
- Hermine O, Dombret H, Poupon J, Arnulf B, Lefrere F, Rousselot P, Damaj G, Delarue R, Fermand JP, Brouet JC, Degos L, Varet B, de The H, Bazarbachi A (2004) Phase II trial of arsenic trioxide and alpha interferon in patients with relapsed/refractory adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hematol J* 5(2):130-4
- Huang C, Ma WY, Li J, Dong Z (1999) Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res* 59(13):3053-8

- Huilgol NG (2006) A phase I study to study arsenic trioxide with radiation and hyperthermia in advanced head and neck cancer. *Int J Hyperthermia* 22(5):391-7
- Hussein MA, Saleh M, Ravandi F, Mason J, Rifkin RM, Ellison R (2004) Phase 2 study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Br J Haematol* 125(4):470-6
- Hussein MA (2005) Multiple myeloma: an update of developments in targeted therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 5(2):379-89
- Iancu TC, Shiloh H, Kedar A (1988) Neuroblastomas contain iron-rich ferritin. *Cancer* 61(12):2497-502
- Jiang XH, Wong BC, Yuen ST (2001) Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of p53 and activation of Kaspase-3. *Int J Cancer* 91:173–9
- Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM, Tatton WG, Waxman S (1999) Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 94(6):2102-11
- Jung HS, Kim HS, Lee MJ, Shin HY, Ahn HS, Ryu KH, Seoh JY, Kim CJ, Jang JJ (2006) Arsenic trioxide concentration determines the fate of Ewing's sarcoma family tumors and neuroblastoma cells in vitro. *FEBS Lett* 580(20):4969-75
- Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I (2003) Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res* 63:2103–8



- Kapahi P, Takahashi T, Natoli G, Adams SR, Chen Y, Tsien RY, Karin M (2000) Inhibition of NF-kappa B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of Ikappa B kinase. *J Biol Chem* 275(46):36062-6
- Karlsson J, Edsjo A, Pahlman S, Pettersson HM (2005) Multidrug-resistant neuroblastoma cells are responsive to arsenic trioxide at both normoxia and hypoxia. *Mol Cancer Ther* 4(7):1128-35
- Karlsson J, Ora I, Porn-Ares I, Pahlman S (2004) Arsenic trioxide-induced death of neuroblastoma cells involves activation of Bax and does not require p53. *Clin Cancer Res* 10(9):3179-88
- Keshelava N, Seeger RC, Groshen S, Reynolds CP (1998) Drug resistance patterns of human neuroblastoma cell lines derived from patients at different phases of therapy *Cancer Res* 58:5396–405
- Keshelava N, Zuo JJ, Chen P (2001) Loss of p53 function confers high level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 61:6185–93
- Kim KB, Bedikian AY, Camacho LH, Papadopoulos NE, McCullough C (2005) A phase II trial of arsenic trioxide in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 104(8):1687-92
- Kim YH, Park EJ, Han ST, Park JW, Kwon TK (2005) Arsenic trioxide induces Hsp70 expression via reactive oxygen species and JNK pathway in MDA231 cells. *Life Sci* 77(22):2783-93
- Kitamura K, Minami Y, Yamamoto K, Akao Y, Kiyoi H, Saito H, Naoe T (2000) Involvement of CD95-independent Kaspase 8 activation in arsenic trioxide-induced apoptosis. *Leukemia* 14(10):1743-50

- Körper S, Nolte F, Thiel E, Schrezenmeier H, Rojewski MT (2004) The role of mitochondrial targeting in arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloid cell lines. *Br J Haematol* 124(2):186-9
- Kramer RA, Greene K, Ahmad S, Vistica DT (1987) Chemosensitization of L-phenylalanine mustard by the thiol-modulating agent buthionine sulfoximine. *Cancer Res* 47(6):1593-7
- Kuci Z, Bruchelt G, Seitz G, Karov Y, Or R, Handgretinger R, Niethammer D, Hahn T (2002) Bone marrow-derived factors support growth of N-type, but not of melanocytic neuroblastoma cells. *Anticancer Res.* 22(6C):4325-9
- Lai YL, Chang HH, Huang MJ, Chang KH, Su WH, Chen HW, Chung CH, Wang WY, Lin LH, Chen YJ (2003) Combined effect of topical arsenic trioxide and radiation therapy on skin-infiltrating lesions of breast cancer-a pilot study. *Anticancer Drugs* 14(10):825-8
- Larochette N, Decaudin D, Jacotot E (1999) Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res* 249:413–21
- Lazo G, Kantarjian H, Estey E, Thomas D, O'Brien S, Cortes J (2003) Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of patients with acute promyelocytic leukemia: the M. D. Anderson experience. *Cancer* 97(9):2218-24
- Lee FY, Allalunis-Turner MJ, Siemann DW (1987) Depletion of tumour versus normal tissue glutathione by buthionine sulfoximine. *Br J Cancer* 56(1):33-8
- Lee FY, Allalunis-Turner MJ, Siemann DW (1988) Depletion of tumour versus normal tissue glutathione by buthionine sulfoximine. *Br J Cancer* 56(1):33-8
- Lee FY, Vessey AR, Siemann DW (1988) Glutathione as a determinant of cellular response to doxorubicin. *NCI Monogr* 6:211-5

- Lee C, Lin Y, Huang M, Lin C, Liu C, Chow J, Liu HE (2006) Increased cellular glutathione and protection by bone marrow stromal cells account for the resistance of non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia cells to arsenic trioxide in vivo. *Leuk Lymphoma* 47(3):521-9
- Li X, Ding X, Adrian TE (2004) Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. *Cancer Invest* 22(3):389-400
- Lin CC, Hsu C, Hsu CH, Hsu WL, Cheng AL, Yang CH (2007) Arsenic trioxide in patients with hepatocellular carcinoma: a phase II trial. *Invest New Drugs* 25(1):77-84
- List A, Beran M, DiPersio J, Slack J, Vey N, Rosenfeld CS, Greenberg P (2003) Opportunities for Trisenox (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 17(8):1499-507
- Litzow MR, Lee S, Bennett JM, Dewald GW, Gallagher RE, Jain V, Paietta EM, Racevskis J, Rousey SR, Mazza JJ, Tallman MS (2006) A phase II trial of arsenic trioxide for relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 91(8):1105-8
- Lorico A, Bertola A, Baum C, Fodstad O, Rappa G (2002) Role of the Multidrug Resistance Protein 1 in protection from heavy metal oxyanions: investigations in vitro and in MRP1-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 291(3):617-22
- Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, Kakizuka A (2004) Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ* 11(7):737-46
- Mathas S, Lietz A, Janz M, Hinz M, Jundt F, Scheidereit C, Bommert K, Dorken B (2003) Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 102(3):1028-34. Epub 2003 Apr 3

- Mathews V, George B, Lakshmi KM, Viswabandya A, Bajel A, Balasubramanian P, Shaji RV, Srivastava VM, Srivastava A, Chandy M (2006) Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. *Blood* 107(7):2627-32
- McCafferty-Grad J, Bahlis NJ, Krett N, Aguilar TM, Reis I, Lee KP, Boise LH (2003) Arsenic trioxide uses Kaspase-dependent and Kaspase-independent death pathways in myeloma cells. *Mol Cancer Ther* 2(11):1155-64
- Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263(33):17205-8
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-60
- Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S (2002) Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 62(14):3893-903
- Miller WH Jr. (2002) Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist* 7 Suppl 1:14-9
- Munshi NC, Tricot G, Desikan R, Badros A, Zangari M, Toor A, Morris C, Anaissie E, Barlogie B (2002) Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 16(9):1835-7
- Murgo AJ (2001) Clinical trials of arsenic trioxide in hematologic and solid tumors: overview of the National Cancer Institute Cooperative Research and Development Studies. *Oncologist* 6 Suppl 2:22–8
- Naito K, Kobayashi M, Sahara N, Shigeno K, Nakamura S, Shinjo K, Tobita T, Takeshita A, Ohno R, Ohnishi K (2006) Two cases of acute promyelocytic leukemia complicated by torsade de pointes during arsenic trioxide therapy. *Int J Hematol* 83(4):318-23

- Nakagawa Y, Akao Y, Morikawa H, Hirata I, Katsu K, Naoe T, Ohishi N, Yagi K (2002) Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. *Life Sci* 70(19):2253-69
- Niu C, Yan H, Yu T (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
- Nouri K, Ricotti CA Jr, Bouzari N, Chen H, Ahn E, Bach A. The incidence of recurrent herpes simplex and herpes zoster infection during treatment with arsenic trioxide. *J Drugs Dermatol*. 2006 Feb;5(2):182-5
- O'Dwyer PJ, Hamilton TC, LaCreta FP, Gallo JM, Kilpatrick D, Halbherr T, Brennan J, Bookman MA, Hoffman J, Young RC, Comis RL, Ozols RF (1996). Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J Clin Oncol* 14(1):249-56
- Ora I, Bondesson L, Jonsson C, Ljungberg J, Porn-Ares I, Garwicz S, Pahlman S (2000) Arsenic trioxide inhibits neuroblastoma growth in vivo and promotes apoptotic cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 277(1):179-85
- Ozols RF, Louie KG, Plowman J, Behrens BC, Fine RL, Dykes D, Hamilton TC (1987) Enhanced melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer in vitro and in tumor-bearing nude mice by buthionine sulfoximine depletion of glutathione. *Biochem Pharmacol* 36(1):147-53
- Park JW, Choi YJ, Jang MA, Baek SH, Lim JH, Passaniti T, Kwon TK (2001) Arsenic trioxide induces G2/M growth arrest and apoptosis after caspase-3 activation and bcl-2 phosphorylation in promonocytic U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 286(4):726-34

- Perkins C, Kim CN, Fang G, Bhalla KN (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(3):1014-22
- Prezioso JA, Fitzgerald GB, Wick MM (1992) Melanoma cytotoxicity of buthionine sulfoximine (BSO) alone and in combination with 3,4-dihydroxybenzylamine and melphalan. *J Invest Dermatol* 99(3):289-93
- Puccetti E, Guller S, Orleth A (2000) BCR-ABL mediates arsenic trioxide-induced apoptosis independently of its aberrant kinase activity. *Cancer Res* 60:3409–13
- Rousselot P, Larghero J, Arnulf B, Poupon J, Royer B, Tibi A, Madelaine-Chambrin I, Cimerman P, Chevret S, Hermine O, Dombret H, Claude Brouet J, Paul Femand J (2004) A clinical and pharmacological study of arsenic trioxide in advanced multiple myeloma patients. *Leukemia* 18(9):1518-21
- Rust DM, Soignet SL (2001) Risk/benefit profile of arsenic trioxide. *Oncologist* 6 Suppl 2:29-32
- Ryu KH, Woo SY, Lee MY, Jung YJ, Yoo ES, Seoh JY, Kie JH, Shin HY, Ahn HS (2005) Morphological and biochemical changes induced by arsenic trioxide in neuroblastoma cell lines. *Pediatr Hematol Oncol* 22(7):609-21
- Schiller GJ, Slack J, Hainsworth JD, Mason J, Saleh M, Rizzieri D, Douer D, List AF (2006) Phase II multicenter study of arsenic trioxide in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 24(16):2414-6
- Scott N, Hatlelid KM, MacKenzie NE, Carter DE (1993) Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem Res Toxicol* 6(1):102-6

- Seo T, Urasaki Y, Takemura H, Ueda T (2005) Arsenic trioxide circumvents multidrug resistance based on different mechanisms in human leukemia cell lines. *Anticancer Res* 25(2A):991-8
- Shao W, Fanelli M, Ferrara FF, Riccioni R, Rosenauer A, Davison K, Lamph WW, Waxman S, Pelicci PG, Lo Coco F, Avvisati G, Testa U, Peschle C, Gambacorti-Passerini C, Nervi C, Miller WH Jr (1998) Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR alpha protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst* 90(2):124-33
- Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY (1997) Use of Arsenic Trioxide ( $As_2O_3$ ) in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia (APL): II. Clinical Efficacy and Pharmacokinetics in Relapsed Patients. *Blood* 89: 3354-60
- Shen Y, Shen ZX, Yan H, Chen J, Zeng XY, Li JM, Li XS, Wu W, Xiong SM, Zhao WL, Tang W, Wu F, Liu YF, Niu C, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z (2001) Studies on the clinical efficacy and pharmacokinetics of low-dose arsenic trioxide in the treatment of relapsed acute promyelocytic leukemia: a comparison with conventional dosage. *Leukemia* 15(5):735-41
- Shen ZY, Shen J, Cai WJ, Hong C, Zheng MH (2000) The alteration of mitochondria is an early event of arsenic trioxide induced apoptosis in esophageal carcinoma cells. *Int J Mol Med* 5(2):155-8
- Singer JW, Kirkhart B, Frank K (2003) Safety experience with Trisenox (arsenic trioxide). *Blood* 102:509b (abstr 5767)
- Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, Stone RM, Kalaycio M, Scheinberg DA, Steinherz P, Sievers EL, Coutre S, Dahlberg S, Ellison R, Warrell RP Jr (2001) United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19(18):3852-60

Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrell RP Jr (1998) Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 339:1341–1348

Soignet SL (2001) Clinical experience of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *Oncologist* 6 Suppl 2:11-6

Tiffany-Castiglioni E, Saneto RP, Proctor PH, Perez-Polo JR (1982) Participation of active oxygen species in 6-hydroxydopamine toxicity to a human neuroblastoma cell line. *Biochem Pharmacol* 31(2):181-8

Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson AD, Lunec J (2001) Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 61:8–13

Vanhoefer U, Cao S, Minderman H, Toth K, Skenderis BS 2nd, Slovak ML, Rustum YM (1996) d,l-buthionine-(S,R)-sulfoximine potentiates in vivo the therapeutic efficacy of doxorubicin against multidrug resistance protein-expressing tumors. *Clin Cancer Res* 2(12):1961-8

Vey N, Bosly A, Guerci A, Feremans W, Dombret H, Dreyfus F, Bowen D, Burnett A, Dennis M, Ribrag V, Casadevall N, Legros L, Fenaux P (2006) Arsenic trioxide in patients with myelodysplastic syndromes: a phase II multicenter study. *J Clin Oncol* 24(16):2414-6

Vey N (2004) Arsenic trioxide for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Pharmacother* 5(3):613-21

Vuky J, Yu R, Schwartz L, Motzer RJ. 2002 Phase II trial of arsenic trioxide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*. 2002 Aug;20(3):327-30



- Wang TS, Kuo CF, Jan KY, Huang H (1996) Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J Cell Physiol* 169(2):256-68
- Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibaya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W, Manabe S (2003) A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci* 28(5):455-69
- Waxman S, Anderson KC (2001) History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *Oncologist* 6 Suppl 2:3-10
- Westervelt P, Brown RA, Adkins DR, Khoury H, Curtin P, Hurd D, Luger SM, Ma MK, Ley TJ, DiPersio JF (2001) Sudden death among patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. *Blood* 98(2):266-71
- Yang CH, Kuo ML, Chen JC, Chen YC (1999) Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells. *Br J Cancer* 81(5):796-9
- Zhang P, Wang SY, Hu XH (1996) Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin J Hematol* 17:58-60
- Zhang P (1999) The use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *J Biol Regul Homeost Agents* 13(4):195-200
- Zhang TD. Treatment of acute granulocytic leukemia with "Ai ling No. 1"- clinical analysis and experimental research (1984) *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 4(1):19-20
- Zhang TD, Chen GQ, Wang ZG, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z (2001) Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 20(49):7146-53

Zhang Y, Shen WL (2003) Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide increases the sensitivity of leukemic cells to arsenic trioxide. *Cell Biol Int.* 27(12):953-8

Zhu XH, Shen YL, Jing YK (1999) Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations. *J Natl Cancer Inst* 91:772–8

## **8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schneppenheim danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf sowie für die Überlassung der Arbeitsmittel für die Versuche. Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Erttmann bin ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die fruchtbaren Diskussionen dankbar. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Guido Looft für die Einführung in die Zellkultivierung und praktische Betreuung während der Versuche.

## 9. Lebenslauf

Name: Sarah Bauer

Geburtsort: Nürnberg

Geburtsdatum: 03.10.1979

Familienstand: ledig, keine Kinder

### Ausbildung

---

2001-2008                      Universität Hamburg, Studium der Humanmedizin

06/2008                        2. Ärztliche Prüfung

09/2003                        Physikum

#### Praktisches Jahr:

10/2007-02/2008            3. Tertial: AK Wandsbek, Hamburg (Neurologie)

06/2007-10/2007           2. Tertial: UKE, Hamburg (Innere Medizin)

02/2007-06/2007           1. Tertial: AK Eilbek, Hamburg (Chirurgie)

#### Famulaturen:

08/2006                        ZNA Klinikum St. Georg, Leipzig

08/2005                        Neurologie Universitätsklinikum Erlangen

12/2004                        Gynäkologische Praxis-Klinik Winterhude, Hamburg

03/2004                        Kardiologie AK Barmbek, Hamburg

1999                             Schwesternhelferinnen-Ausbildung beim Roten Kreuz

1990-1999                     Gymnasium Oldenfelde, 22143 Hamburg

Abschluss: Abitur

1986-1990                     Grundschule Nydamer Weg, 22145 Hamburg

### Arbeitsverhältnisse

---

Seit November 2008        Assistenzärztin in der Abteilung für Neurorehabilitation  
im Klinikum Eilbek, Hamburg

2001-2006                     Reisemedizinische Beratung im Reisemedizinischen  
Zentrum des Bernhard-Nocht-Instituts für  
Tropenmedizin, Hamburg

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 08.11.2008