

„Sensitivierung von humanen Glioma-Zellen für die zytostatische / zytoletale Wirkung von Arsentrioxid durch Kombination mit pflanzlichen Polyphenolen und Buthioninsulfoximin“

M.Sc. Ellen Klauer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Edmund Maser

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 Glioma-Zelllinien (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 μM) hemmt die Proliferation von A-172 und U-87 MG Zellen konzentrations- und zeitabhängig. Bis zu einer Konzentration von 5 μM ist die Proliferationshemmung jeweils auf zytostatische und bei höheren Konzentrationen ($\geq 10 \mu\text{M}$) auf zytoletale 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 G₂/M-Phase verknüpft. Nekrotischer Zelltod spielt bei beiden Zelllinien keine wesentliche Rolle. Die Wirkung von ATO wird nicht durch erhöhte ROS-Bildung (bestimmt mit DCFH₂-DA als Biomarker) oder Verminderung der intrazellulären Glutathionspiegel vermittelt. Im Gegenteil, ATO induziert eindeutig Erhöhungen des Glutathiongehalts. Der maximale Effekt ($\sim 40\%$) wird bei sub-toxischen Konzentrationen (0,5 - 2 μM) 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 zelllinienspezifisch. 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.