

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**SENSITIVIERUNG VON HUMANEN GLIOMA-ZELLEN FÜR DIE  
ZYTOSTATISCHE / ZYTOLETALE WIRKUNG VON ARSENTRIOXID  
DURCH KOMBINATION MIT PFLANZLICHEN POLYPHENOLEN  
UND BUTHIONINSULFOXIMIN**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
M.Sc. oec. troph. Ellen Klauser  
aus Pawlodar

Kiel, 2014

---

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Rainer Horn

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Edmund Maser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerald Rimbach

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2014

Gedruckt mit Genehmigung der Agar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1 EINFÜHRUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 MALIGNEN GLIOME .....	1
1.2 ARSENTRIOXID.....	2
1.3 PFLANZLICHE POLYPHENOLE.....	3
1.4 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....	5
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>9</b>
2.1 GERÄTE UND HILFSMITTEL .....	9
2.2 REAGENZIEEN .....	10
2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	11
2.4 TESTSUBSTANZEN .....	12
2.5 ZELLKULTUR.....	13
2.5.1 Kulturmedien und Pufferlösungen .....	13
2.5.2 Verwendete Zelllinien .....	17
2.5.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen .....	17
2.5.4 Kultivierung.....	18

<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>19</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG VON A-172 UND U-87 MG ZELLEN .....	19
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIONSHEMMUNG .....	20
3.2.1	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i> .....	20
3.2.2	<i>Arbeitslösungen</i> .....	20
3.2.3	<i>Versuchsaufbau und -durchführung</i> .....	21
3.2.4	<i>Auswertung</i> .....	22
3.2.5	<i>Proteinbestimmung in 35-mm- und 10-cm-Kulturschalen</i> .....	24
3.3	ANALYSE DER KOMBINATIONSWIRKUNG .....	25
3.3.1	<i>Isobologramm- und Kombinationsindex-Methode</i> .....	25
3.3.2	<i>Beispiel für die angewendeten Methoden</i> .....	27
3.4	BESTIMMUNG DER INTRAZELLULÄREN RADIKALBILDUNG .....	29
3.4.1	<i>DCF-Fluoreszenzmethode</i> .....	29
3.4.2	<i>Arbeitslösungen</i> .....	30
3.4.3	<i>Versuchsaufbau und -durchführung</i> .....	30
3.5	BESTIMMUNG DES INTRAZELLULÄREN GLUTATHIONGEHALTS .....	32
3.5.1	<i>DTNB-Glutathionreduktase Recycling-Assay</i> .....	32
3.5.2	<i>Arbeitslösungen</i> .....	32
3.5.3	<i>Versuchsaufbau und -durchführung</i> .....	33
3.5.4	<i>Auswertung</i> .....	35
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION VON APOPTOSE UND NEKROSE .....	36
3.6.1	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	36
3.6.2	<i>Durchflusszytometrie</i> .....	36
3.6.2.1	<i>PI/Annexin V-Färbung</i> .....	37
3.6.2.2	<i>Zellzyklusanalyse</i> .....	37
3.6.3	<i>Arbeitslösungen</i> .....	38
3.6.4	<i>Versuchsaufbau und -durchführung</i> .....	38
3.6.5	<i>Auswertung</i> .....	40
3.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE .....	45

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
4.1	CHARAKTERISIERUNG VON A-172 UND U-87 MG ZELLEN	46
4.1.1	<i>Morphologie</i>	46
4.1.2	<i>Proliferationsgeschwindigkeit</i>	47
4.1.3	<i>Zellgröße</i>	49
4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIONSHEMMUNG	51
4.2.1	<i>Arsentrioxid</i>	51
4.2.2	<i>Pflanzliche Polyphenole</i>	58
4.2.2.1	Genistein	58
4.2.2.2	Quercetin	60
4.2.2.3	Curcumin	62
4.2.2.4	Resveratrol	63
4.2.2.5	Epigallocatechin-3-gallat	64
4.2.3	<i>Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen</i>	65
4.2.3.1	Arsentrioxid und Genistein	65
4.2.3.2	Arsentrioxid und Quercetin	71
4.2.3.3	Arsentrioxid und Curcumin	77
4.2.3.4	Arsentrioxid und Resveratrol	81
4.2.3.5	Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat	86
4.2.4	<i>Kombination von Arsentrioxid mit Buthioninsulfoximin</i>	90
4.3	BESTIMMUNG DER INTRAZELLULÄREN RADIKALBILDUNG	96
4.3.1	<i>Cumolhydroperoxid</i>	96
4.3.2	<i>Arsentrioxid</i>	99
4.3.3	<i>Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen</i>	101
4.3.4	<i>Kombination von Arsentrioxid mit Buthioninsulfoximin</i>	108
4.3.5	<i>Übersicht über die Ergebnisse</i>	109
4.4	BESTIMMUNG DES INTRAZELLULÄREN GLUTATHIONGEHALTS	112
4.4.1	<i>Arsentrioxid</i>	113
4.4.2	<i>Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen</i>	114
4.4.3	<i>Kombination von Arsentrioxid mit Buthioninsulfoximin</i>	117
4.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION VON APOPTOSE UND NEKROSE	119
4.5.1	<i>Staurosporin</i>	119
4.5.2	<i>Arsentrioxid</i>	134
4.5.3	<i>Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen</i>	143

---

4.5.3.1	Arsentrioxid und Genistein .....	143
4.5.3.2	Arsentrioxid und Quercetin .....	150
4.5.4	<i>Kombination von Arsentrioxid mit Buthioninsulfoximin</i> .....	158
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>168</b>
5.1	ARSENTRIOXID .....	168
5.1.1	<i>Proliferationshemmung</i> .....	168
5.1.2	<i>Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest</i> .....	169
5.1.3	<i>Einfluss auf die intrazelluläre Radikalbildung und den Glutathiongehalt</i> .....	173
5.2	SENSITIVIERUNG VON HUMANEN GLIOMA-ZELLEN FÜR ARSENTRIOXID .....	175
5.2.1	<i>Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen</i> .....	175
5.2.1.1	Arsentrioxid und Genistein .....	175
5.2.1.2	Arsentrioxid und Quercetin .....	177
5.2.1.3	Arsentrioxid und Curcumin .....	179
5.2.1.4	Arsentrioxid und Resveratrol .....	180
5.2.1.5	Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat .....	181
5.2.2	<i>Kombination von Arsentrioxid mit Buthioninsulfoximin</i> .....	183
5.3	SCHLUSSFOLGERUNG .....	185
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>188</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>201</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>214</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>215</b>

## Zusammenfassung

Arsentrioxid (ATO) induziert klinische Remission bei der akuten Promyelozytenleukämie und Proliferationshemmung bei zahlreichen Zelllinien *in vitro*. Vorausgehende Studien haben berichtet, dass pflanzliche Polyphenole die zytotoxische Wirkung von ATO und die Induktion von Apoptose bei Tumorzellen verschiedener Abstammung verstärken, indem sie zu einer erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder einer Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel führen. Im Hinblick auf alternative Therapieansätze für Patienten mit malignen Gliomen wurde in der vorliegenden Arbeit die proliferationshemmende Potenz von ATO bei zwei humanen Gliomazelllinien (A-172 und U-87 MG) untersucht. Weiterhin wurde geprüft, ob die verwendeten Zelllinien für die Wirkung von ATO durch den gleichzeitigen Einsatz von verschiedenen Polyphenolen (Genistein, Quercetin, Curcumin, Resveratrol, Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)) bzw. Buthioninsulfoximin (BSO), einen Inhibitor der Glutathionsynthese, sensitiviert werden können.

ATO (0,5 - 20  $\mu\text{M}$ ) hemmt die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen konzentrations- und zeitabhängig. Bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  ist die Proliferationshemmung jeweils auf zytostatische und bei höheren Konzentrationen ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) auf zytotoxische Effekte zurückzuführen. Letztere sind nach 72 h mit einer Induktion von Apoptose verbunden. Das Ausmaß des apoptotischen Zelltods wurde über Veränderungen der Zellkernmorphologie, die Externalisierung von Phosphatidylserin und den DNA-Gehalt im Zellzyklus quantifiziert. Bei U-87 MG Zellen ist die Hemmung des Wachstums außerdem mit einem Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase verknüpft. Nekrotischer Zelltod spielt bei beiden Zelllinien keine wesentliche Rolle. Die Wirkung von ATO wird nicht durch erhöhte ROS-Bildung (bestimmt mit DCFH<sub>2</sub>-DA als Biomarker) oder Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel vermittelt. Im Gegenteil, ATO induziert eindeutig Erhöhungen des Glutathiongehalts. Der maximale Effekt (~ 40%) wird bei subtoxischen Konzentrationen (0,5 - 2  $\mu\text{M}$ ) erreicht.

Von den untersuchten Polyphenolen löst Genistein in beiden Zelllinien und Resveratrol in U-87 MG Zellen eine verstärkte Bildung von ROS aus. Quercetin, Curcumin und EGCG wirken dagegen antioxidativ und vermindern die endogene ROS-Bildungsrate. Curcumin und Resveratrol besitzen außerdem einen Einfluss auf die intrazellulären

Glutathionspiegel. Sie induzieren in beiden Zelllinien einen Anstieg der Levels. BSO führt dagegen zu einer drastischen Verarmung an Glutathion.

Die Kombinationswirkung von ATO und den Polyphenolen auf das Wachstum der Glioma-Zellen wurde mit Hilfe der Isobologramm- und der Kombinationsindex-Methode ermittelt. Dazu wurden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Wachstumshemmung der Einzelsubstanzen und ihrer Kombinationen herangezogen. Die gemeinsame Wirkung der Agentien ist teilweise vom betrachteten Effektniveau abhängig und zelllinien-spezifisch. Genistein und Quercetin erhöhen die Empfindlichkeit von A-172 Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO sowie die Induktion von Apoptose. Entsprechende Kombinationen wirken bei U-87 MG Zellen allerdings nur additiv bzw. sogar antagonistisch auf das Wachstum und erhöhen die Induktion von Apoptose nicht. Curcumin, Resveratrol und EGCG sensitivieren beide Zelllinien nicht für ATO. Hier zeigen sich jeweils additive und/oder antagonistische Effekte. Eine deutliche Sensitivierung für ATO (Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion) findet bei A-172 und U-87 MG Zellen in Anwesenheit von BSO statt, das selbst nicht zytotoxisch ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die ausgewählten Polyphenole - im Unterschied zu BSO - kaum geeignete *Sensitizer* sind, um die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf A-172 und U-87 MG zu verstärken. Die Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel, nicht aber eine gesteigerte Bildung von ROS erweist sich als Strategie zur Erhöhung der zytotoxischen ATO-Wirkung auf die verwendeten Glioma-Zellen. Kombinationen von ATO und BSO könnten einen geeigneten Ansatz zur Therapie maligner Glioma darstellen.



## Abstract

Arsenic trioxide (ATO) induces clinical remission in acute promyelocytic leukemia and growth inhibition in various cancer cell lines *in vitro*. Recent studies have reported that plant polyphenols potentiate ATO-provoked cytotoxicity and apoptosis induction in cancer cells from different origin via enhanced reactive oxygen species (ROS) generation or cellular glutathione depletion. Searching for alternative therapy approaches for patients with malignant gliomas in this study the potency of ATO to inhibit proliferation in two human glioma cell lines (A-172 and U-87 MG) was investigated. Furthermore, it was examined, whether selected polyphenols (genistein, quercetin, curcumin, resveratrol, epigallocatechin-3-gallate (EGCG)) and buthionine-sulfoximine (BSO), an inhibitor of glutathione biosynthesis, are able to sensitize the cell lines for the action of ATO.

ATO (0.5 - 20  $\mu\text{M}$ ) inhibited the proliferation of A-172 and U-87 MG cells in a concentration- and time-dependent manner. Up to 5  $\mu\text{M}$  ATO acted as cytostatic and at higher concentrations ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) it caused lethal effects. The latter were associated with apoptosis induction after 72 h. The extent of apoptotic cell death was measured via nuclear morphological changes, externalization of phosphatidylserine and DNA-content in the cell cycle. In addition in U-87 MG cells growth inhibition was also associated with a cell cycle arrest in the G<sub>2</sub>/M-phase. Necrotic cell death only played a minor role in both cell lines. The action of ATO was accompanied neither by enhanced ROS generation (using DCFH<sub>2</sub>-DA as indicator) nor decreased glutathione levels. In contrast, ATO significantly enhanced glutathione levels. The maximum effect (~ 40%) occurred at sub-toxic concentrations (0.5 - 2  $\mu\text{M}$ ).

Of all studied polyphenols genistein enhanced ROS generation in both cell lines, while resveratrol did it only in U-87 MG cells. Quercetin, curcumin und EGCG acted as antioxidants and decreased the endogenous ROS generation rate. Curcumin and resveratrol also influenced the cellular glutathione contents. They induced an increase of the levels in both cell lines. In contrast, BSO led to drastic glutathione depletion.

The combination effects of ATO and the polyphenols on the growth of the glioma cells was investigated via isobolographic- and combination index-analysis. For this purpose concentration-response curves for growth inhibition caused by the agents alone and in combination were used. The combination effects of the agents depended in part on the effect levels regarded and were cell type-specific. Genistein and quercetin enhanced

the sensitivity of A-172 cell for growth inhibition and apoptosis induction provoked by ATO. Corresponding combinations acted in U-87 MG cells only additive and even antagonistic, respectively, on the growth and did not enhance the induction of apoptosis. Curcumin, resveratrol und EGCG did not sensitize both cell lines for ATO. Instead, the effects were additive and/or even antagonistic. A strong sensitization for ATO (growth inhibition and apoptosis induction) occurred in the presence of BSO at non-cytotoxic concentrations.

The results presented in this study indicate that the used polyphenols - in contrast to BSO - are not suitable "sensitizers" to potentiate ATO-induced growth inhibition in A-172 and U-87 MG cells. Thus, depletion of cellular glutathione contents rather than an increase in ROS generation represents a useful strategy to enhance ATO-provoked cytotoxicity in glioma cells. Combinations of ATO and BSO could be an alternative therapy approach for malignant gliomas.

# Abbildungsverzeichnis

1-1: Einteilung der pflanzlichen Polyphenole mit jeweils einem Beispiel .....	4
3-1: Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung der proliferationshemmenden Wirkung einer Testsubstanz .....	21
3-2: Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung der proliferationshemmenden Wirkung der Kombination aus zwei Testsubstanzen .....	22
3-3: Beispiel für Wachstumskurven bei Exposition mit einer zytostatisch und einer zytoletal wirkenden Substanz.....	23
3-4: Schematische Darstellung eines Isobogramms nach Berenbaum (1977) verknüpft mit den Kombinationsindizes nach Chou <i>et al.</i> (1983) .....	25
3-5: Beispiel für die Durchführung einer Analyse der Kombinationswirkung mittels der Isobogramm-Methode nach Berenbaum (1977) .....	28
3-6: Prinzip der DCF-Fluoreszenz Methode .....	29
3-7: Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung der intrazellulären Radikalbildung .....	30
3-8: Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung des Glutathiongehalts	34
3-9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kerne von A-172 Zellen nach Färbung mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid.....	41
3-10: Auswertung der PI/Annexin V-Färbung am Beispiel von A-172 Zellen .....	42
3-11: Auswertung einer Zellzyklusanalyse am Beispiel von A-172 Zellen .....	43
4-1: Morphologie von A-172 und U-87 MG Zellen bei einer Kultivierung über 96 h ...	47
4-2: Wachstumskurven von A-172 und U-87 MG Zellen bei einer Kultivierung über 96 h .....	48
4-3: Zusammenhang zwischen Zellzahl und Zellproteingehalt bei A-172 und U-87 MG Zellen.....	50
4-4: Wirkung von Arsentrioxid auf die Proliferation von A-172 Zellen .....	52
4-5: Wirkung von Arsentrioxid auf die Proliferation von U-87 MG Zellen .....	54

---

4-6: Vergleich der konzentrationsabhängigen Wirkung von Arsentrioxid auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen.....	56
4-7: Vergleich der dosisabhängigen Wirkung von Arsentrioxid auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen .....	57
4-8: Wirkung von Genistein auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen.....	59
4-9: Wirkung von Quercetin auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen .....	61
4-10: Wirkung von Curcumin auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen .....	62
4-11: Wirkung von Resveratrol auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen ..	63
4-12: Wirkung von Epigallocatechin-3-gallat auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen .....	64
4-13: Einfluss von Genistein auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen .....	66
4-14: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Genistein auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	67
4-15: Einfluss von Genistein auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen.....	69
4-16: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Genistein auf das Wachstum von U-87 MG Zellen.....	70
4-17: Einfluss von Quercetin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen .....	72
4-18: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Quercetin auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	73
4-19: Einfluss von Quercetin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen.....	75
4-20: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Quercetin auf das Wachstum von U-87 MG Zellen .....	76
4-21: Einfluss von Curcumin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen .....	77
4-22: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Curcumin auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	78
4-23: Einfluss von Curcumin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen.....	80

---

4-24: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Curcumin auf das Wachstum von U-87 MG Zellen .....	80
4-25: Einfluss von Resveratrol auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen .....	82
4-26: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Resveratrol auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	83
4-27: Einfluss von Resveratrol auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen .....	84
4-28: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Resveratrol auf das Wachstum von U-87 MG Zellen .....	85
4-29: Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen .....	86
4-30: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	87
4-31: Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen .....	88
4-32: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf das Wachstum von U-87 MG Zellen .....	89
4-33: Einfluss von Buthioninsulfoximin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen .....	91
4-34: Einfluss von Buthioninsulfoximin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen .....	93
4-35: Vergleich der proliferationshemmenden Wirkung von Arsentrioxid auf A-172 und U-87 MG Zellen in Anwesenheit von Buthioninsulfoximin .....	94
4-36: Zeitabhängige Radikalbildung durch Cumolhydroperoxid in A-172 und U-87 MG Zellen.....	97
4-37: Vergleich der endogenen Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen.....	98
4-38: Vergleich der Cumolhydroperoxid-induzierten Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen .....	99
4-39: Einfluss von Arsentrioxid auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen	100
4-40: Einfluss von Arsentrioxid und Genistein auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen .....	102

---

4-41: Einfluss von Arsentrioxid und Quercetin auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen .....	103
4-42: Einfluss von Arsentrioxid und Curcumin auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen .....	105
4-43: Einfluss von Arsentrioxid und Resveratrol auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen .....	106
4-44: Einfluss von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen .....	107
4-45: Einfluss von Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen .....	108
4-46: Übersicht über die Radikalbildung in A-172 Zellen in Anwesenheit von Arsentrioxid, verschiedenen pflanzlichen Polyphenolen und Buthioninsulfoximin .....	110
4-47: Übersicht über die Radikalbildung in U-87 MG Zellen in Anwesenheit von Arsentrioxid, verschiedenen pflanzlichen Polyphenolen und Buthioninsulfoximin .....	111
4-48: Vergleich der Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen .....	112
4-49: Wirkung von Arsentrioxid auf den Glutathionspiegel und die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen.....	113
4-50: Wirkung von Arsentrioxid und pflanzlichen Polyphenolen auf den Glutathionspiegel von A-172 Zellen .....	115
4-51: Wirkung von Arsentrioxid und pflanzlichen Polyphenolen auf den Glutathionspiegel von U-87 MG Zellen .....	116
4-52: Wirkung von Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin auf den Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen .....	118
4-53: Morphologische Veränderungen von A-172 und U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin .....	120
4-54: Methodenvergleich zur Bestimmung des Verlusts an U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin .....	122
4-55: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kerne von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin .....	123

---

4-56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kerne von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin .....	124
4-57: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 und U-87 MG Zellen durch Staurosporin .....	125
4-58: Bindung von APC Annexin V und Aufnahme von PI durch A-172 und U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin .....	127
4-59: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin..	129
4-60: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin... ..	130
4-61: Konzentrationsabhängigkeit der Staurosporin-Wirkung auf die Verteilung von A-172 und U-87 MG Zellen im Zellzyklus .....	131
4-62: Korrelation zwischen den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie und der Zellzyklusanalyse.....	132
4-63: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Staurosporin-Wirkung auf die Induktion von Apoptose .....	133
4-64: Verlust von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid.....	134
4-65: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 und U-87 MG Zellen durch Arsentrioxid.....	136
4-66: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kerne von A-172 und U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid.....	137
4-67: Bindung von APC Annexin V und Aufnahme von PI durch A-172 und U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid.....	139
4-68: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit A .....	141
4-69: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit ATO .....	142
4-70: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 Zellen durch Arsentrioxid und Genistein .....	145
4-71: Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein .....	146
4-72: Induktion von Apoptose und Nekrose bei U-87 MG Zellen durch Arsentrioxid und Genistein .....	148
4-73: Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein .....	149

---

4-74: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 Zellen durch Arsentrioxid und Quercetin.....	152
4-75: Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin.....	153
4-76: Induktion von Apoptose und Nekrose bei U-87 Zellen durch Arsentrioxid und Quercetin.....	156
4-77: Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin.....	157
4-78: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 Zellen durch 1 $\mu$ M Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin.....	159
4-79: Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit 1 $\mu$ M Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin.....	160
4-80: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 Zellen durch 2 $\mu$ M Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin.....	162
4-81: Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit 2 $\mu$ M Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin.....	163
4-82: Induktion von Apoptose und Nekrose bei U-87 Zellen durch Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin.....	166
4-83: Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin.....	167
7-1: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein.....	202
7-2: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein.....	204
7-3: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin.....	206
7-4: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin.....	208
7-5: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin.....	210
7-6: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin.....	212



## Tabellenverzeichnis

1-1: Sensitivierung von Tumorzellen für die Wirkung von Arsentrioxid durch eine Ko-Exposition mit pflanzlichen Polyphenolen (Übersicht der Literatur) .....	6
2-1: Untersuchte pflanzliche Polyphenole .....	12
2-2: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien .....	14
2-3: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen .....	15
4-1: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Genistein auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	68
4-2: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Genistein auf das Wachstum von U-87 MG Zellen.....	71
4-3: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Quercetin auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	74
4-4: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Quercetin auf das Wachstum von U-87 MG Zellen .....	76
4-5: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Curcumin auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	79
4-6: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Curcumin auf das Wachstum von U-87 MG Zellen .....	81
4-7: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Resveratrol auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	83
4-8: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Resveratrol auf das Wachstum von U-87 MG Zellen .....	85
4-9: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf das Wachstum von A-172 Zellen .....	87
4-10: Kombinationsindizes (CI)* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf das Wachstum von U-87 MG Zellen .....	89

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	GSx	Gesamtglutathion
AML	akute myeloische Leukämie	h	Stunde
AMPK	adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase	HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )
APC	Allophycocyanin	K	Kontrolle
APL	akute Promyelozytenleukämie	MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
ATO	Arsentrioxid	min	Minuten
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )	MM	Multiple Myelom
BSO	Buthioninsulfoximin	MW	Mittelwert
CHP	Cumolhydroperoxid	n	Anzahl der Versuche oder Nano
CI	Kombinationsindex	ns	nicht signifikant
CLS	<i>Cell Line Service</i>	NF-κB	Nuklearfaktor-kappa B
Cur	Curcumin	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein	PI	Propidiumiodid
DCFH <sub>2</sub>	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
DCFH <sub>2</sub> -DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat	PS	Phosphatidylserin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Que	Quercetin
DMSO	Dimethylsulfoxid	Res	Resveratrol
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	RFU	relative Fluoreszenzeinheiten ( <i>relative fluorescence units</i> )
EC <sub>50</sub> -Wert	halbmaximal effektive Konzentration	ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat	RPM	Umdrehungen pro Minute ( <i>runs per minute</i> )
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>	RT	Raumtemperatur
FACS	Durchflusszytometer ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )	sek	Sekunden
FCS	Fetales Rinderserum ( <i>fetale celver serum</i> )	SEM	mittlerer Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
g	Gramm oder Erdbeschleunigung ( <i>kursiv</i> )	SSA	5-Sulfosalicylsäure
GCS	γ-Glutamylcystein-Synthetase	ST	Staurosporin
Gen	Genistein	t	Zeit
		Tab.	Tabelle
		WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )

# 1 Einführung

## 1.1 Maligne Gliome

Nach kardiovaskulären Erkrankungen ist Krebs die häufigste Todesursache in den *high-income*-Ländern (WHO, 2008). Laut dem statistischen Bundesamt (2012) verstarben in Deutschland im Jahr 2011 insgesamt 221.591 Personen an bösartigen Neubildungen. Das waren 26,8% aller Sterbefälle. Im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen gehören primäre Hirntumore zu den seltenen Tumorarten (Ferlay *et al.*, 2010). Bei diesen handelt es sich um hirneigene Tumore, die von Zellen des Gehirns oder der Hirnhaut abstammen. Sie sind abzugrenzen von sekundären Hirntumoren, welche durch Metastasierung entstehen. Die derzeit gebräuchlichste Klassifizierung von Hirntumoren erfolgt nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und berücksichtigt deren zytogenetische Herkunft sowie den histologischen Malignitätsgrad (WHO Grad I - IV) (Louis *et al.*, 2007).

Maligne Gliome machen einen großen Teil aller primären Hirntumore aus (Ostrom *et al.*, 2013). Sie werden in WHO Grad III (anaplastische Formen von Astrozytomen, Oligodendrogliomen und Ependymomen) und WHO Grad IV Tumore (Glioblastome) eingeteilt. Die Behandlung maligner Gliome stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Als etablierte Standardverfahren gelten in diesem Bereich chirurgische Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie, welche je nach Krankheitsverlauf kombiniert eingesetzt werden (van den Bent *et al.*, 2006; Wick *et al.*, 2009). Bei Patienten mit Glioblastomen hat sich eine Kombination aus allen drei Therapieformen, mit Temozolomid als Chemotherapeutikum, als besonders vielversprechend gezeigt (Stupp *et al.*, 2005; Mirimanoff *et al.*, 2006). Trotz bereits erzielter Erfolge stoßen die vorhandenen Therapieansätze häufig an ihre Grenzen. Die radikale operative Entfernung eines malignen Glioms ist aufgrund seines infiltrierenden Verhaltens und der Schwierigkeit in der Abgrenzung von gesundem Gewebe nicht immer durchführbar (Stummer *et al.*, 2006). Gegenüber Radio- oder Chemotherapien bestehen weiterhin Resistenzen (Shapiro *et al.*, 1989; Stewart, 2002). Der breite Einsatz von Medikamenten wird außerdem durch die Blut-Hirn-Schranke erschwert oder gar verhindert (Juillerat-Jeanneret, 2008).

Die Prognose für Patienten mit malignen Gliomen ist ungünstig. Die mittlere Überlebenszeit mit einem Glioblastom beträgt nur etwa ein Jahr (Brandes *et al.*, 2003; Ohgaki

*et al.*, 2004). Niedriger maligne Gliome weisen aufgrund ihres langsameren Wachstums eine etwas bessere Prognose auf (Burkhard *et al.*, 2003; Okamoto *et al.*, 2004). Sie können in ihrem Verlauf jedoch zu hoch malignen Tumoren entarten und sich klinisch wie diese verhalten (Louis *et al.*, 2007).

## 1.2 Arsentrioxid

Das Metalloid Arsen oder vielmehr zahlreiche seiner Verbindungen, darunter auch Arsentrioxid (ATO,  $\text{As}_2\text{O}_3$ ), haben in der Vergangenheit einen schlechten Ruf erlangt. Aufgrund ihrer Eigenschaften (farb-, geruchs- und geschmackslos), der freien Verfügbarkeit sowie fehlender Nachweismöglichkeiten galten verschiedene Arsenderivate bis ins 19. Jahrhundert als klassisches Mordgift (Hughes *et al.*, 2011). Trotz bzw. gerade wegen der toxischen Wirkung fanden und finden arsenhaltige Präparate aber auch therapeutische Verwendung. Die von Thomas Fowler im 18. Jahrhundert entwickelte *Fowler's Solution*, eine Kaliumbicarbonat-basierte Lösung von ATO, kam beispielsweise bei verschiedenen malignen Erkrankungen (Leukämie, Hodgkin-Lymphom) und anderen Beschwerden (Asthma, Ekzeme, Schuppenflechten etc.) zum Einsatz (Dilda *et al.*, 2007). Paul Ehrlich nutzte Arsenderivate zur Behandlung von Infektionskrankheiten. Eine von ihm 1909 entwickelte organische Arsenverbindung Namens *Salvarsan* stellte das erste effektive Mittel gegen Syphilis dar, welches erst durch Penicillin abgelöst wurde (Sekhon, 2013).

Im September 2000 wurde ATO (Handelsname: *TRISENOX*) durch die *Food and Drug Administration* zur Behandlung der akuten Promyelozytenleukämie (APL) in den USA zugelassen (FDA, 2000). Eine entsprechende Zulassung in Europa folgte im März 2002 durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA, 2002). APL ist eine Unterform der akuten myeloischen Leukämie (AML) und ist durch die Chromosomentranslokation  $t(15;17)(q22;q12)$  gekennzeichnet (Vardiman *et al.*, 2009). Die genetische Veränderung führt zur Bildung eines Fusionsproteins, bestehend aus dem Tumorsuppressor PML und dem Retinsäure-Rezeptor alpha (RAR- $\alpha$ ) (de Thé *et al.*, 1991). Das PML/RAR $\alpha$ -Protein beeinträchtigt die Differenzierung der Vorläuferzellen im Knochenmark und führt zur Akkumulation abnormaler Promyelozyten (Early *et al.*, 1996). Die Standardtherapie bei APL setzt sich aus einer Kombination von *all-trans*-Retinsäure (ATRA) und Anthracyclinen zusammen (Tallman *et al.*, 2002). *TRISENOX* (1 mg ATO/ml) wird bei Versagen der Primärbehandlung oder dem Wiederauftreten der Erkrankung bei erwachsenen Patienten eingesetzt. Die verabreichte ATO-Dosis liegt bei

0,15 mg pro kg Körpergewicht und Tag. Laut Shen *et al.* (1997) erreichen APL-Patienten nach einer intravenösen Gabe von 10 mg ATO Plasmaspiegel zwischen 5,5 und 7,3  $\mu\text{M}$  ATO, welche rapide auf Konzentrationen zwischen 1 und 2  $\mu\text{M}$  sinken. Letztere gelten als therapeutisch vertretbar.

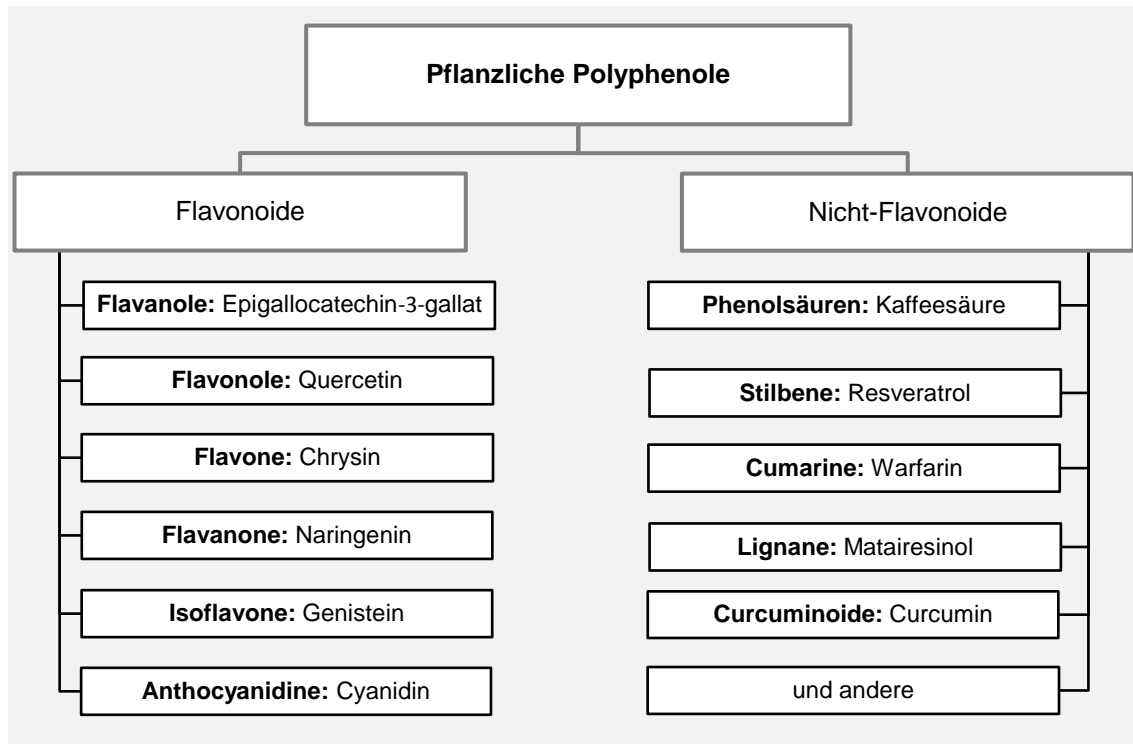
Die klinische Wirksamkeit von ATO wurde erstmals in den Vereinigten Staaten in zwei randomisierten Pilotstudien (Soignet *et al.*, 1998; 2001) belegt, nachdem sich Berichte aus China (Zhang *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1997) zu dessen therapeutischem Potenzial bei APL mehrten. An beiden Untersuchungen nahmen insgesamt 52 Patienten mit rezidivierender APL teil, von denen 45 nach durchschnittlich 57 Tagen eine Vollremission erreichten. Zu den Nebenwirkungen einer Behandlung mit ATO zählten Hypokaliämie, Hyperglykämie, Herzrhythmusstörungen, Neutropenie oder Leukozytose.

Die detaillierte Wirkungsweise von ATO ist bis heute nicht vollständig geklärt. *In vitro* Studien deuten darauf hin, dass eine Förderung der Zelldifferenzierung und/oder Auslösung von Apoptose in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Die Differenzierungsinduktion erfolgt bei niedrigen ATO-Konzentrationen (0,1 - 0,5  $\mu\text{M}$ ) und wird vermutlich durch eine Degradierung des PML/RAR $\alpha$ -Proteins in APL-Zellen ausgelöst (Chen *et al.*, 1997). Die Induktion von Apoptose scheint unabhängig vom Fusionsprotein abzulaufen. Sie findet bei höheren ATO-Konzentrationen ( $\geq 0,5 \mu\text{M}$ ) sowohl in malignen Promyelozyten (Jing *et al.*, 1999) als auch anderen Krebszellen (Uslu *et al.*, 2000; Oketani *et al.*, 2002) statt.

### 1.3 Pflanzliche Polyphenole

Pflanzliche Polyphenole gehören zu der großen Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe. Im Gegensatz zu den Primärmetaboliten (z.B. Kohlenhydraten oder Lipiden) haben sekundäre Pflanzenstoffe keinen nutritiven Charakter oder direkten Einfluss auf das Pflanzenwachstum. Zu ihren Funktionen gehören Abwehr gegen Schädlinge und Krankheiten (Cipollini *et al.*, 2008; Karimi *et al.*, 2011), Schutz vor UV-Strahlung (Rozema *et al.*, 2002), Farb- (Saito *et al.*, 2011) oder Geschmacksgebung (Zabaras *et al.*, 2013). Heute sind etwa 100.000 sekundäre Pflanzenstoffe bekannt (Watzl, 2008), die anhand von gemeinsamen Strukturmerkmalen und funktionellen Eigenschaften eingeteilt werden. Pflanzliche Polyphenole lassen sich in ihrer chemischen Struktur auf das Phenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ) zurückführen. Es sind Verbindungen, die meist mehr als zwei aromatische Hydroxylgruppen im Molekül besitzen (Tsao, 2010). Eine mögliche Einteil-

lung dieser Substanzen ist die, in die Obergruppen der Flavonoide sowie der Nicht-Flavonoide, jeweils mit weiteren Untergruppen (vgl. Abb. 1-1 ).



**Abbildung 1-1: Einteilung der pflanzlichen Polyphenole mit jeweils einem Beispiel**

Pflanzliche Polyphenole sind in allen Pflanzenteilen und damit auch in Obst, Gemüse, Getreide, Leguminosen oder Getränken pflanzlichen Ursprungs vertreten (Perez-Jimenez *et al.*, 2010). Eine hohe Aufnahme entsprechender Lebensmittel wird mit gesundheitsfördernden Effekten assoziiert. Epidemiologische Studien weisen auf eine negative Korrelation zwischen einer polyphenolreichen Ernährung und dem Risiko für verschiedene Krebsformen (Arts *et al.*, 2002; Mursu *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2013) und kardiovaskuläre Erkrankungen (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1995) hin.

*In vitro* werden pflanzlichen Polyphenolen ebenfalls vielfältige Wirkungen zugeschrieben. Diese sind abhängig von dem gewählten experimentellen Aufbau (System, Zeit, Konzentration etc.), aber auch den individuell betrachteten Substanzen. Für verschiedene Flavonoide und Nicht-Flavonoide zeigen sich antibakterielle, antivirale und antifungale Eigenschaften (Orhan *et al.*, 2010; Plumed-Ferrer *et al.*, 2013). Auf zellulärer Ebene besitzen viele Polyphenole eine proliferationshemmende Wirkung (Hirano *et al.*, 1994; Braganhol *et al.*, 2006). Polyphenole wie Genistein oder Resveratrol können bei niedrigen Konzentrationen aber auch zur Förderung der Proliferation führen, die erst bei höheren Konzentrationen in eine Hemmung übergeht (Nakagawa *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004). Weiterhin wird in verschiedenen Zelllinien eine Induktion von Zelldif-

ferenzierung (Constantinou *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 2009a) oder Förderung von Apoptose beobachtet (Nakazato *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2014). Darüber hinaus gelten pflanzliche Polyphenole als Antioxidantien. Sie sind in der Lage Lipidperoxidation und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu unterbinden (Lima *et al.*, 2006; Rübeler *et al.*, 2009) oder einer oxidativ-induzierten DNA-Schädigung entgegen zu wirken (Ovesná *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008). Je nach Versuchsbedingungen sind aber auch prooxidative Effekte bekannt. Das Isoflavon Genistein reduziert in Anwesenheit von Cumolhydroperoxid z.B. die Generierung von ROS in C6 Rattenglioma-Zellen, agiert bei dessen Abwesenheit aber selbst als ROS-Bildner (Rübeler *et al.*, 2008). Neben Genistein induzieren u.a. auch Curcumin (Sánchez *et al.*, 2010) oder Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) (Lee *et al.*, 2011) eine erhöhte Bildung von ROS in Tumorzellen.

## 1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Angesichts der schlechten Prognose und eines Mangels an effektiven Behandlungsmöglichkeiten ist die Entwicklung neuer Therapieansätze bei Patienten mit malignen Gliomen von großer Bedeutung. ATO stellt diesbezüglich einen alternativen Wirkstoff dar. Basierend auf dem Erfolg bei APL-Patienten ist der Einsatz von ATO auch bei der Behandlung anderer Formen der Leukämie sowie bei Tumoren soliden Ursprungs Gegenstand der Krebsforschung geworden (Maeda *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2010). Da ATO bei anderen Tumorarten als der APL häufig erst im höheren Konzentrationsbereich wirksam ist (Baumgartner *et al.*, 2004), zeigt sich hier die Notwendigkeit einer Sensitivierung von Tumorzellen für ATO. Im Hinblick auf die Therapie könnte dies mit einer Verminderung der notwendigen ATO-Dosis und somit der Nebenwirkungen einhergehen. In zahlreichen *in vitro* Untersuchungen wurden bereits verschiedene Konzepte zur Verstärkung der ATO-Wirkung auf Tumorzellen durch Kombination mit diversen Agentien erprobt. Bekannt sind z.B. Kombinationen mit anderen klinisch genutzten Zytostatika (Campbell *et al.*, 2007; Kuo *et al.*, 2011), Bestrahlung (Ho *et al.*, 2009), der mehrfach ungesättigten Fettsäure DHA (Baumgartner *et al.*, 2004), dem Histondeacetylase Inhibitor SAHA (Chien *et al.*, 2011) und diversen sekundären Pflanzenstoffen wie dem Alkaloid Berberin (Kim *et al.*, 2007), den Isothiocyanaten Sulforaphan, Erucin sowie Erysolin (Doudican *et al.*, 2010) oder dem Anthrachinonderivat Emodin (Yi *et al.*, 2004).

Im Zusammenhang mit der zuletzt genannten Gruppe sind seit einigen Jahren auch pflanzliche Polyphenole zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses ge-



rückt. Bereits durchgeführte Studien haben gezeigt, dass diverse Polyphenole die zytotoxische Wirkung von ATO und die Induktion von Apoptose bei Tumorzellen unterschiedlicher Abstammung verstärken (vgl. Tab. 1-1). Die Wirkung der Polyphenole wurde dabei über verschiedene Mechanismen vermittelt. Genistein, Curcumin und EGCG steigerten z.B. die Empfindlichkeit von einigen Leukämie- und Leberkarzinom-Zelllinien für ATO, indem sie zu einer erhöhten Bildung von ROS führten (Sánchez *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). Chrysin und Quercetin sensitivierten Leukämie-Zellen dagegen durch eine Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel (Ramos *et al.*, 2008). Die Effekte einiger Polyphenole gingen zudem mit einer Aktivierung von proapoptotischen (p38-MAPK = p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, AMPK = adenosinmonophosphataktivierte Proteinkinase, Caspase-3) oder einer Inaktivierung von antiapoptotischen (PI3K/Akt = Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt, NF- $\kappa$ B = Nuklearfaktor-kappa B) Faktoren einher.

**Tabelle 1-1: Sensitivierung von Tumorzellen für die Wirkung von Arsentrioxid durch eine Ko-Exposition mit pflanzlichen Polyphenolen (Übersicht der Literatur)**

Kombination	Effekt	Wirkungsmechanismen der Polyphenole	Zelllinie	Referenz
ATO + Chrysin	↑ Apoptoseinduktion	↓ Glutathionspiegel	U937	(Ramos <i>et al.</i> , 2008)
ATO + Curcumin	↓ Zellviabilität ↑ Apoptoseinduktion	↑ ROS-Bildung PI3K/Akt Inaktivierung	U937	(Sánchez <i>et al.</i> , 2010)
ATO + EGCG	↓ Zellviabilität ↑ Apoptoseinduktion	↓ Glutathionspiegel ↑ ROS-Bildung	HS-sultan	(Nakazato <i>et al.</i> , 2005)
	↑ Apoptoseinduktion	nicht untersucht	HL-60 NB4 U937	(Sánchez <i>et al.</i> , 2009b)
	↓ Proliferation ↑ Apoptoseinduktion	↑ ROS-Bildung	HL-60	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
ATO + Genistein	↑ Apoptoseinduktion	↑ ROS-Bildung p38-MAPK-Aktivierung AMPK-Aktivierung	U937	(Sánchez <i>et al.</i> , 2008; 2009b)
	↑ Apoptoseinduktion	↑ ROS-Bildung	HepG2 Hep3B SK-Hep-1	(Jiang <i>et al.</i> , 2010)
	↓ Zellviabilität ↑ Apoptoseinduktion	PI3K/Akt Inaktivierung NF- $\kappa$ B Inaktivierung	HepG2 Hep3B	(Ma <i>et al.</i> , 2011)
ATO + Silibinin	↑ Apoptoseinduktion	Caspase-3-Aktivierung	U-87 MG	(Dizaji <i>et al.</i> , 2012)
ATO + Quercetin	↑ Apoptoseinduktion	↓ Glutathionspiegel PI3K/Akt Inaktivierung	U937	(Ramos <i>et al.</i> , 2008)

(↑) Steigerung; (↓) Verminderung



Bezüglich der gemeinsamen Wirkung von ATO und pflanzlichen Polyphenolen auf maligne Gliome ist noch wenig bekannt. Frühere Versuche in unserem Labor haben ergeben, dass Genistein und Quercetin die Empfindlichkeit von C6 Rattenglioma-Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO nicht erhöhen (Klauser *et al.*, 2014). Bei Kombination von ATO mit Genistein - das in C6 Zellen ebenfalls zu einer erhöhten Bildung von ROS führte - zeigten sich additive Effekte. Quercetin steigerte bei diesen Zellen die intrazellulären Glutathionspiegel und verminderte sogar den ATO-Effekt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Glioma-Zellen humanen Ursprungs für die proliferationshemmende Wirkung von ATO durch verschiedene pflanzliche Polyphenole (Genistein, Quercetin, Curcumin, Resveratrol, EGCG) sensitiviert werden. Weiterhin wurde geprüft, ob die proliferationshemmende Wirkung von ATO durch Buthioninsulfoximin (BSO) verstärkt wird. BSO ist ein spezifischer Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (GCS), dem Schrittmacherenzym der Glutathionsynthese (Griffith *et al.*, 1979). In der Literatur wird eine inverse Beziehung zwischen den intrazellulären Glutathionspiegeln und der Sensitivität von Tumorzellen für ATO postuliert (Dai *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; König *et al.*, 2007). BSO hemmt spezifisch die Synthese von Glutathion, ohne dabei die Synthese von anderen Proteinen zu beeinträchtigen. Als Untersuchungsmodell wurden die beiden Glioma-Zelllinien A-172 und U-87 MG herangezogen. Ein Kriterium für die Wahl dieser humanen Zelllinien war ihr unterschiedlicher p53-Status (A-172: p53-Mutante vs. U-87 MG: p53-Wildtyp). Das p53-Protein ist ein bedeutender Tumorsuppressor, der an der Regulation von Apoptose und DNA-Reparatur beteiligt ist (Vogelstein *et al.*, 2000). Eine Mutation des p53-Gens wird mit Tumorentstehung und einer erhöhten Chemotherapieresistenz in Verbindung gebracht (Liu *et al.*, 2004).

Im Einzelnen wurden in dieser Arbeit folgende Fragen bearbeitet:

- (1) Unterscheiden sich A-172 und U-87 MG Zellen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit für die proliferationshemmende Wirkung von ATO?
- (2) Welche Mechanismen liegen der proliferationshemmenden Wirkung von ATO zugrunde:
  - Induktion von Apoptose und/oder Nekrose?
  - Arretierung der Zellen im Zellzyklus?
  - Induktion von oxidativem Stress (Bildung von Radikalen, Einfluss auf das Glutathionsystem)?
- (3) Können ausgewählte pflanzliche Polyphenole bzw. BSO die proliferationshemmende Wirkung von ATO erhöhen? Welche Kombinationswirkung liegt vor?

- (4) Werden die unter (2) genannten Prozesse bei einer Kombination von ATO mit den pflanzlichen Polyphenolen bzw. BSO beeinflusst/ausgelöst?
- (5) Gibt es qualitative bzw. quantitative Unterschiede zwischen den Glioma-Zelllinien hinsichtlich der Kombinationswirkung von ATO mit Polyphenolen bzw. BSO? Wenn ja, wie lassen sich diese Unterschiede erklären?

## 2 Material

### 2.1 Geräte und Hilfsmittel

Neben den Geräten und Hilfsmitteln, die zur Standardausrüstung eines Labors gehören, wurden verwendet:

Brutschränke	HERAcell 240	Heraeus
Durchflusszytometer	BD FACS Calibur	Becton Dickinson
<i>Cryo 1 °C Freezing Container</i>	Mr. Frosty	Nalgene
Fluoreszenzmikroskop	Phasenkontrast , IM 35, Photomikroskop III RS mit Fluoreszenzauflichtkondensator III RS, Objektiv Ph2 Neoflor	Zeiss
Fluorimeter	TECAN GENios Pro	Tecan
Fotokamera (Mikroskop Olympus)	Olympus E-300	Olympus
Fotokamera (Mikroskop Zeiss)	Power Shot A620	Canon
Inkubationsschüttler	Inkubator 1000/ Unimax1010 Thermomixer compact	Heidolph Eppendorf
Lichtmikroskope	Olympus IMT-2 (invers) Nikon Optiphot	Spectra Nikon
Photometer	ELx800UV universal microplate reader	BioTek Instruments
Reinstwasseranlage	ElgaStat Maxima	Elga
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS	Heraeus
Zählkammer	Thoma neu (0,1 mm Tiefe)	Marienfeld Superior
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R Heraeus fresco 21	Heraeus Heraeus

## 2.2 Reagenzien

Die Lagerung aller aufgeführten Reagenzien erfolgte entsprechend den Vorgaben der Hersteller.

APC Annexin V	Biosciences, BD	Franklin Lakes, USA
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt
DCFH <sub>2</sub> -DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat)	Sigma-Aldrich	Steinheim
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> ) mit Phenolrot (D5648)	Sigma-Aldrich	Steinheim
DMEM ohne Phenolrot (D5030)	Sigma-Aldrich	Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck	Darmstadt
DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure))	Sigma-Aldrich	Steinheim
EMEM ( <i>Eagle's Minimal Essential Medium</i> ) mit 10% FCS, Phenolrot und Pyruvat (MG-10)	CLS	Eppelheim
Ethanol (99%)	J.T. Baker	Deventer, NL
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich	Steinheim
FCS ( <i>fetal calver serum</i> )	Gibco, Invitrogen Ltd.	Paisley, UK
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck	Darmstadt
Fungizone (Amphotericin B 250 µg/ml)	Gibco, Invitrogen Ltd.	Paisley, UK
Gentamycin (10 mg/ml)	Gibco, Invitrogen Ltd.	Paisley, UK
D(+)-Glucose (wasserfrei)	Merck	Darmstadt
Glutamin (200 mM)	c.c.pro GmbH	Oberdorla
GSH (L-Glutathion, reduziert)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Glutathionreduktase (GR), 100 units	Merck	Darmstadt
HCL	Merck	Darmstadt
HEPES-Puffersubstanz 2-(4-(2 Hydroxyethyl)-1 piperazinyl)-ethansulfonsäure	Merck	Darmstadt
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	Steinheim
KCl	Merck	Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt
K-Na-Tartrat	Merck	Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt

NaCl	Merck	Darmstadt
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck	Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	J.T. Baker	Deventer, NL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt
NaOH	Merck	Darmstadt
NADPH (β-Nicotinamidadenindinukleotidphosphat reduziert - Tetranatriumsalz)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich	Steinheim
RNase A (Ribonuclease A), DNase-frei	AppliChem	Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Steinheim
5-Sulfosalicylsäure Dihydrat (SSA)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Tris	Roth	Karlsruhe
Trypanblau	Merck	Darmstadt
Trypsinlösung Tryple Select	Gibco, Invitrogen Ltd.	Paisley, UK

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen, Durchmesser 18 mm	Roth	Karlsruhe
FACS Röhrchen	BD, Pharmingen	Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc	Roskilde, DK
Kulturschalen, 35-mm und 10-cm	Sarstedt AG	Nümbrecht
Membranfilter (Porengröße: 0,2 μm)	Whatmann GmbH	Dassel
Mikrotiterplatten, 96-Well (steril)	Falcon, BD	Franklin Lakes, USA
Mikrotiterplatten, 96-Well (schwarzwandig, durchsichtiger Boden, steril)	Corning	New York, USA
Mikrotiterplatten, 96-Well (unsteril)	Sarstedt AG	Nümbrecht
Objektträger, 76 × 26 mm	Karl Hecht KG	Sondheim
Zellkulturflaschen, 75-cm <sup>2</sup>	Sarstedt AG	Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG	Nümbrecht

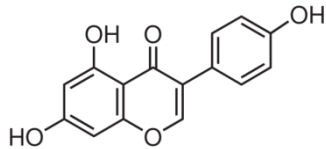
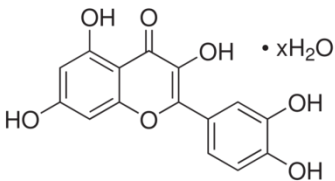
## 2.4 Testsubstanzen

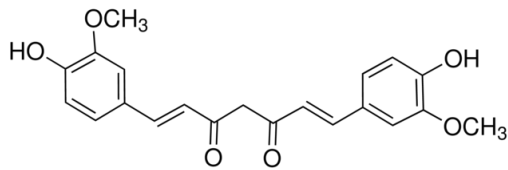
In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der unten aufgeführten Substanzen untersucht. Cumolhydroperoxid, ein bekannter Initiator von oxidativem Stress (Rüweler *et al.*, 2008) sowie Staurosporin, ein klassischer Apoptoseinduktor (Bertrand *et al.*, 1994) dienten als Positivkontrollen.

- Arsentrioxid (ATO)                      Sigma-Aldrich, Steinheim: A1010
- Pflanzliche Polyphenole                (vgl. Tab. 2-1)
- Buthioninsulfoximin (BSO)              Sigma-Aldrich, Steinheim: B2640
- Cumolhydroperoxid (CHP)               Sigma-Aldrich, Steinheim: 513296
- Staurosporin (ST)                        AppliChem, Darmstadt: A7626

Alle Testsubstanzen wurden entsprechend den Vorgaben der Hersteller bei -20 °C (Curcumin, Genistein, Resveratrol), 5 °C (EGCG, Quercetin, BSO, CHP, ST) bzw. bei Raumtemperatur (ATO) gelagert. BSO und Quercetin wurden am Tag der Exposition frisch angesetzt. Die Stammlösungen der übrigen Polyphenole und von ST wurden aliquotiert im Gefrierschrank bzw. die von ATO im Kühlschrank aufbewahrt und mehrfach verwendet. Alle Polyphenole sowie ST wurden in DMSO, ATO in NaOH (0,1 N), BSO und CHP direkt im Versuchsmedium gelöst. Der Anteil der Lösungsvermittler im Kulturmedium betrug 0,2% (v/v). Entsprechend wurden stets 500-fach höhere Konzentrationen der Substanzen hergestellt und jeweils 20 µl dieser Ansätze zu 10 ml Versuchsmedium gegeben.

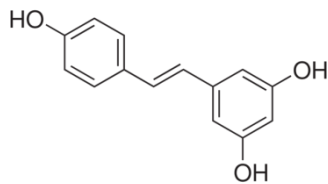
**Tabelle 2-1: Untersuchte pflanzliche Polyphenole**

<b>Genistein (Gen)</b> (Sigma-Aldrich, Steinheim: G6649)	
	Synonym: 4',5,7-Trihydroxyisoflavon Gruppe: Isoflavone
<b>Quercetin (Que)</b> (Sigma-Aldrich, Steinheim: 337951)	
	Synonym: 3,3',4',5,6 Pentahydroxyflavon Gruppe: Flavonole

**Curcumin (Cur)** (Sigma-Aldrich, Steinheim: 08511)

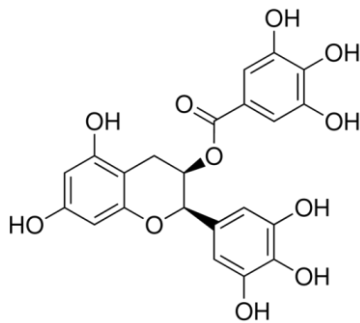
Synonym: Diferulylmethan

Gruppe: Curcuminoide

**Resveratrol (Res)** (Sigma-Aldrich, Steinheim: R5010)

Synonym: 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilben

Gruppe: Stilbene

**Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)** (Sigma-Aldrich, Steinheim: E4143)

Synonym: (-)-cis-3,3',4',5,5',7-Hexahydroxy-flavane-3-gallat

Gruppe: Flavanole

## 2.5 Zellkultur

### 2.5.1 Kulturmedien und Pufferlösungen

#### Kulturmedien

In Tabelle 2-2 ist die Zusammensetzung der verwendeten Medien aufgelistet. Bei den DMEM-Medien wurde zunächst das jeweilige Basismedium hergestellt, indem die angegebenen Komponenten in 1 l ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt wurde. Anschließend erfolgte eine vakuumbetriebene Sterilfiltration der Lösungen durch einen Membranfilter. Das EMEM-Basismedium wurde gebrauchsfertig geliefert. Die Zugabe von FCS, Gentamycin sowie Fungizone fand vor der erst-

maligen Verwendung statt, wobei das Volumen dieser Substanzen den Medien zunächst entnommen wurde. Alle Medien wurden im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt.

**Tabelle 2-2: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien**

<b>DMEM-Basismedium (mit Phenolrot)</b>		
DMEM-Pulver (Sigma-Aldrich: D5648)		
+ 4,766 g/l HEPES		
+ 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub>		
<b>EMEM-Basismedium (mit 10% FCS, Phenolrot und Pyruvat)</b>		
(CLS: MG-10) gebrauchsfertig geliefert		
<b>DMEM-Basismedium (ohne Phenolrot)</b>		
DMEM-Pulver (Sigma-Aldrich: D5030)		
+ 4,766 g/l HEPES		
+ 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub>		
+ 4,5 g/l Glucose		
+ 20 ml/l Glutamin		
<b>Wachstumsmedium (A)</b>		
DMEM-Basismedium (mit Phenolrot)	93,5 (v/v)	<b>Verwendung:</b> Wachstumsmedium für - A-172 Zellen (ab Passage 32) - U-87 MG Zellen (ab Passage 36)
FCS	5% (v/v)	
Gentamycin (10 mg/ml)	1% (v/v)	
Fungizone (250 µg/ml)	0,5% (v/v)	
<b>Wachstumsmedium (B)</b>		
DMEM-Basismedium (mit Phenolrot)	88,5 (v/v)	<b>Verwendung:</b> Wachstumsmedium für A-172 Zellen (bis Passage 32)
FCS	10% (v/v)	
Gentamycin (10 mg/ml)	1% (v/v)	
Fungizone (250 µg/ml)	0,5% (v/v)	
<b>Wachstumsmedium (C)</b>		
EMEM-Basismedium (10% FCS, mit Phenolrot)	98,5% (v/v)	<b>Verwendung:</b> Wachstumsmedium für U-87 MG Zellen (bis Passage 36)
Gentamycin (10 mg/ml)	1% (v/v)	
Fungizone (250 µg/ml)	0,5% (v/v)	



<b>Versuchsmedium (A)</b>		
DMEM-Basismedium (ohne Phenolrot)	93,5% (v/v)	<b>Verwendung:</b> - Untersuchungen zur Proliferationshemmung - Glutathionmessung - Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose
FCS	5% (v/v)	
Gentamycin (10 mg/ml)	1% (v/v)	
Fungizone (250 µg/ml)	0,5% (v/v)	
<b>Versuchsmedium (B)</b>		
DMEM-Basismedium (ohne Phenolrot)	98,5% (v/v)	<b>Verwendung:</b> Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose
Gentamycin (10 mg/ml)	1% (v/v)	
Fungizone (250 µg/ml)	0,5% (v/v)	

### PBS (phosphate buffered saline)-Puffer nach Dulbecco

Zur Herstellung der PBS-Puffer wurden die in Tabelle 2-3 aufgeführten Komponenten in ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst, wobei Lösungen A und B (Puffer mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) getrennt angesetzt und vorsichtig zusammengegeben wurden. Der pH-Wert lag jeweils bei 7,4. Der PBS-Puffer ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> wurde anschließend steril filtriert. Beide Puffer wurden im Kühlschrank bei 5 °C gelagert.

### HBSS (Hank's balanced salt solution)-Lösungen

Die Zusammensetzung der HBSS-Lösungen ist in Tabelle 2-3 angegeben. Die aufgelisteten Bestandteile wurden jeweils in ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst. Beim HEPES-haltigen HBSS wurde der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt. Um mögliche Kontaminationen zu vermeiden, fand die Zugabe von Glucose hier unmittelbar vor der erstmaligen Verwendung statt. Beim HEPES-freien HBSS lag der pH-Wert bei 7,4. Die Lösungen wurden im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt.

**Tabelle 2-3: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen**

<b>PBS-Puffer (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>)</b>		
NaCl	8000 mg/l	<b>Verwendung:</b> - Waschen der Zellen beim Passagieren - Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose
KCl	200 mg/l	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1150 mg/l	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg/l	

<b>PBS-Puffer (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>)</b>		
<u>Lösung A:</u>		<b>Verwendung:</b> Waschen der Zellen vor der - Proteinbestimmung - Glutathionmessung
NaCl	8000 mg/l	
KCl	200 mg/l	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1150 mg/l	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg/l	
<u>Lösung B:</u>		
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	100 mg/l	
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	132 mg/l	
<b>HBSS-Lösung (mit Glucose und HEPES)</b>		
<u>Lösung A:</u>		<b>Verwendung:</b> Waschen und Exposition der Zellen zur Bestimmung der Radikalbildung
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	185 mg/l	
KCl	400 mg/l	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 mg/l	
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	100 mg/l	
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	100 mg/l	
NaCl	7130 mg/l	
NaHCO <sub>3</sub>	350 mg/l	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	48 mg/l	
HEPES	7810 mg/l	
Glucose	1000 mg/l	
<b>HBSS-Lösung (ohne Glucose und HEPES)</b>		
<u>Lösung A:</u>		<b>Verwendung:</b> Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	185 mg/l	
KCl	400 mg/l	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 mg/l	
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	100 mg/l	
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	100 mg/l	
NaCl	7130 mg/l	
NaHCO <sub>3</sub>	350 mg/l	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	48 mg/l	

## 2.5.2 Verwendete Zelllinien

Alle Versuche dieser Arbeit wurden mit zwei adhären wachsenden, humanen Glioma-Zelllinien (A-172 und U-87 MG) durchgeführt. Beide Linien wurden im Jahr 2011 über den *Cell Line Service* (CLS; Eppelheim, Deutschland) bezogen, im Vorfeld dreimal subkultiviert und in flüssigen Stickstoff gelagert.

**A-172 Zellen** (CLS-Nr.: 300108, erhalten in Passage 27) wurden durch Giard *et al.* (1973) aus dem Glioblastom eines 53 Jahre alten Mannes etabliert. Die Experimente erfolgten mit den davon abstammenden Zellen der Passagen 31 bis 43.

**U-87 MG Zellen** (CLS-Nr.: 300367, erhalten in Passage 32) stammen aus einem primären Astrozytoma-Glioblastom einer 44-jährigen Frau (Ponten *et al.*, 1968). Zum Zeitpunkt der Entnahme klassifizierte man das Tumorstadium als Grad III (seit 2007: Grad IV). Für die Experimente wurden die Zellpassagen 36 bis 47 verwendet.

## 2.5.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung erfolgte eine Kryokonservierung der verwendeten Zelllinien. Dazu wurden die Zellen entsprechend dem Standardprotokoll geerntet und die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.5.4). Nach einer anschließenden Zentrifugation (5 min bei 1.300 RPM und 4 °C, Megafuge 1.0 R) wurde der erhaltene Überstand abgesaugt und das Pellet in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Für A-172 Zellen diente als Einfriermedium Wachstumsmedium B und für U-87 MG Zellen Wachstumsmedium C, jeweils mit einem DMSO-Anteil von 10%. Die hergestellte Zellsuspension ( $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml) wurde je 1,5 ml in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert, über Nacht im Isopropanol-gefüllten *Cryo Freezing Container* bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit erfolgten mit bis zu 12 aufeinanderfolgenden Zellpassagen. Die vorhandenen Kulturen wurden also regelmäßig verworfen und tiefgefrorene Zellen niedrigerer Passagen rekultiviert. Zur Rekultivierung wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad (37 °C) zügig aufgetaut und die Zellsuspension in 6,5 ml eiskaltem Wachstumsmedium A aufgenommen. Um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min bei 1.300 RPM und 4 °C abzentrifugiert (Megafuge 1.0 R), der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Wachstumsmedium A resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen komplett in eine 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt und das Medium auf ein Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt.

### 2.5.4 Kultivierung

A-172 und U-87 MG Zellen wurden in 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen im Wachstumsmedium A (15 ml) bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 10% gehalten. Einmal wöchentlich erfolgte eine Subkultivierung der Zellen. Das vorhandene Medium wurde hierbei abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS-Puffer (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und mit 8 ml Trypsinlösung (37 °C) versetzt. Nach kurzem Einwirken wurde die Trypsinlösung bis auf einen kleinen Rest abgesaugt und die Zellen für ca. 4 min im Brutschrank inkubiert. Der dadurch vom Boden gelöste Zellrasen wurde anschließend mit 5 ml kaltem Wachstumsmedium A heruntergespült und es wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren eine homogene Zellsuspension hergestellt. Vor dem Anlegen neuer Erhaltungs- und Versuchskulturen erfolgte eine Zellzahlbestimmung. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau (0,2% (v/v)) versetzt und lebende (trypanblau-negative) Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Nikon Optiphot) gezählt. Für Erhaltungskulturen wurden im Anschluss  $7,5 \cdot 10^5$  (A-172) bzw.  $5 \cdot 10^5$  (U-87 MG) Zellen pro Flasche ausgesät. Am 2. und 5. Tag nach der Passage fand ein Medienwechsel statt.

Kryokonservierte Passagen der A-172 (Passage 33 bis 35) und U-87 MG Zellen (Passage 28 bis 30) wurden bis zur Kryokonservierung entsprechend den Vorgaben des CLS gehalten. Für A-172 Zellen war als Kulturmedium Wachstumsmedium B und für U-87 MG Zellen Wachstumsmedium C sowie eine CO<sub>2</sub>-Atmosphäre von 5% empfohlen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die Kultivierung der für die Versuche verwendeten Passagen beider Zelllinien entsprechend der oberen Beschreibung angeglichen.

## 3 Methoden

### 3.1 Charakterisierung von A-172 und U-87 MG Zellen

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung der verwendeten Zelllinien durch die Bestimmung ihres Wachstumsverhaltens sowie der Zellgröße. Dazu wurden  $5,3 \cdot 10^5$  Zellen in 35-mm-Kulturschalen (Wachstumsfläche:  $8,55 \text{ cm}^2$ ) ausgesät und jeweils zwei der Schalen alle 24 h über insgesamt 4 Tage zur Messung herangezogen. Beide Linien wuchsen im Wachstumsmedium A (2 ml), welches am 3. Tag in den noch verbleibenden Schalen gegen 2 ml frisches ausgetauscht wurde. Die gewählte Zellzahl entsprach pro Fläche der in den Proliferationshemmversuchen (vgl. 3.2.3) geplanten Zelldichte pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ( $2 \cdot 10^4$  Zellen/ $0,32 \text{ cm}^2$ ). Versuche mit A-172 Zellen wurden außerdem mit zwei niedrigeren Ausgangszellzahlen ( $2,7 \cdot 10^5$  und  $1,3 \cdot 10^5$ ) durchgeführt.

Die jeweils geernteten Parallelschalen wurden zunächst zweimal mit 2 ml PBS-Puffer (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Eine der Schalen diente anschließend zur Bestimmung des Zellproteingehalts (vgl. 3.2.5), die andere zur Ermittlung der Zellzahl (vgl. 2.5.4). Für die Zellzählung wurden die Zellen mit  $500 \mu\text{l}$  Trypsinlösung ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) für ca. 30 min im Brutschrank ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$ ) inkubiert und durch die Zugabe von  $500 \mu\text{l}$  Wachstumsmedium A eine Zellsuspension hergestellt.

Die Untersuchung der beiden Parameter „Zellzahl“ und „Zellproteingehalt“ ließ Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Zelllinien zu. Die Gegenüberstellung beider Parameter erlaubte zudem Aussagen bezüglich der Zellgröße. Die Daten zum Wachstumsverhalten wurden mit Hilfe einer exponentiellen Wachstumsfunktion angepasst. Die verwendete Gleichung lautet:

$$Y_t = Y_0 \cdot e^{kt}$$

$Y_t$  gibt dabei die Populationsgröße (hier: als Zellzahl bzw. Zellproteinmenge) an.  $Y_0$  ist die Größe der Population zum Zeitpunkt Null.  $k$  repräsentiert die Wachstumsrate und  $t$  die Zeit. Mit der ermittelten Wachstumsrate  $k$  lässt sich die Verdopplungszeit für jede beliebige Population  $Y_t$  anhand der unten angegebenen Gleichung berechnen.

$$\text{Verdopplungszeit} = \ln(2)/k$$

## 3.2 Untersuchungen zur Proliferationshemmung

### 3.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Um die zytotoxische Potenz der Testsubstanzen zu charakterisieren, wurde die Zeit- und/oder Konzentrationsabhängigkeit ihrer Wirkung auf die Zellproliferation bestimmt. Als Maß für die Zahl der Zellen pro Well wurde der Gehalt an Zellprotein verwendet. Die Proteinbestimmung erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Lowry *et al.* (1951). Dieses quantitative Verfahren beruht auf der Biuret-Reaktion, gefolgt von einer Reduktion des Folin-Ciocalteus Phenolreagenzes (Lösung von Natriumwolframat und -molybdat sowie Phosphor- und Salzsäure). In alkalischer Lösung bilden sich in Anwesenheit von Kupfersulfat und Proteinen (oder Peptiden) zunächst Komplexe zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und den vorhandenen Peptidbindungen (Biuret-Reaktion). In einem zweiten Reaktionsschritt bewirken vorrangig die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan sowie geringfügig Cystein, Cystin und Histidin die Reduktion von Wolframat bzw. Molybdat. Dieser Vorgang wird durch die zuvor gebildeten Kupfer-Protein-Komplexe erleichtert. Das Folin-Ciocalteus Phenolreagenz erfährt hierbei einen Farbumschlag von gelb zu blau. Die resultierende Färbung ist direkt proportional zur Zellproteinmenge und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 630 nm erfasst werden.

### 3.2.2 Arbeitslösungen

- PBS-Puffer (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ): Zusammensetzung siehe Tabelle 2-3, Seite 15
- 0,5 N NaOH: 20 g NaOH gelöst in 1 l ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$
- Proteinstandards:  
(portionsweise bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert) hergestellt aus in 0,5 N NaOH gelöstem Rinderserumalbumin (BSA)
  - Standard 0: 1 mg BSA/ml
  - Standard 1: 0,4 mg BSA/ml
  - Standard 2: 0,3 mg BSA/ml
  - Standard 3: 0,2 mg BSA/ml
  - Standard 4: 0,1 mg BSA/ml
  - Standard 5: 0,05 mg BSA/ml
- Biuretlösung:  
(am Versuchstag angesetzt) 48 Teile 4%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$   
1 Teil 2% K-Na-Tartrat in ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$   
1 Teil 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$
- Folinlösung: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz 1:2 verdünnt mit ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$

### 3.2.3 Versuchsaufbau und -durchführung

Es wurden Kulturen in 96-Well-Mikrotiterplatten mit  $1 \cdot 10^4$  (A-172) bzw.  $2 \cdot 10^4$  Zellen (U-87 MG) pro Well (Spalten 3 - 10, Zeilen B - G) im Wachstumsmedium A angelegt (vgl. Abb. 3-1 und 3-2). Nach 24 h wurde das vorhandene Medium durch Expositionsmedium A ersetzt, welches verschiedene Testsubstanzen enthielt. Die äußeren Wells der Platten waren zellfrei und nur mit dem entsprechenden Medium ( $200 \mu\text{l}$ ) versehen. Bei jeder Versuchsdurchführung wurde jeweils eine Platte nur mit ATO ( $0,5 - 20 \mu\text{M}$ ) und dem zu testenden Polyphenol bzw. BSO belegt ( $2 - 100 \mu\text{M}$ ) (vgl. Abb. 3-1,  $T_1 - T_6$ ). Parallele Platten enthielten Kombinationen aus ATO ( $0,5 - 20 \mu\text{M}$ ) und 5, 20 bzw.  $50 \mu\text{M}$  des Polyphenols (vgl. Abb. 3-2,  $A_1 - A_6 + T$ ). In den Kombinationsversuchen mit BSO ( $5, 20$  bzw.  $100 \mu\text{M}$ ) wurden die ATO-Konzentrationen auf  $0,05$  bis  $10 \mu\text{M}$  (A-172) bzw.  $0,02$  bis  $10 \mu\text{M}$  (U-87 MG) verringert. Als Kontrolle dienten jeweils Zellen, die nur mit den Lösungsmitteln ( $0,1 \text{ N NaOH}$  und/oder DMSO) behandelt wurden. Um die Zeitabhängigkeit der proliferationshemmenden Wirkung zu untersuchen, wurden in den Versuchen mit Genistein, Quercetin und BSO je zwei Platten auf die gleiche Weise behandelt und jeweils eine davon 24 bzw. 72 h nach der Exposition zur Proteinbestimmung herangezogen. Bei den Versuchen mit Curcumin, Resveratrol und EGCG erfolgte die Proteinbestimmung lediglich nach 72 h.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	S2										S2	B	A
B	B	S2	K	$T_1$	$T_2$	$T_3$	K	$T_4$	$T_5$	$T_6$	S2	B	B	
C	B	S3	K	$T_1$	$T_2$	$T_3$	K	$T_4$	$T_5$	$T_6$	S3	B	C	
D	B	S3	K	$T_1$	$T_2$	$T_3$	K	$T_4$	$T_5$	$T_6$	S3	B	D	
E	S0	S4	K	$T_1$	$T_2$	$T_3$	K	$T_4$	$T_5$	$T_6$	S4	S0	E	
F	S0	S4	K	$T_1$	$T_2$	$T_3$	K	$T_4$	$T_5$	$T_6$	S4	S0	F	
G	S1	S5	K	$T_1$	$T_2$	$T_3$	K	$T_4$	$T_5$	$T_6$	S5	S1	G	
H	S1	S5									S5	S1	H	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

**Abbildung 3-1: Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung der proliferationshemmenden Wirkung einer Testsubstanz**

B = Blindwerte ( $0,5 \text{ N NaOH}$ ); S0 - S5 = Proteinstandards; K = Kontrolle;  $T_{1-6}$  = Testsubstanz ( $T_1$  = niedrigste und  $T_6$  = höchste Konzentration).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	S2									S2	B	A
B	B	S2	K	A <sub>1</sub> T	A <sub>2</sub> T	A <sub>3</sub> T	K	A <sub>4</sub> T	A <sub>5</sub> T	A <sub>6</sub> T	S2	B	B
C	B	S3	K	A <sub>1</sub> T	A <sub>2</sub> T	A <sub>3</sub> T	K	A <sub>4</sub> T	A <sub>5</sub> T	A <sub>6</sub> T	S3	B	C
D	B	S3	K	A <sub>1</sub> T	A <sub>2</sub> T	A <sub>3</sub> T	K	A <sub>4</sub> T	A <sub>5</sub> T	A <sub>6</sub> T	S3	B	D
E	S0	S4	K	A <sub>1</sub> T	A <sub>2</sub> T	A <sub>3</sub> T	K	A <sub>4</sub> T	A <sub>5</sub> T	A <sub>6</sub> T	S4	S0	E
F	S0	S4	K	A <sub>1</sub> T	A <sub>2</sub> T	A <sub>3</sub> T	K	A <sub>4</sub> T	A <sub>5</sub> T	A <sub>6</sub> T	S4	S0	F
G	S1	S5	K	A <sub>1</sub> T	A <sub>2</sub> T	A <sub>3</sub> T	K	A <sub>4</sub> T	A <sub>5</sub> T	A <sub>6</sub> T	S5	S1	G
H	S1	S5									S5	S1	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

**Abbildung 3-2: Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung der proliferationshemmenden Wirkung der Kombination aus zwei Testsubstanzen**

B = Blindwerte (0,5 N NaOH); S0 - S5 = Proteinstandards; K = Kontrolle; A<sub>1-6</sub> = ATO (A<sub>1</sub> = niedrigste und A<sub>6</sub> = höchste Konzentration); T = Kombinationssubstanz (eine Konzentration an Polyphenol oder BSO).

Nach Ablauf der Expositionszeit wurde das Medium in allen Wells abgesaugt und diese dreimal mit Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-haltigem PBS-Puffer (200 µl/Well) gewaschen. Die zellhaltigen Wells wurden dann mit 0,5 N NaOH (60 µl/Well) versetzt und die Platten zur besseren Zellauflösung für 45 min bei 37 °C auf dem Inkubationsschüttler (Heidolph) geschüttelt. In die Wells der Spalten 1, 2, 11 und 12 wurden anschließend 60 µl 0,5 N NaOH (Blindwerte) bzw. 60 µl Proteinstandards gegeben, alle Wells mit je 150 µl Biuret-Lösung beschickt und die Platten für weitere 10 min (37 °C) auf den Schüttler gestellt. Im Anschluss wurden pro Well 60 µl Folinlösung zugegeben und diese durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach weiteren 20 min auf dem Inkubationsschüttler (37 °C) folgte eine photometrische Messung (ELx800UV universal microplate reader) bei 630 nm.

### 3.2.4 Auswertung

Anhand der blindwertbereinigten Extinktionswerte der Proteinstandards wurde eine Eichkurve erstellt. Diese diente zur Zuordnung der um den Blindwert bereinigten Extinktionen jedes zellhaltigen Wells zu dem entsprechenden Proteingehalt (µg/Well). Die 6 gemittelten Zellproteingehalte pro Expositionsbedingung wurden anschließend in Relation zum mittleren Proteingehalt der 12 Kontrollwells (= 100%) gesetzt. Die erhal-

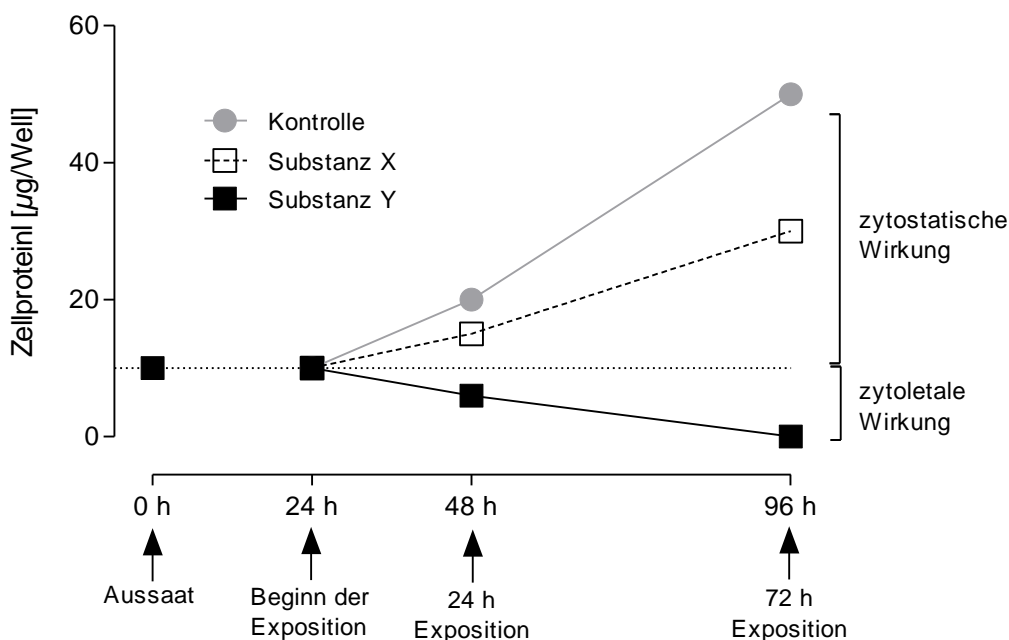


tenen Daten zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurden mittels einer Hill-Funktion mit folgender Gleichung angepasst:

$$Y = \frac{\text{Top}}{1 + 10^{[(\log(\text{EC}_{50}/x)) \cdot \text{HillSlope}]}}$$

Y gibt dabei die Zellproteinmenge pro Well in % der unbehandelten Kontrolle an und x die Konzentration der Testsubstanz. Aus den angepassten Kurven wurden die toxikologischen Kennzahlen  $\text{EC}_{20}$ ,  $\text{EC}_{50}$  und  $\text{EC}_{80}$  ( $\text{EC}$  = *effective concentration*) abgeleitet, welche eine 20%-, 50%- bzw. 80%-ige Proliferationshemmung bezogen auf die Kontrolle ergaben. Wurden die Effektniveaus in einzelnen Fällen nicht erreicht, erfolgte dort, wo es vertretbar war, eine Extrapolation der Werte mittels der Hill-Funktion.

Die proliferationshemmende (= zytotoxische) Wirkung der Substanzen wurde durch Verminderung des Zellproteingehalts pro Well im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle wiedergegeben. Die Verminderung des Zellproteins pro Well kann sowohl auf eine zytostatische als auch auf eine zytoletale Wirkungsweise zurückgehen. Abbildung 3-3 stellt schematisch Wachstumskurven bei Exposition mit einer zytostatisch (X) und einer zytoletal agierenden Substanz dar. Die Zeitachse gibt nochmal den experimentellen Aufbau wieder.



**Abbildung 3-3: Beispiel für Wachstumskurven bei Exposition mit einer zytostatisch und einer zytoletal wirkenden Substanz**

Die Zellen werden über insgesamt 96 h kultiviert. In den ersten 24 h nach der Aussaat findet eine Adaptierung an die neuen Kulturbedingungen statt. Die Exposition erfolgt 24 h nach der Aussaat über weitere 24 bzw. 72 h. Eine zytostatisch wirkende Substanz X vermindert die

Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen (bis hin zur kompletten Wachstumshemmung). Eine zytotoxal agierende Substanz Y führt dagegen zu einer Abnahme der Zahl der angehefteten Zellen.

### **3.2.5 Proteinbestimmung in 35-mm- und 10-cm-Kulturschalen**

Die Bestimmung der Zellproteinmenge war neben den Versuchen zur Proliferationshemmung auch Bestandteil anderer Fragestellungen. Zellprotein aus anderen Kulturschalen wurde zur Messung stets in 96-Well-Mikrotiterplatten überführt.

#### 35-mm-Kulturschalen

Versuche zur Charakterisierung der verwendeten Zelllinien (vgl. 3.1) sowie zur Bestimmung des Glutathiongehalts (vgl. 3.5) erfolgten in 35-mm-Kulturschalen. Nach dem Waschen der Zellen (siehe entsprechendes Kapitel) wurden die Schalen mit 0,5 N NaOH (1 ml) versetzt und für 45 min bei 37 °C auf dem Inkubationsschüttler (Heidolph) geschüttelt. Anschließend wurde der gesamte Inhalt in Eppendorfcups überführt und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Am Tag der Messung wurden 60 µl jeder Probe (wenn notwendig verdünnt) in jeweils zwei innere Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und die Wells der Spalten 1, 2, 11 und 12 mit je 60 µl 0,5 N NaOH (Blindwerte) bzw. 60 µl der Proteinstandards belegt. Alle weiteren Schritte wurden analog zu 3.2.3 durchgeführt.

#### 10-cm-Kulturschalen

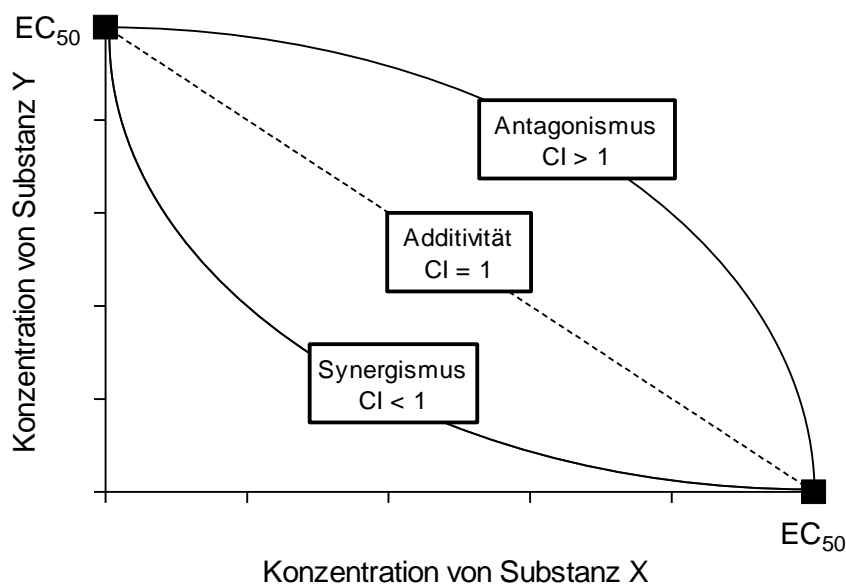
Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose (vgl. 3.6) fanden in 10-cm-Kulturschalen statt. Von der in den Versuchen hergestellten Zellsuspension wurden jeweils zweimal 25 µl mit 0,5 N NaOH auf 600 µl aufgefüllt, für 45 min bei 37 °C inkubiert (Inkubationsschüttler, Heidolph) und bis zur Messung eingefroren (-20 °C). Zur Proteinbestimmung wurden 60 µl jeder Probe in jeweils zwei innere Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Wells der Reihen 1, 2, 11 und 12 mit je 60 µl 0,5 N NaOH (Blindwerte) bzw. je 60 µl der Proteinstandards belegt. Alle weiteren Schritte entsprachen der obigen Beschreibung (vgl. 3.2.3).

### 3.3 Analyse der Kombinationswirkung

#### 3.3.1 Isobologramm- und Kombinationsindex-Methode

Die Analyse der Kombinationswirkung beruht auf einem Vergleich zwischen den experimentell ermittelten Kombinationseffekten und ihrer Prognose nach dem Konzept der Konzentrationsadditivität. Dieses Konzept stellt ein pharmakologisch-theoretisches Modell dar, welches in seinem Ursprung auf Loewe *et al.* (1926) zurückgeht. Es ermöglicht Vorhersagen über konzentrationsadditives Zusammenwirken von Substanzen mit ähnlicher Wirkungsweise und gemeinsamen Wirkorten. Dem Modell liegt der Gedanke zugrunde, dass eine Mischungskomponente teils oder komplett durch die gleichartig wirksame Konzentration einer anderen Komponente ersetzt werden kann, ohne dass sich ein beobachteter Effekt verändert. Entspricht ein experimentell ermittelter Kombinationseffekt also dem nach dem Konzept der Konzentrationsadditivität erwarteten, besteht eine additive Wirkung. Ist ein tatsächlich ermittelter Kombinationseffekt dagegen höher bzw. geringer, als aufgrund der Einzelsubstanzeffekte angenommen wird, deutet das auf Synergismus bzw. Antagonismus hin.

Das Konzept der Konzentrationsadditivität ist Bestandteil der Isobologramm-Methode nach Berenbaum (1977) und der Kombinationsindex (CI)-Methode nach Chou *et al.* (1983) (vgl. Abb. 3-4). Bei beiden Verfahren werden vollständige Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Einzelsubstanzen und ihrer Mischungen zur Analyse benötigt.



**Abbildung 3-4: Schematische Darstellung eines Isobogramms nach Berenbaum (1977) verknüpft mit den Kombinationsindizes nach Chou *et al.* (1983)**

Nach Berenbaum (1977) reicht es nicht aus, jeweils nur eine Konzentration von zwei Substanzen zu testen, um ihre Kombinationswirkung zu bestimmen. In vielen Arbeiten zur Sensitivierung von Tumorzellen für Chemotherapeutika ist diese Herangehensweise allerdings gängig (Nakazato *et al.*, 2005; Doudican *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011), was kritisch zu bewerten ist. In solchen Fällen kann nur dann auf Synergismus geschlossen werden, wenn der Kombinationseffekt deutlich höher ist, als die Effekte der beiden Einzelsubstanzen.

Bei der graphischen Analyse nach Berenbaum (1977) werden die Konzentrationen von zwei Substanzen (X und Y), die zur Auslösung eines bestimmten Effekts benötigt werden (hier: EC<sub>50</sub>-Werte), zusammenhängend in einem Isobologramm (Isobole = Linie der Konzentrationen mit der gleichen Wirkung) dargestellt. Auf die x-Achse des Isobologramms wird der EC<sub>50</sub>-Wert von Substanz X, auf die y-Achse derjenige von Substanz Y aufgetragen und aus der Verbindung der beiden Punkte die Isobolengerade abgeleitet. Mischungen von Substanz X und Y, die sich auf dieser Geraden befinden, entsprechen dem Konzept der Konzentrationsadditivität. Oder anders ausgedrückt, generieren die EC<sub>50</sub>-Werte der Mischungen von Substanz X und Y eine gerade Isobole, ist ihre Kombinationswirkung als additiv zu werten. Bilden die EC<sub>50</sub>-Werte der Mischungen von Substanz X und Y eine konkav verlaufende Isobole, ist ihre Kombinationswirkung synergistisch. Bilden die EC<sub>50</sub>-Werte der Mischungen dagegen eine konvex verlaufende Isobole, ist die Kombinationswirkung antagonistisch.

Bei der algebraischen Methode nach Chou *et al.* (1983) werden Kombinationsindizes nach der unten aufgeführten Gleichung berechnet (hier am Beispiel von EC<sub>50</sub>-Werten). Gemäß Definition liegt Additivität bei einem CI-Wert = 1 vor, Synergismus bei einem CI-Wert < 1 und Antagonismus bei einem CI-Wert > 1.

$$CI (EC_{50}) = \frac{EC_{50} \text{ der Substanz X in Kombination}}{EC_{50} \text{ der Substanz X allein}} + \frac{EC_{50} \text{ der Substanz Y in Kombination}}{EC_{50} \text{ der Substanz Y allein}}$$

In der vorliegenden Arbeit wurden für eine feinere Abstufung die nach Chou (2006) definierten Grenzen für die CI-Werte festgelegt:

- Synergismus: CI-Wert ≤ 0,90
- Additivität: CI-Wert = 0,91 - 1,09
- Antagonismus: CI-Wert ≥ 1,10

Es sei darauf hingewiesen, dass diese Klassifizierung willkürlich und nur als Richtwert zu deuten ist. Andere Autoren, wie z.B. Wang *et al.* (2008) benutzen andere Grenzen. Nach Chou (2006) würde bei weiterer Aufschlüsselung „wirklicher“ Synergismus erst

bei CI-Werten  $< 0,3$  und „wirklicher“ Antagonismus bei CI-Werten  $> 1,45$  vorliegen. Andernfalls sind die Effekte als schwach oder moderat einzustufen.

### 3.3.2 Beispiel für die angewendeten Methoden

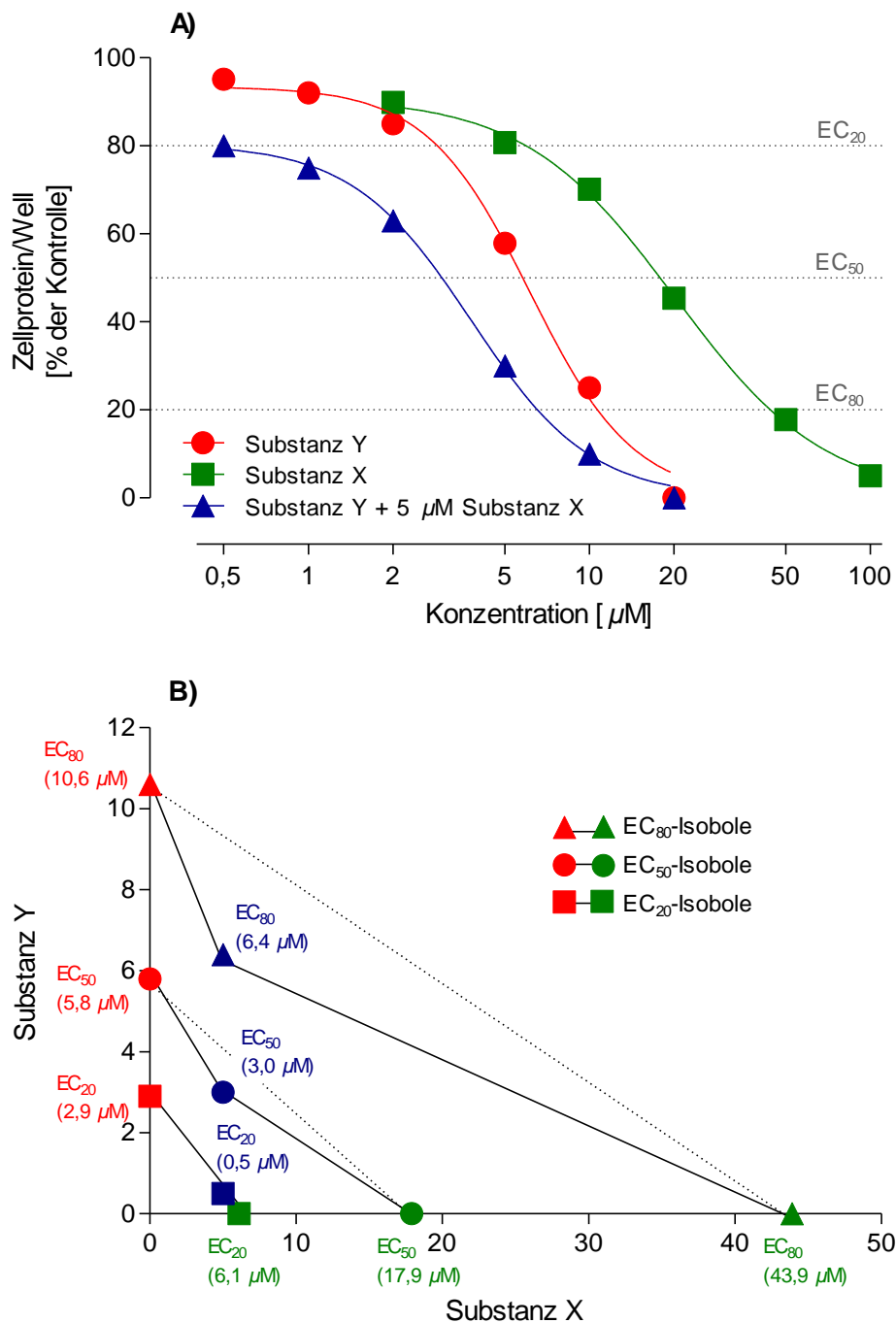
Im Folgenden ist ein Beispiel zur Bewertung der Kombinationswirkung von zwei Substanzen (X und Y) dargestellt. Abbildung 3-5A zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der beiden Substanzen allein sowie in Kombination. Aus diesen Kurven wurden die  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte abgeleitet und zur Darstellung eines Isobogramms (vgl. Abb. 3-5B) sowie zur Berechnung von CI-Werten verwendet:

$$CI (EC_{20}) = \frac{0,5 \mu M}{2,9 \mu M} + \frac{5 \mu M}{6,1 \mu M} = 0,99$$

$$CI (EC_{50}) = \frac{3,0 \mu M}{5,8 \mu M} + \frac{5 \mu M}{17,9 \mu M} = 0,80$$

$$CI (EC_{80}) = \frac{6,4 \mu M}{10,6 \mu M} + \frac{5 \mu M}{43,9 \mu M} = 0,72$$

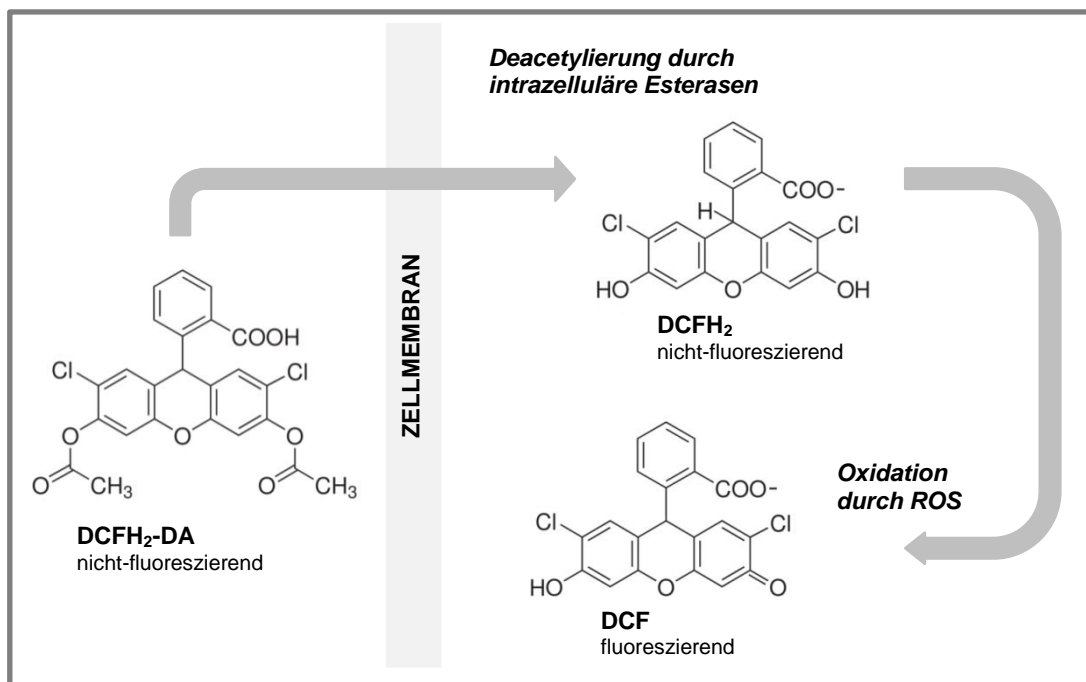
Bei der Betrachtung von  $EC_{20}$ -Werten zeigt sich für die Kombination von Substanz X und Y eine additive Wirkung. Der  $EC_{20}$ -Wert ihrer Mischung ergibt, graphisch dargestellt, eine gerade Isobole und weicht damit nicht vom Konzept der Konzentrationsadditivität ab. Der berechnete CI ( $EC_{20}$ )-Wert beträgt 0,99 und befindet sich damit im festgelegten Intervall für Additivität (0,91 - 1,09). Bei den  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werten liegt eine synergistische Kombinationswirkung vor. Die  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte der Mischung von Substanz X und Y ergeben in der isobographischen Darstellung konkav verlaufende Isobolen. Die CI ( $EC_{50}$ )- und ( $EC_{80}$ )-Werte fallen mit 0,80 bzw. 0,72 in den definierten Bereich für Synergismus ( $\leq 0,9$ ). Numerisch formal handelt es sich um eine schwach synergistische Wirkung, da „wirklicher“ Synergismus erst bei CI-Werten  $< 0,3$  angenommen wird (Chou, 2006).



### 3.4 Bestimmung der intrazellulären Radikalbildung

#### 3.4.1 DCF-Fluoreszenzmethode

Die Quantifizierung der intrazellulären Radikalbildung erfolgte unter Verwendung der DCF-Fluoreszenz-Methode nach Wang *et al.* (1999) sowie Rüweler *et al.* (2008). Das angewendete Verfahren beruht auf der Oxidation des nichtfluoreszierenden DCFH<sub>2</sub>-DA zum stark fluoreszierenden DCF (vgl. Abb. 3-6).



**Abbildung 3-6: Prinzip der DCF-Fluoreszenz Methode**

Das unpolare, nicht-fluoreszierende DCFH<sub>2</sub>-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat) diffundiert rasch ins Cytosol, wo es durch intrazelluläre Esterasen in das polare, nicht-fluoreszierende DCFH<sub>2</sub> (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein) hydrolysiert wird. DCFH<sub>2</sub> wird in Anwesenheit von ROS zu dem stark fluoreszierenden DCF (2',7'-Dichlorofluorescein) oxidiert.

Das aufgrund von zwei Acetatgruppen hydrophobe DCFH<sub>2</sub>-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat) ist frei membranpermeabel und diffundiert leicht in die Zellen. Hier wird es durch unspezifische intrazelluläre Esterasen deacetyliert und verbleibt im Form von DCFH<sub>2</sub> (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein), welches ebenfalls nicht fluoreszierend ist, im Cytosol. In Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird DCFH<sub>2</sub> zum stark fluoreszierenden DCF (2',7'-Dichlorofluorescein) oxidiert. Die Fluoreszenzintensität des DCF verhält sich proportional zu den in den Zellen gebildeten ROS und kann bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm detektiert werden. Die Höhe des gemessenen Signals gilt hierbei als summiert

sches Maß für den oxidativen Stress, da DCFH<sub>2</sub> unspezifisch mit allen in den Zellen gebildeten ROS reagiert (Halliwell *et al.*, 2004).

### 3.4.2 Arbeitslösungen

- HBSS-Lösung (mit HEPES): Zusammensetzung siehe Tabelle 2-3, Seite 15
- 10 mM CHP-Stammlösung: 17,3 µl 88% CHP in 10 ml HBSS gelöst (am Versuchstag angesetzt)
- DCFH<sub>2</sub>-DA-Stammlösung: 5 mM DCFH<sub>2</sub>-DA in DMSO gelöst (am Versuchstag angesetzt)

### 3.4.3 Versuchsaufbau und -durchführung

Zur Bestimmung der intrazellulären ROS-Bildung wurden A-172 bzw. U-87 MG Zellen in schwarzwandige 96-Well-Mikrotiterplatten mit durchsichtigem Boden ausgesät. Die inneren Wells (Spalten 2 - 11 und Zeilen B - G) (vgl. Abb. 3-7) erhielten jeweils  $2 \cdot 10^4$  Zellen in 200 µl Wachstumsmedium A. Die äußeren Wells (Blindwerte) waren zellfrei und nur mit dem entsprechenden Medium versehen. Die Weiterbehandlung einer Platte erfolgte 24 h nach der Aussaat.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B											B
B	B	C	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	T <sub>a1</sub>	T <sub>a2</sub>	K	T <sub>b1</sub>	T <sub>b2</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>a1</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>b1</sub>	B
C	B	C	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	T <sub>a1</sub>	T <sub>a2</sub>	K	T <sub>b1</sub>	T <sub>b2</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>a1</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>b1</sub>	B
D	B	C	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	T <sub>a1</sub>	T <sub>a2</sub>	K	T <sub>b1</sub>	T <sub>b2</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>a1</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>b1</sub>	B
E	B	C	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	T <sub>a1</sub>	T <sub>a2</sub>	K	T <sub>b1</sub>	T <sub>b2</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>a1</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>b1</sub>	B
F	B	C	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	T <sub>a1</sub>	T <sub>a2</sub>	K	T <sub>b1</sub>	T <sub>b2</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>a1</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>b1</sub>	B
G	B	C	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	T <sub>a1</sub>	T <sub>a2</sub>	K	T <sub>b1</sub>	T <sub>b2</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>a1</sub>	A <sub>1</sub> T <sub>b1</sub>	B
H	B											B

**Abbildung 3-7: Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung der intrazellulären Radikalbildung**

B = Blindwerte (HBSS-Lösung), C = Cumolhydroperoxid, K = Kontrolle, A = ATO in zwei verschiedenen Konzentrationen (1-2); T<sub>a</sub>/T<sub>b</sub> = ein Polyphenol oder BSO, jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen (1-2).



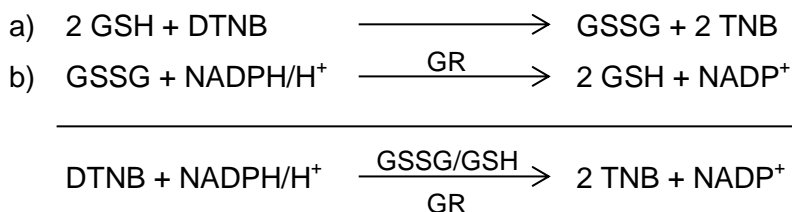
Nach Ablauf der Wachstumszeit wurden alle Wells zweimal mit 200  $\mu$ l HBSS gewaschen und die Zellen mit 10  $\mu$ M DCFH<sub>2</sub>-DA in 150  $\mu$ l HBSS für 30 min im Brutschrank (37 °C, 10% CO<sub>2</sub>) aufgeladen. Der nicht aufgenommene Farbstoff wurde anschließend durch zweimaliges Waschen der Zellen mit HBSS (150  $\mu$ l) entfernt. Dann wurden die Zellen mit ATO (1, 2 bzw. 10  $\mu$ M), den Polyphenolen (20 und 50  $\mu$ M), BSO (5 und 20  $\mu$ M) sowie einer Kombination aus ATO (2 bzw. 1  $\mu$ M) und den einzelnen Polyphenolen (jeweils 20  $\mu$ M) bzw. BSO (5  $\mu$ M) in 150  $\mu$ l HBSS exponiert. Als Positivkontrolle dienten mit 100  $\mu$ M CHP behandelte Zellen. Die äußeren Wells (Blindwerte) wurden nur mit HBSS (150  $\mu$ l) beschickt. Da für Curcumin eine Eigenfluoreszenz beschrieben ist (Strasser *et al.*, 2005), wurden in den entsprechenden Versuchen außerdem 20 sowie 50  $\mu$ M des Polyphenols in zell- und DCF-freien Wells (Reihe A und H, Spalten 4 - 9) zur Kontrolle mitgeführt. Die hierbei erzeugte Fluoreszenz wurde bei der Auswertung vom gemessenen DCF-Signal in den mit Curcumin behandelten Zellen subtrahiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Fluorimeter (TECAN GENios Pro) direkt nach der Exposition, wobei folgende Einstellungen gewählt wurden:

- Messmodus: Fluoreszenzintensität, Kinetik
- Fluoreszenz-Wellenlängen: Anregung: 485 nm / Emission: 535 nm
- Verstärkungsgrad (*Gain*-Wert): 40 (manuell)
- Anzahl der Messungen: 2
- Mehrfachmessungen pro Well: 2 × 2 (Quadrat)
- Anzahl der kinetischen Zyklen: 9
- Kinetischer Zeitabstand: 15 min
- Zulässiger Temperaturbereich: 36 - 38°C

### 3.5 Bestimmung des intrazellulären Glutathiongehalts

#### 3.5.1 DTNB-Glutathionreduktase Recycling-Assay

Die Bestimmung des Gesamtglutathions (GSx) erfolgte mit dem DTNB-Glutathionreduktase Recycling-Assay in Anlehnung an Abdelmohsen *et al.* (2003). Bei dieser enzymatischen Methode wird reduziertes Glutathion (GSH) kontinuierlich durch 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) unter Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) zum Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert (vgl. Schritt a). Das GSSG wird in Anwesenheit von NADPH durch die Glutathionreduktase (GR) wieder reduziert (vgl. Schritt b). Hierbei entstehendes GSH kann erneut mit DTNB reagieren.



Die Bildung des gelben TNB ist direkt proportional zu dem in der Probe vorhandenen Gesamtglutathion (GSx = GSH + GSSG) und kann photometrisch bei 405 nm (Anderson, 1985) erfasst werden.

#### 3.5.2 Arbeitslösungen

- PBS-Puffer (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>): Zusammensetzung siehe Tabelle 2-3 , Seite 15
- 10 mM HCL: 100 µl 1 N HCL ad 10 ultra pure H<sub>2</sub>O
- 10% SSA-Lösung: 5 g SSA in 50 ml ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst
- 5% SSA-Lösung: 2,5 g SSA in 50 ml ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst
- 50 mM Phosphatpuffer: 19,6 ml 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit  
(pH-Wert 7,4) 80,4 ml 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> gemischt
- Assaypuffer: 0,5 mM EDTA in 50 mM Phosphatpuffer gelöst  
(pH-Wert 7,4)
- 10 mM GSH-Stammlösung: 7,68 mg in 2,5 ml ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst  
(portionsweise bei -20 °C gelagert)
- GSH-Standards: hergestellt aus 10 mM GSH-Stammlösung und  
(am Versuchstag angesetzt) 5% SSA-Lösung:

	Standard 1: 50 $\mu\text{M}$ GSH
	Standard 2: 25 $\mu\text{M}$ GSH
	Standard 3: 12,5 $\mu\text{M}$ GSH
	Standard 4: 6,25 $\mu\text{M}$ GSH
	Standard 5: 3,125 $\mu\text{M}$ GSH
▪ DTNB-Stammlösung: (portionsweise bei -20 °C gelagert)	1,5 mg DTNB in 1 ml DMSO gelöst
▪ 40 mM NADPH-Stammlösung: (portionsweise bei -20 °C gelagert)	4 mg NADPH in 100 $\mu\text{l}$ ultra pure H <sub>2</sub> O gelöst
▪ GR-Lösung (6 units/ml): (am Versuchstag angesetzt)	500 $\mu\text{l}$ Assay Puffer versetzt mit 7 $\mu\text{l}$ GR (460 units/ml)
▪ Reaktionslösung: (am Versuchstag angesetzt)	16 ml Assaypuffer versetzt mit 456 $\mu\text{l}$ GR-Lösung (6 units/ml) und 456 $\mu\text{l}$ DTNB-Stammlösung
▪ NADPH-Lösung (0,16 mg/ml): (am Versuchstag angesetzt)	6 ml Assaypuffer versetzt mit 24 $\mu\text{l}$ der 40 mM NADPH-Stammlösung

### 3.5.3 Versuchsaufbau und -durchführung

Für die Glutathionbestimmung wurden  $6,1 \cdot 10^5$  Zellen pro 35-mm-Kulturschale in einem Volumen von 2 ml Wachstumsmedium A ausgesät. Nach 24 h wurde das vorhandene Medium durch 1 ml Expositionsmedium A ersetzt. Dieses enthielt ATO (0,5 - 10  $\mu\text{M}$ ), die Polyphenole (jeweils 20  $\mu\text{M}$ ), BSO (5 und 20  $\mu\text{M}$ ) oder eine Kombination aus ATO (2  $\mu\text{M}$ ) und den einzelnen Polyphenolen (20  $\mu\text{M}$ ) bzw. ATO (1  $\mu\text{M}$ ) und BSO (5 und 20  $\mu\text{M}$ ). Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit den Lösungsmitteln (0,1 N NaOH und/oder DMSO) behandelt wurden. Es wurden jeweils 4 Schalen auf die gleiche Weise beschickt und je 2 davon nach einer 24 h-Exposition zur Messung des Glutathion- bzw. des Proteingehalts herangezogen.

Nach Ablauf der Expositionszeit wurden alle Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS-Puffer (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Die zur Proteinbestimmung vorgesehenen Schalen wurden entsprechend 3.2.5 weiter behandelt. Der Zellrasen der zur Glutathionmessung bestimmten Schalen wurde mit 400  $\mu\text{l}$  eiskalter HCl versetzt und die Zellen mit einem Gummispatel geerntet. Zum Aufschluss noch nicht denaturierter Zellen folgten drei *Freeze-Thaw*-Zyklen bei -180 °C im flüssigen Stickstoff und 37 °C im Wasserbad. Nach einer anschließenden Lagerung auf Eis (5 min) wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  der Proben im Verhältnis 1:2 mit 10%-iger SSA-Lösung versetzt und abzentrifugiert (10.000  $\times$  g, 10 min, 4 °C; Heraeus Fresco 21). Der erhaltene Überstand wurde in neue

Eppendorfcups überführt und lichtgeschützt auf Eis gehalten (Messung innerhalb von 2 h) bzw. bei -80 °C eingefroren (Messung innerhalb von 5 Tagen).

Die Bestimmung des Glutathiongehalts erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten (vgl. Abb. 3-8) bei RT. Die Wells der Spalten 1 und 2 wurden jeweils mit 10  $\mu$ l 5%-iger SSA-Lösung (Blindwerte) bzw. mit 10  $\mu$ l GSH-Standards belegt. Aus den 1:2 verdünnten Proben wurden weitere Verdünnungen (1:4 und 1:8) mit 5%-iger SSA-Lösung hergestellt und jeweils 10  $\mu$ l einer Probe in zwei aufeinander folgende Wells der Spalten 3 bis 11 pipettiert. Anschließend wurden alle Wells mit 150  $\mu$ l Reaktionslösung beschickt und diese durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gleichmäßig verteilt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurden pro Well 50  $\mu$ l NADPH-Lösung zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit dem vorgelegten Platteninhalt vermischt. Die photometrische Messung (ELx800UV universal microplate reader) fand unmittelbar nach dem letzten Schritt bei einer Wellenlänge von 405 nm statt. Die Absorption der Blindwerte, der GSH-Standards und der Proben wurde dabei mithilfe des Kinetikprogramms KC Junior 2 (BioTek Instruments) über 5 min alle 60 sek. erfasst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	S3	P <sub>1</sub> (1:2)	P <sub>2</sub> (1:4)	P <sub>3</sub> (1:8)	P <sub>5</sub> (1:2)	P <sub>6</sub> (1:4)	P <sub>7</sub> (1:8)	P <sub>9</sub> (1:2)	P <sub>10</sub> (1:4)	P <sub>11</sub> (1:8)	
B	B	S3	P <sub>1</sub> (1:2)	P <sub>2</sub> (1:4)	P <sub>3</sub> (1:8)	P <sub>5</sub> (1:2)	P <sub>6</sub> (1:4)	P <sub>7</sub> (1:8)	P <sub>9</sub> (1:2)	P <sub>10</sub> (1:4)	P <sub>11</sub> (1:8)	
C	B	S4	P <sub>1</sub> (1:4)	P <sub>2</sub> (1:8)	P <sub>4</sub> (1:2)	P <sub>5</sub> (1:4)	P <sub>6</sub> (1:8)	P <sub>8</sub> (1:2)	P <sub>9</sub> (1:4)	P <sub>10</sub> (1:8)	P <sub>12</sub> (1:2)	
D	B	S4	P <sub>1</sub> (1:4)	P <sub>2</sub> (1:8)	P <sub>4</sub> (1:2)	P <sub>5</sub> (1:4)	P <sub>6</sub> (1:8)	P <sub>8</sub> (1:2)	P <sub>9</sub> (1:4)	P <sub>10</sub> (1:8)	P <sub>12</sub> (1:2)	
E	S1	S5	P <sub>1</sub> (1:8)	P <sub>3</sub> (1:2)	P <sub>4</sub> (1:4)	P <sub>5</sub> (1:8)	P <sub>7</sub> (1:2)	P <sub>8</sub> (1:4)	P <sub>9</sub> (1:8)	P <sub>11</sub> (1:2)	P <sub>12</sub> (1:4)	
F	S1	S5	P <sub>1</sub> (1:8)	P <sub>3</sub> (1:2)	P <sub>4</sub> (1:4)	P <sub>5</sub> (1:8)	P <sub>7</sub> (1:2)	P <sub>8</sub> (1:4)	P <sub>9</sub> (1:8)	P <sub>11</sub> (1:2)	P <sub>12</sub> (1:4)	
G	S2		P <sub>2</sub> (1:2)	P <sub>3</sub> (1:4)	P <sub>4</sub> (1:8)	P <sub>6</sub> (1:2)	P <sub>7</sub> (1:4)	P <sub>8</sub> (1:8)	P <sub>10</sub> (1:2)	P <sub>11</sub> (1:4)	P <sub>12</sub> (1:8)	
H	S2		P <sub>2</sub> (1:2)	P <sub>3</sub> (1:4)	P <sub>4</sub> (1:8)	P <sub>6</sub> (1:2)	P <sub>7</sub> (1:4)	P <sub>8</sub> (1:8)	P <sub>10</sub> (1:2)	P <sub>11</sub> (1:4)	P <sub>12</sub> (1:8)	

**Abbildung 3-8: Belegung einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Bestimmung des Glutathiongehalts**

B = Blindwerte (5%-ige SSA-Lösung); S1 - S5 = GSH-Standards; P<sub>1-12</sub> = Proben, verdünnt (1:2, 1:4, 1:8)

### 3.5.4 Auswertung

Die pro Zeiteinheit gemessenen Extinktionsänderungen ( $\Delta_{A405/\text{min}}$ ) der GSH-Standards wurden um den Blindwert bereinigt und zur Erstellung einer Eichkurve herangezogen. Diese diente der Zuordnung der blindwertbereinigten  $\Delta_{A405/\text{min}}$  der verdünnten Proben zu der entsprechenden GSx-Konzentration (nmol/ml). Die ermittelten GSx-Konzentration wurden unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren auf die ursprüngliche Probe zurückgerechnet und es wurde ein Mittelwert aus allen Werten der beiden, jeweils auf die gleiche Weise behandelten, Schalen gebildet. Die mittleren GSx-Konzentrationen wurden außerdem auf den mittleren Proteingehalt der beiden Parallelschalen bezogen (nmol/mg Zellprotein).

## 3.6 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose

### 3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Prozesse des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes lassen sich durch unterschiedliche morphologische Veränderungen der Zellen differenzieren. Zu den typischen Merkmalen der Apoptose zählen Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins, Kern-Fragmentierung und Zerfall der Zellen in vesikuläre Strukturen. Demgegenüber wird Nekrose durch Zellschwellung, Lyse zellulärer Membranen und Freisetzung von Zellorganellen begleitet.

Apoptotische und nekrotische Zellen können fluoreszenzmikroskopisch durch eine Doppelfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 und Propidiumiodid (PI) detektiert werden. Hoechst 33342 passiert aufgrund seines lipophilen Charakters die Membran intakter Zellen und bindet vornehmlich an Adenin-Thymin reiche Regionen der DNA (Latt *et al.*, 1976). Das Anregungsmaximum des Farbstoffs liegt bei 350 nm, das Emissionsmaximum bei 460 nm. Die Kerne intakter Zellen erscheinen dadurch hellblau. PI durchdringt nur die Zellmembran geschädigter Zellen und interkaliert ohne besondere Sequenzpräferenz ebenfalls in die DNA (Waring, 1965). Bei einem Anregungsmaximum von 530 nm und einem Emissionsmaximum von 620 nm erscheinen mit PI gefärbte Zellkerne rot.

### 3.6.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) ermöglicht die Charakterisierung einzelner Zellen hinsichtlich ihrer physikalischen (Größe, Form, Granularität) und biochemischen (Oberflächenrezeptoren, DNA-Gehalt) Eigenschaften. Das in dieser Arbeit verwendete FACS Calibur Gerät (Institut für Immunologie, UKSH Kiel) verfügt über einen Argon-Laser (488 nm), dem ein Streulicht- und drei Fluoreszenzdetektoren (FL-1 bis FL-3) zugeordnet sind, und über einen nachgeschalteten Dioden-Laser (635 nm, FL-4 Detektor).

Bei einer durchflusszytometrischen Messung werden einzelne Zellen in einer Suspension an dem dualen Lasersystem vorbeigeführt und streuen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften das Licht des Argon-Lasers. Die Vorwärts-Lichtstreuung (*forward scatter*, FSC) ist hierbei ein Maß für die Beugung des Lichts in flachem Winkel und korreliert mit der Größe der Zellen. Die Seitwärts-Lichtstreuung (*side scatter*, SSC) ist

ein Maß für die Brechung des Lichts in einem 90°-Winkel, welche von der Granularität und äußeren Form der Zellen beeinflusst wird. Beide Laser regen zudem oberflächliche und intrazelluläre Fluoreszenzfarbstoffe an, deren charakteristische Emissionsspektren erfasst werden können. Für die durchgeführten Experimente war die Detektion von APC Annexin V (FL-4) und PI (FL-2) von besonderem Interesse.

### 3.6.2.1 PI/Annexin V-Färbung

Die Färbung mit PI und Annexin V zur Detektion von Apoptose und Nekrose wurde in Anlehnung an Vermes *et al.* (1995) durchgeführt. In einem frühen Stadium der Apoptose erfolgt eine Translokation von Membranphospholipiden, u.a. Phosphatidylserin (PS), von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran. Annexin V, ein 35-36 kDa großes Protein, bindet in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit hoher Affinität an PS. Durch Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen (hier: APC = Allophycocyanin) kann Annexin V durchflusszytometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 650 nm und einer Emissionswellenlänge von 660 nm detektiert werden. Da nekrotische Zellen aufgrund ihrer permeabilisierten Membran auch Annexin V anlagern, wird zur Differenzierung der nekrotischen und apoptotischen Zellpopulation eine Gegenfärbung mit PI durchgeführt. PI dringt bei Verlust der Membranintegrität in nekrotische, allerdings auch in spätapoptotische Zellen ein und interkaliert hier in die DNA. Das PI-Signal kann ebenfalls am FACS (Anregung: 488 nm, Emission: 620 nm) erfasst werden.

### 3.6.2.2 Zellzyklusanalyse

Eine Zelle durchläuft einen Zyklus, der sich in die  $G_1$ - (engl. „gap“), S- (Synthese),  $G_2$ - und M- (Mitose) Phase gliedern lässt. In der  $G_1$ -Phase findet Zellwachstum statt, in der sich daran anschließenden S-Phase die Verdopplung der DNA. Während der darauf folgenden  $G_2$ -Phase wird die Zelle auf die anschließende M-Phase vorbereitet, in der die zuvor replizierte DNA gleichmäßig auf die beiden entstehenden Tochterzellkerne verteilt wird. Differenzierte Zellen treten nach der M-Phase in eine Ruhephase ( $G_0$ ) ein, aus der sie auf bestimmte Reize hin erneut in die  $G_1$ -Phase übergehen können.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Zellzyklusphase ist der Chromosomensatz einer Zelle di- ( $G_{0/1}$ -Phase), di- bis tetra- (S-Phase) bzw. tetraploid ( $G_2$ /M-Phase). Durch Färbung mit dem DNA-Interkalator PI kann der DNA-Gehalt und damit die Zellzyklusverteilung einer fixierten Zellpopulation bestimmt werden. Gleichzeitig ist die Detektion von Apoptose möglich. Apoptotische Zellen besitzen aufgrund der DNA-Fragmentierung geringere Mengen an DNA als diploide (sub $G_{0/1}$ -Phase). Das PI-Signal kann am FACS bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 620

nm aufgezeichnet werden. Da PI unspezifisch auch in doppelsträngige RNA interkaliert (Suzuki *et al.*, 1997), muss diese vor der Messung eliminiert werden.

### 3.6.3 Arbeitslösungen

- Trypsinlösung Tryple Select:           gebrauchsfertig
- Hoechst 33342-Stammlösung:       1 mg Hoechst 33342 in 1 ml ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst  
(portionsweise bei -20 °C gelagert)
- PI-Stammlösung:                       1 mg PI in 1 ml ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst  
(bei 4 °C gelagert)
- APC Annexin V:                       gebrauchsfertig
- DNase freie RNase A:               1 mg RNase A in 1 ml RNase-Puffer gelöst  
(portionsweise bei -20 °C gelagert)
- PBS-Puffer (Ø Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>):   Zusammensetzung siehe Tabelle 2-3 , Seite 15
- HBSS-Lösung (Ø Glucose):         Zusammensetzung siehe Tabelle 2-3 , Seite 15
- Annexin V-Bindungspuffer:  
(bei 4 °C gelagert)                   595,78 mg HEPES in 200 ml H<sub>2</sub>O gelöst  
pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt  
2045,29 mg NaCl und 69,36 mg CaCl<sub>2</sub>  
zugegeben und Volumen auf 250 ml aufgefüllt
- RNase-Puffer:  
(bei RT gelagert)                   302,85 mg Tris in 200 ml H<sub>2</sub>O gelöst  
pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,5 eingestellt  
219,15 mg NaCl zugegeben  
Volumen auf 250 ml aufgefüllt
- Ethanol (99,9%):                   gebrauchsfertig

### 3.6.4 Versuchsaufbau und -durchführung

Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose wurden in 10-cm-Kulturschalen durchgeführt. Die Aussaat erfolgte im Wachstumsmedium A (10 ml). Bei allen Versuchen mit U-87 MG Zellen wurde stets eine Zellzahl von  $4 \cdot 10^6$  je Schale gewählt. Bei den Versuchen mit A-172 Zellen wurden  $4 \cdot 10^6$  (alle Staurosporin (ST)-Versuche und PI/Annexin V-Färbungen) bzw.  $2 \cdot 10^6$  Zellen (alle anderen Versuche) je Schale verwendet. Die Exposition der Kulturen fand 24 h nach der Aussaat statt, wobei das vorhandene Wachstumsmedium durch 8 ml Versuchsmedium A ausgetauscht wurde. Dieses enthielt verschiedene Konzentrationen an ATO, Polyphenolen sowie



BSO, jeweils einzeln und in Kombination bzw. ST. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit den Lösungsmitteln (0,1 N NaOH und/oder DMSO) behandelt wurden.

Nach Ablauf der Expositionszeit (24 oder 72 h) erfolgte die Überführung sämtlicher Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen. Dazu wurden zunächst Versuchsmedium und die sich darin befindlichen, bereits abgelösten Zellen in die Röhrchen pipettiert. Angeheftete Zellen wurden durch Inkubation mit 5 ml Trypsinlösung (37 °C, 3 min) abgelöst, die Trypsinlösung durch Zugabe von 5 ml serumhaltigem Versuchsmedium A (4 °C) inaktiviert und die erhaltene Zellsuspension ebenfalls in Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Schalen dreimal mit insgesamt 32 ml serumfreiem Versuchsmedium B (4 °C) gespült und so auch die restlichen Zellen gesammelt. Nach dem Ernten wurden die Zellen bei  $1560 \times g$  (3000 RPM) für 15 min abzentrifugiert (Megafuge 1.0 R; 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) resuspendiert. Bei Versuchen mit anschließender PI/Annexin V-Färbung erfolgte das Resuspendieren des Pellets im Annexin V-Bindungspuffer, um die Anlagerung von Annexin V an PS zu gewährleisten. Verwendungsmöglichkeiten der gewonnenen Zellsuspension sind im Folgenden beschrieben.

#### Fluoreszenzmikroskopie

Jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit je 10  $\mu\text{l}$  PI- (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , verdünnt im PBS) sowie 10  $\mu\text{l}$  Hoechst 33342-Lösung (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , verdünnt im HBSS) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden zweimal 10  $\mu\text{l}$  jeder Probe auf einen Objektträger aufgetragen und mindestens 5 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder mit einem 20er Objektiv und weitere 10 mit einem 40er Objektiv im Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss) mit einer Digitalkamera (Canon, Power Shot A620) fotografiert.

#### PI/Annexin V-Färbung

Zu jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden 5  $\mu\text{l}$  APC Annexin V und 10  $\mu\text{l}$  PI-Lösung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , verdünnt im Annexin V-Bindungspuffer) gegeben. Um die Markierungsreaktion der Farbstoffe zu stoppen, wurden die Proben nach einer Inkubationszeit von 15 min (4 °C) mit 400  $\mu\text{l}$  Annexin V-Bindungspuffer versetzt und in eisgekühlte FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse erfolgte am FACS Calibur. Zur Auswertung diente das Programm *CellQuest Pro* ergänzt durch die *Freeware WinMDI 2.9*.

#### Zellzyklusanalyse

Jeweils 400  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden tropfenweise und unter kontinuierlichem Mischen (Thermomixer, RT) zu 400  $\mu\text{l}$  eiskaltem Ethanol (99,9%) gegeben und an-

schließlich bei -20 °C gelagert. Am Tag der Messung wurden die Zellen bei  $300 \times g$  und 4°C für 10 min abzentrifugiert (Heraeus fresco 21) und nach Entfernen des Überstandes mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Unter Verwendung der gleichen Einstellungen wurden die Zellen anschließend erneut abzentrifugiert und das Pellet in 200  $\mu$ l PBS-Puffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 8  $\mu$ l DNase-freier RNase A (1mg/ml) sowie 200  $\mu$ l PI-Lösung (50  $\mu$ g/ml, verdünnt im PBS) und die Überführung der Proben in FACS-Röhrchen. Nach einer Inkubation über 30 min bei RT wurden die Proben bis zur Messung (FACS Calibur) bei 4 °C gehalten. Zur Auswertung der Ergebnisse diente das Programm *CellQuest Pro*, ergänzt durch die *Freeware WinMDI 2.9*.

### Proteinbestimmung und Zellzählung

Bei den hier angewendeten Methoden sind nur Aussagen über den Zustand von Zellen möglich, die noch hinreichend intakt sind. Über den Untergang von zu stark geschädigten Zellen bzw. ihren Resten (sog. „desintegrierten Zellen“) können keine Aussagen mehr getroffen werden. Um den Anteil der Zellen abzuschätzen, der in die Analyse einging, wurde in ausgewählten Versuchen die Proteinmenge der sedimentierten Zellen bestimmt. Weiterhin wurden lichtmikroskopische Zellzählungen durchgeführt.

Für die Proteinbestimmung wurden jeweils zweimal 25  $\mu$ l der Zellsuspension abgenommen und entsprechend 3.2.5 weiter behandelt. Eine Bestimmung des Proteingehalts fand nicht statt, wenn das Pellet im Annexin V-Bindungspuffer aufgenommen wurde, da das hier enthaltene HEPES zu einer Störung der Messung führt. Für die Zellzählung wurden jeweils zweimal 100  $\mu$ l der Zellsuspension mit je 100  $\mu$ l 0,2% Trypanblau versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wobei eine Differenzierung zwischen trypanblau-negativen (vitalen) und trypanblau-positiven (toten) Zellen stattfand. Insgesamt wurden 4 Großquadrate ausgezählt und ein Mittelwert gebildet.

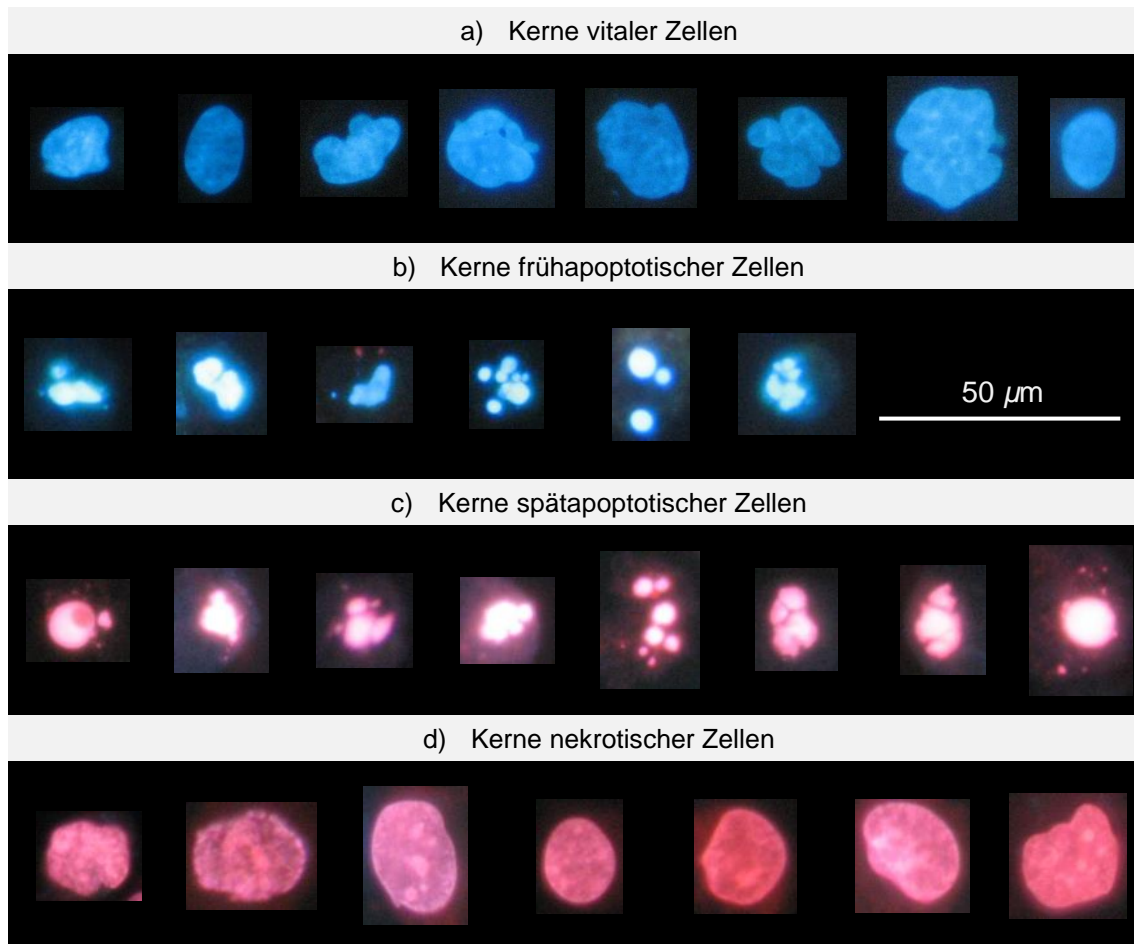
## **3.6.5 Auswertung**

### Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopisch können nach einer Färbung mit Hoechst 33342 und PI vier morphologische Zustände von Zellkernen unterschieden werden (vgl. Abb. 3-9).

- a) Vitale Zellen: Die Kerne erscheinen in einem hellen Blau.
- b) Frühapoptotische Zellen: Die Kerne sind fragmentiert und hellblau leuchtend. Sie sind oft kleiner als die Kerne vitaler Zellen und zeigen kondensiertes Chromatin.

- c) Spätapoptotische Zellen: Die Kerne sind fragmentiert, rot und leuchtend. Sie besitzen kondensiertes Chromatin und sind ebenfalls kleiner als die Kerne vitaler Zellen.
- d) Nekrotische Zellen: Die Kerne sind rot und im Vergleich zu den Kernen vitaler Zellen häufig vergrößert.

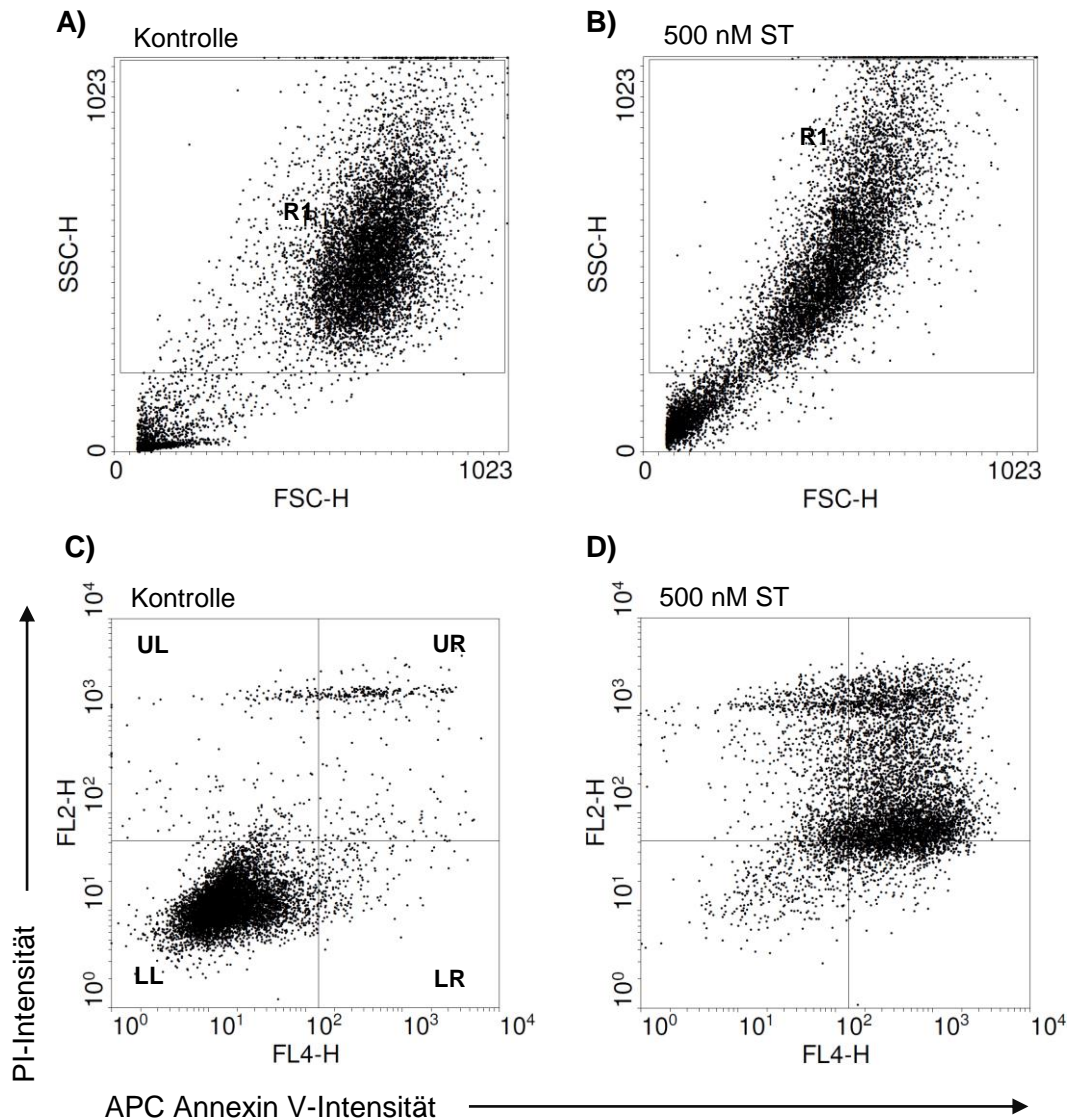


**Abbildung 3-9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kerne von A-172 Zellen nach Färbung mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid**

Die Induktion von Apoptose erfolgte durch Exposition der A-172 Zellen mit 500 nM Staurosporin über 24 h. Die Aufnahmen wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung (Zeiss Fluoreszenzmikroskop, Kamera Canon Power Shot A620) gemacht.

#### PI/Annexin V-Färbung

Ohne Verwendung eines *Gates* wurden zunächst  $1 \cdot 10^4$  Zellen je Probe analysiert und ein Ausschluss von Zellbruchstücken durch Darstellung des FSC/SSC in einem Streudiagramm vorgenommen (vgl. Abb. 3-10A und B). Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität von APC Annexin V (FL4-H) und PI (FL2-H) der im *Gate* R1 enthaltenen Zellpopulation in einem weiteren Streudiagramm bewertet (vgl. Abb. 3-10C und D).



**Abbildung 3-10: Auswertung der PI/Annexin V-Färbung am Beispiel von A-172 Zellen**

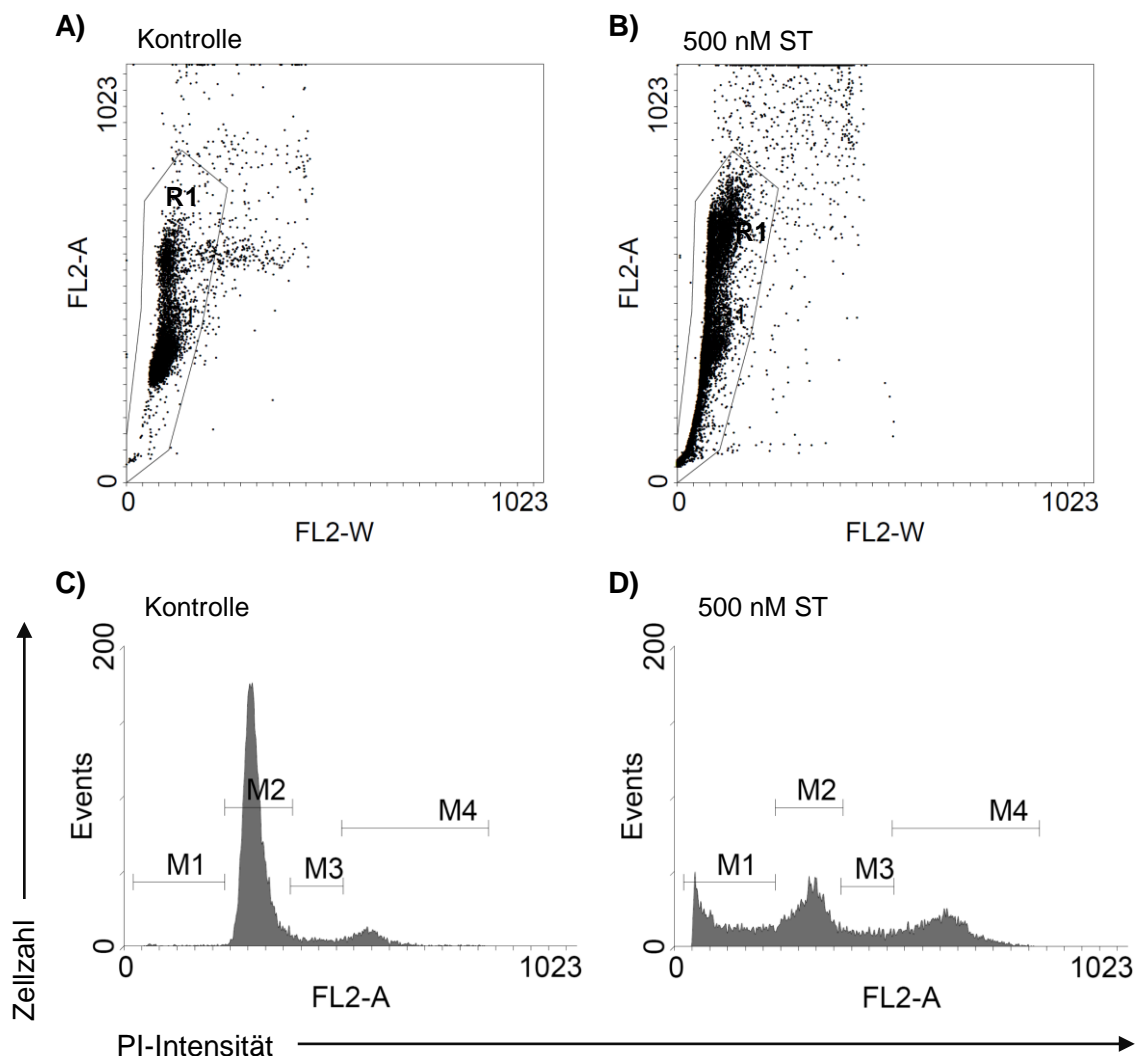
Unbehandelte (**A** und **C**) bzw. über 24 h mit 500 nM ST behandelte (**B** und **D**) A-172 Zellen wurden entsprechend 3.6.4 mit PI und APC Annexin V markiert und am FACS Calibur analysiert. Durch Darstellung des Streudiagramms des FSC/SSC (**A** und **B**) wurde zunächst eine Diskriminierung von Zelltrümmern vorgenommen. Der Zustand der jeweils im *Gate* R1 enthaltenen Zellsuspension wurde anschließend im Streudiagramm des PI/Annexin (**C** und **D**) bewertet.

Die Einteilung der Streudiagramme der fluoreszenzmarkierten Zellen in die vier Quadranten erfolgte bei einer einmaligen Kalibrierung des FACS vor Beginn der eigentlichen Messungen. Zum Setzen des Fadenkreuzes wurden eine unbehandelte sowie eine mit ST behandelte Zellpopulation verwendet, die mit APC Annexin V und PI einzeln sowie in Kombination gefärbt bzw. ungefärbt gelassen wurden. Im Quadranten unten links (LL) befinden sich ungefärbte, vitale Zellen. Im unteren rechten Quadranten (LR) liegen nur mit APC Annexin V gefärbte, frühapoptotische Zellen. Der obere rechte Quadrant (UR) enthält PI- und APC Annexin V-positive Zellen. Diese sind entweder

nekrotisch oder spätapoptotisch. Im oberen linken Quadranten (UL) sind nur mit PI gefärbte Zellen zu finden. Sie werden zu den nekrotischen gezählt.

### Zellzyklusanalyse

Es wurden zunächst  $1 \cdot 10^4$  Zellen je Probe am FACS Calibur analysiert und eine Diskriminierung von Doubletten (aneinander haftenden Zellen) vorgenommen. Die Proben wurden dazu im FL2-Kanal, aufgetrennt in FL2-A (engl. „area“) und FL2-W (engl. „width“), mit dem Doubletten-Differenzierungsmodus (DDM) vermessen und die Signale gegeneinander aufgetragen (vgl. Abb. 3-11, A und B). Doubletten erzeugen bei gleichem DNA-Gehalt mehr Streulicht als Singuletten und lassen sich so ausklammern.



**Abbildung 3-11: Auswertung einer Zellzyklusanalyse am Beispiel von A-172 Zellen**

Unbehandelte (A und C) bzw. über 24 h mit 500 nM ST behandelte (B und D) A-172 Zellen wurden entsprechend 3.6.4 mit PI markiert und am FACS Calibur analysiert. Durch Auftrennung des FL2-Kanals in FL2-A und FL2-W wurde zunächst eine Doubletten-Diskriminierung vorgenommen (A und B). Die Zellzyklusverteilung der jeweils im Gate R1 enthaltenen Zellpopulation

wurde anschließend in einem Histogramm (**C** und **D**) bewertet. M1 = subG<sub>0/1</sub>-Phase; M2 = G<sub>0/1</sub>-Phase; M3 = S-Phase; M4 = G<sub>2</sub>/M-Phase.

Die Zellzyklusverteilung der Singulett-Population (R1) wurde anschließend durch Darstellung in einem Histogramm bewertet. Die x-Achse eines solchen Histogramms repräsentiert die Fluoreszenzintensität von PI (FL2-A), die y-Achse die Anzahl der Ereignisse (Zellzahl). Abbildung 3-11C zeigt beispielhaft die Zellzyklusverteilung einer unbehandelten Probe. Der Hauptanteil der Zellen befindet sich in der G<sub>0/1</sub>-Phase. In Abbildung 3-11D ist weiterhin eine mit ST behandelte Zellpopulation zu sehen. Während der Apoptose findet eine Fragmentierung der DNA statt, sodass die Interkalation von PI zunehmend schlechter wird. Das damit verbundene schwächere Fluoreszenzsignal wird in der FACS-Analyse links des G<sub>0/1</sub>-Peaks sichtbar und als subG<sub>0/1</sub>-Peak bezeichnet. Eine Ansammlung von Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus (G<sub>0/1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>/M-Arrest) gibt zudem Hinweise auf Proliferationshemmung.

### 3.7 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse, ihre lineare und nichtlineare Anpassung sowie die grafische Darstellung erfolgten mittels des Programms *Graph Pad Prism 5*. Zur Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analysen diente zusätzlich die *Freeware WinMDI 2.9*. Alle Experimente wurden in der Regel dreimal wiederholt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM; bei  $n \geq 3$ ) bzw. Spannweite (bei  $n = 2$ ) dargestellt. Die Fehlerbalken sind nicht abgebildet, wenn sie kleiner sind als die Symbole, die den Mittelwert repräsentieren.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde der ungepaarte t-Test (zwei Gruppen) oder die Varianzanalyse (ANOVA; mehr als zwei Gruppen) gefolgt von einem *Dunnett's multiple comparison test* oder einem *Tukey's multiple comparison test* durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung der Daten wurden immer die tatsächlich generierten und nicht die relativen Zahlen herangezogen, um die Streuung der Kontrolle zu berücksichtigen. Ein Unterschied galt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den Abbildungen auf eine Differenzierung zwischen „signifikanten“ ( $p < 0,05$ ) und „höchst signifikanten“ ( $p < 0,001$ )  $p$ -Werten verzichtet.



## 4 Ergebnisse

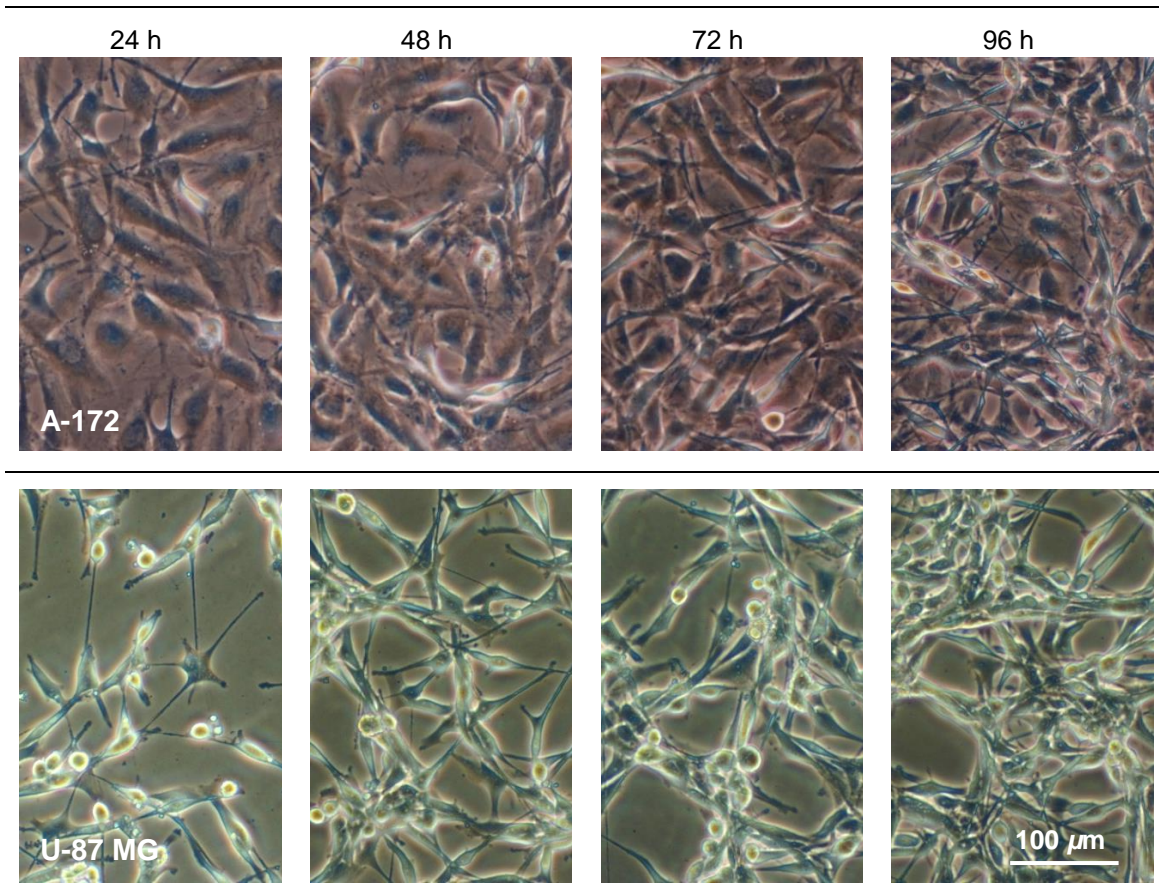
### 4.1 Charakterisierung von A-172 und U-87 MG Zellen

Zunächst erfolgte durch Betrachtung der Morphologie, Proliferationsgeschwindigkeit sowie der Zellgröße eine Charakterisierung der verwendeten Glioma-Zelllinien A-172 und U-87 MG. Dazu wurden beide Linien mit einer Zellzahl von  $5,3 \cdot 10^5$  in 35-mm-Kulturschalen ausgesät und die Zellen alle 24 h über insgesamt 4 Tage fotografiert. Weiterhin wurde die Zunahme der Zellzahl und des Gehalts an Zellprotein ermittelt. Die gewählte Aussaatdichte pro Fläche einer 35-mm-Kulturschale war analog zu der in den Proliferationshemmversuchen geplanten Zelldichte pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte (vgl. 3.2.3). Der betrachtete Zeitraum entsprach zudem der in den Vergiftungsversuchen maximal vorgesehenen Kultivierungsdauer.

#### 4.1.1 Morphologie

Abbildung 4-1 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von A-172 und U-87 MG Zellen. Nach der Aussaat adhäreren beide Linien, wobei sich zwischen ihnen während der Kultivierung morphologische Unterschiede erkennen lassen. A-172 Zellen bilden einen geschlossenen Zellrasen aus. Die Kulturschale ist bei der gewählten Aussaatdichte bereits nach 24 h fast vollständig bedeckt. Die Zellen wachsen nicht ausschließlich, aber überwiegend als Monolayer. Im zunehmenden Zeitverlauf (ab 48 h) nimmt die Größe einzelner A-172 Zellen ab. U-87 MG Zellen breiten sich dagegen nicht über die gesamte Kulturoberfläche aus. Nach 24 h sind die Zellen über lange Fortsätze verbunden. Der Zellrasen weist jedoch große Lücken auf, die auch nach 96 h erhalten bleiben. Mit steigender Dichte wachsen U-87 MG Zellen vermehrt dreidimensional und bilden ein netzartiges Geflecht mit Clustern.





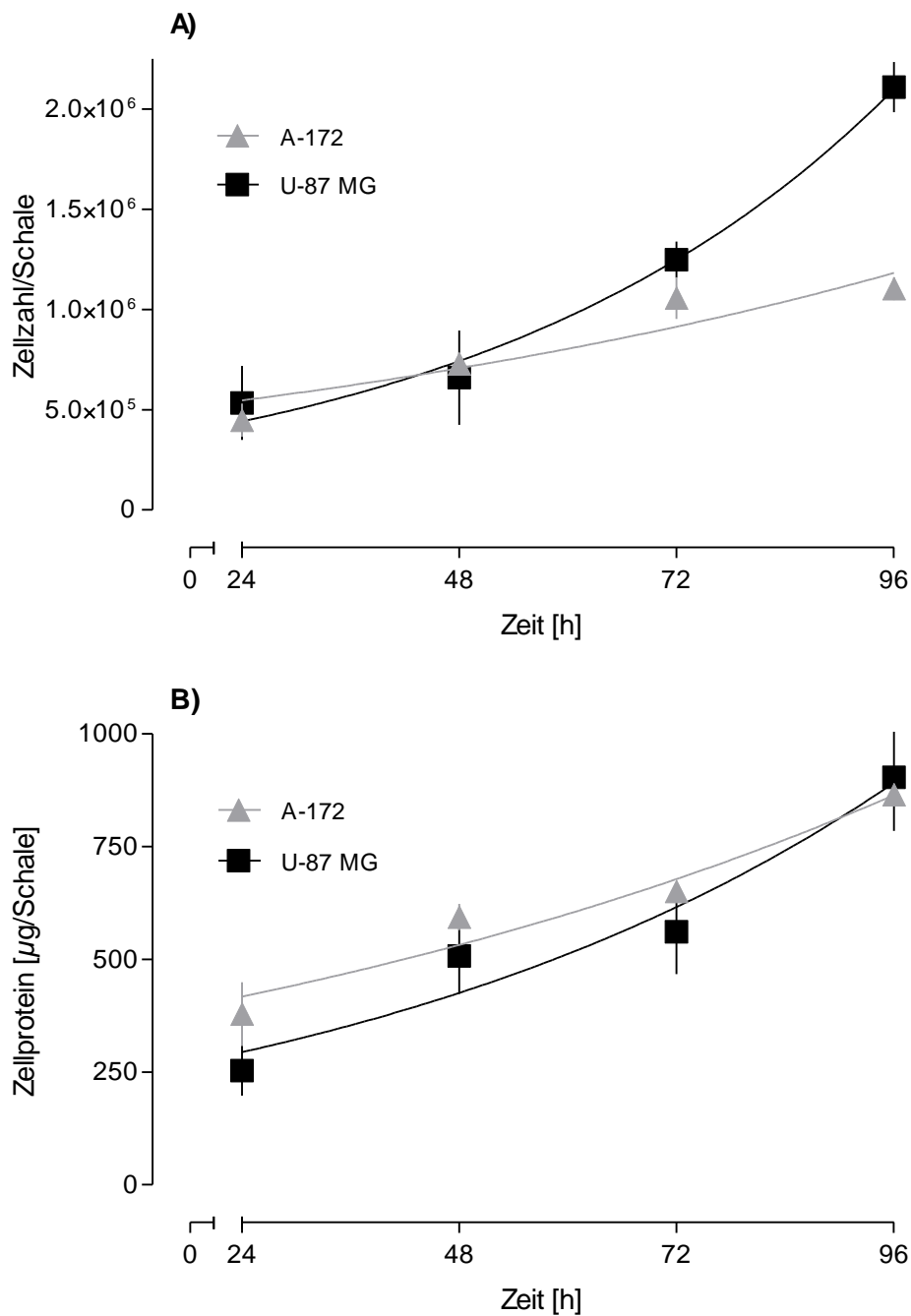
**Abbildung 4-1: Morphologie von A-172 und U-87 MG Zellen bei einer Kultivierung über 96 h**

A-172 und U-87 MG Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $5,3 \cdot 10^5$  in 35-mm-Kulturschalen ausgesät und alle 24 h mittels Phasenkontrast-Mikroskop (Olympus IMT-2) und angeschlossener Digitalkamera (Olympus E-300) fotografiert. Dargestellt sind typische Gesichtsfelder.

#### 4.1.2 Proliferationsgeschwindigkeit

Abbildung 4-2 zeigt Wachstumskurven von A-172 und U-87 MG Zellen bei einer Kultivierung über 96 h. Die gemessenen Parameter Zellzahl und Zellproteingehalt wurden mit Hilfe einer Funktion für exponentielles Wachstum ( $Y_t = Y_0 \cdot e^{k \cdot t}$ ) angepasst.

24 h nach der Aussaat entspricht die ermittelte Zellzahl ( $\sim 5 \cdot 10^5$ ) bei beiden Linien der ausgesäten ( $5,3 \cdot 10^5$ ). Es ist anzunehmen, dass die Zellen zu Beginn der Kultivierung an die neue Umgebung adaptieren und adhären müssen. Im Zeitraum zwischen 24 und 96 h nimmt die Zahl von A-172 und U-87 MG Zellen sowie die Menge an Zellprotein zu. Die Kurven von U-87 MG Zellen weisen dabei einen steileren Verlauf auf, als die von A-172 Zellen.



**Abbildung 4-2: Wachstumskurven von A-172 und U-87 MG Zellen bei einer Kultivierung über 96 h**

Es wurden jeweils  $5,3 \cdot 10^5$  A-172 bzw. U-87 MG Zellen pro 35-mm-Kulturschale ausgesät und über 96 h kultiviert. Alle 24 h wurde je eine Schale zur Bestimmung der Zellzahl (**A**) und des Zellproteingehalts (**B**) herangezogen (vgl. 3.1). Dargestellt sind die MW + Spannweite aus  $n = 2$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Funktion für exponentielles Wachstum.

**(A)**  $R^2$ -Wert = 0,8095 (A-172) bzw. 0,9225 (U-87 MG)

**(B)**  $R^2$ -Wert = 0,9029 (A-172) bzw. 0,8201 (U-87 MG)

Aus den Wachstumskurven lassen sich die Verdopplungszeiten der Zelllinien bestimmen. Für A-172 Zellen ergibt sich je nach Bezugsgröße ( $n = 2$ ) eine Verdopplungszeit von  $67 \pm 13$  h (Zellzahl) bzw.  $69 \pm 7$  h (Zellprotein). U-87 MG Zellen haben eine Verdopplungszeit von  $34 \pm 11$  h, gemessen an der Zellzahl. Der anhand der Zellproteinmenge bestimmte Wert liegt bei  $45 \pm 3$  h. U-87 MG Zellen wachsen also schneller als A-172 Zellen.

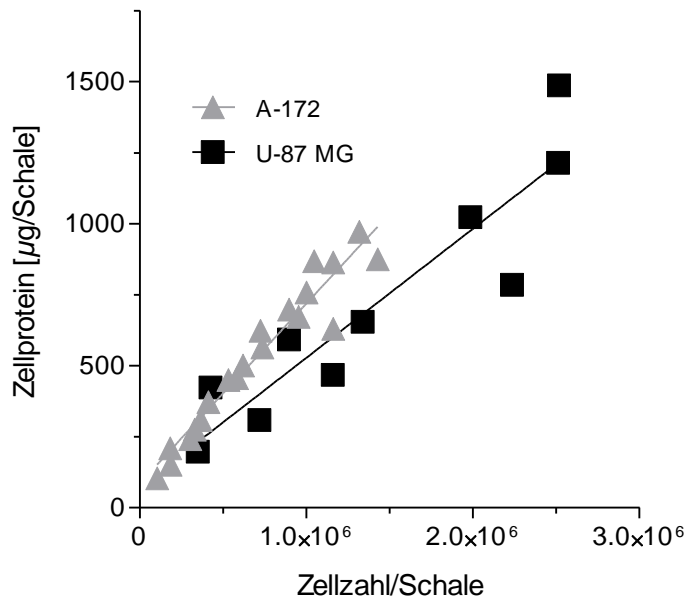
Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass A-172 Zellen den Boden der Kulturschale bereits 24 h nach der Aussaat fast vollständig bedecken (vgl. Abb. 4-1). Um der Frage nachzugehen, ob die geringe Proliferationsrate dieser Zelllinie möglicherweise das Ergebnis der hohen Ausgangszellzahl ( $5,3 \cdot 10^5$ ) ist, wurde der Einfluss der Aussaatdichte auf die Verdopplungszeit von A-172 Zellen untersucht. Dazu wurden weitere Kulturen mit  $2,7 \cdot 10^5$  sowie  $1,3 \cdot 10^5$  Zellen pro 35-mm-Schale angelegt und alle 24 h über insgesamt 4 Tage Zellzahl und Zellproteinmenge bestimmt (Daten nicht gezeigt). Durch Verminderung der Ausgangszellzahl um den Faktor 2 bzw. 4 nimmt die Verdopplungszeit von A-172 Zellen tendenziell ab. Dieser Zusammenhang wurde jedoch nicht systematisch analysiert.

Um weiterhin zu klären, ob die Passagenzahl einen Einfluss auf die Wachstumsrate der verwendeten Zelllinien hat, wurde nach Abschluss der Proliferationshemmversuche (vgl. 4.2) die dort gemessene Zellproteinmenge der Kontrollzellen nach einer Kultivierung über insgesamt 48 sowie 96 h ihrer jeweiligen Passagenzahl gegenüber gestellt (Daten nicht gezeigt). Es ergaben sich zu keinem Zeitpunkt und für keine der Zelllinien signifikante Unterschiede zwischen der Nummer der Passage und dem Zellwachstum.

### 4.1.3 Zellgröße

Um den Zusammenhang zwischen der Zahl und dem Proteingehalt von A-172 und U-87 MG Zellen zu ermitteln, wurden Daten, welche aus den oben beschriebenen Versuchen stammen, gegen einander aufgetragen (vgl. Abb. 4-3). Zwischen den beiden Parametern besteht ein linearer Zusammenhang. Der gemessene Proteingehalt nimmt mit steigender Zellzahl zu. Aus der Steigung der Regressionsgeraden ergibt sich der Proteingehalt je Zelle. Bei U-87 MG Zellen beträgt dieser  $0,45 \pm 0,07$  ng pro Zelle. Aus den mit A-172 Zellen durchgeführten Versuchen leitet sich ein Proteingehalt von  $0,63 \pm 0,04$  ng pro Zelle ab. Also sind A-172 Zellen gemessen am Proteingehalt um ca. 40%

größer als U-87 MG Zellen. Dies stimmt qualitativ mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen überein (vgl. Abb. 4-1).



**Abbildung 4-3: Zusammenhang zwischen Zellzahl und Zellproteingehalt bei A-172 und U-87 MG Zellen**

Die Werte stammen aus  $n = 2$  Versuchen mit gleicher Zelldichte für U-87 MG Zellen bzw. aus  $n = 4$  Versuchen mit drei unterschiedlichen Zelldichten für A-172 Zellen (vgl. 4.1.2).

Gleichung der Regressionsgeraden (A-172):  $y = 0,0006329 x + 85,69$ ;  $r^2 = 0,9340$

Gleichung der Regressionsgeraden (U-87 MG):  $y = 0,0004544 x + 73,29$ ;  $r^2 = 0,8492$

## 4.2 Untersuchungen zur Proliferationshemmung

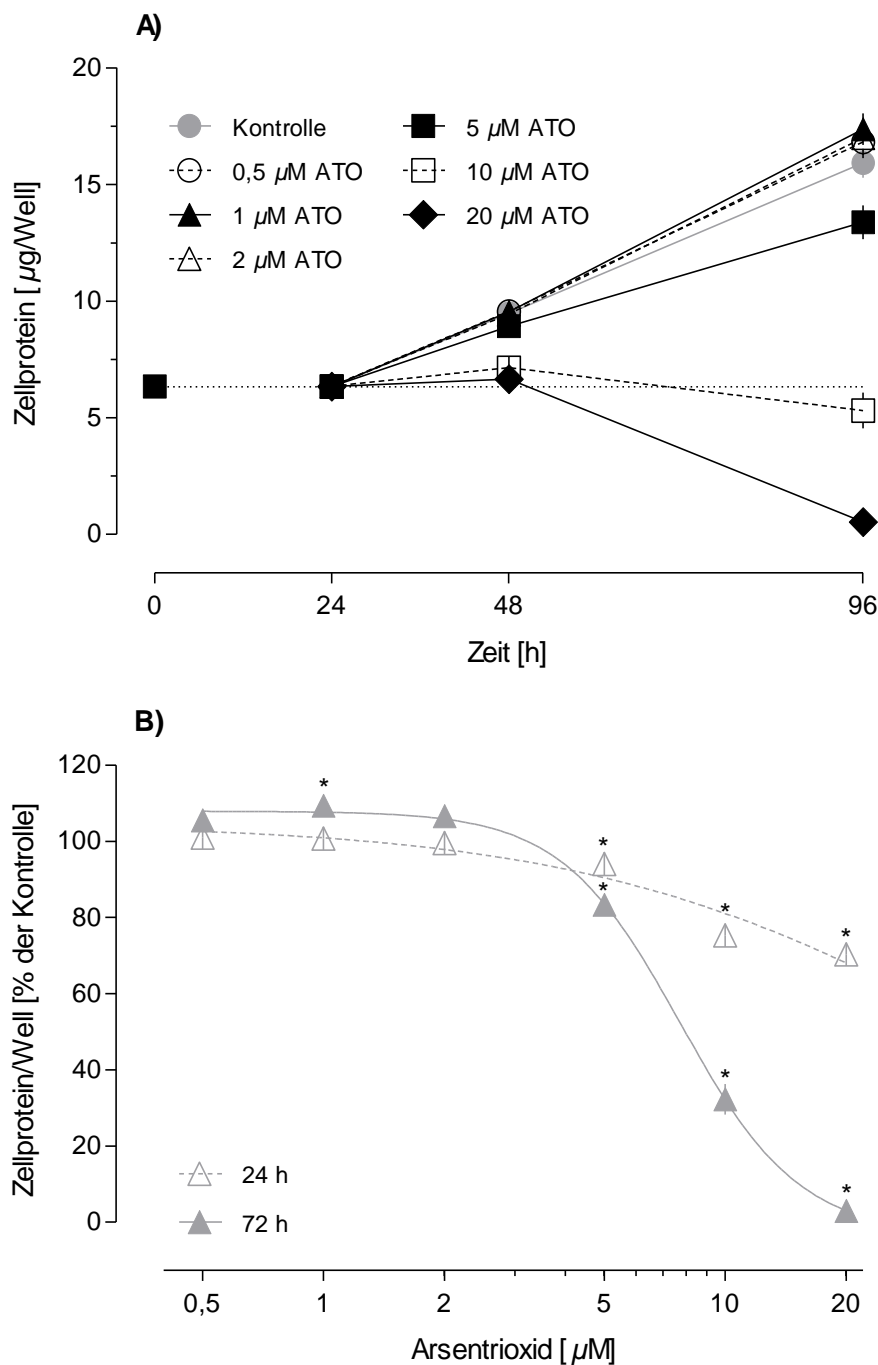
Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche beschrieben, in denen der konzentrations- und zeitabhängige Einfluss von Arsentrioxid (ATO), verschiedenen pflanzlichen Polyphenolen (Genistein, Quercetin, Curcumin, Resveratrol, Epigallocatechin-3-gallat) und Buthioninsulfoximin (BSO) auf das Wachstum von A-172 und U-87 MG Zellen untersucht wurde. Wie im Methodenteil beschrieben (vgl. 3.2), wurden die Zellen mit ATO (0,5 - 20  $\mu\text{M}$ ), den Polyphenolen (2 - 100  $\mu\text{M}$ ), BSO (2 - 100  $\mu\text{M}$ ) sowie verschiedenen Kombinationen aus ATO und den einzelnen Polyphenolen bzw. BSO exponiert. Nach 24 und/oder 72 h wurde als Maß für die Zahl angehefteter Zellen der Proteingehalt pro Well bestimmt.

### 4.2.1 Arsentrioxid

#### A) A-172 Zellen

Abbildung 4-4 fasst die Informationen aller Versuche zur Wirkung von ATO auf die Proliferation von A-172 Zellen zusammen. Bei den unter (A) dargestellten Wachstumskurven wird davon ausgegangen, dass die Werte bei  $t = 0$  und  $t = 24$  dem Zellproteingehalt pro Well bei der Aussaat entsprechen (vgl. 4.1.2). Diese Annahme gilt für alle Wachstumskurven, die im Folgenden zu sehen sind. Die Zahl der unbehandelten A-172 Zellen pro Well nimmt innerhalb der ersten 24 h nach der Exposition nur leicht zu. Der Effekt einer zytostatisch wirkenden Substanz kann sich nur im Bereich zwischen der Zunahme der Kontrollzellen und der anfänglich ausgesäten Zellmenge zeigen. Die in den vorliegenden Versuchen bei zytostatischer Wirkungsweise maximal erreichbare Hemmung beträgt im Vergleich zur Kontrolle nur 30%. Nach 72 h sind es 60%. Das bedeutet also, dass 24 h-Expositionen bei A-172 Zellen bzw. generell bei Zellen mit langen Verdopplungszeiten wenig Aussagekraft besitzen, da der Spielraum zur Detektion von Wachstumshemmung gering ist. In diesem Fall sind Expositionen über längere Zeiten notwendig.

Die gezeigten Wachstumskurven verdeutlichen weiterhin die Zeitabhängigkeit der ATO-Wirkung. Niedrige Konzentrationen an ATO (0,5 - 2  $\mu\text{M}$ ) haben bei einer Inkubation über 24 h keinen messbaren Effekt auf A-172 Zellen. Über 72 h fördern diese Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle reproduzierbar die Proliferation. Höhere ATO-Konzentrationen führen zu einer Hemmung des Zellwachstums. 10 und 20  $\mu\text{M}$  ATO wirken bei einer Behandlung über 24 h dabei zytostatisch. Eine 72 h-Exposition zeigt



**Abbildung 4-4: Wirkung von Arsentrioxid auf die Proliferation von A-172 Zellen**

A-172 Zellen wurden 24 h nach der Aussaat über weitere 24 h ( $n = 9$ ) bzw. 72 h ( $n = 18$ ) mit ATO exponiert. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). **(A) Zeitabhängigkeit:** Gezeigt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in  $\mu\text{g}/\text{Well}$ . Die Werte bei  $t = 0$  und  $t = 24$  entsprechen dem Proteingehalt/Well bei der Aussaat (vgl. 4.1.3). **(B) Konzentrationsabhängigkeit:** Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. In vielen Fällen sind die Standardfehler kleiner als die Symbole, die den MW repräsentieren. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

zusätzlich eine zytoletale Wirkung dieser Konzentrationen. D.h. sie induzieren eine Verminderung der Zellzahl bezogen auf die anfänglich ausgesäte Zellmenge (10  $\mu\text{M}$  ATO) bzw. lösen einen vollständigen Zellverlust aus (20  $\mu\text{M}$  ATO).

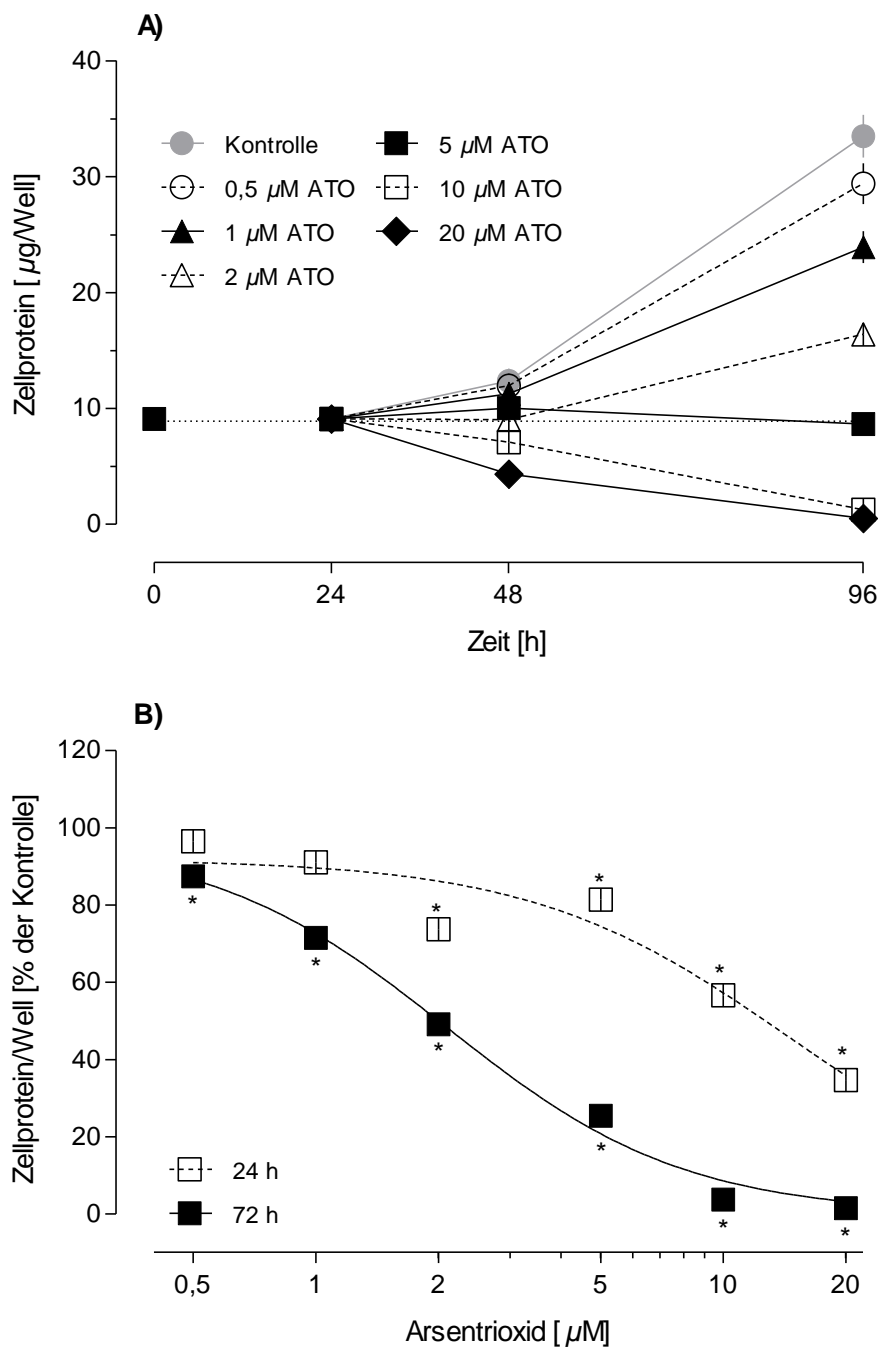
Aus den Wachstumskurven von A-172 Zellen leiten sich die unter (B) abgebildeten Konzentrations-Wirkung-Kurven von ATO ab. Diese verdeutlichen nochmal die Konzentrationsabhängigkeit der ATO-Wirkung. Bei einer Inkubation über 24 h induziert ATO ab 5  $\mu\text{M}$  eine statistisch signifikante Verminderung des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrolle (5%). Die höchste eingesetzte ATO-Konzentration (20  $\mu\text{M}$ ) führt zu einer Verminderung um 30%. Nach 72 h hat die Konzentrations-Wirkung-Kurve von ATO einen biphasischen Verlauf. Niedrige ATO-Konzentrationen (0,5 - 2  $\mu\text{M}$ ) stimulieren reproduzierbar und teilweise signifikant die Proliferation von A-172 Zellen - ein Effekt, der auch bei anderen Zelllinien beobachtet werden konnte (Herbert *et al.*, 2012; Watcharasit *et al.*, 2012). Höhere ATO-Konzentrationen wirken demgegenüber proliferationshemmend. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert ( $n = 18$ ) für ATO nach 72 h beträgt bei A-172 Zellen  $8,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ .

#### B) U-87 MG Zellen

In Abbildung 4-5 sind die Ergebnisse aller Versuche zur Wirkung von ATO auf die Proliferation von U-87 MG Zellen zusammengefasst. An den Wachstumskurven lässt sich erkennen, dass die Proliferationsgeschwindigkeit von U-87 MG Zellen wie die von A-172 Zellen niedrig ist. Innerhalb der ersten 24 h nach der Exposition nimmt die Zahl der Kontrollzellen kaum zu. Zur Messung von Wachstumshemmung sind daher auch bei dieser Zelllinie längere Expositionszeiten sinnvoll. Das Wachstum von U-87 MG Zellen über die Zeit ist umso geringer, je höher die eingesetzte ATO-Konzentration ist. Bei Konzentrationen zwischen 0,5 und 5  $\mu\text{M}$  agiert ATO zytostatisch. Bei höheren Konzentrationen geht die zytostatische Wirkung in eine zytoletale über. Bereits bei einer Exposition über 24 h induzieren 10 und 20  $\mu\text{M}$  ATO eine Verminderung der Zellzahl bezogen auf die anfänglich ausgesäte Zellmenge. Nach 72 h liegt bei diesen Expositionsbedingungen ein vollständiger Zellverlust vor.

Wie unter (B) gezeigt, tritt ab 2  $\mu\text{M}$  ATO nach 24 h eine statistisch signifikante Verminderung des Zellwachstums auf. Dieser Effekt nimmt mit steigender Konzentration zu und ergibt beim Einsatz von 20  $\mu\text{M}$  ATO eine Verminderung von ca. 70%. Nach 72 h führt ATO bereits ab 0,5  $\mu\text{M}$  zu einer statistisch signifikanten Proliferationshemmung. In Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  ATO sind keine Zellen mehr zu finden. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert von ATO beträgt bei einer Exposition über 24 h  $12,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$  ( $n = 8$ ) und sinkt nach 72 h auf  $2,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$  ( $n = 20$ ).





**Abbildung 4-5: Wirkung von Arsentrioxid auf die Proliferation von U-87 MG Zellen**

U-87 MG Zellen wurden 24 h nach der Aussaat über weitere 24 h ( $n = 8$ ) bzw. 72 h ( $n = 20$ ) mit ATO exponiert. In Anschluss erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). **(A) Zeitabhängigkeit:** Gezeigt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteinanteils in  $\mu\text{g/Well}$ . Die Werte bei  $t = 0$  und  $t = 24$  entsprechen dem Proteinanteil/Well bei der Aussaat (vgl. 4.1.3). **(B) Konzentrationsabhängigkeit:** Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteinanteils in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. In vielen Fällen sind die Standardfehler kleiner als die Symbole, die den MW repräsentieren. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (A-NOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

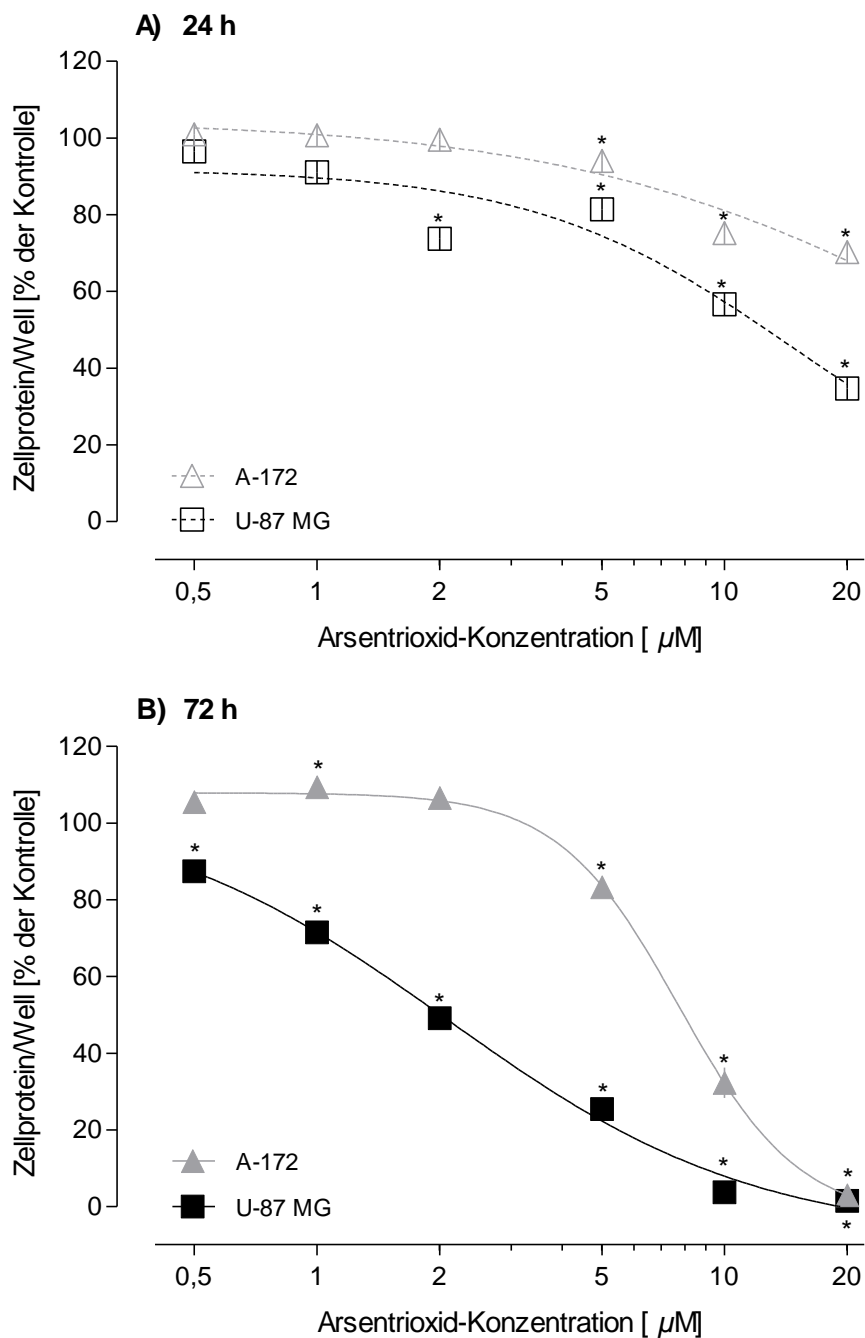


### C) Vergleich der Wirkung von Arsenitrioxid auf A-172 und U-87 MG Zellen

Vergleicht man die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf die untersuchten Glioma-Zellen, ist zu erkennen, dass U-87 MG Zellen wesentlich empfindlicher reagieren als A-172 Zellen (vgl. Abb. 4-6). Bei U-87 MG Zellen ist nach einer 24 h-Exposition ab einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  ATO eine leichte Verminderung des Zellwachstums verglichen mit der Kontrolle zu beobachten. Dieser Effekt nimmt mit steigender Konzentration zu und ergibt beim Einsatz von 20  $\mu\text{M}$  ATO eine Verminderung um ca. 70%. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert (24 h) für ATO bei U-87 MG Zellen beträgt 12,8  $\mu\text{M}$ . A-172 Zellen zeigen nach 24 h im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 2  $\mu\text{M}$  noch keine messbare Reaktion auf ATO. Die höchste eingesetzte ATO-Konzentration führt zu einer Hemmung um 30%.

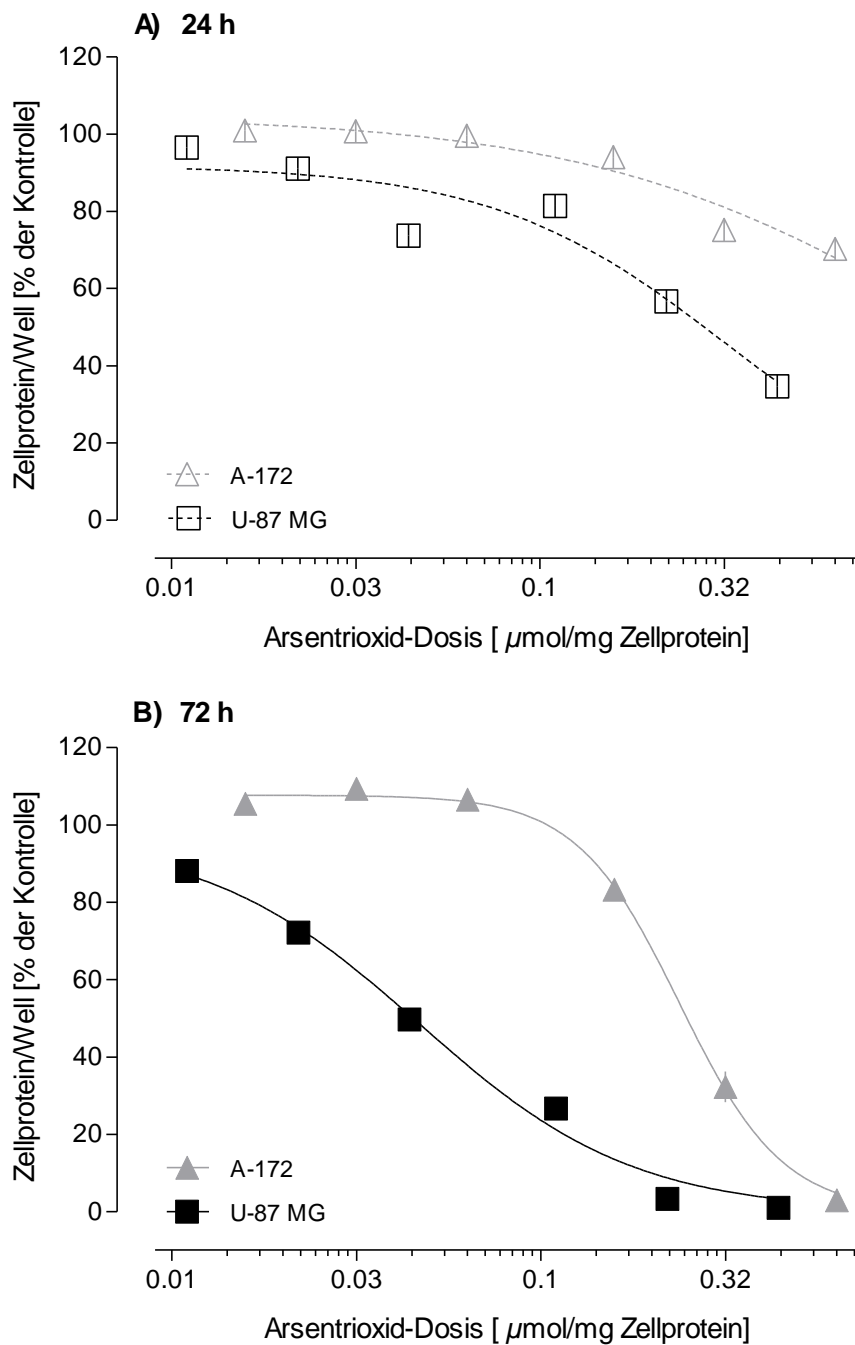
Nach 72 h verläuft die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von ATO bei A-172 Zellen biphasisch, während die Kurve bei U-87 MG Zellen einen stetigen, sigmoiden Verlauf aufweist. Bei U-87 MG Zellen führt eine Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  ATO bereits zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Proliferation. Der Einsatz dieser Konzentration wirkt auf A-172 Zellen nicht proliferationshemmend. Im Gegenteil, die Proliferationsrate der mit bis zu 2  $\mu\text{M}$  ATO exponierten A-172 Zellen ist sogar reproduzierbar höher als die der unbehandelten Kontrolle (bis zu 10%). Niedrigere Konzentrationen als 0,5  $\mu\text{M}$  ATO wurden nicht untersucht. Es lassen sich also keine Aussagen über eine mögliche Wachstumsstimulierung durch noch geringere ATO-Konzentrationen bei U-87 MG Zellen treffen. Mit einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 2,0  $\mu\text{M}$  sind U-87 MG Zellen nach einer Exposition über 72 h um den Faktor 4 sensibler gegenüber ATO als A-172 Zellen ( $\text{EC}_{50}$ -Wert: 8,0  $\mu\text{M}$ ).

Die in Abbildung 4-6 gezeigte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von ATO basiert auf nominellen Konzentrationen, d.h. der zu einem bestimmten Volumen an Kulturmedium zugegebenen ATO-Menge. Nominell effektive Konzentrationen *in vitro* können von der eingesetzten Zellkonzentration abhängig sein (Gülden *et al.*, 2001; 2013). Charakterisiert man die Zellkonzentration zu Beginn der Exposition durch die Zellproteinmenge pro Volumeneinheit Medium ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), so ergibt sich für die hier beschriebenen Versuche eine Zellkonzentration von 31,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (A-172) und 45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (U-87 MG). Trägt man die Wirkung von ATO gegen die „Dosis pro Zelle“ ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Zellprotein) auf, leiten sich die in Abbildung 4-7 dargestellten Dosis-Wirkungs-Kurven ab. Es wird deutlich, dass der Unterschied bezüglich der Empfindlichkeit beider Zelllinien bestehen bleibt. Die halbmaximal wirksame Zelldosis ( $\text{ED}_{50}$ -Wert) nach einer 72 h-Exposition ist bei U-87 MG Zellen mit  $0,05 \pm 0,01$   $\mu\text{mol}$  ATO/mg Zellprotein fünfmal niedriger als bei A-172 Zellen ( $0,25 \pm 0,01$   $\mu\text{mol}$  ATO/mg Zellprotein).



**Abbildung 4-6: Vergleich der konzentrationsabhängigen Wirkung von Arsentrioxid auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen**

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von ATO aus den Abbildungen 4-4B und 4-5B. Weitere Beschreibung siehe dort. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparison test*).



**Abbildung 4-7: Vergleich der dosisabhängigen Wirkung von Arsentrioxid auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen**

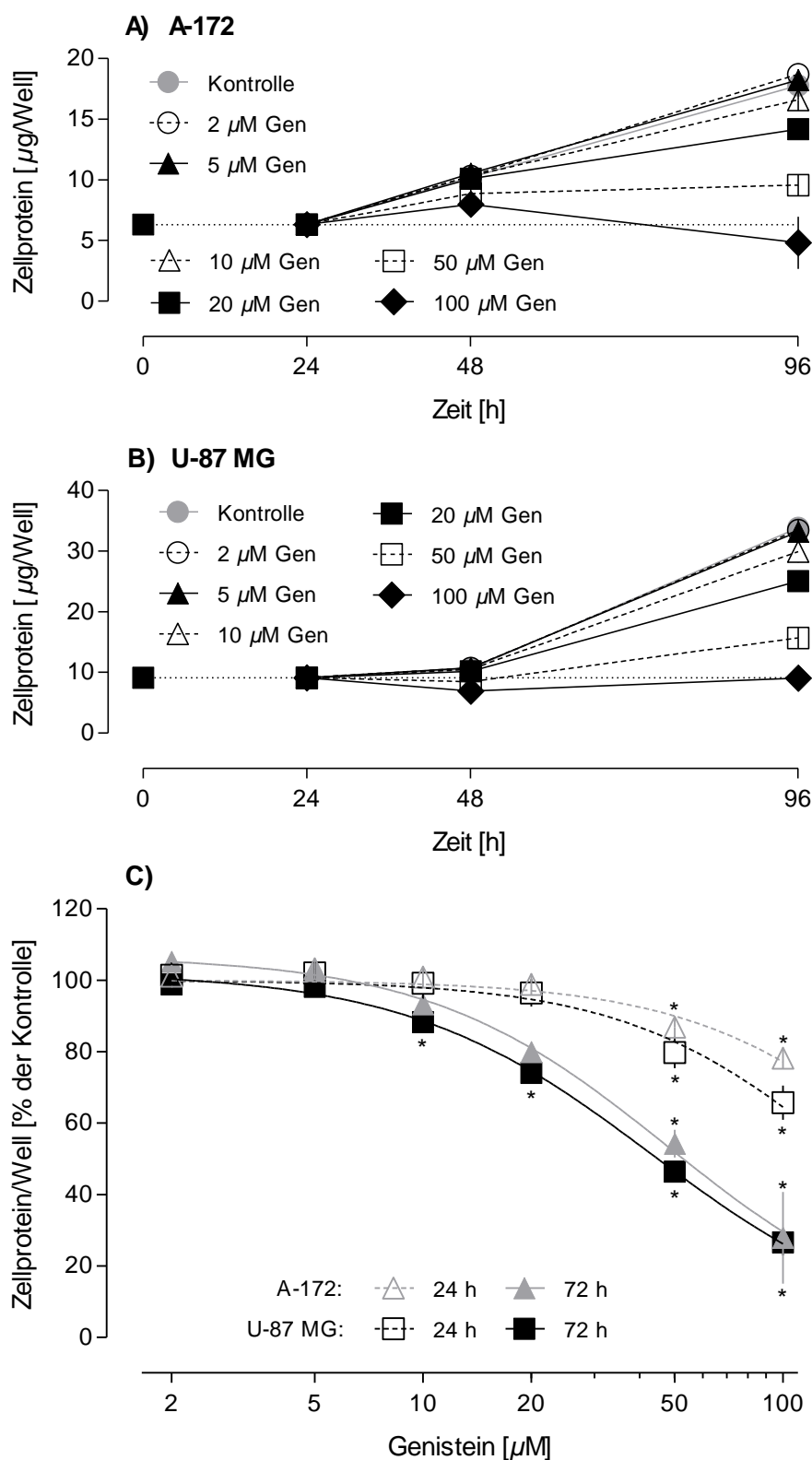
Dargestellt sind Dosis-Wirkungs-Kurven von ATO, die den in Abbildung 4-6 gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Kurven entsprechen. Die ATO-Dosis ( $\mu\text{mol/mg}$  Zellprotein) wurde aus der nominellen ATO-Konzentration ( $\mu\text{M}$ ) und der jeweils vorliegenden Zellproteinkonzentration bei der Aussaat ( $\mu\text{g}$  Zellprotein/ml Mediumvolumen) berechnet.

## 4.2.2 Pflanzliche Polyphenole

### 4.2.2.1 Genistein

Wie in Abbildung 4-8 gezeigt, besitzt Genistein eine von der Konzentration und Expositionszeit abhängige proliferationshemmende Wirkung auf A-172 und U-87 MG Zellen. An den Wachstumskurven lässt sich erkennen, dass Genistein die Proliferationsgeschwindigkeit der beiden Zelllinien bei Konzentrationen ab  $10 \mu\text{M}$  gegenüber den Kontrollen vermindert. Das Wachstum der Zellen ist dabei umso geringer, je höher die eingesetzte Konzentration ist. Selbst bei  $100 \mu\text{M}$  Genistein tritt jedoch kein Zellverlust bezogen auf die anfänglich ausgesäte Zellmenge auf. Mit anderen Worten: Genistein wirkt bei beiden Zelllinien nicht zytoletal.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Genistein haben bei beiden Zelllinien einen ähnlichen Verlauf. Eine 24 h-Exposition mit Genistein führt bei Konzentrationen bis zu  $20 \mu\text{M}$  zu keinem Effekt. Höhere Genistein-Konzentrationen bewirken jeweils eine geringe, aber statistisch signifikante Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei A-172 Zellen beträgt die Hemmung 10% ( $50 \mu\text{M}$ ) bzw. 20% ( $100 \mu\text{M}$ ). Bei U-87 MG Zellen ist die Hemmung beim Einsatz entsprechender Konzentrationen mit 20% bzw. 35% etwas höher. Nach 72 h ist bei beiden Zelllinien eine reproduzierbare Verminderung des Wachstums ( $\sim 10\%$ ) ab  $10 \mu\text{M}$  Genistein zu erkennen. Die höchste eingesetzte Genistein-Konzentration ( $100 \mu\text{M}$ ) führt zu einer Abnahme des gemessenen Zellproteingehalts pro Well um jeweils 70%. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert ( $n \geq 3$ ) für Genistein nach 72 h beträgt  $45,9 \pm 5,1 \mu\text{M}$  (U-87 MG) bzw.  $66,7 \pm 14,5 \mu\text{M}$  (A-172). Die wachstumshemmende Potenz von Genistein ist also bei beiden Zelllinien sehr ähnlich.



**Abbildung 4-8: Wirkung von Genistein auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen**

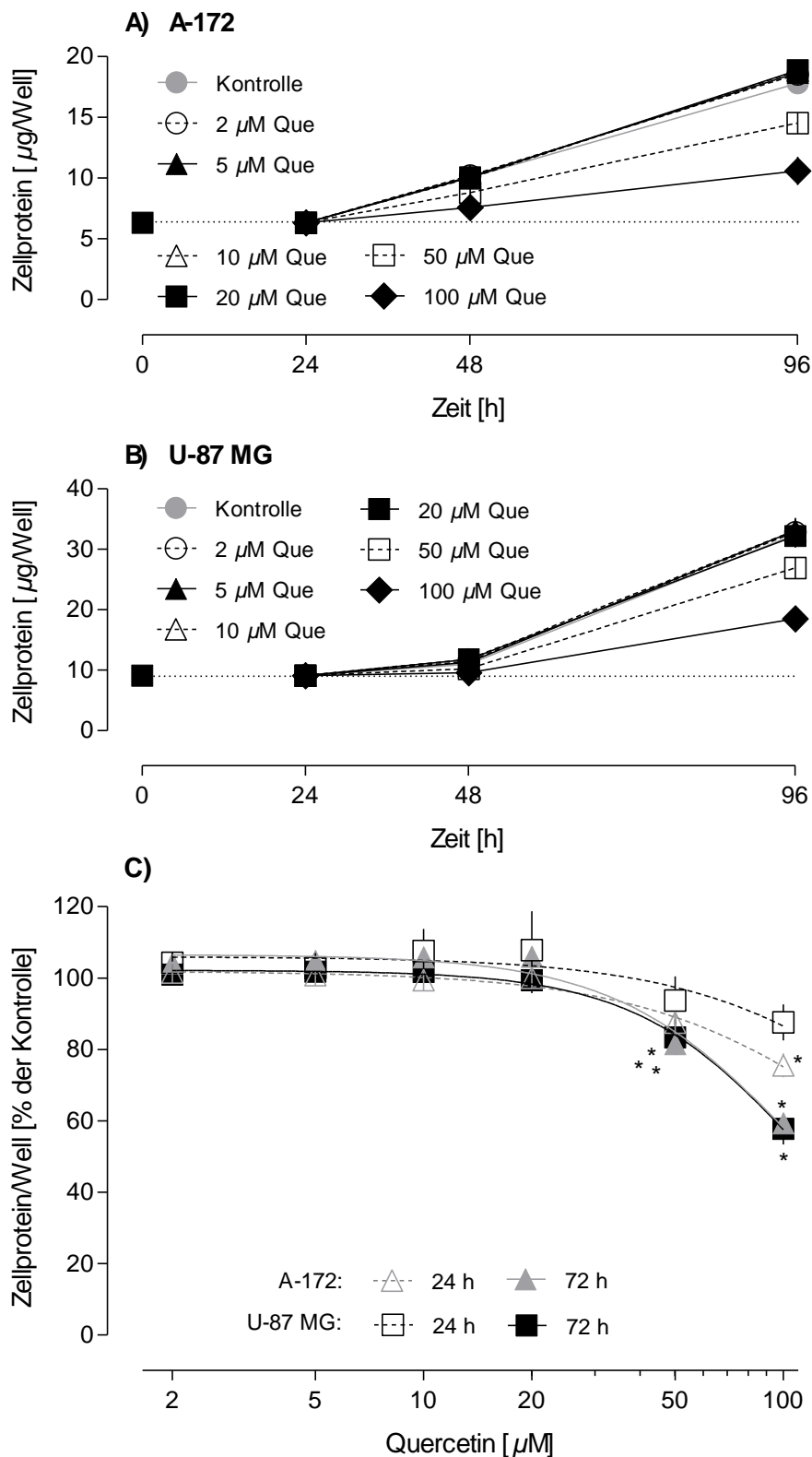
A-172 und U-87 MG Zellen wurden 24 h nach der Aussaat über weitere 24 sowie 72 h mit Genistein (Gen) behandelt und im Anschluss einer Proteinbestimmung unterzogen (vgl. 3.2). Es wurden  $n \geq 3$  Versuche durchgeführt. **(A - B) Zeitabhängigkeit:** Gezeigt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in  $\mu\text{g}/\text{Well}$ . Die Werte bei  $t = 0$  und  $t = 24$  entsprechen dem

Proteingehalt/Well bei der Aussaat (vgl. 4.1.3). **(C) Konzentrationsabhängigkeit:** Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

#### 4.2.2.2 Quercetin

Anders als auf Genistein reagieren A-172 und U-87 MG Zellen auf eine Behandlung mit Quercetin deutlich unempfindlicher (vgl. Abb. 4-9). An den Wachstumskurven lässt sich erkennen, dass Quercetin bis zu einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  die Proliferation der beiden Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst. Das gilt sowohl für eine Exposition über 24 als auch über 72 h. Eine schwache zytostatische Wirkung zeigt sich erst bei höheren Quercetin-Konzentrationen. Die Proliferationsgeschwindigkeit der mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  Quercetin behandelten Zellen ist verglichen mit den unbehandelten Zellen über die gesamte Expositionsdauer verlangsamt. Eine vollständige Wachstumshemmung wird jedoch nicht erreicht.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Quercetin haben bei beiden Zelllinien einen ähnlichen Verlauf. Mit dem Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  Quercetin wird nach 24 h eine Hemmung des Wachstums von 10% (U-87 MG) bzw. 25% (A-172) erzielt. Letztere ist im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant. Nach 72 h beträgt die Hemmung in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Quercetin bei beiden Zelllinien 20%. Bei einer Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Quercetin steigt der Wert auf jeweils 40%. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für Quercetin wurde durch Extrapolation berechnet. Er beträgt nach 72 h  $119 \pm 13,9 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) bei A-172 Zellen und  $114 \pm 10,5 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) bei U-87 MG Zellen.



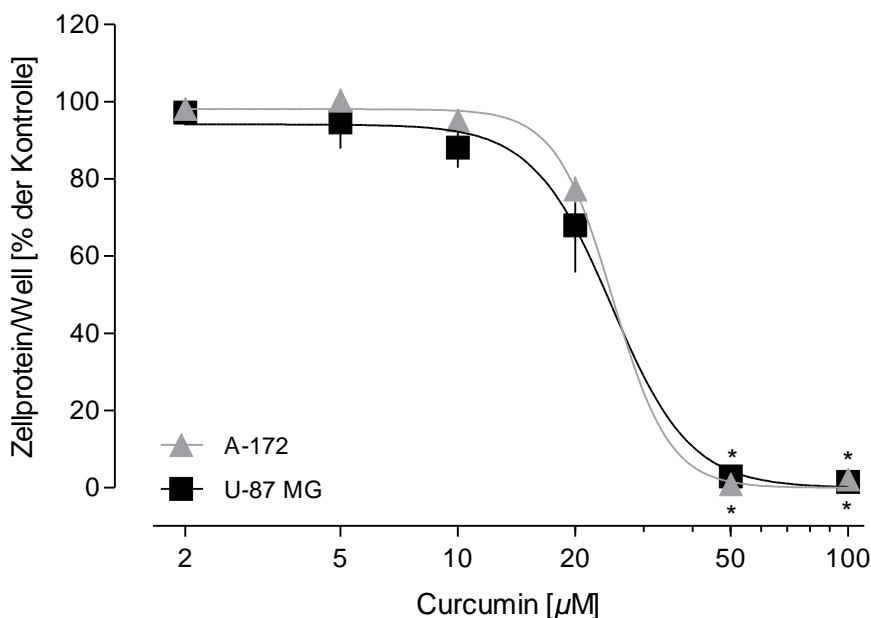
**Abbildung 4-9: Wirkung von Quercetin auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 und U-87 MG Zellen wurden 24 h nach der Aussaat über weitere 24 sowie 72 h mit Quercetin (Que) behandelt und einer Proteinbestimmung unterzogen (vgl. 3.2). Es wurden  $n \geq 3$  Versuche durchgeführt. **(A - B) Zeitabhängigkeit:** Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des ges-

senen Zellproteingehalts in  $\mu\text{g}/\text{Well}$ . Die Werte bei  $t = 0$  und  $t = 24$  entsprechen dem Proteingehalt/Well bei der Aussaat (vgl. 4.1.3). **(C) Konzentrationsabhängigkeit:** Dargestellt sind die  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  des Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion.  $*p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

#### 4.2.2.3 Curcumin

Da in den bisherigen Versuchen mit Genistein und Quercetin selbst hohe Konzentrationen nicht ausreichend waren, um nach 24 h vollständige Konzentrations-Wirkungskurven zu erhalten, wurden bei Curcumin und den im Folgenden beschriebenen Polyphenolen nur 72 h-Expositionen vorgenommen. Wie in Abbildung 4-10 gezeigt, übt Curcumin auf A-172 und U-87 MG Zellen eine ähnliche wachstumshemmende Wirkung aus. Es beeinflusst bis zu 10  $\mu\text{M}$  kaum oder gar nicht das Wachstum der beiden Zelllinien. Im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 50  $\mu\text{M}$  erfolgt eine steile Abnahme des Zellproteins pro Well im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Ab 50  $\mu\text{M}$  kommt es zu einem vollständigen Verlust an angehefteten Zellen. D.h. also, dass Curcumin nicht nur die Proliferation der Glioma-Zellen hemmt, sondern, zumindest bei hinreichend hohen Konzentrationen, auch zytotoxisch wirkt. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert ( $n = 3$ ) für Curcumin beträgt bei A-172 Zellen  $24,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$  und bei U-87 MG Zellen  $22,9 \pm 2,5 \mu\text{M}$ .



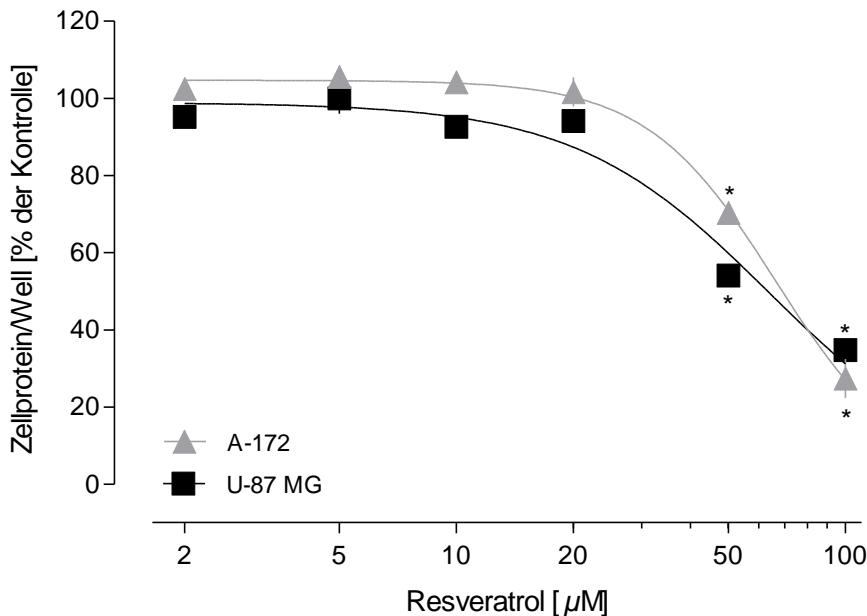
**Abbildung 4-10: Wirkung von Curcumin auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 und U-87 MG Zellen wurden über 72 h mit Curcumin exponiert und anschließend einer Proteinbestimmung unterzogen (vgl. 3.2). Dargestellt sind die  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  des gemessenen Zellproteins in % der Kontrolle (= 100%) aus  $n = 3$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion.  $*p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).



#### 4.2.2.4 Resveratrol

Abbildung 4-11 zeigt, dass Resveratrol auf A-172 und U-87 MG Zellen eine ähnliche Wirkung bezüglich der Wachstumshemmung aufweist. Im Bereich zwischen 2 und 20  $\mu\text{M}$  wirkt Resveratrol nicht proliferationshemmend. Eine Behandlung mit höheren Resveratrol-Konzentrationen führt dagegen zu einer eindeutigen Hemmung des Wachstums bei beiden Zelllinien. In Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol beträgt die Hemmung 30% (A-172) bzw. 45% (U-87 MG). Beim Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol steigt sie jeweils auf 70% an. Die beobachteten Effekte sind statistisch signifikant. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert ( $n = 3$ ) für Resveratrol beträgt  $68,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$  bei A-172 Zellen und  $62,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$  bei U-87 MG Zellen.

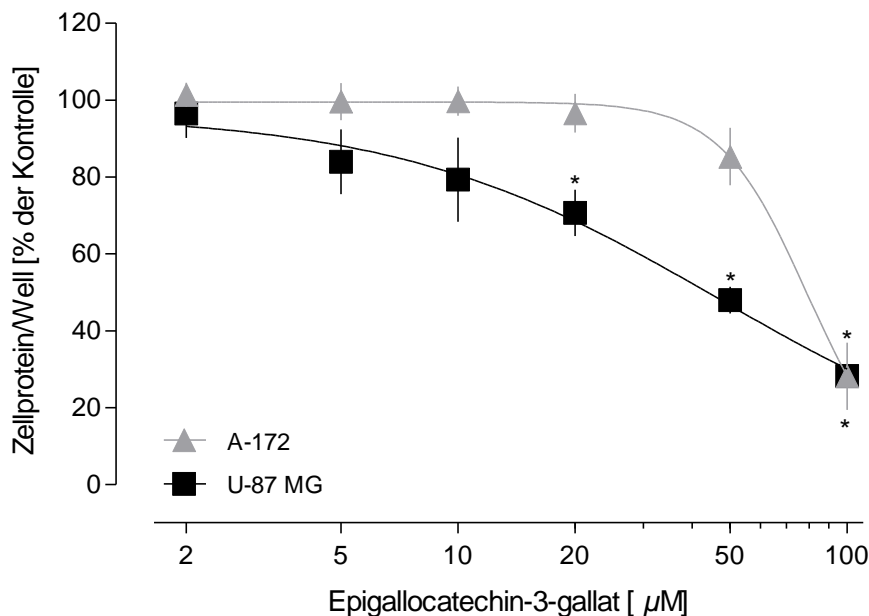


**Abbildung 4-11: Wirkung von Resveratrol auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 und U-87 MG Zellen wurden über 72 h mit Resveratrol exponiert und im Anschluss einer Proteinbestimmung unterzogen (vgl. 3.2). Dargestellt sind die  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) mit  $n = 3$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

#### 4.2.2.5 Epigallocatechin-3-gallat

Anders als bei den zuvor vorgestellten Polyphenolen zeigen sich die untersuchten Zelllinien für Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) unterschiedlich stark empfindlich (vgl. Abb. 4-12). Bei A-172 Zellen wirkt EGCG im Konzentrationsbereich zwischen 2 und 20  $\mu\text{M}$  nicht wachstumshemmend. 50  $\mu\text{M}$  EGCG induzieren bei dieser Zelllinie eine geringe Proliferationshemmung von ca. 15%. Bei U-87 MG Zellen kann eine 15%-ige Verminderung des Wachstums dagegen bereits mit 5  $\mu\text{M}$  EGCG erzielt werden. Dieser Effekt verstärkt sich mit zunehmender EGCG-Konzentration und ist ab 20  $\mu\text{M}$  und einem Zellverlust von 30% statistisch signifikant. Die höchste getestete EGCG-Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) führt bei beiden Zelllinien zu einer Abnahme des Zellproteins pro Well von 70%. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert ( $n = 3$ ) ist bei A-172 Zellen mit  $79 \pm 10,3 \mu\text{M}$  doppelt so hoch wie bei U-87 MG Zellen ( $41,6 \pm 7,5 \mu\text{M}$ ).



**Abbildung 4-12: Wirkung von Epigallocatechin-3-gallat auf die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 und U-87 MG Zellen wurden über 72 h mit EGCG behandelt und im Anschluss einer Proteinbestimmung unterzogen (vgl. 3.2). Dargestellt sind die  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) aus  $n = 3$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

### 4.2.3 Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen

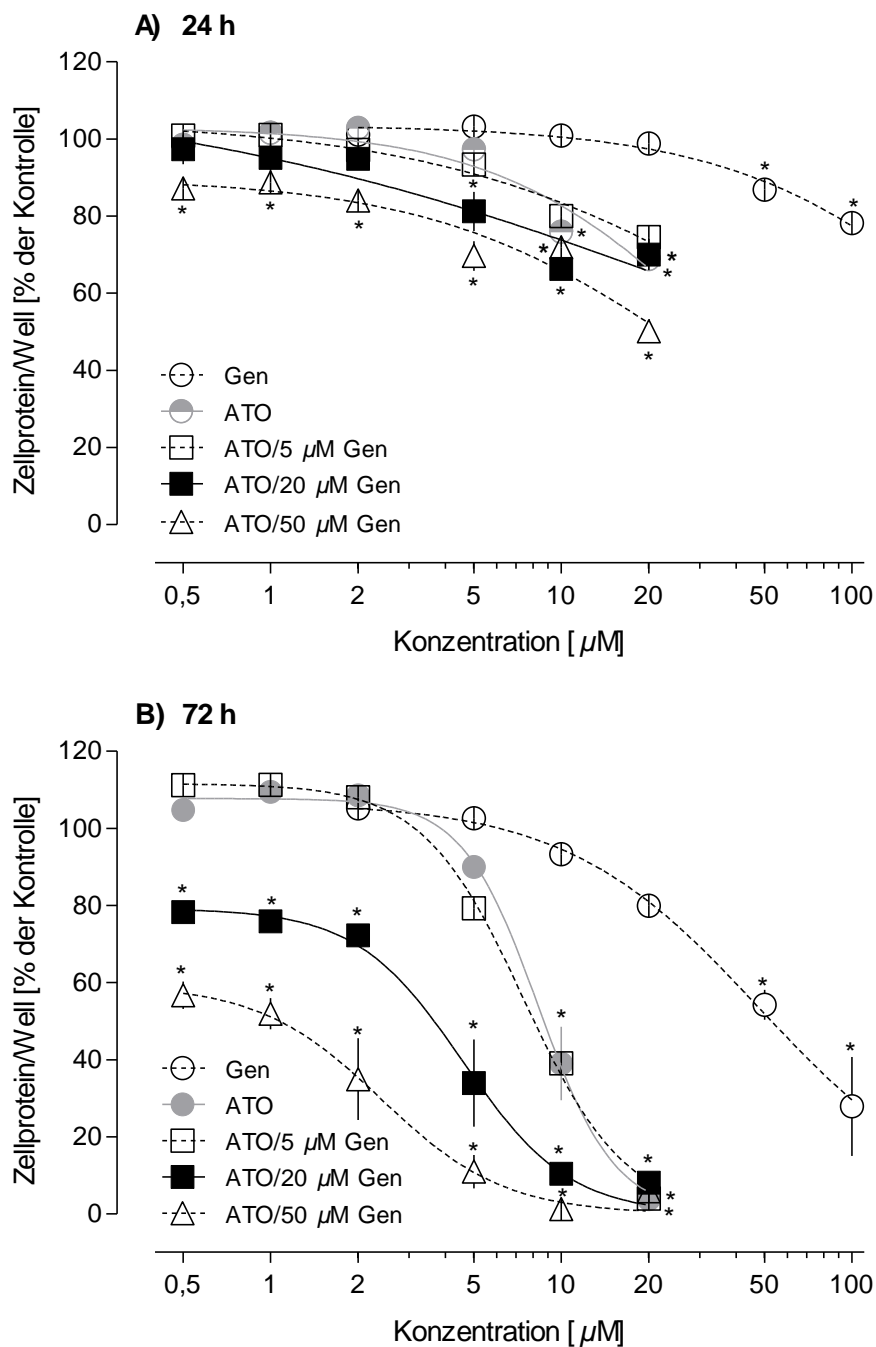
Die in den Kombinationsversuchen verwendeten Konzentrationen an den pflanzlichen Polyphenolen (5, 20, 50  $\mu\text{M}$ ) orientierten sich an ihrer proliferationshemmenden Wirkung (vgl. 4.2.2). Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie nach einer 72 h-Exposition noch keine, beginnende bzw. klare Effekte auf das Wachstum von A-172 und U-87 MG Zellen hatten. Es wurde also nicht nur untersucht, ob selbst zytotoxische Polyphenol-Konzentrationen die Wirkung von ATO verstärken, sondern ob auch subtoxische Konzentrationen einen solchen Effekt haben.

#### 4.2.3.1 Arsentrioxid und Genistein

##### A) A-172 Zellen

Abbildung 4-13 zeigt den Einfluss von Genistein auf die proliferationshemmende Wirkung von ATO bei A-172 Zellen. Weiterhin dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der beiden Einzelsubstanzen. Sie wurden unter 4.2.1 und 4.2.2.1 bereits beschrieben. Eine 24 h-Ko-Exposition mit Genistein-Konzentrationen, die selbst nicht proliferationshemmend sind (5, 20  $\mu\text{M}$ ), beeinflusst den Verlauf der ATO-Kurve und damit dessen Wirkung auf A-172 Zellen nicht. In Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Genistein wird die ATO-Kurve dagegen nach links verschoben. Das Ausmaß dieser Verschiebung entspricht der durch 50  $\mu\text{M}$  Genistein allein verursachten Wachstumshemmung ( $\sim 10\%$ ). Eine 72 h-Ko-Behandlung mit einer auch nach der längeren Inkubationszeit unwirksamen Genistein-Konzentration (5  $\mu\text{M}$ ) verändert die Lage der ATO-Kurve ebenfalls nicht. Dagegen führen bereits selbst proliferationshemmende Genistein-Konzentrationen (20, 50  $\mu\text{M}$ ) zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Linksverschiebung der ATO-Kurve. Während z.B. 0,5  $\mu\text{M}$  ATO das Zellwachstum noch nicht vermindern, findet bei einer Ko-Inkubation der Zellen mit 0,5  $\mu\text{M}$  ATO und 20 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Genistein eine Verminderung um 20% bzw. 40% statt. Diese Effekte sind statistisch signifikant.

Für die Analyse aller im Folgenden gezeigten Kombinationswirkungen wurden, wann immer möglich, die  $\text{EC}_{20}$ -,  $\text{EC}_{50}$ - und  $\text{EC}_{80}$ -Werte der Einzelsubstanzen und ihrer Mischungen abgeleitet. Diese Werte geben jene Konzentrationen an, die zu einer Hemmung der Proliferation von 20%, 50% bzw. 80% führen. Durch Betrachtung verschiedener Effektniveaus wurde der Steigungsverlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurven berücksichtigt.

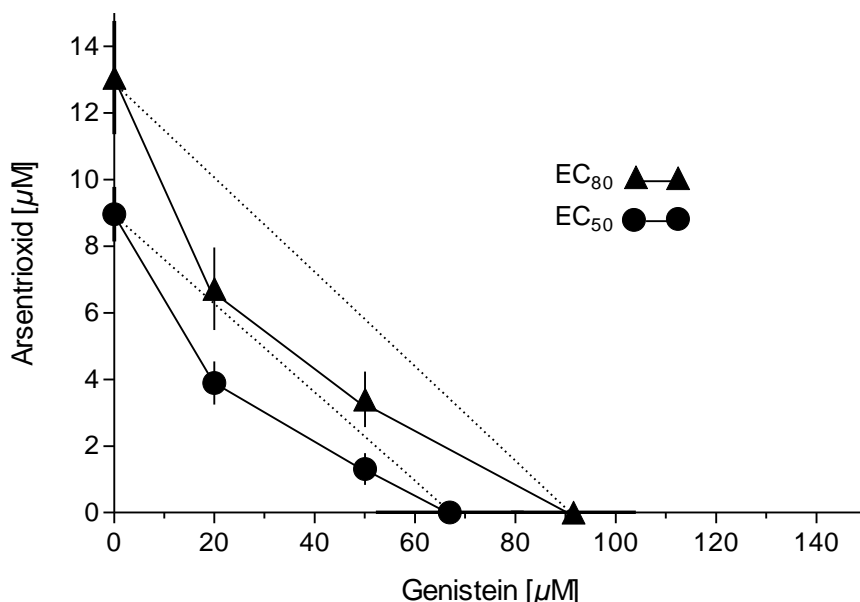


**Abbildung 4-13: Einfluss von Genistein auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen**

A-172 Zellen wurden mit ATO, Genistein und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt ist der gemessene Zellproteingehalt in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. Für die ATO/5  $\mu\text{M}$  Gen-Kurve sind die Ergebnisse aus  $n = 1$  Experiment angegeben. Alle anderen Kurven repräsentieren  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  aus  $n = 3$  Versuchen.  $*p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

Die Analyse der Kombinationswirkung von ATO und Genistein wurde nur für die Messungen nach einer 72 h-Exposition durchgeführt. 24 h-Messungen liefern wenig Auskunft über die Kombinationswirkung der Substanzen. Selbst hohe Konzentrationen von ATO und Genistein reichen bei einer Exposition über 24 h nicht aus, um vollständige Konzentrations-Wirkungs-Kurven zu erhalten. Hier können höchstens  $EC_{20}$ -Werte abgeleitet werden. Das liegt an der langsamen Proliferationsrate von A-172 Zellen, wie in Abbildung 4-4 gezeigt.

Die Kombinationswirkung von ATO und Genistein ist bei den  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werten formal als synergistisch zu werten.  $EC_{20}$ -Werte können nicht verwendet werden, da hier eine mehr als 20%-ige Wachstumshemmung vorliegt. Bei der graphischen Darstellung nach Berenbaum (1977) erzeugen die  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte der Mischungen von ATO und 20 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Genistein konkav verlaufende Isobolen (vgl. Abb. 4-14). Das höchste Ausmaß an Synergie bzw. die stärkste sensitivierende Wirkung von Genistein tritt dabei im Bereich „mittlerer“ Konzentrationen beider Substanzen auf. Mit anderen Worten: Je näher man den  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werten der einzelnen Substanzen kommt, desto geringer ist der Kombinationseffekt. In den Randbereichen sind kleine Abweichungen nach oben und unten damit zu vernachlässigen.



**Abbildung 4-14: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsenitoxid und Genistein auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, Genistein und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-13B) wurden die jeweiligen  $EC_{50}$ - sowie  $EC_{80}$ -Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die gepunktete Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Dargestellt sind  $MW \pm SEM$  aus  $n = 3$  Experimenten.

Der oben beschriebene Zusammenhang wird durch die berechneten Kombinationsindizes verdeutlicht (vgl. Tab. 4-1). Die CI-Werte liegen in dem nach Chou (2006) definierten Bereich für Synergismus ( $\leq 0,9$ ) und sind für die Kombination aus ATO und 20  $\mu\text{M}$  Genistein niedriger als für die Kombination aus ATO und 50  $\mu\text{M}$  Genistein. Das Ausmaß der Sensitivierung ist bei der zuerst genannten Kombination also höher. Numerisch formal handelt es sich um einen schwachen Synergismus. Nach Chou (2006) besteht „wirklicher“ Synergismus erst bei CI-Werten, die niedriger sind als 0,3.

**Tabelle 4-1: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsenitrioxid und Genistein auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Kombination	CI (EC <sub>20</sub> )	CI (EC <sub>50</sub> )	CI (EC <sub>80</sub> )
ATO + 20 $\mu\text{M}$ Genistein	- **	0,73	0,73
ATO + 50 $\mu\text{M}$ Genistein	- **	0,90	0,81

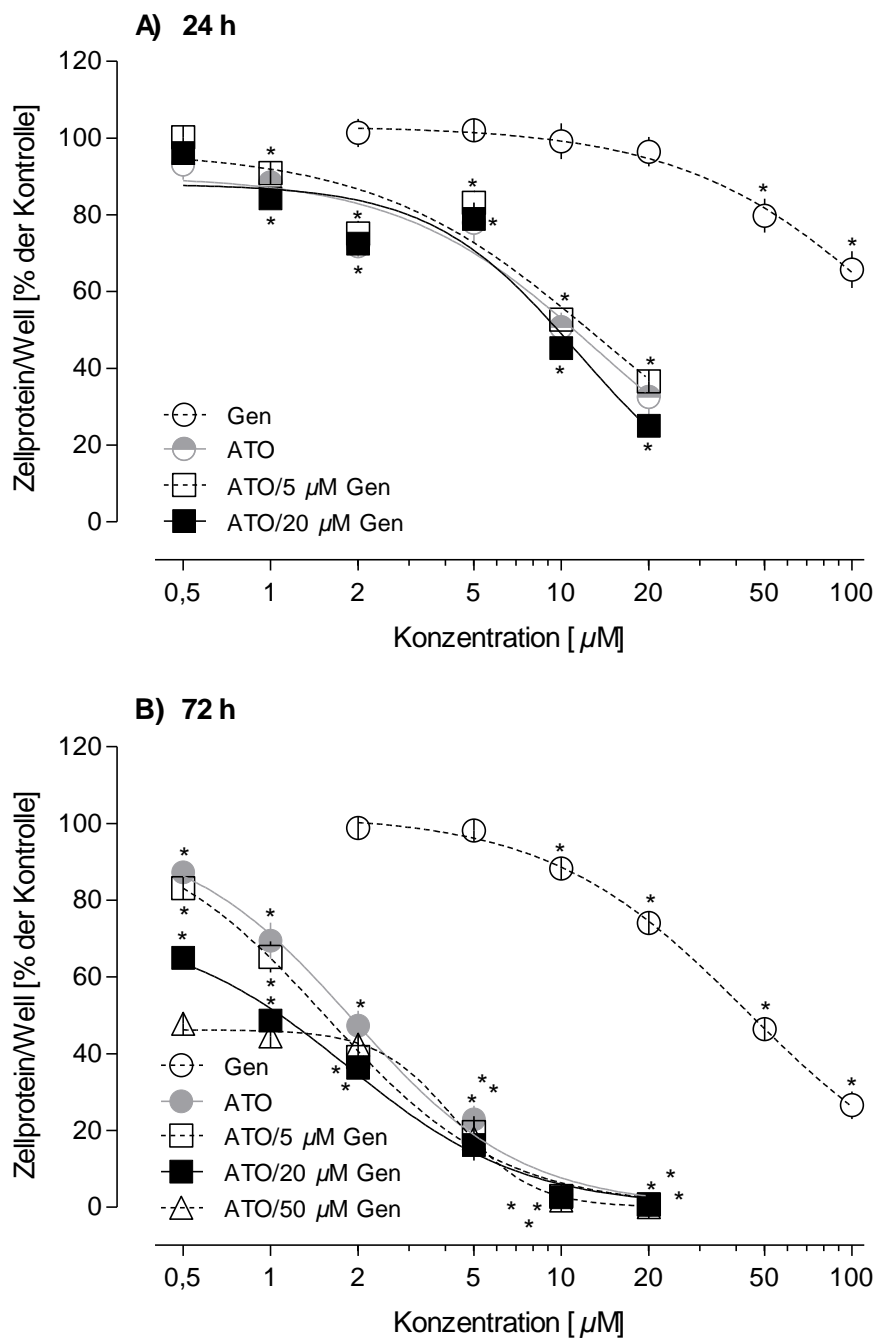
\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-14) sind MW aus n = 3 Experimenten.

\*\* Berechnung der CI-Werte nicht möglich (vgl. Abb. 4-13B).

Zusammengefasst: Kombinationen von ATO und Genistein wirken unabhängig vom zugrunde gelegten Effektniveau schwach synergistisch auf das Wachstum von A-172 Zellen. Genistein sensitiviert die Zellen also für die proliferationshemmende Wirkung von ATO.

#### B) U-87 MG Zellen

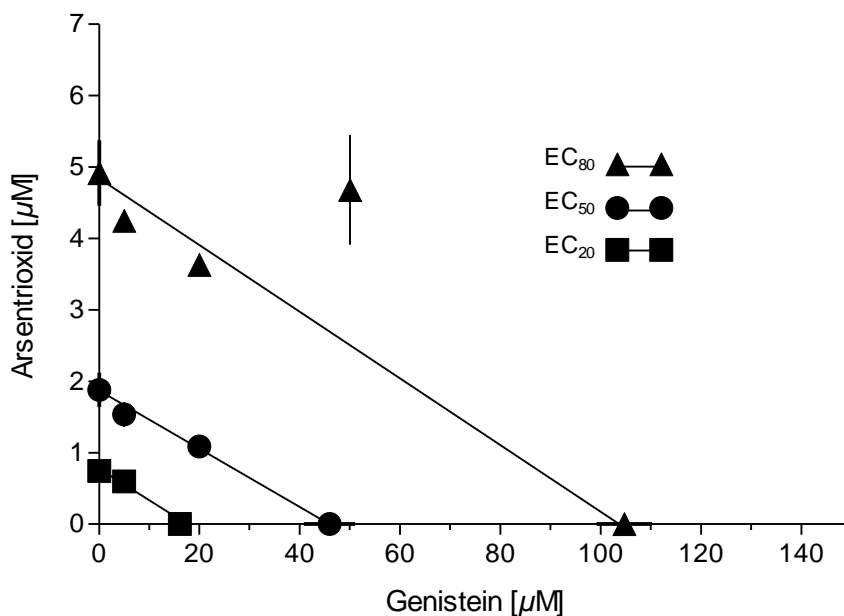
Abbildung 4-15 verdeutlicht den Einfluss von Genistein auf die proliferationshemmende Wirkung von ATO bei U-87 MG Zellen. Genistein führt nach einer Exposition über 24 h ab 50  $\mu\text{M}$  zu einer statistisch signifikanten Hemmung des Zellwachstums. Bei einer 24 h-Ko-Inkubation mit ATO sind die gleichzeitig verwendeten Genistein-Konzentrationen (5, 20  $\mu\text{M}$ ) somit allein unwirksam. Diese Konzentrationen induzieren keine zusätzliche Wachstumshemmung verglichen mit der Wirkung von ATO allein. Nach einer 72 h-Ko-Behandlung wird die Wirkung von ATO erst in Anwesenheit selbst proliferationshemmender Genistein-Konzentrationen (20, 50  $\mu\text{M}$ ) beeinflusst. Bei niedrigen ATO-Konzentrationen (0,5 - 1  $\mu\text{M}$ ) findet hier eine Verlagerung der ATO-Kurve nach links statt. 0,5  $\mu\text{M}$  ATO lösen z.B. eine Hemmung des Zellwachstums von 15% aus. In Kombination mit Genistein steigt dieser Wert auf 35% (20  $\mu\text{M}$ ) bzw. auf mehr als 50% (50  $\mu\text{M}$ ) an. Bei höheren ATO-Konzentrationen nähern sich die beiden Kombinationskurven allerdings wieder der ATO-Kurve an. Ab 10  $\mu\text{M}$  ATO sind unabhängig vom gleichzeitigen Genistein-Einsatz keine Zellen mehr zu finden.



**Abbildung 4-15: Einfluss von Genistein auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen**

U-87 MG Zellen wurden mit ATO, Genistein und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt ist der gemessene Zellproteingehalt in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. Für die ATO-Kurve nach 24 h und die ATO/50  $\mu\text{M}$  Gen-Kurve nach 72 h sind die Ergebnisse aus  $n = 2$  Experimenten als MW + Spannweite angegeben. Alle anderen Kurven repräsentieren MW  $\pm$  SEM aus  $n \geq 3$  Versuchen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparison test*).

Die Analyse der Kombinationswirkung von ATO und Genistein auf U-87 MG Zellen wurde wie bei A-172 Zellen nur für die 72 h-Messungen durchgeführt. Auch bei U-87 MG Zellen erhält man keine vollständigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven, wenn die Expositionszeit nur 24 h beträgt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 4-16 und in Tabelle 4-2 gezeigt. Aus der isobographischen Darstellung leitet sich für alle Effektniveaus eine additive Kombinationswirkung für ATO und Genistein ab. Die  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte ihrer Mischungen bilden gerade Isobolen und weichen damit nicht vom Konzept der Konzentrationsadditivität ab. Verdeutlicht werden die Befunde durch die berechneten CI-Werte, welche in das nach Chou (2006) definierte Intervall für Additivität (0,91 - 1,09) fallen. Einen „Ausreißer“ stellt der  $EC_{80}$ -Wert der Kombination aus ATO und 50  $\mu\text{M}$  Genistein dar. Dieser Wert ergibt sich aus dem Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Die Kurve von ATO zeigt bei U-87 MG Zellen eine geringe Steigung. Der Verlauf dieser Kurve wird bei Kombination mit steigenden Genistein-Konzentrationen zunehmend flacher. Dadurch wird die Spannweite der gemessenen EC-Werte und damit die Unterschiede zwischen den Werten immer geringer. Besonders empfindlich gegenüber kleinen Variationen sind hier die  $EC_{80}$ -Werte. Diese sind zur Analyse der Kombinationswirkung nur bedingt geeignet.



**Abbildung 4-16: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Genistein auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, Genistein und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-15B) wurden die jeweiligen  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - sowie  $EC_{80}$ -Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Für die Kombination ATO/50  $\mu\text{M}$  Gen ist der  $EC_{80}$ -Wert aus  $n = 2$  Experiment als MW + Spannweite angegeben. Alle anderen Punkte sind MW  $\pm$  SEM aus  $\geq 3$  Versuchen.



**Tabelle 4-2: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Genistein auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Kombination	CI (EC <sub>20</sub> )	CI (EC <sub>50</sub> )	CI (EC <sub>80</sub> )
ATO + 5 $\mu$ M Genistein	1,12	0,93	0,91
ATO + 20 $\mu$ M Genistein	-**	1,01	0,93
ATO + 50 $\mu$ M Genistein	-**	-**	1,43

\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-16) sind MW aus  $n \geq 2$  Experimenten.

\*\* Berechnung der CI-Werte nicht möglich (vgl. Abb. 4-15B).

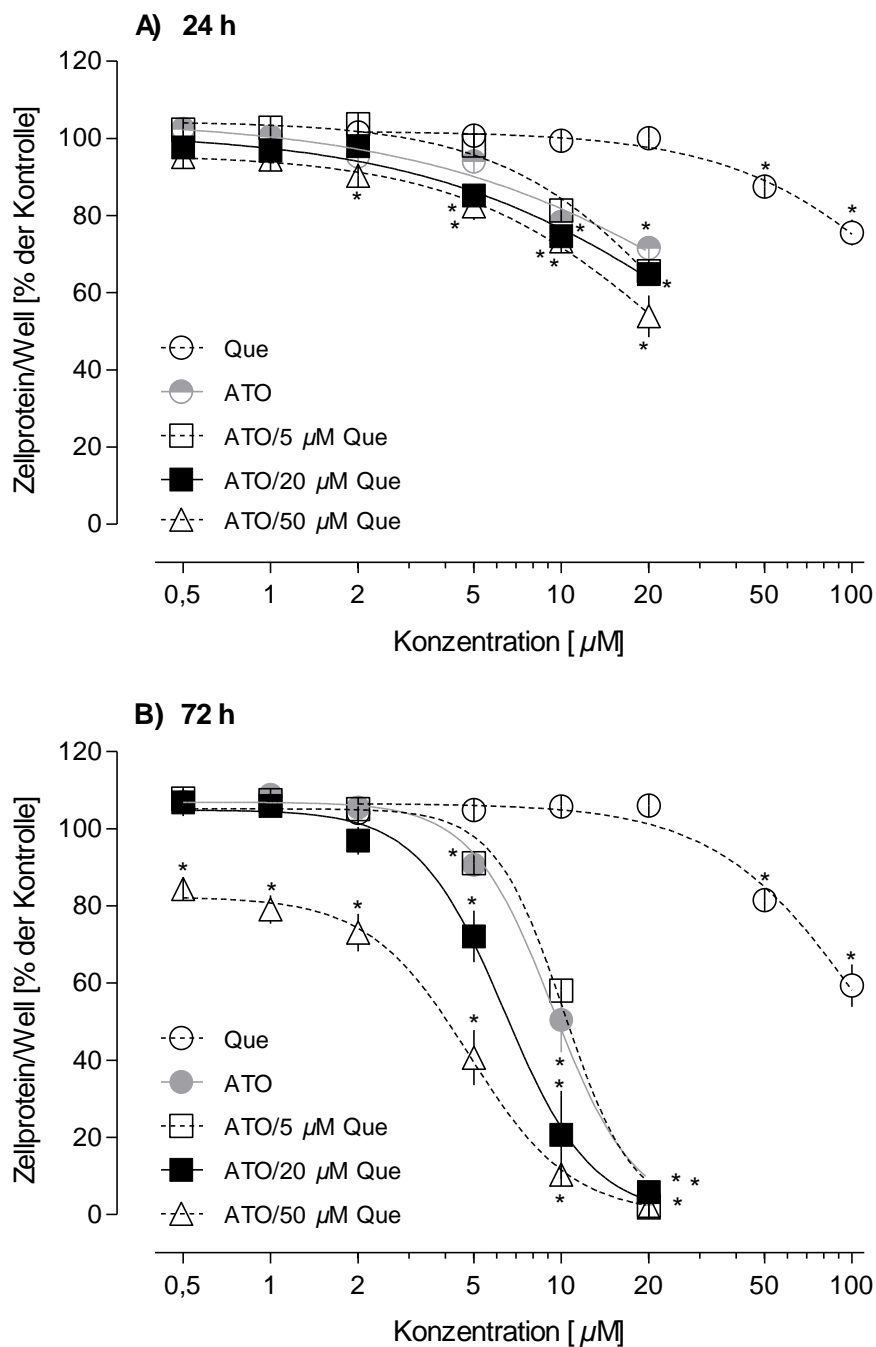
Kurz gefasst: Unabhängig vom betrachteten Effektniveau wirken Kombinationen von ATO und Genistein additiv auf das Wachstum von U-87 MG Zellen. Genistein sensitiviert die Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO also nicht.

#### 4.2.3.2 Arsentrioxid und Quercetin

##### A) A-172 Zellen

Wie Abbildung 4-17 nochmals verdeutlicht, induziert Quercetin bei A-172 Zellen nach einer Exposition über 24 h ab 50  $\mu$ M eine geringe (~ 12%), aber statistisch signifikante Hemmung des Zellwachstums. Eine 24 h-Ko-Inkubation mit Quercetin-Konzentrationen, die allein unwirksam sind (5, 20  $\mu$ M), beeinflusst die Wirkung von ATO auf A-172 Zellen nicht. In Kombination mit 50  $\mu$ M Quercetin wird die ATO-Kurve dagegen geringfügig nach links verschoben. Das Ausmaß dieser Verschiebung entspricht dem durch 50  $\mu$ M Quercetin allein verursachten Effekt. Nach einer 72 h-Behandlung wirkt Quercetin ebenfalls erst bei Konzentrationen ab 50  $\mu$ M zytotoxisch auf A-172 Zellen (~ 20% Wachstumshemmung). 5  $\mu$ M Quercetin beeinflussen die Wirkung von ATO auch nach 72 h nicht. Höhere Quercetin-Konzentrationen (20, 50  $\mu$ M) führen dagegen zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Verlagerung der ATO-Kurve nach links unten. In Anwesenheit von 20  $\mu$ M Quercetin wird sie ab 2  $\mu$ M ATO verlagert. Bei Kombination mit 50  $\mu$ M Quercetin findet eine Verlagerung der kompletten ATO-Kurve statt. In diesem Fall ist die verursachte Hemmung des Zellwachstums ab 0,5  $\mu$ M ATO statistisch signifikant.

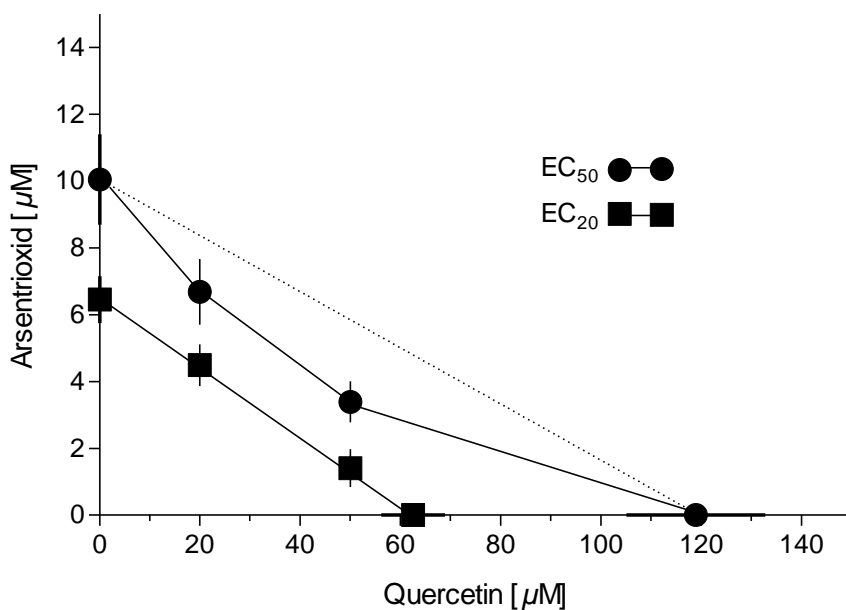
Wie bei den Genistein-Versuchen (vgl. 4.2.3.1) geben 24 h-Messungen auch bei den Quercetin-Versuchen wenig Auskunft über die Kombinationswirkung mit ATO. Selbst hohe Konzentrationen der Substanzen reichen bei einer Exposition über 24 h nicht aus, um EC<sub>50</sub>-Werte abzuleiten. Die Analyse der Kombinationswirkung von ATO und Quercetin erfolgte daher nur für die 72 h-Messungen (vgl. Abb. 4-18 und Tab. 4-3).



**Abbildung 4-17: Einfluss von Quercetin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsenitrioxid bei A-172 Zellen**

A-172 Zellen wurden über 24 h (A) bzw. 72 h (B) mit ATO, Quercetin und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Im Anschluss erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt ist der gemessene Zellprotein Gehalt in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. Für die ATO/5  $\mu\text{M}$  Que-Kurve sind die Ergebnisse aus  $n = 1$  Experiment angegeben. Alle anderen Kurven repräsentieren  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  aus  $n = 3$  Experimenten. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparison test*).

Bei den  $EC_{20}$ -Werten ergibt sich für die Kombination aus ATO und Quercetin formal eine additive Wirkung. Bei der graphischen Darstellung nach Berenbaum (1977) generieren die  $EC_{20}$ -Werte der Mischungen von ATO und Quercetin eine gerade Isobole und weichen damit nicht vom Konzept der Konzentrationsadditivität ab. Die CI ( $EC_{20}$ )-Werte liegen mit 1,02 in dem festgelegten Bereich für Additivität. Bei den  $EC_{50}$ -Werten ist die Kombinationswirkung von ATO und Quercetin als synergistisch zu werten. Die  $EC_{50}$ -Werte ihrer Mischungen bilden eine konkav verlaufende Isobole. Wie bei Genistein (vgl. Abb. 4-14) ist auch die sensitivierende Wirkung von Quercetin auf A-172 Zellen im Bereich „mittlerer“ Konzentrationen beider Substanzen am höchsten. Die berechneten CI ( $EC_{50}$ )-Werte zeigen weiterhin, dass es sich auch hier numerisch formal um einen schwachen Synergismus handelt. Die  $EC_{80}$ -Werte können zur Analyse nicht verwendet werden, da man mit den eingesetzten Quercetin-Konzentrationen keine 80%-ige Wachstumshemmung auslösen kann.



**Abbildung 4-18: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Quercetin auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, Quercetin und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-17B) wurden die jeweiligen  $EC_{20}$ - und  $EC_{50}$ -Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die gepunktete Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM aus n = 3 Versuchen.

**Tabelle 4-3: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsenitrioxid und Quercetin auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Kombination	CI (EC <sub>20</sub> )	CI (EC <sub>50</sub> )	CI (EC <sub>80</sub> )
ATO + 20 $\mu$ M Quercetin	1,02	0,83	-.**
ATO + 50 $\mu$ M Quercetin	1,02	0,76	-.**

\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-18) sind MW aus n = 3 Experimenten.

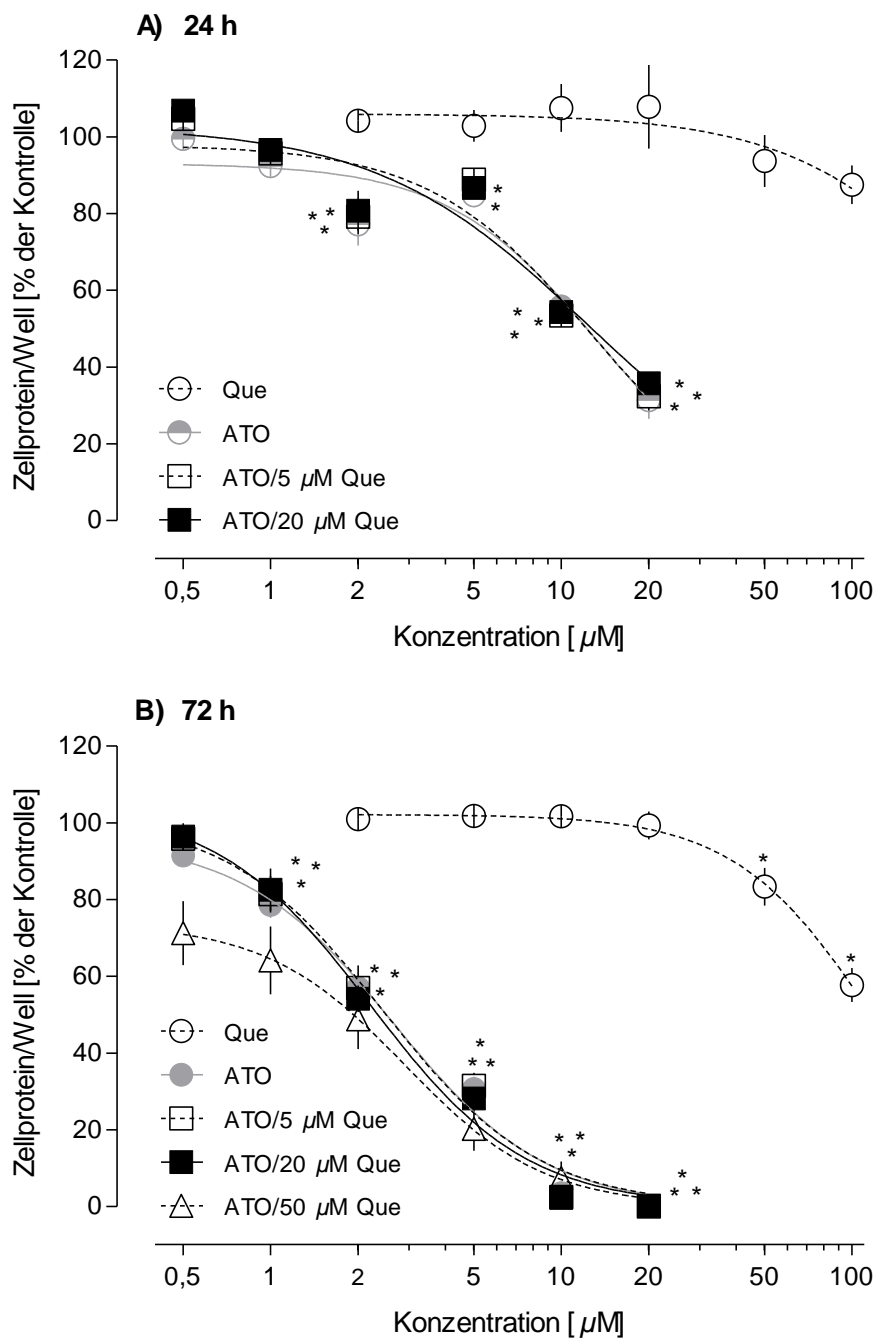
\*\* Berechnung der CI-Werte nicht möglich (vgl. Abb. 4-17B).

Kurz gefasst: Kombinationen von ATO und Quercetin wirken, abhängig vom betrachteten Effektniveau, additiv bzw. schwach synergistisch auf das Wachstum von A-172 Zellen.

### B) U-87 MG Zellen

In Abbildung 4-19 ist der Einfluss von Quercetin auf die proliferationshemmende Wirkung von ATO bei U-87 MG Zellen dargestellt. Quercetin führt, wie unter 4.2.2.2 schon beschrieben, bei einer Exposition über 24 h selbst bei hohen Konzentrationen (100  $\mu$ M) nur zu einer geringen Hemmung des Zellwachstums (~ 10%). Bei einer 24 h-Ko-Inkubation mit ATO sind die gleichzeitig verwendeten Quercetin-Konzentrationen (5, 20  $\mu$ M) allein unwirksam. Diese Konzentrationen beeinflussen den Verlauf der ATO-Kurve nicht. Nach 72 h wird die Lage der ATO-Kurve in Anwesenheit allein nicht proliferationshemmender Quercetin-Konzentrationen (5, 20  $\mu$ M) ebenfalls nicht verändert. Eine Ko-Inkubation mit 50  $\mu$ M Quercetin, einer bereits selbst wirksamen Konzentration, führt dagegen zu einer Linksverschiebung der ATO-Kurve. Diese Verschiebung ist im Bereich zwischen 0,5 und 1  $\mu$ M ATO stärker ausgeprägt und wird im Bereich zwischen 2 und 5  $\mu$ M ATO deutlich schwächer. Ab 10  $\mu$ M ATO sind unabhängig vom gleichzeitigen Quercetin-Einsatz keine angehefteten Zellen mehr vorhanden.

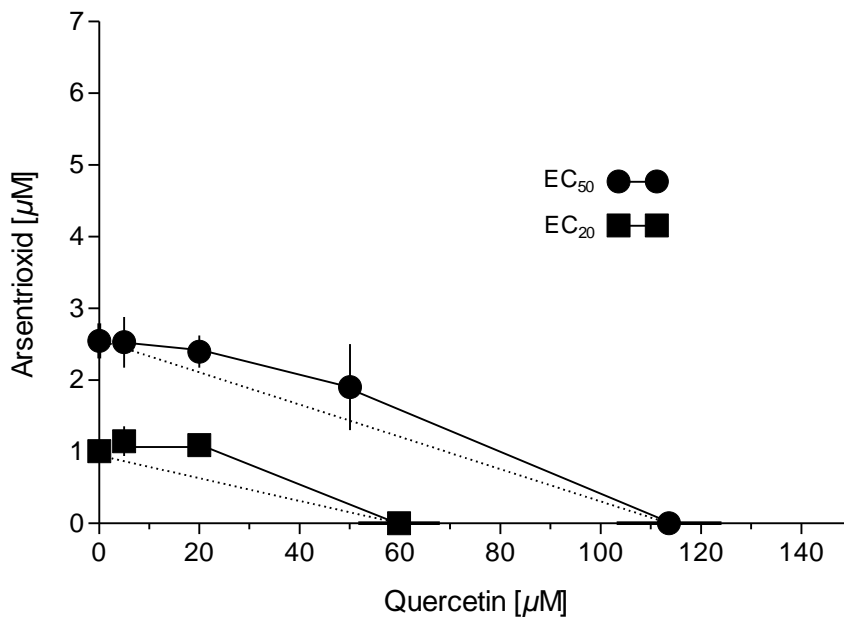
Wie bei A-172 Zellen wurde die Analyse der Kombinationswirkung von ATO und Quercetin auch bei U-87 MG Zellen nur für die 72 h-Messungen durchgeführt. Bei den EC<sub>20</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werten leitet sich für ATO und Quercetin formal eine antagonistische Kombinationswirkung ab. Bei der graphischen Darstellung generieren die EC<sub>20</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte der Mischungen beider Agentien konvex verlaufende Isobolen (vgl. Abb. 4-20). Verdeutlicht werden die Befunde durch die berechneten CI-Werte, welche in den nach Chou (2006) definierten Bereich für Antagonismus ( $\geq 1,10$ ) fallen (vgl. Tab. 4-4). Numerisch formal handelt sich dabei um einen schwachen Antagonismus. „Wirklicher“ Antagonismus besteht nach Chou (2006) erst bei CI-Werten, die höher sind als 1,45.



**Abbildung 4-19: Einfluss von Quercetin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsenitrioxid bei U-87 MG Zellen**

U-87 MG Zellen wurden mit ATO, Quercetin und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 24 h **(A)** und 72 h **(B)** erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt ist der gemessene Zellproteingehalt in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. Für die ATO/50  $\mu\text{M}$  Que-Kurve (72 h) sind die Ergebnisse aus  $n = 2$  Experimenten als MW + Spannweite angegeben. Alle anderen Kurven repräsentieren MW  $\pm$  SEM aus  $n \geq 3$  Experimenten. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

Die  $EC_{80}$ -Werte können zur Analyse nicht verwendet werden, da mit den eingesetzten Quercetin-Konzentrationen keine 80%-ige Hemmung des Wachstums erreicht wird.



**Abbildung 4-20: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Quercetin auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, Quercetin und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-19B) wurden die jeweiligen  $EC_{20}$ - und  $EC_{50}$ -Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die gepunktete Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Für die Kombination ATO/50  $\mu$ M Que ist der  $EC_{50}$ -Wert aus  $n = 2$  Experimenten als MW + Spannweite angegeben. Alle anderen Punkte repräsentieren MW  $\pm$  SEM aus  $n \geq 3$  Versuchen.

**Tabelle 4-4: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Quercetin auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Kombination	CI ( $EC_{20}$ )	CI ( $EC_{50}$ )	CI ( $EC_{80}$ )
ATO + 5 $\mu$ M Quercetin	1,22	1,04	-**
ATO + 20 $\mu$ M Quercetin	1,42	1,12	-**
ATO + 50 $\mu$ M Quercetin	-**	1,19	-**

\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-20) sind MW aus  $n \geq 2$  Experimenten.

\*\* Berechnung der CI-Werte nicht möglich (vgl. Abb. 4-19B).

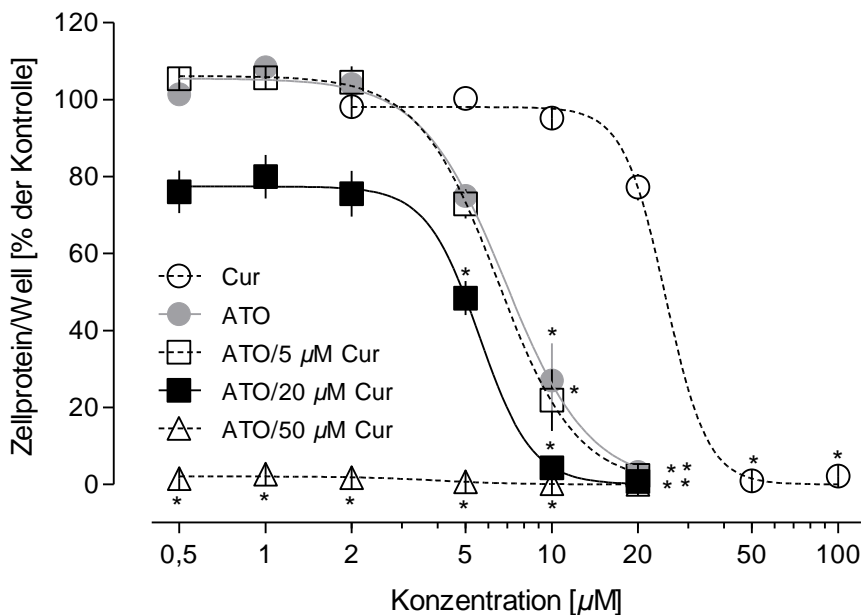
Kurz gefasst: Quercetin wirkt bei Ko-Inkubation mit ATO keinesfalls synergistisch auf das Wachstum von U-87 MG Zellen. Im Gegenteil, es ist eine schwach antagonistische Wirkung festzustellen.

### 4.2.3.3 Arsentrioxid und Curcumin

#### A) A-172 Zellen

Da 24 h-Messungen bisher wenig Auskunft über die Kombinationswirkung der Substanzen geliefert haben, wurden bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen ausschließlich 72 h-Expositionen vorgenommen.

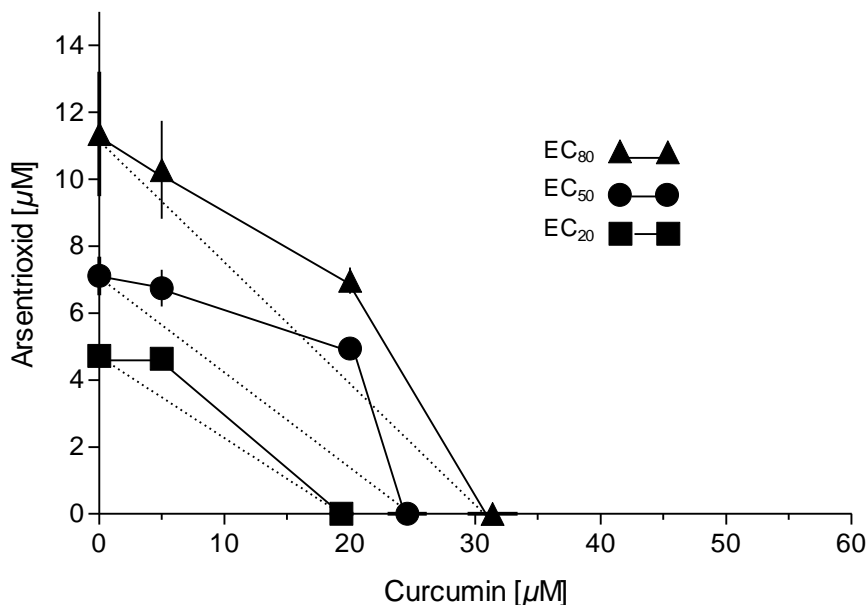
Abbildung 4-21 zeigt den Einfluss von Curcumin auf die proliferationshemmende Wirkung von ATO bei A-172 Zellen. Wie unter 4.2.2.3 erläutert, hemmt Curcumin ab 20  $\mu\text{M}$  reproduzierbar das Zellwachstum. Ab 50  $\mu\text{M}$  kommt es zu einem vollständigen Zellverlust. Bei einer Ko-Exposition mit einer allein unwirksamen Curcumin-Konzentration (5  $\mu\text{M}$ ) wird der Verlauf der ATO-Kurve nicht beeinflusst. In Anwesenheit höherer, allein proliferationshemmender Curcumin-Konzentrationen (20, 50  $\mu\text{M}$ ) erfolgt hingegen eine deutliche Verschiebung der ATO-Kurve nach links unten. Während beispielsweise 0,5 bis 2  $\mu\text{M}$  ATO noch keine Wirkung auf das Wachstum von A-172 Zellen haben, nimmt der gemessene Zellproteingehalt pro Well bei gleichzeitigem Einsatz von 20  $\mu\text{M}$  Curcumin bereits um etwa 20% ab. In Kombination mit 50  $\mu\text{M}$  Curcumin sind hier keine angehefteten Zellen mehr zu finden.



**Abbildung 4-21: Einfluss von Curcumin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen**

A-172 Zellen wurden mit ATO, Curcumin (Cur) und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 72 h erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) aus  $n = 3$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

Abbildung 4-22 und Tabelle 4-5 geben die Ergebnisse der Analyse zur Bewertung der Kombinationswirkung von ATO und Curcumin auf A-172 Zellen wieder. Unabhängig vom zugrunde gelegten Wirkungsniveau ergeben sich bei der graphischen Darstellung konvexe Isobolen, die formal betrachtet, auf eine antagonistische Kombinationswirkung der beiden Substanzen hinweisen. Verdeutlicht werden die Befunde durch die berechneten CI-Werte, welche in den definierten Bereich für Antagonismus ( $\geq 1,10$ ) fallen. Betrachtet man allerdings die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (vgl. Abb. 4-21), so fällt auf, dass die durch ATO ausgelöste Hemmung des Zellwachstums in keinem Fall durch Curcumin vermindert wird. Somit handelt es sich hier um einen „untypischen“ Antagonismus. Dieses, zunächst widersprüchlich erscheinende, Phänomen ist bereits beschrieben worden. Nach Berenbaum (1977) kann ein Kombinationseffekt antagonistisch sein, selbst wenn er höher ist als die Summe der Einzeleffekte. Der beobachtete Sachverhalt macht also deutlich, dass die Kombinationswirkung von Substanzen nicht schlicht abgeleitet werden kann, indem man den Kombinationseffekt mit der Summe der Einzelsubstanzeffekte vergleicht.



**Abbildung 4-22: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Curcumin auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, Curcumin und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-21) wurden die jeweiligen EC<sub>20</sub>-, EC<sub>50</sub>- sowie EC<sub>80</sub>-Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die gepunktete Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Alle Punkte repräsentieren MW  $\pm$  SEM aus n = 3 Experimenten.



**Tabelle 4-5: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Curcumin auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Kombination	CI (EC <sub>20</sub> )	CI (EC <sub>50</sub> )	CI (EC <sub>80</sub> )
ATO + 5 $\mu$ M Curcumin	1,24	1,15	1,06
ATO + 20 $\mu$ M Curcumin	-**	1,51	1,25

\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-22) sind MW aus n = 3 Experimenten.

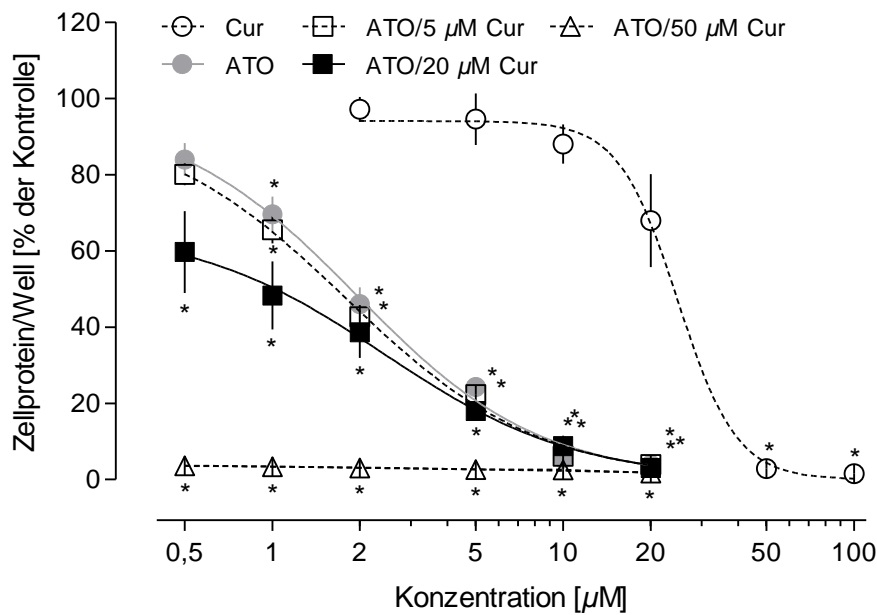
\*\* Berechnung des CI-Wertes nicht möglich (vgl. Abb. 4-21).

Zusammengefasst: Curcumin wirkt bei Ko-Inkubation mit ATO keinesfalls synergistisch auf das Wachstum von A-172 Zellen. Im Gegenteil, formal ist eine antagonistische Wirkung festzustellen.

### B) U-87 MG Zellen

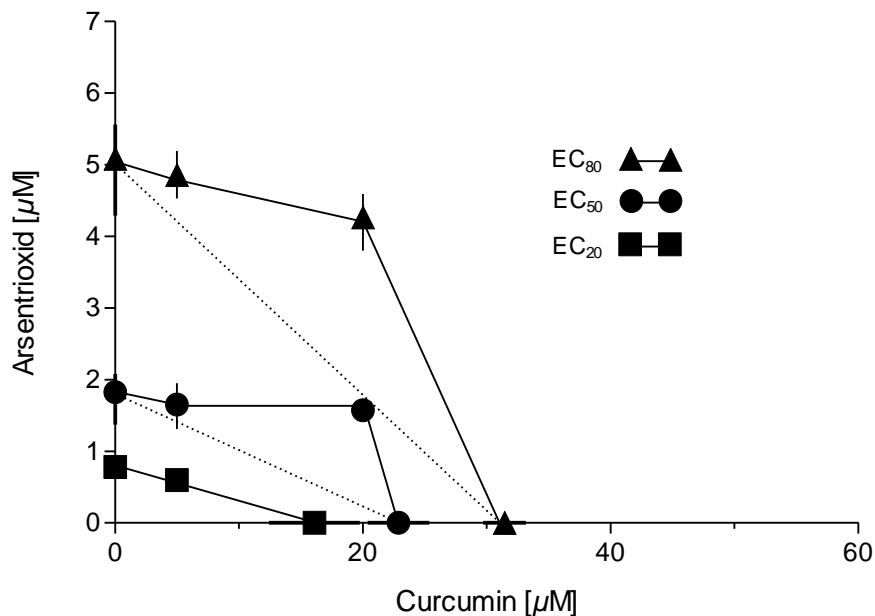
Wie Abbildung 4-23 nochmal verdeutlicht, induziert Curcumin bei U-87 MG Zellen eine reproduzierbare Wachstumshemmung ab 20  $\mu$ M (vgl. 4.2.2.3). Bei 50  $\mu$ M lassen sich keine angehefteten Zellen mehr finden. Eine allein unwirksame Curcumin-Konzentration von 5  $\mu$ M beeinflusst die Wirkung von ATO auf U-87 MG Zellen nicht. 20  $\mu$ M Curcumin führen hingegen zu einer Verschiebung der ATO-Kurve nach links. Diese Verschiebung ist insbesondere im Bereich zwischen 0,5 und 1  $\mu$ M ATO ausgeprägt. Bei höheren ATO-Konzentrationen nähert sich die Kombinationskurve der ATO-Kurve. Ab 10  $\mu$ M ATO sind unabhängig vom gleichzeitigen Curcumin-Einsatz keine angehefteten Zellen mehr vorhanden. In Kombination mit 50  $\mu$ M Curcumin sind alle Zellen abgelöst.

Die Kombinationswirkung von ATO und Curcumin auf U-87 MG Zellen ist bei den EC<sub>20</sub>-Werten als additiv zu werten. Bei der isobographischen Darstellung (vgl. Abb. 4-24) wird bei diesem Wirkungsniveau eine gerade Isobole generiert. Das entspricht dem Konzept der Konzentrationsadditivität. Bei den EC<sub>50</sub>- und EC<sub>80</sub>-Werten ergibt sich formal eine antagonistische Wirkung. Die EC<sub>50</sub>- und EC<sub>80</sub>-Werte der Mischungen von ATO und Curcumin bilden konvexe Isobolen. Die berechneten CI (EC<sub>50</sub>)- und (EC<sub>80</sub>)-Werte (vgl. Tab. 4-6) liegen zwischen 1,11 und 1,73 und sind damit höher als die definierte Obergrenze für Additivität (vgl. 3.3). Wie bei A-172 Zellen tritt auch bei U-87 MG Zellen ein „untypischer“ Antagonismus auf. Es ist keine offensichtliche Abschwächung der ATO-Wirkung in Anwesenheit von Curcumin zu erkennen, wenn man die Konzentrations-Wirkungs-Kurven betrachtet (vgl. Abb. 4-23).



**Abbildung 4-23: Einfluss von Curcumin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen**

U-87 MG Zellen wurden über 72 h mit ATO, Curcumin und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Im Anschluss erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) aus  $n = 3$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).



**Abbildung 4-24: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Curcumin auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, Curcumin und ihrer Kombinationen (vgl. Abb. 4-23) wurden die jeweiligen  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -

Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die gepunktete Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Dargestellt sind die MW + Spannweite aus n = 3 Experimenten.

**Tabelle 4-6: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Curcumin auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Kombination	CI (EC <sub>20</sub> )	CI (EC <sub>50</sub> )	CI (EC <sub>80</sub> )
ATO + 5 $\mu$ M Curcumin	1,08	1,12	1,11
ATO + 20 $\mu$ M Curcumin	-**	1,73	1,48

\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-24) sind MW aus n = 3 Experimenten.

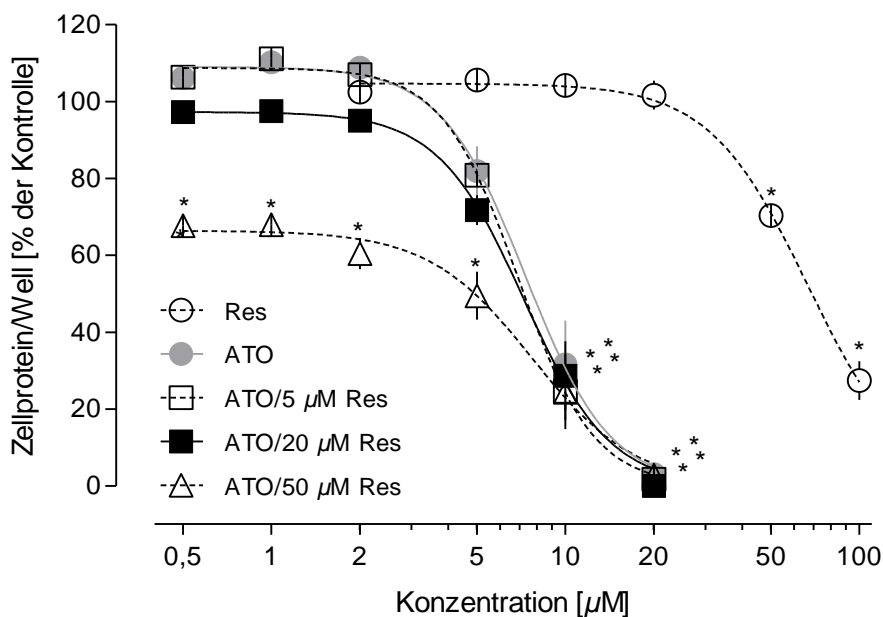
\*\* Berechnung der CI-Werte nicht möglich (vgl. Abb. 4-23).

Zusammengefasst: Kombinationen von ATO mit Curcumin wirken, in Abhängigkeit vom zugrunde gelegten Effektniveau, additiv bzw. antagonistisch auf das Wachstum von U-87 MG Zellen. Die Zellen werden durch Curcumin also nicht für die proliferationshemmende Wirkung von ATO sensitiviert.

#### 4.2.3.4 Arsentrioxid und Resveratrol

##### A) A-172 Zellen

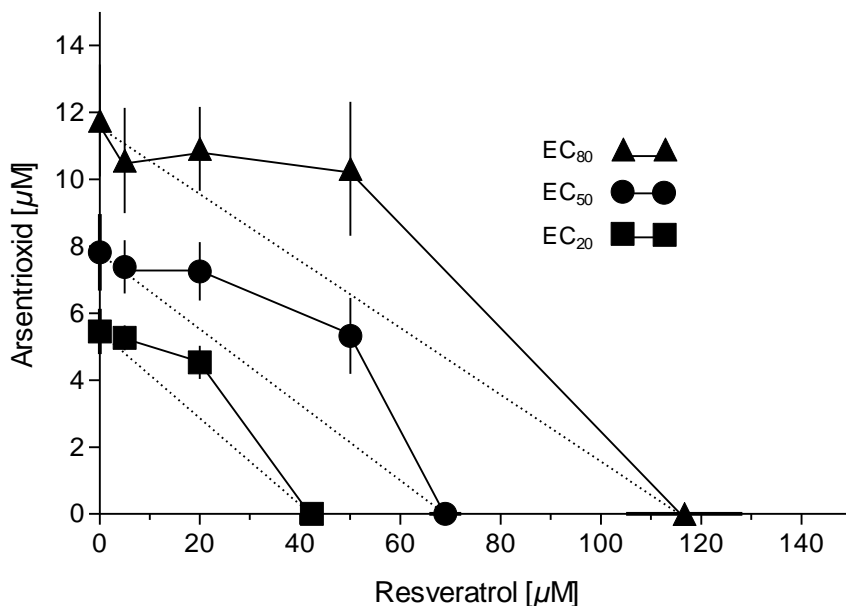
Abbildung 4-25 zeigt den Einfluss von Resveratrol auf die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf A-172 Zellen. Resveratrol induziert bei einer 72 h-Exposition ab 50  $\mu$ M eine statistisch signifikante Hemmung des Wachstums (~ 30%). Eine Ko-Inkubation mit 5  $\mu$ M Resveratrol ändert den Verlauf der ATO-Kurve nicht. In Anwesenheit höherer Resveratrol-Konzentrationen wird die ATO-Kurve dagegen nach links unten verschoben. Die Steigung der Kurve nimmt also ab. Bei einer Ko-Exposition mit 20  $\mu$ M Resveratrol wird die durch 0,5 bis 2  $\mu$ M ATO hervorgerufene Förderung der Proliferation komplett unterbunden. In Kombination mit 50  $\mu$ M Resveratrol findet in diesem Bereich eine Hemmung des Wachstums verglichen mit der Kontrolle statt (jeweils ca. 30%). Ab 5  $\mu$ M ATO laufen die beiden Kombinations-Kurven zunehmend mit der ATO-Kurve zusammen.



**Abbildung 4-25: Einfluss von Resveratrol auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsenitrioxid bei A-172 Zellen**

A-172 Zellen wurden mit ATO, Resveratrol (Res) und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 72 h erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Gezeigt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) aus  $n = 3$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

Die Ergebnisse der Analyse zur Bewertung der Kombinationswirkung von ATO und Resveratrol sind in Abbildung 4-26 und in Tabelle 4-7 wiedergegeben. Unabhängig vom zugrunde gelegten Effektniveau ergeben sich bei der isobographischen Darstellung konvexe Isobolen. Diese weisen, formal betrachtet, auf eine antagonistische Kombinationswirkung hin. Das höchste Ausmaß an Antagonismus tritt dabei im Bereich „mittlerer“ Konzentrationen beider Substanzen auf. Je weiter also die  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte der Mischungen von ATO und Resveratrol von ihren separaten EC-Werten entfernt liegen, desto höher ist die antagonistische Wirkung. In den Randbereichen sind damit kleine Abweichungen nach oben und unten, wie sie sich hier für ATO und 5  $\mu$ M Resveratrol ergeben, zu vernachlässigen. Die CI-Werte deuten numerisch formal auf eine schwach antagonistische Wirkung hin. Außerdem liegt auch hier, wie bei Curcumin (vgl. 4.2.3.3), ein „untypischer“ Antagonismus vor.



**Abbildung 4-26: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Resveratrol auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, Resveratrol und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-25) wurden die jeweiligen EC<sub>20</sub>-, EC<sub>50</sub>- und EC<sub>80</sub>-Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die gepunktete Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Dargestellt sind die MW ± SEM aus n = 3 Experimenten.

**Tabelle 4-7: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Resveratrol auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Kombination	CI (EC <sub>20</sub> )	CI (EC <sub>50</sub> )	CI (EC <sub>80</sub> )
ATO + 5 µM Resveratrol	1,08	1,02	0,94
ATO + 20 µM Resveratrol	1,30	1,22	1,10
ATO + 50 µM Resveratrol	-**	1,41	1,31

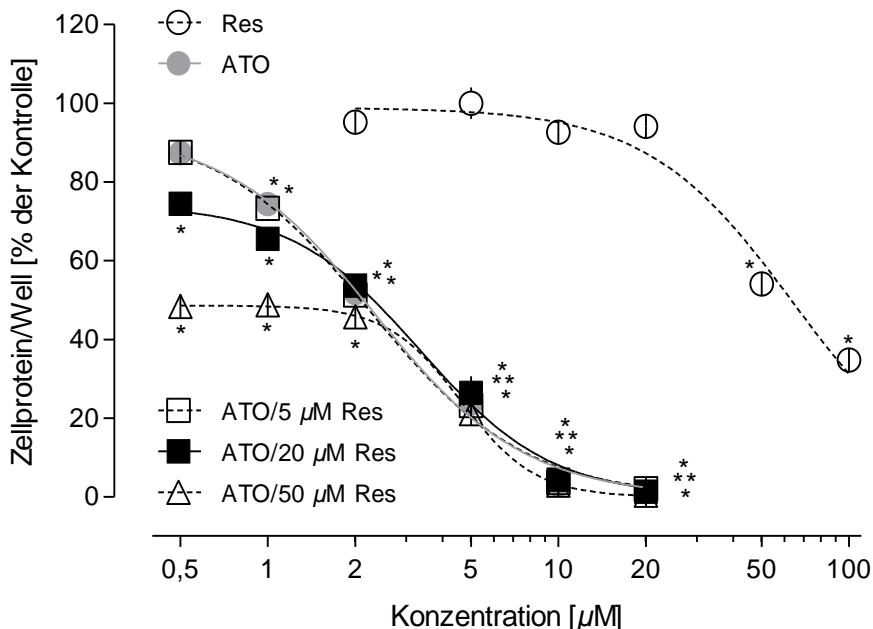
\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-26) sind MW aus n = 3 Experimenten.

\*\* Berechnung des CI-Wertes nicht möglich (vgl. Abb. 4-25).

Zusammengefasst: Kombinationen von ATO und Resveratrol wirken schwach antagonistisch auf das Wachstum von A-172 Zellen. Resveratrol sensitiviert die Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO also nicht.

### B) U-87 MG Zellen

Abbildung 4-27 zeigt den Einfluss von Resveratrol auf die proliferationshemmende Wirkung von ATO bei U-87 MG Zellen. Wie unter 4.2.2.4 beschrieben, wirkt Resveratrol bei Konzentrationen bis zu 20  $\mu\text{M}$  nicht proliferationshemmend. 50 bzw. 100  $\mu\text{M}$  führen dann aber zu einer deutlichen Hemmung des Wachstums. Eine Ko-Exposition mit 5  $\mu\text{M}$  Resveratrol beeinflusst die Lage der ATO-Kurve nicht. In Anwesenheit höherer Resveratrol-Konzentrationen verläuft die Kurve dagegen zunehmend flacher. Während 0,5  $\mu\text{M}$  ATO allein beispielsweise eine Verminderung des Wachstums um 15% bewirken, steigt diese in Anwesenheit von 20 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol auf 25% bzw. 55%. Bei Konzentrationen, die höher sind als 1  $\mu\text{M}$  ATO nähern sich die Kombinations-Kurven zunehmend der ATO-Kurve an.

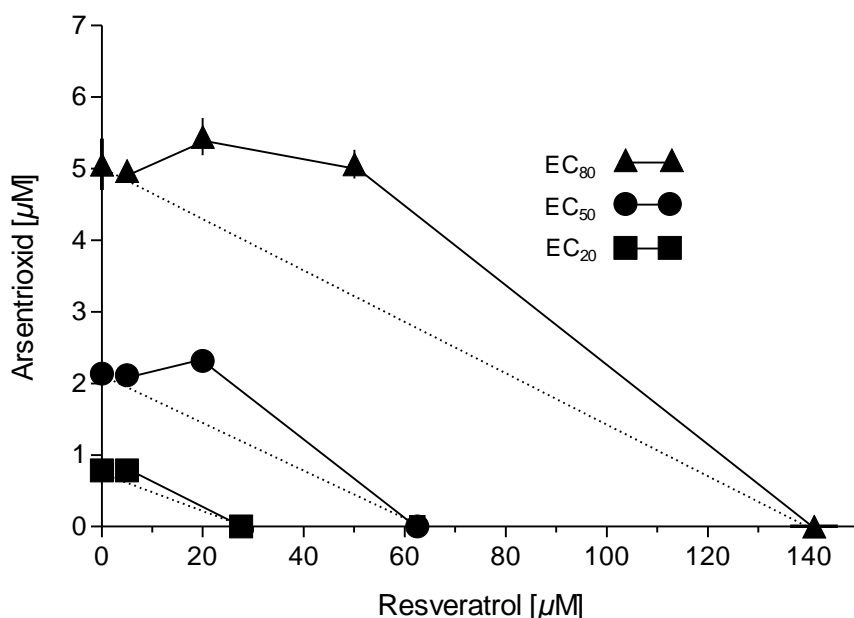


**Abbildung 4-27: Einfluss von Resveratrol auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsenitrioxid bei U-87 MG Zellen**

U-87 MG Zellen wurden mit ATO, Resveratrol und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 72 h erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Gezeigt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

Aus der isobographischen Darstellung (vgl. Abb. 4-28) leitet sich für ATO und Resveratrol bei allen zugrunde gelegten Effektniveaus eine antagonistische Kombinationswirkung ab. Die  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte der Mischungen beider Agentien generieren konvex verlaufende Isobolen. Wie bei A-172 Zellen tritt das höchste Ausmaß an Antagonismus im Bereich „mittlerer“ Konzentrationen beider Substanzen auf. Auch hier

ist außerdem keine offensichtliche Verminderung der ATO-Wirkung durch Resveratrol zu erkennen (vgl. Abb. 4-27). Es liegt also erneut ein „untypischer“ Antagonismus vor. Die berechneten CI-Werte (vgl. Tab. 4-8) deuten numerisch formal weiterhin auf schwach antagonistische Effekte hin.



**Abbildung 4-28: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Resveratrol auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Aus den nach 72 h Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, Resveratrol und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-27) wurden die jeweiligen  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die gepunktete Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  Experimenten.

**Tabelle 4-8: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Resveratrol auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Kombination	CI ( $EC_{20}$ )	CI ( $EC_{50}$ )	CI ( $EC_{80}$ )
ATO + 5 $\mu$ M Resveratrol	1,19	1,07	1,02
ATO + 20 $\mu$ M Resveratrol	-**	1,40	1,22
ATO + 50 $\mu$ M Resveratrol	-**	-**	1,36

\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-28) sind MW aus  $n = 3$  Experimenten.

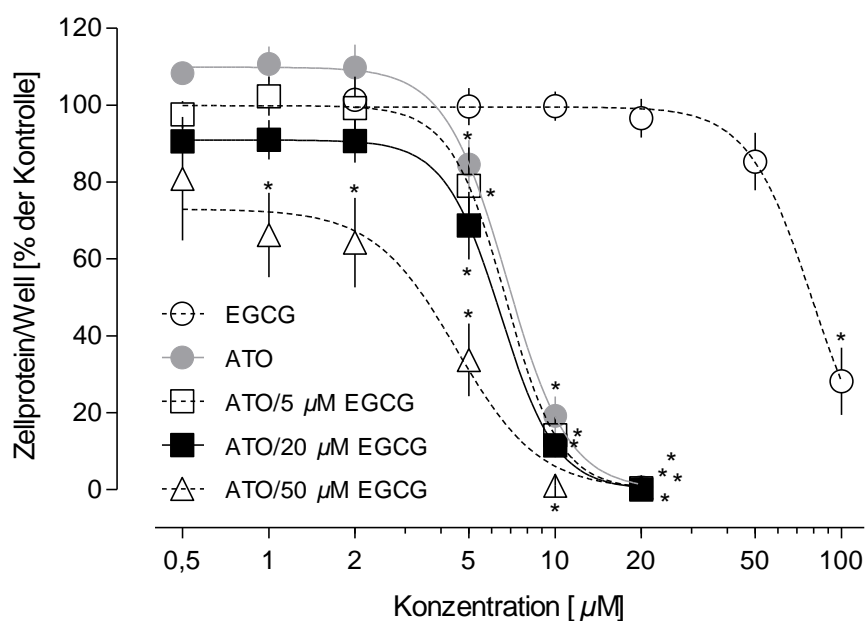
\*\* Bestimmung der CI-Werte nicht möglich (vgl. Abb. 4-27).

Zusammengefasst: Kombinationen von ATO mit Resveratrol wirken, unabhängig vom betrachteten Effektniveau, schwach antagonistisch auf das Wachstum von U-87 MG Zellen. Die Zellen werden durch Resveratrol also nicht für die proliferationshemmende Wirkung von ATO sensitiviert.

#### 4.2.3.5 Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat

##### A) A-172 Zellen

Abbildung 4-29 verdeutlicht den Einfluss von EGCG auf die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf A-172 Zellen. Wie unter 4.2.2.5 beschrieben, hemmt EGCG ab 50  $\mu\text{M}$  reproduzierbar das Wachstum von A-172 Zellen. Bei einer Ko-Exposition führt EGCG bei allen eingesetzten Konzentrationen zu einer Verlagerung der ATO-Kurve nach links unten. Während ATO im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 2  $\mu\text{M}$  beispielsweise zu einer Steigerung der Proliferation bei A-172 Zellen führt, wird dieser Effekt in Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  EGCG komplett unterbunden. In Kombination mit 20  $\mu\text{M}$  EGCG tritt im Bereich zwischen 0,5 und 2  $\mu\text{M}$  ATO eine Hemmung des Zellwachstums von ca. 10% auf. In Kombination mit 50  $\mu\text{M}$  EGCG steigt die Hemmung auf 20% (0,5  $\mu\text{M}$  ATO) bis 36% (2  $\mu\text{M}$  ATO).



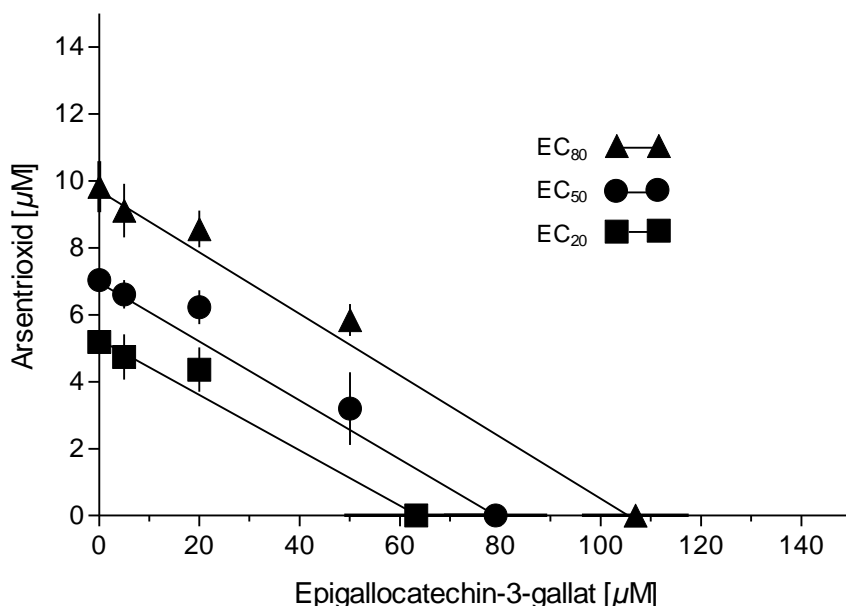
**Abbildung 4-29: Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen**

A-172 Zellen wurden mit ATO, EGCG und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 72 h erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteinanteils in % der Kontrolle (= 100%) aus  $n = 3$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

In Abbildung 4-30 ist das Isobologramm und in Tabelle 4-9 die berechneten CI-Werte zur Bewertung der Kombinationswirkung von ATO und EGCG auf A-172 Zellen zu sehen. Unter Berücksichtigung der Streuung der Ergebnisse leitet sich für alle betrachteten Effektniveaus eine additive Kombinationswirkung für ATO und EGCG ab. Bei der



isobographischen Darstellung generieren die  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte der Mischungen beider Agentien gerade Isobolen. Sie weichen damit nicht vom Konzept der Konzentrationsadditivität ab. Entsprechend geben auch die CI-Werte Hinweis auf eine additive Wirkung (vgl. 3.3).



**Abbildung 4-30: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, EGCG und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-29) wurden die jeweiligen  $EC_{20}$ -,  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Dargestellt sind die  $MW \pm SEM$  aus  $n = 3$  Experimenten.

**Tabelle 4-9: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf das Wachstum von A-172 Zellen**

Kombination	CI ( $EC_{20}$ )	CI ( $EC_{50}$ )	CI ( $EC_{80}$ )
ATO + 5 $\mu\text{M}$ EGCG	0,99	1,00	0,97
ATO + 20 $\mu\text{M}$ EGCG	1,16	1,14	1,06
ATO + 50 $\mu\text{M}$ EGCG	-**	1,09	1,06

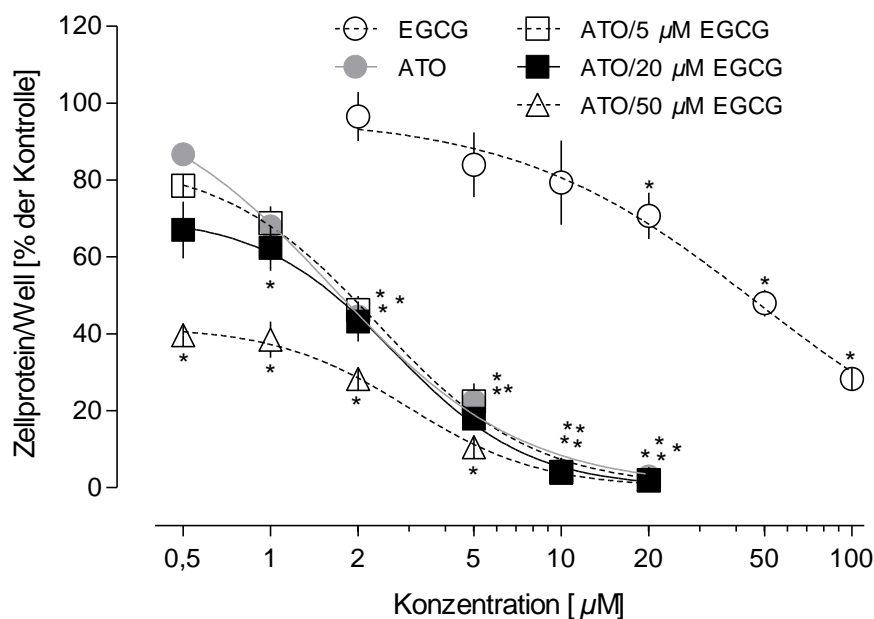
\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-30) sind  $MW$  aus  $n = 3$  Experimenten.

\*\* Berechnung des CI-Wertes nicht möglich (vgl. Abb. 4-29).

Zusammengefasst: Unabhängig vom zugrunde gelegten Effektniveau wirken Kombinationen von ATO und EGCG additiv auf das Wachstum von A-172 Zellen. EGCG sensibilisiert die Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO also nicht.

### B) U-87 MG Zellen

In Abbildung 4-31 ist der Einfluss von EGCG auf die proliferationshemmende Wirkung von ATO bei U-87 MG Zellen dargestellt. Wie unter 4.2.2.5 bereits beschrieben, führt EGCG ab 5  $\mu\text{M}$  reproduzierbar zu einer Hemmung des Wachstums bei U-87 MG Zellen ( $\sim 15\%$ ). In Kombination mit 5 bzw. 20  $\mu\text{M}$  EGCG findet eine Linksverschiebung der ATO-Kurve lediglich bei der niedrigsten ATO-Konzentration statt. Während 0,5  $\mu\text{M}$  ATO allein das Wachstum der Zellen um ca. 15% vermindern, steigt dieser Wert in Anwesenheit von EGCG auf 20% bzw. 30%. Ab 1  $\mu\text{M}$  ATO nähern sich die beiden Kombinationskurven allerdings der ATO-Kurve. 50  $\mu\text{M}$  EGCG induzieren eine deutliche Verlagerung der gesamten ATO-Kurve nach links. Auch hier ist der Effekt aber bei niedrigeren ATO-Konzentrationen stärker ausgeprägt. Mit anderen Worten: Die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven nimmt in Anwesenheit von EGCG ab.

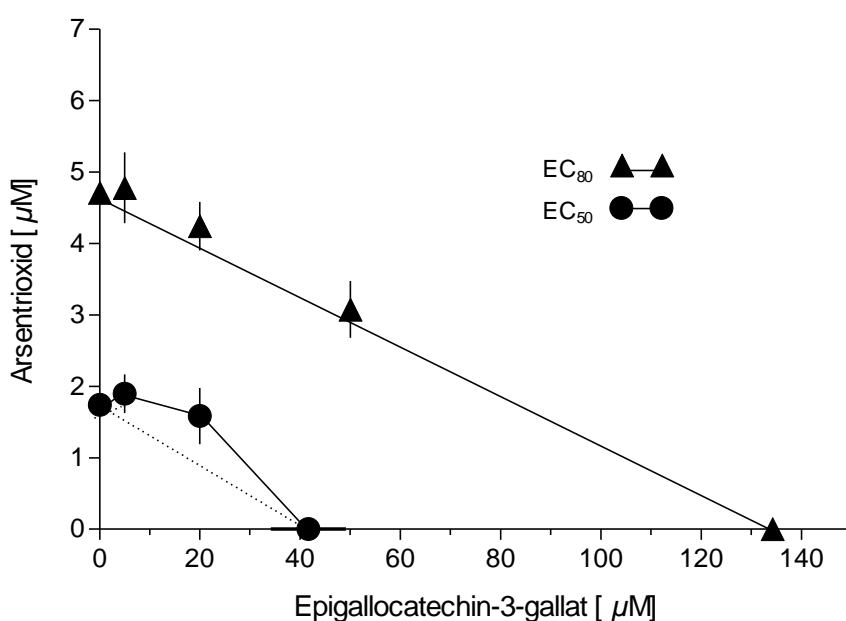


**Abbildung 4-31: Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen**

U-87 MG Zellen wurden über 72 h mit ATO, EGCG und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien behandelt. Im Anschluss erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen Zellproteingehalts in % der Kontrolle (= 100%) aus  $n = 3$  Versuchen und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

In Abbildung 4-32 und in Tabelle 4-10 sind die Ergebnisse zur Bewertung der Kombinationswirkung von ATO und EGCG auf U-87 MG Zellen dargestellt.  $EC_{20}$ -Werte können zur Analyse nicht herangezogen werden, da bei Kombination von ATO und EGCG bereits eine mehr als 20%-ige Wachstumshemmung auftritt. Bei den  $EC_{50}$ -Werten zeigt

sich eine antagonistische Kombinationswirkung. Die  $EC_{50}$ -Werte der Mischungen von ATO und EGCG generieren eine konvex verlaufende Isobole. Die berechneten CI ( $EC_{50}$ )-Werte deuten numerisch formal auf einen schwachen Effekt hin (vgl. 3.3). Bei der Betrachtung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven ist keine offensichtliche Verminderung der ATO-Wirkung durch EGCG zu erkennen (vgl. Abb. 4-31). Es handelt sich damit auch hier um einen „untypischen“ Antagonismus, ein Phänomen, das bereits bei Curcumin beschrieben wurde (vgl. 4.2.3.3). Bei den  $EC_{80}$ -Werten ist die Kombinationswirkung von ATO und EGCG additiv. Die  $EC_{80}$ -Werte ihrer Mischungen bilden eine gerade Isobole und weichen damit nicht vom Konzept der Konzentrationsadditivität ab.



**Abbildung 4-32: Isobologramm zur Bewertung der Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Aus den nach einer 72 h-Exposition erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für ATO, EGCG und ihre Kombinationen (vgl. Abb. 4-31) wurden die jeweiligen  $EC_{50}$ - und  $EC_{80}$ -Werte abgeleitet und es wurde ein Isobologramm erstellt (vgl. 3.3). Die gepunktete Verbindung der äquieffektiven Konzentrationen der Einzelsubstanzen entspricht der Isobole bei Konzentrationsadditivität. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM aus n = 3 Experimenten.

**Tabelle 4-10: Kombinationsindizes (CI)\* zur Bewertung der Wirkung von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf das Wachstum von U-87 MG Zellen**

Kombination	CI ( $EC_{20}$ )	CI ( $EC_{50}$ )	CI ( $EC_{80}$ )
ATO + 5 $\mu\text{M}$ EGCG	-**	1,21	1,06
ATO + 20 $\mu\text{M}$ EGCG	-**	1,39	1,06
ATO + 50 $\mu\text{M}$ EGCG	-**	-**	1,06

\* Die CI-Werte (berechnet aus EC-Werten der Abb. 4-32) sind MW aus n = 3 Experimenten.

\*\* Berechnung der CI-Werte nicht möglich (vgl. Abb. 4-31).

Kurz gefasst: Kombinationen von ATO mit EGCG wirken, abhängig vom betrachteten Effektniveau, schwach antagonistisch bzw. additiv auf das Wachstum von U-87 MG Zellen. Eindeutig ist, dass EGCG die Zellen nicht für die proliferationshemmende Wirkung von ATO sensitiviert.

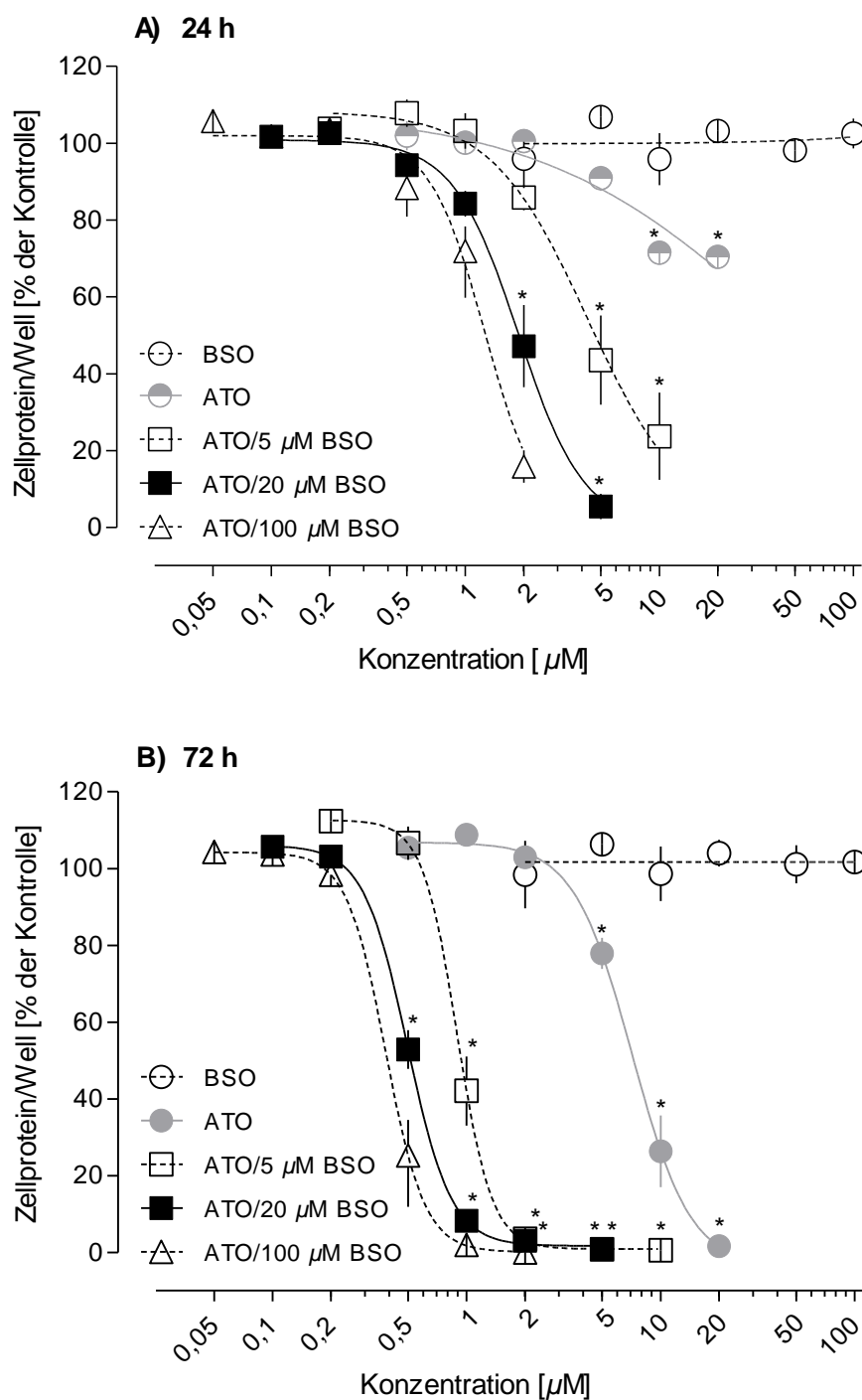
#### 4.2.4 Kombination von Arsentrioxid mit Buthioninsulfoximin

##### A) A-172 Zellen

Anders als die untersuchten pflanzlichen Polyphenole wirkt BSO bei einer Exposition über bis zu 72 h im gesamten getesteten Konzentrationsbereich (2 - 100  $\mu\text{M}$ ) nicht proliferationshemmend auf A-172 Zellen (vgl. Abb. 4-33). Dennoch führt BSO zu einer dramatischen Verstärkung der ATO-Wirkung.

Bei einer Exposition über 24 h hemmt ATO ab 5  $\mu\text{M}$  reproduzierbar das Zellwachstum ( $\sim 10\%$ ). Die höchste eingesetzte Konzentration (20  $\mu\text{M}$  ATO) führt zu einer Hemmung von 30%. In Kombination mit BSO sind schon niedrigere ATO-Konzentrationen wirksam. Bei einer Ko-Exposition mit 5  $\mu\text{M}$  BSO deutet sich bereits ab 2  $\mu\text{M}$  ATO ein Effekt an ( $\sim 15\%$  Wachstumshemmung). In Kombination mit 20  $\mu\text{M}$  BSO wird eine vergleichbare Wirkung ab 1  $\mu\text{M}$  ATO ( $\sim 15\%$ ) und in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  BSO bereits ab 0,5  $\mu\text{M}$  ATO ( $\sim 10\%$ ) erzielt. Die  $\text{EC}_{50}$ -Werte ( $n = 3$ ) für ATO liegen beim gleichzeitigen Einsatz von 5, 20 bzw. 100  $\mu\text{M}$  BSO nach 24 h bei  $5,1 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ,  $2,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$  bzw.  $1,4 \pm 0,04 \mu\text{M}$ . Bei einer 72 h-Behandlung verringert ATO ebenfalls erst ab 5  $\mu\text{M}$  die Proliferationsrate von A-172 Zellen. Hierbei nimmt der Zellproteingehalt pro Well um ca. 20% ab. In Anwesenheit von BSO wird die ATO-Kurve deutlich nach links verschoben. Bereits ab 2  $\mu\text{M}$  ATO sind dabei keine angehefteten Zellen mehr zu finden. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert ( $n = 3$ ) für ATO ( $9,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ) sinkt auf  $0,98 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ,  $0,51 \pm 0,02 \mu\text{M}$  bzw.  $0,40 \pm 0,03 \mu\text{M}$ , wenn man A-172 Zellen gleichzeitig mit 5, 20 bzw. 100  $\mu\text{M}$  BSO behandelt. Somit verstärkt BSO die proliferationshemmende Wirkung von ATO nach 72 h um das 9-, 18- bzw. 22-fache.

Die Bewertung der Kombinationswirkung von ATO und BSO auf A-172 Zellen mittels der Isobologramm- und der Kombinationsindex-Methode ist aufgrund der fehlenden Zytotoxizität von BSO nicht möglich. Wegen dieser fehlenden Zytotoxizität und der gleichzeitigen Fähigkeit von BSO zur Verstärkung der ATO-Wirkung ist die Kombinationswirkung der Agentien bei unterschiedlichen Konzentrationen aber als synergistisch zu werten.



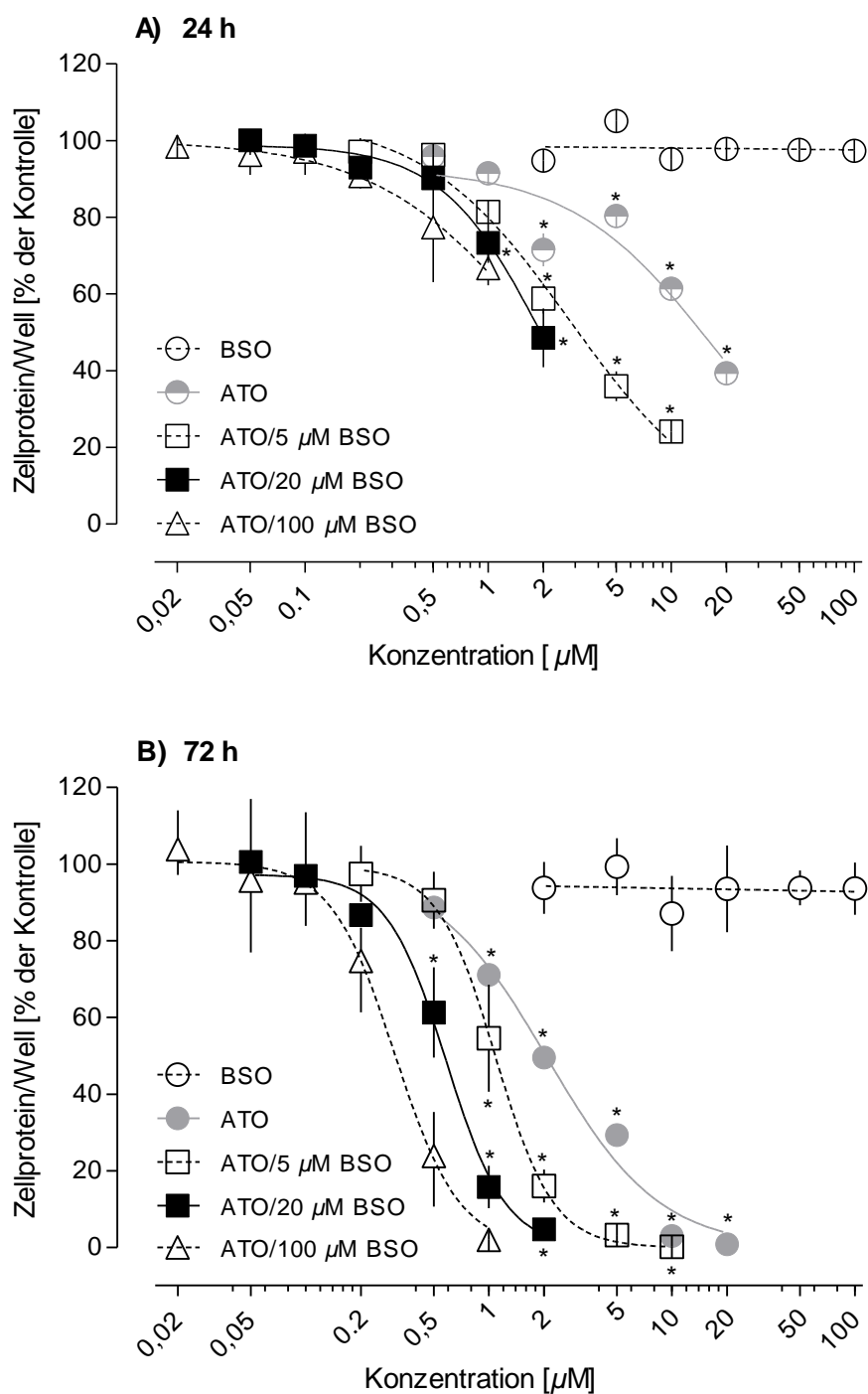
**Abbildung 4-33: Einfluss von Buthioninsulfoximin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei A-172 Zellen**

A-172 Zellen wurden mit ATO, BSO und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 24 h **(A)** und 72 h **(B)** erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt ist der gemessene Zellproteingehalt in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. Die Ergebnisse sind mit Ausnahme der Kombination 2  $\mu\text{M}$  ATO/100  $\mu\text{M}$  BSO ( $n = 2$ ; MW + Spannweite) als MW  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  Experimenten angegeben. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

### B) U-87 MG Zellen

Wie bei A-172 Zellen zeigt BSO auch bei U-87 MG Zellen keine Wirkung auf das Wachstum (vgl. Abb. 4-34), es verstärkt aber deutlich den ATO-Effekt. Bei einer Exposition über 24 h hat ATO einen  $EC_{50}$ -Wert ( $n = 3$ ) von  $14,5 \pm 1,5 \mu\text{M}$ . In Anwesenheit von 5 bzw. 20  $\mu\text{M}$  BSO verringert sich dieser Wert auf  $3,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$  bzw. auf  $2,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$  ATO. In Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  BSO ist die höchste, gleichzeitig eingesetzte ATO-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nicht ausreichend um eine 50%-ige Wachstumshemmung zu erzielen. Die Abnahme des Zellproteingehalts pro Well beträgt hier ca. 30%. Nach einer 72 h-Ko-Behandlung sind bei dieser Expositionsbedingung dagegen keine angehefteten Zellen mehr zu finden. Der  $EC_{50}$ -Wert von ATO ( $2,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ) sinkt bei gleichzeitigem Einsatz von BSO auf  $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$  (+ 5  $\mu\text{M}$  BSO),  $0,59 \pm 0,10 \mu\text{M}$  (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw.  $0,32 \pm 0,05 \mu\text{M}$  (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO). BSO erhöht die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf U-87 MG Zellen nach 72 h damit um mehr als das 2-, 4- bzw. 8-fache.

Die Bewertung der Kombinationswirkung von ATO und BSO mittels der Isobologramm- sowie der Kombinationsindex-Methode ist auch bei U-87 MG Zellen nicht möglich. Die Kombinationswirkung der beiden Agentien ist wegen der einerseits fehlenden BSO-Zytotoxizität und der andererseits hervorgerufenen Verstärkung der ATO-Wirkung aber auch hier als synergistisch zu werten.

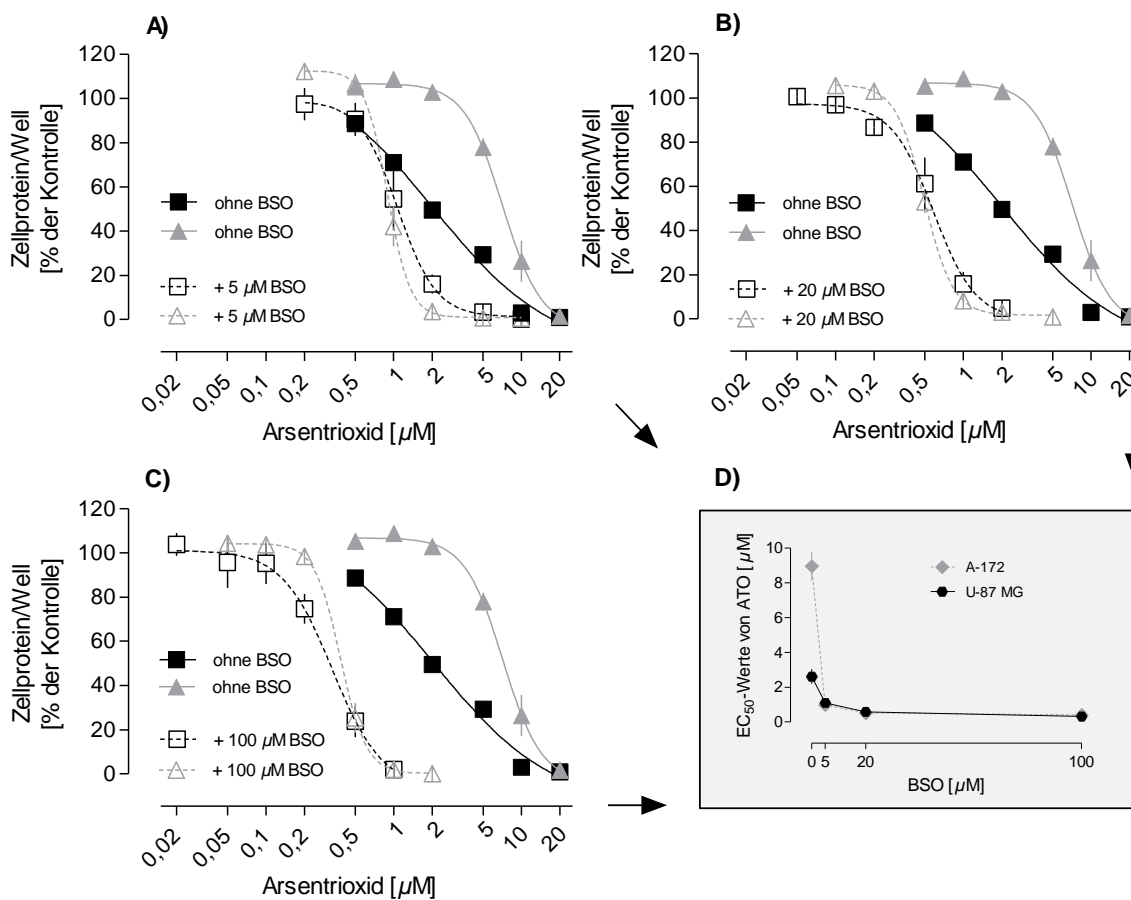


**Abbildung 4-34: Einfluss von Buthioninsulfoximin auf die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid bei U-87 MG Zellen**

U-87 MG Zellen wurden mit ATO, BSO und verschiedenen Kombinationen aus beiden Agentien exponiert. Nach 24 h **(A)** bzw. 72 h **(B)** erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). Dargestellt ist der gemessene Zellproteingehalt in % der Kontrolle (= 100%) und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. Die Ergebnisse sind mit Ausnahme der Kombination 1  $\mu\text{M}$  ATO/100  $\mu\text{M}$  BSO ( $n = 2$ ; MW + Spannweite) als MW  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  Experimenten angegeben. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnett's multiple comparison test*).

C) Vergleich der proliferationshemmenden Wirkung von Arsentrioxid auf A-172 und U-87 MG Zellen in Anwesenheit von Buthioninsulfoximin

Abbildung 4-35 stellt die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf A-172 und U-87 MG Zellen bei gleichzeitigem Einsatz von BSO nach einer Exposition über 72 h gegenüber. Zur besseren Übersichtlichkeit sind unter A) bis C) die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von ATO allein und in Anwesenheit von jeweils einer BSO-Konzentration gezeigt. Unter D) sind weiterhin die  $EC_{50}$ -Werte für ATO in Abhängigkeit von der gleichzeitig verwendeten BSO-Konzentration zu sehen.



**Abbildung 4-35: Vergleich der proliferationshemmenden Wirkung von Arsentrioxid auf A-172 und U-87 MG Zellen in Anwesenheit von Buthioninsulfoximin**

A-172 (Dreiecke) und U-87 MG Zellen (Quadrate) wurden mit ATO allein und in Kombination mit 5 µM BSO (A), 20 µM BSO (B) bzw. 100 µM BSO (C) exponiert. Nach 72 h erfolgte eine Proteinbestimmung (vgl. 3.2). (A - C) **Konzentrations-Wirkungs-Kurven:** Gezeigt ist der gemessene Zellproteinengehalt in % der Kontrolle (= 100%) als MW ± SEM, wenn n > 2 Experimente und die Anpassung mittels einer Hill-Funktion. (D) **Abhängigkeit der wachstumshemmenden Potenz von ATO ( $EC_{50}$ -Werte) von der BSO-Konzentration:** Dargestellt sind die  $EC_{50}$ -Werte (MW ± SEM; n = 3) von ATO mit/ohne BSO bei A-172 und U-87 MG Zellen, welche aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Abbildungen A - C abgeleitet wurden.



Die untersuchten Zelllinien weisen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Sensitivität für ATO auf. U-87 MG Zellen sind mit einem  $EC_{50}$ -Wert ( $n = 3$ ) von  $2,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$  deutlich empfindlicher für ATO als A-172 Zellen ( $EC_{50}$ -Wert:  $9,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ). BSO führt bei beiden Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Verschiebung der ATO-Kurve nach links. Interessanterweise wird die Empfindlichkeit von A-172 und U-87 MG Zellen für ATO durch BSO angeglichen. In Abhängigkeit von der verwendeten BSO-Konzentration werden die beiden ATO-Kurven jeweils auf das gleiche Niveau verschoben. Die  $EC_{50}$ -Werte für ATO, welche sich bei gleichzeitiger Inkubation mit BSO ergeben, sind bei beiden Zelllinien nahezu identisch.

### 4.3 Bestimmung der intrazellulären Radikalbildung

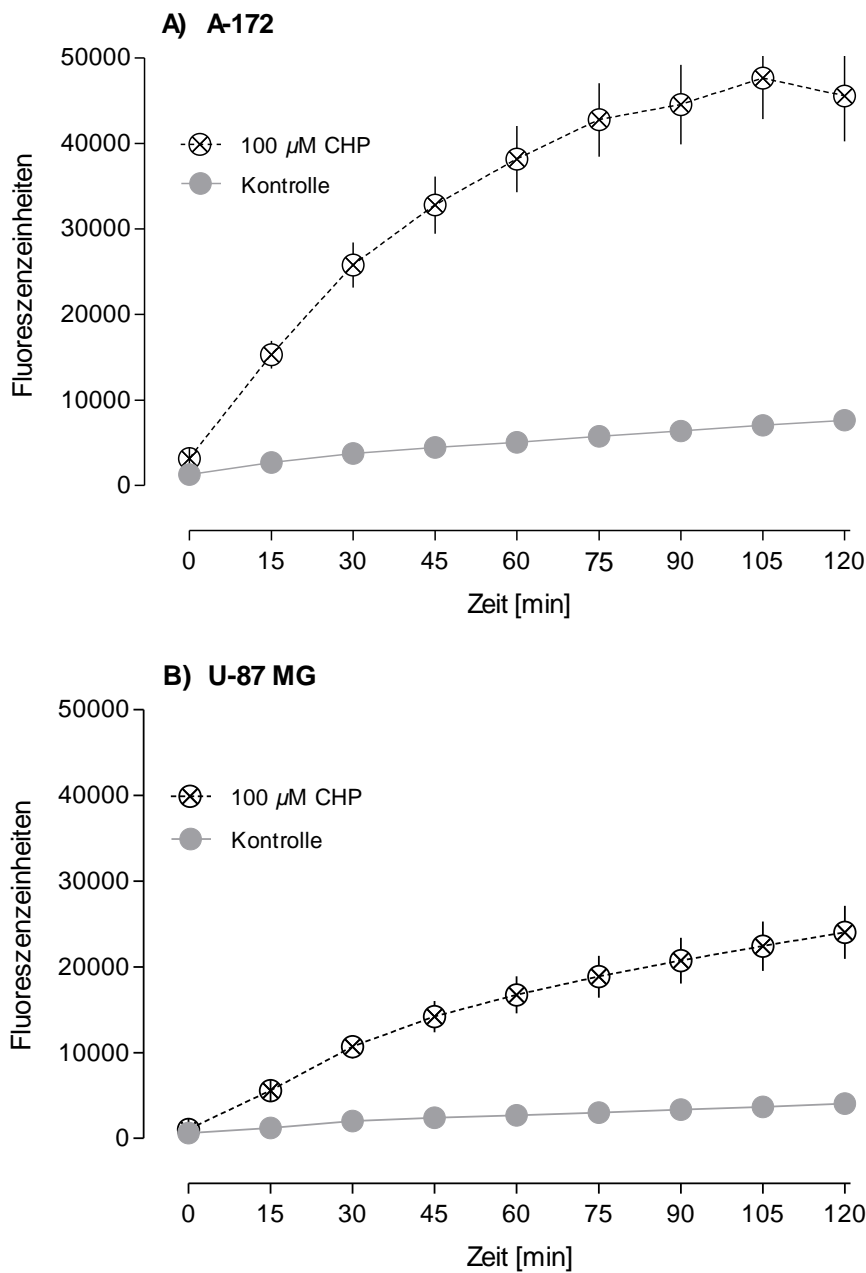
Bei der Vermittlung der zytotoxischen ATO-Wirkung soll die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und damit die Auslösung von oxidativem Stress eine wichtige Rolle spielen (Sumi *et al.*, 2010; Flora, 2011). Die Induktion der intrazellulären ROS-Bildung gilt zudem als eine wichtige Strategie zur Sensitivierung von Tumorzellen für ATO (Maeda *et al.*, 2001; 2004). Sánchez *et al.* (2008) bzw. (2010) haben z.B. berichtet, dass Genistein und Curcumin die Wirkung von ATO auf die Leukämie-Zelllinie U937 verstärken, indem sie ROS bilden.

In diesem Kapitel wurde daher geprüft, welchen Einfluss ATO, die gewählten pflanzlichen Polyphenole und BSO auf die intrazelluläre ROS-Bildung in A-172 und U-87 MG Zellen haben. Wie im Methodenteil beschrieben (vgl. 3.4), wurden die Zellen dazu für 30 min mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und mit den Testsubstanzen jeweils einzeln und in Kombination exponiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Detektion der erzeugten DCF-Fluoreszenz als Maß für die Entstehung von ROS. Die Messungen fanden in einem Abstand von 15 min über insgesamt 2 h statt. Als Positivkontrolle wurde in allen Versuchen Cumolhydroperoxid (CHP) mitgeführt.

#### 4.3.1 Cumolhydroperoxid

Abbildung 4-36 zeigt die ROS-Bildung über 2 h in den unbehandelten und mit CHP behandelten A-172 und U-87 MG Zellen. In Kulturen, die keiner Exposition unterzogen wurden, findet eine stetige, allerdings geringe, Erhöhung der DCF-Fluoreszenz statt. Diese dürfte Ausdruck der endogenen ROS-Bildung sein. CHP induziert eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals über die Zeit. Nach einer Exposition über 2 h wird bei A-172 Zellen eine DCF-Fluoreszenz von  $45.000 \pm 5.000$  Einheiten und bei U-87 MG Zellen von  $24.000 \pm 3.000$  Einheiten gemessen. Das ist eine Erhöhung des Signals um den Faktor 6 (A-172) bzw. 5 (U-87 MG) im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen. Anders als in den Kontrollzellen ist die Zeitabhängigkeit der ROS-Bildung durch CHP nicht linear. Die Geschwindigkeit nimmt über die Zeit ab.

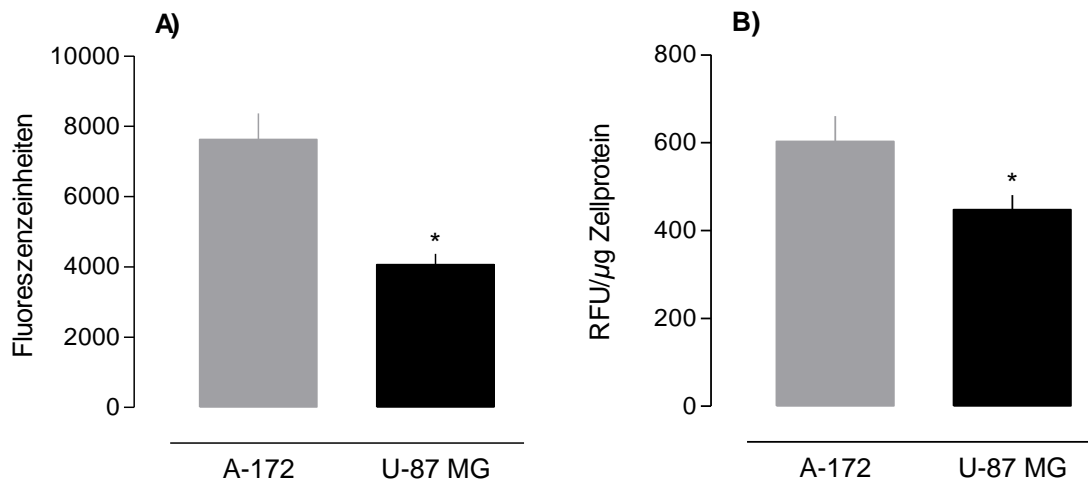
In den Abbildungen des Abschnitts 4.3.4 wurde darauf verzichtet das CHP-Signal darzustellen, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen.



**Abbildung 4-36: Zeitabhängige Radikalbildung durch Cumolhydroperoxid in A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 **(A)** und U-87 MG Zellen **(B)** wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und mit der Positivkontrolle CHP exponiert (vgl. 3.4). Die Messung der DCF-Fluoreszenz erfolgte direkt nach der Exposition in einem Abstand von 15 min über insgesamt 2 h. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des Fluoreszenzsignals aus n = 9 Versuchen.

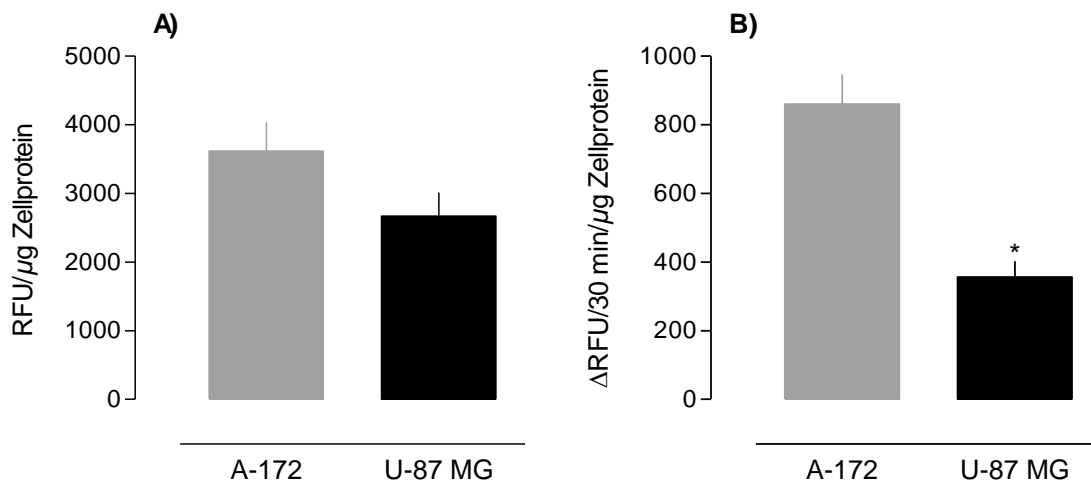
Vergleicht man die untersuchten Zelllinien, so zeigt sich, dass die endogene ROS-Bildung in A-172 Zellen signifikant höher als in U-87 MG Zellen ist (vgl. Abb. 4-37). Nach 2 h ist die DCF-Fluoreszenz in Kulturen von A-172 Zellen um 90% höher als in U-87 MG Zellen. Bezieht man die Messwerte auf den Zellproteingehalt, wird der Unterschied geringer (~ 40%), er bleibt aber signifikant.



**Abbildung 4-37: Vergleich der endogenen Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 und U-87 MG wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen. Die DCF-Fluoreszenz wurde nach der Exposition über insgesamt 2 h erfasst (vgl. 3.4). Gezeigt sind die **(A)** „absoluten“ und **(B)** auf Zellprotein bezogenen, relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU). Die Ergebnisse sind angegeben als MW ± SEM aus n = 9 Versuchen. \**p* < 0,05 vs. A-172 Zellen (t-Test).

Um die Wirkung von CHP in den verwendeten Zelllinien zu vergleichen, wurden zum einen die Messwerte nach 2 h gegenübergestellt (vgl. Abb. 4-38). Bezogen auf den Zellproteingehalt bildet CHP in A-172 Zellen 1,4-mal mehr ROS als in U-87 MG Zellen. Aufgrund der nichtlinearen Zeitabhängigkeit der CHP-Wirkung wurde weiterhin die ROS-Bildungsrate in den ersten 30 min nach der Exposition betrachtet. Pro Minute werden in A-172 Zellen anfangs 2,4-mal so viele ROS durch CHP gebildet wie in U-87 MG Zellen. Der Unterschied zwischen den Zelllinien ist statistisch signifikant. Damit ist die ROS-Bildungsfähigkeit von CHP oder anders ausgedrückt der CHP-induzierte oxidative Stress in A-172 Zellen höher als in U-87 MG Zellen.



**Abbildung 4-38: Vergleich der Cumolhydroperoxid-induzierten Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

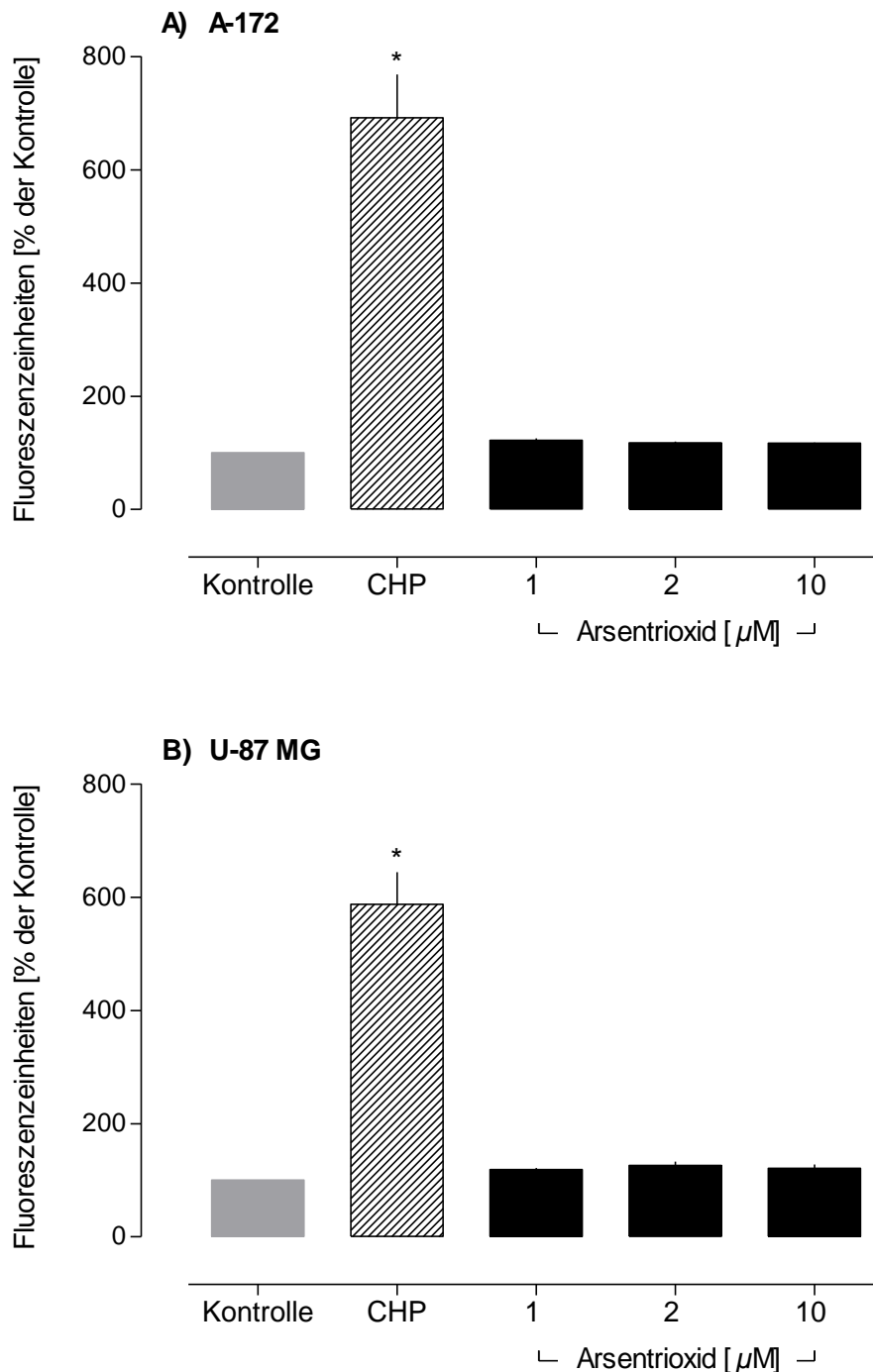
A-172 und U-87 MG Zellen wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und mit 100 µM CHP exponiert (vgl. 3.4). Gezeigt sind **(A)** die relativen, auf Zellprotein bezogenen Fluoreszenzeinheiten, welche nach der Exposition über insgesamt 120 min gemessen wurden und **(B)** die Veränderung der relativen, auf Zellprotein bezogenen Fluoreszenzeinheiten, welche in den ersten 30 min nach der Exposition stattfand. Die Ergebnisse sind angegeben als MW ± SEM aus n = 9 Versuchen. \**p* < 0,05 vs. A-172 Zellen (t-Test).

### 4.3.2 Arsentrioxid

ATO allein ist in den hier dargestellten Versuchen stets in zwei Konzentrationen (2 und 10 µM bzw. 1 und 2 µM) eingesetzt worden (vgl. 4.3.3 und 4.3.4). Diese Konzentrationen wurden gewählt, um zu prüfen, welchen Einfluss ATO auf die intrazelluläre ROS-Bildung in A-172 und U-87 MG Zellen im Bereich unterschiedlicher Proliferationshemmung hat (vgl. 4.2.1). Abbildung 4-39 fasst die Informationen aller Versuche nach einer Exposition über 2 h zusammen.

ATO führt in beiden Zelllinien reproduzierbar zu einem Anstieg der DCF-Fluoreszenz verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Allerdings ist die ROS-Bildung in den ATO-behandelten Kulturen gering. Dies wird deutlich, wenn man den Anstieg des Signals betrachtet, der durch die Positivkontrolle CHP ausgelöst wird. Die Wirkung von CHP ist um den Faktor 6 (A-172) bzw. 5 (U-87 MG) höher als die von ATO. Darüber hinaus ist der Effekt von ATO nicht konzentrationsabhängig. Im Mittel wird im Vergleich zu den Kontrollen eine Erhöhung des DCF-Signals um 20% erreicht. Aufgrund der fehlenden Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und der geringen Effekte kann nicht auf eine durch ATO induzierte ROS-Bildung geschlossen werden. Da der Anstieg des

DCF-Signals in beiden Zelllinien ähnlich groß ist, ist er mit hoher Wahrscheinlichkeit auf methodische Veränderungen zurückzuführen. Welche das sind, ist derzeit unklar.



**Abbildung 4-39: Einfluss von Arsentrioxid auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

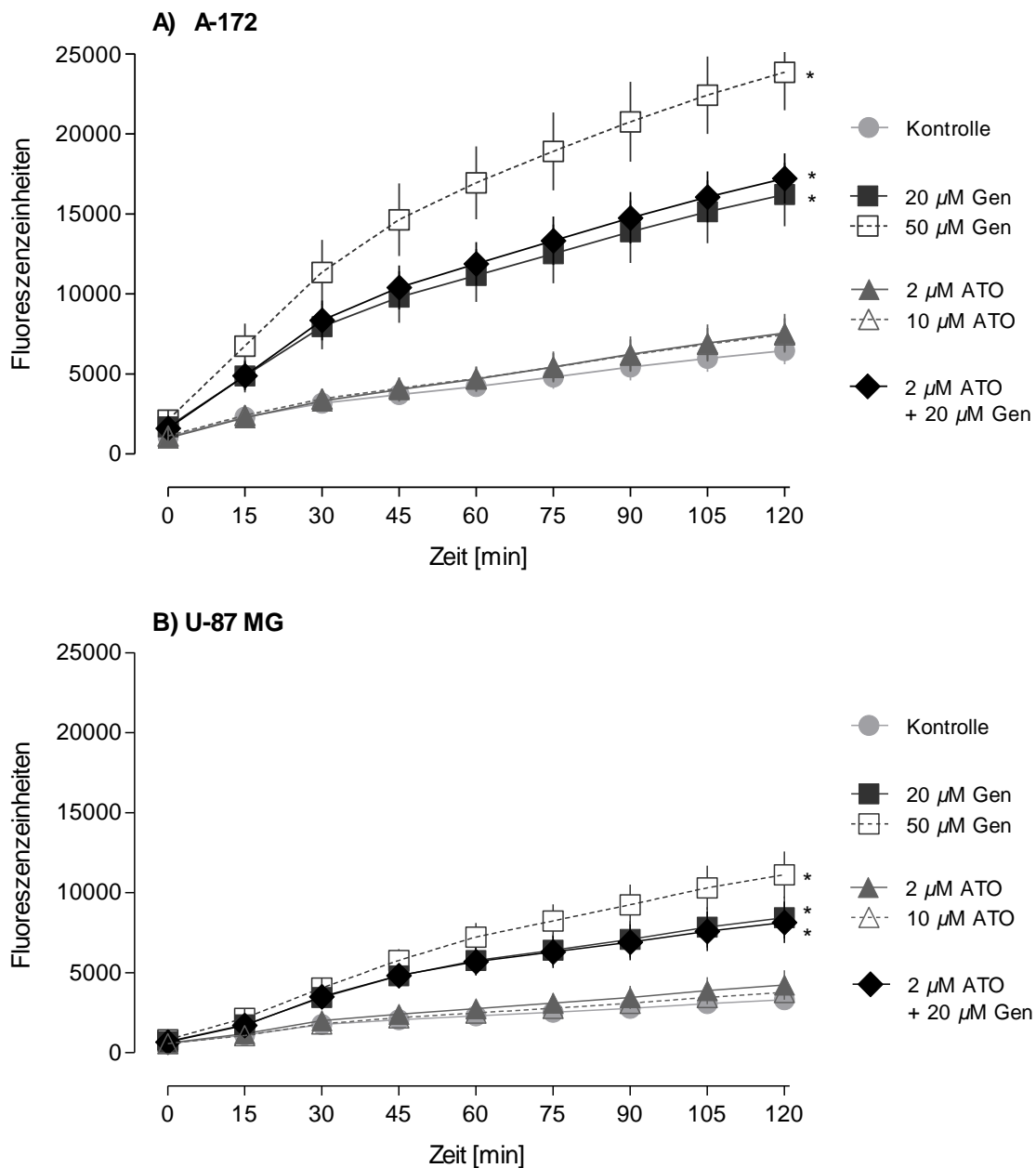
A-172 (**A**) und U-87 MG Zellen (**B**) wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und anschließend mit ATO bzw. der Positivkontrolle CHP (100  $\mu\text{M}$ ) exponiert (vgl. 3.4). Die Messung der DCF-Fluoreszenz erfolgte nach der Exposition über insgesamt 120 min. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des Fluoreszenzsignals in % Kontrolle (= 100%) aus  $n \geq 3$  Versuchen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).

### 4.3.3 Kombination von Arsenitrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen

Die im vorliegenden Abschnitt verwendeten Konzentrationen der pflanzlichen Polyphenole (20 und 50  $\mu\text{M}$ ) orientierten sich an den Proliferationshemmversuchen. Sie wurden gewählt um zu klären, welche Wirkung die Polyphenole auf die intrazelluläre ROS-Bildung in A-172 und U-87 MG Zellen im Bereich unterschiedlicher Wachstumshemmung haben (vgl. 4.2.2). Bei Kombination von ATO mit den Polyphenolen wurden außerdem Konzentrationen ausgesucht, die gemeinsam appliziert keinen vollständigen Zellverlust auslösen (vgl. 4.2.3).

In Abbildung 4-40 ist die Wirkung von ATO und Genistein auf die intrazelluläre ROS-Bildung in A-172 und U-87 MG Zellen gezeigt. Genistein induziert bei beiden Zelllinien eine von der Konzentration und Expositionsdauer abhängige Bildung von ROS. Diese Resultate sind nicht sonderlich überraschend, da ähnliche Effekte schon bei C6 Zellen beobachtet wurden (Rüweler *et al.*, 2008). Bei A-172 Zellen ist die DCF-Fluoreszenz nach 120 min gegenüber der Kontrolle um 150% (20  $\mu\text{M}$  Genistein) bzw. 270% (50  $\mu\text{M}$  Genistein) erhöht. Bei U-87 MG Zellen ist die Erhöhung mit 155% bzw. 240% ähnlich. In Anwesenheit von 2  $\mu\text{M}$  ATO und 20  $\mu\text{M}$  Genistein tritt bei beiden Zelllinien jeweils die durch 20  $\mu\text{M}$  Genistein allein verursachte ROS-Bildung auf. Die Fluoreszenzintensität in den mit ATO und Genistein gleichzeitig behandelten Kulturen weist statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen, aber nicht zur Intensität, welche sich bei der Exposition mit Genistein allein ergibt, auf.

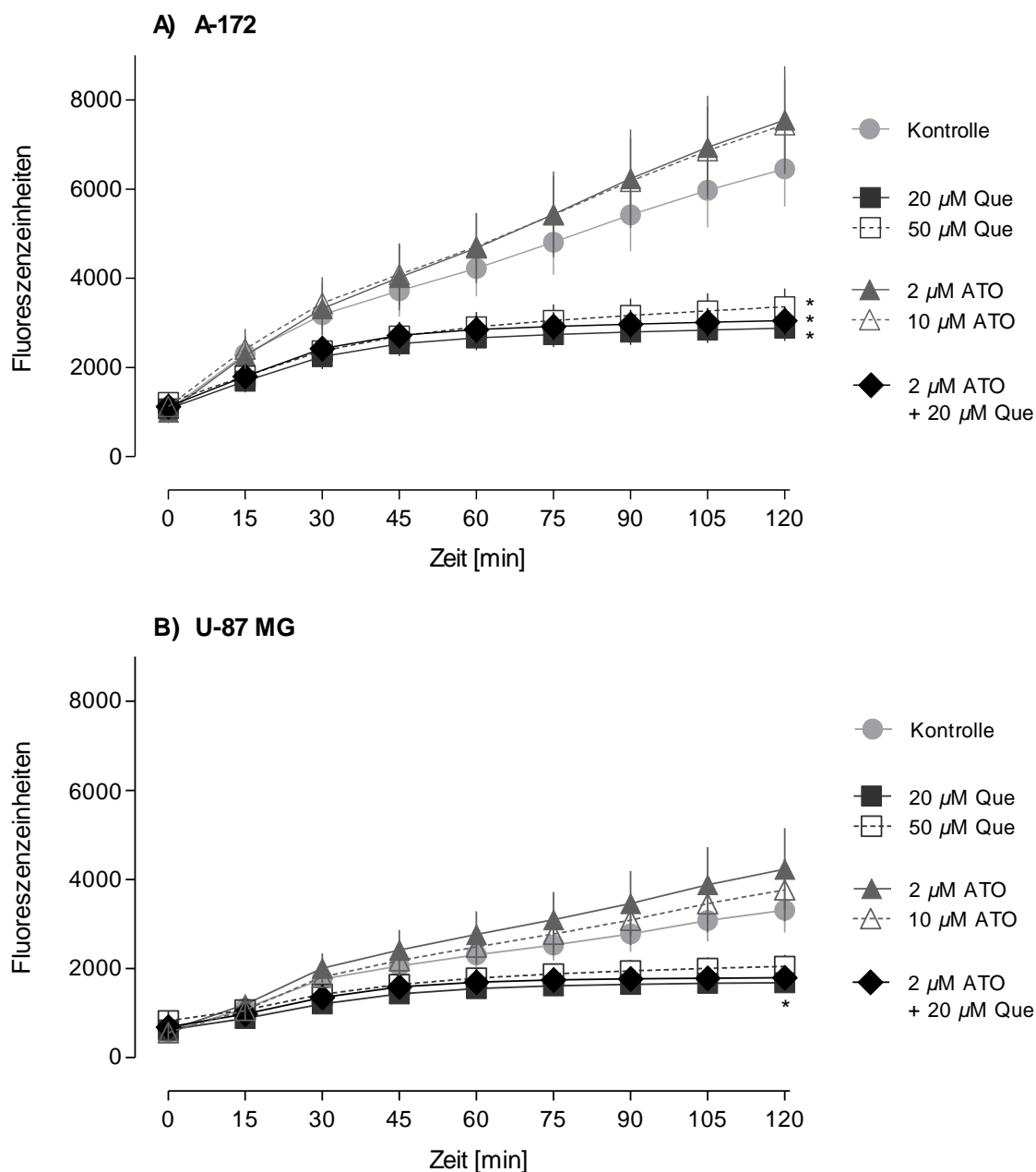
Ganz anders als Genistein löst Quercetin keine Erhöhung der ROS-Bildung aus (vgl. Abb. 4-41). In unbehandelten A-172 und U-87 MG Zellen ist ein leichter Anstieg des Fluoreszenzsignals über die Zeit zu erkennen. Quercetin wirkt diesem Anstieg sogar entgegen - ein Effekt, der darauf beruhen könnte, dass Quercetin Radikale abfängt. Nach einer 60 min-Exposition pendelt sich das Fluoreszenzsignal, welches in den mit Quercetin behandelten Wells detektiert wird, jeweils auf einem Niveau ein und bleibt während der weiteren Messung konstant. Die Hemmung der ROS-Bildung ist in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Quercetin nicht stärker als in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$ . Mit anderen Worten: Die Wirkung von Quercetin ist schon bei 20  $\mu\text{M}$  maximal. Bei gleichzeitigem Einsatz von 2  $\mu\text{M}$  ATO und 20  $\mu\text{M}$  Quercetin tritt bei A-172 und U-87 MG Zellen jeweils die durch Quercetin allein verursachte Verminderung des Fluoreszenzsignals auf. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität in den mit Quercetin allein und in Kombination mit ATO behandelten Kulturen.



**Abbildung 4-40: Einfluss von Arsentrioxid und Genistein auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und mit ATO, Genistein und einer Kombination aus beiden Agentien exponiert (vgl. 3.4). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der DCF-Fluoreszenz über 120 min in einem Intervall von 15 min. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des Fluoreszenzsignals aus n = 3 Versuchen. \**p* < 0,05 vs. Kontrollwert nach 120 min (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).





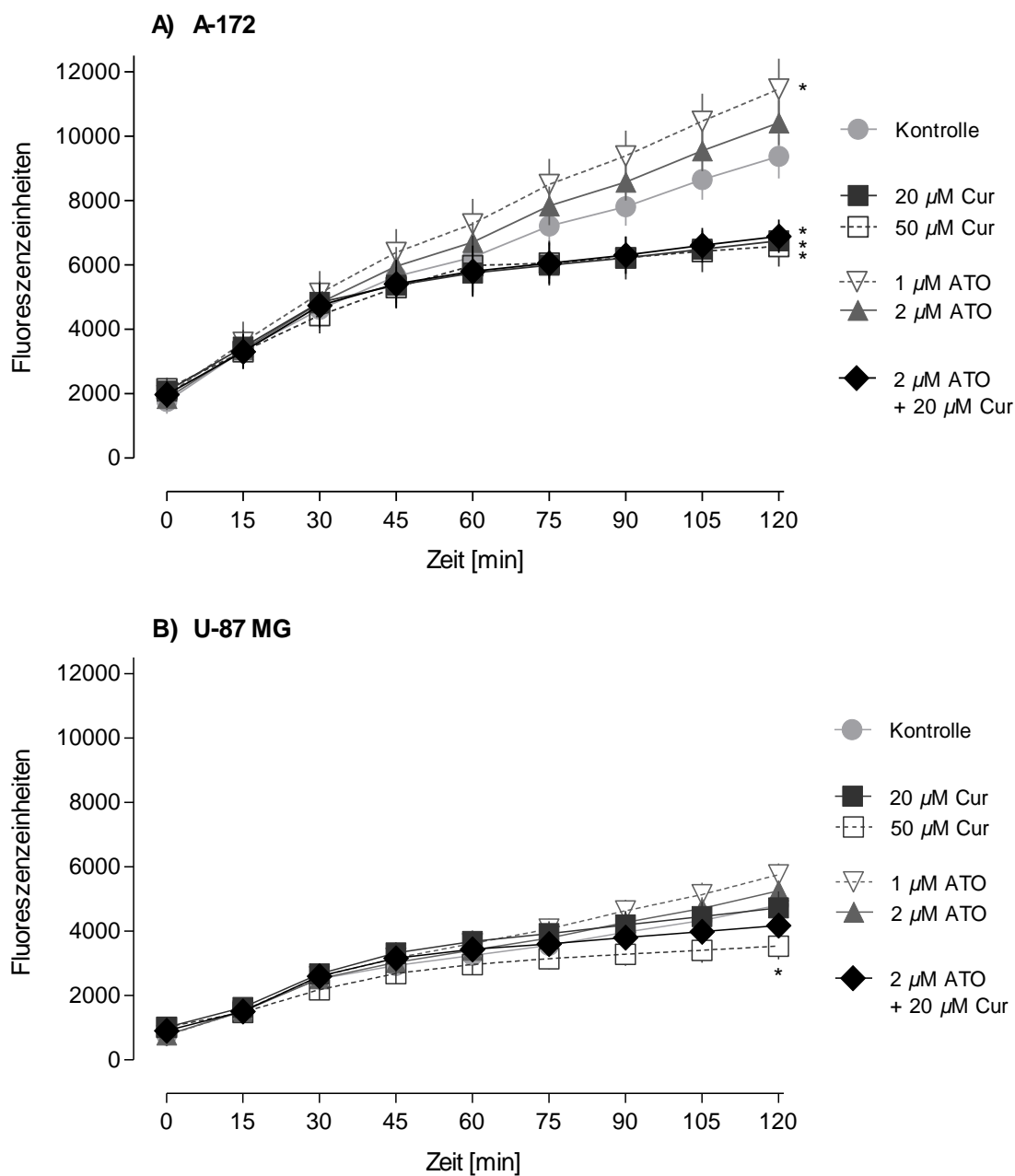
**Abbildung 4-41: Einfluss von Arsentrioxid und Quercetin auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und mit ATO, Quercetin und einer Kombination aus beiden Agentien exponiert (vgl. 3.4). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der DCF-Fluoreszenz über 120 min in einem Intervall von 15 min. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des Fluoreszenzsignals aus n = 3 Versuchen. \**p* < 0,05 vs. Kontrollwert nach 120 min (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).

Die Wirkung von Curcumin und ATO auf die intrazelluläre ROS-Bildung ist in Abbildung 4-42 zu sehen. Bei A-172 Zellen verlaufen die Kurven der mit Curcumin inkubierten Kulturen ab einer Expositionszeit von 45 min zunehmend flacher als die Kontrollkurve. Das ist ein Phänomen, das auch bei Quercetin beobachtet wurde und auf dem Abfangen von ROS beruhen könnte. Die Wirkung von Curcumin ist schon bei 20  $\mu\text{M}$  maximal. Bei U-87 MG Zellen drosselt nur die höhere Curcumin-Konzentration die endogene ROS-Entstehung. Dieser Effekt wird in zunehmendem Zeitverlauf ebenfalls höher. Bei einer gleichzeitigen Behandlung der untersuchten Zelllinien mit 2  $\mu\text{M}$  ATO und 20  $\mu\text{M}$  Curcumin tritt jeweils die durch Curcumin allein verursachte Wirkung auf. In A-172 Zellen ist bei einer Ko-Exposition mit den beiden Agentien also eine Verminderung des Fluoreszenzsignals zu beobachten, während sich das Signal in U-87 MG Zellen nicht von dem der Kontrolle unterscheidet.

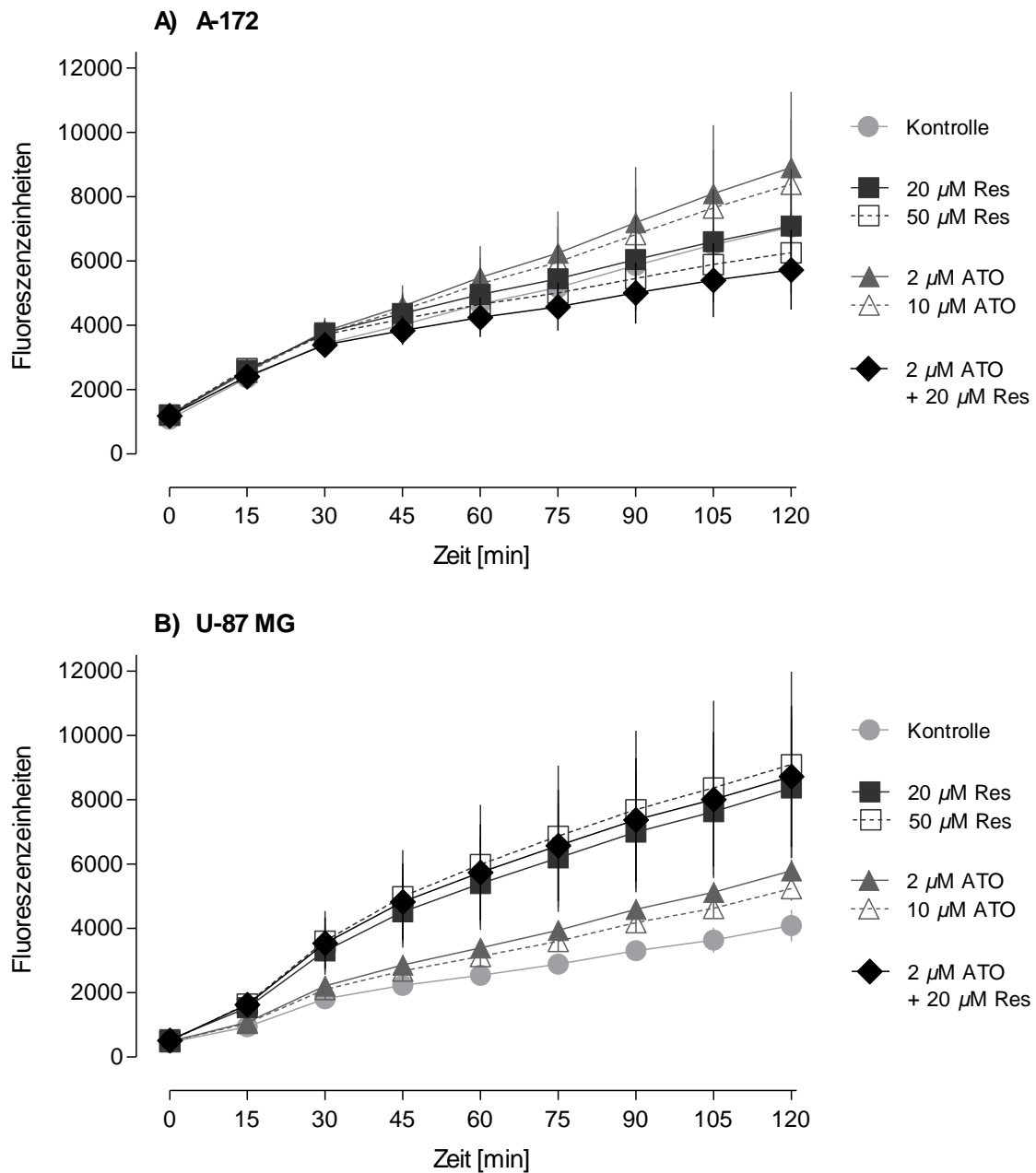
Resveratrol besitzt in A-172 Zellen keinen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Bildung (vgl. Abb. 4-43). Geringfügige Schwankungen zwischen den exponierten Gruppen und der Kontrolle liegen im Rahmen der Messstreuung. Dagegen führt Resveratrol in U-87 MG Zellen ab einer Expositionszeit von 15 min zu einer zunehmenden Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Nach 120 min ist die DCF-Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle im Mittel um mehr als 100% erhöht. Die beobachteten Effekte sind stets reproduzierbar, aber wegen der relativ großen interexperimentellen Variation nicht statistisch signifikant. Bei einer gleichzeitigen Behandlung der untersuchten Zelllinien mit 2  $\mu\text{M}$  ATO und 20  $\mu\text{M}$  Resveratrol liegt das Fluoreszenzsignal in A-172 Zellen unter Berücksichtigung der Streuung im Bereich der Kontrolle. In U-87 MG Zellen tritt die durch Resveratrol allein verursachte ROS-Bildung auf.

EGCG wirkt ähnlich wie Quercetin und Curcumin der endogenen ROS-Bildung in A-172 und U-87 MG Zellen entgegen (vgl. Abb. 4-44). Ab einer Expositionszeit von 45 min pendelt sich das Signal in den mit EGCG inkubierten Kulturen auf einem Level ein und bleibt während der restlichen 75 min konstant. 20  $\mu\text{M}$  EGCG bewirken in beiden Zelllinien eine höhere Drosselung des Signals als 50  $\mu\text{M}$ . Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen nur bei U-87 MG Zellen vor, bestimmt für die Werte nach 120 min-Exposition. Bei A-172 Zellen sind die Effekte stets reproduzierbar, jedoch nicht signifikant. Bei gleichzeitigem Einsatz von 2  $\mu\text{M}$  ATO und 20  $\mu\text{M}$  EGCG ist in beiden Zelllinien jeweils die durch EGCG allein verursachte Verminderung des Fluoreszenzsignals zu erkennen.



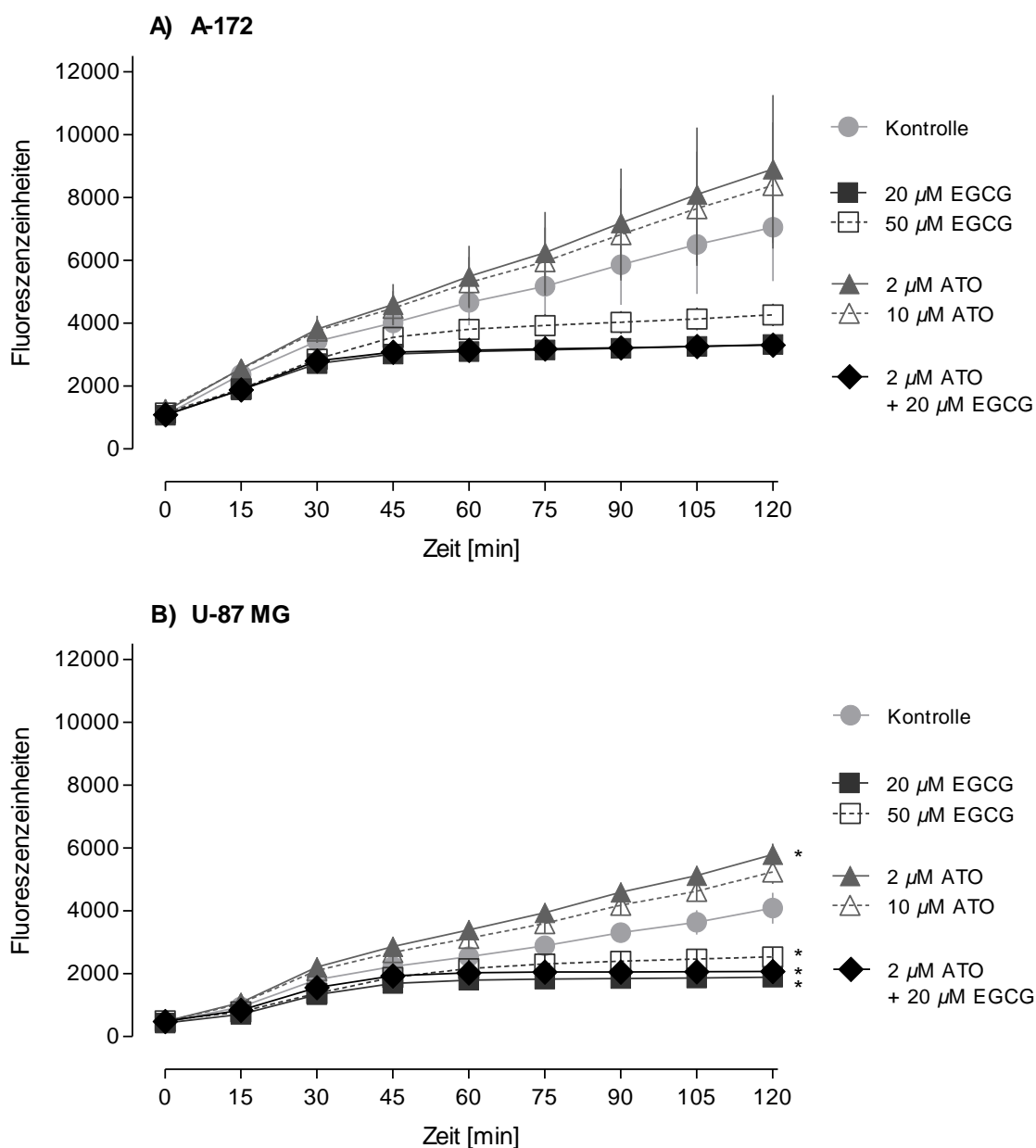
**Abbildung 4-42: Einfluss von Arsentrioxid und Curcumin auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und mit ATO, Curcumin und einer Kombination aus beiden Agentien exponiert (vgl. 3.4). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der DCF-Fluoreszenz über 120 min in einem Intervall von 15 min. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des Fluoreszenzsignals aus n = 3 Versuchen. \**p* < 0,05 vs. Kontrollwert nach 120 min (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).



**Abbildung 4-43: Einfluss von Arsenitrioxid und Resveratrol auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA vorbehandelt und mit ATO, Resveratrol und einer Kombination aus beiden Agentien exponiert (vgl. 3.4). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der DCF-Fluoreszenz über 120 min in einem Intervall von 15 min. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des Fluoreszenzsignals aus n = 3 Versuchen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrollwert nach 120 min (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).

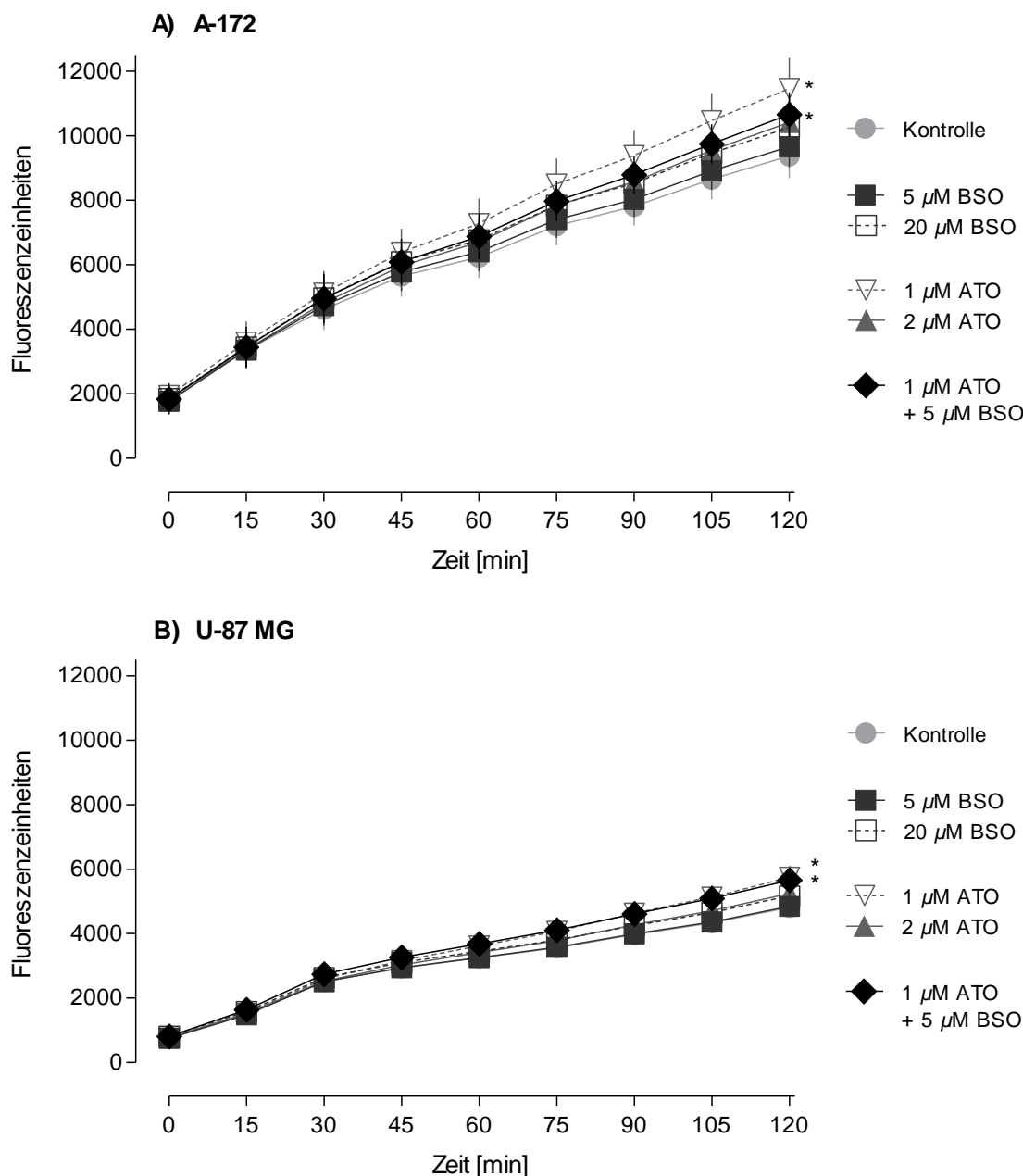


**Abbildung 4-44: Einfluss von Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 (**A**) und U-87 MG Zellen (**B**) wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und mit ATO, EGCG und einer Kombination aus beiden Agentien exponiert (vgl. 3.4). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der DCF-Fluoreszenz über 120 min in einem Intervall von 15 min. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des Fluoreszenzsignals aus n = 3 Versuchen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrollwert nach 120 min (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).

#### 4.3.4 Kombination von Arsentrioxid mit Buthioninsulfoximin

In den Versuchen mit BSO wurde ATO in einer niedrigeren Konzentration getestet als in den Versuchen mit den Polyphenolen. Die gewählte Konzentration ( $1 \mu\text{M}$  ATO) orientierte sich auch hier an den Proliferationshemmversuchen (vgl. 4.2.4). Bei gemein-



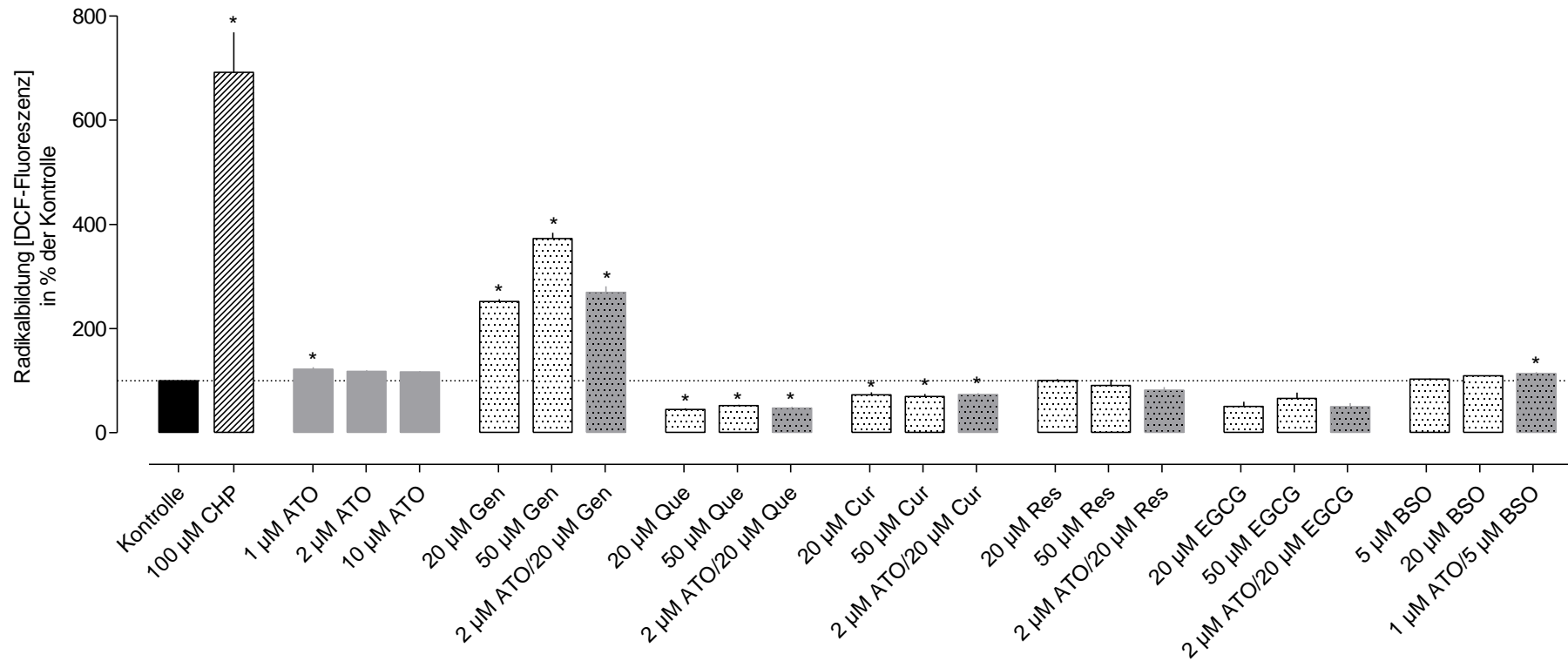
**Abbildung 4-45: Einfluss von Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin auf die Radikalbildung in A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 (**A**) und U-87 MG Zellen (**B**) wurden mit DCFH<sub>2</sub>-DA aufgeladen und mit ATO, BSO und einer Kombination aus beiden Agentien exponiert (vgl. 3.4). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der DCF-Fluoreszenz über 120 min in einem Intervall von 15 min. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des Fluoreszenzsignals aus n = 3 Versuchen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrollwert nach 120 min (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).

samer Applikation mit BSO sollte sie keinen vollständigen Zellverlust auslösen. Wie in Abbildung 4-45 gezeigt, besitzt BSO (5, 20  $\mu\text{M}$ ) keine Wirkung auf die ROS-Bildung in A-172 und U-87 MG Zellen. Bei einer gleichzeitigen Behandlung der Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  BSO und 1  $\mu\text{M}$  ATO entspricht das gemessene Fluoreszenzsignal der Wirkung von ATO allein.

#### 4.3.5 Übersicht über die Ergebnisse

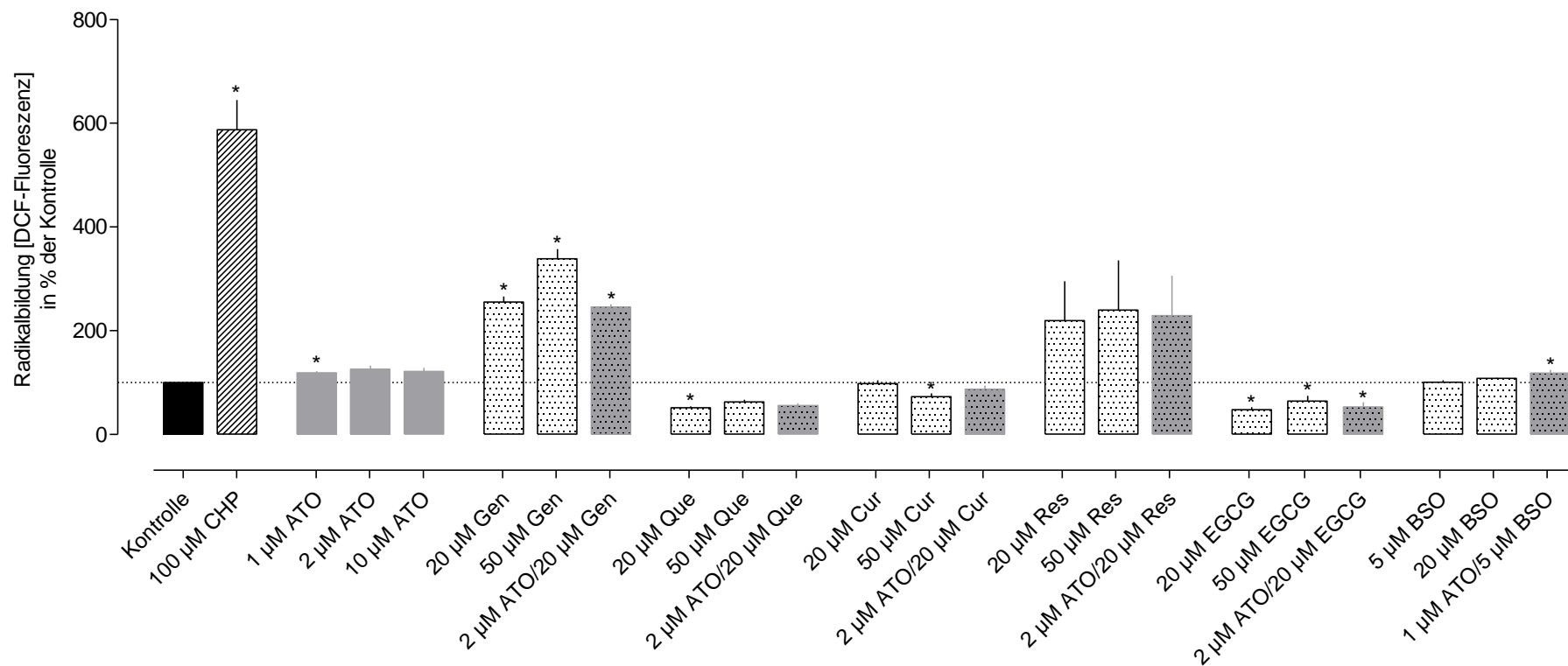
Abbildungen 4-46 und 4-47 geben Übersicht über den Einfluss aller getesteten Substanzen auf die intrazelluläre ROS-Bildung in A-172 und U-87 MG Zellen. Gezeigt ist die DCF-Fluoreszenz in % Kontrolle, welche sich nach 120 min ergibt. ATO führt in beiden Zelllinien zu einem schwachen Anstieg des DCF-Signals. Die Oxidation von  $\text{DCFH}_2$  in den ATO-behandelten Kulturen hängt aber höchstwahrscheinlich mit methodischen Veränderungen zusammen (vgl. 4.3.2), sodass man davon ausgehen kann, dass die proliferationshemmende Wirkung von ATO unabhängig von einer ROS-Bildung auftritt. Die untersuchten pflanzlichen Polyphenole lassen sich in drei Gruppen einteilen: (i) Polyphenole, die zu einer erhöhten ROS-Bildung führen, (ii) Polyphenole, die die endogene ROS-Bildung vermindern, also antioxidativ wirken und (iii) Polyphenole, die keinen Effekt haben. Genistein induziert eine deutliche Erhöhung der ROS-Bildung in beiden Zelllinien. Ob auch Resveratrol in U-87 MG Zellen prooxidativ agiert, ist nicht eindeutig. Aufgrund der großen Streuung kann hier keine Entscheidung getroffen werden. In A-172 Zellen zeigt Resveratrol keinen Effekt. Quercetin, EGCG und Curcumin hemmen die endogene ROS-Bildung. Bei Kombination von ATO mit den Polyphenolen tritt in beiden Zelllinien nur die durch das jeweilige Polyphenol allein verursachte Wirkung auf. Polyphenole, die allein appliziert zu einer erhöhten ROS-Bildung führen, tun dies also auch in Anwesenheit von ATO. Polyphenole, die die endogene ROS-Bildungsrate vermindern, zeigen diesen Effekt ebenfalls bei einer Kombination mit ATO. BSO hat keinen Einfluss auf die ROS-Bildung in A-172 und U-87 MG Zellen. Bei gleichzeitigem Einsatz von ATO und BSO ist jeweils nur der ATO-Effekt zu erkennen.



**Abbildung 4-46: Übersicht über die Radikalbildung in A-172 Zellen in Anwesenheit von Arsentrioxid, verschiedenen pflanzlichen Polyphenolen und Buthioninsulfoximin**

Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM der DCF-Fluoreszenz in % der Kontrolle (= 100%), welche nach der Exposition über 2 h gemessen wurde. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle. Die absoluten Werte stammen aus den Abbildungen der Abschnitte 4.3.1 bis 4.3.4. Weitere Details siehe dort.





**Abbildung 4-47: Übersicht über die Radikalbildung in U-87 MG Zellen in Anwesenheit von Arsentrioxid, verschiedenen pflanzlichen Polyphenolen und Buthioninsulfoximin**

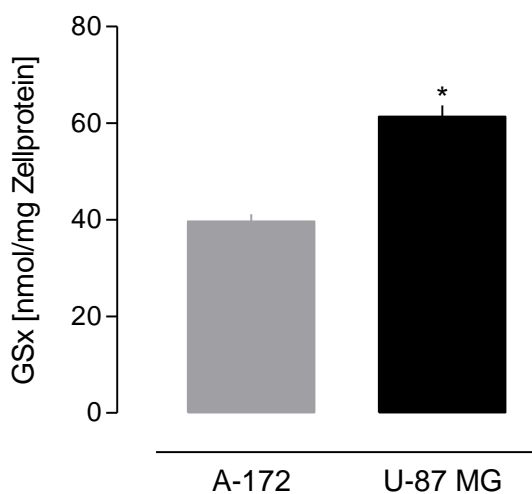
Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM der DCF-Fluoreszenz in % der Kontrolle (= 100%), welche nach der Exposition über 2 h gemessen wurde. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle. Die absoluten Werte stammen aus den Abbildungen der Abschnitte 4.3.1 bis 4.3.4. Weitere Details siehe dort.

#### 4.4 Bestimmung des intrazellulären Glutathiongehalts

Glutathion ist ein Antioxidanz, das eine wichtige Rolle bei der zellulären Abwehr von oxidativem Stress spielt (Dickinson *et al.*, 2002). Die Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel gilt als eine weitere Strategie zur Erhöhung der Empfindlichkeit von Tumorzellen für ATO (Dai *et al.*, 1999). Nach Ramos *et al.* (2008) sensitiviert z.B. Quercetin U937 Zellen für die Wirkung von ATO, indem es die Glutathionspiegel senkt. Einen besonderen Fall stellt in diesem Zusammenhang BSO dar, da es als Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase die Glutathionsynthese spezifisch hemmt.

In diesem Kapitel wurde der Frage nachgegangen, wie ATO, die gewählten Polyphenole und BSO auf den Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen wirken. Die Zellen wurden dazu mit den Testsubstanzen über 24 h exponiert. Hierbei wurden Konzentrationen gewählt, die in den Proliferationshemmversuchen noch keine bzw. nur eine geringe Hemmung des Wachstums nach 24 h gezeigt hatten (vgl. 4.2). Der Gehalt an Gesamtglutathion (GSx) wurde bezogen auf den Proteingehalt der Kulturen mit der unter 3.5 beschriebenen Methode ermittelt.

Abbildung 4-48 zeigt zunächst den GSx-Spiegel, welcher in den unbehandelten Kontrollzellen gemessen wurde. Zu erkennen ist, dass U-87 MG Zellen mit  $61,4 \pm 2,3$  nmol/mg Zellprotein ( $n = 15$ ) einen 1,5-mal höheren GSx-Spiegel besitzen als A-172 Zellen ( $39,6 \pm 1,5$  nmol/mg Zellprotein;  $n = 14$ ). Der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ist statistisch signifikant.

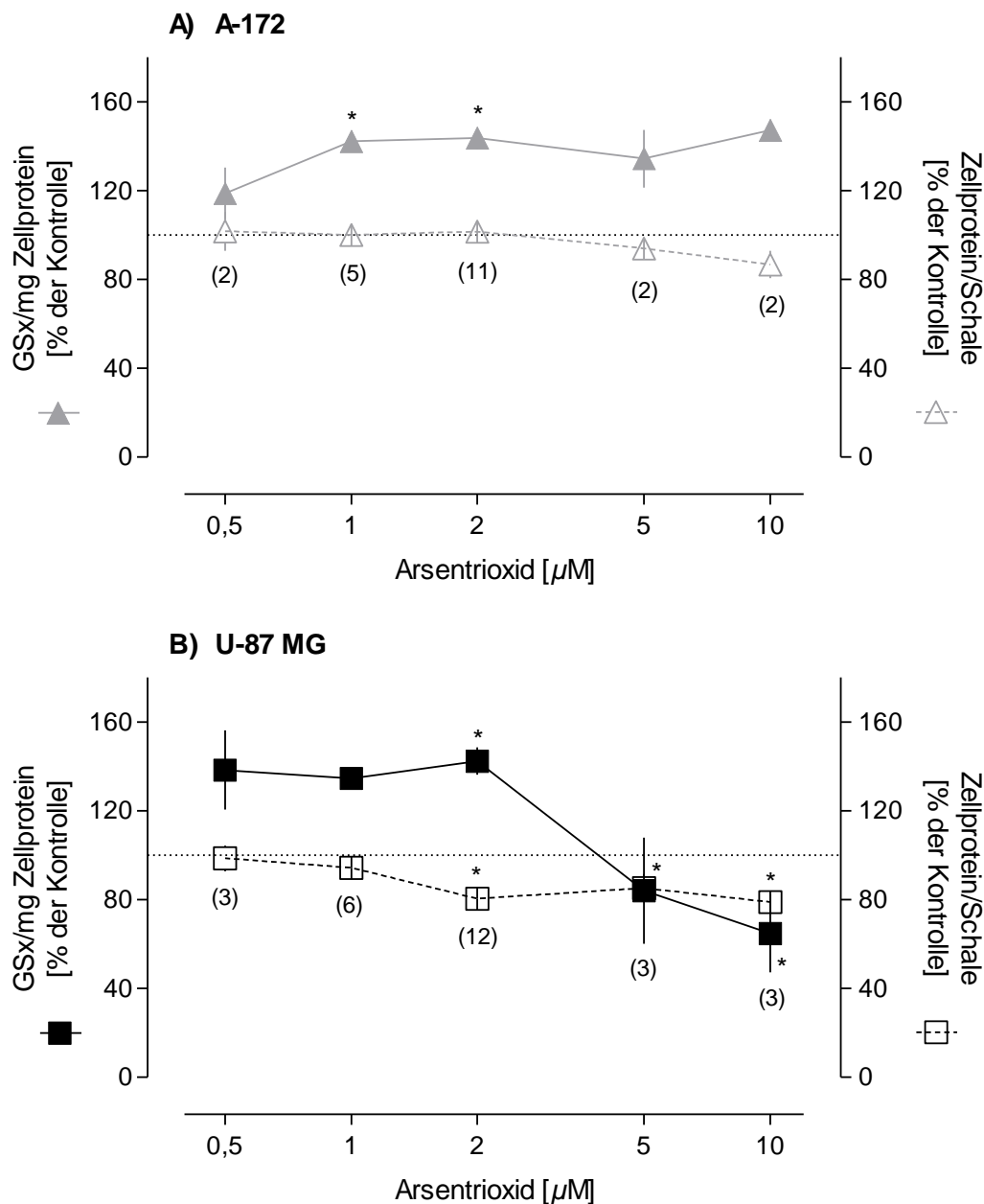


**Abbildung 4-48: Vergleich der Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 ( $n = 14$ ) und U-87 MG Zellen ( $n = 15$ ) wurden einer Glutathion- sowie Proteinbestimmung unterzogen (vgl. 3.5). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen GSx in nmol/mg Zellprotein. \* $p < 0,05$  vs. A-172 Zellen (t-Test).

#### 4.4.1 Arsentrioxid

Abbildung 4-49 stellt die Wirkung von ATO auf den intrazellulären GSx-Gehalt sowie die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen gegenüber.



**Abbildung 4-49: Wirkung von Arsentrioxid auf den Glutathionspiegel und die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) wurden mit ATO exponiert. Nach 24 h erfolgte eine Glutathion- und Proteinbestimmung (vgl. 3.5). Zu jeder Konzentration wurden (n) Versuche durchgeführt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM (wenn  $n > 2$ ) des GSx/mg Zellprotein und des Zellproteins/Schale in % der Kontrolle (= 100%). \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit Tukey's multiple comparison test).

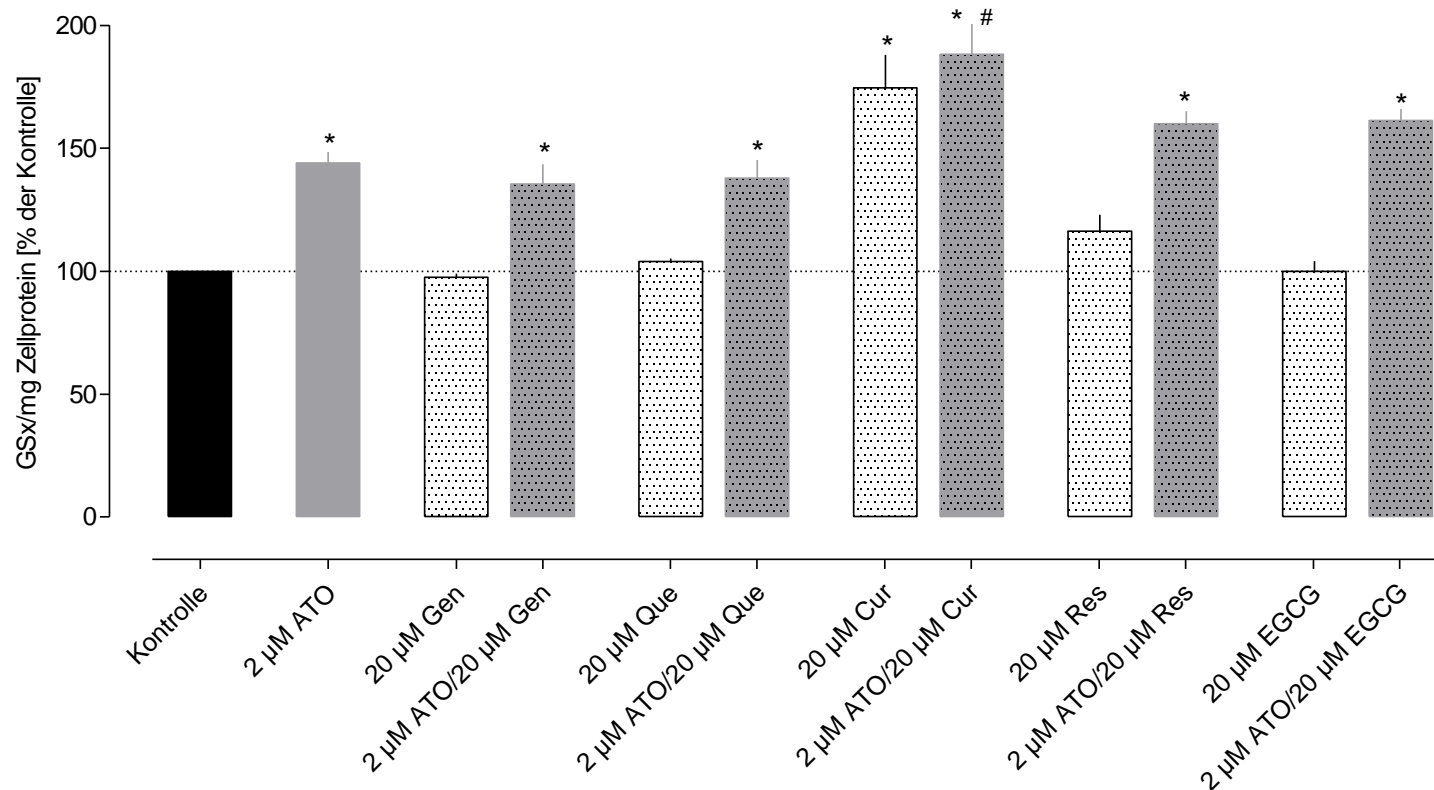
Bei A-172 Zellen steigert ATO die GSx-Spiegel im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (0,5 - 10  $\mu\text{M}$ ). In Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  ATO nimmt der Gehalt an GSx im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bereits um 20% zu. Dieser Effekt verdoppelt sich bei einer Exposition der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  ATO. Noch höhere ATO-Konzentrationen (2 - 10  $\mu\text{M}$ ) induzieren keine weitere Zunahme der GSx-Levels. Diese bewegen sich jeweils im Bereich der bereits mit 1  $\mu\text{M}$  ATO erzielten Wirkung. Das Wachstum von A-172 Zellen wird bei einer Inkubation mit 0,5 bis 5  $\mu\text{M}$  ATO nicht beeinflusst und nimmt erst bei 10  $\mu\text{M}$  ATO geringfügig ab (~ 15%) - eine Wirkung, die sich schon in den Proliferationshemmversuchen zeigte (vgl. Abb. 4-4).

Bei U-87 MG Zellen besitzt ATO eine „zweiphasige“ Wirkung auf den GSx-Gehalt. 0,5 bis 2  $\mu\text{M}$  ATO erhöhen den Gehalt an GSx jeweils um etwa 40% verglichen mit der Kontrolle. 10  $\mu\text{M}$  ATO führen dagegen zu einer deutlichen Verminderung der GSx-Levels pro mg Zellprotein auf 65% der Kontrollwerte. Das Wachstum von U-87 MG wird bei einer 24 h-Behandlung mit niedrigen ATO-Konzentrationen (0,5 - 1  $\mu\text{M}$ ) nicht gehemmt, während es bei höheren Konzentrationen (2 - 10  $\mu\text{M}$ ) um etwa 20% abnimmt.

Zusammengefasst: Eine Behandlung mit ATO erhöht in niedrigen Konzentrationen (0,5 - 2  $\mu\text{M}$ ) bei beiden Zelllinien in ähnlicher Weise die zellulären GSx-Spiegel. Die Wirkung höherer ATO-Konzentrationen (5 und 10  $\mu\text{M}$ ) weist allerdings Unterschiede auf. Während bei A-172 Zellen auch hier die GSx-Spiegel über den unbehandelten Kontrollen liegen, sinken sie in U-87 MG Zellen um 15% bzw. 35% unter die Kontrollwerte.

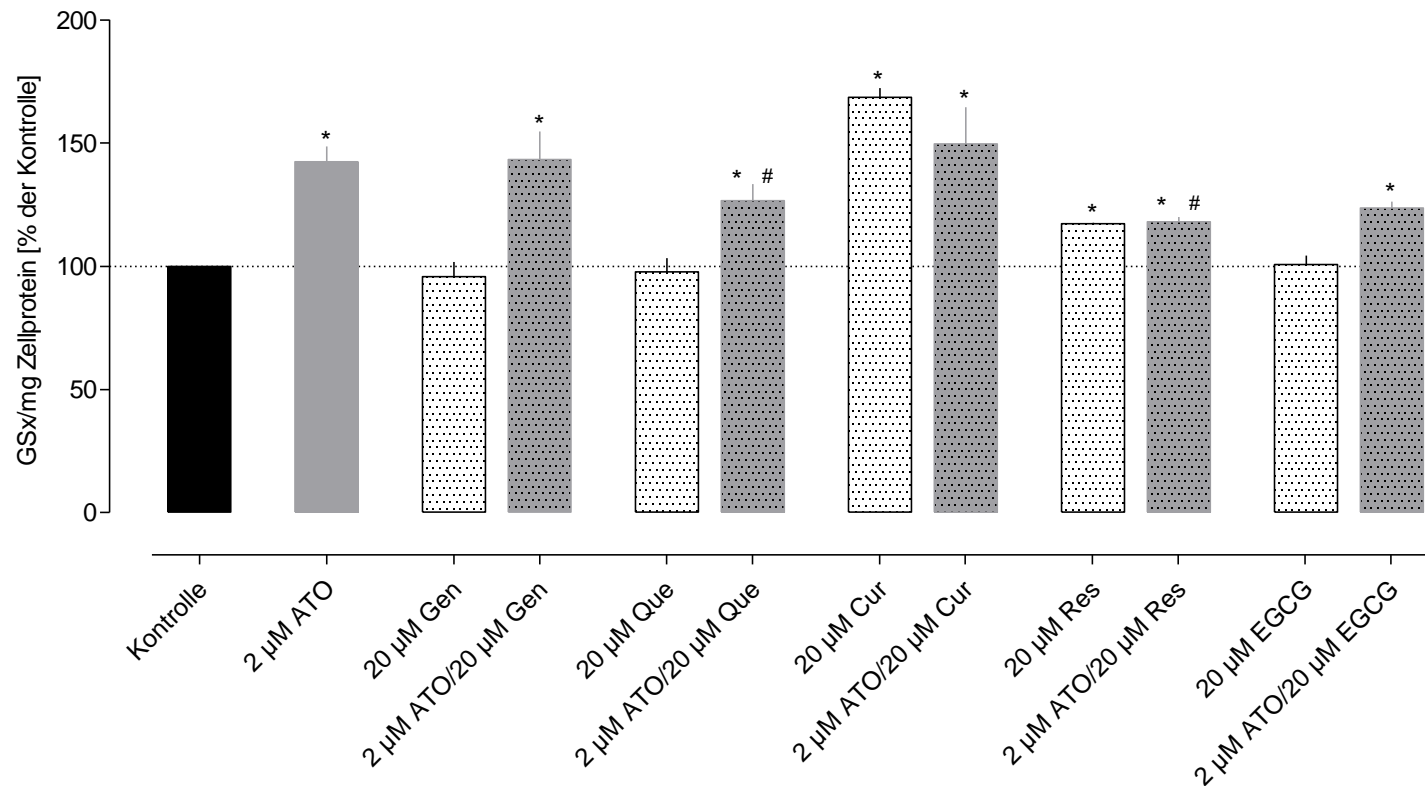
#### **4.4.2 Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen**

Zur besseren Übersicht ist in den Abbildungen 4-50 und 4-51 die Wirkung von ATO und den fünf untersuchten Polyphenolen auf die intrazellulären GSx-Spiegel von A-172 und U-87 MG Zellen zusammengefasst. Die Zellen wurden in den hier dargestellten Versuchen stets mit 2  $\mu\text{M}$  ATO, 20  $\mu\text{M}$  eines Polyphenols und der Kombination aus beiden Agentien exponiert. Es fanden jeweils drei Messungen statt. Für jede Polyphenol-Gruppe sind die Ergebnisse dieser drei Messungen und die dazugehörige statistische Auswertung gezeigt. Der Effekt von ATO entspricht dem Mittelwert aus allen durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 4-50: Wirkung von Arsentrioxid und pflanzlichen Polyphenolen auf den Glutathionspiegel von A-172 Zellen**

A-172 Zellen wurden mit ATO, pflanzlichen Polyphenolen und ihrer Kombination exponiert. Nach 24 h erfolgte eine Glutathion- und Proteinbestimmung (vgl. 3.5). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen GSx/mg Zellprotein in % der Kontrolle (= 100%) mit  $n \geq 3$  Versuchen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle; #  $p < 0,05$  vs. ATO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).



**Abbildung 4-51: Wirkung von Arsenitrioxid und pflanzlichen Polyphenolen auf den Glutathionspiegel von U-87 MG Zellen**

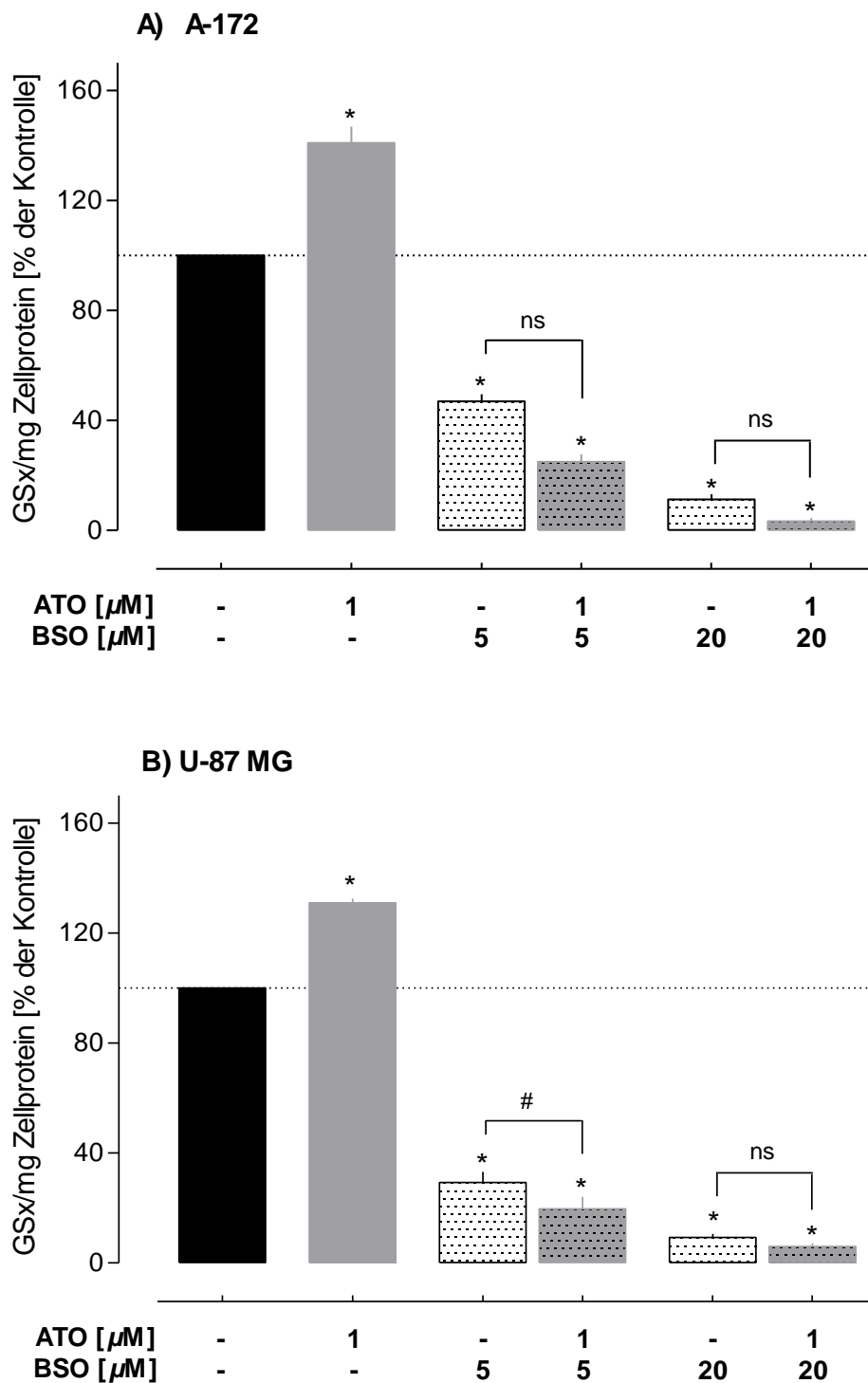
U-87 MG Zellen wurden mit ATO, pflanzlichen Polyphenolen und ihrer Kombination exponiert. Nach 24 h erfolgte eine Glutathion- und Proteinbestimmung (vgl. 3.5). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen GSx/mg Zellprotein in % der Kontrolle (= 100%) mit n = 3 Versuchen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # $p < 0,05$  vs. ATO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).

Die untersuchten Polyphenole können in zwei Gruppen eingeteilt werden: (i) Polyphenole, die keinen Effekt haben und (ii) Polyphenole, die eine Erhöhung der intrazellulären GSx-Spiegel bewirken. Genistein, Quercetin und EGCG sind der ersten Gruppe zuzuordnen. Sie besitzen keinen Einfluss auf die GSx-Spiegel in beiden Zelllinien. Curcumin und Resveratrol gehören der zweiten Gruppe an. Curcumin führt bei beiden Zelllinien zu einer Erhöhung der GSx-Levels um jeweils etwa 70% verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Die Wirkung von Resveratrol ist im Vergleich zu der von Curcumin deutlich geringer. Durch dieses Polyphenol erfolgt bei beiden Zelllinien eine Steigerung des GSx-Gehalts um jeweils ca. 16%.

Bei einer gleichzeitigen Behandlung von A-172 Zellen mit ATO und Genistein, Quercetin, EGCG bzw. Resveratrol tritt jeweils nur der durch ATO allein verursachte GSx-steigernde Effekt auf. Bei einer Ko-Behandlung mit Curcumin sind die GSx-Spiegel verglichen mit der Wirkung von ATO allein signifikant erhöht. Die Erhöhung erreicht allerdings nicht das Maß einer Summierung der separaten Wirkung beider Agentien. Der maximale Effekt wird also schon vorher erreicht. Bei U-87 MG Zellen ist der GSx-Gehalt bei einer Ko-Exposition mit ATO und allen Polyphenolen verglichen mit der Kontrolle ebenfalls erhöht. In Anwesenheit von Quercetin, Resveratrol bzw. EGCG ist er gegenüber dem GSx-Gehalt der mit nur ATO exponierten Kulturen jedoch leicht vermindert.

#### **4.4.3 Kombination von Arsenitrioxid mit Buthioninsulfoximin**

Anders als die untersuchten pflanzlichen Polyphenole induziert BSO eine drastische, von der Konzentration abhängige Verminderung der intrazellulären GSx-Spiegel (vgl. Abb. 4-52). Bei A-172 Zellen sinken die Spiegel auf 47% (5  $\mu$ M BSO) bzw. 11% (20  $\mu$ M BSO) der Kontrollwerte. Bei U-87 MG Zellen nehmen die Spiegel in Anwesenheit gleicher BSO-Konzentrationen auf 29% bzw. 9% ab. Bei gleichzeitigem Einsatz von ATO und BSO sinkt der Gehalt an GSx in beiden Zelllinien entsprechend der Wirkung von BSO allein unter die der jeweiligen Kontrolle. Mit anderen Worten: Der GSx-steigernde Effekt von ATO wird bei einer Ko-Exposition mit BSO aufgehoben. Die GSx-Levels sind nach einer Inkubation mit ATO und BSO reproduzierbar niedriger als die Levels, welche sich nach einer separaten Behandlung mit der entsprechenden BSO-Konzentration ergeben.



**Abbildung 4-52: Wirkung von Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin auf den Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen**

A-172 (A) und U-87 MG (B) Zellen wurden mit ATO und BSO einzeln sowie in Kombination über 24 h exponiert. Anschließend erfolgte eine Glutathion- und Proteinbestimmung (vgl. 3.5). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM des gemessenen GSx/mg Zellprotein in % der Kontrolle (= 100%) aus  $n = 3$  Experimenten. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle; ns = nicht signifikant bzw. # $p < 0,05$  vs. BSO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).



## 4.5 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose

Für Substanzen, die in den Proliferationshemmversuchen zumindest bei einer der Glioma-Zelllinien zu einer Sensitivierung für ATO geführt haben (vgl. 4.2), wurde zusätzlich geprüft, ob ihre proliferationshemmende Wirkung auf apoptotischem und/oder nekrotischem Zelltod beruht oder ob eine Arretierung im Zellzyklus stattfindet und Zelltod nur eine untergeordnete Rolle spielt. In diesem Kapitel werden also die Ergebnisse der Versuche mit ATO, Genistein, Quercetin und BSO beschrieben.

Wie im Methodenteil erläutert (vgl. 3.6), wurden A-172 und U-87 MG Zellen über unterschiedliche Zeiten (24 h / 24 und 72 h) mit den Substanzen einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend wurden Veränderungen in der Zellkernmorphologie, die Externalisierung von Phosphatidylserin und der DNA-Gehalt im Zellzyklus bestimmt.

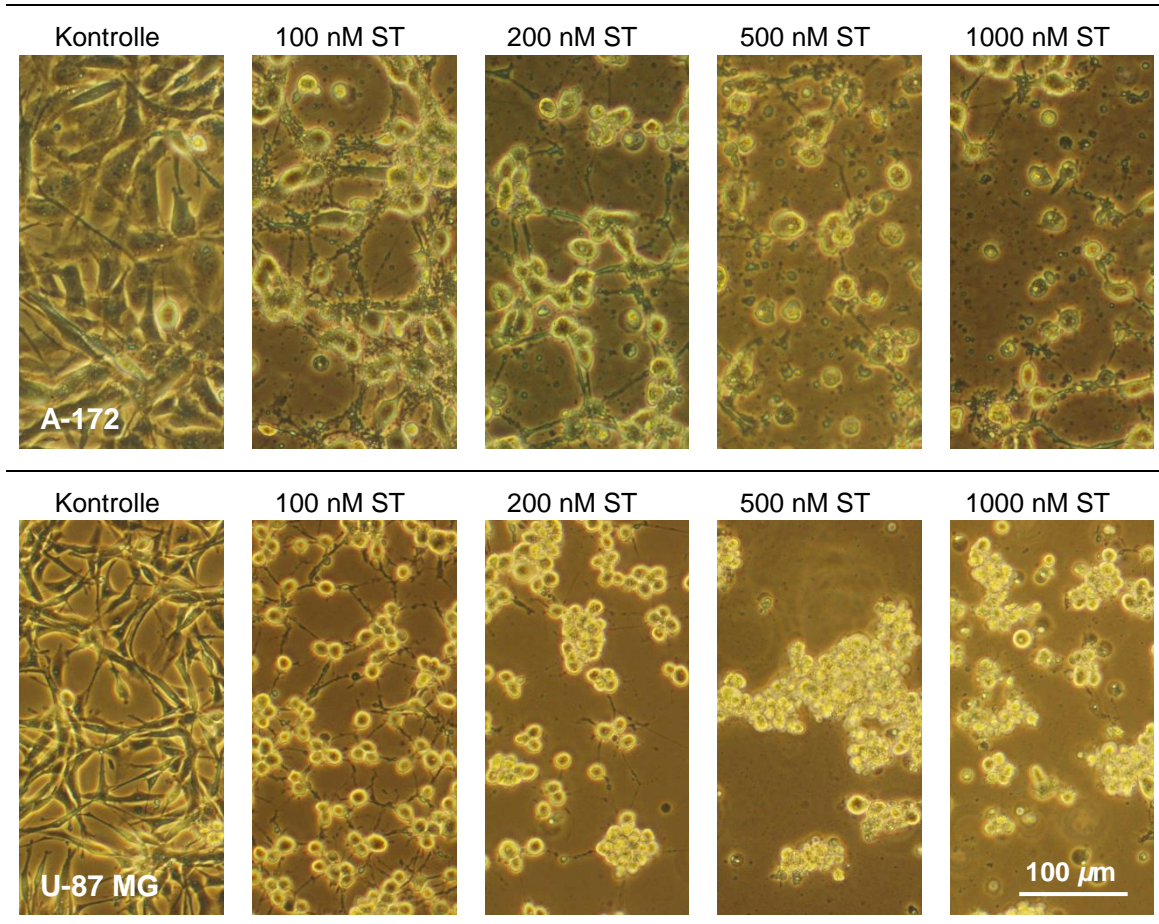
Um die verwendeten Nachweismethoden und den Versuchsaufbau zu etablieren, wurden zunächst Versuche mit Staurosporin (ST), einem bekannten Apoptoseinduktor (Bertrand *et al.*, 1994) durchgeführt. Da Gliome häufig als resistent gegen Apoptose beschrieben werden (Lefranc *et al.*, 2006; Sarafian *et al.*, 2009), sollten die Versuche mit ST gleichzeitig Auskunft über die Empfindlichkeit von A-172 und U-87 MG Zellen für einen klassischen Apoptoseinduktor bzw. die Möglichkeit bei ihnen Apoptose auszulösen, geben.

### 4.5.1 Staurosporin

#### A) Bestimmung des Anteils der in die Analyse eingehenden Zellpopulation

In Abbildung 4-53 sind zunächst phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von A-172 und U-87 MG Zellen nach einer 24 h-Inkubation mit ST (100 - 1000 nM) dargestellt. Unbehandelte A-172 und U-87 MG Zellen (Kontrollen) weisen eine für sie typische Morphologie auf (vgl. Abb. 4-1). Die Zellen der jeweiligen Linie sind über lange Fortsätze miteinander verbunden, wobei sich A-172 Zellen über die gesamte Kulturschale ausbreiten, während U-87 MG Zellen dreidimensional wachsen und zahlreiche Lücken im Zellrasen besitzen. Mit ST behandelte Kulturen zeigen ein grundlegend anderes Erscheinungsbild. Beide Zelllinien sind bereits nach einer Behandlung mit 100 nM ST deutlich geschädigt. Die Leiber von A-172 und U-87 MG Zellen sind geschrumpft und abgekugelt. Ihre Fortsätze sind stark verdünnt, das Netzwerk zwischen den Zellen

bleibt aber noch jeweils erhalten. An den Fortsätzen von A-172 Zellen kann man weiterhin winzige Bläschen erkennen. Ab einer Konzentration von 500 nM ST verschwinden die Fortsätze bei U-87 MG Zellen vollständig, bei A-172 Zellen treten sie nur noch vereinzelt auf. Die meisten Zellen haben sich vom Schalenboden abgelöst. Es sind zahlreiche Zelltrümmer sichtbar.



**Abbildung 4-53: Morphologische Veränderungen von A-172 und U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin**

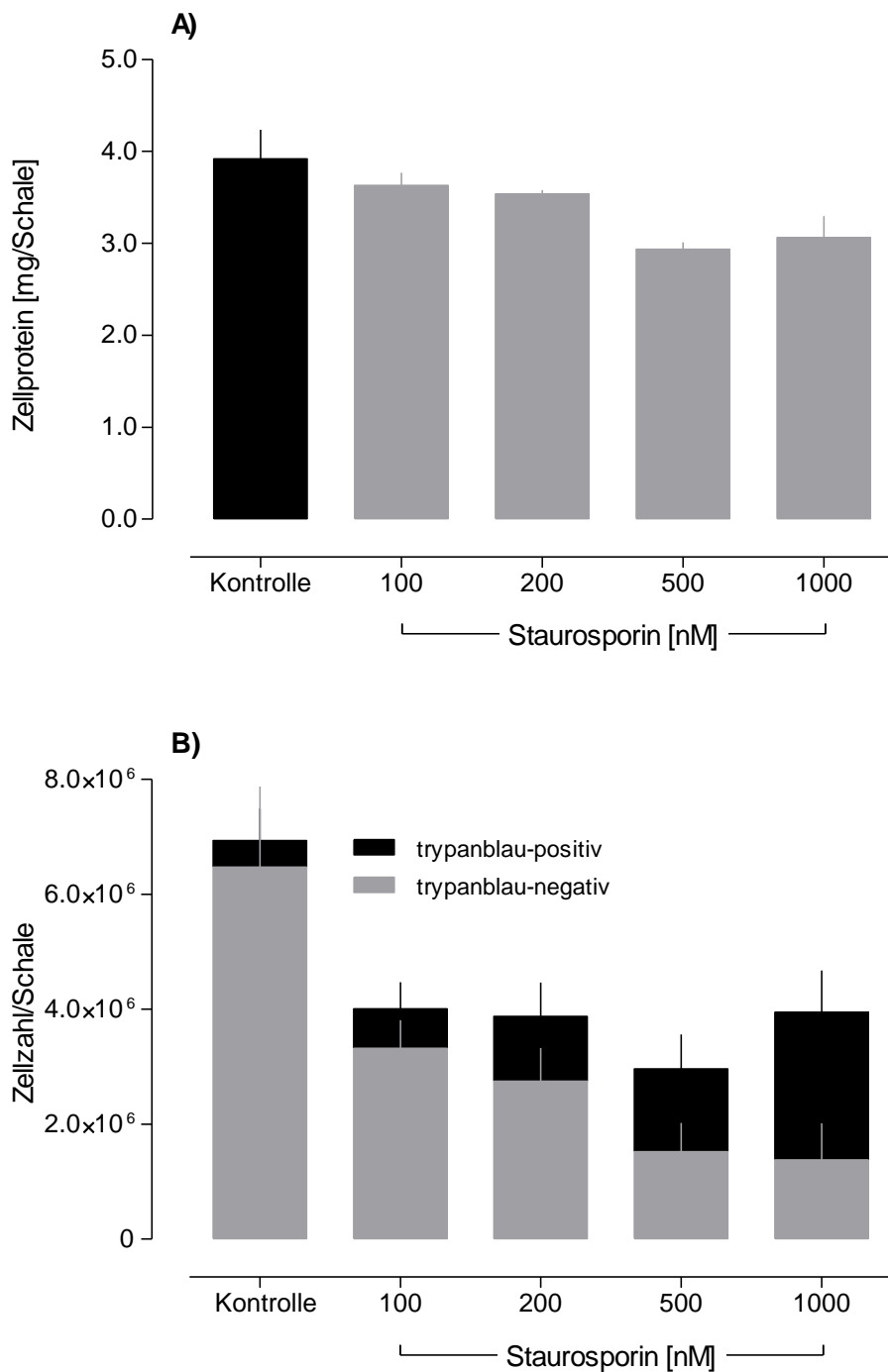
A-172 und U-87 MG Zellen wurden über 24 h mit ST exponiert und anschließend fotografiert. Die Aufnahmen erfolgten mittels Phasenkontrast-Mikroskop (Olympus IMT-2) und angeschlossener Digitalkamera (Olympus E-300).

Bei den Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose wurden alle Zellen (angeheftet und abgelöst) gesammelt, abzentrifugiert und das gewonnene Pellet aufbereitet (vgl. 3.6.4). Mit den dann angewendeten Methoden konnten nur Aussagen über den Zustand von Zellen gemacht werden, die sich während der Zentrifugation sedimentieren ließen, also noch hinreichend intakt waren. Über den Untergang von zu stark geschädigten Zellen bzw. ihren Resten (sog. „desintegrierten Zellen“) konnten keine Aussagen mehr getroffen werden. Um den Anteil der Zellen abzuschätzen, der in

die Analyse einging, wurde die Zahl der sedimentierten Zellen bestimmt. Dazu wurde zum einen der Gehalt an Zellprotein ermittelt und zum anderen eine lichtmikroskopische Zellzählung vorgenommen. Letztere Methode erlaubte zudem eine Differenzierung in die trypanblau-negative (vitale) und -positive (tote) Fraktion. Die Ergebnisse beider Messverfahren sind am Beispiel von U-87 MG Zellen nach einer 24 h-Exposition mit unterschiedlichen ST-Konzentrationen in Abbildung 4-54 gezeigt. Bei A-172 Zellen war die Bestimmung der Zellzahl aufgrund einer starken Aggregatbildung nach der Exposition mit ST nicht möglich.

Die gemessene Proteinmenge pro Schale nimmt in den mit ST behandelten U-87 MG Kulturen im Vergleich zur Kontrolle nur leicht ab. Bei den beiden niedrigeren ST-Konzentrationen (100 und 200 nM) beträgt die Abnahme jeweils ca. 10%. Bei den beiden höheren Konzentrationen (500 und 1000 nM) liegt sie jeweils bei etwa 15%. Gemäß der Zellzählung befinden sich in der Kontrollschale etwa  $7 \cdot 10^6$  Zellen. Verglichen mit der ausgesäten Zellzahl ( $4 \cdot 10^6$  Zellen/Schale) hat hier also ein Wachstum stattgefunden. In den mit ST exponierten Kulturen bleibt die ermittelte Zellzahl im Bereich der ausgesäten. Sie ist um etwa 40% niedriger als in der Kontrolle. Weiterhin ist eine von der ST-Konzentration abhängige Zunahme der trypanblau-positiven Fraktion zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass ST die Proliferation von U-87 MG Zellen komplett unterbindet und zytoletal wirkt.

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Methoden, so zeigt sich, dass die Zellzählung einen höheren Verlust an Zellen ergibt als die Proteinbestimmung. Das dürfte darauf zurückzuführen sein, dass bei der Proteinbestimmung das gesamte sedimentierte Protein erfasst wird, also auch Zelltrümmer, welche bei der Zellzählung nicht berücksichtigt werden. Mit anderen Worten: Bei der Proteinbestimmung wird der Anteil der in die Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose eingehenden Zellpopulation überschätzt.

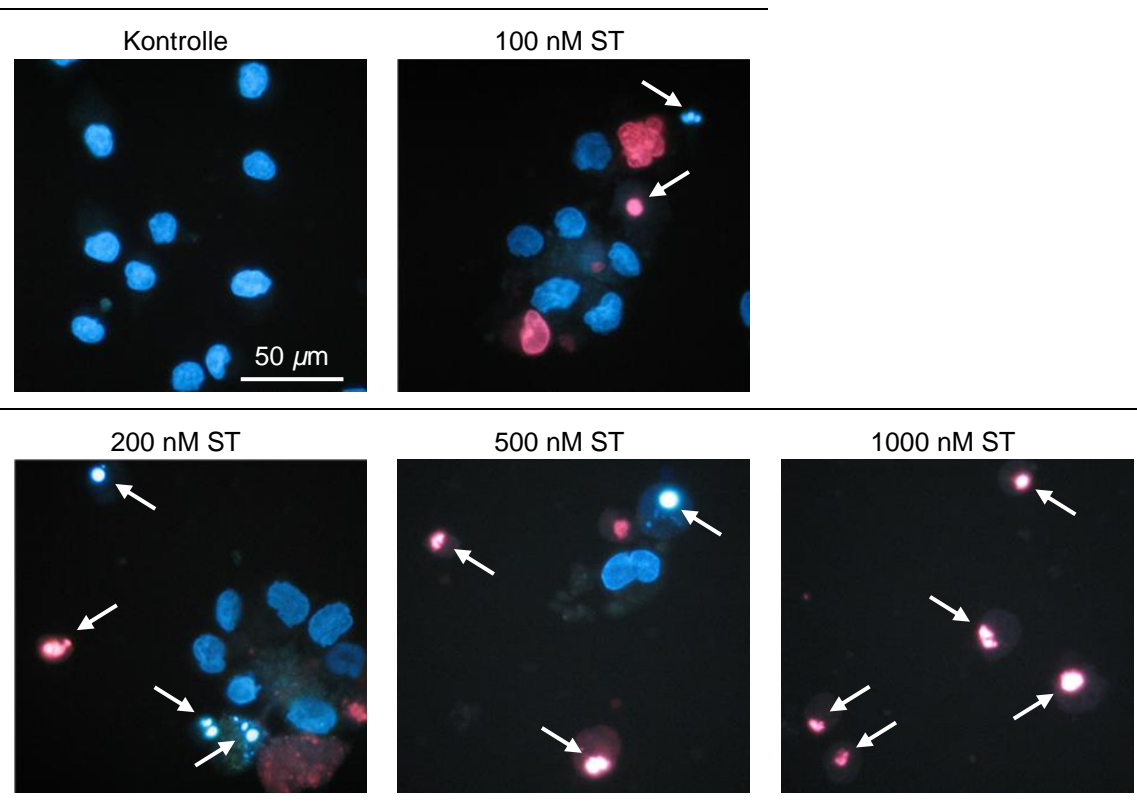


**Abbildung 4-54: Methodenvergleich zur Bestimmung des Verlusts an U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin**

U-87 MG Zellen wurden über 24 h mit ST exponiert und anschließend einer Protein- sowie Zellzahlbestimmung unterzogen (vgl. 3.6.4). **(A) Proteinbestimmung:** Dargestellt ist der gemessene Zellprotein Gehalt/Schale als MW ± SEM aus n ≥ 3 Experimenten (Ausnahme: für 500 nM ST entsprechen die Daten MW + Spannweite aus n = 2 Versuchen). **(B) Zellzählung:** Gezeigt ist die Zellzahl/Schale, differenziert in trypanblau-negative (vitale) und trypanblau-positive (tote) Zellen als MW + Spannweite aus n = 2 Versuchen.

### B) Fluoreszenzmikroskopie

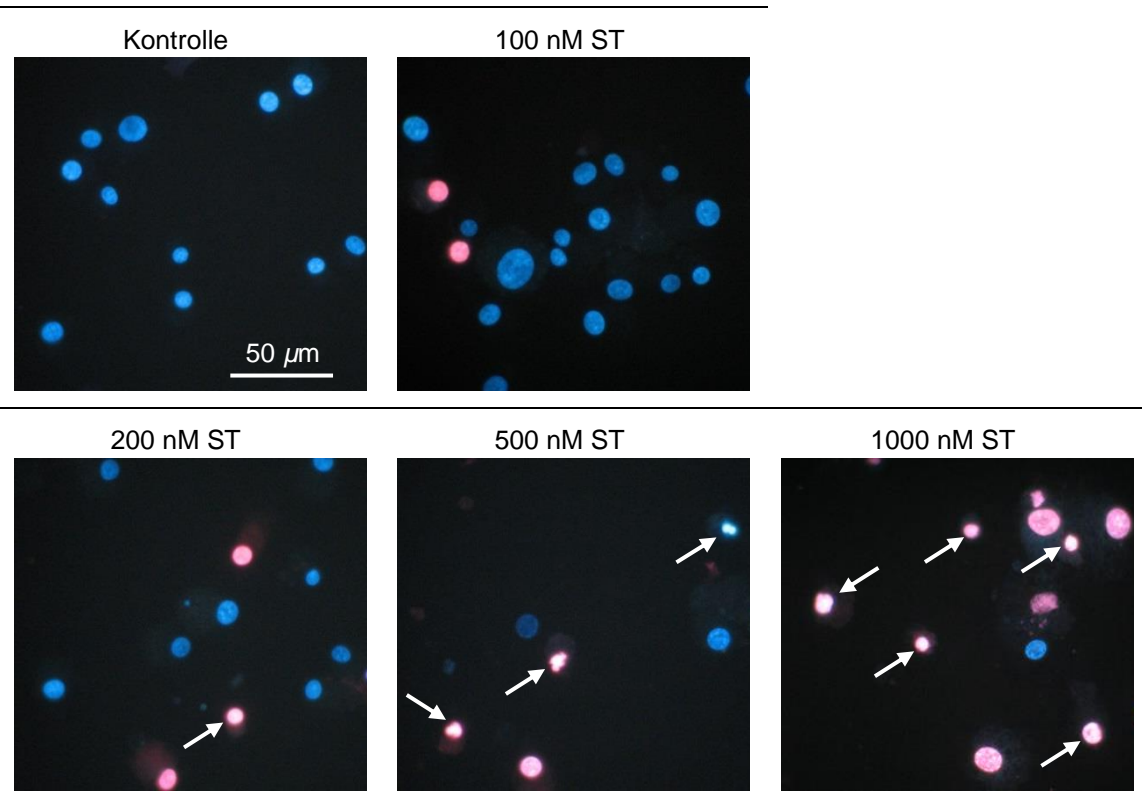
Zur morphologischen Bestimmung von Apoptose und Nekrose wurden Zellkernfärbungen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 und PI durchgeführt (vgl. 3.6.1). Abbildungen 4-55 und 4-56 zeigen zunächst fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A-172 und U-87 MG Zellen nach einer 24 h-Behandlung mit ST (100 - 1000 nM). ST führt bei beiden Zelllinien zu einer Induktion von Apoptose. Bei A-172 Zellen ist die Zunahme an apoptotischen Zellen bereits ab einer Konzentration von 100 nM sichtbar. Nekrotischer Zelltod ist kaum zu beobachten. Bei U-87 MG Zellen ist das Auftreten von Apoptose erst ab einer ST-Konzentration von 500 nM deutlich ausgeprägt. Insbesondere bei einer Exposition mit 1000 nM ST sind bei dieser Zelllinie auch vermehrt nekrotische Zellkerne zu erkennen.



**Abbildung 4-55: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kerne von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin**

A-172 Zellen wurden über 24 h mit ST exponiert und anschließend mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt (vgl. 3.6.4). Die Aufnahmen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) und angeschlossener Digitalkamera (Canon Power Shot A620). Dargestellt ist jeweils ein typisches Gesichtsfeld. Die Pfeile kennzeichnen apoptotische Zellen.

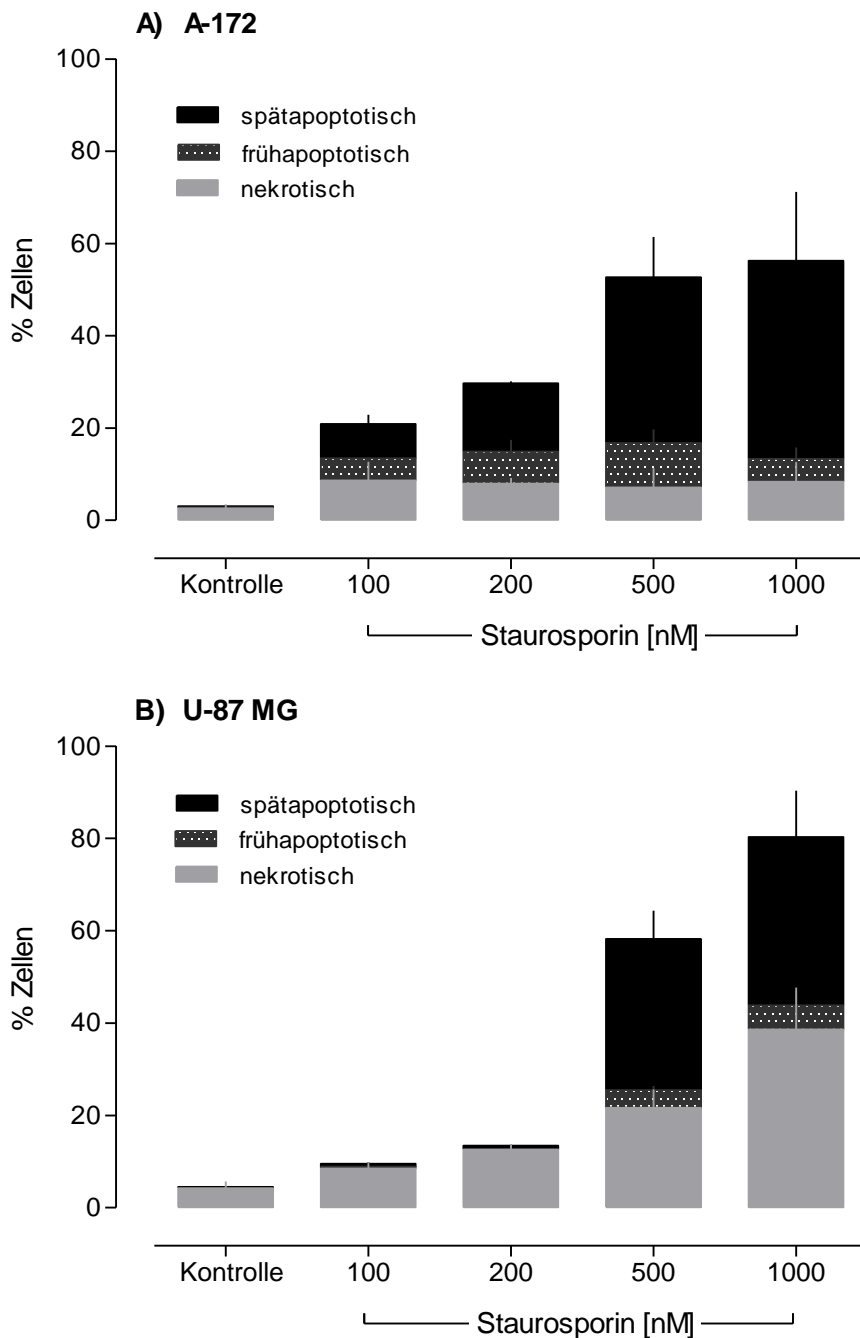




**Abbildung 4-56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kerne von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin**

U-87 MG Zellen wurden über 24 h mit ST exponiert und anschließend mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt (vgl. 3.6.4). Die Aufnahmen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) und angeschlossener Digitalkamera (Canon Power Shot A620). Dargestellt ist jeweils ein typisches Gesichtsfeld. Die Pfeile kennzeichnen apoptotische Zellen.

Um quantitative Aussagen über das Auftreten von Früh- und Spätapoptose sowie Nekrose zu treffen, wurden jeweils mindestens 15 zufällig ausgewählte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht und die Zellkerne ausgezählt (vgl. Abb. 4-57). Eine Behandlung von A-172 Zellen mit 100 nM ST führt bei 12% der Population zur Induktion von Apoptose. In Anwesenheit von 1000 nM ST stirbt knapp die Hälfte der Zellen (48%) apoptotisch. Auffällig ist jeweils der hohe Anteil der Spätapoptose an der Gesamtapoptoserate. Der Anteil an Nekrose ist bei allen Expositionsbedingungen konstant niedrig (~ 8%). Bei U-87 MG Zellen findet ab einer Konzentration von 100 nM ST eine Induktion von Nekrose statt (8,5%). Bei der höchsten getesteten ST-Konzentration beträgt der Anteil nekrotischer Zellen 38,6%. Eine Induktion von Apoptose tritt bei U-87 MG Zellen bei einer Behandlung mit ST-Konzentrationen bis zu 200 nM nicht auf. 500 nM ST induzieren dann aber bei 37% der Zellen apoptotischen Zelltod. Dieser Anteil nimmt bei Erhöhung der ST-Konzentration auf 1000 nM nicht weiter zu (41,6%). Wie bei A-172 Zellen ist auch bei U-87 MG Zellen nach 24 h hauptsächlich Spätapoptose zu beobachten.



**Abbildung 4-57: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 und U-87 MG Zellen durch Staurosporin**

A-172 (**A**) und U-87 MG Zellen (**B**) wurden über 24 h mit ST behandelt und anschließend mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt (vgl. 3.6.4). Gezeigt sind die Anteile nekrotischer sowie früh- und spätapoptotischer A-172 und U-87 MG Zellen an der jeweiligen Gesamtpopulation als (**A**) MW + Spannweite aus  $n = 2$  Versuchen bzw. (**B**) MW  $\pm$  SEM aus  $n \geq 3$  Versuchen (Kontrolle, 100 und 200 nM ST) bzw. MW + Spannweite aus  $n = 2$  Versuchen (500 und 1000 nM ST).

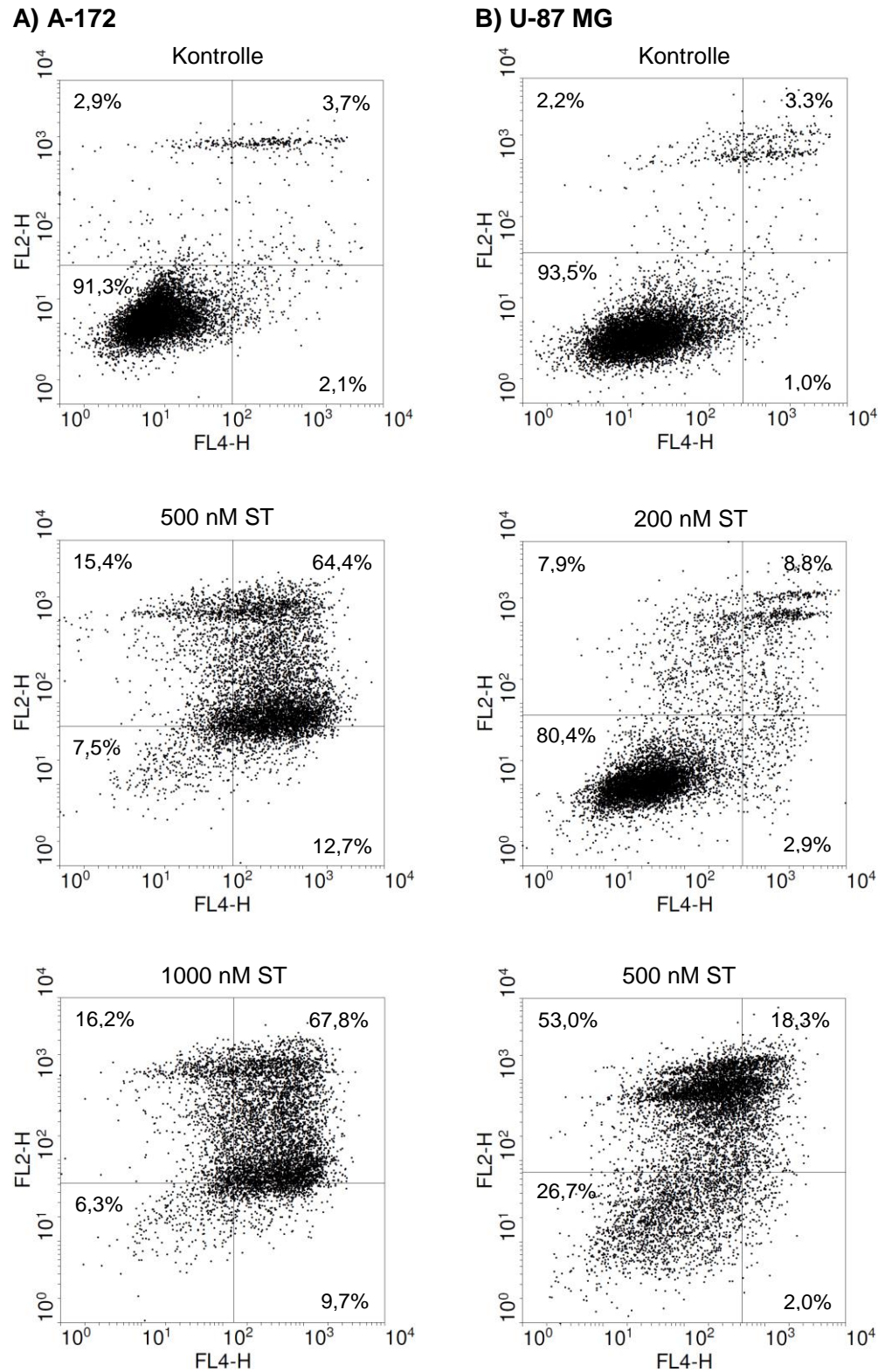
### C) PI/Annexin V-Färbung

Zum weiteren Nachweis von Apoptose und Nekrose erfolgten durchflusszytometrische Messungen nach einer Markierung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen APC Annexin V und PI (vgl. 3.6.2.1). Abbildung 4-58 zeigt repräsentative Streudiagramme von A-172 und U-87 MG Zellen nach einer 24 h-Behandlung mit verschiedenen ST-Konzentrationen (200 - 1000 nM).

91,3% der unbehandelten A-172 Zellen und 93,5% der unbehandelten U-87 MG Zellen erscheinen jeweils im unteren linken Quadranten. Bei diesen Zellen erfolgt keine spezifische Annexin V-Bindung oder PI-Aufnahme. Diese Zellen sind also intakt. ST bewirkt eine Verschiebung von A-172 und U-87 MG Zellen in die drei anderen Quadranten und somit eine Abnahme der vitalen Population. Mit 500 nM ST exponierte A-172 Zellen befinden sich mit 12,7% in der frühen Phase der Apoptose, weitere 15,4% der Zellen sind nekrotisch. Bei dem größten Anteil der Population (64,4%) kann nicht differenziert werden, ob dieser nekrotisch und/oder spätapoptotisch zugrunde geht. Eine Erhöhung der ST-Konzentration auf 1000 nM verändert die prozentuale Verteilung von A-172 Zellen auf die vier Quadranten kaum. 9,7% der Zellen sind hier frühapoptotisch, 16,2% nekrotisch und 67,8% spätapoptotisch und/oder nekrotisch. Bei U-87 MG Zellen sind nach einer Exposition mit 200 nM ST 2,9% aller Zellen frühapoptotisch, 7,9% nekrotisch, während 8,8% nekrotisch und/oder spätapoptotisch sein können. Nach einer Inkubation mit 500 nM ST bleibt der Anteil der frühapoptotischen U-87 MG Zellen mit 2% niedrig. Der Anteil nekrotischer Zellen steigt auf 53%. Bei weiteren 18,3% der Zellen ist nicht eindeutig zu bestimmen, ob sie nekrotisch und/oder spätapoptotisch sterben.

Zusammengefasst: Die PI/Annexin-Färbung erlaubt den Nachweis vom Zelltod, der auf eine Induktion von Apoptose und/oder Nekrose zurückzuführen ist. Diese Methode ermöglicht allerdings keine Unterscheidung von apoptotischem und nekrotischem Zelltod, wenn sich die Zellen zum Zeitpunkt der Messung bereits in einer späten Phase der Apoptose befinden. D.h., dass die Anwendung dieses Verfahrens nur dann sinnvoll ist, wenn Frühapoptose vorherrscht, andernfalls gehen Teilinformationen verloren.





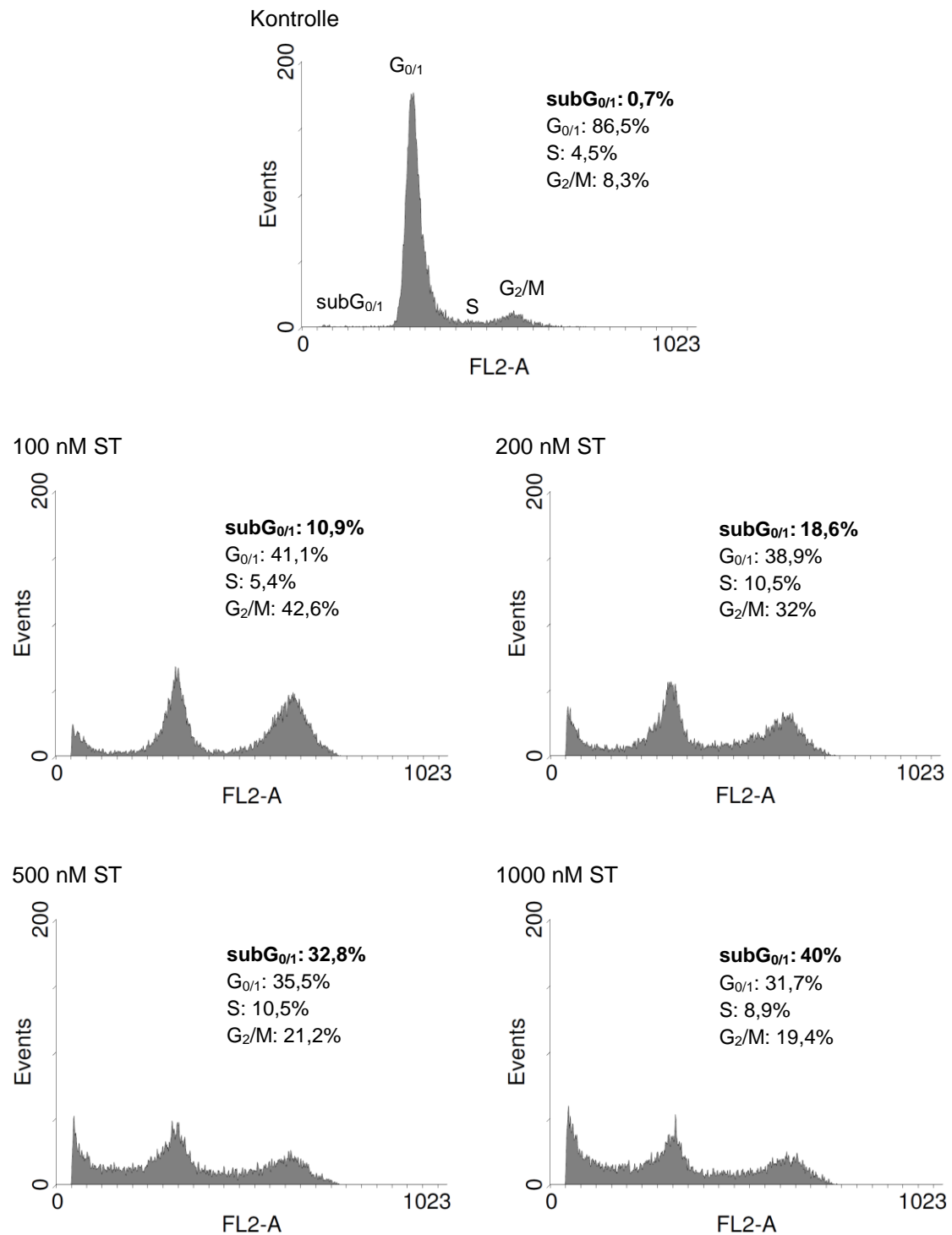
**Abbildung 4-58: Bindung von APC Annexin V und Aufnahme von PI durch A-172 und U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin**

A-172 (**A**) und U-87 MG Zellen (**B**) wurden über 24 h mit ST exponiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen APC Annexin V sowie PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die Streudiagramme jeweils einer repräsentativen Messung.

#### D) Zellzyklusanalyse

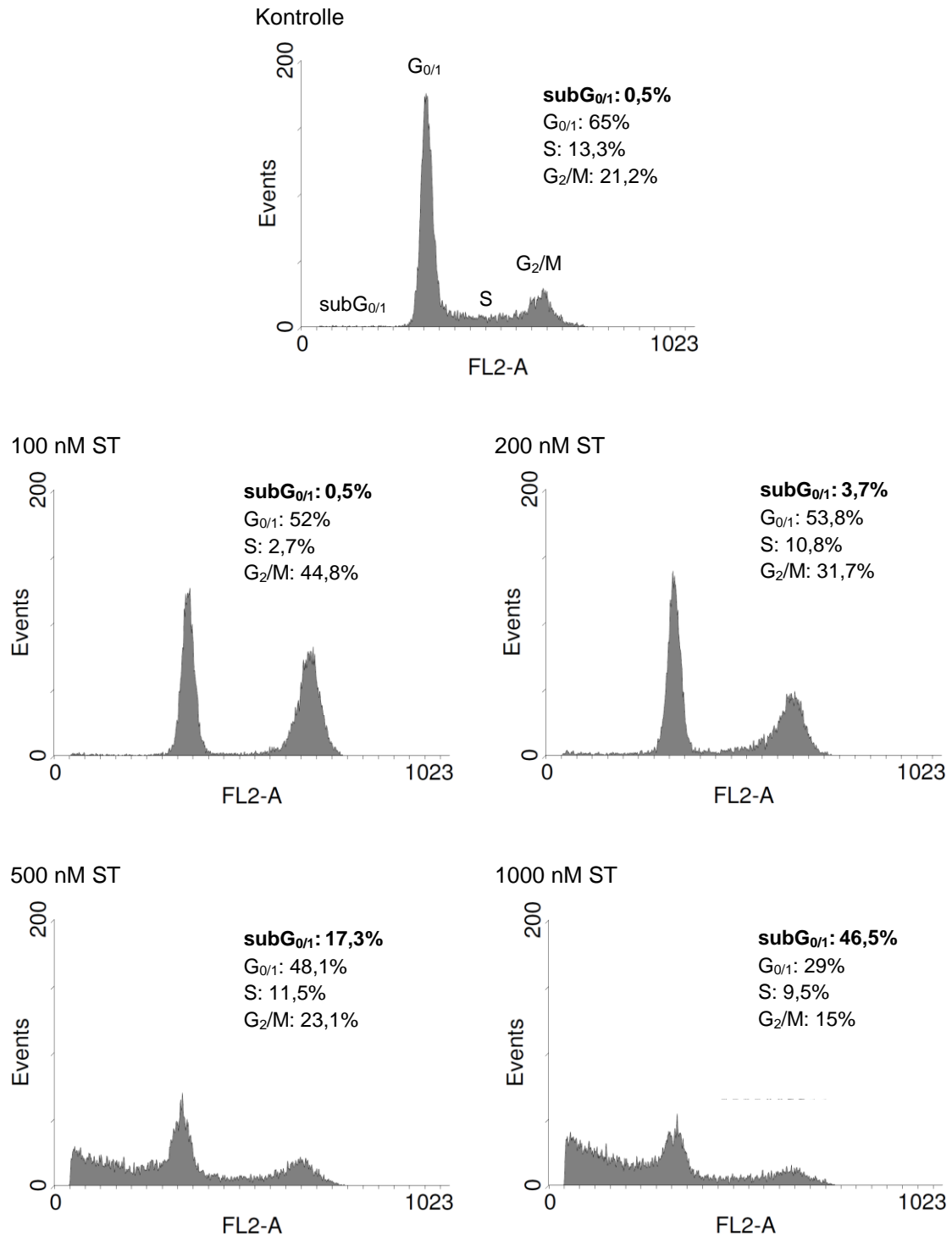
Eine weitere Methode zum Nachweis von Apoptose ist die Quantifizierung der subG<sub>0/1</sub>-Fraktion in der Zellzyklusverteilung (vgl. 3.6.2.2). Hier wird der DNA-Gehalt der Zellen nach einer Färbung mit PI im Durchflusszytometer bestimmt. Abbildungen 4-59 und 4-60 zeigen repräsentative DNA-Histogramme von A-172 bzw. U-87 MG Zellen nach einer 24 h-Exposition mit ST (100 - 1000 nM). Um die Konzentrationsabhängigkeit der ST-Wirkung zu verdeutlichen, sind in Abbildung 4-61 zudem die aus den Histogrammen abgeleiteten Konzentrations-Wirkungs-Kurven zu sehen.

Unbehandelte A-172 und U-87 MG Zellen befinden sich mit 86,5% bzw. 65% überwiegend in der G<sub>0/1</sub>-Phase. Der subG<sub>0/1</sub>-Fraktion ist jeweils weniger als 1% der Kontrollzellen zuzuordnen. ST löst bei den untersuchten Zelllinien ähnliche Veränderungen im Zellzyklus aus. 100 nM ST führen bei beiden Linien zu einem Arrest der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase (~ 45%). Damit verbunden tritt jeweils eine Abnahme der G<sub>0/1</sub>-Population auf 41% (A-172) bzw. 52% (U-87 MG) auf. Ab 200 nM ST erfolgt wiederum eine Verringerung der zuvor arretierten G<sub>2</sub>/M-Population. In Anwesenheit der höchsten ST-Konzentration (1000 nM) befinden sich nur noch 19,4% (A-172) bzw. 15% (U-87 MG) aller Zellen in dieser Phase. Die G<sub>0/1</sub>-Population nimmt bei beiden Linien mit steigender ST-Konzentration weiter ab. Auf den Abfall der G<sub>0/1</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Phase folgt eine konzentrationsabhängige Zunahme der subG<sub>0/1</sub>-Fraktion. Bei A-172 Zellen treten erste Effekte ab 100 nM ST auf. Hier sind bereits 10,9% der Zellen apoptotisch. Bei U-87 MG Zellen ist ein deutlicher Anstieg erst ab 500 nM ST zu beobachten (17,3%). Beim Einsatz von 1000 nM ST macht die subG<sub>0/1</sub>-Population bei A-172 Zellen 40% und bei U-87 MG Zellen 46,5% aus.



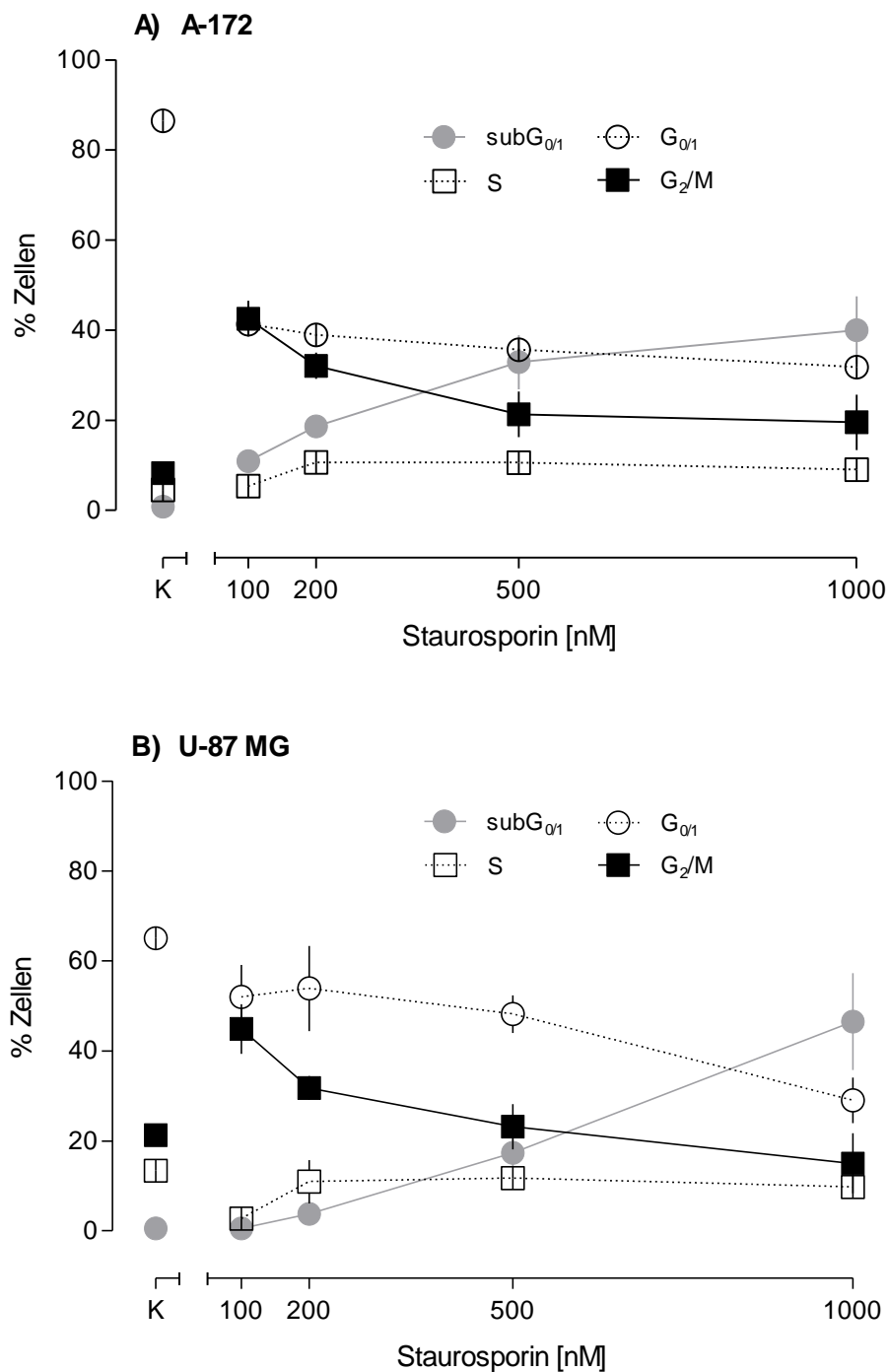
**Abbildung 4-59: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin**

A-172 Zellen wurden über 24 h mit ST exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung. Die ebenfalls gezeigte prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen stellt MW aus  $n = 2$  Versuchen dar.



**Abbildung 4-60: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Staurosporin**

U-87 MG Zellen wurden über 24 h mit ST exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung, in denen die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW aus  $n \geq 2$  Experimenten vermerkt ist.

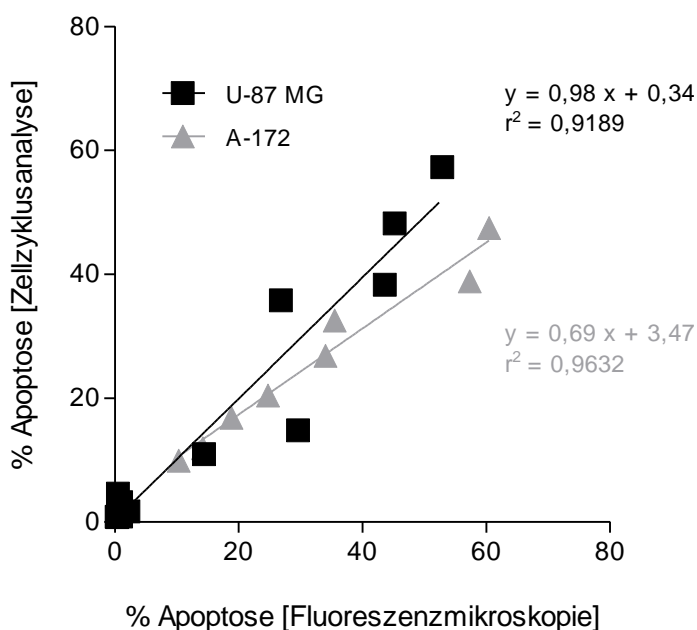


**Abbildung 4-61: Konzentrationsabhängigkeit der Staurosporin-Wirkung auf die Verteilung von A-172 und U-87 MG Zellen im Zellzyklus**

Aufgetragen ist die prozentuale Verteilung von A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) auf die einzelnen Zellzyklusphasen in Abhängigkeit von der eingesetzten ST-Konzentration. Die Werte (MW  $\pm$  SEM, wenn  $n > 2$  Versuche) stammen aus den Abbildungen 4-59 und 4-60. Weitere Beschreibung siehe dort.

### E) Methodenvergleich: Fluoreszenzmikroskopie vs. Zellzyklusanalyse

Um zu prüfen, ob die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und der Zellzyklusanalyse zusammenpassen, wurden die bei A-172 und U-87 MG Zellen jeweils gemessenen Apoptoseraten nach einer Exposition mit ST gegenübergestellt (vgl. Abb. 4-62). Zur Durchführung der beiden Tests wurden stets Proben aus der gleichen Zellsuspension entnommen (vgl. 3.6.4). Zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden besteht ein linearer Zusammenhang. Die Korrelation ist mit  $r^2$ -Werten von 0,9632 (A-172) bzw. 0,9189 (U-87 MG) sehr hoch. Die Steigung der Regressionsgeraden deutet zudem auf eine hohe Übereinstimmung der mit beiden Verfahren ermittelten Apoptoseraten hin.



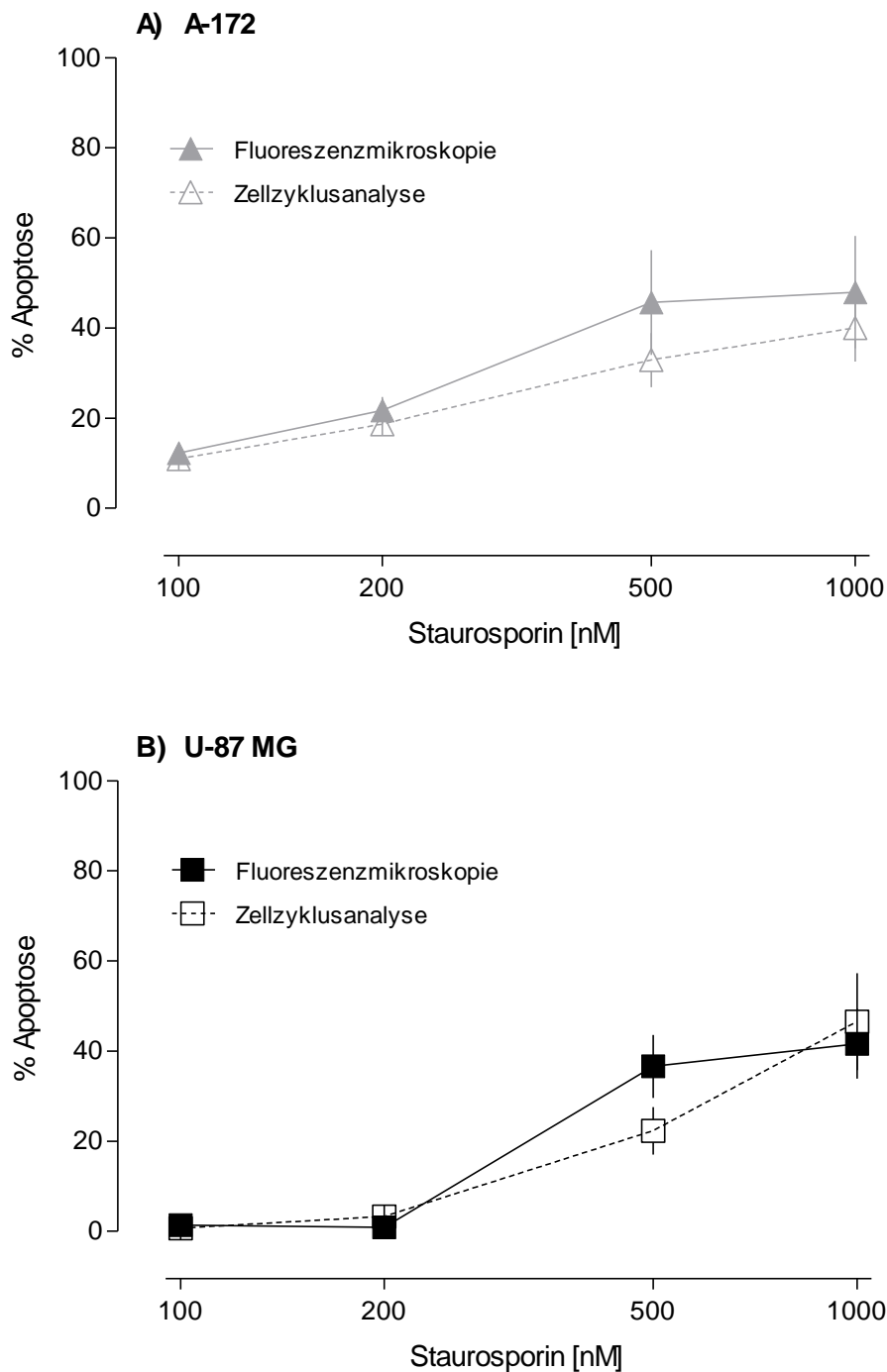
**Abbildung 4-62: Korrelation zwischen den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie und der Zellzyklusanalyse**

Dargestellt sind die Wertepaare der gemessenen Apoptoseraten in Abhängigkeit von der verwendeten Methode und die Anpassung mittels linearer Regression. Die gezeigten Werte stammen aus den Abbildungen 4-57, 4-59 und 4-60.

### F) Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Staurosporin-Wirkung

Abbildung 4-63 veranschaulicht die konzentrationsabhängige Wirkung von ST auf die Induktion von Apoptose, ermittelt mit zwei unterschiedlichen Methoden. Die Konzentrationsabhängigkeit der ST-Wirkung stimmt bei Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie und der Zellzyklusanalyse überein. Die gezeigten Kurven verdeutlichen zudem nochmals, dass A-172 Zellen im Vergleich zu U-87 MG Zellen bereits bei niedrigeren ST-

Konzentrationen (ab 100 nM) zur Apoptose fähig sind. Bei U-87 MG Zellen tritt apoptotischer Zelltod erst bei ST-Konzentrationen auf, die höher sind als 200 nM.



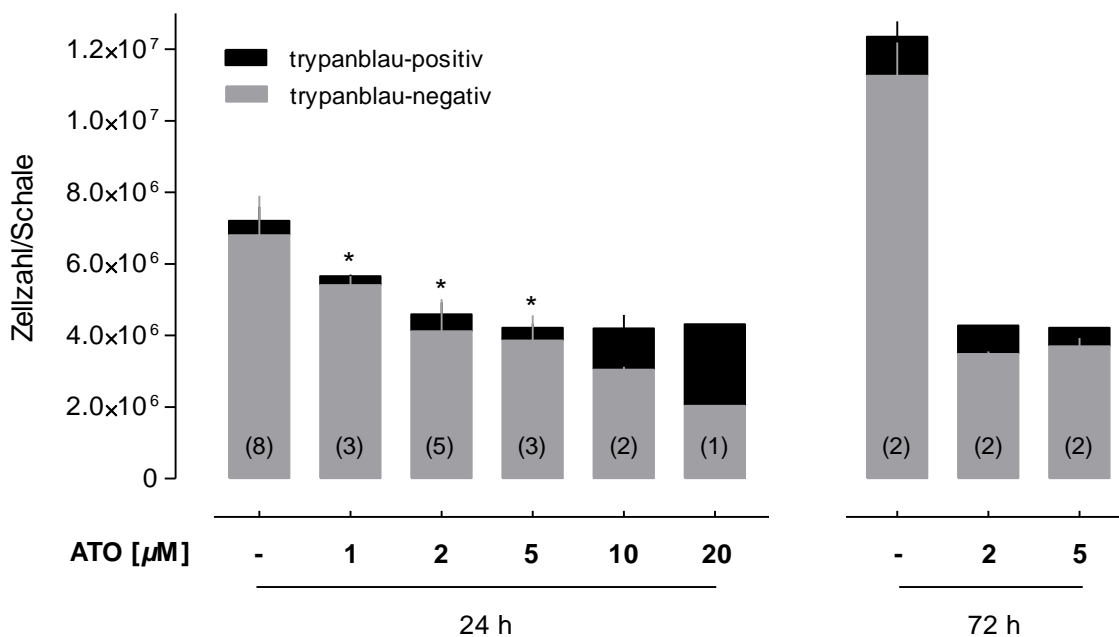
**Abbildung 4-63: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Staurosporin-Wirkung auf die Induktion von Apoptose**

A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) wurden über 24 h mit ST exponiert. Anschließend wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop untersucht bzw. einer Zellzyklusanalyse unterzogen. Dargestellt ist der %-Anteil apoptotischer Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. Die Werte stammen aus den Abbildungen 4-57, 4-59 und 4-60. Weitere Details siehe dort.

### 4.5.2 Arsentrioxid

#### A) Bestimmung des Anteils der in die Analyse eingehenden Zellpopulation

Um den Anteil der Zellen zu ermitteln, der nach einer Exposition mit ATO in die Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Nekrose einging, wurden bei U-87 MG Zellen lichtmikroskopische Zellzählungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen, wie unter 3.6.4 beschrieben, abgelöst und mit dem Kulturmedium vereinigt. Adhärente und abgelöste Zellen wurden dann durch Zentrifugation gesammelt und nach Anfärbung mit Trypanblau ausgezählt. Abbildung 4-64 fasst die Resultate aller Versuche zusammen.



**Abbildung 4-64: Verlust von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid**

U-87 MG Zellen wurden über 24 sowie 72 h mit ATO exponiert und anschließend einer Zellzahlbestimmung unterzogen (vgl. 3.6.4). Zu jeder Konzentration wurden (n) Versuche durchgeführt. Gezeigt ist die ermittelte Zellzahl/Schale, differenziert in trypanblau-negative (vitale) und trypanblau-positive (tote) Zellen als  $MW \pm SEM$ , wenn  $n > 2$  Versuche. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparison test*).

Die ausgesäte Zellzahl pro Schale betrug  $4 \cdot 10^6$ . In den Kontrollschalen nimmt die Zahl der Zellen während der Kultivierung zu. Verglichen damit ist die Zellzahl in den mit ATO exponierten Kulturen deutlich niedriger. ATO hemmt also die Zellproliferation. Nach einer 24 h-Exposition mit  $1 \mu\text{M}$  ATO ist die Zellzahl um ca. 20% geringer als die der Kontrolle. In Anwesenheit höherer ATO-Konzentrationen (2 -  $20 \mu\text{M}$ ) ist die Population gleichbleibend um ca. 40% reduziert. Die Gesamtzellzahl entspricht dabei der anfänglich ausgesäten Zellmenge. Der Anteil der trypanblau-positiven Fraktion an der

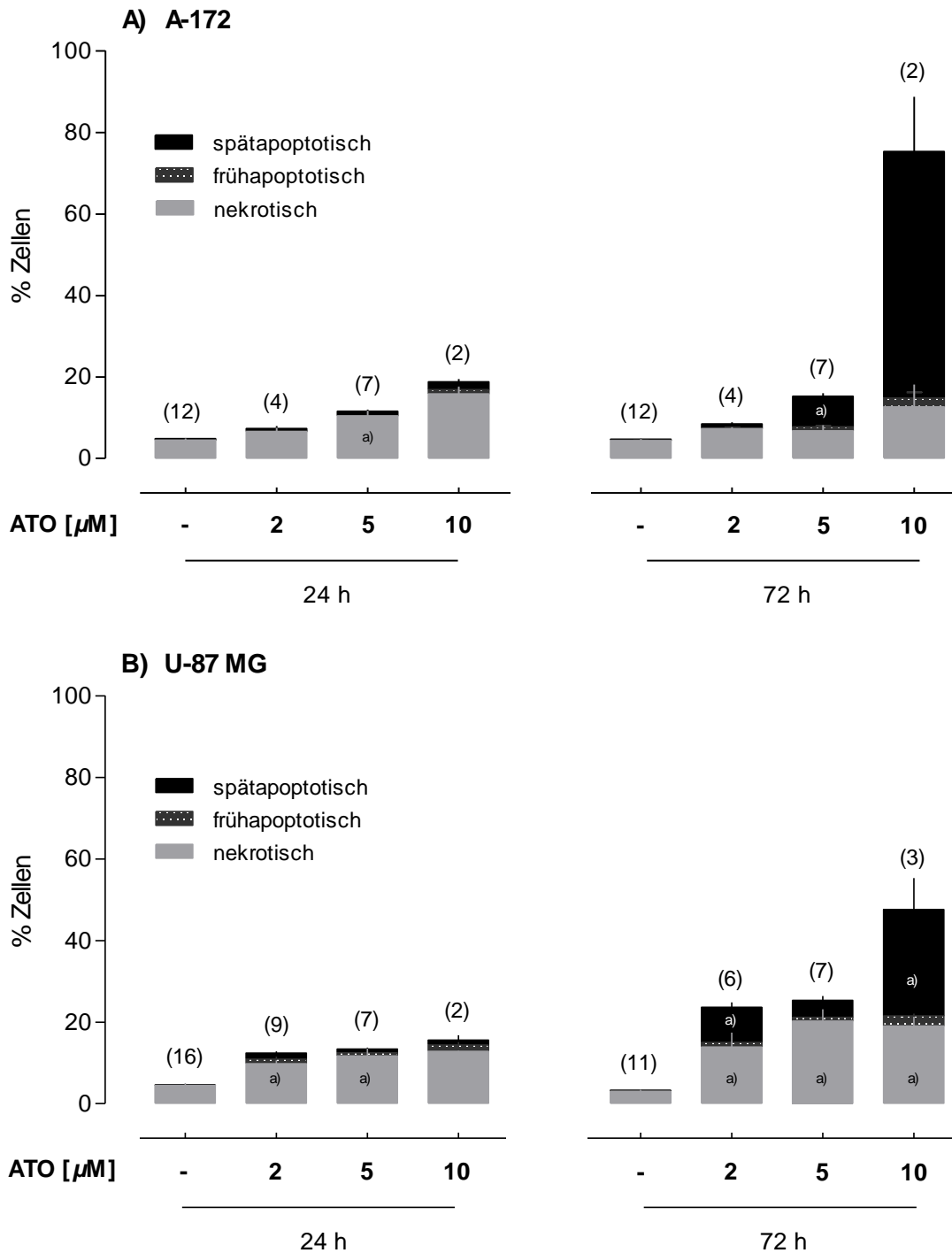


gesamten Zellpopulation liegt bei Konzentrationen bis zu 5  $\mu\text{M}$  ATO im Bereich der Kontrolle. Bei 10 und 20  $\mu\text{M}$  ATO steigt der Anteil der Zellen, die Trypanblau aufnehmen, konzentrationsabhängig an. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass ATO bis zu 5  $\mu\text{M}$  zytostatisch auf U-87 MG Zellen wirkt, während es bei höheren Konzentrationen zusätzlich eine zytoletale Wirkung entfaltet. Nach 72 h agieren 2 und 5  $\mu\text{M}$  ATO ebenfalls zytostatisch. In den mit diesen Konzentrationen exponierten Schalen findet, absolut betrachtet, keine Verringerung der Zellzahl im Vergleich zur ausgesäten statt. Weiterhin ist keine Zunahme der trypanblau-positiven Fraktion zu beobachten. Höhere Konzentrationen an ATO wurden nicht getestet. Aufgrund der Ergebnisse der Proliferationshemmversuche kann man davon ausgehen, dass hier nach 72 h keine Zellen mehr zu finden sind (vgl. Abb. 4-5).

#### *B) Fluoreszenzmikroskopie*

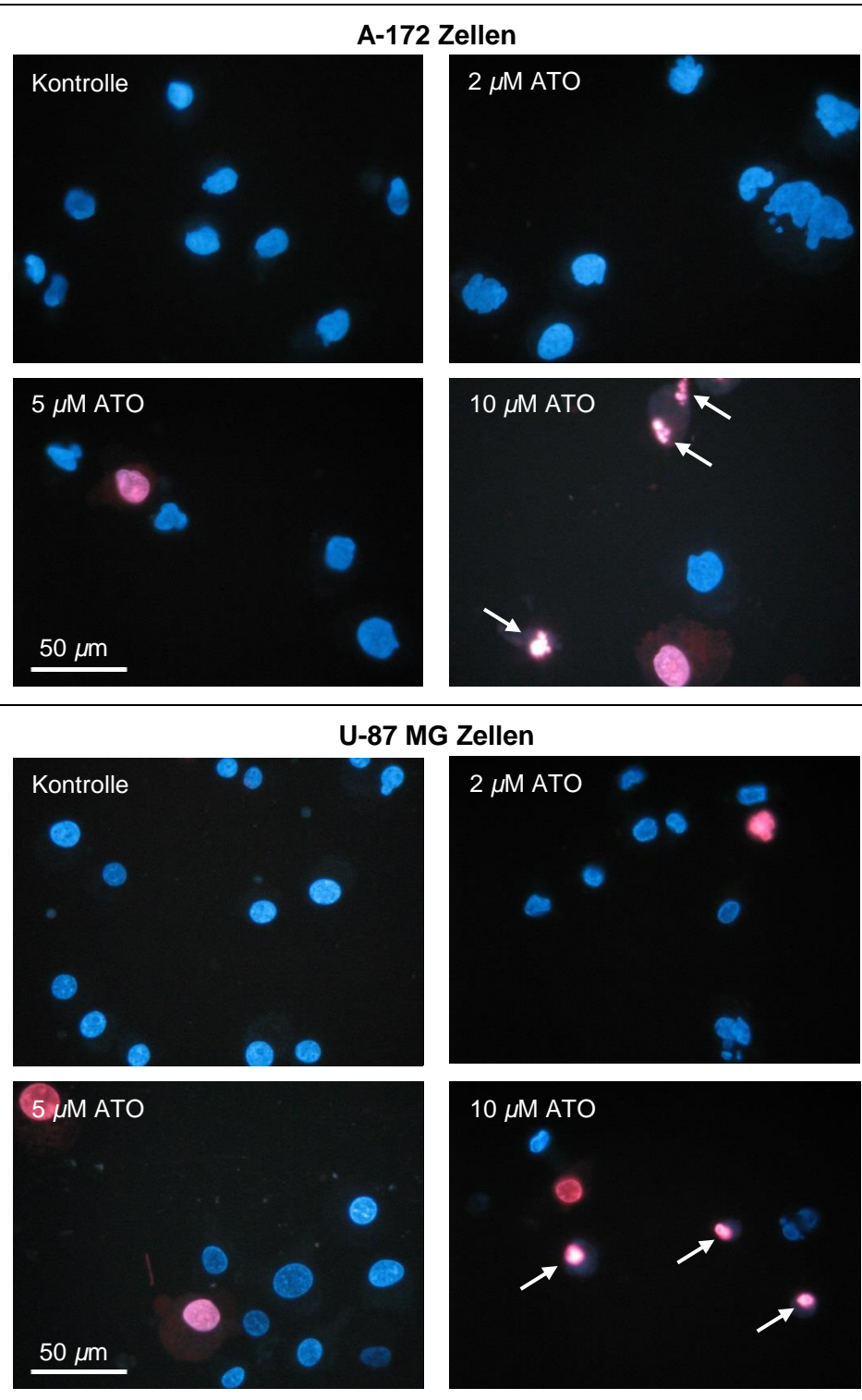
Um zu prüfen, ob ATO (2 - 10  $\mu\text{M}$ ) apoptotischen und/oder nekrotischen Zelltod bei den untersuchten Glioma-Zelllinien auslöst, wurden morphologische Veränderungen ihrer Zellkerne nach einer 24 h- und 72 h-Exposition am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Wie in Abbildung 4-65 zu erkennen, tritt bei einer Exposition von A-172 und U-87 MG Zellen über 24 h mit ATO-Konzentrationen bis zu 10  $\mu\text{M}$  keine Apoptose auf. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ist nur eine geringe Zunahme der nekrotischen Population zu erkennen. Bei A-172 Zellen beträgt der Nekroseanteil 6,5% (2  $\mu\text{M}$ ) bis 15,8% (10  $\mu\text{M}$ ). Bei U-87 MG Zellen liegt dieser unabhängig von der eingesetzten ATO-Konzentration bei ca. 10%. Nach einer 72 h-Exposition ist bei A-172 Zellen eine Induktion von Apoptose ab 5  $\mu\text{M}$  zu erkennen (vorwiegend Spätapoptose). Insgesamt sterben hier 8,5% der Zellen apoptotisch. Dieser Effekt verstärkt sich durch den Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  ATO deutlich auf 62,7%. Der Anteil nekrotischer A-172 Zellen bleibt mit 7,3% (2  $\mu\text{M}$ ) bis 12,7% (10  $\mu\text{M}$ ) niedrig. Bei U-87 MG Zellen sind nach einer 72 h-Behandlung mit den beiden niedrigeren ATO-Konzentrationen bis zu 10% der Zellen apoptotisch. Ein deutlicher Anstieg an Apoptose ist wie bei A-172 Zellen erst ab 10  $\mu\text{M}$  ATO zu erkennen (28,6%). Auch hier ist hauptsächlich Spätapoptose zu beobachten. Der Prozentsatz nekrotischer U-87 MG Zellen beträgt ca. 15% (2  $\mu\text{M}$  ATO) bis 20% (5 und 10  $\mu\text{M}$  ATO).

Abbildung 4-66 zeigt nochmals typische Aufnahmen von A-172 und U-87 MG Zellen am Fluoreszenzmikroskop nach einer Exposition mit ATO über 72 h. Es wird verdeutlicht, dass apoptotischer Zelltod bei beiden Zelllinien erst ab 10  $\mu\text{M}$  ATO ausgeprägt ist, wobei Spätapoptose vorherrscht.



**Abbildung 4-65: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 und U-87 MG Zellen durch Arsentrioxid**

A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) wurden über 24 bzw. 72 h mit ATO behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (vgl. 3.6.4). Zu jeder Konzentration wurden (n) Versuche durchgeführt. Dargestellt sind jeweils die %-Anteile nekrotischer sowie früh- und spätapoptotischer Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. Die Ergebnisse sind gezeigt als MW  $\pm$  SEM, wenn  $n > 2$  Versuche. <sup>a)</sup> $p < 0,05$  vs. Kontrolle, bezogen auf Gesamtapoptose bzw. Nekrose (ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparison test*).



**Abbildung 4-66: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kerne von A-172 und U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid**

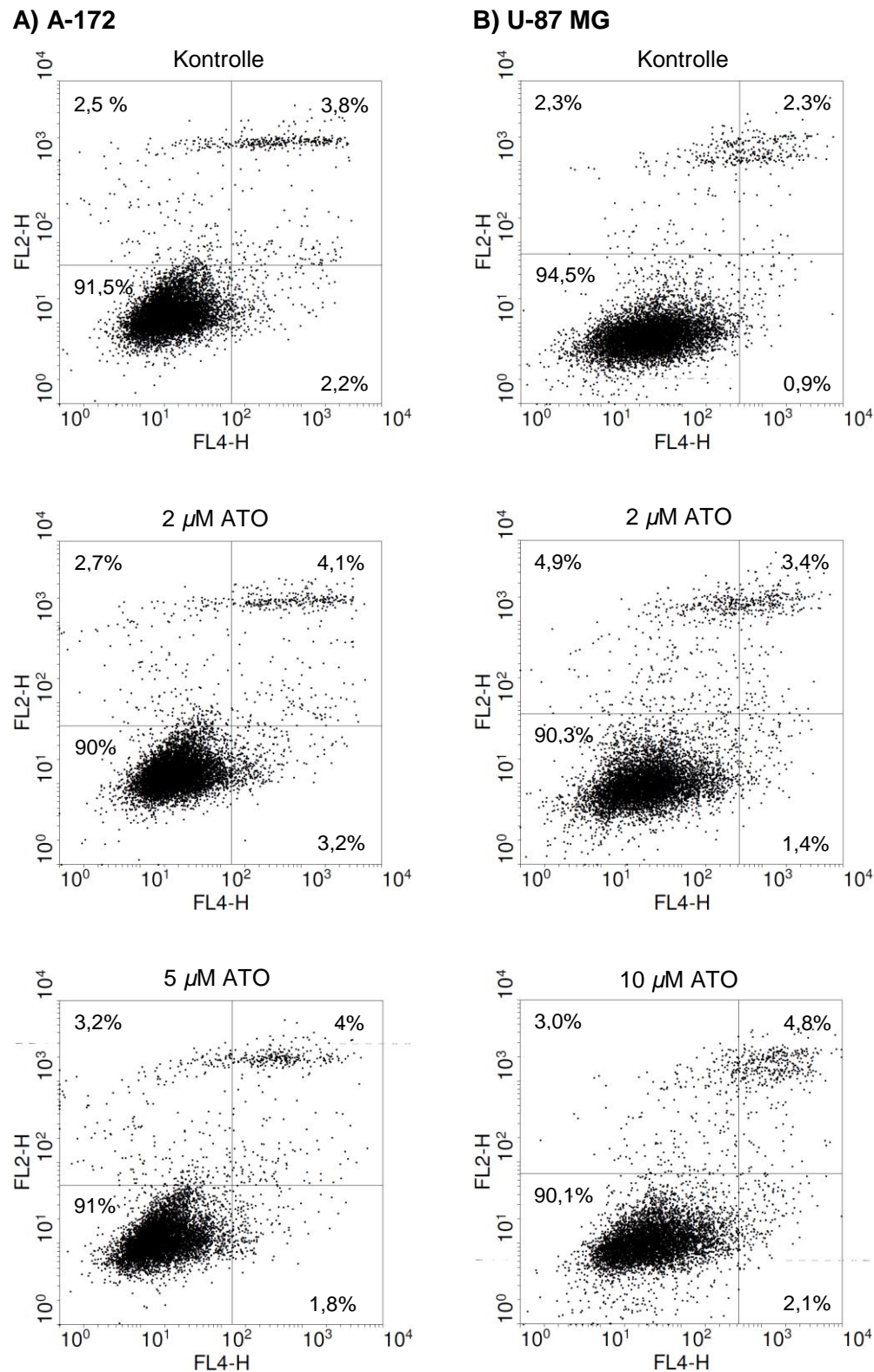
A-172 und U-87 MG Zellen wurden über 72 h mit ATO exponiert und anschließend mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt (vgl. 3.6.4). Die Aufnahmen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) und angeschlossener Digitalkamera (Canon Power Shot A620). Dargestellt ist jeweils ein typisches Gesichtsfeld. Die Pfeile kennzeichnen apoptotische Zellen.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigen grundsätzlich, dass ATO in beiden Zelllinien ganz anders als ST wirkt. Wenn ATO Apoptose induziert, dann mit einer anderen Zeitabhängigkeit. Bei einer Exposition mit ATO ist apoptotischer Zelltod erst nach einer Exposition über 72 h zu erkennen. ST löst bereits nach 24 h deutliche Effekte aus (vgl. 4.5.1A).

### C) *PI/Annexin V-Färbung*

Für den Nachweis eines frühen Stadiums an Apoptose wurden A-172 und U-87 MG Zellen nach einer 24 h-Exposition mit verschiedenen ATO-Konzentrationen einer PI/Annexin V-Färbung unterzogen. Wie an den Streudiagrammen der Abbildung 4-67 zu erkennen ist, führt ATO bei beiden Zelllinien zu keiner Verlagerung der vitalen Fraktion in den unteren linken Quadranten, was ein Zeichen für Frühapoptose wäre. Es findet auch keine Verschiebung der Zellen in die beiden oberen Quadranten statt, was auf das Vorliegen von Spätapoptose und/oder Nekrose hindeuten würde. Diese Ergebnisse stimmen mit den 24 h-Messungen der Fluoreszenzmikroskopie überein (vgl. Abb. 4-65).

Aufgrund von theoretischen Erwägungen und der Ergebnisse mit ST (vgl. 4.5.1C) wurde nach einer 72 h-Exposition mit ATO keine Färbung mit PI und Annexin V vorgenommen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die Zellen beider Linie zu diesem Zeitpunkt schon spätapoptotisch oder aber nekrotisch sind. Wie sich bereits in den Versuchen mit ST zeigte, können die Ergebnisse des PI/Annexin V-Färbetests in diesem Fall nicht interpretiert werden, da keine Trennung der spätapoptotischen Population von der nekrotischen möglich ist. In den späteren Versuchen mit Genistein, Quercetin und BSO (s.u.) sind ausschließlich Analysen der Kernmorphologie und des Zellzyklus durchgeführt worden. Dort fand außerdem keine Differenzierung mehr zwischen Früh- und Spätapoptose statt.



**Abbildung 4-67: Bindung von APC Annexin V und Aufnahme von PI durch A-172 und U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid**

A-172 (A) und U-87 MG Zellen (B) wurden über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an ATO exponiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen APC Annexin V sowie PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die Streudiagramme jeweils einer repräsentativen Messung.

#### D) Zellzyklusanalyse

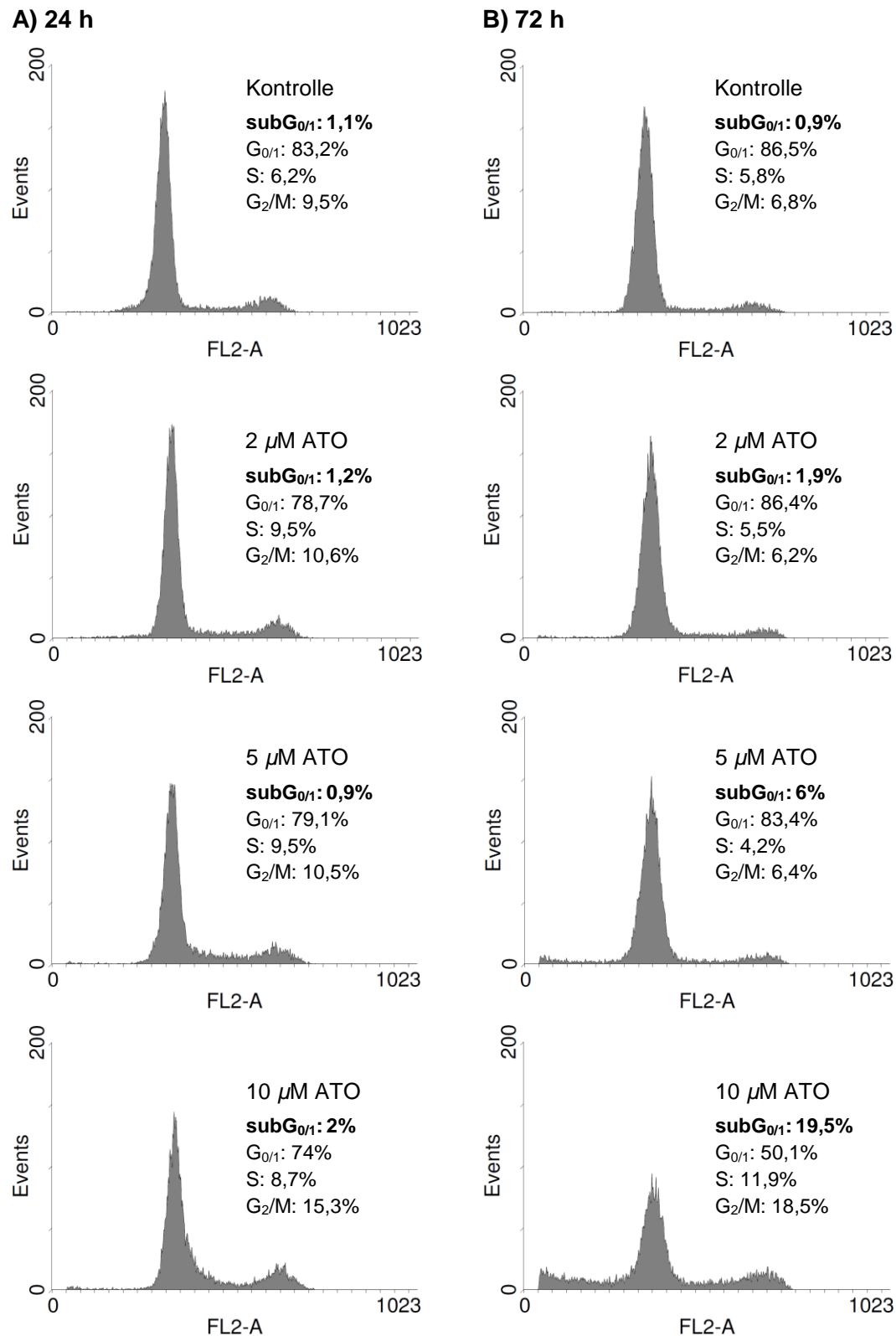
Weiterhin wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Diese gaben Aufschluss über das Zellzyklusprofil von A-172 und U-87 MG Zellen nach einer 24 h- und 72 h-Exposition mit ATO. Zudem lieferten sie Hinweise auf apoptotischen Zelltod. Abbildungen 4-68 und 4-69 zeigen repräsentative DNA-Histogramme.

Das Zellzyklusprofil unbehandelter A-172 Zellen verändert sich im betrachteten Zeitraum nicht. Der größte Anteil der Population befindet sich mit 83,2% (24 h) bzw. 86,5% (72 h) in der  $G_{0/1}$ -Phase. ATO zeigt erst nach 72 h bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine deutliche Wirkung auf das Zellzyklusprofil von A-172 Zellen. Bei dieser Expositionsbedingung nimmt die  $G_{0/1}$ -Population auf 50,1% ab. Damit verbunden kommt es zu einem Anstieg der sub $G_{0/1}$ -Fraktion (19,5%). Dies deutet auf eine Induktion von Apoptose hin.

Bei unbehandelten U-87 MG Zellen finden bei längerer Kultivierung Veränderungen im Zellzyklus statt. Bei der 24 h-Messung liegen 68% der Kontrollzellen in der  $G_{0/1}$ -Phase. Weitere 12,3% bzw. 19,3% verteilen sich auf die S- bzw.  $G_2/M$ -Phase. 48 h später ist eine Anhäufung der Zellen in der  $G_{0/1}$ -Phase (85,4%) zu erkennen. Dies geschieht auf Kosten der S- sowie der  $G_2/M$ -Population. ATO induziert bei einer Exposition über 24 h bei allen getesteten Konzentrationen einen Arrest in der  $G_2/M$ -Phase (~ 30%). Dies geht mit einem Rückgang der  $G_{0/1}$ -Population einher. Nach 72 h befinden sich bei einer Exposition mit 2  $\mu\text{M}$  ATO bereits 54,4% der U-87 MG Zellen in der  $G_2/M$ -Phase, während sich nur noch 29,4% in der  $G_{0/1}$ -Phase aufhalten. Höhere ATO-Konzentrationen bewirken keine zeitabhängige Wirkung. Die nach 24 h hervorgerufene Arretierung in der  $G_2/M$ -Phase durch 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  ATO bleibt auch bei einer Exposition über 72 h bestehen. Eine Induktion von Apoptose durch ATO zeigt sich bei U-87 MG Zellen wie bei A-172 Zellen erst nach 72 h bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Der Anteil der sub $G_{0/1}$ -Fraktion beträgt hier 8,3%.

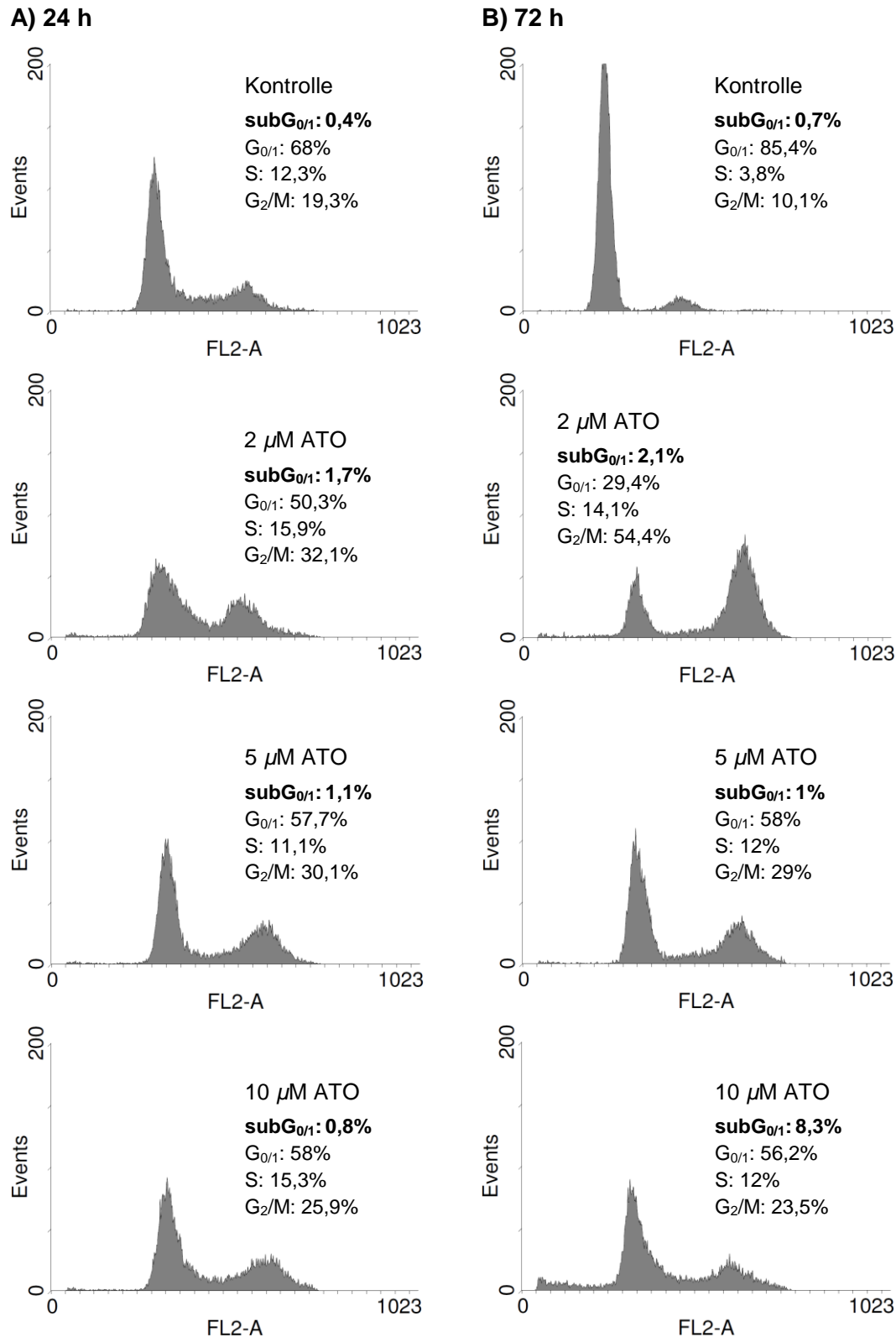
Zusammengefasst: Bei beiden Zelllinien induziert ATO nach 24 h selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) keine Apoptose. Apoptotischer Zelltod tritt erst nach 72 h und dann auch nur bei 10  $\mu\text{M}$  ATO in nennenswertem Ausmaß auf. Dabei ist der Anteil bei A-172 Zellen (19,5%) etwa doppelt so hoch wie bei U-87 MG Zellen. Grundsätzlich stimmen die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse gut mit denen der Analyse der Kernmorphologie überein (vgl. 4.5.2B). Allerdings ergab Letztere insbesondere bei A-172 Zellen deutlich höhere Anteile apoptotischer Zellen nach 72 h.





**Abbildung 4-68: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit ATO**

A-172 Zellen wurden über 24 bzw. 72 h mit ATO exponiert. Anschließend folgte eine Färbung mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung, in denen die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW aus  $n \geq 2$  Experimenten vermerkt ist.



**Abbildung 4-69: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit ATO**

U-87 MG Zellen wurden über 24 bzw. 72 h mit ATO exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung, in denen die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW aus  $n \geq 3$  Experimenten vermerkt ist.



### 4.5.3 Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen

Um die Wirkung von ATO (5  $\mu\text{M}$ ) und Genistein bzw. Quercetin (20 und 50  $\mu\text{M}$ ) auf den Zelltod von A-172 und U-87 MG Zellen sowie deren Zellzyklusprofil zu bestimmen, erfolgte nach einer Exposition über 24 sowie 72 h eine morphologische Analyse der Zellkerne am Fluoreszenzmikroskop und eine Zellzyklusanalyse mithilfe von Durchflusszytometrie (vgl. 3.6.4). Die verwendeten Konzentrationen an ATO und den Polyphenolen, aber auch an ATO und BSO (s.u.) wurden im Hinblick auf ihre proliferationshemmende Wirkung ausgesucht. Bei den gewählten Konzentrationen lösten die Substanzen in den Kombinationsversuchen zur Proliferationshemmung noch keinen vollständigen Zellverlust aus (vgl. 4.2.3 und 4.2.4).

#### 4.5.3.1 Arsentrioxid und Genistein

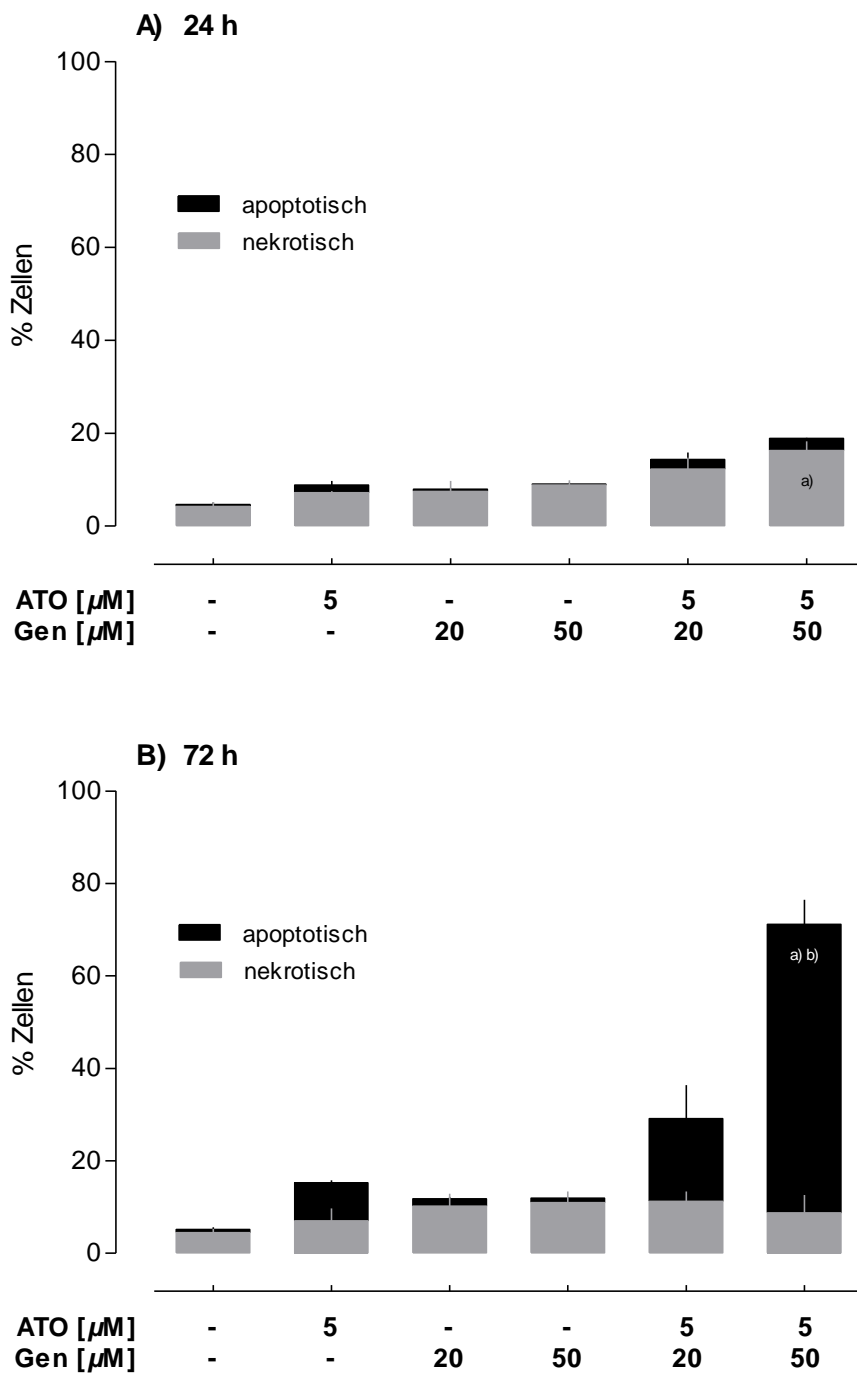
##### A) A-172 Zellen

Abbildung 4-70 gibt zunächst die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie für A-172 Zellen nach einer Behandlung mit ATO und Genistein wieder. 5  $\mu\text{M}$  ATO lösen bei A-172 Zellen nur geringfügig und erst nach einer Exposition über 72 h Apoptose aus (8,2%). Der Anteil an Zellen, der nekrotisch zugrunde geht, beträgt zu beiden Messzeitpunkten ca. 7%. Genistein führt bei A-172 Zellen sowohl nach 24 als auch nach 72 h nicht zum apoptotischen Zelltod. Nekrotisch gehen durch Genistein ca. 10% der Zellen zugrunde. Die Kombinationswirkung der beiden Agentien ist stark von der Behandlungsdauer, aber auch von der Genistein-Konzentration abhängig. Nach 24 h sterben 12,3% (+ 20  $\mu\text{M}$  Genistein) bzw. 16,2% (+ 50  $\mu\text{M}$  Genistein) der gezählten Zellen nekrotisch. Apoptotische Zellen sind nach 24 h entsprechend einer Behandlung mit den beiden Einzelsubstanzen kaum zu finden. Nach 72 h ist dagegen eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellpopulation zu erkennen. Während ATO und Genistein einzeln kaum Apoptose auslösen, steigt der Anteil apoptotischer Zellen bei einer Kombination von ATO und 20  $\mu\text{M}$  Genistein auf 17,9% an. In Anwesenheit von ATO und 50  $\mu\text{M}$  Genistein sterben 62,3% aller analysierten Zellen durch Apoptose. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle sowie zur Apoptoseinduktion durch ATO allein ist allerdings nur bei einer Kombination von ATO mit 50  $\mu\text{M}$  Genistein gegeben. Der Anteil nekrotischer Zellen bleibt nach 72 h mit jeweils ca. 10% niedrig.

In Abbildung 4-71 ist die Verteilung von A-172 Zellen im Zellzyklus nach einer Behandlung mit ATO und Genistein dargestellt. Einzelne DNA-Histogramme sind im Anhang zu finden (Abb. 7-1, S. 202). Das Zellzyklusprofil unbehandelter A-172 Zellen bleibt

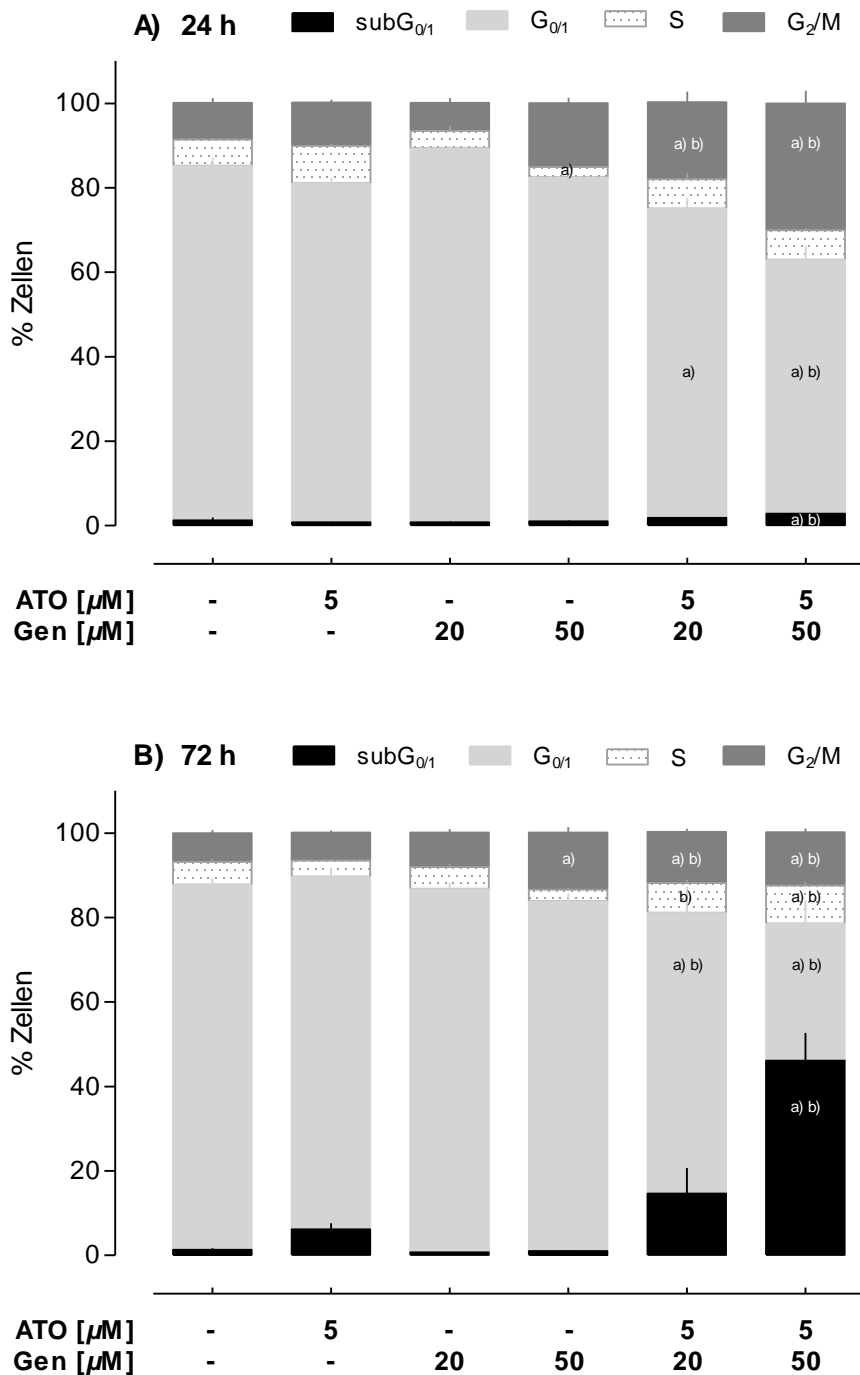
über den betrachteten Zeitraum nahezu konstant. Der größte Anteil der Population befindet sich in der  $G_{0/1}$ -Phase (~ 85%). 5  $\mu\text{M}$  ATO und 20 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Genistein besitzen einzeln nur einen geringen Einfluss auf die Verteilung von A-172 Zellen im Zellzyklus und führen zu keinem Anstieg des sub $G_{0/1}$ -Peaks, was als Indiz für die Induktion von Apoptose zu werten wäre. Bei gleichzeitiger Behandlung von A-172 Zellen mit ATO und Genistein erfolgt eine von der Genistein-Konzentration sowie der Expositionszeit abhängige Anhäufung der Zellen in der sub $G_{0/1}$ -Phase. Der Anteil apoptotischer Zellen nach 24 h liegt bei lediglich 1,8% (+ 20  $\mu\text{M}$  Genistein) bzw. 2,8% (+ 50  $\mu\text{M}$  Genistein), steigt nach 72 h aber deutlich auf 14,6% bzw. 46% an. Der Unterschied zur Kontrolle sowie zur Wirkung von ATO allein ist zu beiden Expositionszeiten nur für die Kombination aus ATO und 50  $\mu\text{M}$  Genistein statistisch signifikant. Die Ko-Exposition von A-172 Zellen mit ATO und Genistein geht auch mit weiteren Veränderungen im Zellzyklus einher. Nach 24 h findet ein konzentrationsabhängiger Rückgang der  $G_{0/1}$ -Population auf 73,1% (+ 20  $\mu\text{M}$  Genistein) bzw. auf 60,1% (+ 50  $\mu\text{M}$  Genistein) statt. Damit verbunden kommt es zu einem vorübergehenden Arrest der Zellen in der  $G_2$ /M-Phase, was auf eine zytostatische Wirkungsweise hindeutet. Bei gleichzeitigem Einsatz von ATO und 20  $\mu\text{M}$  Genistein befinden sich 18,1% und bei gleichzeitiger Verwendung von ATO und 50  $\mu\text{M}$  Genistein 30,1% der Zellen in der  $G_2$ /M-Phase. Nach 72 h sinkt die  $G_{0/1}$ -Population weiter auf 66,3% (+ 20  $\mu\text{M}$  Genistein) bzw. auf 32,3% (+ 50  $\mu\text{M}$  Genistein). Die zuvor arretrierte  $G_2$ /M-Population nimmt ebenfalls ab, jeweils auf etwa 12%. Die Zellen gehen vermehrt in die sub $G_{0/1}$ -Phase über.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: Die Resultate der Zellzyklusanalyse stimmen mit denen der Analyse der Kernmorphologie überein. Nach einer Exposition über 72 h wird die Induktion von Apoptose bei A-172 Zellen durch eine Kombination von ATO mit Genistein deutlich verstärkt. Die hier beobachteten Effekte passen damit zu den Ergebnissen der Proliferationshemmversuche, in denen sich bereits zeigte, dass die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf A-172 Zellen durch Genistein synergistisch verstärkt wird (vgl. 4.2.3.1).



**Abbildung 4-70: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 Zellen durch Arsentrioxid und Genistein**

A-172 Zellen wurden über 24 h **(A)** bzw. 72 h **(B)** mit ATO und Genistein einzeln sowie in Kombination behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM der %-Anteile der apoptotischen und nekrotischen Fraktion an der jeweiligen Gesamtpopulation aus  $n = 3$  Experimenten. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. <sup>b)</sup> $p < 0,05$ : ATO + Gen vs. ATO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).



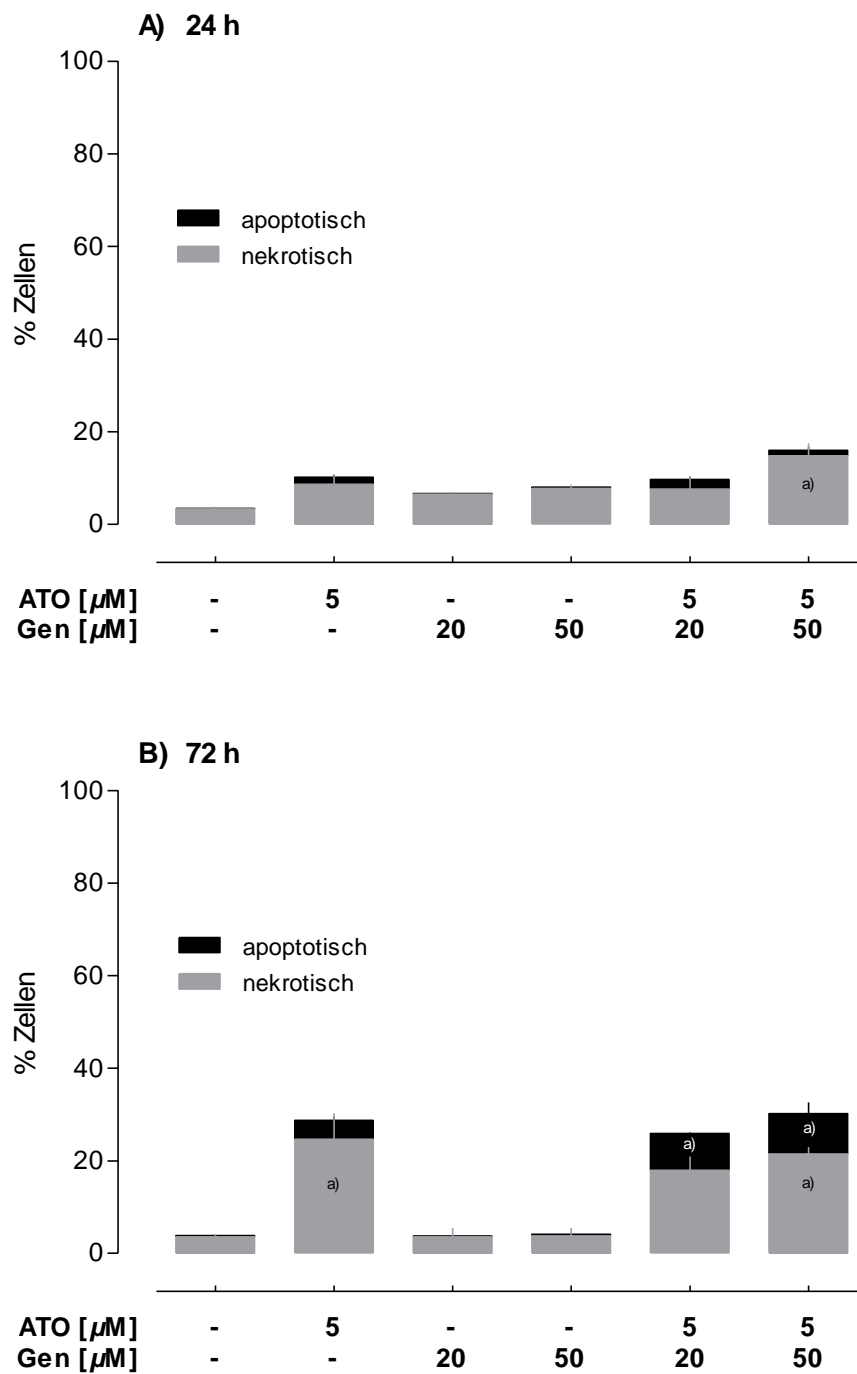
**Abbildung 4-71: Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein**

A-172 Zellen wurden über 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) mit ATO und Genistein einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  Versuchen. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. <sup>b)</sup> $p < 0,05$ : ATO + Gen vs. ATO allein (ANOVA mit Tukey's multiple comparison test).

### B) U-87 MG Zellen

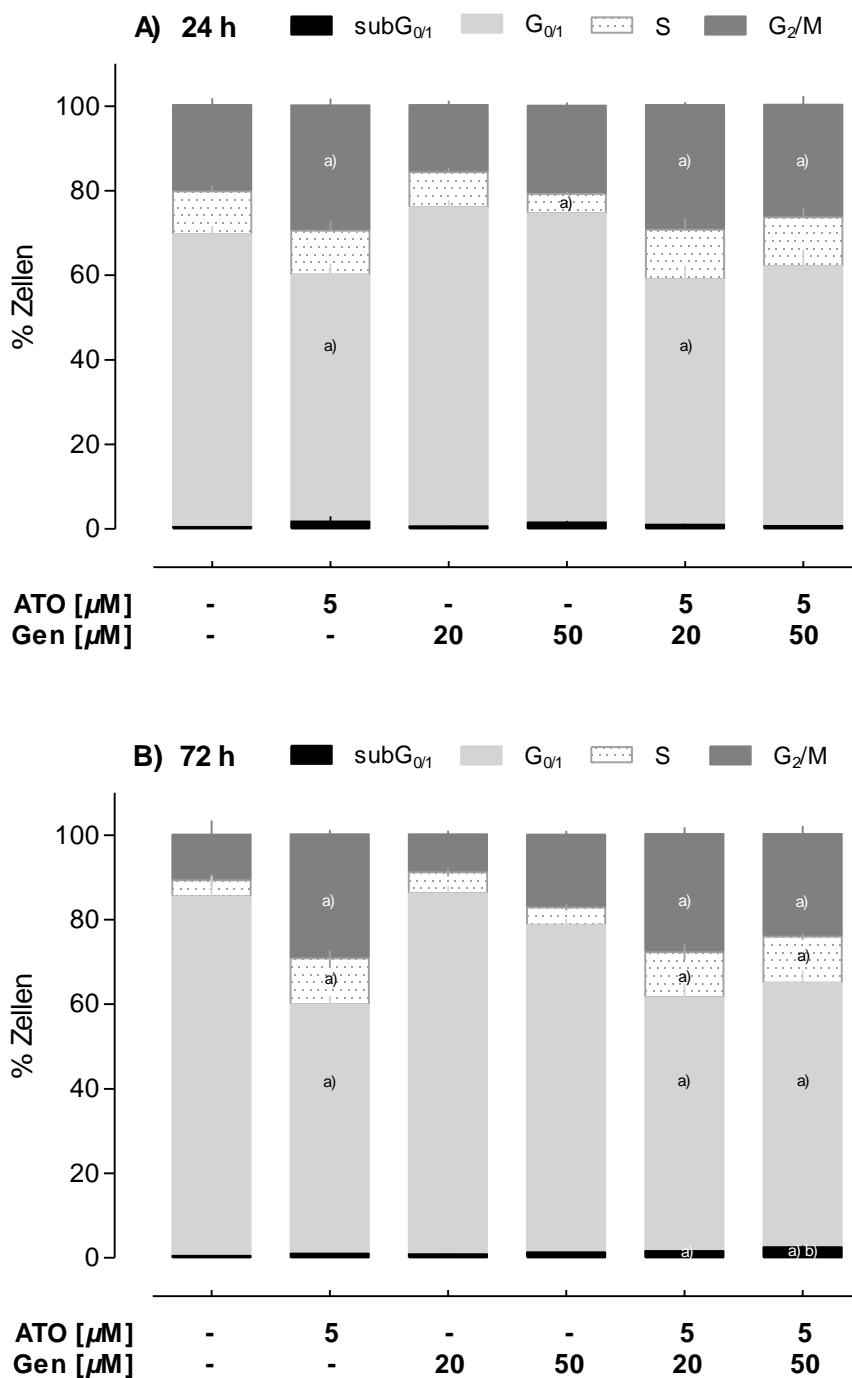
Abbildung 4-72 zeigt die Ergebnisse fluoreszenzmikroskopischer Messungen für U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit ATO und Genistein. Nach einer 24 h-Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  ATO beträgt der Anteil nekrotischer Zellen an der betrachteten Gesamtpopulation 8,7%. Nach 72 h sind es 24,6%. Der Anteil apoptotischer Zellen ist mit 1,5% (24 h) bzw. 4,1% (72 h) jeweils niedrig. Eine Inkubation von U-87 MG Zellen mit Genistein führt zu keiner Auslösung von Apoptose. Der Anteil nekrotischer Zellen entspricht zu beiden Messzeitpunkten dem Kontrollniveau. Genistein induziert also keinen Zelltod. Kombiniert man ATO und Genistein, so bewegen sich die Effekte jeweils im Bereich der mit ATO allein erzielten Wirkung. Nach einer Behandlung von U-87 MG Zellen über 24 h mit ATO und 20  $\mu\text{M}$  Genistein gehen 7,6% sämtlicher Zellen nekrotisch zugrunde. In Kombination mit 50  $\mu\text{M}$  Genistein sind es 14,8%. Apoptotisch sterben hier jeweils weniger als 2,5% der Zellen. Nach einer Ko-Exposition über 72 h sind in Kombination mit 20  $\mu\text{M}$  Genistein insgesamt 25,9% der analysierten Zellen nicht mehr vital. In Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Genistein sind es 30,2%. Apoptotisch sind davon lediglich 7,9% (+ 20  $\mu\text{M}$  Genistein) bzw. 8,7% (+ 50  $\mu\text{M}$  Genistein) der Zellen.

Abbildung 4-73 zeigt das Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen, welche mit ATO und Genistein exponiert wurden. Repräsentative DNA-Histogramme sind im Anhang zu finden (Abb. 7-2, S. 204). Verglichen mit der 24 h-Messung (69,2%) kommt es bei unbehandelten U-87 MG Zellen nach 72 h zu einer Zunahme der  $G_{0/1}$ -Population (85%). Damit verbunden tritt eine Verringerung der S- und  $G_2/M$ -Population auf. 5  $\mu\text{M}$  ATO führen nach einer 24 h-Exposition zu einem Rückgang der  $G_{0/1}$ -Population auf 58%. Dies geht mit einer Arretierung der Zellen in der  $G_2/M$ -Phase (29%) einher, welche auch nach 72 h zu beobachten ist. Genistein hat nur eine geringe Wirkung auf das Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen. Eine Erhöhung des sub $G_{0/1}$ -Peaks, als Zeichen für Apoptose, findet durch die beiden Einzelsubstanzen nicht statt. In Kombination führen ATO und Genistein zu einer statistisch signifikanten, jedoch äußerst geringen Induktion von Apoptose nach einer Exposition über 72 h. Durch ATO und 20  $\mu\text{M}$  Genistein sterben 1,6% und durch ATO und 50  $\mu\text{M}$  Genistein 2,5% der Zellen apoptotisch. Bei der Umverteilung aller anderen Zellzyklusphasen spiegelt sich in den Kombinationsversuchen sowohl nach 24 als auch nach 72 h die Wirkung von ATO allein wieder. Das Zellzyklusprofil der mit ATO und Genistein exponierten Zellen ist nahezu identisch mit dem Profil von Kulturen, die nur mit ATO behandelt wurden.



**Abbildung 4-72: Induktion von Apoptose und Nekrose bei U-87 MG Zellen durch Arsentrioxid und Genistein**

U-87 MG Zellen wurden mit ATO und Genistein einzeln sowie in Kombination behandelt. Nach 24 h **(A)** bzw. 72 h **(B)** wurden die Zellen mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (vgl. 3.6.4). Gezeigt sind die MW  $\pm$  SEM der %-Anteile der apoptotischen und nekrotischen Fraktion an der jeweiligen Gesamtpopulation aus  $n = 3$  Experimenten. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. nicht signifikant: ATO + Gen vs. ATO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).



**Abbildung 4-73: Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein**

U-87 MG Zellen wurden über 24 h **(A)** bzw. 72 h **(B)** mit ATO und Genistein einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW  $\pm$  SEM aus n = 3 Versuchen. <sup>a)</sup>p < 0,05: exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. <sup>b)</sup>p < 0,05: ATO + Gen vs. ATO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).

Kurz gefasst: Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und der Zellzyklusanalyse stimmen hinsichtlich der Apoptoseauslösung bei U-87 MG durch eine Kombination von ATO mit Genistein überein. In Anwesenheit von Genistein wird die Induktion von Apoptose durch ATO zu keinem Zeitpunkt verstärkt. Diese Ergebnisse passen damit zu den Daten der Proliferationshemmversuche (vgl. 4.2.3.1). Dort zeigte sich, dass Genistein und ATO in Kombination keinesfalls synergistisch, sondern additiv auf das Wachstum von U-87 MG Zellen wirken.

#### 4.5.3.2 Arsentrioxid und Quercetin

##### A) A-172 Zellen

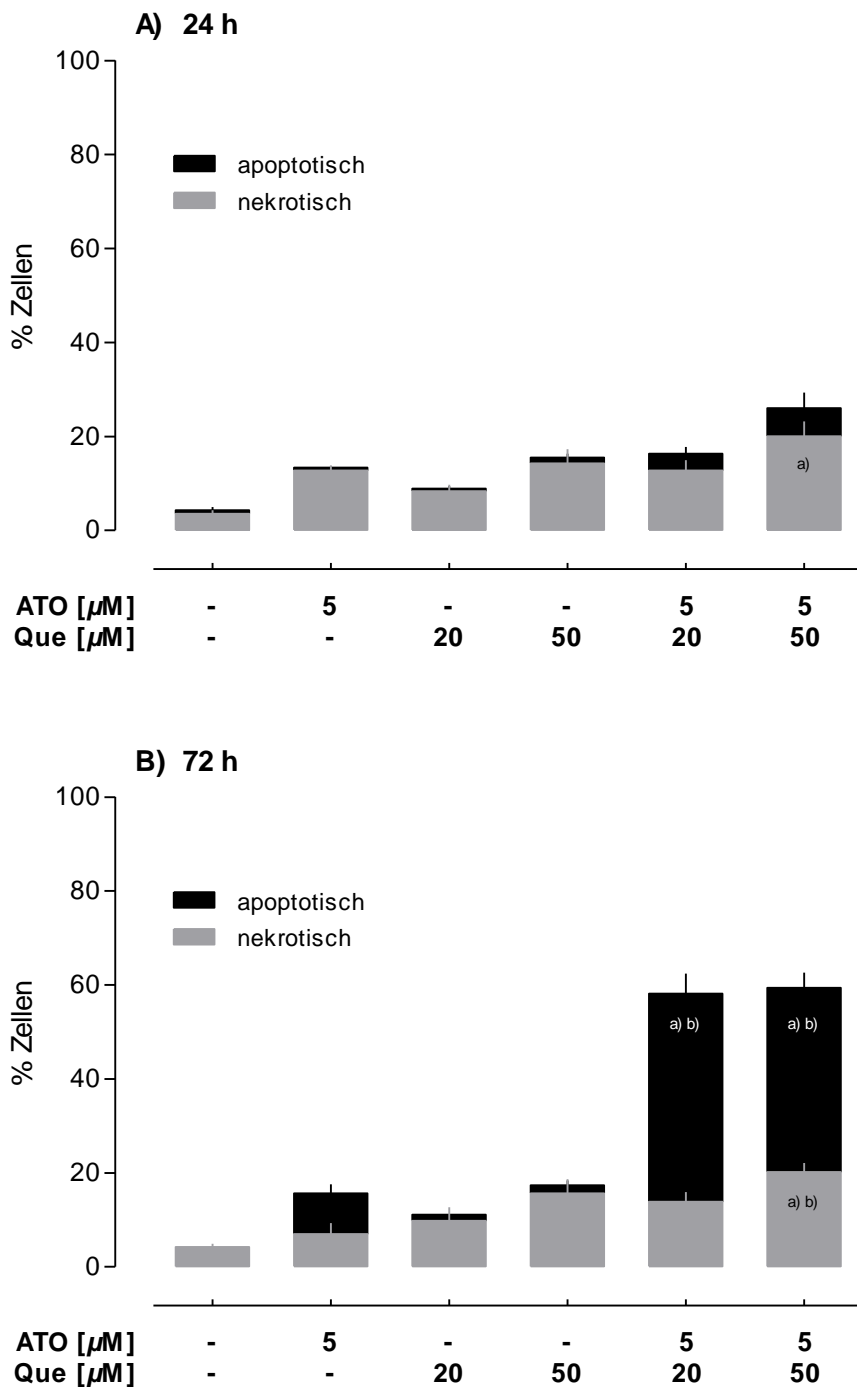
Abbildung 4-74 zeigt die Resultate fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen für A-172 Zellen nach einer Exposition mit ATO und Quercetin. 5  $\mu\text{M}$  ATO lösen nach 24 h ausschließlich nekrotischen Zelltod aus (12,8%). Nach 72 h gehen 7% aller gezählten Zellen nekrotisch und 8,6% apoptotisch zugrunde. Bei einer 24 h-Behandlung mit Quercetin sind 8,9% (20  $\mu\text{M}$ ) bzw. 15,5% (50  $\mu\text{M}$ ) der betrachteten Zellen nicht mehr vital. Nach 72 h ist der Prozentsatz mit 11,1% (20  $\mu\text{M}$ ) bzw. 17,4% (50  $\mu\text{M}$ ) ähnlich. Es tritt überwiegend Nekrose auf. Die Kombinationswirkung von ATO und Quercetin ist stark von der Behandlungsdauer abhängig. Nach einer 24 h Ko-Inkubation bewegen sich die erzielten Effekte auf dem Niveau der mit den beiden Einzelsubstanzen ausgelösten Wirkung. Qualitativ deutet sich jedoch ein Anstieg des apoptotischen Zelltodes an. Bei einer Ko-Exposition mit ATO und 20  $\mu\text{M}$  Quercetin sind insgesamt 16,3% der untersuchten Zellpopulation nicht mehr vital. Davon sind 3,6% apoptotisch. Durch ATO und 50  $\mu\text{M}$  Quercetin sterben 5,9% der Zellen apoptotisch und 20,1% nekrotisch. Bei Verlängerung der Expositionszeit auf 72 h tritt bei Kombination von ATO und den beiden Quercetin-Konzentrationen jeweils keine Zunahme an Nekrose im Vergleich zur 24 h-Messung auf. Es findet allerdings ein dramatischer Anstieg an Apoptose statt. Dieser Anstieg ist jeweils statistisch signifikant zur Kontrolle sowie zur Apoptoseinduktion durch ATO allein. Interessanterweise sind unter beiden Ko-Expositionsbedingungen insgesamt jeweils ca. 60% der Zellen nicht mehr intakt. Der zytoletale Effekt bzw. die Induktion von Apoptose wird in Anwesenheit der höheren Quercetin-Konzentration also nicht verstärkt. Bei Kombination von ATO mit 20  $\mu\text{M}$  Quercetin beträgt der Anteil an Apoptose 44,3%. Bei gleichzeitigem Einsatz von 50  $\mu\text{M}$  Quercetin ist er mit 39,2% ähnlich hoch.

In Abbildung 4-75 ist das Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit ATO und Quercetin dargestellt. Repräsentative DNA-Histogramme sind im Anhang zu



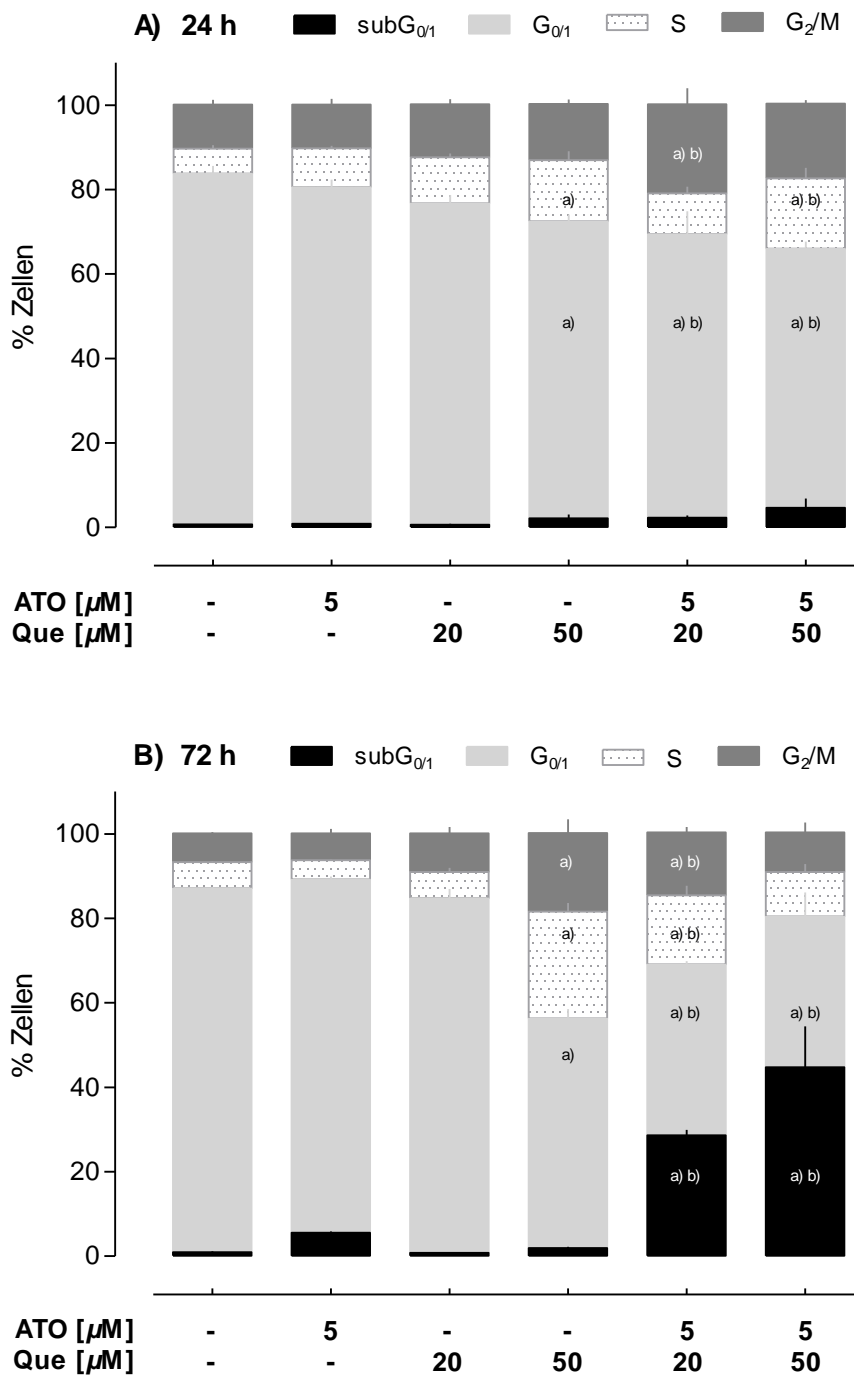
finden (Abb. 7-3, S. 206). Unbehandelte A-172 Zellen zeigen zu beiden Messzeitpunkten ähnliche Zellzyklusverteilungen. Die analysierte Population liegt mit 83% (24 h) bzw. 86% (72 h) in der  $G_{0/1}$ -Phase. ATO und Quercetin induzieren, einzeln appliziert, keine statistisch signifikante Erhöhung des sub $G_{0/1}$ -Peaks. Dies gilt für beide Expositionszeiten. 5  $\mu\text{M}$  ATO und 20  $\mu\text{M}$  Quercetin besitzen ebenfalls keine signifikante Wirkung auf die Verteilung von A-172 Zellen auf die anderen Zellzyklusphasen. 50  $\mu\text{M}$  Quercetin führen dagegen zu einer Verringerung der Population in der  $G_{0/1}$ -Phase. Dieser Effekt ist zeitabhängig. Nach 24 h befinden sich noch 70,2% der Zellen in der  $G_{0/1}$ -Phase, nach 72 h sind es nur noch 54,3%. Damit verbunden steigt der Anteil der Zellen in der S- sowie der  $G_2/M$ -Phase zeitabhängig an. Bei gleichzeitiger Behandlung von A-172 Zellen mit ATO und Quercetin bleibt der Anteil der sub $G_{0/1}$ -Fraktion nach 24 h unverändert niedrig. Es treten aber andere Effekte im Zellzyklus auf. Die  $G_{0/1}$ -Population sinkt jeweils zugunsten der S- und  $G_2/M$ -Population auf 67,1% (+ 20  $\mu\text{M}$  Quercetin) bzw. 61% (+ 50  $\mu\text{M}$  Quercetin). Nach 72 h ist eine deutliche, von der Quercetin-Konzentration abhängige Anhäufung der sub $G_{0/1}$ -Fraktion zu erkennen. 28,6% (+ 20  $\mu\text{M}$  Quercetin) bzw. 44,7% (+ 50  $\mu\text{M}$  Quercetin) der Zellen sind hier apoptotisch. Die Induktion von Apoptose ist jeweils statistisch signifikant zur Kontrolle sowie zur Wirkung von ATO allein. Damit verbunden sinkt der Anteil der Zellen in der  $G_{0/1}$ -Phase auf jeweils ca. 40%.

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Die Resultate der angewendeten Methoden liefern konsistente Befunde. Nach einer Exposition über 72 h wird die Induktion von Apoptose bei A-172 Zellen durch eine Kombination von ATO mit Quercetin deutlich verstärkt. Damit passen die hier beobachteten Effekte zu den Ergebnissen der Proliferationshemmversuche, in denen sich bereits zeigte, dass die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf A-172 Zellen durch Quercetin synergistisch verstärkt wird (vgl. 4.2.3.2).



**Abbildung 4-74: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 Zellen durch Arsentrioxid und Quercetin**

A-172 Zellen wurden über 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) mit ATO und Quercetin einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM der %-Anteile der apoptotischen und nekrotischen Fraktion an der jeweiligen Gesamtpopulation aus  $n = 3$  Versuchen. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. <sup>b)</sup> $p < 0,05$ : ATO + Que vs. ATO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).



**Abbildung 4-75: Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin**

A-172 Zellen wurden über 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) mit ATO und Quercetin einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM der prozentualen Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen aus  $n = 3$  Versuchen. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. <sup>b)</sup> $p < 0,05$ : ATO + Que vs. ATO allein (ANOVA mit Tukey's multiple comparison test).

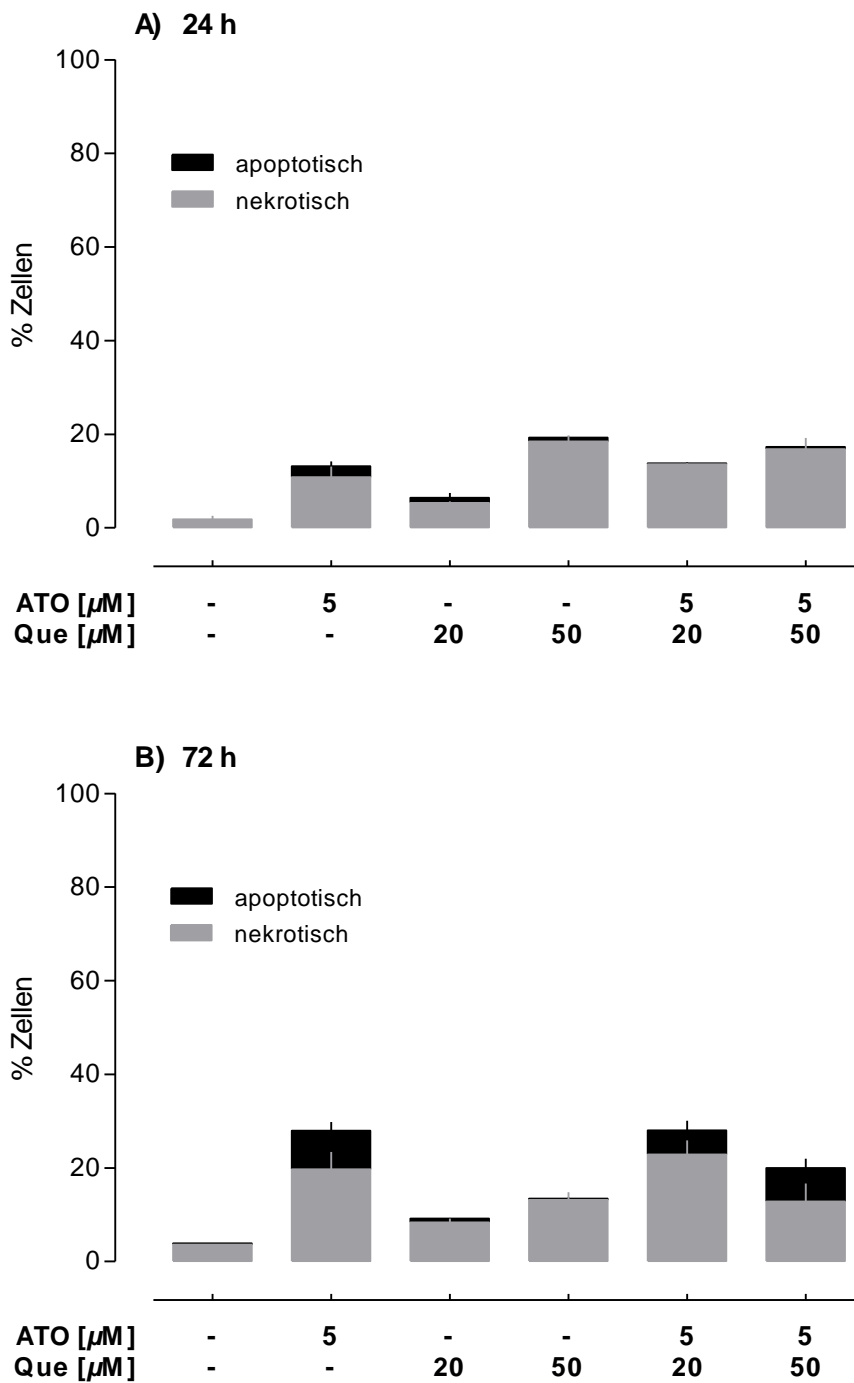
### B) U-87 MG Zellen

In Abbildung 4-76 sind die Ergebnisse fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen nach einer Exposition von U-87 MG Zellen mit ATO und Quercetin dargestellt. 5  $\mu\text{M}$  ATO lösen vorrangig nekrotischen Zelltod aus. Nach 24 h sind insgesamt 13,2% und nach 72 h 28% der gezählten Zellen nicht mehr vital. Davon sterben lediglich 2,4% bzw. 8,3% durch Apoptose. Quercetin zeigt eine von der Konzentration, aber nicht von der Expositionszeit abhängige Wirkung auf U-87 MG Zellen. Durch 20  $\mu\text{M}$  Quercetin gehen 6,4% (24 h) bzw. 9,2% (72 h) der Zellen zugrunde. 50  $\mu\text{M}$  Quercetin führen bei insgesamt 19,3% (24 h) bzw. 13,2% (72 h) der analysierten Population zum Untergang. Nekrotischer Zelltod ist jeweils vorherrschend. Eine 24 h-Ko-Exposition von U-87 MG Zellen mit ATO und Quercetin induziert bei 13,8% (+ 20  $\mu\text{M}$  Quercetin) bzw. bei 17,3% (+ 50  $\mu\text{M}$  Quercetin) der betrachteten Population Nekrose. Apoptotischer Zelltod tritt nicht auf. Nach 72 h sterben bei einer Behandlung mit ATO und 20  $\mu\text{M}$  Quercetin 22,9% der Zellen nekrotisch und 5,2% apoptotisch. In Kombination mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin ist der Prozentsatz der insgesamt nicht mehr intakten Zellen (20%) im Vergleich zur ATO-Wirkung allein sogar leicht vermindert. Von diesen Zellen sind 7,2% apoptotisch. Mit anderen Worten: Quercetin verstärkt die Wirkung von ATO auf U-87 MG Zellen nicht. Es findet auch keine Verschiebung des nekrotischen Zelltodes zugunsten des apoptotischen statt.

In Abbildung 4-77 ist die Verteilung von U-87 MG Zellen im Zellzyklus nach einer Exposition mit ATO und Quercetin zu sehen. Repräsentative DNA-Histogramme sind im Anhang zu finden (Abb. 7-4, S. 208). Bei unbehandelten U-87 MG Zellen liegt der größte Anteil der Population mit 71,8% (24 h) bzw. 88,9% (72 h) in die  $G_{0/1}$ -Phase. Sowohl eine separate als auch eine kombinatorische Inkubation von U-87 MG Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  ATO und 20 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Quercetin führt zu keinem Zeitpunkt zu einer Anhäufung der  $\text{sub}G_{0/1}$ -Fraktion und damit zur Induktion von Apoptose. Es treten aber andere Veränderungen im Zellzyklus auf. 5  $\mu\text{M}$  ATO führen nach einer 24 h-Exposition zu einem Rückgang der  $G_{0/1}$ -Population auf ca. 60%. Dies geht mit einer Arretierung der Zellen in der  $G_2/M$ -Phase ( $\sim 30\%$ ) einher, welche auch nach 72 h zu beobachten ist. Beim Einsatz von 20  $\mu\text{M}$  Quercetin erfolgt nach 24 h eine ähnliche Umverteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen wie durch eine Behandlung mit ATO allein. Nach 72 h steigt die durch 20  $\mu\text{M}$  Quercetin verminderte  $G_{0/1}$ -Population wieder an, was mit einem Rückgang der S- und der  $G_2/M$ -Population verbunden ist. 50  $\mu\text{M}$  Quercetin besitzen bei einer Inkubation über 24 h keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Nach 72 h ist die Zellzyklusverteilung der mit 50  $\mu\text{M}$  Quercetin behandelten Zellen vergleichbar mit der Verteilung, die sich nach einer Exposition mit ATO allein zeigt. Bei Kombination

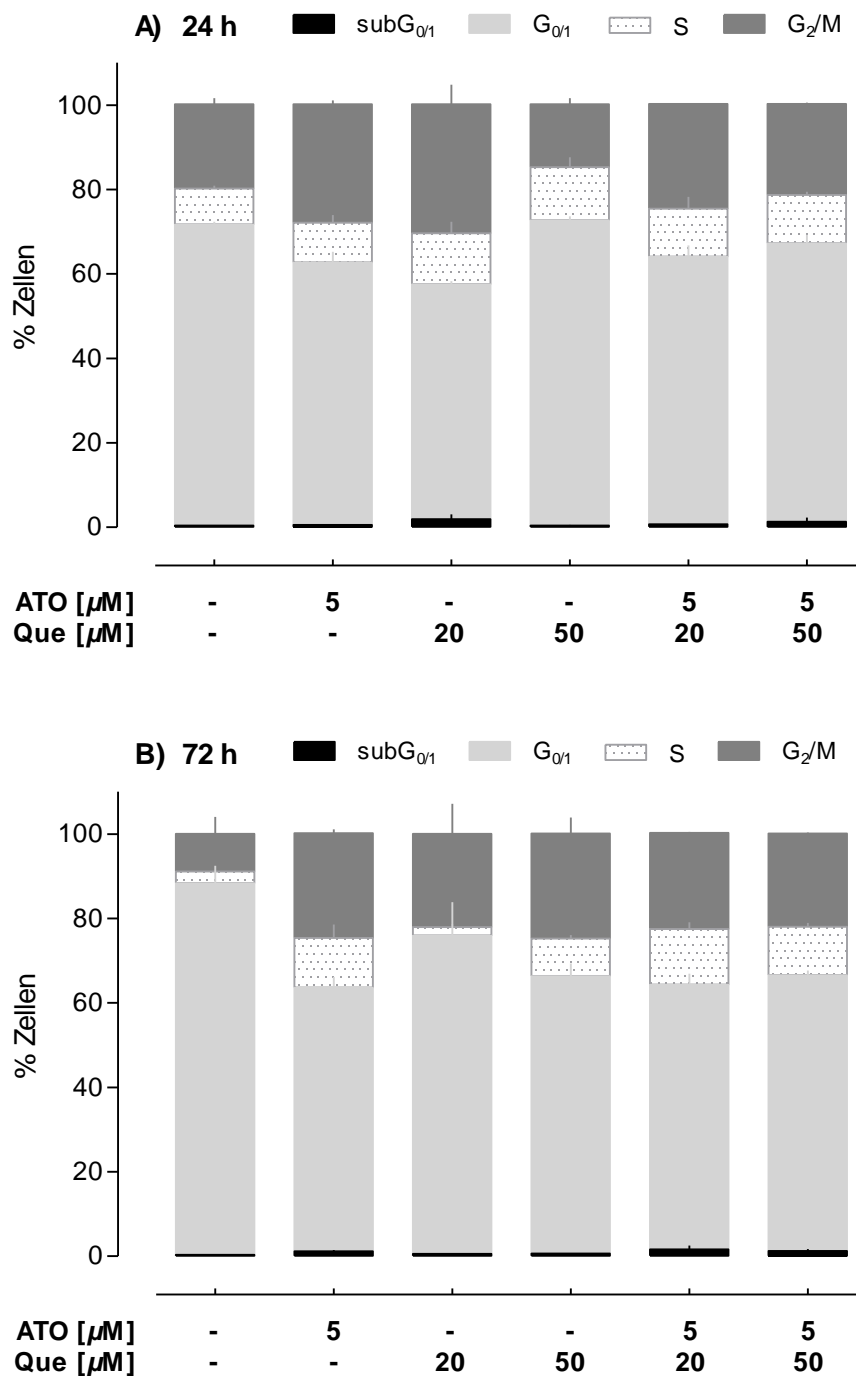
von ATO und Quercetin treten zu beiden Zeitpunkten jeweils nur die durch ATO bereits allein induzierten Effekte auf.

Zusammenfassend ist festzuhalten: Die angewendeten Methoden liefern hinsichtlich der Induktion von Apoptose bei U-87 MG Zellen durch eine Kombination von ATO mit Quercetin konsistente Ergebnisse. Die Wirkung von ATO auf den apoptotischen Zelltod von U-87 MG Zellen wird durch Quercetin nicht verstärkt. Die hier generierten Daten passen damit zu denen der Proliferationshemmversuche (vgl. 4.2.3.2). Dort zeigte sich, dass Quercetin und ATO in Kombination keinesfalls synergistisch, sondern sogar antagonistisch auf das Wachstum von U-87 MG Zellen wirken.



**Abbildung 4-76: Induktion von Apoptose und Nekrose bei U-87 Zellen durch Arsentrioxid und Quercetin**

U-87 Zellen wurden über 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) mit ATO und Quercetin einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die MW + Spannweite der %-Anteile der apoptotischen und nekrotischen Fraktion an der jeweiligen Gesamtpopulation aus  $n = 2$  Experimenten.



**Abbildung 4-77: Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsenitrioxid und Quercetin**

U-87 MG Zellen wurden über 24 h **(A)** bzw. 72 h **(B)** mit ATO und Quercetin einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW + Spannweite aus  $n = 2$  Experimenten.

#### 4.5.4 Kombination von Arsenitrioxid mit Buthioninsulfoximin

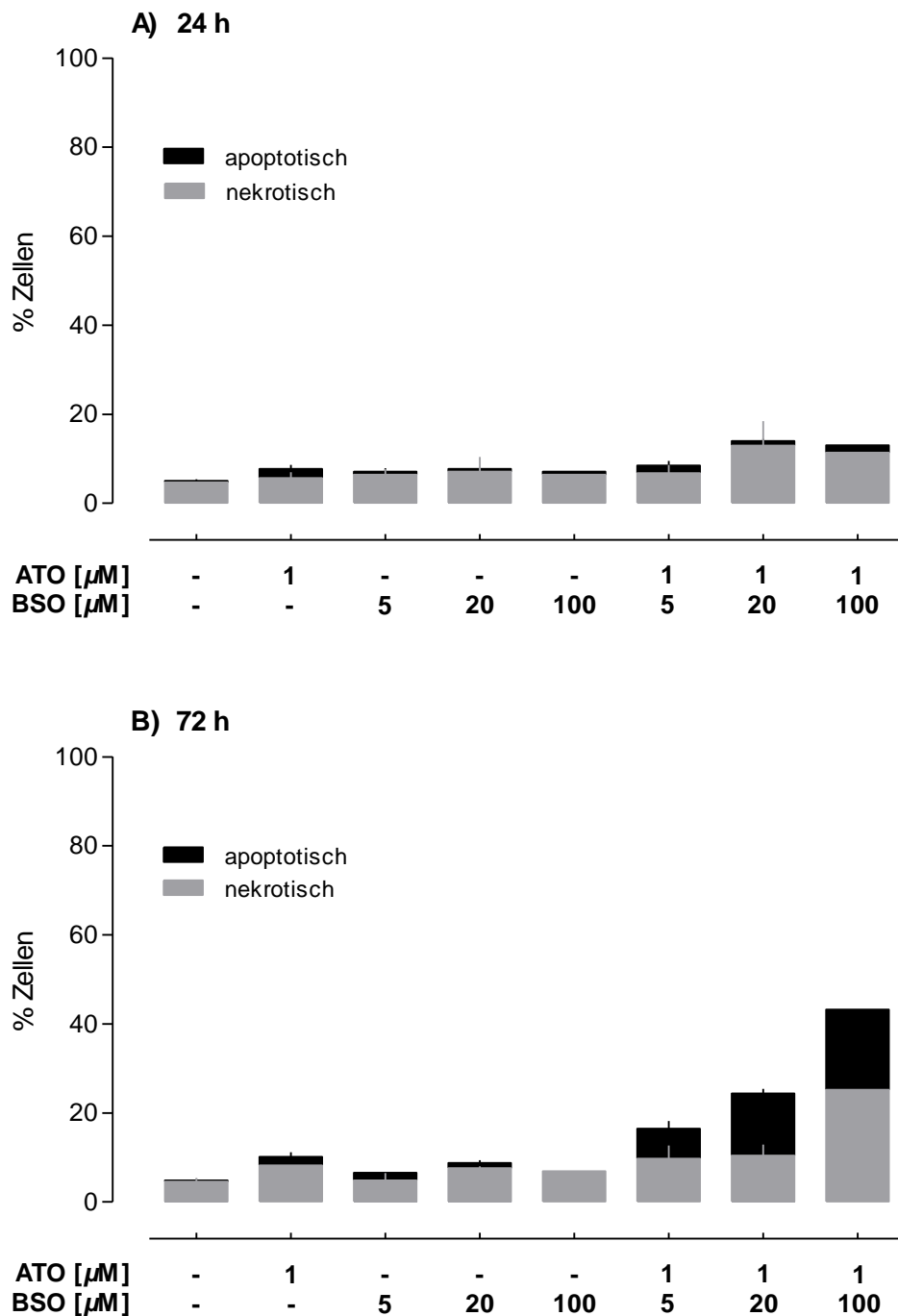
##### A) A-172 Zellen

Um die Wirkung von ATO und BSO (5, 20, 100  $\mu\text{M}$ ) auf den Zelltod von A-172 Zellen sowie deren Zellzyklusprofil zu bestimmen, wurde ATO zunächst bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  getestet. Gegenüber dieser ATO-Konzentration in Anwesenheit von BSO waren A-172 Zellen bei den Versuchen zur Proliferationshemmung nach 72 h bereits stark geschädigt (vgl. 4.2.4).

Abbildung 4-78 zeigt die Ergebnisse fluoreszenzmikroskopischer Messungen. 1  $\mu\text{M}$  ATO und BSO induzieren, einzeln appliziert, keinen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod bei A-172 Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle ist der Anteil der nicht mehr intakten Population in den mit den Einzelsubstanzen behandelten Gruppen zu beiden Messzeiten um maximal 5% erhöht. Das liegt im Rahmen der Streuung. Die Kombinationswirkung von 1  $\mu\text{M}$  ATO und BSO ist von der Expositionszeit und der gleichzeitig verwendeten BSO-Konzentration abhängig. Bei einer Ko-Exposition über 24 h wird die Wirkung von ATO auf den apoptotischen und nekrotischen Zelltod durch BSO nicht verstärkt. Es findet aber nach 72 h eine Verstärkung statt. Hier sterben 6,8% (+ 5  $\mu\text{M}$  BSO), 14% (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw. 18% (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO) der analysierten Population apoptotisch. Der Anteil nekrotischer Zellen steigt erst in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  BSO an (25,5%).

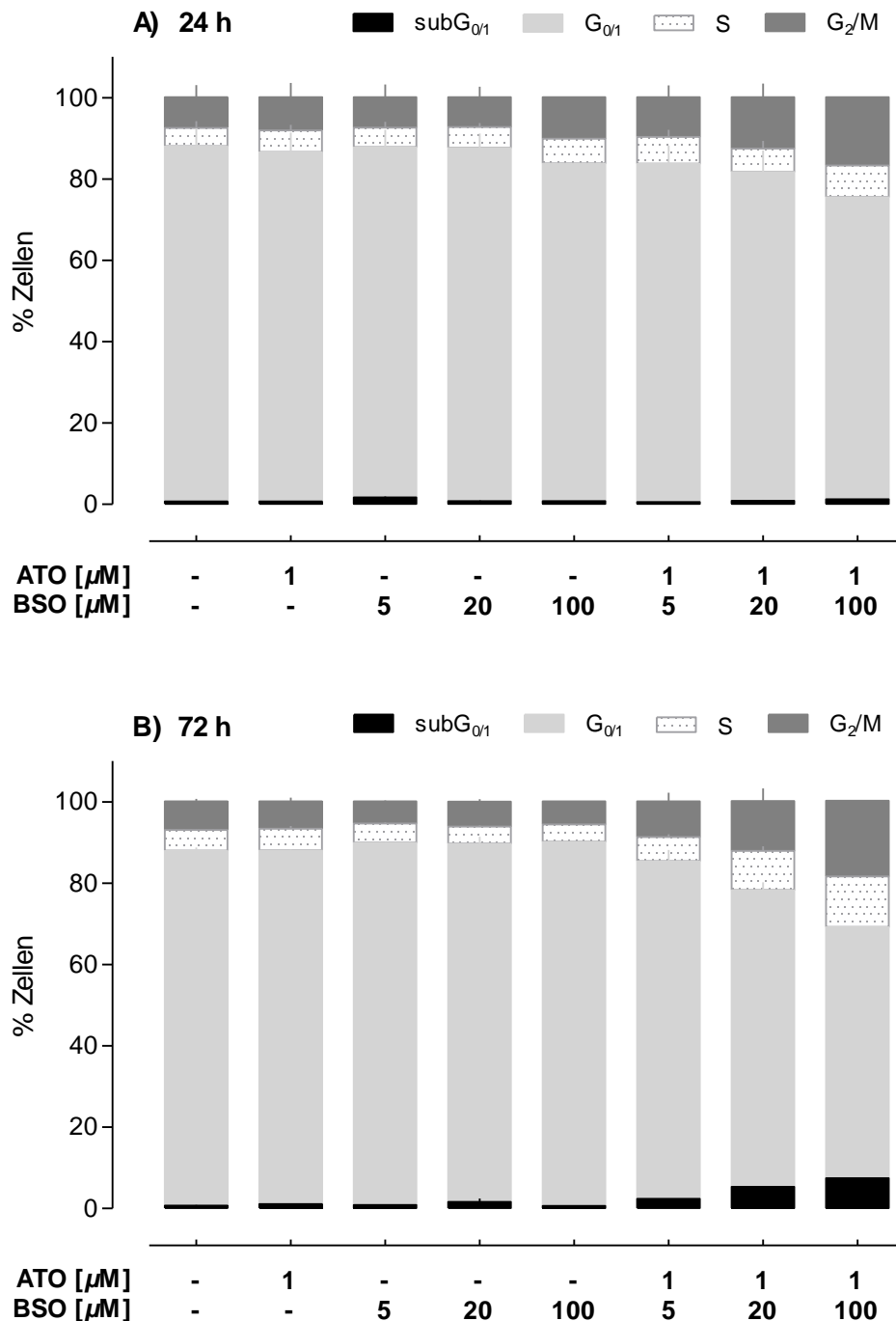
In Abbildung 4-79 ist das Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit 1  $\mu\text{M}$  ATO und BSO zu sehen. Unbehandelte A-172 Zellen liegen mit 82,8% (24 h) bzw. 86,6% (72 h) in der  $G_{0/1}$ -Phase. 1  $\mu\text{M}$  ATO und BSO führen, einzeln appliziert, zu keinem Anstieg des sub $G_{0/1}$ -Peaks und besitzen keinen Einfluss auf die Verteilung von A-172 Zellen auf die anderen Zellzyklusphasen. Dies gilt für beide Expositionszeiten. Die Kombinationswirkung von 1  $\mu\text{M}$  ATO und BSO ist nach einer Exposition über 24 h ebenfalls gering. Es findet eine schwache Arretierung der Zellen in der S- sowie  $G_2/M$ -Phase statt, welche mit einer Abnahme der  $G_{0/1}$ -Population einhergeht, wenn man die Zellen mit ATO und 100  $\mu\text{M}$  BSO exponiert. Apoptose wird nach 24 h nicht ausgelöst. Nach 72 h ist der Rückgang der  $G_{0/1}$ -Population durch ATO und 100  $\mu\text{M}$  BSO stärker ausgeprägt und jetzt auch in Kombination mit 20  $\mu\text{M}$  BSO zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle befinden sich ca. 14% (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw. 25% (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO) weniger Zellen in dieser Phase. Die Verminderung der  $G_{0/1}$ -Fraktion geht mit einer Zunahme der Zellen in der S-,  $G_2/M$ - und sub $G_{0/1}$ -Phase einher. Letzterer sind 5,3% (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw. 7,4% (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO) der gesamten Population zuzuordnen.





**Abbildung 4-78: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 Zellen durch 1  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin**

A-172 Zellen wurden über 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) mit 1  $\mu\text{M}$  ATO und BSO einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die MW + Spannweite der %-Anteile der apoptotischen und nekrotischen Fraktion an der jeweiligen Gesamtpopulation aus  $n = 2$  Experimenten (Ausnahme: für alle Gruppen mit 100  $\mu\text{M}$  BSO sind die Ergebnisse aus  $n = 1$  Versuch gezeigt).

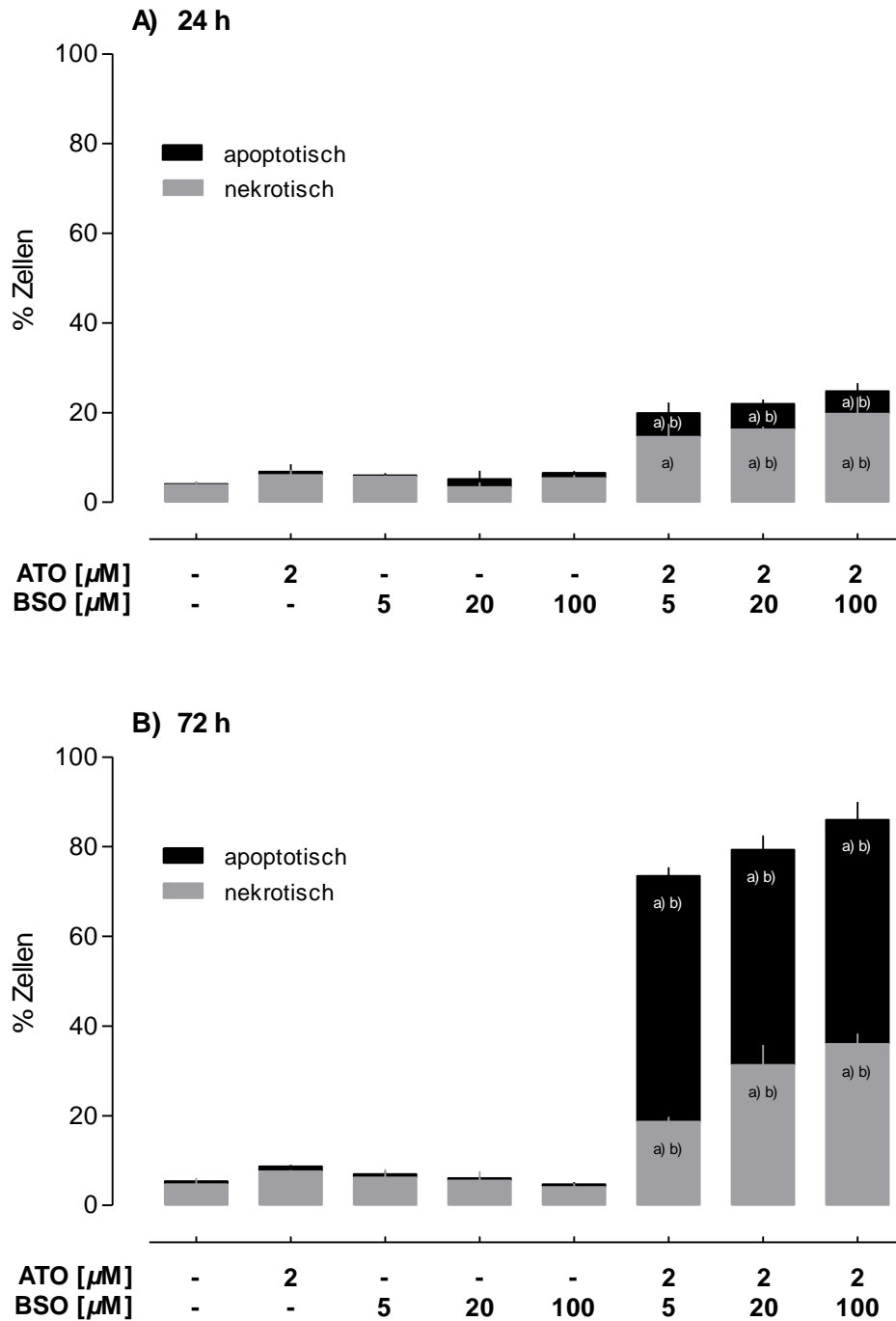


**Abbildung 4-79: Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit 1  $\mu$ M Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin**

A-172 Zellen wurden über 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) mit 1  $\mu$ M ATO und BSO einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW + Spannweite aus n = 2 Experimenten (Ausnahme: für alle Gruppen mit 100  $\mu$ M BSO sind die Ergebnisse aus n = 1 Versuch gezeigt).

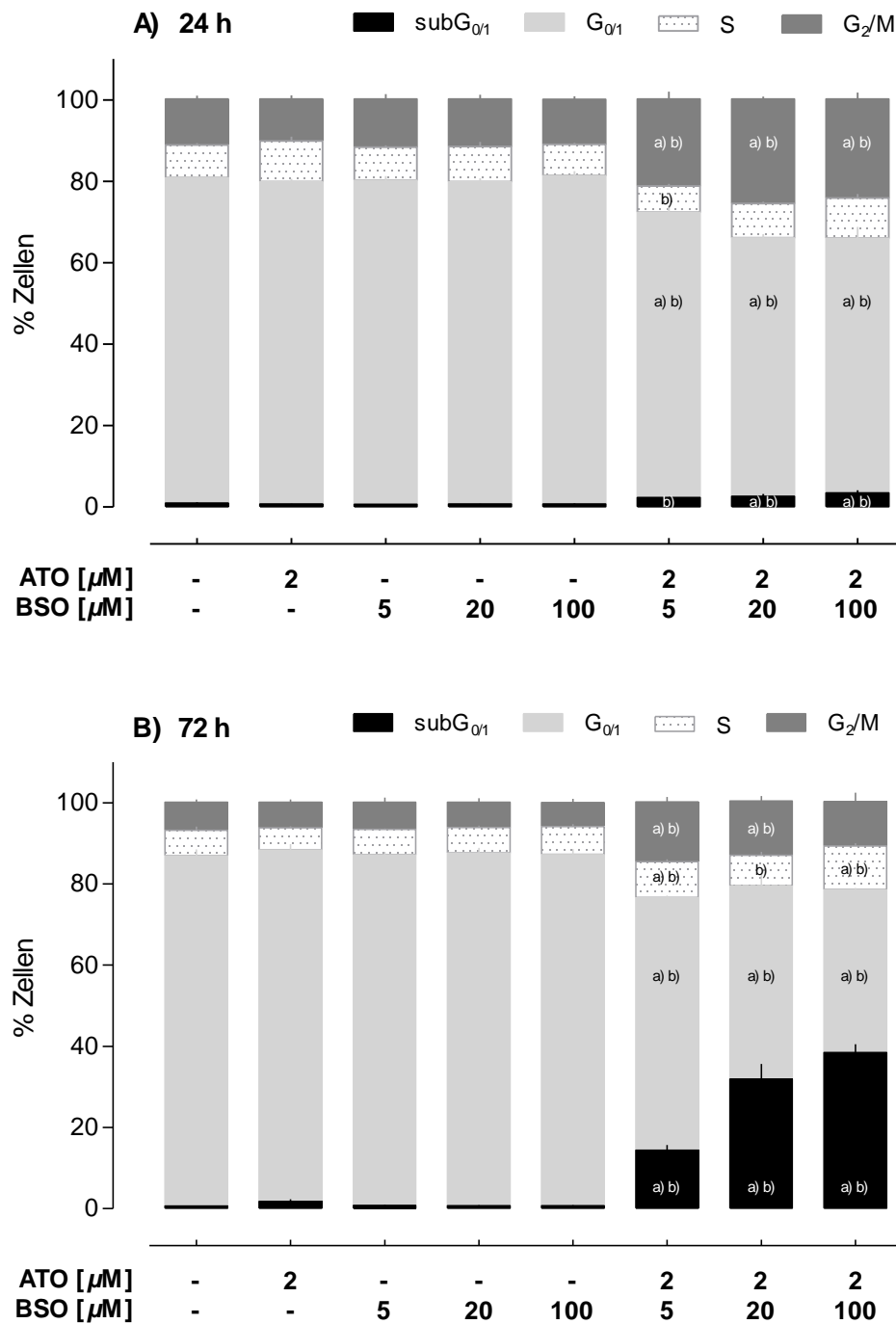
Im Weiteren stellte sich die Frage, welchen Einfluss BSO auf den ATO-induzierten Zelltod von A-172 Zellen hat, wenn man die zuvor gewählte ATO-Konzentration erhöht. Zu diesem Zweck erfolgten analoge 24 h- und 72 h-Messungen, in denen ATO bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  und BSO wie bereits vorher bei 5 bis 100  $\mu\text{M}$  getestet wurde. Abbildung 4-80 zeigt die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie. 2  $\mu\text{M}$  ATO allein induzieren zu beiden Messzeitpunkten keinen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod bei A-172 Zellen. BSO besitzt, wie oben bereits beschrieben, ebenfalls keinen Effekt. Die Kombinationswirkung von ATO und BSO ist durch die Erhöhung der ATO-Konzentration deutlich stärker ausgeprägt. Nach einer 24 h-Ko-Exposition nimmt der Anteil nekrotischer Zellen auf 14,6% (+ 5  $\mu\text{M}$  BSO), 16,2% (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw. 19,8% (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO) zu. Der Anteil der apoptotischen Population ist unter allen drei Ko-Expositionsbedingungen mit ca. 5,3% konstant. Eine Behandlung von A-172 Zellen mit 2  $\mu\text{M}$  ATO und BSO über 72 h führt bei den meisten Zellen zum Untergang. Insgesamt sind 73,5% (+ 5  $\mu\text{M}$  BSO), 79,3% (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw. 86% (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO) der Population nicht mehr vital. Nekrotisch sind davon 18,7%, 31,3% bzw. 36%. Der Anteil apoptotischer Zellen liegt durchschnittlich bei 51%. Dieser wird bereits bei 5  $\mu\text{M}$  BSO erreicht.

Abbildung 4-81 gibt das Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit 2  $\mu\text{M}$  ATO und BSO wieder. Repräsentative DNA-Histogramme sind im Anhang dargestellt (Abb. 7-5, S. 210). 2  $\mu\text{M}$  ATO und BSO bewirken, einzeln appliziert, keinen Anstieg des subG<sub>0/1</sub>-Peaks und lösen im Vergleich zur Kontrolle auch keine sonstigen Veränderungen im Zellzyklus aus. Das gilt für beide Messzeitpunkte. In Kombination führen ATO und BSO zu einer deutlichen Erhöhung des subG<sub>0/1</sub>-Peaks. Bei einer Ko-Exposition über 24 h deutet sich die Induktion von Apoptose mit 2,3% (+ 5  $\mu\text{M}$  BSO), 2,6% (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw. 3,4% (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO) nur an. Nach 72 h nimmt dieser Anteil dagegen deutlich auf 14,3%, 31,9% bzw. 38,5% zu. Der jeweils beobachtete Übergang der Zellen in die subG<sub>0/1</sub>-Phase ist mit weiteren Veränderungen im Zellzyklus verknüpft. Nach 24 h erfolgt zunächst eine Arretierung der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Dies geht mit einem Rückgang der G<sub>0/1</sub>-Population einher. Beim Einsatz von ATO und 5  $\mu\text{M}$  BSO sinkt die G<sub>0/1</sub>-Population auf 70%, während die G<sub>2</sub>/M-Fraktion auf 21,3% ansteigt. In Kombination mit den beiden höheren BSO-Konzentrationen sind jeweils ca. 63% der Zellen in der G<sub>0/1</sub>- und ca. 25% in der G<sub>2</sub>/M-Phase zu finden. Nach 72 h nimmt der Anteil der G<sub>0/1</sub>-Population weiter auf 62,2% (+ 5  $\mu\text{M}$  BSO), 47,4% (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw. 39,9% (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO) ab. Weiterhin ist eine Abnahme der zuvor in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretierten Population zu erkennen. Die Zellen gehen vermehrt in die subG<sub>0/1</sub>-Phase über.



**Abbildung 4-80: Induktion von Apoptose und Nekrose bei A-172 Zellen durch 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin**

A-172 Zellen wurden mit 2  $\mu\text{M}$  ATO und BSO einzeln sowie in Kombination exponiert. Nach 24 h (A) bzw. 72 h (B) wurden die Zellen mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (vgl. 3.6.4). Gezeigt sind die MW  $\pm$  SEM der %-Anteile der apoptotischen und nekrotischen Fraktion an der jeweiligen Gesamtpopulation mit  $n = 3$  Versuchen. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. <sup>b)</sup> $p < 0,05$ : ATO + BSO vs. ATO allein (ANOVA mit Tukey's multiple comparison test).



**Abbildung 4-81: Zellzyklusprofil von A-172 Zellen nach einer Exposition mit 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin**

A-172 Zellen wurden über 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) mit 2  $\mu\text{M}$  ATO und BSO einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW  $\pm$  SEM mit  $n = 3$  Experimenten. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. <sup>b)</sup> $p < 0,05$ : ATO + BSO vs. ATO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).

Kurz gefasst: Die Befunde der Fluoreszenzmikroskopie und der Zellzyklusanalyse sind konsistent. Bei Kombination von ATO mit BSO wird die Induktion von Apoptose bei A-172 Zellen deutlich verstärkt. Die beobachteten Effekte sind dabei stark von der jeweils eingesetzten ATO- und BSO-Konzentration sowie der Expositionszeit abhängig. Eine Sensitivierung der A-172 Zellen durch BSO für die Wirkung von ATO zeigte sich bereits bei den Untersuchungen zur Proliferationshemmung (vgl. 4.2.4).

### B) U-87 MG Zellen

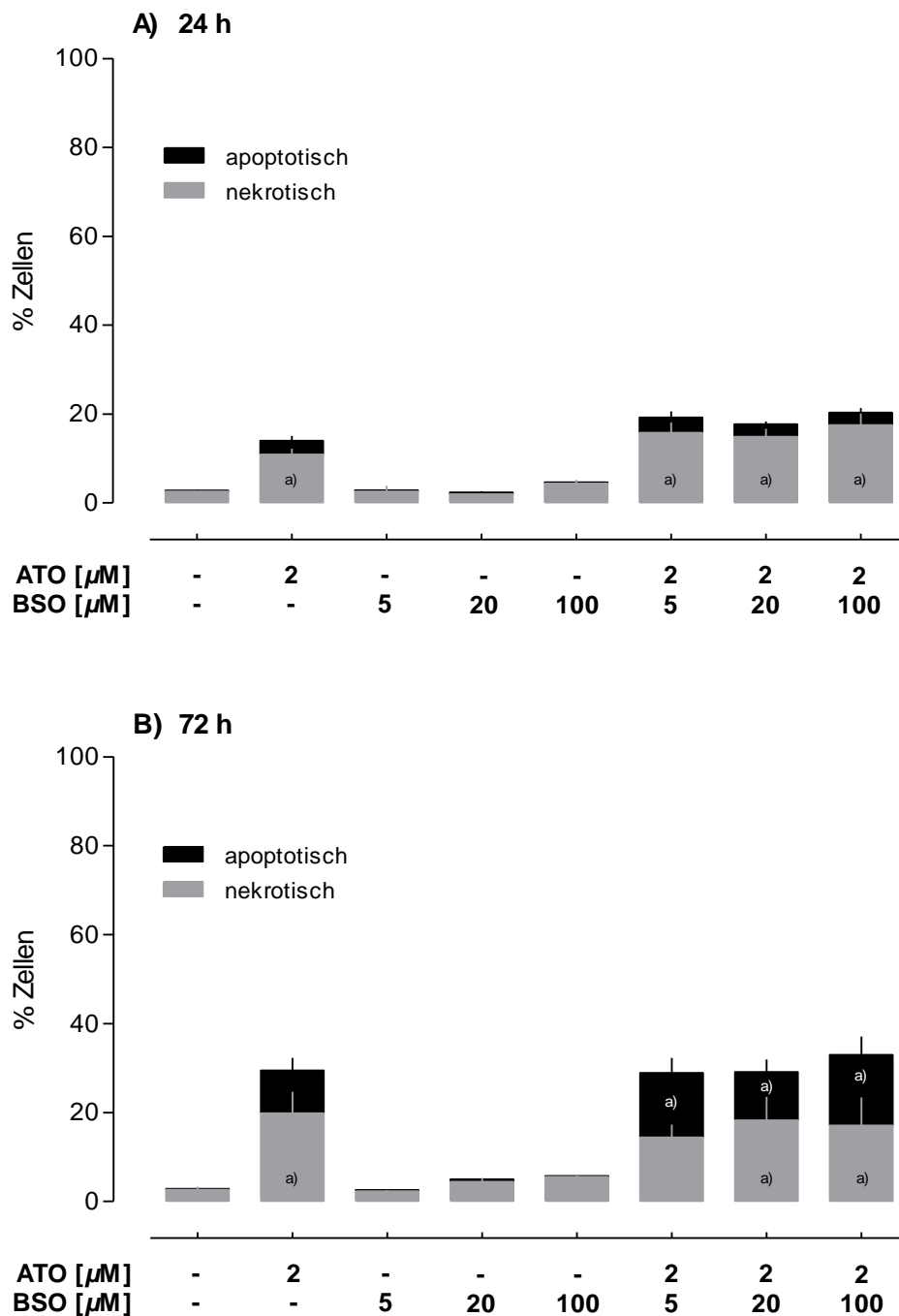
Analog zu A-172 Zellen wurde die Kombinationswirkung von ATO und BSO auch auf den Zelltod von U-87 MG Zellen sowie deren Zellzyklusprofil untersucht. Die Versuche erfolgten ebenfalls über 24 sowie 72 h, wobei ATO bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  und BSO bei Konzentrationen von 5, 20 und 100  $\mu\text{M}$  getestet wurde.

Abbildung 4-82 zeigt die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Bewertung. 2  $\mu\text{M}$  ATO induzieren bei U-87 MG Zellen vorrangig nekrotischen Zelltod. Nach 24 h sind von den insgesamt 14% der nicht mehr intakten Population 10,9% nekrotisch. Nach 72 h sind 19,9% der Zellen nekrotisch und weitere 9,6% apoptotisch. BSO löst während der gesamten Behandlungsdauer keinen Zelltod bei U-87 MG Zellen aus. In Kombination mit BSO wird die durch ATO allein erzielte Wirkung nicht verstärkt. Es erfolgt auch keine Verschiebung des nekrotischen Zelltodes zugunsten des apoptotischen. Bei einer 24 h-Ko-Exposition sind unabhängig von der gleichzeitig verwendeten BSO-Konzentration maximal 20% der gezählten Zellen nicht mehr vital. Apoptotisch sind davon jeweils nur etwa 3%. Nach 72 h gehen in Anwesenheit von ATO und BSO jeweils ca. 30% der Zellen zugrunde. Davon sind 14,5% (+ 5  $\mu\text{M}$  BSO), 10,9% (+ 20  $\mu\text{M}$  BSO) bzw. 15,9% (+ 100  $\mu\text{M}$  BSO) apoptotisch. Die Apoptoseinduktion nach 72 h ist jeweils statistisch signifikant zur Kontrolle, jedoch nicht zur ATO-Wirkung allein.

Abbildung 4-83 gibt das Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit ATO und BSO wieder. Repräsentative DNA-Histogramme sind im Anhang zu finden (Abb. 7-6, S. 212). Unbehandelte U-87 MG Zellen halten sich bei der 24 h-Messung mit 67,8% und bei der 72 h-Messung mit 80,8% in der  $G_{0/1}$ -Phase auf. Gleichzeitig ist ein Rückgang der S- und der  $G_2/M$ - Population nach 72 h zu beobachten. 2  $\mu\text{M}$  ATO führen nach einer 24 h-Exposition zu einem Anstieg der  $G_2/M$ -Population auf 29,6%. Damit verbunden nimmt die  $G_{0/1}$ -Population auf 55,4% ab. Diese Arretierung von U-87 MG Zellen ist zeitabhängig und statistisch signifikant zur entsprechenden Kontrolle. Nach 72 h liegen nur noch 35,1% der Zellen in der  $G_{0/1}$ -Phase, während sich 48,1% in der  $G_2/M$ -Phase aufhalten. BSO bewirkt bei Konzentrationen bis zu 100  $\mu\text{M}$  keinen Anstieg des sub $G_{0/1}$ -Peaks und löst auch sonst keine Veränderungen im Zellzyklus

aus. Eine Kombination von ATO mit BSO induziert bei U-87 MG Zellen keine verstärkte Induktion von Apoptose. Nach 24 h beträgt der Anteil der subG<sub>0/1</sub>-Population 3,5% (+ 5  $\mu$ M BSO), 4,4% (+ 20  $\mu$ M BSO) bzw. 3,2% (+ 100  $\mu$ M BSO). Nach 72 h befinden sich jeweils nur ca. 2,5% der Zellen in der subG<sub>0/1</sub>-Phase. Die Verteilung von U-87 MG Zellen auf die anderen Zellzyklusphasen bei einer Ko-Exposition mit ATO und BSO unterscheidet sich nur geringfügig von der Verteilung, welche sich bei einer separaten Behandlung mit ATO ergibt. Mit anderen Worten: BSO verstärkt auch die Wirkung von ATO auf den Zellzyklus nicht.

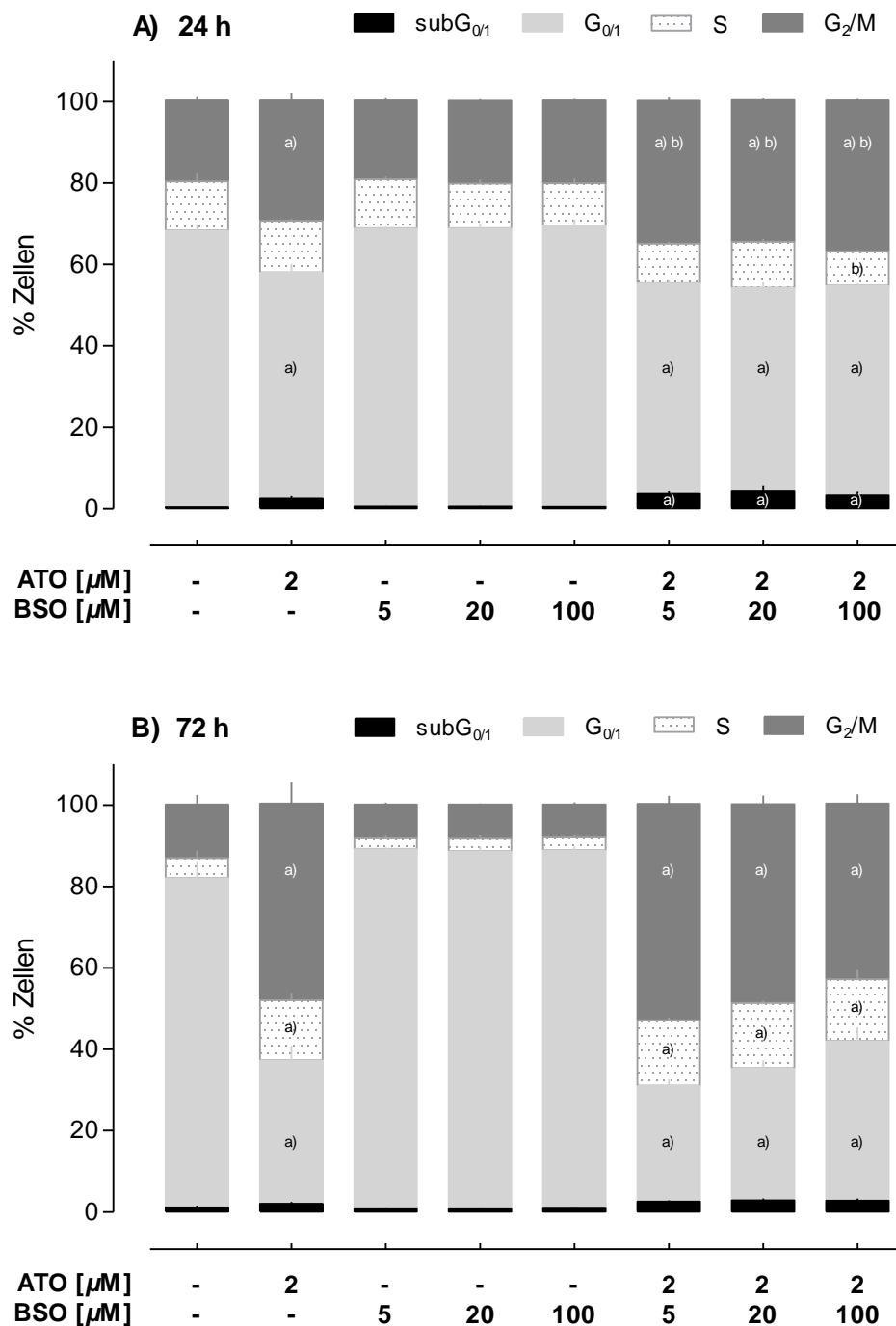
Zusammenfassend kann festgehalten werden: Sowohl die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie als auch die der Zellzyklusanalyse zeigen, dass die Wirkung von ATO auf den apoptotischen Zelltod von U-87 MG Zellen durch BSO nicht verstärkt wird. Bei den Proliferationshemmversuchen wurde das Wachstum von U-87 MG Zellen bei Kombination beider Agentien synergistisch gehemmt (vgl. 4.2.4). Aufgrund der hier vorliegenden Daten ist davon auszugehen, dass die Sensitivierung von U-87 MG Zellen durch BSO für die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf anderen Mechanismen beruht, als auf der verstärkten Induktion von Apoptose.



**Abbildung 4-82: Induktion von Apoptose und Nekrose bei U-87 Zellen durch Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin**

U-87 Zellen wurden über 24 h (**A**) bzw. 72 h (**B**) mit ATO und BSO einzeln sowie in Kombination behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hoechst 33342 sowie PI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM der %-Anteile der apoptotischen und nekrotischen Fraktion an der jeweiligen Gesamtpopulation mit  $n = 3$  Versuchen. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. nicht signifikant: ATO + BSO vs. ATO allein (ANOVA mit *Tukey's multiple comparison test*).





**Abbildung 4-83: Zellzyklusprofil von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin**

U-87 MG Zellen wurden über 24 h **(A)** bzw. 72 h **(B)** mit ATO und BSO einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen als MW  $\pm$  SEM mit  $n = 3$  Experimenten. <sup>a)</sup> $p < 0,05$ : exponierte Gruppen vs. Kontrolle bzw. <sup>b)</sup> $p < 0,05$ : ATO + BSO vs. ATO allein (ANOVA mit Tukey's multiple comparison test).

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die proliferationshemmende Wirkung von Arsentrioxid (ATO,  $\text{As}_2\text{O}_3$ ) auf zwei Glioma-Zelllinien humanen Ursprungs (A-172 und U-87 MG) untersucht, welche als *in vitro*-Modelle für maligne Gliome gelten. Weiterhin wurde die Fähigkeit von fünf pflanzlichen Polyphenolen (Genistein, Quercetin, Curcumin, Resveratrol, Epigallocatechin-3-gallat) sowie von Buthioninsulfoximin (BSO) geprüft, Glioma-Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO zu sensitivieren.

### 5.1 Arsentrioxid

#### 5.1.1 Proliferationshemmung

ATO (0,5 - 20  $\mu\text{M}$ ) besitzt einen konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss auf das Wachstum der untersuchten Glioma-Zellen. Bei A-172 Zellen wirkt ATO nach 24 h ab 5  $\mu\text{M}$  (vgl. Abb. 4-4) und bei U-87 MG Zellen bereits ab 2  $\mu\text{M}$  (vgl. Abb. 4-5) proliferationshemmend. Wenn man die Wachstumskurven der Zellen zugrunde legt und die Wirkung von ATO auf die Zellzahl bezogen auf die anfänglich ausgesäte Zellmenge betrachtet, zeigt sich, dass die Proliferationshemmung bei beiden Zelllinien bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auf zytostatische Effekte zurück geht. Bei höheren Konzentrationen (10 und 20  $\mu\text{M}$ ) treten zusätzlich zytoletale Effekte auf. Diese sind bei A-172 Zellen erst nach einer Exposition über 72 h, bei U-87 MG Zellen bereits nach 24 h zu erkennen. Die halbmaximal wirksame Konzentration ( $\text{EC}_{50}$ ) von ATO beträgt bei A-172 Zellen > 20  $\mu\text{M}$  nach 24 h und  $8,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$  nach 72 h. Für U-87 MG Zellen ergeben sich mit  $12,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$  (24 h) bzw.  $2,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$  (72 h) deutlich niedrigere  $\text{EC}_{50}$ -Werte. Die Ergebnisse für beide Zelllinien decken sich mit denen von anderen Arbeitsgruppen (Haga *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008; Zhen *et al.*, 2010).

In einigen Studien wird eine inverse Beziehung zwischen der Sensitivität verschiedener Zelllinien für die proliferationshemmende Wirkung von ATO und ihren basalen Glutathionspiegeln postuliert (Dai *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; König *et al.*, 2007). Bei den hier untersuchten Zelllinien besteht ein solcher Zusammenhang nicht. U-87 MG Zellen

sind nach 72 h um den Faktor 4 empfindlicher für ATO als A-172 Zellen. Sie verfügen mit  $61,4 \pm 2,3$  nmol/mg Zellprotein aber auch über einen signifikant höheren Glutathiongehalt als A-172 Zellen ( $39,6 \pm 1,5$  nmol/mg Zellprotein) (vgl. Abb. 4-48). Davison *et al.* (2003) stellten ebenfalls fest, dass die proliferationshemmende Potenz von ATO bei einigen Zelllinien wenig mit der Höhe ihrer basalen Glutathionspiegel korreliert. Die unterschiedliche Sensitivität von Tumorzellen für ATO muss also auch von weiteren Faktoren abhängig sein.

### 5.1.2 Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest

Die Effizienz einer Radio- oder Chemotherapie wird insbesondere mit ihrer Fähigkeit, Apoptose bei entarteten Zellen auszulösen, verbunden. In der Tumorforschung ist die Entwicklung von Therapieansätzen, die apoptotische Signalwege induzieren, heute von besonderem Interesse (Bremer *et al.*, 2006; Ocker *et al.*, 2012). „Apoptose“ (auch programmierter Zelltod I) ist im Gegensatz zu Nekrose ein streng regulierter, physiologischer Prozess, der durch die betroffenen Zellen selbst gesteuert bzw. sogar eingeleitet wird. Er ermöglicht alternde oder geschädigte Zellen, weitgehend ohne Beeinträchtigung des umliegenden Gewebes, zu eliminieren (Lawen, 2003).

ATO löst apoptotischen Zelltod bei Tumorzellen unterschiedlicher Abstammung, u.a. bei Leukämie- (Chen *et al.*, 1996), Gebärmutterhalskarzinom- (Han *et al.*, 2008), Leberkarzinom- (Kito *et al.*, 2002) und Lungenkarzinom-Zellen (Jiang *et al.*, 2013), aus. Um zu prüfen, ob die proliferationshemmende Wirkung von ATO auch bei A-172 und U-87 MG Zellen auf die Induktion von Apoptose zurückgeht, wurden Veränderungen in der Zellkernmorphologie am Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Weiterhin wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) - ein frühes Zeichen für Apoptose - mittels PI/Annexin V-Färbung untersucht und der Gehalt an DNA im Zellzyklus gemessen.

Die Etablierung der Methoden erfolgte mit dem Alkaloid Staurosporin (ST), einem klassischen Apoptoseinduktor (Bertrand *et al.*, 1994). Die PI/Annexin V-Färbung erwies sich dabei als wenig aussagekräftig. Diese Methode erlaubt zwar den Nachweis von frühapoptotischen Zellen, ermöglicht aber keine Abgrenzung der spätapoptotischen Population von der nekrotischen (vgl. Abb. 4-58) - ein Problem, das auch Thierfelder (2006) schilderte. Da sich die meisten Zellen 24 h nach der Exposition mit ST bereits in einer späten Phase der Apoptose befinden oder aber nekrotisch sind, können nur Aussagen zum Ausmaß, aber nicht zur Art des Zelltodes getroffen werden. D.h., dass die

Durchführung der PI/Annexin V-Färbung generell nur dann sinnvoll ist, wenn Frühapoptose vorherrscht. Andernfalls gehen wichtige Informationen verloren. Im Gegensatz hierzu kann man bei der Analyse der Zellkernmorphologie auch der Kinetik des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes folgen. Nach Färbung der Zellen mit PI und Hoechst 33342 lassen sich früh- und spätapoptotische sowie nekrotische Zellkerne stets klar differenzieren (vgl. Abb. 4-55 - 4-57). Die Vorzüge einer kernmorphologischen Untersuchung beschrieben auch Lizard *et al.* (1995). Sie nannten dieses Verfahren „einfach, eindeutig und zuverlässig“. Die Bestimmung des DNA-Gehalts in der Zellzyklusanalyse nach einer Markierung der Zellen mit PI gibt Hinweise auf die Induktion von Apoptose, nicht allerdings auf Nekrose. Diese Methode hat gegenüber den beiden anderen aber den Vorteil, dass sie zusätzlich die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus und damit eine mögliche Zellzyklusarretierung anzeigt (vgl. Abb. 4-59 - 4-61). Die gemessenen Apoptoseraten nach einer Exposition mit ST weisen bei der Analyse der Zellkernmorphologie und des Zellzyklus eine hohe Übereinstimmung auf (vgl. Abb. 4-62).

Gliome werden häufig als apoptoseresistent beschrieben (Lefranc *et al.*, 2006; Sarafian *et al.*, 2009). Ein weiteres Ziel der ST-Versuche war es deshalb zu prüfen, wie empfindlich A-172 und U-87 MG Zellen auf einen klassischen Apoptoseinduktor reagieren oder anders ausgedrückt, ob sie durch ST zur Apoptose gebracht werden können. Die Induktion von Apoptose durch ST ist bei beiden Zelllinien nach 24 h sichtbar und konzentrationsabhängig. Bei A-172 Zellen treten erste Effekte ab einer Konzentration von 100 nM auf (~ 10%). Bei U-87 MG Zellen sind höhere Konzentrationen (> 200 nM) notwendig, um Apoptose auszulösen. 1000 nM ST führen jeweils bei etwa der Hälfte der Glioma-Zellen zum apoptotischen Untergang. Eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit zeigte ST auch bei zwei Melanom-Zelllinien (Zhang *et al.*, 2004). Bei CNE 2 Nasopharynxkarzinom-Zellen war ST dagegen deutlich wirksamer und löste nach 24 h schon bei 20 nM (~ 20%) Apoptose aus (Lan *et al.*, 1999).

Im Vergleich zu ST besitzt ATO eine andere Zeitabhängigkeit bei der Induktion von Apoptose. Nach einer 24 h-Inkubation finden bei beiden Glioma-Zelllinien selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration (10  $\mu$ M) noch keine morphologischen Zellkernveränderungen (vgl. Abb. 4-65) und keine Verminderung des DNA-Gehalts in der Zellzyklusanalyse (vgl. Abb. 4-68 und 4-69) statt. Zu beobachten ist auch noch keine Externalisierung von PS (vgl. Abb. 4-67). Apoptotischer Zelltod tritt erst nach einer Exposition über 72 h und dann auch nur bei 10  $\mu$ M ATO in nennenswertem Ausmaß auf, bestimmt durch die Analyse der Kernmorphologie und des Zellzyklus. Die Befunde beider Verfahren sind grundsätzlich konsistent. Allerdings ergeben sich bei der Analyse

der Kernmorphologie deutlich höhere Apoptoseraten: Ca. 60% bei A-172 Zellen und 30% bei U-87 MG Zellen. Bis zu 20% der Zellen sind hier weiterhin nekrotisch. Die Zellzyklusanalyse liefert Apoptoseraten von ca. 20% (A-172) bzw. 10% (U-87 MG). Die Durchführung der PI/Annexin-V Färbung machte nach einer 72 h-Exposition wenig Sinn, da zu diesem Zeitpunkt Spätaoptose bereits dominierte (vgl. Abb. 4-66). Aufgrund ihrer Schwächen wurde diese Methode bei den Kombinationsversuchen nicht angewendet.

Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen haben bereits andere Studien gezeigt, dass verschiedene Glioma-Zelllinien nicht zur Apoptose gebracht werden können, wenn man sie mit niedrigeren Konzentrationen an ATO ( $\leq 4 \mu\text{M}$ ) über bis zu 72 h behandelt (Kanzawa *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2009). Die zitierten Arbeitsgruppen beobachteten unter den genannten Expositionsbedingungen die Auslösung von Autophagie (auch programmierter Zelltod II). „Autophagie“ ist ein Prozess, bei dem zytoplasmatische Bestandteile (langlebige Proteine, geschädigte Organellen etc.) eukaryotischer Zellen abgebaut werden und der auf einem basalen Niveau in vermutlich allen Zellen abläuft (Hara *et al.*, 2006). Unter Stressbedingungen (z.B. Mangel an Nährstoffen) kann der partielle Selbstverdau stark induziert werden (Kuma *et al.*, 2004). Kurzfristig stellt er so einen Überlebensmechanismus der Zelle dar, bei vollständigem Ablauf kann er allerdings auch zu ihrem Tod führen (Notte *et al.*, 2011). Laut Literatur sind zur Induktion von Apoptose bei Glioma-Zellen (darunter auch A-172 und U-87 MG) hohe Konzentrationen an ATO ( $\geq 8 \mu\text{M}$ ), aber auch Expositionszeiten von mindestens 48 h notwendig (Zhao *et al.*, 2002; Kanzawa *et al.*, 2003; Haga *et al.*, 2005). Hierdurch werden die vorliegenden Befunde bestätigt.

Insgesamt fällt auf, dass  $10 \mu\text{M}$  ATO bei etwa doppelt so vielen A-172 wie U-87 MG Zellen apoptotischen Zelltod auslösen, obwohl diese Konzentration bei U-87 MG Zellen zu einer deutlich stärkeren Proliferationshemmung führt. Ein diesbezüglich diskutierter Erklärungsansatz geht auf den p53-Status von Tumorzellen zurück. p53 ist ein bedeutender Tumorsuppressor, der an der Regulation von Apoptose und DNA-Reparatur beteiligt ist (Vogelstein *et al.*, 2000). Eine Mutation des p53-Gens ist mit Tumorentstehung verbunden und bei der Mehrzahl aller Tumorerkrankungen nachweisbar (Liu *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2003) haben beschrieben, dass verschiedene Multiple Myelom (MM)-Zelllinien, die ein mutiertes p53-Gen besitzen, sensibler auf ATO mit Apoptose reagieren als MM-Zelllinien, bei denen das Gen nicht mutiert ist. Das passt zu den hier beobachteten Effekten. A-172 Zellen bilden ein mutiertes und U-87 MG Zellen ein Wildtyp p53-Protein. Eine andere Begründung, die im Zusammenhang mit der höheren Apoptoserate häufig aufgegriffen wird, bezieht sich auf den Redox-Status von Tumor-

zellen. Zelllinien, die eine schlechtere antioxidative Ausstattung besitzen und per se höhere inhärente ROS-Levels aufweisen, sollen empfindlicher für die Induktion von Apoptose durch ATO sein (Jing *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2002; Yi *et al.*, 2002). Auch das könnte die beobachteten Unterschiede erklären. Die endogene ROS-Bildungsrate ist bei A-172 Zellen signifikant höher (vgl. Abb. 4-37) und ihre antioxidative Kapazität (gemessen am Glutathiongehalt) signifikant niedriger (vgl. Abb. 4-48) als bei U-87 MG Zellen. Im Vergleich zu U-87 MG Zellen weisen A-172 Zellen weiterhin eine etwa dreimal niedrigere Aktivität an der manganhaltigen Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase, zwei antioxidativ wirksamen Enzymen, auf (Zhong *et al.*, 1999).

Proliferationshemmung kann zudem mit einem Zellzyklusarrest einhergehen. Kanzawa *et al.* (2003) haben berichtet, dass ATO ( $2 \mu\text{M}$ ) nach einer 72 h-Exposition zu einer Arretierung von A-172 und U-87 MG Zellen in der  $G_2/M$ -Phase führt. Ein  $G_2/M$ -Arrest durch ATO wurde auch bei diversen anderen Zelllinien beobachtet (MCF-7, H460, He-La, U-118 MG) (Ling *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2009). Ling *et al.* (2002) stellten fest, dass ATO dabei eine Hemmung der Mitose induziert, indem es mit Tubulin interagiert. Übereinstimmend mit den Befunden der Literatur zeigte sich bei der Zellzyklusanalyse, dass ATO bei U-87 MG Zellen bereits nach 24 h bei der niedrigsten getesteten Konzentration ( $2 \mu\text{M}$ ) eine Arretierung der Zellen in der  $G_2/M$ -Phase bewirkt (vgl. Abb. 4-68). Dieser Prozess findet auch bei höheren ATO-Konzentrationen (5 und  $10 \mu\text{M}$ ) sowie bei Verlängerung der Expositionszeit (72 h) statt. Im Gegensatz dazu löst ATO bei A-172 Zellen erst nach 72 h und nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration ( $10 \mu\text{M}$ ) Veränderungen im Zellzyklus aus (vgl. Abb. 4-69). Diese sind verbunden mit einem Rückgang der  $G_{0/1}$ - zugunsten der apoptotischen  $subG_{0/1}$ -Population. Somit widersprechen die Beobachtungen bei A-172 Zellen denen von Kanzawa *et al.* (2003). Die Analyse des Zellzyklus führten Kanzawa *et al.* (2003) ebenfalls an einem FACS (Becton Dickinson) durch, nachdem sie die Zellen mit PI gefärbt hatten. Wodurch die Diskrepanz zustande kommt, ist nicht ganz klar. Abweichungen lassen sich nur in der Kultivierung erkennen. In der zitierten Arbeit wurde eine geringere Aussaatdichte und ein höherer Gehalt an FCS verwendet.

Zusammengefasst: ATO hemmt die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen. Die Hemmung ist bei einer hohen ATO-Konzentration ( $10 \mu\text{M}$ ) jeweils mit der Induktion von Apoptose verbunden. Bei U-87 MG Zellen geht die Hemmung weiterhin mit einem Zellzyklusarrest in der  $G_2/M$ -Phase einher. Nekrotischer Zelltod spielt bei beiden Zelllinien keine wesentliche Rolle.

### 5.1.3 Einfluss auf die intrazelluläre Radikalbildung und den Glutathiongehalt

Die exakten Mechanismen der ATO-Wirkung sind bis heute nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Rolle wird der Bildung von ROS (insbesondere  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) und damit der Auslösung von oxidativem Stress zugeschrieben (Sumi *et al.*, 2010; Flora, 2011). Die gebildeten ROS gelten als Vermittler für die proliferationshemmende Wirkung von ATO und die Induktion von Apoptose (Jing *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2001; 2004). Wie weit diese Annahme allgemeine Gültigkeit hat, ist allerdings fraglich. Vergleicht man die Ergebnisse der Literatur, so ist die Fähigkeit von ATO, ROS-Bildung zu induzieren, auch bei gleichen experimentellen Bedingungen von der untersuchten Zelllinie abhängig (Han *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2010). Bei Verwendung von DCFH<sub>2</sub>-DA als Marker führt ATO (1 - 10  $\mu\text{M}$ ) in A-172 und U-87 MG Zellen innerhalb einer Inkubationszeit von 120 min zu keiner gesteigerten Generierung von ROS (vgl. Abb. 4-39). Das entspricht den Beobachtungen bei anderen Glioma-Zelllinien (U-118 MG, C6), welche ebenfalls über 120 min mit ATO-Konzentrationen bis zu 25  $\mu\text{M}$  behandelt wurden (Cheng *et al.*, 2007; Klauser *et al.*, 2014). Nicht völlig auszuschließen ist, dass die Generierung von ROS durch ATO erst nach längerer Inkubationszeit erfolgt. In C6 Rattenglioma-Zellen gab es allerdings auch nach 24 h keine Hinweise auf einen solchen Effekt (Klauser *et al.*, 2014). Auch Lipidperoxidation, ein weiteres Indiz für oxidativen Stress, fand hier nach 24 h nicht statt.

Oxidativer Stress kann weiterhin als Folge einer Störung des antioxidativen Abwehrsystems auftreten, beispielsweise durch eine Verarmung an intrazellulärem Glutathion. In einigen Studien wurde beobachtet, dass die zytotoxische Wirkung von ATO mit einer Senkung der Glutathionspiegel einhergeht (Han *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2010). Bei A-172 Zellen führt eine 24 h-Behandlung mit ATO-Konzentrationen bis zu 10  $\mu\text{M}$  zu keiner Verminderung des Glutathiongehalts (vgl. Abb. 4-49A). Im Gegenteil, es ist sogar eine Steigerung der Levels zu beobachten. Der maximale Effekt (~ 40%) wird bei einer noch nicht proliferationshemmenden Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  erreicht. Bei U-87 MG Zellen erhöht ATO im nicht bzw. zytostatisch wirksamen Konzentrationsbereich (0,5 - 2  $\mu\text{M}$ ) ebenfalls die Glutathionspiegel (bis zu 40%; vgl. Abb. 4-49B). Eine bereits nach 24 h auch zytolethal wirkende ATO-Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) führt hier dagegen, ähnlich wie bei den oben zitierten Berichten, zu einer Verringerung der Glutathionspiegel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (~ 35%). Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die Wachstumshemmung, welche bei U-87 MG Zellen durch 10  $\mu\text{M}$  ATO induziert wird (~ 40%), Konsequenz einer Glutathionverarmung ist. Dagegen sprechen z.B. die



Versuche mit BSO (siehe 5.2.2). Da sich die Verminderung des Glutathiongehalts im Bereich der Wachstumshemmung bewegt, ist der Effekt eher umgekehrt als Folge der unspezifischen Zellschädigung anzusehen.

Eine Steigerung der Glutathionspiegel durch ATO ist kein unbekanntes Phänomen. In unserem Labor zeigten sich ähnliche Effekte auch bei C6 Zellen (Klauser *et al.*, 2014). Hier erhöhten sub-toxische ATO-Konzentrationen (1 und 2  $\mu\text{M}$ ) den Glutathionspiegel nach 24 h sogar um etwa 70%. Die Wirkung von ATO war zeitabhängig und trat bereits nach 2 h auf. Versuche an primären Endothelzellen (PAECs) lieferten Hinweise darauf, dass die ATO-induzierte Erhöhung der Glutathionlevels mit einer gesteigerten Aktivität sowie einer Expression der GCS und GGT ( $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase), zwei Enzymen, die am Glutathion-*Turnover* beteiligt sind, einhergeht (Cheng *et al.*, 2008). Bei V79-Fibroblasten war nach einer Exposition mit verschiedenen Arsenderivaten zudem eine verstärkte Aufnahme und ein erhöhter Umsatz von Cystin zur Glutathionsynthese zu beobachten (Ochi, 1997). Ochi (1997), aber auch andere Autoren (Bannai *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 2009) vermuten, dass die Steigerung der intrazellulären Glutathionspiegel als Abwehrmechanismus von Zellen gegen die zytotoxische Arsen-Wirkung auftritt.

Kurz gefasst: Die proliferationshemmende Wirkung von ATO ist bei A-172 und U-87 MG Zellen nicht mit einer erhöhten Bildung von ROS oder einer Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel verbunden. Im Gegenteil, ATO induziert eindeutig Erhöhungen des Glutathiongehalts.



## 5.2 Sensitivierung von humanen Glioma-Zellen für Arsentrioxid

Der klinische Einsatz von ATO wird durch seine Toxizität begrenzt. Bei APL-Patienten können nach einer Behandlung mit ATO unerwünschte Effekte wie Hypokaliämie, Hyperglykämie, Herzrhythmusstörungen, Neutropenie oder Leukozytose auftreten (Soignet *et al.*, 1998; 2001). Um das therapeutische Spektrum von ATO zu erhöhen, sind daher Strategien zur Sensitivierung von Tumorzellen notwendig. Im Hinblick auf eine Therapie könnte diese mit einer Verminderung der notwendigen ATO-Dosis und damit der Nebenwirkungen einhergehen.

### 5.2.1 Kombination von Arsentrioxid mit pflanzlichen Polyphenolen

#### 5.2.1.1 Arsentrioxid und Genistein

Eine Erhöhung der intrazellulären ROS-Generierung gilt als eine der wichtigsten Strategien zur Verstärkung der ATO-Wirkung auf Tumorzellen (Maeda *et al.*, 2001; Doudican *et al.*, 2010). Sánchez *et al.* (2008) haben berichtet, dass Genistein (50  $\mu\text{M}$ ) die Induktion von Apoptose durch ATO (2  $\mu\text{M}$ ) bei der humanen Leukämie-Zelllinie U937 nach 24 h verstärkt, indem es zur Bildung von ROS führt. Verbunden mit der ROS-Bildung erfolgte eine Aktivierung der ROS-sensitiven Kinasen p38-MAPK und AMPK, welche an der Regulation von Apoptose beteiligt sind. Eine verstärkte Induktion von Apoptose durch ATO (2  $\mu\text{M}$ ) und Genistein (15 bzw. 20  $\mu\text{M}$ ) nach 48 h wurde auch bei verschiedenen Leberkarzinom-Zelllinien (HepG2, Hep3B, SK-Hep-1) vom Arbeitskreis um Jiang *et al.* (2010) und Ma *et al.* (2011) beschrieben. Jiang *et al.* (2010) führten die Effekte ebenfalls auf die Bildung von ROS durch Genistein zurück. Ma *et al.* (2011) beobachteten darüber hinaus eine Hemmung der redox-sensitiven, antiapoptischen PI3K/Akt und NF- $\kappa$ B Signalwege in Anwesenheit des Isoflavons.

Auch bei den hier untersuchten A-172 und U-87 MG Zellen induziert Genistein eine erhöhte Generierung von ROS (vgl. Abb. 4-40). Bereits nach 120 min sind bei beiden Zelllinien vergleichbare Steigerungen des DCF-Signals um ca. 50% (20  $\mu\text{M}$  Genistein) bzw. 150% (50  $\mu\text{M}$  Genistein) der Kontrollwerte zu messen. Der prooxidative Charakter von Genistein in kultivierten Zellen ist erst seit einigen Jahren bekannt und vermutlich auf eine Störung der mitochondrialen Atmungskette zurückzuführen, wie sich in einer Studie an isolierten Mitochondrien zeigte (Salvi *et al.*, 2002). Bei der Analyse der Kom-

binationswirkung von ATO und Genistein anhand ihrer Konzentrations-Wirkungskurven für Wachstumshemmung ergeben sich bei A-172 Zellen formal synergistische Effekte. Die Sensitivierung der Zellen für ATO ist allerdings nicht sonderlich hoch. In Kombination mit 20 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Genistein müssen nicht 6,3 bzw. 2,2  $\mu\text{M}$  sondern 3,9 bzw. 1,3  $\mu\text{M}$  ATO eingesetzt werden, um eine 50%-ige Wachstumshemmung zu erreichen (vgl. Abb. 4-14). Die Konzentration an ATO ist also unabhängig von der verwendeten Genistein-Konzentration um etwa 40% niedriger, als bei Additivität nötig wäre. Im Gegensatz zu A-172 Zellen wirken ATO und Genistein bei U-87 MG Zellen „nur“ additiv auf das Wachstum (vgl. Abb. 4-16). Der zelllinienspezifische Einfluss von Genistein auf die Wirkung von ATO äußert sich nicht nur in der Hemmung des Wachstums, sondern auch in der Induktion von Apoptose. Bei der Analyse der Kernmorphologie ist bei A-172 Zellen nach 72 h eine deutliche Verstärkung des apoptotischen Zelltodes (18% bzw. 62%) durch Kombination von ATO (5  $\mu\text{M}$ ) mit Genistein (20 bzw. 50  $\mu\text{M}$ ) zu erkennen (vgl. Abb. 4-70). Vergleichbar hoch ist der gemessene Anteil an Apoptose in der Zellzyklusanalyse (15% bzw. 46%; vgl. Abb. 4-71). Bei U-87 MG Zellen findet dagegen keine Steigerung der Apoptoseinduktion statt (vgl. Abb. 4-72 und 4-73). Warum Genistein nur eine der Glioma-Zelllinien für die Wirkung von ATO sensitiviert, ist nicht ersichtlich. So besitzt Genistein bei A-172 und U-87 MG Zellen - neben der Fähigkeit zur ROS-Bildung - z.B. auch eine vergleichbare proliferationshemmende Potenz (vgl. Abb. 4-8) und führt, einzeln appliziert, jeweils nicht zur Apoptoseauslösung oder einem Zellzyklusarrest.

Ähnlich wie U-87 MG Zellen konnten auch C6 Zellen durch Genistein nicht für die proliferationshemmende Wirkung von ATO und eine Induktion von Apoptose sensitiviert werden, obwohl Genistein in dieser Zelllinie ebenfalls zu einer erhöhten Bildung von ROS führte (Klauser *et al.*, 2014). Die Empfindlichkeit von C6 Zellen für ATO konnte auch dann nicht gesteigert werden, wenn man statt Genistein  $\text{H}_2\text{O}_2$  als ROS-Bildner einsetzte. Die Effekte waren jeweils additiv. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zusammen mit den Beobachtungen bei C6 Zellen lassen den Rückschluss zu, dass eine Erhöhung der intrazellulären ROS-Generierung keine allgemeingültige Strategie zur Verstärkung der ATO-Wirkung auf Tumorzellen darstellt. Wenn die Bildung von ROS in diesem Zusammenhang tatsächlich eine Rolle spielt, dann nur zelltypspezifisch. Andernfalls müsste Genistein auch U-87 MG (und C6) Zellen für die Wirkung von ATO sensitivieren.

### 5.2.1.2 Arsentrioxid und Quercetin

Quercetin ist ein Polyphenol aus der Gruppe der Flavonole. Es kommt insbesondere in Zwiebeln, Äpfeln und Schnittlauch vor (Aherne *et al.*, 2002). In einer Arbeit von Shen *et al.* (2012) wurde berichtet, dass Quercetin bei HaCaT Keratinocyten die ATO-induzierte Zytotoxizität und Apoptose verstärkt, indem es - ähnlich wie Genistein - zu einer Bildung von ROS führt. Eine Verstärkung des apoptotischen Zelltodes durch eine Kombination von ATO mit Quercetin wurde auch von Ramos *et al.* (2008) bei drei (von vier untersuchten) Leukämie-Zelllinien beobachtet. Bei der Zelllinie U937 betrug die Apoptoserate nach einer 24 h-Ko-Exposition mit ATO (2  $\mu\text{M}$ ) und Quercetin (25  $\mu\text{M}$ ) ganze 80%. Anders als bei den HaCaT Keratinocyten verstärkte Quercetin (25  $\mu\text{M}$ , 24 h Exposition) die Wirkung von ATO bei den Leukämie-Zellen durch eine Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel (~ 25%). Dieser Mechanismus stellt eine weitere wichtige Strategie dar, um Tumorzellen für ATO zu sensitivieren. Der damit zusammenhängende Sachverhalt wird unter 5.2.2 diskutiert.

Im Unterschied zu den Beobachtungen von Shen *et al.* (2012) induziert Quercetin in den untersuchten Glioma-Zellen weder allein, noch in Kombination mit ATO eine erhöhte Generierung von ROS (vgl. Abb. 4-41). Im Gegenteil, Quercetin (20 und 50  $\mu\text{M}$ ) verringert sogar signifikant die endogene ROS-Bildungsrate - ein Effekt, der z.B. schon von Alia *et al.* (2006) in HepG2 Zellen beobachtet wurde. Bei Versuchsbedingungen, die mit denen von Ramos *et al.* (2008) vergleichbar sind, hat Quercetin (20  $\mu\text{M}$ , 24 h Exposition) außerdem keine Wirkung auf die Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen (vgl. Abb. 4-50 und 4-51). Bei Kombination von ATO (2  $\mu\text{M}$ ) und Quercetin (20  $\mu\text{M}$ ) sind die Spiegel entsprechend der Wirkung von ATO allein erhöht. Unabhängig von einer ROS-Bildung oder einer Senkung des Glutathiongehalts steigert Quercetin die Empfindlichkeit von A-172 Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO. Das Ausmaß der Sensitivierung ist allerdings nicht sonderlich hoch. Um eine 50%-ige Wachstumshemmung zu erreichen, ist die Konzentration an ATO in Kombination mit 20 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Quercetin um etwa 20% bzw. 40% niedriger, als bei Additivität nötig wäre (vgl. Abb. 4-18). Die verstärkte Wachstumshemmung in Anwesenheit von Quercetin geht bei A-172 Zellen wie bei den HaCaT Keratinocyten (Shen *et al.*, 2012) oder den U937-Zellen (Ramos *et al.*, 2008) mit einer Apoptoseinduktion einher. Die Untersuchungen der Kernmorphologie zeigen, dass jeweils etwa 40% der A-172 Zellen apoptotisch sterben, wenn man sie über 72 h mit 5  $\mu\text{M}$  ATO und 20 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Quercetin behandelt (vgl. Abb. 4-74). Die Analyse des Zellzyklus liefert mit Apoptoseraten von ca. 30% (+ 20  $\mu\text{M}$  Quercetin) bzw. 45% (+ 50  $\mu\text{M}$  Quercetin) vergleichbare Ergebnisse (vgl. Abb. 4-75).

Im Gegensatz zu den Effekten auf A-172 Zellen steigert Quercetin die Empfindlichkeit von U-87 MG Zellen nicht für die proliferationshemmende Wirkung von ATO und die Induktion von Apoptose (vgl. Abb. 4-76 und 4-77). Wenn man die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Wachstumshemmung zugrunde legt, ist die Kombinationswirkung der beiden Agentien bei U-87 MG Zellen formal sogar als schwach antagonistisch einzustufen (vgl. Abb. 4-20). Das ist kein gänzlich unbekanntes Phänomen. Untersuchungen in unserem Labor ergaben bereits, dass Quercetin (5 und 20  $\mu\text{M}$ ) bei C6 Zellen ebenfalls auf antagonistische Weise agiert und die proliferationshemmende Wirkung von ATO vermindert (Klauser *et al.*, 2014). Bekannt ist außerdem die schützende Wirkung von Quercetin bei MCF-7 Mammakarzinom-Zellen vor der Natriumarsenit ( $\text{NaAsO}_2$ )-induzierten Zytotoxizität (Soria *et al.*, 2007). Abweichend von ihren sonst positiven Befunden (s.o.) stellten auch Ramos *et al.* (2008) fest, dass Quercetin eine der Leukämie-Zelllinien (NB4), die sie untersuchten, nicht für die ATO-induzierte Apoptose sensitiviert. Die Effekte der beiden Agentien waren bei dieser Zelllinie „less than additive“. Die Resistenz von NB4 Zellen gegenüber einer Apoptoseinduktion verknüpften Ramos *et al.* (2008) mit einem  $G_2/M$ -Arrest im Zellzyklus, der nach einer Behandlung mit Quercetin allein (25  $\mu\text{M}$ ) und in Kombination mit ATO (1  $\mu\text{M}$ ) auftrat. Die Autoren mutmaßten, dass ein  $G_2$ -Arrest NB4 Zellen vorübergehend daran hindern könne den apoptotischen Prozess einzuleiten. Quercetin arretiert auch U-87 MG Zellen in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzyklus (vgl. Abb. 7-4). Allerdings scheint dieser Effekt als Begründung für die Unempfindlichkeit von U-87 MG Zellen nicht ausreichend. Die durch Quercetin allein und in Kombination mit ATO hervorgerufenen Veränderungen in der Zellzyklusverteilung von U-87 MG Zellen sind verglichen mit (i) den unbehandelten Kulturen ( $\leq 16\%$ ) und (ii) den Effekten, welche bei NB4 Zellen ausgelöst wurden, äußerst gering. Für die letzteren ist nur eine Gegenüberstellung der DNA-Histogramme möglich, da Ramos *et al.* (2008) keine Zahlenwerte angeben.

Es lassen sich auch sonst keine offensichtlichen Erklärungen finden, warum Quercetin bei den verwendeten Glioma-Zellen einen unterschiedlichen Einfluss auf die ATO-Wirkung hat. So besitzt Quercetin bei beiden Zelllinien mit  $\text{EC}_{50}$ -Werten (72 h Exposition) von  $119 \pm 13,9$  (A-172) bzw.  $114 \pm 10,5$  (U-87 MG) z.B. die gleiche proliferationshemmende Potenz (vgl. Abb. 4-9) und induziert selbst jeweils keine Apoptose. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Zelllinienspezifität aufzuklären. Auffällig ist, dass hier erneut A-172, nicht aber U-87 MG Zellen für die Wirkung von ATO sensitiviert werden (siehe Genistein).

### 5.2.1.3 Arsentrioxid und Curcumin

Sánchez *et al.* (2010) haben berichtet, dass Curcumin, ein aus dem Rhizom der Gelbwurzel (*Curcuma longa* L.) stammendes Polyphenol, die zytotoxische Wirkung von ATO sowie die Induktion von Apoptose bei einigen (aber nicht allen) Leukämie-Zelllinien verstärkt, indem es ebenfalls zu einer intrazellulären Bildung von ROS führt. Vor diesem Hintergrund wurde Curcumin mit dem Ziel die Empfindlichkeit von Glioma-Zellen für die Wirkung von ATO zu erhöhen, als weiteres Polyphenol ausgewählt. Interessanterweise unterscheiden sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich von den Beobachtungen, die Sánchez *et al.* (2010) gemacht haben. Curcumin (5 - 50  $\mu\text{M}$ ) sensitiviert weder A-172, noch U-87 MG Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO. Legt man die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Wachstumshemmung zugrunde, sind die Kombinationseffekte der beiden Agentien bei A-172 Zellen formal unabhängig und bei U-87 MG Zellen abhängig vom zugrunde gelegten Wirkungsniveau als antagonistisch zu werten (vgl. Abb. 4-22 und 4-24). Curcumin übt weiterhin keine prooxidative Wirkung aus. So induziert es (20 und 50  $\mu\text{M}$ ) keine Erhöhung, sondern führt sogar zu einer Verminderung der endogenen ROS-Bildungsrate in beiden Zelllinien (vgl. Abb. 4-42). Darüber hinaus steigert Curcumin (20  $\mu\text{M}$ ) allein und in Kombination mit ATO (2  $\mu\text{M}$ ) signifikant die intrazellulären Glutathionspiegel ( $\geq 50\%$ ) (vgl. Abb. 4-50 und 4-51). Ähnlich beschrieben auch Lavoie *et al.* (2009) eine Erhöhung der Glutathionlevels durch Curcumin (20  $\mu\text{M}$ ) in Primärkulturen von korticalen Maus-Astrozyten um ca. 75%. Verbunden damit trat eine Erhöhung der GCS-Aktivität auf. Einer Steigerung des Glutathiongehalts durch Curcumin wurde auch bei K562 Leukämie-Zellen beobachtet und ebenfalls auf eine Induktion der GCS-Aktivität zurückgeführt (Singhal *et al.*, 1999).

Vorausgehende Studien haben gezeigt, dass Curcumin kultivierte, humane Lymphozyten sowie Maus-Milzzellen vor den zytotoxischen Effekten von dreiwertigem Arsen schützt, indem es aufgrund seiner antioxidativen Kapazität den Arsen-ausgelösten, oxidativen Stress hemmt (Mukherjee *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu den Beobachtungen an den Nichttumor-Zellen liefern die hier vorliegenden Untersuchungen keine Hinweise darauf, dass ATO prooxidativ agiert (siehe 5.1.3). Daher ist es äußerst unwahrscheinlich, dass die antagonistische Wirkung, welche bei einer Ko-Exposition mit ATO und Curcumin auftritt, aufgrund der antioxidativen Eigenschaften von Curcumin zustande kommt. Der Einfluss von Curcumin auf die Glutathionspiegel könnte in diesem Zusammenhang aber trotzdem eine bedeutende Rolle spielen, da die Sensitivität von A-172 und U-87 MG Zellen für ATO durch Veränderungen der endogenen Glutathionlevels stark beeinflusst werden kann (siehe 5.2.2). Wie vorher schon

beschrieben steigert auch ATO die Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen. Evtl. wirken ATO und Curcumin auf die gleiche Weise und erhöhen die Aktivität der glutathionsynthetisierenden Enzyme. Die Tatsache, dass die Glutathionlevels, die nach der Ko-Exposition gemessen werden, kaum bzw. nicht höher sind, als nach einer Behandlung mit den Einzelsubstanzen, könnte damit zusammenhängen, dass die Effekte schon maximal sind. Dafür spricht insbesondere der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, welche den Einfluss von ATO auf den Glutathiongehalt beschreiben (vgl. Abb. 4-49). Diese zeigen, dass die höchstmögliche Steigerung der Glutathionspiegel bereits bei 1  $\mu\text{M}$  (A-172) bzw. 0,5  $\mu\text{M}$  (U-87 MG) ATO erreicht wird.

#### 5.2.1.4 Arsenitrioxid und Resveratrol

Resveratrol ist ein Nicht-Flavonoid aus der Gruppe der Stilbene und u.a. in Rotwein oder Erdnüssen zu finden (Burns *et al.*, 2002). In der Literatur existiert eine Vielzahl von Berichten, die belegen, dass Resveratrol Tumorzellen für die Wirkung von diversen Zytostatika sensitiviert. Harikumar *et al.* (2010) haben z.B. beschrieben, dass Resveratrol die Empfindlichkeit von verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien für die Gemcitabin-vermittelte Apoptose erhöht. Resveratrol unterdrückte dabei die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und hemmte die Expression verschiedener NF- $\kappa$ B-regulierter Genprodukte, die antiapoptotische, metastasenbildende, proliferations- und angiogenesefördernde Effekte ausüben. Jazirehi *et al.* (2004) haben weiterhin gezeigt, dass Resveratrol die Induktion von Apoptose durch Paclitaxel in verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphom- und MM-Zelllinien verstärkt. Entscheidend für die Sensitivierung war hier die Expressionshemmung des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL (*B cell lymphoma extra large*) durch Resveratrol. Weitere Studien belegen, dass Resveratrol beispielsweise auch die Effekte von Bortezomib bei MM-Zellen (Bhardwaj *et al.*, 2007) oder die von Doxorubicin bei AML-Zellen (Kweon *et al.*, 2010) steigert.

Aufgrund der genannten und zahlreicher weiterer positiver Befunde wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob Resveratrol auch die proliferationshemmende Wirkung von ATO bei A-172 und U-87 MG Zellen verstärkt. Die Ergebnisse zeigen allerdings, dass die Empfindlichkeit der Glioma-Zellen für ATO in Anwesenheit von Resveratrol (5 - 50  $\mu\text{M}$ ) nicht erhöht wird. Im Gegenteil, Kombinationen von ATO und Resveratrol wirken, unabhängig vom betrachteten Effektniveau, schwach antagonistisch auf das Wachstum der Zellen (vgl. Abb. 4-26 und Abb. 4-28).

Bei embryonalen Ratten-Kardiomyocyten (H9c2) führte eine 1 h-Vorinkubation mit einer sub-toxischen Resveratrol-Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) ebenfalls zu keiner Verstärkung, sondern zu einer offensichtlichen Verminderung der ATO (10  $\mu\text{M}$ )-induzierten Zytotoxi-



zität und Apoptose (Zhao *et al.*, 2008). Resveratrol hemmte in diesem Zusammenhang die durch ATO ausgelöste ROS-Generierung, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung und damit die Aktivierung von Caspase-3, welche an der Ausführung von Apoptose beteiligt ist. In zwei kürzlich publizierten, tierexperimentellen Untersuchungen wurde darüber hinaus festgestellt, dass Resveratrol (3 mg/kg) das Gehirn und die Lunge von Katzen vor der oxidativen Schädigung durch ATO (1 mg/kg) schützt, indem es verschiedene, durch ATO ausgelöste, prooxidative Prozesse (ROS-Bildung, Lipidperoxidation, Glutathionspiegel-Senkung u.a.) unterdrückt (Cheng *et al.*, 2013a; 2013b).

Wie Curcumin erhöht auch Resveratrol (20  $\mu\text{M}$ ) allein oder in Kombination mit ATO (2  $\mu\text{M}$ ) die Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen (vgl. Abb. 4-50 und 4-51). Die Effekte von Resveratrol (jeweils ~ 16%) sind allerdings deutlich geringer als die von Curcumin (jeweils ~ 70%). In Primärkulturen von korticalen Maus-Astrozyten hatte Resveratrol (25  $\mu\text{M}$ ) eine stärkere Wirkung. Hier fand eine Steigerung der Glutathionlevels um ca. 60% statt (de Almeida *et al.*, 2007). Die Erhöhung der Glutathionspiegel durch Resveratrol hängt möglicherweise mit einer Hochregulierung der GCS via einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 (*nuclear factor erythroid related factor-2*) zusammen. Beide Effekte zeigten sich bei A549 Lungenkarzinom-Zellen nach einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol (Kode *et al.*, 2008). Es ist unwahrscheinlich, dass die antagonistische Kombinationswirkung von ATO und Resveratrol - ähnlich wie die von ATO und Curcumin - Konsequenz einer gesteigerten antioxidativen Kapazität der Zellen aufgrund der durch Resveratrol erhöhten Glutathionspiegel ist. Anders ausgedrückt tritt die antagonistische Wirkung aller Voraussicht nach nicht auf, weil Resveratrol, wie in den oben zitierten Arbeiten, den ATO-induzierten, oxidativen Stress unterdrückt. Bei U-87 MG Zellen wirkt Resveratrol (20 und 50  $\mu\text{M}$ ) zudem selbst prooxidativ und erhöht die intrazellulären ROS-Levels (vgl. Abb. 4-43). Die Tatsache, dass Resveratrol die Empfindlichkeit von U-87 MG Zellen nicht für die Wirkung von ATO verstärkt, demonstriert erneut, dass eine Generierung von ROS keine geeignete Strategie ist, um diese Zelllinie für ATO zu sensitivieren (vgl. 5.2.1.1).

#### 5.2.1.5 Arsentrioxid und Epigallocatechin-3-gallat

Das fünfte Polyphenol, das in der vorliegenden Arbeit mit dem Ziel die Wirkung von ATO bei Glioma-Zellen zu verstärken, untersucht wurde, war das im grünen Tee vorkommende Flavanol EGCG. Wie die anderen Polyphenole wurde auch EGCG im Hinblick auf vorausgehende, positive Befunde ausgewählt. In einer Studie von Nakazato *et al.* (2005) wurde z.B. berichtet, dass EGCG bei einer sub-toxischen Konzentration (10

$\mu\text{M}$ ) die zytotoxische Wirkung von ATO ( $2 \mu\text{M}$ ) und die Induktion von Apoptose bei HS-sultan Lymphom-Zellen nach 24 h verstärkt. Die beobachteten Effekte verknüpften die Wissenschaftler mit dem Einfluss der Agentien auf die Glutathion- und ROS-Levels. Sowohl EGCG als auch ATO führten bei HS-sultan Zellen bereits nach 3 h zu einer schwachen Erhöhung der ROS-Bildung und einer Verminderung der Glutathionspiegel. Bei Kombination von ATO und EGCG nahm das Ausmaß der Wirkung auf die beiden Parameter deutlich zu.

In einer Studie von Sánchez *et al.* (2009b) wurde herausgefunden, dass Kombinationen von ATO ( $1 - 2 \mu\text{M}$ ) und EGCG ( $50 \mu\text{M}$ ) nach 24 h auch zu einer gesteigerten Apoptoserate bei HL-60 Zellen und anderen Leukämie-Zelllinien (U937, NB4) führen. Ähnlich beobachteten Lee *et al.* (2011), dass EGCG bei einer sub-toxischen Konzentration ( $20 \mu\text{M}$ ) die zytotoxische Wirkung von ATO ( $1 - 2 \mu\text{M}$ ) auf HL-60 Zellen nach 72 h verstärkt. Die Verstärkung der ATO-Zytotoxizität war verbunden mit einer mitochondrienabhängigen Induktion von Apoptose. Wie bei HS-sultan-Zellen (Nakazato *et al.*, 2005) löste EGCG bei HL-60 Zellen (Lee *et al.*, 2011) eine gesteigerte Bildung von ROS aus, die bei Kombination mit ATO zunahm. ATO selbst hatte keinen Effekt auf die ROS-Bildung, induzierte aber die Hämoxygenase 1 (HO-1), welche Häm u.a. zu freiem  $\text{Fe}^{2+}$  abbaut. Lee *et al.* (2011) mutmaßten, dass durch EGCG  $\text{H}_2\text{O}_2$  und über ATO  $\text{Fe}^{2+}$  gebildet würden und dass die Sensitivierung der Leukämie-Zellen bei Kombination der Agentien auftrat, weil  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Fenton Reaktion ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ) zu reaktiven Hydroxyl-Radikalen ( $\cdot\text{OH}$ ) umgewandelt wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Kombinationen von ATO und EGCG auf A-172 und U-87 MG Zellen eine deutlich andere Wirkung ausüben als auf die Lymphom- (Nakazato *et al.*, 2005) und Leukämie-Zellen (Sánchez *et al.*, 2009b; Lee *et al.*, 2011). EGCG ( $20$  und  $50 \mu\text{M}$ ) induziert weder allein, noch in Anwesenheit von ATO ( $2 \mu\text{M}$ ) eine erhöhte Generierung von ROS (vgl. Abb. 4-44). Im Gegenteil, verglichen mit den unbehandelten Kulturen findet bei beiden Glioma-Zelllinien eine Verminderung der endogenen ROS-Bildungsrate statt. Eine ähnliche antioxidative Wirkung hatte EGCG ( $5$  und  $10 \mu\text{M}$ ) z.B. auch bei Caco2 Kolonkarzinom-Zellen. Es verringerte hier die inhärente ROS-Entstehung (Rodriguez-Ramiro *et al.*, 2011). Anders als bei den Lymphom-Zellen (Nakazato *et al.*, 2005) besitzt EGCG ( $20 \mu\text{M}$ , 24 h Exposition) weiterhin keinen Einfluss auf die Glutathionspiegel von A-172 und U-87 MG Zellen (vgl. Abb. 4-50 und 4-51). Bei gleichzeitigem Einsatz von ATO ( $2 \mu\text{M}$ ) und EGCG ist der Gehalt an Glutathion sogar erhöht. Dabei zeichnet sich die Wirkung von ATO allein ab. Von besonderer Bedeutung sind an dieser Stelle aber v.a. die Befunde der Kombinationswirkungsanalyse für Wachstumshemmung. Diese machen deutlich, dass die Empfindlichkeit der Glioma-Zellen für ATO weder bei sub-toxischen, noch bei selbst toxischen Konzentra-



tionen an EGCG gesteigert werden kann. Bei A-172 Zellen wirken Kombinationen der beiden Agentien additiv auf das Wachstum (vgl. Abb. 4-30). Bei U-87 MG treten in Abhängigkeit vom betrachteten Effektniveau formal schwach antagonistische ( $EC_{50}$ ) bzw. ebenfalls additive ( $EC_{80}$ ) Effekte auf (vgl. Abb. 4-32).

### 5.2.2 Kombination von Arsenitrioxid mit Buthioninsulfoximin

Die Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel gilt, wie oben bereits erwähnt, als eine weitere wichtige Strategie zur Sensitivierung von Tumorzellen für ATO. BSO, ein spezifischer Inhibitor der GCS (Griffith *et al.*, 1979), verstärkt die zytotoxische Wirkung von ATO bei verschiedenen Zelllinien, darunter Leber- (Kito *et al.*, 2002), Gebärmutterhals- (Han *et al.*, 2008), Brust- und Blasen- (Yang *et al.*, 1999), Prostata- und Kolonkarzinom-Zellen (Maeda *et al.*, 2004). Damit stehen die Befunde der vorliegenden Arbeit im Einklang mit denen der Literatur. BSO selbst wirkt bei Konzentrationen bis zu 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch auf die untersuchten Glioma-Zellen, sensitiviert sie aber deutlich für die proliferationshemmende Wirkung von ATO (vgl. Abb. 4-33 und 4-34). Die Effekte von BSO sind konzentrationsabhängig und bereits bei 5  $\mu\text{M}$  stark ausgeprägt. In Kombination mit 20 bzw. 100  $\mu\text{M}$  BSO wird nach 72 h bei einer klinisch vertretbaren ATO-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  (Shen *et al.*, 1997) ein (fast) vollständiger Zellverlust induziert. Gemessen an den  $EC_{50}$ -Werten werden A-172 Zellen durch 100  $\mu\text{M}$  BSO um den Faktor  $\sim 22$  und U-87 MG Zellen um den Faktor  $\sim 8$  für die Wirkung von ATO sensitiviert. Der für A-172 Zellen ermittelte „Sensitivierungsfaktor“ entspricht in etwa dem, der in unserem Labor früher für C6 Zellen gemessen wurde ( $\sim 20$ ) (Klauser *et al.*, 2014). Die  $EC_{50}$ -Werte für ATO, welche sich bei gleichzeitiger Inkubation mit BSO ergeben, sind bei A-172 und U-87 MG (vgl. Abb. 4-35) sowie C6 Zellen (Klauser *et al.*, 2014) nahezu identisch. Anders ausgedrückt werden die drei Zelllinien durch eine intrazelluläre Glutathionverarmung gleich empfindlich für ATO. Auch wenn Unterschiede in den Versuchsbedingungen eine direkte Übertragung der Ergebnisse schwierig machen, scheinen die hier gemessenen  $EC_{50}$ -Werte außerdem mit denen vergleichbar zu sein, die bei verschiedenen anderen Tumor-Zelllinien bei Kombination von ATO und BSO erfasst wurden (Yang *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2004).

Glutathion ist ein ubiquitär vorkommendes Antioxidanz, das eine wichtige Rolle bei der zellulären Abwehr von ROS-vermitteltem, oxidativem Stress spielt (Dickinson *et al.*, 2002). In der Literatur wird z.T. angenommen, dass BSO Tumorzellen für ATO sensitiviert, indem es durch Senkung der intrazellulären Glutathionspiegel ebenfalls zu einer

erhöhten Generierung von ROS führt (Kito *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2004). Bei A-172 und U-87 MG Zellen verringert BSO (5  $\mu\text{M}$ ) allein und in Kombination mit ATO (1  $\mu\text{M}$ ) deutlich den Glutathiongehalt (vgl. Abb. 4-52), induziert aber keine erhöhte ROS-Bildung (vgl. Abb. 4-45). Da die Akkumulation von ROS eine Konsequenz von verminderten Glutathionspiegeln sein könnte, kann man nicht vollständig ausschließen, dass die hier gewählte Expositionszeit (0 - 120 min) nicht ausreicht, um solche Effekte zu beobachten. In einer Studie von Wu *et al.* (2004) an verschiedenen Nierenkarzinom-Zelllinien trat allerdings selbst nach einer 24 h-Behandlung mit ATO und BSO keine erhöhte Bildung von ROS auf. Grundsätzlich ist es unwahrscheinlich, dass die Sensitivierung von A-172 und U-87 MG Zellen für ATO durch BSO auf ROS-Bildung beruht. Wenn dem so wäre, dann müssten Genistein und Resveratrol auch die Empfindlichkeit von U-87 MG Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO steigern (vgl. 5.2.1.1 und 5.2.1.4).

Ein anderer Mechanismus, auf dem die Sensitivierung von Tumorzellen für ATO durch eine Senkung der Glutathionspiegel beruhen könnte, ist die verminderte Bindung von ATO in der Zelle. Glutathion spielt eine wichtige Rolle bei der Biotransformation von Fremdstoffmetaboliten (Dickinson *et al.*, 2002). Bekannt ist, dass dreiwertiges Arsen direkt an die Thiol-Gruppe von Glutathion bindet, wodurch ein  $\text{As}(\text{SG})_3$ -Komplex entsteht (Scott *et al.*, 1993; Delnomdedieu *et al.*, 1994). Dieser Komplex stellt ein Substrat für Membrantransportproteine dar und kann auf diese Weise aus der Zelle geschleust werden. Für ATO ist ein MRP1 (*human multidrugresistanceprotein 1*)-vermittelter As-GSH Efflux bekannt (Leslie *et al.*, 2004). In der TRL1215 Rattenleber-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass eine BSO-induzierte Glutathionverarmung mit einer zellulären Natriumarsenit-Akkumulation einhergeht, möglicherweise über einen reduzierten Efflux (Liu *et al.*, 2001). Eine Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel könnte also dazu führen, dass die Konzentration an freiem, aktivem ATO und seine Verweildauer in der Zelle ansteigen. Damit verbunden könnte eine erhöhte Zytotoxizität auftreten.

Zahlreiche Berichte schildern, dass eine Ko-Exposition mit BSO, und damit Verringerung der Glutathionspiegel, bei Tumorzellen unterschiedlichster Abstammung zu einer verstärkten Induktion von Apoptose durch ATO führt. Diese Effekte sollen auch dann auftreten, wenn ATO allein keinen apoptotischen Zelltod auslöst (Dai *et al.*, 1999; Kito *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2008). Übereinstimmend mit diesen Befunden geht auch die erhöhte proliferationshemmende Wirkung von ATO auf A-172 Zellen in Anwesenheit von BSO mit einer Induktion von Apoptose einher. Bei Kombination von 2  $\mu\text{M}$  ATO mit 100  $\mu\text{M}$  BSO beträgt der Anteil apoptotischer Zellen nach 72 h beispielsweise ~51%, bestimmt anhand von Veränderungen der Zellkernmorphologie (vgl. Abb. 4-80). Der bei der Zellzyklusanalyse gemessene Apoptoseanteil

ist mit ~40% ähnlich hoch (vgl. Abb. 4-81). Anders als bei A-172 Zellen ist die gesteigerte Wachstumshemmung bei U-87 MG Zellen nicht mit einer Apoptoseauslösung verbunden (vgl. Abb. 4-82 und 4-83). Der Anteil apoptotischer Zellen ist bei einer Ko-Exposition mit ATO und BSO nicht höher, als bei einer Behandlung mit ATO allein. Veränderungen im Zellzyklus oder eine Induktion des nekrotischen Zelltodes können als Ursache für die gesteigerte Wachstumshemmung ebenfalls ausgeschlossen werden. Ein alternativer Mechanismus, der in diesem Zusammenhang auftreten könnte, ist eine verstärkte Induktion von Autophagie. Wie unter 5.1.2 erwähnt, wird diese Zelltodesart nach einer Exposition mit ATO bei verschiedenen Glioma-Zellen häufig beobachtet (Kanzawa *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2009). Ob dieser Mechanismus tatsächlich eine Rolle spielt, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen. Soweit bekannt, existieren in der Literatur dazu keine Angaben.

### 5.3 Schlussfolgerung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Frage, ob humane Glioma-Zellen für die zytostatische bzw. zytoletale Wirkung von ATO durch den gleichzeitigen Einsatz von verschiedenen pflanzlichen Polyphenolen bzw. BSO sensitiviert werden können. Damit sollte geprüft werden, ob ATO in Kombination mit einem *Sensitizer* einen geeigneten Ansatz zur Therapie maligner Glioma darstellen könnte.

Von den fünf untersuchten Polyphenolen erhöhen Genistein und Quercetin die Empfindlichkeit von A-172 Zellen für die proliferationshemmende Wirkung von ATO. Das Ausmaß der Sensitivierung ist allerdings nicht sehr hoch. Bei U-87 MG Zellen wirken Kombinationen von ATO und Genistein additiv, während Kombinationen von ATO und Quercetin formal eine antagonistische Wirkung besitzen. Curcumin, Resveratrol und EGCG steigern die Empfindlichkeit beider Zelllinien nicht. Sie wirken in Kombination mit ATO z.T. additiv, vorwiegend aber antagonistisch auf das Wachstum der Zellen. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Kombinationswirkung von ATO und den fünf Polyphenolen komplex und teilweise zelllinienspezifisch ist. Aufgrund der sensitivierenden Wirkung eines Polyphenols bei einer Glioma-Zelllinie lassen sich nicht automatisch Rückschlüsse auf die Sensitivierung bei einer anderen Glioma-Zelllinie ziehen. Um die Ursachen für die Zelllinienspezifität und die zugrundeliegenden Mechanismen der Kombinationswirkung von ATO und den eingesetzten Polyphenolen besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Hinsichtlich eines Einsatzes in der Tu-

morthherapie kann aber bereits an dieser Stelle die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die gewählten Polyphenole kaum geeignete *Sensitizer* sind, um die proliferationshemmende Wirkung von ATO auf maligne Gliome zu verstärken. Ob sich andere Polyphenole als geeignet erweisen, gilt es zu prüfen. Bei weiteren Untersuchungen sollte die Heterogenität von Glioma-Zelllinien stets berücksichtigt und Extrapolationen nur mit Vorsicht durchgeführt werden. Es sollte außerdem bedacht werden, dass Polyphenole die Wirkung von ATO auf Glioma-Zellen nicht nur verstärken, sondern auch auf eine antagonistische Weise beeinflussen können.

Im Gegensatz zu den fünf Polyphenolen agiert BSO selbst nicht zytotoxisch, steigert die Empfindlichkeit beider Zelllinien aber deutlich für die Wirkung von ATO - ein Effekt der bereits bei zahlreichen anderer Zelllinien beobachtet wurde, also nicht zellspezifisch zu sein scheint. Damit erweist sich die Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel, nicht aber eine erhöhte Bildung von ROS als eine vielversprechende Strategie zur Sensitivierung von A-172 und U-87 MG Zellen für ATO. Eine Kombinationstherapie mit ATO und BSO (oder anderen glutathionsenkenden Agentien) könnte somit einen alternativen Therapieansatz zur Behandlung von Patienten mit malignen Gliomen darstellen. Die klinische Wirksamkeit (Glutathionsenkung) und Verträglichkeit von BSO wurde bereits in verschiedenen Phase I Studien an Krebspatienten belegt (Bailey *et al.*, 1994; O'Dwyer *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1997). Bei Anwendung unterschiedlicher Therapiekonzepte führte eine intravenöse BSO-Applikation bei Dosen, die gut toleriert wurden, zu einer deutlichen Verarmung an Glutathion in peripheren Lymphozyten und im Tumorgewebe.

Mittlerweile existieren vier abgeschlossene Phase I Studien an Patienten mit malignen Gliomen, bei denen ATO in Kombination mit Temozolomid und/oder Radiotherapie eingesetzt wurde ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); Stand: April 2014). Ziele dieser Studien waren in erster Linie eine Dosisfindung (maximal tolerierte ATO-Dosis) und die Bestimmung der toxischen Nebenwirkungen. Veröffentlichte Ergebnisse liegen dazu allerdings noch nicht vor. Eine weitere, ähnliche Studie befindet sich derzeit im Aufbau. *In vivo* Untersuchungen zur Kombinationswirkung von ATO und BSO bei malignen Gliomen sind bisher nicht vorhanden. Der gemeinsame Einsatz der Agentien erwies sich aber bereits in einer tierexperimentellen Studie an Mäusen mit einem orthotop implantierten Prostatakarzinom als wirksam und verträglich (Maeda *et al.*, 2004). Bei Versuchstieren, denen in dieser Studie ATO (2 mg/kg/Tag) und BSO verabreicht (i.p.) wurden, zeigte sich eine stärkere Hemmung des Tumorstwachstums und eine höhere Überlebensrate als bei Tieren, die einer Behandlung mit ATO allein (5 mg/kg/Tag) bzw. keiner Behandlung unterzogen wurden. Die Kombinationstherapie mit ATO und BSO war mit einem leich-

ten Gewichtsverlust verbunden. Schwerwiegende Nebenwirkung, z.B. eine Anämie oder eine Schädigung von wichtigen Organen (Leber, Lunge, Niere), traten nicht auf.

## 6 Literaturverzeichnis

Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H, Klotz LO (2003). Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **278**(40): 38360-38367.

Aherne SA, O'Brien NM (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**(1): 75-81.

Alia M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L (2006). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr* **45**(1): 19-28.

Anderson ME (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* **113**: 548-555.

Aoki H, Kondo Y, Aldape K, Yamamoto A, Iwado E, Yokoyama EF, *et al.* (2008). Monitoring autophagy in glioblastoma with antibody against isoform B of human microtubule-associated protein 1 light chain 3. *Autophagy* **4**(4): 467-475.

Arts IC, Jacobs Jr. DR, Gross M, Harnack LJ, Folsom AR (2002). Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control* **13**(4): 373-382.

Bailey HH, Mulcahy RT, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Tombes MB, *et al.* (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, *et al.* (1997). Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J Natl Cancer Inst* **89**(23): 1789-1796.

Bannai S, Sato H, Ishii T, Taketani S (1991). Enhancement of glutathione levels in mouse peritoneal macrophages by sodium arsenite, cadmium chloride and glucose/glucose oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1092**(2): 175-179.

Baumgartner M, Sturlan S, Roth E, Wessner B, Bachleitner-Hofmann T (2004). Enhancement of arsenic trioxide-mediated apoptosis using docosahexaenoic acid in arsenic trioxide-resistant solid tumor cells. *Int J Cancer* **112**(4): 707-712.

Berenbaum MC (1977). Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. *Clin Exp Immunol* **28**(1): 1-18.

Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* **211**(2): 314-321.

Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan-Raj S, Bueso-Ramos C, Takada Y, Gaur U, *et al.* (2007). Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance

through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* **109**(6): 2293-2302.

Braganhol E, Zamin LL, Canedo AD, Horn F, Tamajusuku AS, Wink MR, *et al.* (2006). Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* **17**(6): 663-671.

Brandes AA, Vastola F, Basso U, Berti F, Pinna G, Rotilio A, *et al.* (2003). A prospective study on glioblastoma in the elderly. *Cancer* **97**(3): 657-662.

Bremer E, van Dam G, Kroesen BJ, de Leij L, Helfrich W (2006). Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects. *Trends Mol Med* **12**(8): 382-393.

Burkhard C, Di Patre PL, Schüler D, Schüler G, Yaşargil MG, Yonekawa Y, *et al.* (2003). A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma. *J Neurosurg* **98**(6): 1170-1174.

Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* **50**(11): 3337-3340.

Campbell RA, Sanchez E, Steinberg JA, Baritaki S, Gordon M, Wang C, *et al.* (2007). Antimyeloma effects of arsenic trioxide are enhanced by melphalan, bortezomib and ascorbic acid. *Br J Haematol* **138**(4): 467-478.

Chen AC, Donovan SM (2004). Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits Caco-2BBE cell proliferation by causing G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest. *J Nutr Biochem* **134**(6): 1303-1308.

Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, *et al.* (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): 3345-3353.

Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, *et al.* (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**(3): 1052-1061.

Cheng B, Yang X, An L, Gao B, Liu X (2010). Arsenic trioxide-induced apoptosis of Hep-2 cell line through modulating intracellular glutathione (GSH) level. *Auris Nasus Larynx* **37**(1): 89-94.

Cheng TJ, Wang YJ, Kao WW, Chen RJ, Ho YS (2007). Protection against arsenic trioxide-induced autophagic cell death in U118 human glioma cells by use of lipoic acid. *Food Chem Toxicol* **45**(6): 1027-1038.

Cheng YH, Ou BR, Cheng LC, Lu JH, Yeh JY (2008). Glutathione regulation in arsenic-induced porcine aortic endothelial cells. *Toxicol in Vitro* **22**(8): 1832-1839.

Cheng Y, Xue J, Jiang H, Wang M, Gao L, Ma D, *et al.* (2013a). Neuroprotective effect of resveratrol on arsenic trioxide-induced oxidative stress in feline brain. *Hum Exp Toxicol*: 1-11.



- Cheng Y, Xue J, Yao C, Gao L, Ma D, Liu Y, *et al.* (2013b). Resveratrol ameliorates the oxidative damage induced by arsenic trioxide in the feline lung. *J Vet Med Sci.* **75**(9): 1139-1146.
- Chien CW, Yao JH, Chang SY, Lee PC, Lee TC (2011). Enhanced suppression of tumor growth by concomitant treatment of human lung cancer cells with suberoylanilide hydroxamic acid and arsenic trioxide. *Toxicol Appl Pharmacol* **257**(1): 59-66.
- Chiu HW, Ho YS, Guo HR, Wang YJ (2009). Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances autophagic effects in U118-MG cells through increased mitotic arrest and regulation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Autophagy* **5**(4): 472-483.
- Chou TC (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **58**(3): 621-681.
- Chou TC, Talalay P (1983). Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci* **4**: 450-454.
- Cipollini D, Stevenson R, Enright S, Eyles A, Bonello P (2008). Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects. *J Chem Ecol* **34**(2): 144-152.
- ClinicalTrials.gov - A service of the U.S. National Institutes of Health. Unter: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=arsenic&cond=%22Glioma%22>. [Stand: April 2014].
- Constantinou A, Kiguchi K, Huberman E (1990). Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* **50**(9): 2618-2624.
- 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): 268-277.
- Davison K, Côté S, Mader S, Miller WH (2003). Glutathione depletion overcomes resistance to arsenic trioxide in arsenic-resistant cell lines. *Leukemia* **17**(5): 931-940.
- de Almeida LM, Pineiro CC, Leite MC, Brolese G, Tramontina F, Feoli AM, *et al.* (2007). Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. *Cell Mol Neurobiol* **27**(5): 661-668.
- de Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**(4): 675-684.
- Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ (1994). Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chem Biol Interact* **90**(2): 139-155.
- Dickinson DA, Forman HJ (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* **64**(5-6): 1019-1026.
- Dilda PJ, Hogg PJ (2007). Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev* **33**(6): 542-564.



- Dizaji MZ, Malehmir M, Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Ghaffari SH (2012). Synergistic effects of arsenic trioxide and silibinin on apoptosis and invasion in human glioblastoma U87MG cell line. *Neurochem Res* **37**(2): 370-380.
- Doudican NA, Bowling B, Orlow SJ (2010). Enhancement of arsenic trioxide cytotoxicity by dietary isothiocyanates in human leukemic cells via a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Leuk Res* **34**(2): 229-234.
- Early E, Moore MA, Kakizuka A, Nason-Burchenal K, Martin P, Evans RM, *et al.* (1996). Transgenic expression of PML/RARalpha impairs myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci* **93**(15): 7900-7904.
- EMA (2002). Trisenox - arsenic trioxide. Unter: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000388/WC500042837.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000388/WC500042837.pdf). [Stand: Februar 2014].
- FDA (2000). Center for Drug Evaluation and Research 2000 - Report to the nation improving public health through human drugs. Unter: <http://www.fda.gov/downloads/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsandtobacco/cder/whatwedo/ucm079006.pdf> [Stand: Februar 2014].
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. **46**(4): 765-781.
- Flora SJ (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* **51**(2): 257-281.
- Gao F, Yi J, Shi GY, Li H, Shi XG, Tang XM (2002). The sensitivity of digestive tract tumor cells to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> is associated with the inherent cellular level of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* **8**(1): 36-39.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, *et al.* (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1417-1423.
- 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): 7558-7560.
- Gülden M, Mörchel S, Seibert H (2001). Factors influencing nominal effective concentrations of chemical compounds in vitro: cell concentration. *Toxicol In Vitro* **15**(3): 233-243.
- Gülden M, Schreiner J, Seibert H (2013). In vitro toxicity testing with microplate cell cultures: Impact of cell binding. *Toxicology*(13): 1-11.
- Haga N, Fujita N, Tsuruo T (2005). Involvement of mitochondrial aggregation in arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Cancer Sci* **96**(11): 825-833.
- Halliwell B, Whiteman M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**(2): 231-255.

Han YH, Kim SZ, Kim SH, Park WH (2008). Enhancement of arsenic trioxide-induced apoptosis in HeLa cells by diethylthiocarbamate or buthionine sulfoximine. *Int J Oncol* **33**(1): 205-213.

Han YH, Moon HJ, You BR, Kim SZ, Kim SH, Park WH (2009). The effect of MAPK inhibitors on arsenic trioxide-treated Calu-6 lung cells in relation to cell death, ROS and GSH levels. *Anticancer Res* **29**(10): 3837-3844.

Han YH, Moon HJ, You BR, Kim SZ, Kim SH, Park WH (2010). Effects of arsenic trioxide on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in different cell types. *Int J Mol Med* **25**(1): 121-128.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**(7095): 885-889.

Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Sethi G, Diagaradjane P, Anand P, Pandey MK, *et al.* (2010). Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* **127**(2): 257-268.

Herbert KJ, Snow ET (2012). Modulation of arsenic-induced epidermal growth factor receptor pathway signalling by resveratrol. *Chem Biol Interact* **198**(1-3): 38-48.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**(8878): 1007-1011.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, *et al.* (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* **155**(4): 381-386.

Hirano T, Gotoh M, Oka K (1994). Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci* **55**(13): 1061-1069.

Ho SY, Chen WC, Chiu HW, Lai CS, Guo HR, Wang YJ (2009). Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances apoptotic effects in U937 cells through increased mitotic arrest and ROS generation. *Chem Biol Interact* **179**(2-3): 304-313.

Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci* **123**(2): 305-332.

Jazirehi AR, Bonavida B (2004). Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* **3**(1): 71-84.

Jiang H, Ma Y, Chen X, Pan S, Sun B, Krissansen GW (2010). Genistein synergizes with arsenic trioxide to suppress human hepatocellular carcinoma. *JCA* **101** (4): 975-983.

Jiang X, Chen C, Zhao W, Zhang Z (2013). Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in A549 cells: An implication for the paradoxical mechanism. *Environ Toxicol Pharmacol* **36**(3): 891-902.

- 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): 2102-2111.
- Juillerat-Jeanneret L (2008). The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discov Today* **13**(23/24): 1099-1106.
- 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**(9): 2103-2108.
- Karimi E, Jaafar HZ, Ahmad S (2011). Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisa pumila* Benth. *Molecules* **16**(6): 4438-4450.
- Khan HY, Zubair H, Faisal M, Ullah M, Farhan M, Sarkar FH, *et al.* (2014). Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: A mechanism for cancer chemopreventive action. *Mol Nutr Food Res* **58**(3): 437-446.
- Khan S, Vala JA, Nabi SU, Gupta G, Kumar D, Telang AG, *et al.* (2012). Protective effect of curcumin against arsenic-induced apoptosis in murine splenocytes in vitro. *J Immunotoxicol* **9**(2): 148-159.
- Kim DW, Ahan SH, Kim TY (2007). Enhancement of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-mediated apoptosis using berberine in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Korean Neurosurg Soc* **42**(5): 392-399.
- Kito M, Akao Y, Ohishi N, Yagi K, Nozawa Y (2002). Arsenic trioxide-induced apoptosis and its enhancement by buthionine sulfoximine in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **291**(4): 861-867.
- Klauser E, Gülden M, Maser E, Seibert S, Seibert H (2014). Additivity, antagonism, and synergy in arsenic trioxide-induced growth inhibition of C6 glioma cells: effects of genistein, quercetin and buthionine-sulfoximine. *Food Chem Toxicol* **67**(14): 212-221.
- Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I (2008). Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**(3): 478-488.
- Konig H, Härtel N, Schultheis B, Schatz M, Lorentz C, Melo JV, *et al.* (2007). Enhanced Bcr-Abl-specific antileukemic activity of arsenic trioxide through glutathione-depletion in imatinib-resistant cells. *Haematologica* **92**(6): 838-841.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, *et al.* (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**(7020): 1032-1036.
- Kuo CC, Liu TW, Chen LT, Shiah HS, Wu CM, Cheng YT, *et al.* (2011). Combination of arsenic trioxide and BCNU synergistically triggers redox-mediated autophagic cell death in human solid tumors. *Free Radic Biol Med* **51**(12): 2195-2209.

- Kweon SH, Song JH, Kim TS (2010). Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **395**(1): 104-110.
- Lan L, Wong NS (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C are required for the inhibition of caspase activity by epidermal growth factor. *FEBS Lett* **444**(1): 90-96.
- Latt SA, Stetten G (1976). Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Histochem Cytochem* **24**(1): 24-33.
- Lavoie S, Chen Y, Dalton TP, Gysin R, Cuénod M, Stuellet P, *et al.* (2009). Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *J Neurochem* **108**(6): 1410-1422.
- Lawen A (2003). Apoptosis - an introduction. *Bioessays* **25**(9): 888-896.
- Lee TC, Cheng IC, Shue JJ, Wang TC (2011). Cytotoxicity of arsenic trioxide is enhanced by (-)-epigallocatechin-3-gallate via suppression of ferritin in cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **250**(1): 69-77.
- Lefranc F, Kiss R (2006). Autophagy, the trojan horse to combat glioblastomas. *Neurosurg Focus* **20**(3): 1-6.
- Leslie EM, Haimeur A, Waalkes MP (2004). Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J Biol Chem* **279**(31): 32700-32708.
- Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci* **79**(21): 2056-2068.
- Lin TH, Kuo HC, Chou FP, Lu FJ (2008). Berberine enhances inhibition of glioma tumor cell migration and invasiveness mediated by arsenic trioxide. *BMC cancer* **8**(58).
- Ling YH, Jiang JD, Holland JF, Perez-Soler R (2002). Arsenic trioxide produces polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines. *Mol Pharmacol* **62**(3): 529-538.
- Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, *et al.* (2001). Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol Pharmacol* **60**(2): 302-309.
- Liu Q, Hilsenbeck S, Gazitt Y (2003). Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53 dependent G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL. *Blood* **101**(10): 4078-4087.
- Liu S, Bishop WR, Dasmahapatra B, Wang Y (2004). Pharmacogenomics of the p53 tumor suppressor and its role in cancer chemoresistance. *Drug Dev Res* **62**(3): 254-272.

- Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, *et al.* (1995). Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* **21**(3): 275-283.
- Loewe S, Muischnek H (1926). Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*: 313-326.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, *et al.* (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**(2): 97-109.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Ma Y, Wang J, Liu L, Zhu H, Chen X, Pan S, *et al.* (2011). Genistein potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma: role of Akt and nuclear factor-kappaB. *Cancer Lett* **301**(1): 75-84.
- Maeda H, Hori S, Nishitoh H, Ichijo H, Ogawa O, Kakehi Y, *et al.* (2001). Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* **61**(14): 5432-5440.
- Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, *et al.* (2004). Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ* **11**(7): 737-746.
- Mirmanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, *et al.* (2006). Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol* **24**(16): 2563-2569.
- Mukherjee S, Roy M, Dey S, Bhattacharya RK (2007). A mechanistic approach for modulation of arsenic toxicity in human lymphocytes by curcumin, an active constituent of medicinal herb *Curcuma longa* Linn. *J Clin Biochem Nutr* **41**(1): 32-42.
- Mursu J, Nurmi T, Tuomainen TP, Salonen JT, Pukkala E, Voutilainen S (2008). Intake of flavonoids and risk of cancer in Finnish men: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Int J Cancer* **123**(3): 660-663.
- Nakagawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, Senzaki H, Shikata N, Hioki K, *et al.* (2001). Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**(4): 258-264.
- Nakazato T, Ito K, Ikeda Y, Kizaki M (2005). Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin Cancer Res* **11**(16): 6040-6049.
- Notte A, Leclere L, Michiels C (2011). Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol* **82**(5): 427-434.
- O'Dwyer PJ, Hamilton TC, LaCreta FP, Gallo JM, Kilpatrick D, Halbherr T, *et al.* (1996). Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J Clin Oncol* **14**(1): 249-256.



- Ochi T (1997). Arsenic compound-induced increases in glutathione levels in cultured Chinese hamster V79 cells and mechanisms associated with changes in  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activity, cystine uptake and utilization of cysteine. *Arch Toxicol* **71**(12): 730-740.
- Ocker M, Höpfner M (2012). Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. *Eur Surg Res* **48**(3): 111-120.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, *et al.* (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **64**(19): 6892-6899.
- Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, *et al.* (2004). Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* **108**(1): 49-56.
- Oketani M, Kohara K, Tuvdendorj D, Ishitsuka K, Komorizono Y, Ishibashi K, *et al.* (2002). Inhibition by arsenic trioxide of human hepatoma cell growth. *Cancer Lett* **183**(2): 147-153.
- Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res.* **165**(6): 496-504.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, *et al.* (2013). CBTRUS Statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* **15**(2): ii1–ii56.
- Ovesná Z, Kozics K, Bader Y, Saiko P, Handler N, Erker T, *et al.* (2006). Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. *Oncol Rep* **16**(3): 617-624.
- Park SY, Ollberding NJ, Woolcott CG, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN (2013). Fruit and vegetable intakes are associated with lower risk of bladder cancer among women in the Multiethnic Cohort Study. *J Nutr* **143**(8): 1283-1292.
- Perez-Jimenez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A (2010). Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem* **58**(8): 4959-4969.
- Plumed-Ferrer C, Väkeväinen K, Komulainen H, Rautiainen M, Smeds A, Raitanen JE, *et al.* (2013). The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms. *Int J Food Microbiol* **164**(1): 99-107.
- Ponten J, Macintyre EH (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**(4): 465-486.
- Ramos AM, Aller P (2008). Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol* **75**(10): 1912-1923.
- Rodriguez-Ramiro I, Martin MA, Ramos S, Bravo L, Goya L (2011). Comparative effects of dietary flavanols on antioxidant defences and their response to oxidant-induced stress on Caco2 cells. *Eur J Nutr* **50**(5): 313-322.

- Rozema J, Björn LO, Bornman JF, Gaberscik A, Häder DP, Trost T, *et al.* (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems--an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J Photochem Photobiol B* **66**(1): 2-12.
- Rüweler M, Anker A, Gülden M, Maser E, Seibert H (2008). Inhibition of peroxide-induced radical generation by plant polyphenols in C6 astrogloma cells. *Toxicol In Vitro* **22**(5): 1377-1381.
- Rüweler M, Gülden M, Maser E, Murias M, Seibert H (2009). Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant activities of resveratrol and analogues in C6 astrogloma cells in vitro. *Chem Biol Interact* **182**(2-3): 128-135.
- Saito N, Tatsuzawa F, Toki K, Shinoda K, Shigihara A, Honda T (2011). The blue anthocyanin pigments from the blue flowers of *Heliophila coronopifolia* L. (Brassicaceae). *Phytochemistry* **72**(17): 2219-2229.
- Salvi M, Brunati AM, Clari G, Toninello A (2002). Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. *Biochim Biophys Acta* **1556**(2-3): 187-196.
- Sánchez Y, Amran D, de Blas E, Aller P (2009a). Regulation of genistein-induced differentiation in human acute myeloid leukaemia cells (HL60, NB4) Protein kinase modulation and reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol* **77**(3): 384-396.
- Sánchez Y, Amran D, Fernandez C, de Blas E, Aller P (2008). Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human leukemia cells via reactive oxygen species generation and activation of reactive oxygen species-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK). *Int J Cancer* **123**(5): 1205-1214.
- Sánchez Y, Calle C, de Blas E, Aller P (2009b). Modulation of arsenic trioxide-induced apoptosis by genistein and functionally related agents in U937 human leukaemia cells. Regulation by ROS and mitogen-activated protein kinases. *Chem Biol Interact* **182**(1): 37-44.
- Sánchez Y, Simon GP, Calviño E, de Blas E, Aller P (2010). Curcumin stimulates reactive oxygen species production and potentiates apoptosis induction by the antitumor drugs arsenic trioxide and lonidamine in human myeloid leukemia cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* **335**(1): 114-123.
- Sarafian V, Koev I, Staykov D (2009). Mechanisms of cell resistance in glioblastoma multiforme. *J of IMAB* **15**(1): 6-8.
- Scott N, Hatlelid KM, MacKenzie NE, Carter DE (1993). Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem Res Toxicol* **6**(1): 102-106.
- Sekhon BS (2013). Metalloid compounds as drugs. *Res Pharm Sci* **8**(3): 145-158.
- Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Selker RG, VanGilder JC, *et al.* (1989). Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *J Neurosurg* **71**(1): 1-9.

- Shen SC, Lee WR, Yang LY, Tsai HH, Yang LL, Chen YC (2012). Quercetin enhancement of arsenic-induced apoptosis via stimulating ROS-dependent p53 protein ubiquitination in human HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* **21**(5): 370-375.
- Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, *et al.* (1997). Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* **89**(9): 3354-3360.
- Silva JP, Gomes AC, Coutinho OP (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* **601**(1-3): 50-60.
- Singhal SS, Awasthi S, Pandya U, Piper JT, Saini MK, Cheng JZ, *et al.* (1999). The effect of curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells. *Toxicol Lett* **109**(1-2): 87-95.
- Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, *et al.* (2001). United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* **19**(18): 3852-3860.
- Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, *et al.* (1998). Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* **339**(19): 1341-1348.
- Soria EA, Eynard AR, Quiroga PL, Bongiovanni GA (2007). Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. *Life Sci* **81**(17-18): 1397-1402.
- Statistisches Bundesamt (2012). Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2011, Fachserie 12, Reihe 4. Unter: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400117004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400117004.pdf?__blob=publicationFile). [Stand: März 2014].
- Stewart LA (2002). Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* **359**(9311): 1011-1018.
- Strasser EM, Wessner B, Manhart N, Roth E (2005). The relationship between the anti-inflammatory effects of curcumin and cellular glutathione content in myelomonocytic cells. *Biochem Pharmacol* **70**(4): 552-559.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* **7**(5): 392-401.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, *et al.* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**(10): 987-996.
- Sumi D, Shinkai Y, Kumagai Y (2010). Signal transduction pathways and transcription factors triggered by arsenic trioxide in leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **244**(3): 385-392.
- Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* **45**(1): 49-53.



Tallman MS, Nabhan C, Feusner JH, Rowe JM (2002). Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood* **99**(3): 759-767.

Thierfelder N (2006). Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in Lymphoblastoiden Zellen von Patienten mit Nijmegen-Breakage-Syndrom. Doctor medicinae Dissertation, Charité - Universitätsmedizin Berlin, <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/thierfelder-nadja-katherina-2006-04-28/PDF/thierfelder.pdf>.

Thompson JA, White CC, Cox DP, Chan JY, Kavanagh TJ, Fausto N, *et al.* (2009). Distinct Nrf1/2-independent mechanisms mediate As<sup>3+</sup>-induced glutamate-cysteine ligase subunit gene expression in murine hepatocytes. *Free Radic Biol Med* **46**(12): 1614-1625.

Tsao R (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**(12): 1231-1246.

Uslu R, Sanli UA, Sezgin C, Karabulut B, Terzioglu E, Omay SB, *et al.* (2000). Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* **6**(12): 4957-4964.

van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, *et al.* (2006). Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: A randomized european organisation for research and treatment of cancer phase III trial. *J Clin Oncol* **24**(18): 2715-2722.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, *et al.* (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**(5): 937-951.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**(1): 39-51.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**(6810): 307-310.

Wang D, Wang Z, Tian B, Li X, Li S, Tian Y (2008). Two hour exposure to sodium butyrate sensitizes bladder cancer to anticancer drugs. *Int J Urol* **15**(5): 435-441.

Wang H, Joseph JA (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* **27**(5-6): 612-616.

Waring MJ (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* **13**(1): 269-282.

Watcharasit P, Visitnonthachai D, Suntararuks S, Thiantanawat A, Satayavivad J (2012). Low arsenite concentrations induce cell proliferation via activation of VEGF signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Environ Toxicol Pharmacol* **33**(1): 53-59.

Watzl B (2008). Sekundäre Pflanzenstoffe – viel hilft viel? *Ernährungs Umschau* **55** 486-487.

WHO (2008). The global burden of disease: 2004 update. Unter: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GBD\\_report\\_2004update\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf). [Stand: März 2014].

Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, *et al.* (2009). NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* **27**(35): 5874-5880.

Wu XX, Ogawa O, Kakehi Y (2004). Enhancement of arsenic trioxide-induced apoptosis in renal cell carcinoma cells by L-buthionine sulfoximine. *Int J Oncol* **24**(6): 1489-1497.

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): 796-799.

Yi J, Gao F, Shi G, Li H, Wang Z, Shi X, *et al.* (2002). The inherent cellular level of reactive oxygen species: one of the mechanisms determining apoptotic susceptibility of leukemic cells to arsenic trioxide. *Apoptosis* **7**(3): 209-215.

Yi J, Yang J, He R, Gao F, Sang H, Tang X, *et al.* (2004). Emodin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling. *Cancer Res* **64**(1): 108-116.

Zabaras D, Roohani M, Krishnamurthy R, Cochet M, Delahunty CM (2013). Characterisation of taste-active extracts from raw Brassica oleracea vegetables. *Food Funct* **4**(4): 592-601.

Zhang P, Wang SY, Hu LH, Shi F, Qui F, Hong Z, *et al.* (1996). Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin J Hematol* (2): 58-60.

Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P (2004). Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* **3**(2): 187-197.

Zhao S, Tsuchida T, Kawakami K, Shi C, Kawamoto K (2002). Effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on cell cycle progression and cyclins D1 and B1 expression in two glioblastoma cell lines differing in p53 status. *Int J Oncol* **21**(1): 49-55.

Zhao XY, Li GY, Liu Y, Chai LM, Chen JX, Zhang Y, *et al.* (2008). Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **154**(1): 105-113.

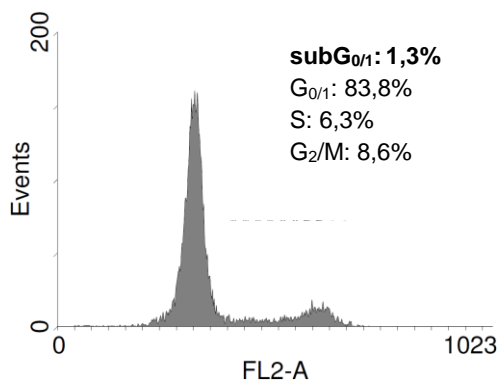
Zhen Y, Zhao S, Li Q, Li Y, Kawamoto K (2010). Arsenic trioxide-mediated Notch pathway inhibition depletes the cancer stem-like cell population in gliomas. *Cancer Lett* **292**(1): 64-72.

Zhong W, Yan T, Lim R, Oberley LW (1999). Expression of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. *Free Radic Biol Med* **27**(11-12): 1334-1345.

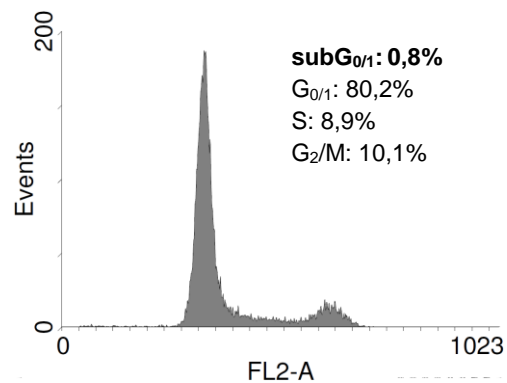
## 7 Anhang

### A) 24 h-Exposition

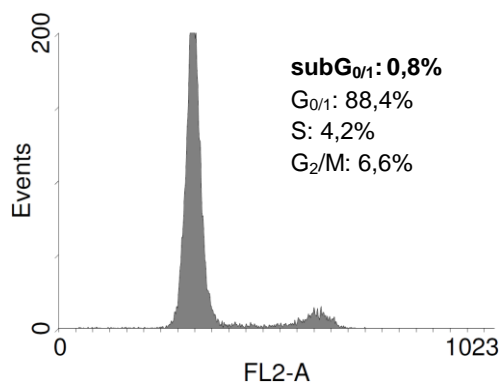
Kontrolle



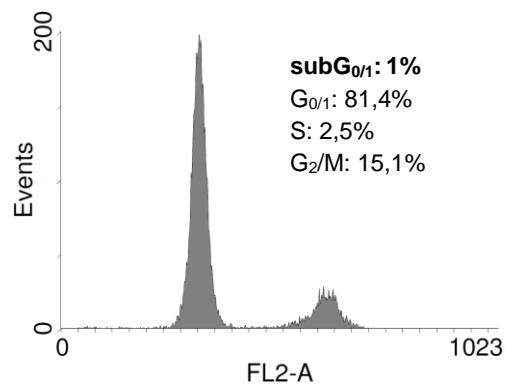
5  $\mu$ M ATO



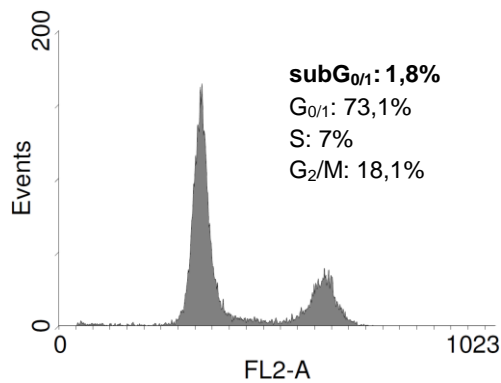
20  $\mu$ M Genistein



50  $\mu$ M Genistein



5  $\mu$ M ATO + 20  $\mu$ M Genistein



5  $\mu$ M ATO + 50  $\mu$ M Genistein

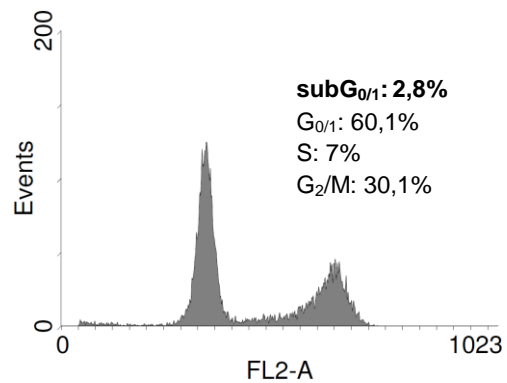
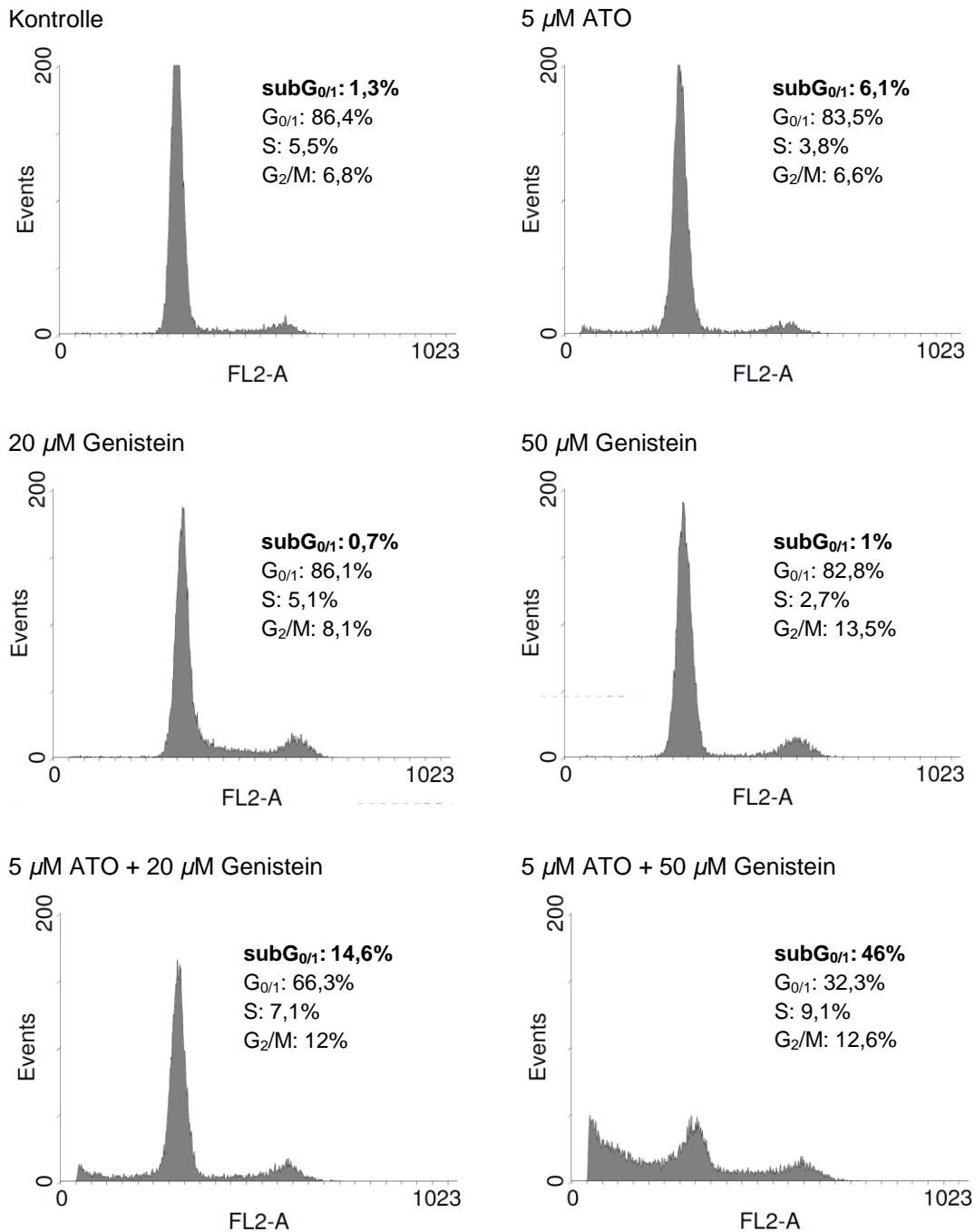


Abbildung 7-1A: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein

Beschreibung siehe Abbildung 7-1B.

## B) 72 h-Exposition

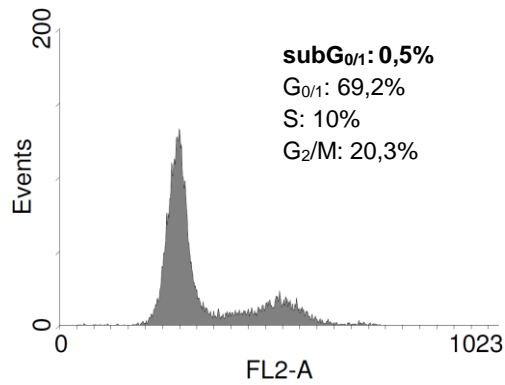
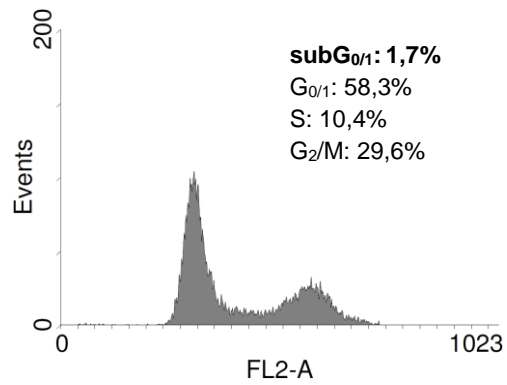
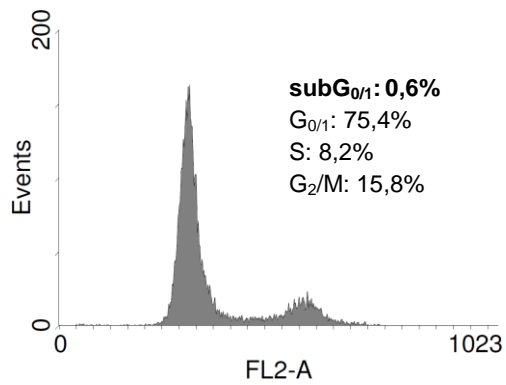
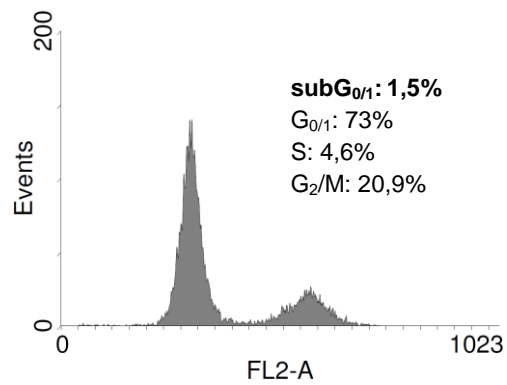
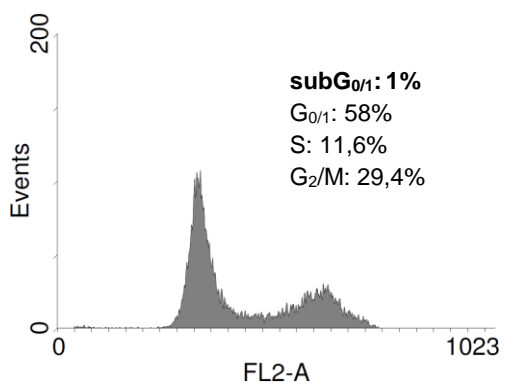
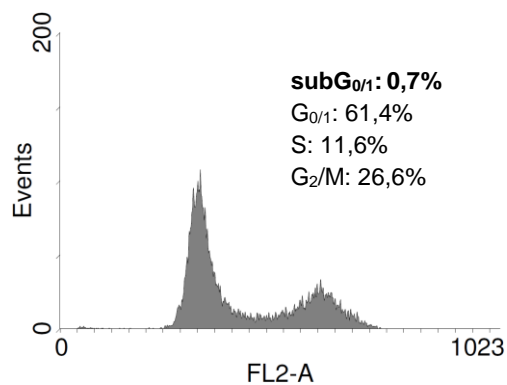


**Abbildung 7-1B: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein**

A-172 Zellen wurden über die angegebene Zeit mit ATO und Genistein einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung. Die ebenfalls gezeigte prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen stellt MW aus  $n = 3$  Versuchen dar.

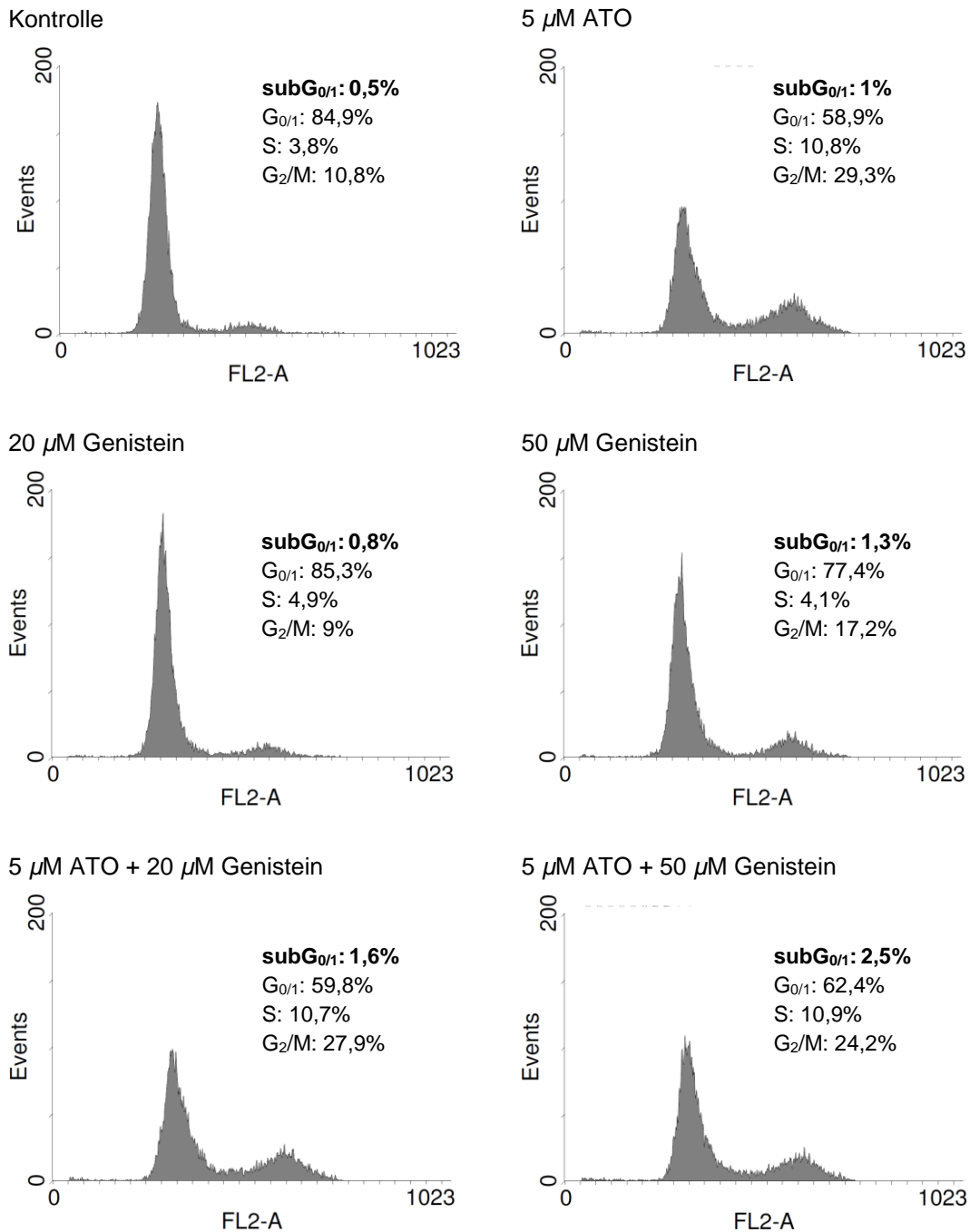
**A) 24 h-Exposition**

Kontrolle

5  $\mu$ M ATO20  $\mu$ M Genistein50  $\mu$ M Genistein5  $\mu$ M ATO + 20  $\mu$ M Genistein5  $\mu$ M ATO + 50  $\mu$ M Genistein**Abbildung 7-2A: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsenitoxid und Genistein**

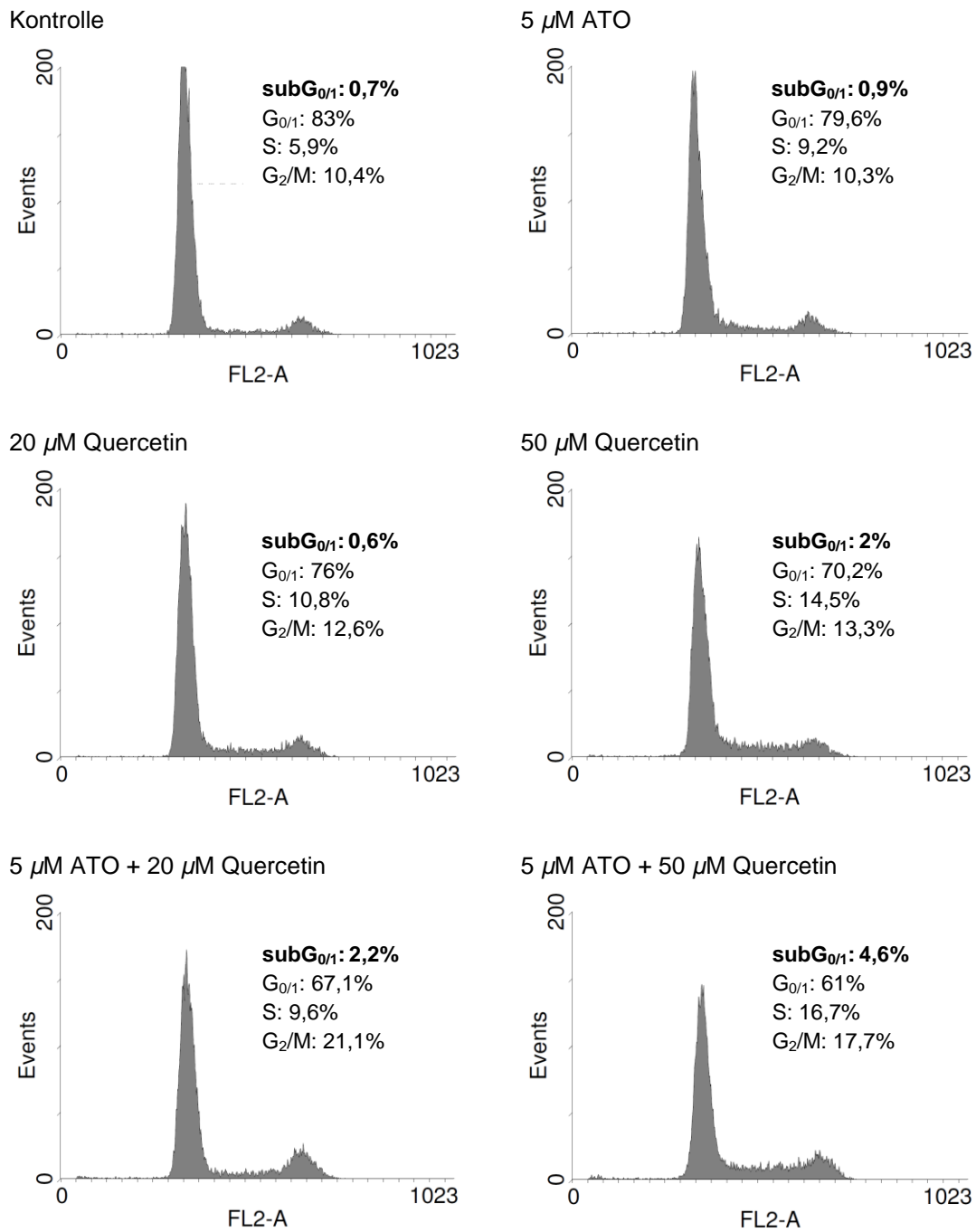
Beschreibung siehe Abbildung 7-2B.

## B) 72 h-Exposition



**Abbildung 7-2B: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Genistein**

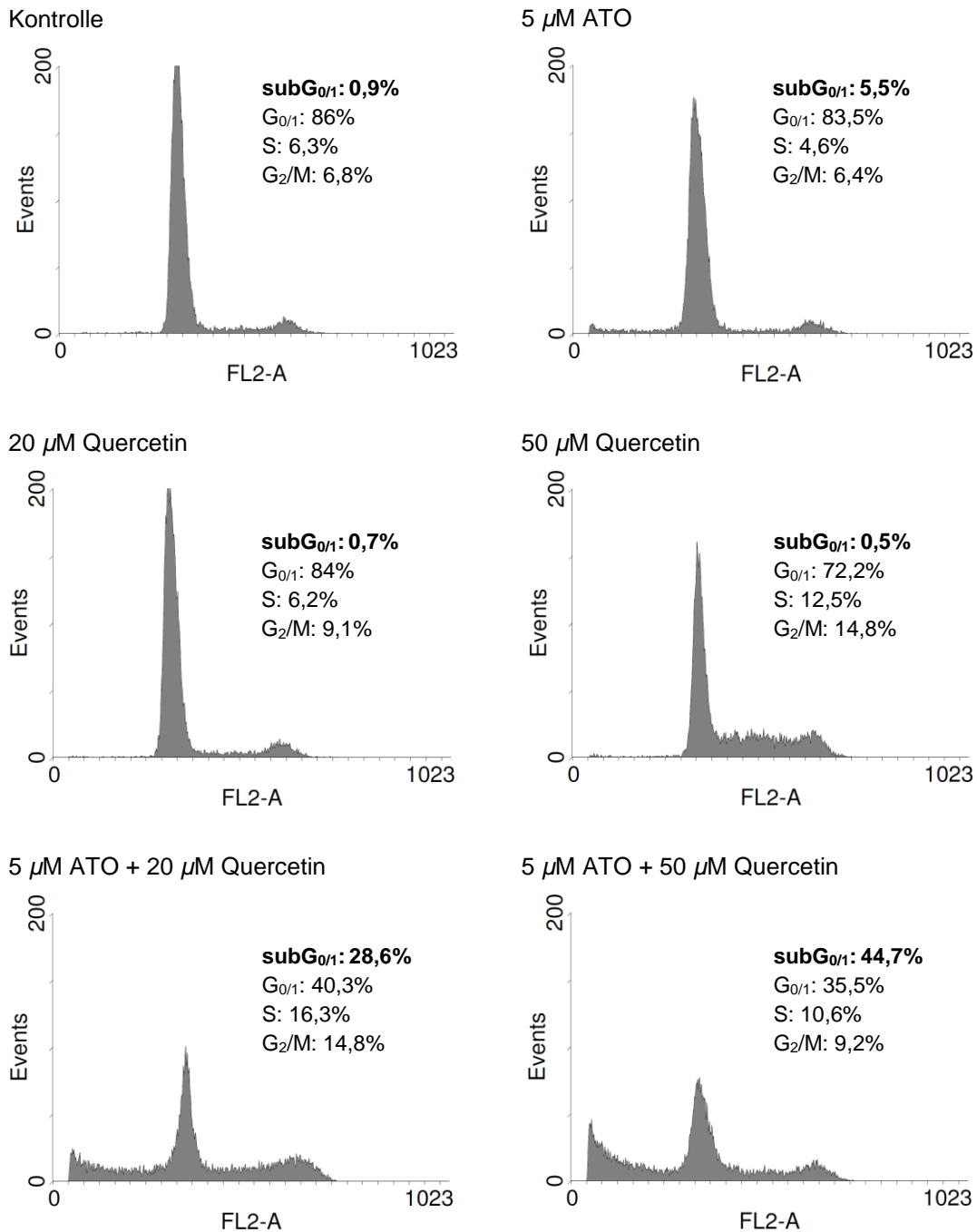
U-87 MG Zellen wurden über die angegebene Zeit mit ATO und Genistein einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung. Die ebenfalls gezeigte prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen stellt MW aus n = 3 Versuchen dar.

**A) 24 h-Exposition**

**Abbildung 7-3A: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin**

Beschreibung siehe Abbildung 7-3B.

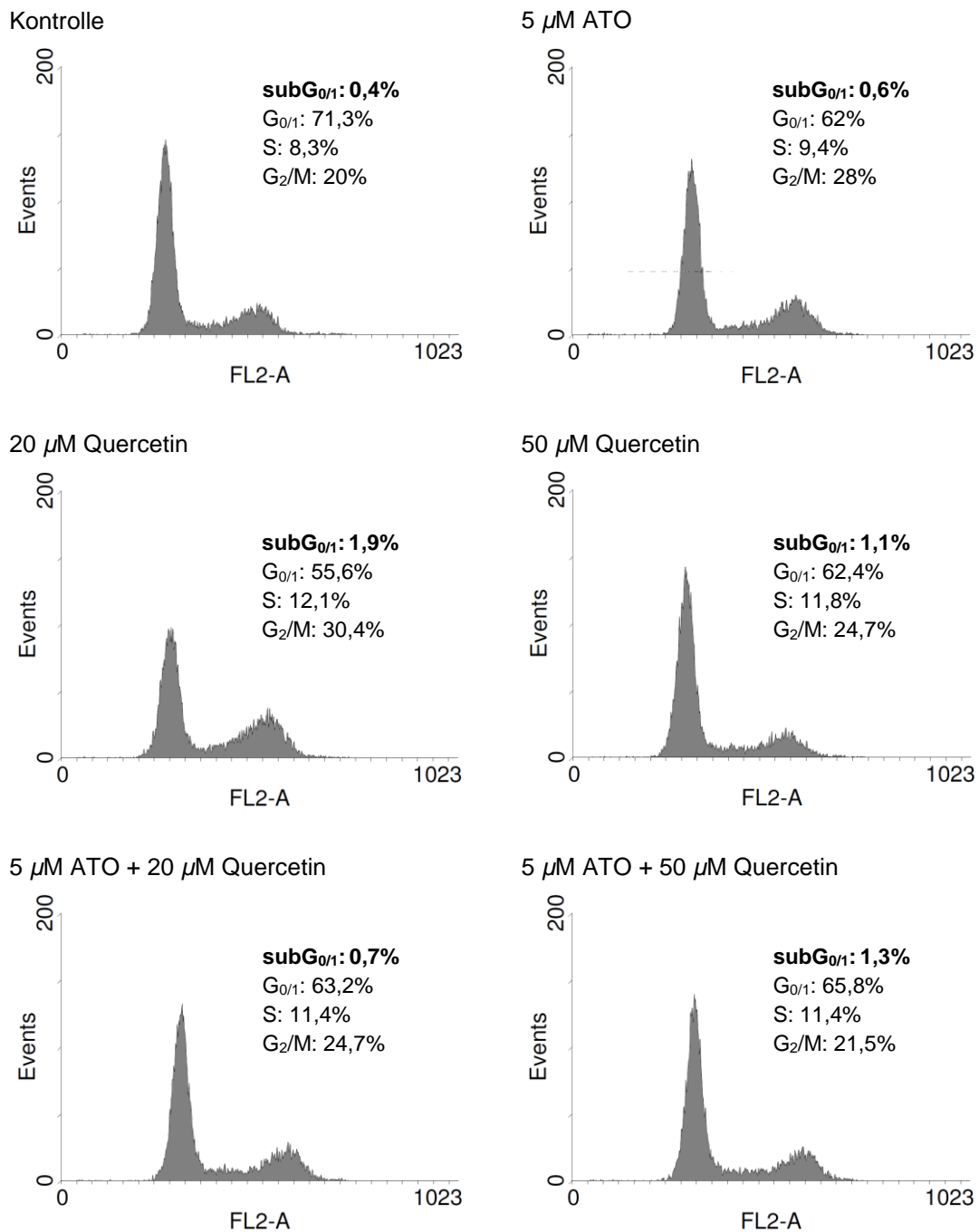
## B) 72 h-Exposition



**Abbildung 7-3B: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin**

A-172 Zellen wurden über die angegebene Zeit mit ATO und Quercetin einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung. Die ebenfalls gezeigte prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen stellt MW aus n = 3 Versuchen dar.

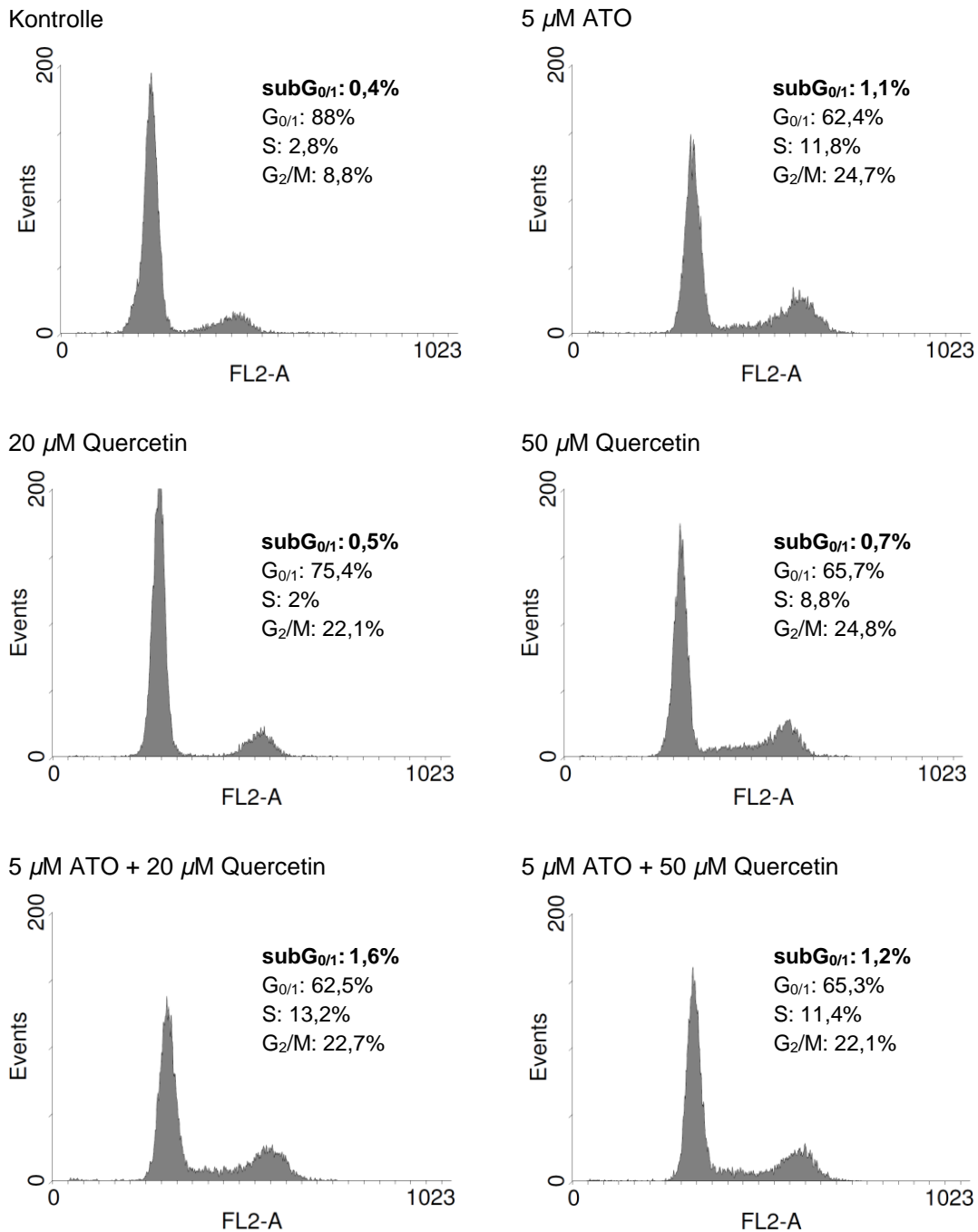


**A) 24 h-Exposition**

**Abbildung 7-4A: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin**

Beschreibung siehe Abbildung 7-4B.

## B) 72 h-Exposition



**Abbildung 7-4B: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Quercetin**

U-87 MG Zellen wurden über die angegebene Zeit mit ATO und Quercetin einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung. Die ebenfalls gezeigte prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen stellt MW aus n = 2 Versuchen dar.

## A) 24 h-Exposition

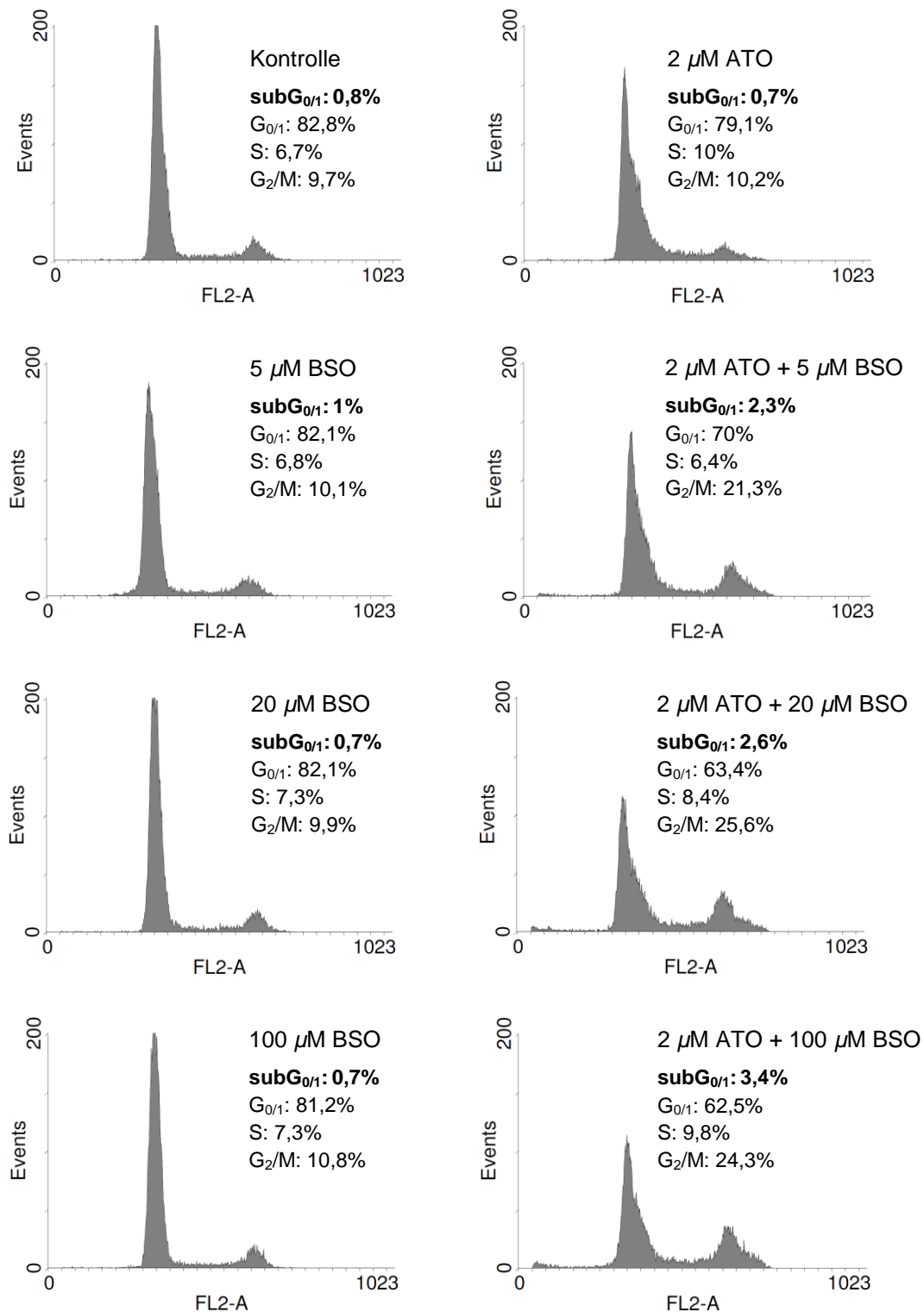
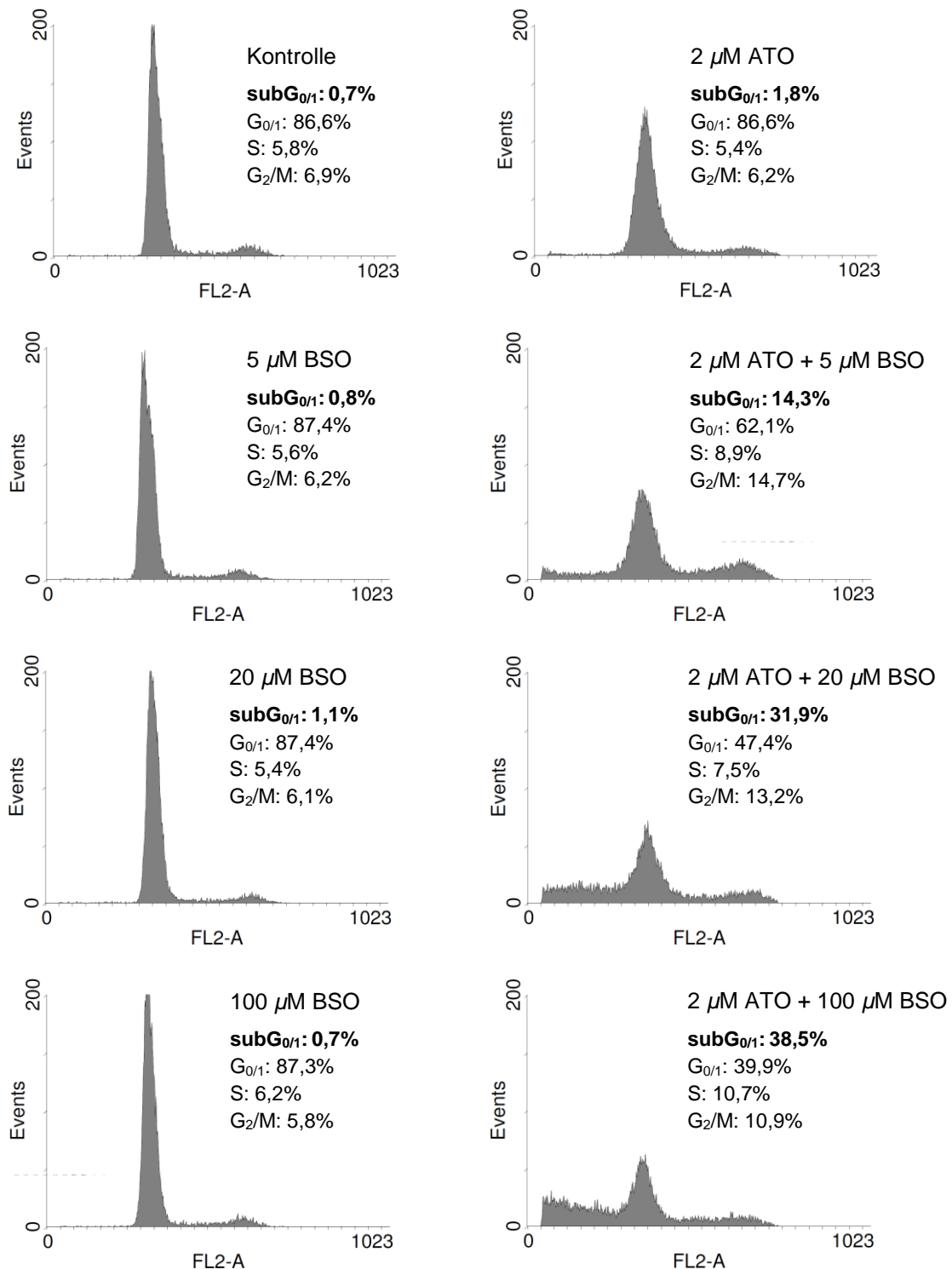


Abbildung 7-5A: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin

Beschreibung siehe Abbildung 7-5B.

### B) 72 h-Exposition



**Abbildung 7-5B: DNA-Histogramme von A-172 Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin**

A-172 Zellen wurden über die angegebene Zeit mit ATO und BSO exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung. Die ebenfalls gezeigte prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen stellt MW aus n = 3 Versuchen dar.

## A) 24 h-Exposition

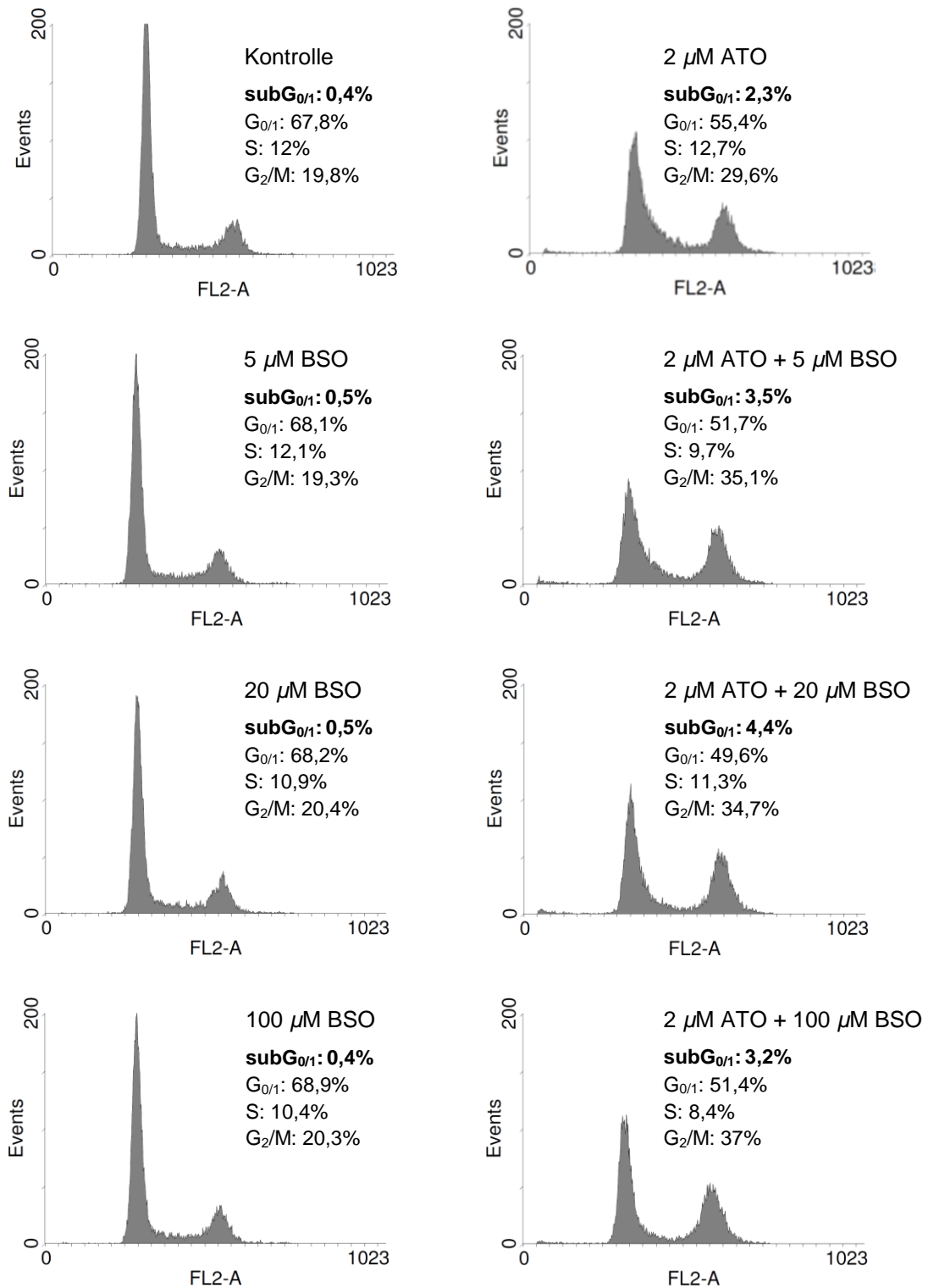
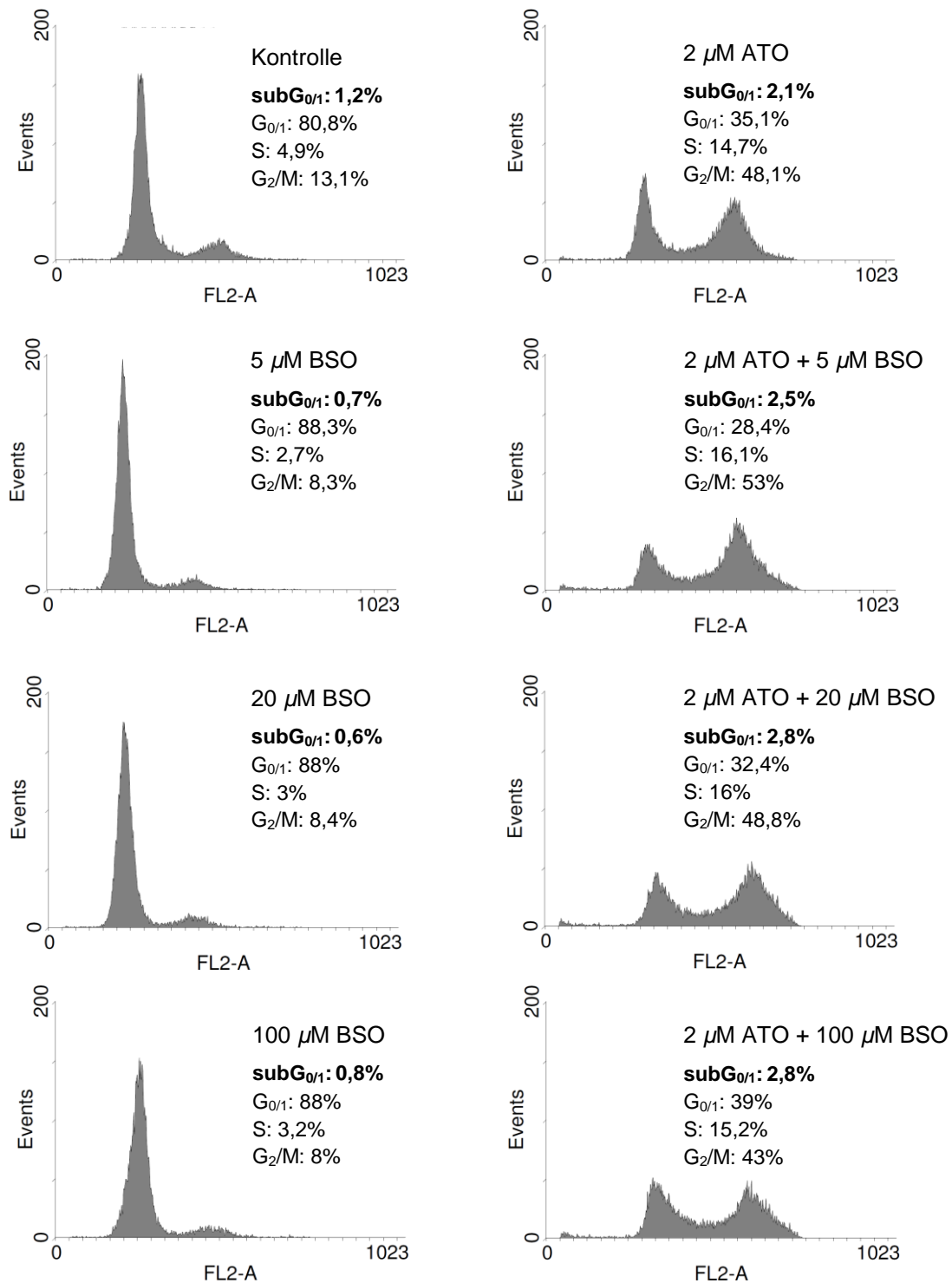


Abbildung 7-6A: DNA-Histogramme von U-77 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin

Beschreibung siehe Abbildung 7-6B.

### B) 72 h-Exposition



**Abbildung 7-6B: DNA-Histogramme von U-87 MG Zellen nach einer Exposition mit Arsentrioxid und Buthioninsulfoximin**

U-87 MG Zellen wurden über die angegebene Zeit mit ATO und BSO einzeln sowie in Kombination exponiert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit PI und Bestimmung ihres DNA-Gehalts am Durchflusszytometer (vgl. 3.6.4). Dargestellt sind die DNA-Histogramme jeweils einer repräsentativen Messung. Die ebenfalls gezeigte prozentuale Verteilung der Zellpopulationen auf die einzelnen Zellzyklusphasen stellt MW aus n = 3 Versuchen dar.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Edmund Maser für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler anzufertigen.
- Der Landesgraduierföderung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Gewährung eines Promotionsstipendiums, ohne das diese Arbeit nicht entstanden wäre.
- Meinem wissenschaftlichen Betreuer, Dr. Hasso Seibert für die Überlassung des Themas und die großartige Unterstützung während der gesamten Promotion.
- Dr. Michael Gülden und Sabine Seibert für zahlreiche Anregungen, fachlich wertvolle Vorschläge und die experimentelle Unterstützung.
- Allen anderen Angehörigen des Instituts für die schöne gemeinsame Zeit und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Dem Institut für Immunologie (UKSH Kiel) für die Bereitstellung des Durchflussszytometers, insbesondere Prof. Dr. Sabine Adam für die kompetente Einarbeitung in die Methoden und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft.
- Und nicht zuletzt meinen Eltern und meinem Freund für die liebevolle Unterstützung und die Geduld.



# Curriculum Vitae

## PERSÖNLICHE DATEN

Name: Ellen Klauser  
Geburtsdatum: 27/11/1984  
Geburtsort: Pawlodar  
Nationalität: deutsch

## AKADEMISCHER WERDEGANG

07/2011 - 07/2014 **Promotion** am Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel  
**Studium der Ökotoxikologie**, CAU zu Kiel

10/2008 - 10/2010 *Master of Science*  
Thesis: "Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Arsentrioxid und Genistein auf C6-Astrogliazellen *in vitro*"

10/2005 - 09/2008 *Bachelor of Science*  
Thesis: "Zur Bedeutung von Viren in der Lebensmittelhygiene"

2002 - 2005 **Abitur** an der Beruflichen Schule des Kreises Steinburg (Fachgymnasium mit dem Schwerpunkt Ernährung), Itzehoe

## STUDIUMBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

10/2008 - 08/2009 **Studentische Assistentin** am Institut für Tierzucht und Tierhaltung, CAU zu Kiel

07/2007 - 09/2007 **Praktikum** am Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung, Max Rubner-Institut, Kiel

## SONSTIGES

Stipendien: Landesgraduiertenstipendium der CAU zu Kiel (07/2011 - 07/2013)

Publikationen: Klauser E, Gülden M, Maser E, Seibert S, Seibert H (2014). *Additivity, antagonism, and synergy in arsenic trioxide-induced growth inhibition of C6 glioma cells: effects of genistein, quercetin and buthionine-sulfoximine. Food Chem Toxicol* 67(14): 212–221.