

Aus dem Zentrum für Neurologie der Universitätsklinik Tübingen  
Neurologische Klinik und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung  
Abteilung Allgemeine Neurologie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Weller

**Modulation des Wachstums und der Bestrahlungs- und  
Chemosensitivität von humanen malignen Gliomzellen  
unter Azidose und Hypoxie**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
**Medizinischen Fakultät**  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

MANUELA REICHERT  
aus Bietigheim

2007

Dekan :

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Weller

2. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Wesselborg

## **Widmung**

Diese Arbeit widme ich meiner Familie.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
1.1 Glioblastom .....	5
1.2 Zelltod.....	5
1.2.1 Nekrose und Apoptose .....	5
1.2.2 Das Tumorsuppressorgen p53 .....	6
1.3 Azidose und Hypoxie in Tumoren.....	7
1.3.1 Azidose und Hypoxie als Folge unzureichender Angiogenese .....	7
1.3.2 Veränderungen zellulärer Prozesse durch Azidose und Hypoxie ...	8
1.3.3 Intrazelluläre Bildung von Säure .....	8
1.3.4 Mechanismen zur Regulierung des intrazellulären pH-Wertes .....	9
1.4 Chemotherapeutika .....	10
1.4.1 Lomustin .....	10
1.4.2 Cisplatin .....	11
1.4.3 Gemcitabin.....	12
1.4.4 Temozolomid .....	13
1.4.5 Teniposid .....	14
1.4.6 Topotecan.....	15
1.4.7 Vincristin .....	15
1.5 Die Bedeutung der Azidose für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemo- und Strahlentherapie .....	16
1.6 <i>Multidrug resistance</i> -Transporter.....	17
1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	17
 <b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	 <b>19</b>
2.1 Chemikalien.....	19
2.2 Chemotherapeutika .....	20
2.3 Antikörper .....	20
2.4 Verbrauchsmaterialien .....	20
2.5 <i>Kits</i> .....	21

## Inhaltsverzeichnis

---

2.6 Verzeichnis der Lieferfirmen.....	21
2.7 Zelllinien.....	21
2.8 Transfektion.....	21
2.9 Zellkultur.....	22
2.9.1 Kultivierung von Zelllinien.....	22
2.9.2 Herstellung der azidotischen Zellmedien.....	23
2.9.3 Herstellung der hypoxischen Zellmedien.....	23
2.10 Kristallviolett-Assay.....	23
2.11 Wachstumskurven unter Azidose.....	24
2.12 [ <sup>3</sup> H]-Methylthymidin-Einbau unter Azidose.....	24
2.13 Messung der Chemotherapeutika-vermittelten Zytotoxizität.....	24
2.13.1 Unter Azidose.....	24
2.13.2 Unter Hypoxie.....	25
2.14 Bestimmung der Stabilität der Chemotherapeutika unter Azidose.....	26
2.15 Messung der Strahlen-vermittelten Zytotoxizität unter Azidose.....	26
2.16 Proteinbiochemische Methoden.....	26
2.16.1 Herstellung von Proteinlysaten.....	26
2.16.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	27
2.17 Westernblot.....	27
2.17.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.17.2 Westernblot und Immunodetektion.....	28
2.18 Durchflusszytometrie.....	29
2.18.1 Bestimmung der Zellzyklusphasen unter Azidose.....	29
2.18.2 Rhodamin-123-Transport zur Quantifizierung der P-Glykoprotein-Aktivität.....	30
2.19 Reporter-Assay.....	30
2.20 Durchführung und Darstellung der Versuche.....	31
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>32</b>
3.1 Modulation der Gliomzellproliferation unter Azidose.....	32
3.2 Inhibition der Proliferation unter Azidose: Die Rolle von p53.....	37

3.3 Modulation der Bestrahlungssensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose .....	42
3.4 Modulation der Chemosensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose .....	44
3.5 Verstärkte Lomustinwirkung unter Azidose ist mit einer erhöhten Stabilität dieses Wirkstoffes bei niedrigen pH-Werten verbunden .....	47
3.6 <i>Multidrug resistance</i> -Transporter unter Azidose .....	50
3.6.1 Unveränderte P-Glykoprotein (P-gp)-Aktivität unter Azidose .....	50
3.6.2 Modulation der Zytotoxizität von Vincristin durch Verapamil unter Azidose .....	51
3.7 Modulation der Chemosensitivität von humanen Gliomzellen unter Hypoxie .....	53
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
4.1 Modulation der Gliomzellproliferation unter Azidose .....	56
4.2 Inhibition der Proliferation unter Azidose: Die Rolle von p53.....	57
4.3 Modulation der Bestrahlungssensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose .....	58
4.4 Modulation der Chemosensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose .....	60
4.4.1 Lomustin .....	61
4.4.2 Topotecan.....	61
4.4.3 Cisplatin .....	62
4.4.4 Gemcitabin.....	63
4.4.5 Temozolomid .....	63
4.4.6 Teniposid .....	64
4.4.7 Vincristin .....	64
4.5 Verstärkte Lomustinwirkung unter Azidose ist mit einer erhöhten Stabilität dieses Wirkstoffes bei niedrigen pH-Werten verbunden .....	64
4.6 <i>Multidrug resistance</i> -Transporter unter Azidose .....	65
4.7 Modulation der Chemosensitivität von humanen Gliomzellen unter	

Inhaltsverzeichnis

---

Hypoxie .....	66
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
<b>7 ANHANG.....</b>	<b>84</b>
7.1 Abkürzungen .....	84
7.2 Publikation.....	86
7.3 Danksagung .....	86



# 1 Einleitung

## 1.1 Glioblastom

Maligne Gliome sind Tumoren des Zentralnervensystems, die sich aus Gliazellen oder deren Vorstufen entwickeln. Sie werden nach der WHO-Klassifikation in Grad III und IV eingeteilt [78]. Die anaplastischen Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome und Ependymome entsprechen den Grad III-Gliomen, die Glioblastome den Grad IV-Gliomen. Wegen ihrer Häufigkeit und ihres aggressiven Wachstums sind Glioblastome unter den malignen Gliomen von besonderer Bedeutung. Typische histologische Merkmale der Glioblastome und zugleich Zeichen der Malignität dieser Tumoren sind hohe Zelldichte, Zellpolymorphie, erhöhte Mitoseaktivität, Nekrosen und pathologische Gefäße. Die Prognose insbesondere der Glioblastome ist schlecht: die Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt im Median bei maximaler Therapie (Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie) weniger als ein Jahr. Verantwortlich für die schlechte Prognose und die ausgeprägte Therapieresistenz von Glioblastomen sind unter anderem molekulare Veränderungen, wie der Verlust von proapoptotischen Genprodukten wie p53 und eine verstärkte Expression von antiapoptotischen Genprodukten wie Mitgliedern der BCL2-Familie. Veränderungen des Tumormikromilieus sind auch von großer Bedeutung. Neben der Tumorphypoxie könnte dabei auch die Azidose eine wichtige Rolle spielen.

## 1.2 Zelltod

### 1.2.1 Nekrose und Apoptose

Es können in vielzelligen Organismen zwei prototypische Arten von Zelltod unterschieden werden: Nekrose und Apoptose. Das pathologisch bedingte Absterben von Zellen nach einer irreparablen Schädigung wird als Nekrose bezeichnet. Aufgrund von Flüssigkeits- und Elektrolytverschiebungen schwellen

die geschädigten Zellen an und lysieren. Durch die Freisetzung des Zellinhaltes können Entzündungsreaktionen und Schädigungen des benachbarten Gewebes auftreten. Der Begriff Apoptose wurde 1972 eingeführt, um die morphologischen Veränderungen zu beschreiben, die während des Prozesses der zellulären Selbstzerstörung auftreten [77]. Apoptose (griechisch: „Herabfallen der Blätter“) ist eine morphologisch definierte Form des Zelltodes, bei dem die Zellen bestimmte Kennzeichen aufweisen. Apoptose kann bei physiologischem (programmiertem) Zelltod während der Embryonalentwicklung und beim aktiven Zelltod, der durch die Notwendigkeit von RNA- und Proteinsynthese gekennzeichnet ist, auftreten. Aber auch viele exogene Einflüsse können zu apoptotischem Zelltod führen, wie zum Beispiel Chemotherapeutika, ionisierende Strahlung, Hyperthermie, Entzug von Wachstumsfaktoren sowie bestimmte Zytokine.

### 1.2.2 Das Tumorsuppressorgen p53

P53 wird als „*cellular gatekeeper for growth and division*“ bezeichnet [90]. Bei DNS-Schädigung zum Beispiel durch Zytostatika oder ionisierende Strahlung kommt es zu einer gesteigerten Expression von p53. Durch eine Aktivierung von p21 und damit Induktion eines Zellzyklusarrestes in der G1-Phase ermöglicht p53 der Zelle, die geschädigte DNS zu reparieren. Es verhindert somit, dass die geschädigte DNS repliziert wird.

Der Zellzyklus wird durch Komplexe aus Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK; *cyclin-dependent kinases*) und ihren regulatorischen Untereinheiten - den Cyclinen - angetrieben. P21 (Nomenklatur gemäß der relativen Molmasse: 21 kD) ist ein CDK-Inhibitor.

Außer einem Zellzyklusarrest kann p53 eine Apoptose der Zelle auslösen.

P53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren. Bei niedergradigen glialen Tumoren wie auch sekundären Glioblastomen ist ein Verlust von p53 häufig, im Gegensatz zu den primären Glioblastomen, wo dies nur selten auftritt. Seine Inaktivierung ist mit Tumorprogression und Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapie vergesellschaftet.

---

Eine Untersuchung an 12 humanen malignen Gliomzelllinien mit unterschiedlichen Chemotherapeutika ergab jedoch keine Korrelation zwischen dem p53-Status und der Chemosensitivität [157].

Möglicherweise haben Tumorzellen ohne p53-Mutationen andere genetische Veränderungen erworben, die funktionell ähnliche transkriptionelle Veränderungen wie Mutationen von p53 bewirken. Eine weitere Möglichkeit ist der Erwerb einer Zelltodresistenz durch Alterationen von p53-unabhängigen Molekülen.

### **1.3 Azidose und Hypoxie in Tumoren**

#### 1.3.1 Azidose und Hypoxie als Folge unzureichender Angiogenese

Hypoxie und Azidose spielen eine entscheidende Rolle bei der Resistenzentwicklung solider Tumoren [45, 139, 149]. Angiogenese ist in Tumoren ein wichtiger Prozess und kann durch eine Reihe von Faktoren, wie *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *fibroblast growth factors*, *hepatocyte growth factor*, *transforming growth factors (TGFs)* und *tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )* induziert werden [30, 36].

Hypoxie ist bereits in Frühstadien der Tumorentwicklung nachweisbar und kann schon ab etwa einer Tumorgroße von 1 mm<sup>3</sup> vorhanden sein [130]. Ursächlich für die chronische Hypoxie, die in weiten Abschnitten solider Tumore besteht, ist ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, wenn die Proliferation der Tumorzellen nicht ausreichend durch Angiogenese ausgeglichen werden kann. Zusätzlich kann es zum Beispiel durch Thrombose von Tumorgefäßen zu akuter, zum Teil repetitiver und reversibler Hypoxie kommen [15]. Weiter besteht durch den verminderten Blutfluss ein geringerer Austausch an Nährstoffen, Hormonen, Wachstumsfaktoren und Abfallprodukten (zum Beispiel Wasserstoffionen, Laktat; [139, 147]). Durch Ansammlung und vermehrte Produktion dieser Abfallprodukte scheint Azidose daher verstärkt in hypoxischen Bereichen eines Tumors vorzukommen [148]. Zusammen stellen diese Faktoren das Mikromilieu solider Tumoren dar. Es konnte jedoch durch

hochauflösende Messtechniken in soliden Tumoren *in vivo* gezeigt werden, dass Azidose nicht notwendigerweise zusammen mit Hypoxie auftreten muss [55]. Dies kann durch transiente Hypoxie durch einen unregelmäßigen Blutfluss innerhalb des Tumors mit sich verschließenden und wieder öffnenden Gefäßen bedingt sein, wobei der pH-Wert hierbei normal ist [128].

### 1.3.2 Veränderungen zellulärer Prozesse durch Azidose und Hypoxie

Die Arbeitsgruppe um Schmalz zeigte weiter, dass Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen bei gleichzeitig normalem pH-Wert bei Herunterregulierung von p53 überleben können, wohingegen bei gleichzeitig bestehender Azidose und erhöhtem p53 Apoptose auftritt. Somit scheint Azidose eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose in Tumorzellen zu spielen.

Auch andere zelluläre Prozesse werden durch eine extrazelluläre Azidose oder Hypoxie beeinflusst. So wird zum Beispiel die Transkription von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Gehirntumoren *in vivo* durch Hypoxie und Azidose unabhängig voneinander verstärkt [40]. Weiter war *in vitro* unter extrazellulärer Azidose eine verstärkte Migrations- und Invasionsbereitschaft und eine damit verbundene erhöhte Metastasenbildung unter anderem in humanen Melanomzellen gefunden worden [69, 100].

### 1.3.3 Intrazelluläre Bildung von Säure

Bei der Entwicklung von Azidose sind verschiedene Vorgänge beteiligt. Dabei entstehen Wasserstoffionen unter anderem während aerober und anaerober Glykolyse (mit Bildung von Laktat), Glutaminolyse und der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP). Normalerweise wird in gesunden Zellen unter Sauerstoffzufuhr aufgrund der deutlich niedrigeren Energieausbeute keine anaerobe Glykolyse durchgeführt und somit kein Laktat gebildet („Pasteur-Effekt“). Warburg beschrieb 1956, dass im Gegensatz dazu Tumorzellen häufig auch in Gegenwart von ausreichendem Sauerstoff und trotz geringerer Energieausbeute anaerobe Stoffwechselwege beschreiten, um aus Glukose

ATP zu gewinnen („Warburg-Effekt“; [152]). Es wird ein dadurch entstehender Wachstumsvorteil der Tumorzellen postuliert [44]. Ein Mol Glukose führt dabei durch das Umschalten von oxidativer Phosphorylierung auf Glykolyse zur Bildung von zwei Mol Laktat wie auch zwei Mol ATP. Laktat ist bei einem physiologischen pH-Wert in ein Laktatanion sowie ein Proton dissoziiert. Durch das Laktat kann ein azidotisches Zellumgebungsmilieu mitverursacht werden [128]. Bei einem niedrigen extrazellulären pH-Wert wird dabei zusätzlich der Transport von Laktat aus der Zelle verhindert [139]. Durch einen dadurch entstehenden niedrigen pH-Wert in der Zelle wird die Glykolyserate inhibiert. Dies wird vermutlich über eine Hemmung der Phosphofruktokinase verursacht. Nichtinvasive Untersuchungen mittels  $^{31}\text{P}$  Magnetresonanzspektroskopie (MRS) ergaben, dass in Tumorzellen intrazellulär häufig kein azidotischer, sondern ein neutraler bis alkalischer pH-Wert vorherrscht [48, 109]. Die lange Zeit dominierende Methode mit Messung des pH-Wertes in Tumoren durch Mikroelektroden zeigte häufig Werte im azidotischen Bereich [158]. Diese Messmethode gibt jedoch nur den extrazellulären also interstitiellen pH-Wert an, und kann durch Zellen, die durch das Einführen der Sonde geschädigt werden, wie auch durch Blut aus rupturierten Kapillaren beeinflusst werden.

#### 1.3.4 Mechanismen zur Regulierung des intrazellulären pH-Wertes

Zur Beibehaltung des intrazellulären pH-Wertes wenden Zellen zahlreiche Mechanismen wie Pufferung, metabolische Reaktionen, die Protonen verbrauchen, wie auch den Transfer von Säuren aus dem Zytoplasma in Zellorganellen und nach extrazellulär an [123]. Zu den Transportmechanismen gehören vakuoläre Protonenpumpen (V-ATPasen), der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport, Natrium-Bicarbonat-Kotransporter, Natrium-abhängige sowie Natrium-unabhängige  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher und die Monocarboxylattransporter (MCT). Es zeigte sich, dass unter anderem vakuoläre Protonenpumpen in multiresistenten Zellen überexprimiert werden, und dass die Expression von MCT1 in hochgradigen glialen Tumoren deutlich erhöht ist [39, 106]. Eine vom  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport abhängige Alkalinisierung wird als mögliches frühes Ereignis im

Rahmen einer malignen Transformation angesehen [120]. Durch eine Hemmung der Transporter konnte ein verringertes Tumorwachstum oder auch Apoptose induziert werden [121, 124, 161].

Somit scheinen diese Mechanismen zur Regulierung des intrazellulären pH-Wertes eine wichtige Rolle in Tumorzellen zu spielen und entscheidende Funktionen wie das Zellwachstum zu beeinflussen. Dabei sind viele zelluläre Prozesse wie zum Beispiel die Synthese von Makromolekülen und die Aktivität von Enzymen vom intrazellulären pH-Wert abhängig. Auch die Aufnahme von Chemotherapeutika und deren Wirksamkeit in der Zelle sind davon betroffen. Daher kann eine Beeinflussung dieser Transportmechanismen als eine Möglichkeit der Überwindung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika angesehen werden.

### **1.4 Chemotherapeutika**

#### 1.4.1 Lomustin

Lomustin (CCNU; 1-(2-Chloräthyl)-3-Cyclohexyl-1-Nitrosoharnstoff) gehört der Gruppe der Nitrosoharnstoffe an [94]. Es gelangt aufgrund seiner ausgeprägten Lipophilie mittels passiver Diffusion in die Zelle und penetriert gut in das ZNS. Chloroäthylnitrosoharnstoffe sind durch ihre carbamylierende und alkylierende Wirkung zytotoxisch. Sie wirken Zellzyklusphasen-unspezifisch. Die Wirkung von Chloroäthylnitrosoharnstoffen kann unter anderem durch O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNS-Methyltransferasen (MGMT; [5, 29]), Glutathion [2], Glutathion S-Transferasen (GST; [10, 93, 144]), Zytochrom P-450 [155], Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARP; [97]), Stickoxid [164] wie auch durch eine Induktion von p53 mit der Folge einer verstärkten DNS-Reparatur [111, 162] vermindert werden.

Diese Resistenzmechanismen können durch verschiedene Wirkstoffe moduliert werden. Dabei kann eine Inaktivierung des Reparaturenzyms MGMT mittels O<sup>6</sup>-Benzylguanin die Zytotoxizität von Lomustin steigern [5, 29].

Eine Methylierung des MGMT-Promoters reduziert die Produktion von MGMT und ist mit einer verlängerten progressionsfreien Überlebensrate wie auch einer verlängerten medianen Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit einem Glioblastom nach Behandlung mit Nitrosoharnstoffen und Temozolomid verbunden [31, 57].

Eine Studie von Mukanganyama und Mitarbeitern ergab, dass sich Glutathion S-Transferasen durch Medikamente gegen Malaria wie Pyrimethamin, Artemisinin, Chinidin, Chinin und Tetrazykline hemmen lassen [105].

Zu einer verstärkten Resistenz können hingegen erhöhte Spiegel von Glutathion S-Transferasen führen, die unter anderem durch Phenobarbital und Dexamethason induziert werden [88, 144].

#### 1.4.2 Cisplatin

Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin (II); cis-DDP) ist ein divalenter, anorganischer, wasserlöslicher, platinenthaltender Komplex. Ein Platinatom wird von zwei Chloridatomen und zwei Ammoniakmolekülen umgeben. Es wird angenommen, dass Cisplatin vor allem durch passive Diffusion in die Zelle gelangt [11, 62, 98]. Ein Teil der Aufnahme ist energieabhängig und kann durch Inhibitoren der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase vermindert werden. In der Zelle werden die Chloridliganden von Cisplatin durch Wassermoleküle ersetzt. Dieser Ligandenaustausch wird im Serum aufgrund der hohen Chloridkonzentration (um 100 mM) unterdrückt und findet daher zum größten Teil nach Eintritt von Cisplatin in die Zelle statt. Die durch den Austausch beider Chloridliganden entstandene Diaquo-Form des Cisplatins entfaltet nun ihre zytotoxische Wirkung durch Bindung an alle DNS-Basen unter Bildung von Quervernetzungen innerhalb eines oder zwischen verschiedenen DNS-Strängen, wobei die N<sup>7</sup>-Position des Guanins und des Adenins bevorzugt wird [165]. Im Zytoplasma reagieren Mikrofilamente, schwefelwasserstoffhaltige Proteine und RNS mit Cisplatin [72]. Cisplatin kann die DNS-Replikation wie auch die RNS-Transkription inhibieren, zu einem Sistieren des Zellzyklus in der G2-Phase und zum programmierten Zelltod führen [20, 103].

Die zu Resistenz gegenüber Cisplatin führenden Mechanismen sind unter anderem eine Verminderung der intrazellulären Cisplatinanreicherung (sowohl durch verminderte Aufnahme wie auch durch verstärkten Transport aus der Zelle bedingt, wobei der vermehrte Efflux unter anderem durch MRP1 und 2 (*multidrug resistance associated protein*) vermittelt wird; [92, 101]) wie auch eine intrazelluläre Anreicherung von Cisplatin in Vesikeln [73], eine Inaktivierung von Cisplatin durch Bindung an schwefelwasserstoffhaltige Moleküle wie Glutathion [67] sowie eine Überexpression von Metallothioneinen [75]. Weiter können Glutathion S-Transferasen [46], verstärkte Reparaturmechanismen [68], Defekte im *mismatch-repair*-System [145], eine verstärkte Toleranz [25], eine erhöhte Expression von DNS-Polymerase  $\beta$  [18] sowie eine vermehrte Bildung von neutralen Hydroxylmetaboliten [19] eine Resistenz gegenüber Cisplatin verursachen.

### 1.4.3 Gemcitabin

Gemcitabin (2', 2'-Difluoro-2'- Desoxycytidin, dFdC) ist ein dem Cytarabin verwandtes Nukleosidanalogen [49, 58]. Es wird über spezielle Nukleosidtransporter in die Zelle transportiert [8]. Durch die Desoxycytidinkinase (zu einem geringen Anteil auch durch die Thymidinkinase 2) wird Gemcitabin zu seinem aktiven Metaboliten, dem Triphosphat, phosphoryliert. Es erfolgt der Einbau kompetitiv zu Desoxycytidintriphosphat in die DNS. Dabei wird Gemcitabintriphosphat im sich verlängernden DNS-Strang eingebaut und ein Desoxynukleotid angefügt. Die DNS-Polymerasen sind nun nicht mehr in der Lage mit dem Prozess fortzufahren. Dieser sogenannte „maskierte Kettenabbruch“ scheint Gemcitabin in der DNS einzuschließen. Exonukleasen können Gemcitabin aus dieser Position nicht mehr entfernen. Zelllinienabhängig ist auch ein Einbau in die RNS möglich [127]. Für Gemcitabin wird weiter ein selbstpotenzierender Wirkmechanismus postuliert [117].

Resistenzen gegen Gemcitabin können aufgrund einer Reihe von Faktoren auftreten [8]. Dazu gehören ein verminderter Transport in die Zelle [96],



verminderte oder weniger aktive Desoxycytidinkinasen [146], vermehrte oder aktivere 5'-Nukleotidasen [64] und Desoxycytidineaminasen [108] wie auch die Entfernung durch Exonukleasen [42]. P-Glykoprotein und MRP scheinen bei Gemcitabin eher eine Sensibilisierung als eine Resistenz auszulösen [9].

#### 1.4.4 Temozolomid

Temozolomid (8-Carbamoyl-3-Methylimidazo(5,1-d)-1,2,3,5-Tetrazin-4(3H)-on) ist ein lipophiles Molekül mit einer relativen Molekularmasse von 194 [74]. Es gehört den Imidazotetrazinonen an, die charakteristischerweise aus einem Imidazol- und einem Tetrazinonring, der drei Stickstoffatome enthält, bestehen [110]. Temozolomid wird spontan in Abhängigkeit vom pH-Wert nichtenzymatisch zu seinen aktiven Metaboliten abgebaut [27]. Dabei wird Temozolomid hydrolysiert, wobei es zu Ringöffnung und Decarboxylierung kommt. Dies geschieht bei einem pH-Wert von über 7, da Temozolomid in Säure stabil ist - die Säurestabilität von Temozolomid ermöglicht die orale Einnahme. Das entstandene 5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-Carboxamid (MTIC) wird zur Bildung eines Methyldiazonium-Ions bei einem pH-Wert unter 7 gespalten, da es im Gegensatz zu Temozolomid bei alkalischen pH-Werten stabil ist. Das Methyldiazonium-Ion interagiert mit der DNS in Form von Alkylierung. Dies geschieht zu mindestens 70% an N<sup>7</sup>-Guanin, zu etwa 9,2% an N<sup>3</sup>-Adenin und zu 5% an O<sup>6</sup>-Guanin. Die zytotoxische wie auch mutagene Wirkung von Temozolomid scheint hauptsächlich durch die Bildung von O<sup>6</sup>-Methylguanin bedingt zu sein [27].

Das durch Temozolomid entstandene O<sup>6</sup>-Methylguanin entfaltet seine zytotoxische Wirkung mittels eines funktionierenden *mismatch-repair*-Systems. Bei der frustrierten Suche nach einem passenden Partner für das O<sup>6</sup>-Methylguanin entstehen Unterbrechungen in der DNS, die bei der Replikation in der S-Phase inhibitorisch wirken. Die DNS-Replikation kann ebenso durch die entstehenden N<sup>7</sup>-Methylguanin- sowie N<sup>3</sup>-Methyladenin-Gebilde verhindert werden. Die Expression von N<sup>7</sup>-Methylguanin-DNS- sowie N<sup>3</sup>-Methyladenin-DNS-Glykosylasen scheint mit der zytotoxischen Wirkung von Temozolomid

jedoch nicht zu korrelieren [24, 66]. Weitere Wirkungen von Temozolomid sind eine Hemmung von Enzymen (zum Beispiel von Esterasen [28]) und eine Hemmung der Angiogenese [82], der Metastasenbildung [142] sowie der Telomerasenaktivität [32]. Temozolomid kann in malignen Gliomzellen einen G2/M-Arrest sowie eine Apoptose induzieren [60]. Es kann in malignen Gliomzellen auch eine Autophagie bewirken [74]. Wird diese in einem frühen Stadium gehemmt, wird die Wirkung von Temozolomid abgeschwächt. Zu einem späteren Zeitpunkt bewirkt die Hemmung durch Bafilomycin A1, einem H<sup>+</sup>-ATPase-Inhibitor, eine durch Temozolomid verursachte Apoptose.

Die Wirkung von Temozolomid kann unter anderem durch die MGMT, ein nicht funktionierendes DNS-*mismatch-repair*-System sowie eine verstärkte Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Aktivität vermindert werden [22, 29, 143].

### 1.4.5 Teniposid

Teniposid (VM26; C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>S; 4'-Demethyl-Epipodophyllotoxin-9(4,6-O-Thenyliden-β-D-Glukopyranosid) ist ein halbsynthetisches Glykosid des aktiven Wirkstoffes Podophyllotoxin und gehört der Gruppe der Epipodophyllotoxine an [21]. Die Aufnahme von Teniposid in die Zelle erfolgt mittels passiver Diffusion [52]. Teniposid bindet an Tubulin, dabei an anderer Stelle als die Vinca-Alkaloide, wobei es die Struktur und Funktion der Spindelproteine nicht beeinträchtigt. Weiter bildet Teniposid mit Topoisomerase II und DNS einen ternären Komplex. Dies führt zu DNS-Doppelstrangbrüchen [154] und letztendlich zum Zelltod. Eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Epipodophyllotoxinen besteht in der S- und G<sub>2</sub>-Phase. Mögliche Resistenzmechanismen gegenüber Teniposid sind ein verminderter Einstrom [21] sowie ein vermehrter Efflux von Teniposid [81], eine verminderte Expression [160] und Mutationen der Topoisomerase II [17] wie auch ein zur Komplexbildung benötigter vermehrter Energieverbrauch [23].

#### 1.4.6 Topotecan

Topotecan ( $C_{23}H_{23}N_3O_5 \cdot (-HCL)$ ) ist ein halbsynthetisches, wasserlösliches Derivat des Alkaloids Camptothecin. Die geschlossene Laktonstruktur scheint für die passive Diffusion von Topotecan in die Zelle erforderlich zu sein [63]. In einem sauren Milieu ist die Bildung der aktiven geschlossenen Laktonform von Topotecan begünstigt; bei alkalischen wie auch bei physiologischen pH-Werten herrscht die offene inaktive Lakton-Ringform vor.

Topotecan bewirkt eine reversible Hemmung der Topoisomerase I durch Bindung an den Komplex aus DNS und Topoisomerase I. Während der Replikation verursacht Topoisomerase I durch Bindung an bestimmte DNS-Abschnitte unabhängig von ATP einen Einzelstrangbruch der normalerweise als Doppelstrang in spiralierter Form vorliegenden DNS [26]. Dadurch kann die für die Replikation notwendige Relaxation der DNS erfolgen. Die DNS-Polymerase erhält somit Zugang zum replizierenden Strang. Danach verbindet die Topoisomerase I die Einzelstrangenden wieder miteinander. Topotecan inhibiert selektiv die Religation der gespaltenen Einzelstrangenden und stabilisiert dadurch den kovalenten Komplex aus Enzym und gespaltenem DNS, der die Replikation behindert. Die Zytotoxizität von Topotecan ist zellzyklusspezifisch. In der S-Phase ist sie am stärksten ausgeprägt. Als Resistenzmechanismen werden eine verminderte intrazelluläre Topotecananreicherung durch verminderte Aufnahme und gesteigerten Efflux, eine subzelluläre Umverteilung von Topotecan, Topoisomerase I-Mutationen wie auch ein veränderter Abbau der Topoisomerase und Reparaturmechanismen angesehen [118, 119].

#### 1.4.7 Vincristin

Vincristin ist eine asymmetrische, dimere Verbindung und gehört zur Gruppe der Vinca-Alkaloide. Die Aufnahme in die Zelle wird durch zahlreiche Mechanismen erreicht. Hierbei spielen passive Diffusion und ein aktiver energie- und temperaturabhängiger Transport eine wichtige Rolle [168].

Die Vinca-Alkaloide sind zellzyklusabhängige Substanzen. Sie führen durch Bindung an Tubulin zur Hemmung der Polymerisierung von Tubulin zu Mikrotubuli. Sie binden auch direkt an Mikrotubuli [59]. Daher verursachen die Vinca-Alkaloide eine Mitosehemmung in der Metaphase [159]. Zusätzlich zur Mikrotubulifunktionsstörung wird für Vincristin eine antiangiogenetische Wirkung angenommen [6, 53]. In nichttoxischen Dosen scheint Vincristin weiter auch eine Reduzierung der Tumorzellmigration zu bewirken [53].

Zur Resistenz gegenüber Vincristin führen unter anderem eine Verminderung der intrazellulären Vincristinanreicherung (durch verminderte Aufnahme [133] und vermehrten Efflux durch *multidrug resistance*-Transporter [99]), eine Anreicherung in zytoplasmatischen Organellen [86], ein verstärkter Abbau (unter anderem durch die Myeloperoxidase [115] und Zytochrom P450 [166]) sowie Veränderungen der Mikrotubuli und des Tubulins [70, 76, 132].

### **1.5 Die Bedeutung der Azidose für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemo- und Strahlentherapie**

Bei soliden Tumoren wurde in den bisher vorliegenden Arbeiten überwiegend eine verringerte Zytotoxizität der meisten Chemotherapeutika bei Azidose beschrieben. Die Ergebnisse sind jedoch heterogen, belastbare Daten für eine repräsentative Auswahl von Gliomzelllinien und die dabei relevanten Chemotherapeutika liegen nicht vor. Von besonderer Bedeutung ist, dass für das derzeit am häufigsten bei malignen Gliomen eingesetzte Chemotherapeutikum Temozolomid keinerlei diesbezügliche Daten vorliegen.

Als Mechanismen für Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika unter extrazellulärer Azidose werden unter anderem eine reduzierte Aufnahme durch veränderte Wirkstoffgradienten [45], eine veränderte Beständigkeit der Therapeutika [126], eine erhöhte MDR-Aktivität [156] sowie ein veränderter Zellzyklus postuliert.

Eine Resistenz gegenüber Bestrahlung können eine verminderte Fixierung des DNS-Schadens nach Bestrahlung [38], eine vermehrte Anzahl von DNS-

Reparaturenzymen sowie ein veränderter Zellzyklus hervorrufen. Ein unter Azidose möglicher veränderter Zellzyklus mit Verlängerung der G2/M-Phase lässt dabei eine längere Zeitspanne für die Reparatur der unter Bestrahlung entstandenen DNS-Schäden zu [89, 116].

### **1.6 *Multidrug resistance*-Transporter**

Viele Wirkstoffe können unter ATP-Verbrauch durch Transportproteine aus der Zelle gepumpt werden. Zu diesen Transportproteinen gehört auch das P-Glykoprotein (P-gp). Dieses ist ein Breitspektrum-MDR-Transporter, der eine Vielzahl zytotoxischer Substanzen aus der Zelle pumpen kann. Hierbei entsteht ein Konzentrationsgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum, der eine relative Resistenz erzeugt [47]. Auch in gesundem Gewebe findet sich P-gp, das hier eine Entgiftungsfunktion übernimmt. Vor allem sekretorische und schrankenbildende Zellen, wie die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, weisen eine hohe P-gp-Expression auf.

Substanzen wie Verapamil, die selbst Substrate dieser Transportproteine sind, hemmen den Transport von Chemotherapeutika kompetitiv [122]. Daneben gibt es andere Substanzen wie zum Beispiel Cyclosporin, die keine Substrate des Transporters sind, sondern durch Bindung an anderen Stellen der dreidimensionalen Proteinstruktur eine Hemmung verursachen [85].

### **1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Das aggressive biologische Verhalten und die Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie sind verantwortlich für die sehr ungünstige Prognose von Patienten mit Glioblastom. Das Tumormikromilieu mit Hypoxie, Azidose, Nährstoffmangel und verminderter Perfusion trägt dabei entscheidend zur Therapieresistenz bei.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von extrazellulärer Azidose und Hypoxie bei etablierten Glioblastomzelllinien untersucht.

## 1 Einleitung

---

Dabei wurde zunächst der Einfluss von Azidose auf Proliferation und Überleben charakterisiert. Anschließend wurde geprüft, wie Azidose die Sensitivität gegenüber Bestrahlung, und Azidose und Hypoxie die Sensitivität gegen Chemotherapeutika beeinflusst. Spezifisch wurde die Bedeutung der Azidose für die Stabilität verschiedener Chemotherapeutika und die Aktivität eines *multidrug resistance*-Transporters (P-Glykoprotein) bestimmt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Antagonisierung von p53 Wachstum und Überleben unter Azidose verändert.

Das Ziel dieser Arbeit war, ein besseres Verständnis der Bedeutung von Azidose und Hypoxie für die zur Zeit verfügbaren Therapieoptionen beim Glioblastom zu erreichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Serva
Aprotinin	Sigma
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Serva
BSA ( <i>fraction V standard grade lyophilized</i> )	Sigma
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL
Dulbecco's PBS ( <i>phosphat buffered saline</i> )	Gibco BRL
Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
[ <sup>3</sup> H]-Methylthymidin	Amersham
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL
HEPES	Sigma
HCl	Sigma
Hygromycin	Gibco BRL
Kristallviolett	Sigma
Leupeptin	Sigma
Mercaptoäthanol	Roth
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Sigma
Natriumvanadat/ NaVO <sub>5</sub>	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Ponceau-Rot S	Merck
Propidiumiodid	Sigma
Rhodamin-123	Molecular Probes
RNase A	Roth
N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	Fluka

## 2 Material und Methoden

---

TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma
Trypsin	Gibco BRL
Tween-20	Fluka
Verapamil	Sigma

### 2.2 Chemotherapeutika

Lomustin (CCNU)	Medac
Cisplatin	Bristol
Gemcitabin	Lilly
Teniposid (VM 26)	Bristol
Temozolomid	Essex Pharma
Topotecan	GlaxoSmithKline
Vincristin	Sigma

### 2.3 Antikörper

Aktin (1-19; SC1616)	Santa Cruz Biotechnology
p21 (C19 ; SC397)	Santa Cruz Biotechnology
p53 ( <i>polyclonal antibody</i> [pAb] 240 und 1801)	Oncogene Research Products

### 2.4 Verbrauchsmaterialien

Filterpapier für Westernblots	Bio-Rad
Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	Bio-Rad
PVDF (Hybond <sup>TM</sup> -P; 0,45 µm)	Amersham
Röntgenfilme Kodak Xomat AR5	Kodak

Sonstige Materialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Costar, Eppendorf, Greiner und Falcon bezogen.



## 2.5 Kits

<i>ECL Western blotting detection reagents</i>	Amersham
<i>ECL Plus Western blotting detection reagents</i>	Amersham
PathDetect® 219092 (p53-Reporter-Assay)	Stratagene

## 2.6 Verzeichnis der Lieferfirmen

Amersham (Freiburg), BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg), Becton-Dickinson (Heidelberg), Bio-Rad (München), Bristol-Myers Squibb (München), Costar (Cambridge, MA, USA), Eppendorf (Hamburg), Essex Pharma (München), Falcon (Heidelberg), Fluka (Seelze), Gibco BRL (Basel, Schweiz), GlaxoSmithKline (München), Greiner (Frickenhausen), Kodak (Stuttgart), Lilly (Bad Homburg), Medac (Hamburg), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Leiden, Niederlande), Oncogene Research Products (Cambridge, MA, USA), Roth (Karlsruhe), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Stratagene (La Jolla, CA, USA).

## 2.7 Zelllinien

Die humanen Gliomzelllinien U87MG, LNT-229, LN-18 sowie T98G wurden von Prof. Dr. N. de Tribolet (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden ursprünglich aus einem Glioblastom isoliert.

## 2.8 Transfektion

Die Zelllinien LNT-229 und U87MG wurden mittels Elektroporation mit dem Vektor für das Hygromycin-Resistenzgen (hygro) oder mit einem Vektor transfiziert, der das Hygromycin-Resistenzgen und das murine p53<sup>V135A</sup> enthielt. Somit erhielt man je zwei Varianten der jeweiligen Zelllinie, zum Beispiel LNT-229 hygro und LNT-229 p53<sup>V135A</sup>. Dieses von der Maus stammende p53<sup>V135A</sup> wirkt bei 38,5 °C dominant-negativ.

Bei der Elektroporation bilden sich dabei durch Anlegen einer hohen Spannung in der Zellmembran der zu transfizierenden Zellen kurzzeitig Poren, durch welche die sich in der Zellsuspension befindenden Plasmide in die Zellen eintreten können.

Zur Transfektion wurden die Zellen trypsiniert. Für 5 µg Plasmid wurden  $10^7$  Zellen verwendet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit 800 µl PBS resuspendiert und auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 5 µg Plasmid und Mischung wurde diese Suspension in eine Transfektionsküvette gegeben und die Elektroporation im *Genpulsar* (Biorad, Krefeld/Oppum) bei 250 V und 950 µF durchgeführt. Danach wurden die Zellen in Kulturflaschen mit Vollmedium kultiviert. Nach zwei Tagen wurde das Vollmedium durch das Selektionsmedium (Vollmedium mit 200 µg/ml Hygromycin B) ersetzt und so die Selektion der Zellen, die den Vektor aufgenommen hatten, gestartet. Nach etwa sechs Wochen war dieser Vorgang abgeschlossen, und die Zellen wurden gepoolt.

### **2.9 Zellkultur**

#### 2.9.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 5% FCS, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Das zur Herstellung der Zellkulturmedien eingesetzte FCS wurde bei 58°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert. Das Passagieren der adhären, konfluenten Zellen erfolgte durch einmaliges Waschen mit Dulbecco's PBS und anschließender Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung für circa ein bis zwei Minuten. Danach wurden die Zellen zur Inaktivierung des Trypsins in Vollmedium resuspendiert und in einer 1:10 Verdünnung in neue Zellkulturflaschen überführt.

### 2.9.2 Herstellung der azidotischen Zellmedien

Die Einstellung der Medien auf die pH-Werte 7,4, 7,0 und 6,6 wurde durch Titration mit einmolarer Salzsäure (HCl) des unter 2.9.1 beschriebenen Zellmediums (mit zusätzlich 20 mM HEPES) durchgeführt. Daran schloss sich eine Inkubation von 24 Stunden in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt an, um eine Einstellung des Bikarbonatpuffersystems zu erreichen. Anschließend erfolgte eine erneute Titration mit weiterer 24 Stunden 5% CO<sub>2</sub>-Begasung. Dieser Vorgang wurde bis zum Erreichen sowie stabilen Aufrechterhalten des gewünschten pH-Wertes wiederholt.

### 2.9.3 Herstellung der hypoxischen Zellmedien

Die Zellmedien, die bei den Versuchen unter Hypoxie verwendet wurden, wurden durch mindestens 48-stündige Begasung des unter 2.9.1 beschriebenen Zellmediums mit 99% Stickstoff und 1% Sauerstoff in einem C42-Inkubator der Firma Labotect (Göttingen) hergestellt.

Ebenso wurden die Zellmedien, die bei der Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen eingesetzt wurden, wie oben geschildert hergestellt. Bei der Zugabe der Wirkstoffe war durch die Arbeit in einem offenen System eine Zufuhr von Sauerstoff nicht zu vermeiden.

## 2.10 Kristallviolett-Assay

Das Zellwachstum wurde durch die Kristallviolettfärbung als Nachweismethode bestimmt. Mit dieser Färbemethode ist eine quantitative Auswertung des Überlebens von Zellen möglich. Dabei gilt das Prinzip, dass nur lebende Zellen auf der Zellkulturplatte adhären und damit nur diese von Kristallviolett angefärbt werden können.

Für die Kristallviolettfärbung wurden der Zellkulturüberstand und mit ihm die nicht adhärenen toten Zellen entfernt und 15 Minuten mit 50 µl Kristallviolettlösung (0,5% Kristallviolett in 20% Methanol) pro Kavität bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde diese Lösung abgeschüttet und die

96-*well*-Platten gründlich mit Wasser gewaschen, um nicht-zellgebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach dem Trocknen der 96-*well*-Platten wurde der in die Zellen aufgenommene Farbstoff in jeweils 50 µl 0,1 M Natriumzitat (in 50% Äthanol) gelöst, um zu verhindern, dass falsche Extinktionswerte aufgrund einer nicht gleichmäßigen Verteilung der Zellen gemessen werden. Die optische Dichte wurde bei 550 nm in einem Photometer (*MRX Dynatech Laboratories*) mittels *BioLinx-Software* (BioLinx 2.21) gemessen. Von den so erhaltenen Messwerten wurde jeweils ein Leerwert, der mittels einer Lösung aus ungefärbten Zellen mit Natriumcitrat gewonnen wurde, subtrahiert.

### **2.11 Wachstumskurven unter Azidose**

Für diesen Versuch wurden 5000 Zellen pro Kavität ausgesät. 24 Stunden nach Anwachsen in Medium mit einem physiologischen pH-Wert von 7,4 erfolgte ein Mediumwechsel mit den zuvor pH-modifizierten Medien (pH 7,4, pH 7,0 oder 6,6). Die Zellen wurden in diesen Medien belassen, und das Wachstum zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Kristallviolettffärbung bestimmt.

### **2.12 [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin-Einbau unter Azidose**

Um den [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin-Einbau zu messen, wurden 5000 Zellen pro Kavität ausgesät. Nach 24 Stunden Anwachsen in einem Zellmedium mit einem pH-Wert von 7,4 erfolgte ein Mediumwechsel auf pH 7,4, 7,0 oder 6,6. Nach 56 Stunden wurde 1 µCi [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin hinzugegeben und der [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin-Einbau nach Ablauf von weiteren 16 Stunden mittels eines *liquid scintillation counter* bestimmt.

### **2.13 Messung der Chemotherapeutika-vermittelten Zytotoxizität**

#### **2.13.1 Unter Azidose**

Für die Messung der Chemotherapeutika-vermittelten Zytotoxizität wurden 5000 Gliomzellen pro Kavität einer 96-*well*-Platte ausgesät. Nach einer Anwachszeit

von 24 Stunden in untitriertem Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 5% FCS wurden die Zellen durch Wechsel mit nun pH-modifiziertem Medium für 24 Stunden an den jeweiligen pH-Wert adaptiert. Daraufhin erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika für 72 Stunden unter gleichbleibenden pH-Wert-Bedingungen, die durch Messung mit einer pH-Messelektrode bei Beendigung des Versuchs kontrolliert wurden. Der Versuch wurde dann mittels Kristallviolett färbung gestoppt.

Aus den Überlebensdaten wurde als Maß der Empfindlichkeit einer bestimmten Zelllinie für ein Zytostatikum die Konzentration berechnet, bei der 50% der Zellen überleben (EC50; *effective concentration*).

### 2.13.2 Unter Hypoxie

Hierzu wurden 5000 Gliomzellen pro Kavität einer 96-well-Platte ausgesät, die für 24 Stunden in DMEM mit 5% FCS anwachsen konnten. Dem folgte eine 24-stündige Adaptation an Hypoxie (1% Sauerstoff, 99% Stickoxid) in einem C42-Inkubator der Firma Labotect (Göttingen). Danach erfolgte die Behandlung mit den Chemotherapeutika, die in den zuvor für mindestens 48 Stunden unter 1% Sauerstoff und 99% Stickstoff gehaltenen Medien gemischt wurden. Da hierbei ein offenes System bestand (Herausholen der Zellplatten aus dem Hypoxie-Brutschrank und Behandlung an offener Sterilbank) war für die kurze Zeit des Mediumwechsels eine Zufuhr von Sauerstoff nicht zu vermeiden. Die Zellplatten wurden danach erneut in den Hypoxie-Inkubator gestellt, und nach weiteren 72 Stunden wurde die Behandlung mittels Kristallviolett färbung abgestoppt. Die gleiche Behandlung erfuhren die Zellen der Kontrollgruppen. Diese wurden jedoch während des gesamten Versuches in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> und normaler Sauerstoffzufuhr gehalten.

Aus den Überlebensdaten wurde als Maß der Empfindlichkeit einer bestimmten Zelllinie für ein Zytostatikum die Konzentration berechnet, bei der 50% der Zellen überleben (EC50; *effective concentration*).

### **2.14 Bestimmung der Stabilität der Chemotherapeutika unter Azidose**

Dafür wurden die Chemotherapeutika für 0 bis 29 Stunden in einem Zellmedium mit einem pH-Wert von entweder 6,6 oder 7,4 belassen. Danach wurden diese zu Zellkulturen von LNT-229 unter Beibehaltung eines pH-Wertes von 7,4 hinzugegeben, und die Zytotoxizität nach weiteren 72 Stunden mittels Kristallviolett färbung gemessen.

### **2.15 Messung der Strahlen-vermittelten Zytotoxizität unter Azidose**

Zur Untersuchung der Bestrahlungssensitivität der einzelnen Zelllinien unter verschiedenen pH-Werten wurde ein Versuchsaufbau mit Kolonienbildung verwendet. Aufgrund der dabei offensichtlichen verringerten Fähigkeit der Zelllinie U87MG zur Kolonienbildung unter Azidose wurde dieser Versuch nur mit den Zelllinien LNT-229, T98G und LN-18 durchgeführt.

Für die Messung der Strahlen-vermittelten Zytotoxizität wurden 500 Gliomzellen pro Kavität einer 6-well-Platte ausgesät. Der Wechsel des Zellmediums durch pH-veränderte Zellmedien (pH 6,6, 7,0 sowie 7,4) wurde nach 24 Stunden Anwachszeit durchgeführt. Diese Zellmedien wurden für weitere 24 Stunden belassen. Es erfolgte die Bestrahlung (0 bis 6 Gray) sowie 48 Stunden nach Bestrahlung für alle Zellen ein erneuter Mediumwechsel auf einen pH-Wert von 7,4. Der Versuch wurde nach stattgefundenener Kolonienbildung (mindestens 50 Zellen) der Kontrollplatte (pH 7,4 während des gesamten Versuches; keine Bestrahlung) mittels Kristallviolett färbung abgestoppt, und die Kolonien unter dem Mikroskop gezählt.

### **2.16 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.16.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Für die Herstellung der Proteinlysate wurden die transfizierten Zellen und die Kontrollzellen in Zellkulturflaschen ausgesät, und nach einer Anwachszeit von

24 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt. Die hierbei zugeführten pH-adaptierten Zellmedien (pH 7,4, 7,0 oder 6,6) wurden für weitere 48 Stunden belassen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Es folgte die Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche mittels Zellschaber in eiskaltem PBS und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 100 µM). Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1700 rpm und 4°C wurde das Zellpellet in Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCL, pH 8; 120 mM NaCl; 0,5% NP-40; 2 µg/ml Aprotinin; 100 µg/ml PMSF; 10 µg/ml Leupeptin; 50 mM Natriumfluorid; 200 µM Natriumvanadat) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellysate 15 Minuten bei 4°C und 13000 rpm erneut zentrifugiert und bis zur Weiterverarbeitung bei minus 20°C aufbewahrt.

### 2.16.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Messung wurden die Zellysate mit PBS 1:50 verdünnt. Danach wurden diese in eine 96-well-Platte überführt und jeweils 150 µl einer 1:4 verdünnten Biorad-Färbelösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Platten bei 590 nm in einem *Elisa-Reader* (*MRX Dynatech Laboratories*). Auf denselben Platten wurde jeweils eine Eichkurve mit einem BSA-Standard (0,1 mg/ml in PBS) im Bereich von 1 bis 12 µg aufgetragen. Die Umrechnung der Proteinkonzentration anhand der Standard-Eichkurve erfolgte im Anschluss mittels der *BioLinx-Software* (BioLinx 2.21).

## 2.17 Westernblot

### 2.17.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden 20 bis 40 µg jeder Probe mit dem gleichen Volumen von 2x Lämmli-Puffer (100 mM Tris-HCL, pH 6,8; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycerol) versetzt und 10% Mercaptoäthanol dazugegeben. Es erfolgte eine kurze Zentrifugation und eine Denaturierung der Proben bei 95°C für 10 Minuten mit anschließender 5-minütiger Inkubation auf

## 2 Material und Methoden

---

Eis. Danach wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel nochmals kurz zentrifugiert.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen [84]. Die Elektrophorese wurde in Mini-Gel-Apparaturen (BioRad) durchgeführt.

Die Acrylamidkonzentration des verwendeten Trenngels betrug zwischen 8 und 15 Prozent je nach Größe der zu untersuchenden Proteine (Tab. 1). Auf das Trenngel wurde ein Sammelgel (1,15 ml H<sub>2</sub>O; 0,33 ml 30% Acrylamid-Mix; 0,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,02 ml 10% SDS; 0,02 ml 10% APS; 0,002 ml TEMED) gegossen. Nach der Polymerisierung wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 193 mM Glycin; 0,5% SDS) benetzt. Danach wurden die Proben in die Geltaschen überführt und die Elektrophorese bei 200 Volt für circa 45 Minuten durchgeführt.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Polyacrylamid-Trenngele

	Acrylamid-Konzentration (%)			
	8	10	12	15
Aqua dest (ml)	2,3	2	1,7	1,2
30% Acrylamid (ml)	1,3	1,7	2	2,5
1,5 M Tris, pH 8,8 (ml)	1,3	1,3	1,3	1,3
10% SDS (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05
10% APS (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED (ml)	0,003	0,002	0,002	0,002

### 2.17.2 Westernblot und Immunodetektion

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2 µm) oder eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF; Porengröße 0,45 µm) übertragen. Der



Elektro-Transfer erfolgte unter Kühlung bei 100 Volt für eine Stunde in Transfer-Puffer (25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin). Unmittelbar nach dem Transfer wurde das Gesamtprotein auf der Membran mit Ponceau-Rot S-Färbelösung (0,2% Ponceau-Rot S; 3% Trichloressigsäure; 3% Sulfosalicylsäure) reversibel angefärbt, um die Effizienz des Transfers und die Ladung gleicher Proteinmengen zu kontrollieren. Die Membran wurde dann für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungs-Puffer (5% Magermilchpulver in PBS/0,05% Tween-20) gesättigt. Anschließend folgte eine 24-stündige Inkubation mit dem primären Antikörper. Nach drei Waschschritten in PBS/0,05% Tween-20 für jeweils 15 Minuten wurde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase-Konjugate 1:3000 in PBS/0,05% Tween-20/0,1% BSA) durchgeführt. Unspezifische gebundene Antikörper wurden nach einer Stunde durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween-20 entfernt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Chemolumineszenz-Detektion (ECL-Kit, Amersham, Freiburg). Dazu wurden die einzelnen Membranen eine Minute mit dem Nachweisreagenz (1 Vol. Lösung 1 und 1 Vol. Lösung 2, etwa 0,5 ml/cm<sup>2</sup>) bei Raumtemperatur inkubiert, kurz abgetropft, in Folie eingewickelt und 30 Sekunden bis 30 Minuten auf Röntgenfilm exponiert.

### **2.18 Durchflusszytometrie**

#### 2.18.1 Bestimmung der Zellzyklusphasen unter Azidose

Für die Bestimmung der Zellzyklusphasen unter Azidose wurde eine je nach Zelllinie (U87MG und T89G) und damit verbundener verschiedener Wachstumsgeschwindigkeit unterschiedliche Zellzahl pro Gewebekulturflasche ausgesät. Das Ziel war, eine zum Abstopppzeitpunkt nach insgesamt 96 Stunden in den Kontrollflaschen ähnliche konfluierende Zelldichte ohne Überwachungen zu erhalten. Die Zellen konnten nach der Aussaat für 24 Stunden bei einem pH-Wert von 7,4 anwachsen, woraufhin ein Mediumwechsel auf pH-Werte von 6,6, 7,0 oder 7,4 erfolgte. Nach jeweils 24, 48 und 72

## 2 Material und Methoden

---

Stunden wurde das Wachsen gestoppt und eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.

Dabei wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 80 % eiskalten Äthanol fixiert und zentrifugiert. Danach erfolgte erneut das Waschen mit PBS. Im Anschluss wurden jeweils  $10^6$  Zellen mit Propidiumiodid (50  $\mu\text{g/ml}$ ) in PBS gefärbt, das 100  $\mu\text{g/ml}$  RNase A enthielt. Die anschließende durchflusszytometrische Untersuchung wurde mit einem Becton Dickinson FACSCalibur Zytometer und *CellQuest Software* durchgeführt.

### 2.18.2 Rhodamin-123-Transport zur Quantifizierung der P-Glykoprotein-Aktivität

Um die funktionelle Aktivität von P-Glykoprotein (P-gp) zu messen, wurde der Rhodamin-123 Transport bestimmt, da dieser Farbstoff von P-Glykoprotein aktiv aus der Zelle transportiert wird [7].

Für den Versuch wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit 200 ng/ml Rhodamin-123 für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  und in Dunkelheit beladen. Anschließend wurden die Zellen entweder mit oder ohne 20  $\mu\text{g}$  Verapamil, das als P-Glykoprotein-Inhibitor wirkt, weiterhin in Dunkelheit behandelt. Dabei transportieren die Zellen bei vorhandener P-gp-Aktivität den Farbstoff Rhodamin-123 aktiv aus der Zelle und verlieren somit an Fluoreszenz-Intensität. Mit Verapamil dagegen sollten die Zellen auf einem gleichbleibend hohen Fluoreszenzniveau bleiben. Nach 1 sowie 2 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Becton Dickinson FACSCalibur Durchflusszytometer die Fluoreszenzintensität gemessen. Der P-gp-Aktivitätsindex wurde aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensität mit und ohne P-gp-Inhibitor errechnet.

### 2.19 Reporter-Assay

Zur Bestimmung der transkriptionellen p53-Aktivität in U87MG-Zellen wurde ein Reporter-Assay (PathDetect® 219092), wie zuvor von Schmidt und Mitarbeitern beschrieben, verwendet [129].

## **2.20 Durchführung und Darstellung der Versuche**

Die Versuche wurden mindestens drei Mal durchgeführt. Wenn bei den einzelnen Versuchen nicht anders angegeben, sind die Daten als Mittelwerte (aus mindestens drei Messergebnissen) und den Standardabweichungen dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Modulation der Gliomzellproliferation unter Azidose

Da in vielen Tumoren extrazellulär Azidose auftritt, und dies häufig mit einem veränderten Tumorwachstum vergesellschaftet ist, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um die Auswirkungen von Azidose auf die Proliferation von Gliomzellen zu untersuchen.

In einer früheren Arbeit waren die Verdopplungsgeschwindigkeiten für die einzelnen Gliomzelllinien für U87MG auf 39 Stunden, für LNT-229 auf 24, für T98G auf 22 und für LN-18 auf 33 Stunden bestimmt worden [157].

Bei den Versuchen unter Azidose hatte ein Wechsel des Zellmedium-pH-Wertes auf 7,0 im untersuchten Zeitraum von 96 Stunden einen nur geringen Effekt auf das Wachstum der Zellen von T98G sowie LN-18. Im Gegensatz dazu war das Wachstum der Zelllinien U87MG und LNT-229 bei einem pH-Wert von 7,0 deutlich beeinträchtigt. Bis zu 48 Stunden nach Mediumwechsel ist diese Wachstumsbeschränkung von U87MG sowie LNT-229 noch nicht stark ausgeprägt, danach aber deutlich erkennbar.

Bei einem pH-Wert von 6,6 zeigte sich bei allen vier untersuchten Zelllinien eine deutliche Wachstumshemmung innerhalb des 96 Stunden Zeitfensters (Abb. 1 A-D).

Um die Hemmung der DNS-Synthese bei azidotischen extrazellulären pH-Werten nachzuweisen, wurde der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin in die Zellen der einzelnen Zelllinien bestimmt. Dabei war ein bei einem pH-Wert von 7,0 in den Zellen von U87MG sowie LNT-229 schon deutlich reduzierter, bei T98G wie auch LN-18 jedoch ähnlicher [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin-Einbau im Vergleich zum Einbau bei einem pH-Wert von 7,4 zu erkennen. Bei einem pH-Wert von 6,6 war bei U87MG wie auch LN-18 ein nur noch geringer, bei LNT-229 und T89G deutlich verminderter Einbau nachzuweisen (Abb. 1 E).

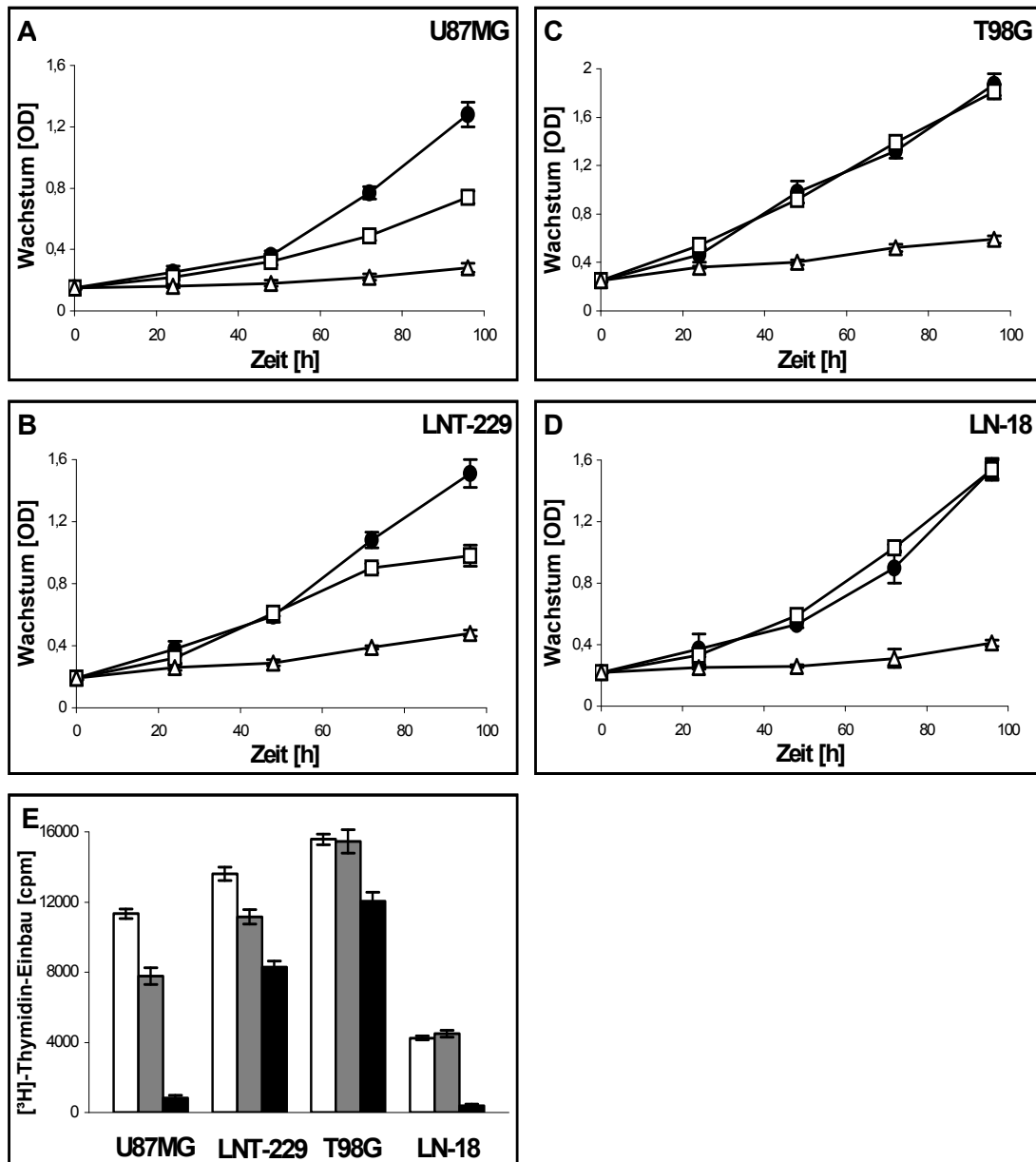


Abbildung 1 (A-E): Azidose moduliert das Wachstum von malignen Gliomzellen.

(A-D) Es wurden 5000 Zellen pro Kavität ausgesät. 24 Stunden nach Anwachsen in Medium mit einem physiologischen pH-Wert von 7,4 erfolgte ein Mediumwechsel mit pH 7,4 (Kontrolle; dunkle Kreise), pH 7,0 (offene Quadrate) oder pH 6,6 (offene Dreiecke). Das Wachstum wurde mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte der optischen Dichte und den Standardabweichungen dargestellt (h: Stunden; OD: optische Dichte).

(E) Um den  $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin-Einbau zu messen, wurden 5000 Zellen pro Kavität ausgesät. Nach 24 Stunden Anwachsen in einem Zellmedium mit einem pH-Wert von 7,4 erfolgte ein Mediumwechsel mit pH 7,4, 7,0 oder 6,6. Nach 56 Stunden wurde  $1 \mu\text{Ci}$   $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin hinzugegeben und der  $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin-Einbau nach Ablauf von weiteren 16 Stunden mittels eines *liquid scintillation counter* bestimmt. Dabei kennzeichnen die weißen Säulen Werte bei pH 7,4, die grauen Säulen Werte bei pH 7,0 und die schwarzen Säulen Werte bei pH 6,6. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt (cpm: counts per minute).

### 3 Ergebnisse

Zellzyklusanalysen an U87MG- und T98G-Zellen, die für 24, 48 oder 72 Stunden unter azidotischen Bedingungen gehalten wurden, ließen kein spezifisches Muster eines Zellzyklusarrestes erkennen (Abb. 2 A-C).

Somit war ein je nach Zelltypus und Ausmaß der extrazellulären Azidose verschieden auftretendes Wachstumsverhalten zu beobachten. Auffällig war dabei, dass Gliomzellen mit mutiertem p53 (T98G und LN-18) bei einem pH-Wert von 7,0 keine Wachstumshemmung erfuhren, wohingegen diese gering ausgeprägte Azidose das Wachstum von Wildtyp-p53-Zellen (U87MG und LNT-229) schon deutlich inhibierte.

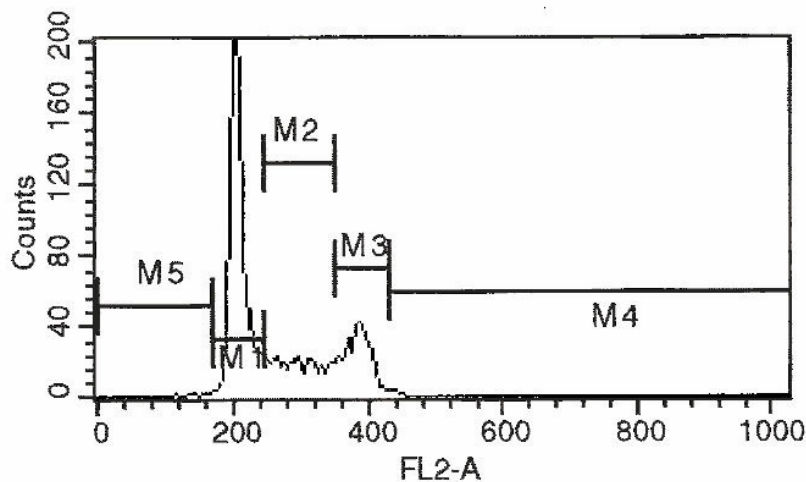
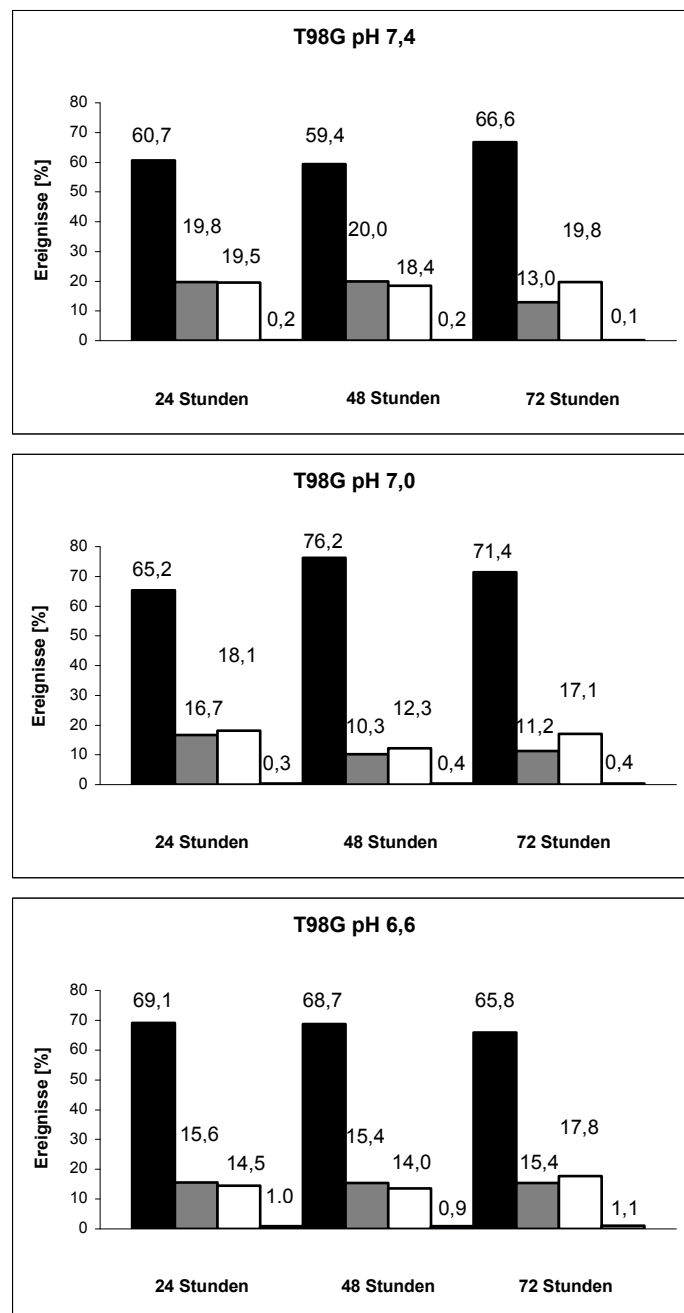


Abbildung 2 A: Beispiel der durchflusszytometrischen Zellzyklusbestimmung (M1: G0/G1-Phase; M2: S-Phase; M3: G2/M-Phase und M5: Sub-G1-Phase).

Abbildung 2 B und C: Zellzyklusanalysen der Zelllinien T98G (B) und U87MG (C). Die Zellen konnten nach Aussaat für 24 Stunden bei einem pH-Wert von 7,4 anwachsen, woraufhin ein Mediumwechsel auf pH-Werte von 6,6, 7,0 oder 7,4 erfolgte. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurde das Wachsen gestoppt und eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dabei kennzeichnen schwarze Säulen die G0/G1-Phase, die dunkelgrauen Säulen die S-Phase, die weißen Säulen die G2/M-Phase und die hellgrauen Säulen die Sub-G1-Phase; die auf der Y-Achse aufgezeigten Ereignisse sind „gegate“ und in Prozent dargestellt.

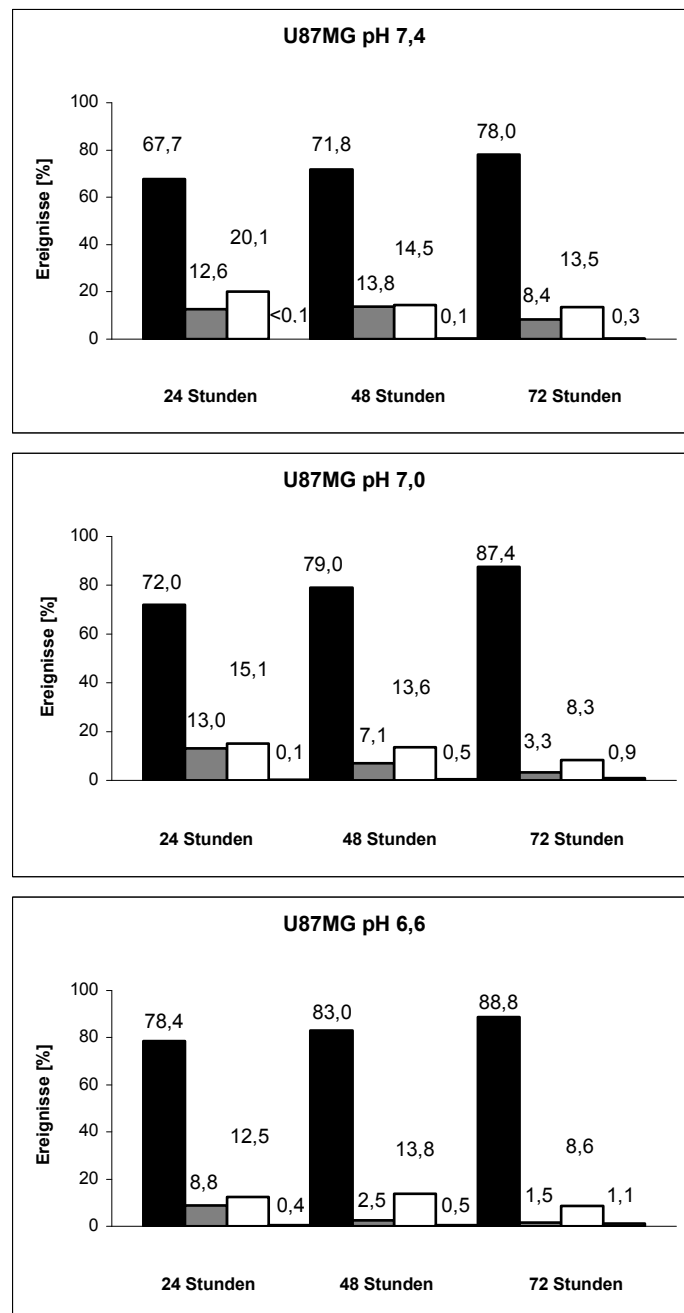
Abbildung 2 B: Zellzyklusbestimmung von T98G-Zellen unter Azidose.



### 3 Ergebnisse

---

Abbildung 2 C: Zellzyklusbestimmung von U87MG-Zellen unter Azidose.





### 3.2 Inhibition der Proliferation unter Azidose: Die Rolle von p53

Die in 3.1 dargestellten Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen bei Azidose legen die Vermutung nahe, dass Zellen mit einer p53-Mutation unter Azidose einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht mutierten (Wildtyp-p53) Zellen besitzen.

Daher wurde weiter untersucht, ob p53 die Wachstumshemmung bei Azidose in LNT-229- (Abb. 3 A-D) sowie in U87MG-Zellen (Abb. 4 A-E) mitverursacht.

Dazu wurden die Zellen mit temperatursensitivem, von der Maus stammenden p53<sup>V135A</sup> transfiziert. Dieses wirkt bei 38,5°C dominant-negativ. Die Expression von p53<sup>V135A</sup> wurde mittels Westernblot bestimmt, indem der Antikörper pAb240 verwendet wurde, der nur gering mit endogenem p53-Protein der untersuchten menschlichen Gliomzelllinien reagiert (Abb. 3 D und 4 A).

Dabei zeigten sowohl die Wachstumskurven der p53<sup>V135A</sup>-transfizierten Zellen als auch die der Kontroll-transfizierten Zellen unter Azidose eine deutliche Wachstumshemmung (Abb. 3 A und B, Abb. 4 E). Der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin wurde weiter in LNT-229-Zellen bestimmt, der in den p53<sup>V135A</sup>-transfizierten Zellen wie auch in den Kontroll-transfizierten Zellen unter Azidose ähnlich vermindert war (Abb. 3 C). Somit zeigte sich nach Transfektion von p53<sup>V135A</sup> keine Umgehung der Wachstumshemmung unter Azidose (Abb. 3 A-C, Abb. 4 E).

Ein p53-Reporter-Assay wies an U87MG-Zellen weiter nach, dass p53<sup>V135A</sup> die p53-Aktivität bei einem pH-Wert von 7,4, 7,0 sowie 6,6 deutlich unterdrückt. Ebenso war unter Azidose eine verminderte p53-Reporter-Aktivität in den Kontroll-transfizierten Zellen erkennbar (Abb. 4 B). Der Gehalt an p21-Protein war in p53<sup>V135A</sup>-transfizierten U87MG-Zellen vermindert und stieg unter Azidose in den Kontroll-transfizierten Zellen auch nicht an.

Somit kann mutiertes p53<sup>V135A</sup> den Azidose-vermittelten Wachstumsstopp in Wildtyp-p53-Zellen nicht überwinden. Damit wird die Aussage bekräftigt, dass Wildtyp-p53 nicht für den Azidose-vermittelten Wachstumsstopp in U87MG- und LNT-229-Zellen benötigt wird.

### 3 Ergebnisse

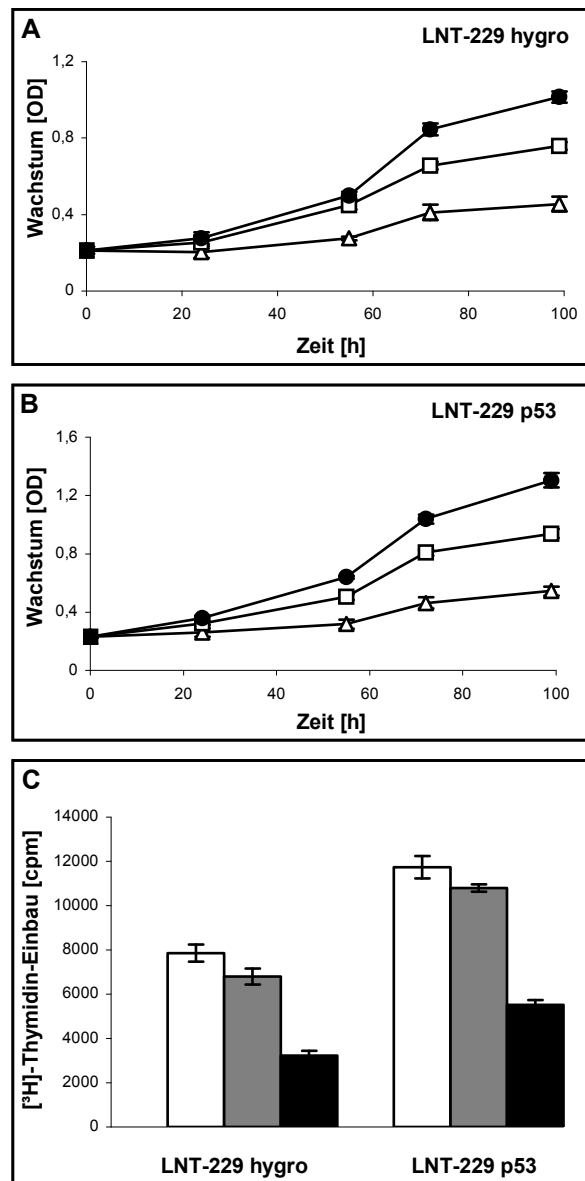


Abbildung 3 (A-C): Die Rolle von p53 bei der Proliferationshemmung von LNT-229-Zellen unter Azidose.

(A und B) Es wurden jeweils 5000 Zellen von LNT-229-Hygro-Kontrollzellen (hygro) und p53<sup>V135A</sup>-transfizierten Zellen (p53) pro Kavität ausgesät. 24 Stunden nach Anwachsen in Medium mit einem physiologischen pH-Wert von 7,4 erfolgte ein Mediumwechsel mit pH 7,4 (Kontrolle; dunkle Kreise), pH 7,0 (offene Quadrate) oder pH 6,6 (offene Dreiecke). Das Wachstum wurde mittels Kristallviolettffärbung bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte der optischen Dichte und den Standardabweichungen dargestellt (OD: optische Dichte; h: Stunden). (C) Der [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin-Einbau wurde bestimmt, indem nach 56 Stunden 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin hinzugegeben und der [<sup>3</sup>H]-Methylthymidin-Einbau nach Ablauf von weiteren 16 Stunden mittels eines *liquid scintillation counter* gemessen wurde (offene Säulen, pH 7,4; graue Säulen, pH 7,0; schwarze Säulen, pH 6,6). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt (cpm: counts per minute).

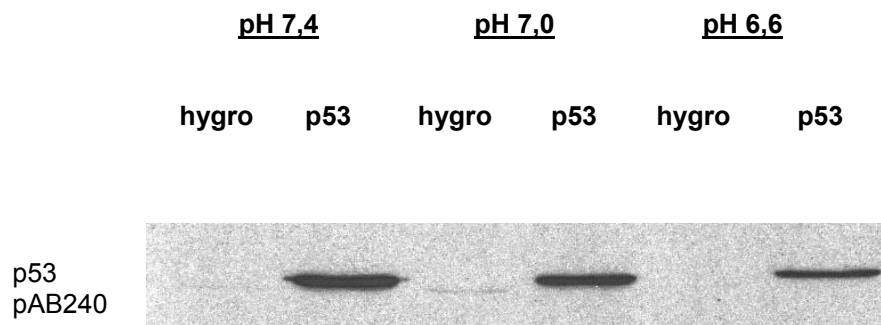


Abbildung 3 D: Die Rolle von p53 bei der Proliferationshemmung von LNT-229-Zellen unter Azidose.

LNT-229 Hygro-Kontrollzellen (hygro) und p53<sup>V135A</sup>-transfizierte Zellen (p53) wurden jeweils für 48 Stunden bei einem pH-Wert von 7,4, 7,0 oder 6,6 gehalten. Die transgene Expression wurde mittels Westernblotanalyse mit Verwendung des p53-Antikörpers 240 (pAB240) bestimmt.

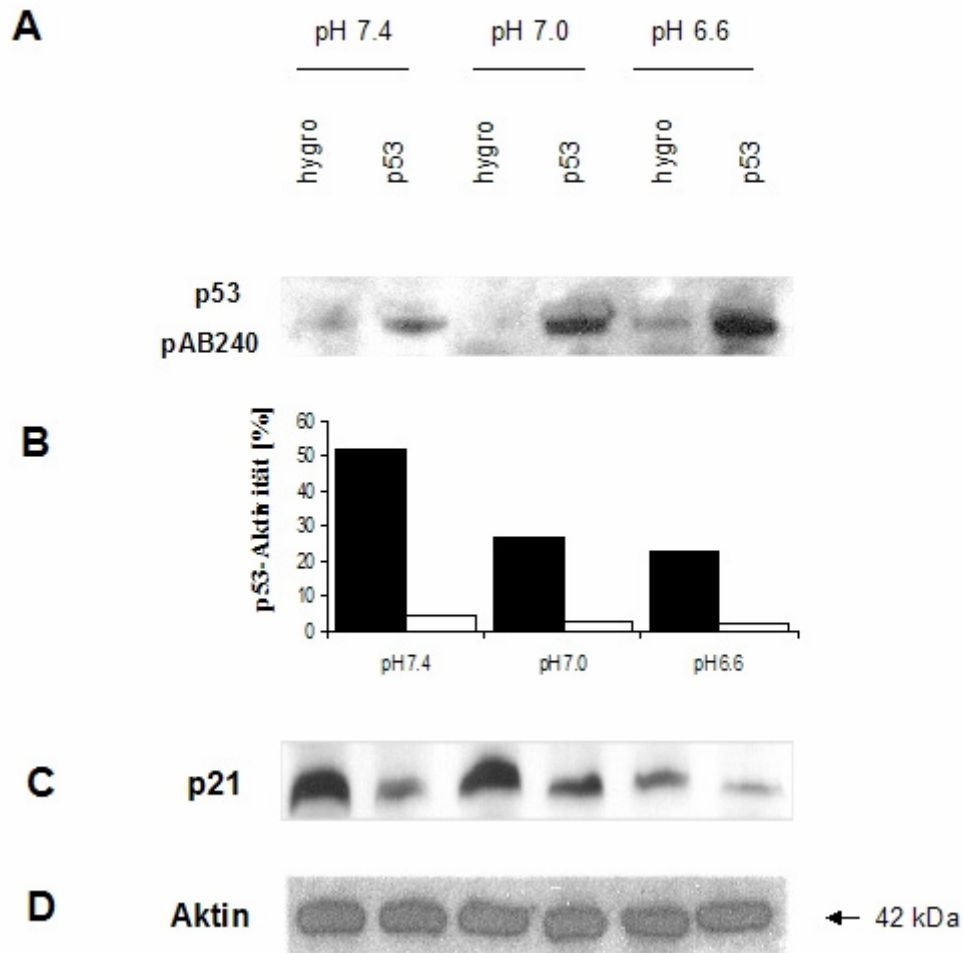


Abbildung 4 (A-D): Die Rolle von p53 bei der Proliferationshemmung von U87MG-Zellen unter Azidose.

(A) U87MG Hygro-Kontrollzellen (hygro) und p53<sup>V135A</sup>-transfizierte Zellen (p53) wurden jeweils für 48 Stunden bei einem pH-Wert von 7,4, 7,0 oder 6,6 gehalten. Die transgene Expression wurde mittels Westernblotanalyse mit Verwendung des p53-Antikörpers 240 (pAB240) bestimmt.

(B) Die Aktivität von p53 wurde mit einem Reporter-Assay ermittelt (schwarze Säulen: hygro; weiße Säulen: p53; siehe Beschriftung in (A)).

(C, D) Lösliche Zellysate wurden für die Bestimmung des Gehaltes an p21 (C) und Aktin (D) verwendet (kDa: Kilodalton).

Die Beschriftung in (A) gilt für die gesamte Abbildung.

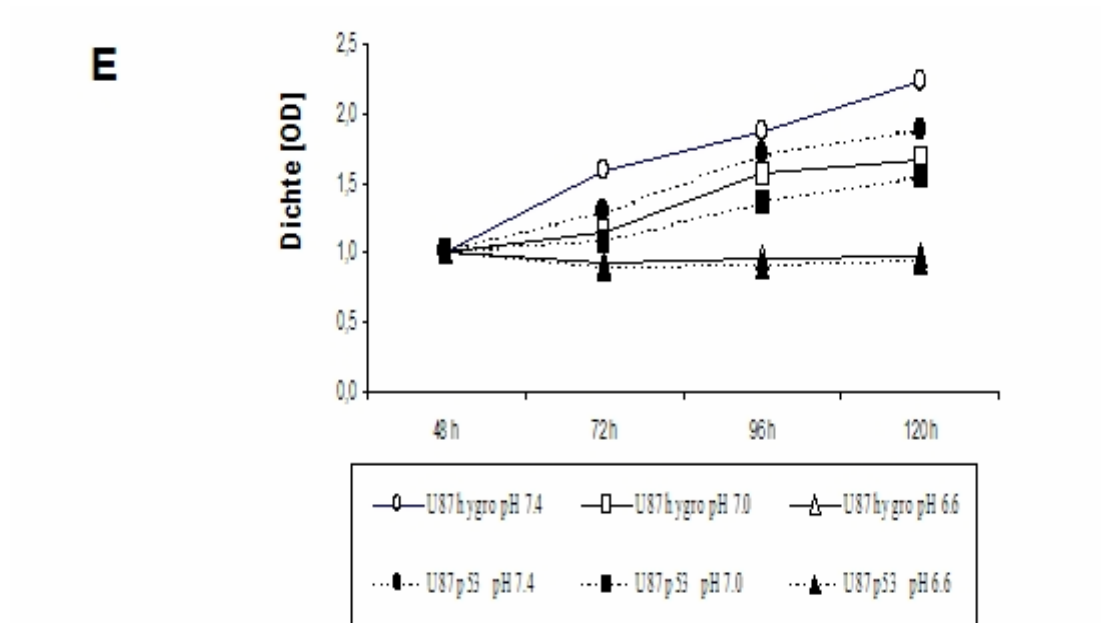


Abbildung 4 E: Die Rolle von p53 bei der Proliferationshemmung von U87MG-Zellen unter Azidose.

Das Wachstum der Hygro-Kontrollzellen (offene Symbole) sowie der p53<sup>V135A</sup>-transfizierten Zellen (dunkle Symbole) wurde bei einem pH-Wert von 7,4 (Kreise), pH 7,0 (Quadrate) oder pH 6,6 (Dreiecke) bestimmt. Dazu wurden 5000 Zellen pro Kavität ausgesät. 24 Stunden nach Anwachsen in Medium mit einem physiologischen pH-Wert von 7,4 erfolgte ein Mediumwechsel mit pH 7,4, pH 7,0 oder pH 6,6. Das Wachstum wurde mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte der optischen Dichte und den Standardabweichungen dargestellt (h: Stunden; OD: optische Dichte; Standardabweichungen < 10 %; aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt).

### **3.3 Modulation der Bestrahlungssensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose**

Zur Untersuchung der Bestrahlungssensitivität der einzelnen Zelllinien unter verschiedenen pH-Werten wurde ein Versuchsaufbau mit Kolonienbildung verwendet. Aufgrund der dabei offensichtlich verringerten Fähigkeit der Zelllinie U87MG zur Kolonienbildung unter Azidose wurde dieser Versuch nur mit den Zelllinien LNT-229, T98G und LN-18 durchgeführt (Abb. 5). Dabei zeigte sich eine verstärkte Kolonienbildung bei einem pH-Wert von 6,6 wie auch 7,0 in unbestrahlten LNT-229- und T98G-Zellen. Bei LN-18-Zellen war die Kolonienbildung unter diesen Bedingungen vermindert. Bei milder Azidose (pH 7,0) war die relative Radiosensitivität der Zellen von LNT-229 und T98G kaum beeinflusst, wohingegen LN-18-Zellen sowohl bei milder wie auch stärkerer Azidose (pH 6,6 und 7,0) deutlich radiosensitiver waren. Bei einem pH-Wert von 6,6 waren die T98G-Zellen resistenter, LNT-229-Zellen hingegen wie LN-18-Zellen sensitiver gegenüber Bestrahlung (Abb. 5).

Somit zeigte sich ein uneinheitliches Muster zwischen den untersuchten Zelllinien. Auch ließ sich bei Bestrahlung unter Azidose bei den p53-mutierten Zelllinien kein ähnliches Verhalten feststellen. Es sind hiermit keine sicheren Schlussfolgerungen hinsichtlich der Modulation der Bestrahlungssensitivität möglich.

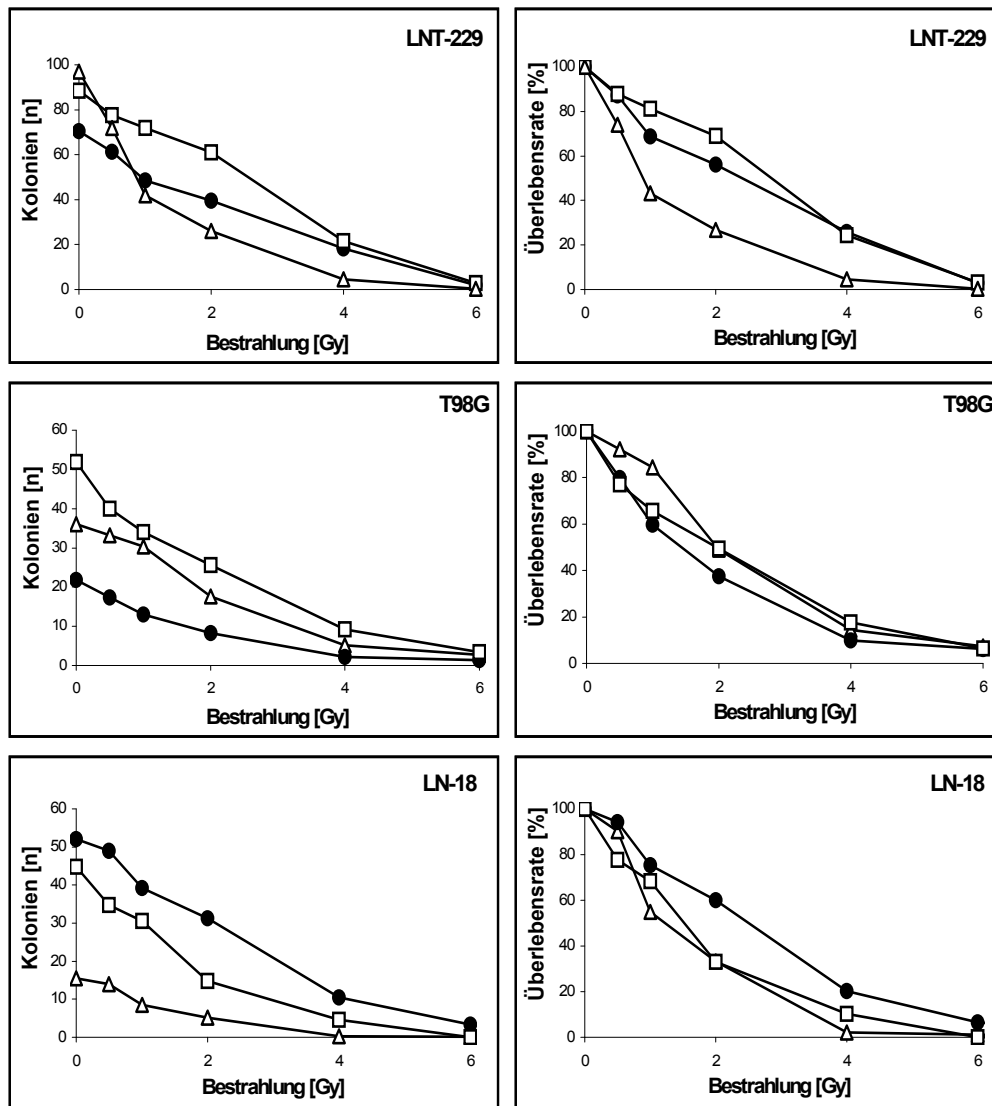


Abbildung 5: Modulation der Bestrahlungssensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose. Die Zellen wurden für 24 Stunden an den jeweiligen extrazellulären pH-Wert der Zellmedien adaptiert, bevor sie einer Bestrahlung mit 0 bis 6 Gray unterzogen wurden. Danach wurden die Zellen für weitere 48 Stunden unter dem jeweiligen pH-Wert belassen, um dann nach einem Mediumwechsel bei einem pH-Wert von 7,4 wachsen zu können. Bei auftretender Kolonienbildung in den unbestrahlten Kontrollkulturen wurde der Versuch abgestoppt. Die Daten sind als Mittelwerte der Kolonien (linke Abbildung) und auf die Werte der nichtbestrahlten Kontrollkulturen bezogen dargestellt (rechte Abbildung); (pH 7,4: dunkle Kreise; pH 7,0 offene Quadrate; pH 6,6 offene Dreiecke; n: Anzahl; Gy: Gray).

### **3.4 Modulation der Chemosensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose**

Da Glioblastome im Allgemeinen wenig auf eine Chemotherapie ansprechen, wurde im nächsten Schritt der Einfluss von extrazellulärer Azidose auf die Chemosensitivität maligner Gliomzellen untersucht.

Die hieraus folgenden Ergebnisse sind im Gegensatz zu den Ergebnissen der Versuche zur Bestrahlungssensitivität zwischen den verschiedenen Zelllinien relativ einheitlich (Abb. 6 A und B).

Die Zytotoxizität von Lomustin bei extrazellulärer Azidose war bei allen Zelllinien beachtlich verstärkt, wobei die Zytotoxizität bei einem pH-Wert von 6,6 bei allen Zelllinien stärker ausgeprägt war als bei einem pH-Wert von 7,0.

Im Gegensatz dazu war bei Cisplatin, Gemcitabin, Teniposid, Temozolomid und Vincristin bei extrazellulärer Azidose in allen Zelllinien eine Resistenz zu beobachten. Je stärker ausgeprägt die Azidose war, umso geringer war die Ansprechrate auf die Chemotherapeutika.

Bei Topotecan zeigte sich bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,0 in T98G- und LN-18-Zellen, beides Zelllinien mit mutiertem p53, eine geringe Sensibilisierung, wohingegen bei LNT-229- und U87MG-Zellen, beides Wildtyp-p53-Zelllinien, keine verstärkte Wirkung erzielt wurde. Eine höhergradige extrazelluläre Azidose (pH 6,6) führte jedoch in allen Zelllinien zu Resistenz.

Somit tritt bei Lomustin als einzigem der untersuchten Wirkstoffe unter Azidose bei allen Zelllinien eine verstärkte Wirkung auf.

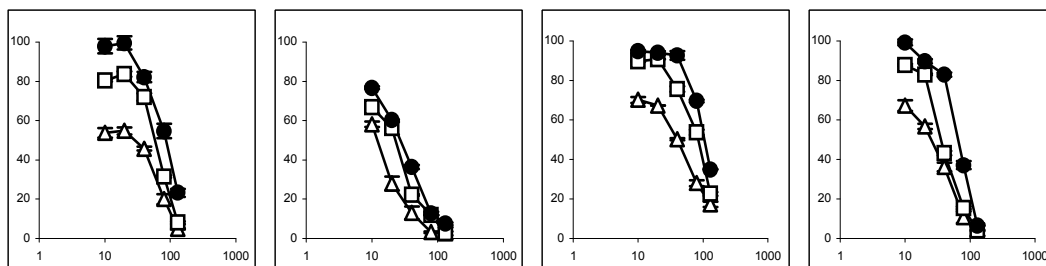


Abbildung 6 A und B: Chemotherapeutika-induzierter Zelltod von humanen Gliomzellen unter Azidose.

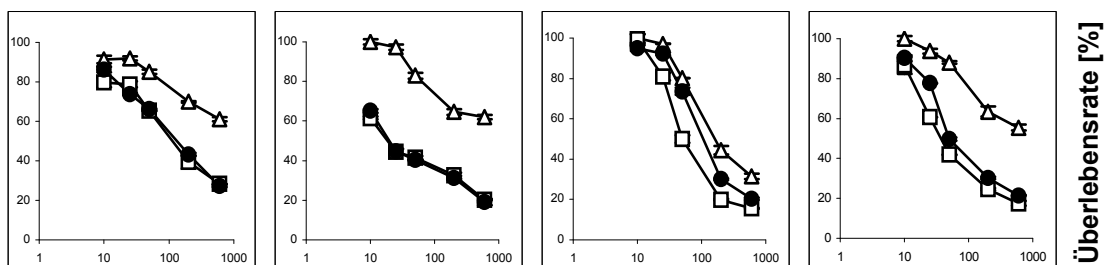
Nach 24-stündigem Anwachsen der Zellen (5000 pro well) bei einem pH-Wert von 7,4 erfolgte ein Mediumwechsel und für 24 Stunden eine Adaptation bei einem pH-Wert von 6,6 (offene Dreiecke), 7,0 (offene Quadrate) oder 7,4 (dunkle Kreise). Nach der dann erfolgten Wirkstoffgabe unter dem jeweils gleichbleibenden pH-Wert wurden diese für weitere 72 Stunden belassen. Die Überlebensrate wurde anschließend mit Kristallviolett färbung gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte der Überlebensrate der Zellen und den Standardabweichungen dargestellt. Dabei sind einige Standardabweichungen zu klein, um in der Abbildung sichtbar zu sein (X-Achse: Wirkstoffe [Konzentrationseinheit]; Y-Achse: Überlebensrate [%]).

Abbildung 6 A: Chemosensitivität von Lomustin, Topotecan und Temozolomid unter Azidose.

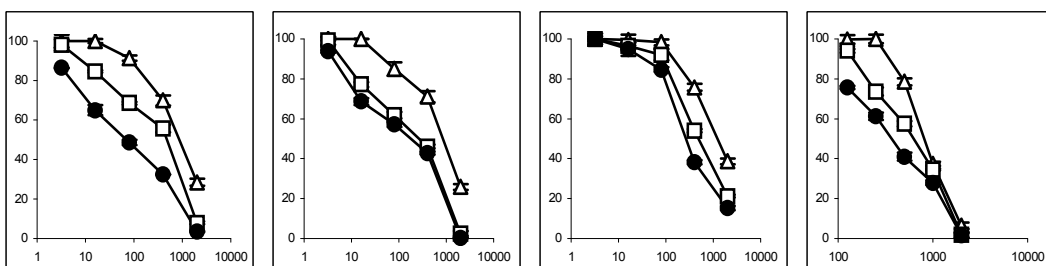
**Lomustin [ $\mu\text{M}$ ]**



**Topotecan [nM]**



**Temozolomid [ $\mu\text{M}$ ]**



**U87MG**

**LNT-229**

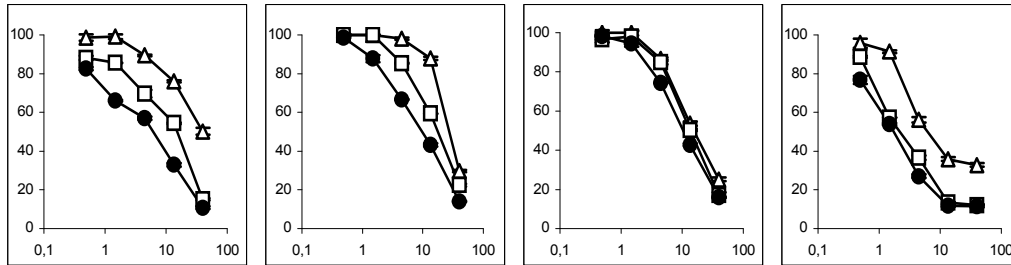
**T98G**

**LN-18**

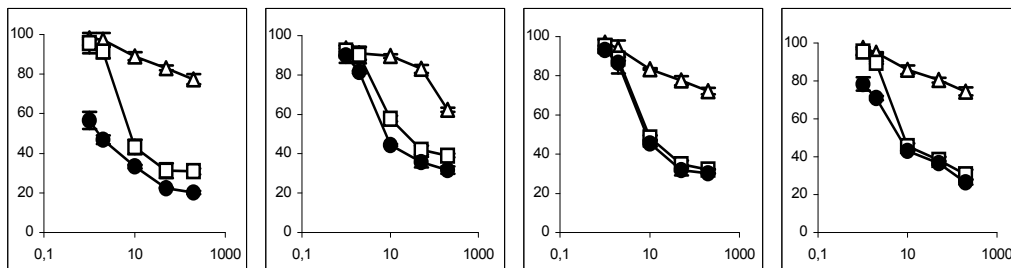
### 3 Ergebnisse

Abbildung 6 B: Resistenz gegenüber Cisplatin, Gemcitabin, Teniposid und Vincristin unter Azidose.

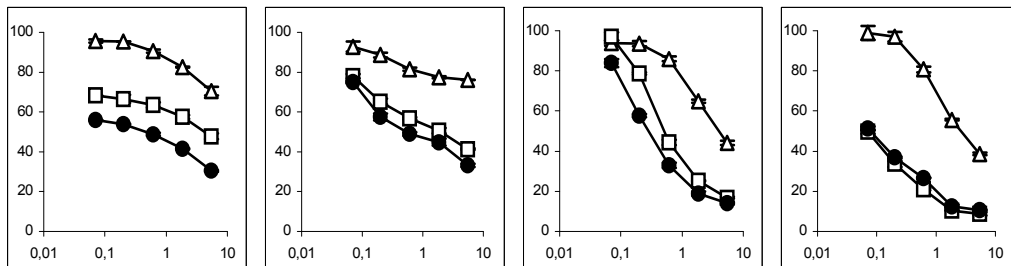
#### Cisplatin [ $\mu\text{M}$ ]



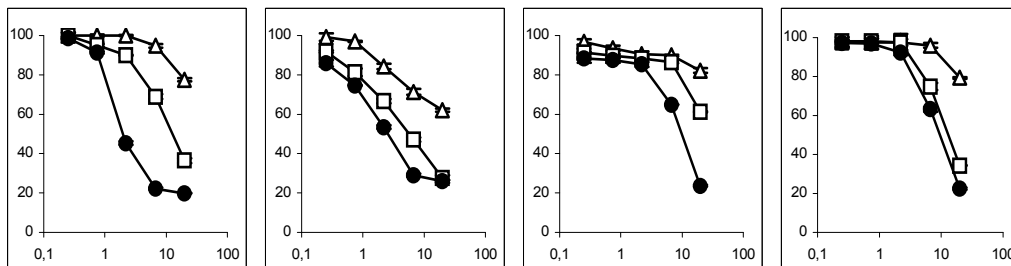
#### Gemcitabin [nM]



#### Teniposid [ $\mu\text{M}$ ]



#### Vincristin [nM]



Überlebensrate [%]

U87MG

LNT-229

T98G

LN-18

---

### **3.5 Verstärkte Lomustinwirkung unter Azidose ist mit einer erhöhten Stabilität dieses Wirkstoffes bei niedrigen pH-Werten verbunden**

Auf der Suche nach einem der Mechanismen einer verstärkten oder verminderten Wirksamkeit der Chemotherapeutika unter Azidose wurde die Stabilität der einzelnen Wirkstoffe untersucht. Dazu wurden diese jeweils in Medien mit einem pH-Wert von 6,6 oder 7,4 für eine bestimmte Zeitdauer (0 bis 29 Stunden) belassen und anschließend zu Gliomzellkulturen hinzugefügt, um ihre verbleibende zytotoxische Wirkung zu messen. Dabei zeigte Lomustin eine bleibende biologische Aktivität unter azidotischen Bedingungen, wohingegen diese bei einem pH-Wert von 7,4 deutlich nachließ (Abb. 7 A).

Ein solcher Effekt konnte für Cisplatin, Gemcitabin, Teniposid, Topotecan, Temozolomid und Vincristin nicht nachgewiesen werden (Abb. 7 B).

Die verstärkte Wirksamkeit von Lomustin unter Azidose kann folglich unter anderem durch eine erhöhte Stabilität bei niedrigen pH-Werten erklärt werden. Bei den anderen untersuchten Wirkstoffen zeigte sich keine veränderte Stabilität unter Azidose. Somit scheint die Stabilität dieser Wirkstoffe keine Rolle bei der unter Azidose veränderten Wirksamkeit, zumeist Resistenz, zu spielen.

### 3 Ergebnisse

---

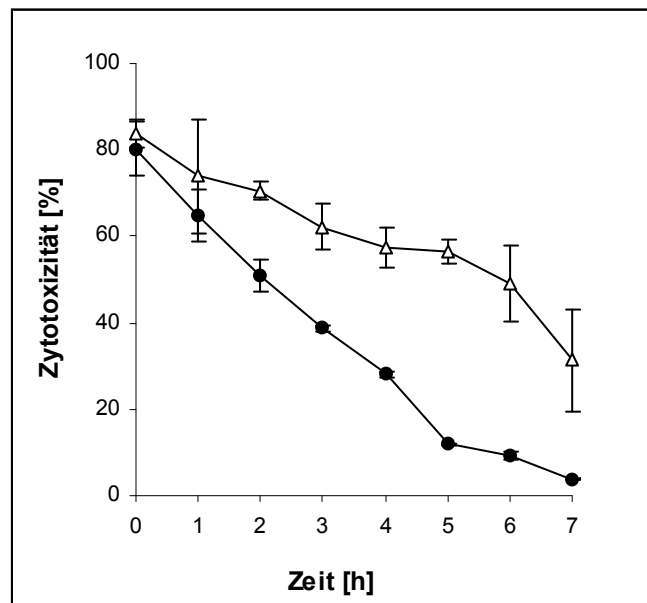


Abbildung 7 A: Azidose erhält die zytotoxische Aktivität von Lomustin.

Lomustin wurde für 0 bis 7 Stunden in einem zellfreien Zellmedium mit einem pH-Wert von entweder 6,6 (offene Dreiecke) oder 7,4 (dunkle Kreise) belassen. Danach wurden diese jeweils zu Zellkulturen von LNT-229 unter Beibehaltung eines pH-Wertes von 7,4 hinzugegeben, und die Zytotoxizität nach weiteren 72 Stunden mittels Kristallviolett färbung gemessen (h: Stunden). Der gleiche Versuchsaufbau wurde mit den anderen Chemotherapeutika durchgeführt (Abbildung 7 B; bei dieser Darstellung wurden die Werte von pH 6,6 bezogen auf die jeweilige Referenz von pH 7,4 (gleich 100%) dargestellt).

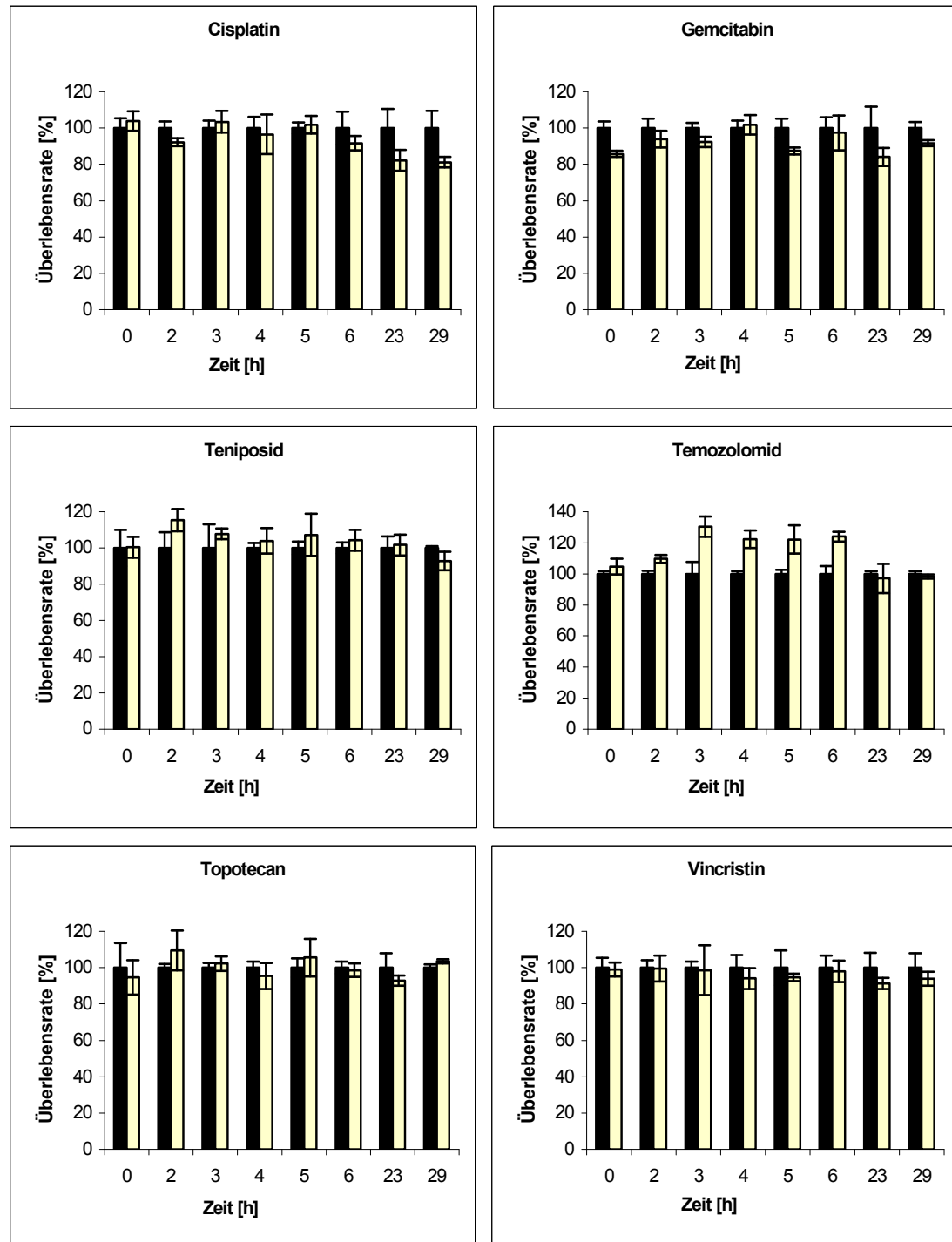


Abbildung 7 B: Unveränderte biologische Aktivität von Cisplatin, Gemcitabin, Teniposid, Temozolomid, Topotecan und Vincristin unter Azidose.

### 3.6 *Multidrug resistance*-Transporter unter Azidose

#### 3.6.1 Unveränderte P-Glykoprotein (P-gp)-Aktivität unter Azidose

Da auch bei Behandlung mit Vincristin und Teniposid, beides klassische MDR-Substrate, eine verstärkte Resistenz unter Azidose auftrat, wurde die MDR-Aktivität bestimmt, indem quantitativ die Aufnahme eines MDR-abhängig transportierten Farbstoffes bestimmt wurde. Dabei wurde der Rhodamin-123-Transport zur Quantifizierung der P-Glykoprotein (P-gp)-Aktivität verwendet (Abb. 8 und 9). Diese Versuche wurden an U87MG-, LNT-229-, T98G- und LN-18-Zellen durchgeführt (Abb. 9). Dabei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der P-gp-Aktivität unter Azidose im Vergleich zur Aktivität unter physiologischen pH-Werten, so dass dies bei den hier untersuchten Zelllinien nicht als Resistenzmechanismus unter Azidose angesehen werden kann.

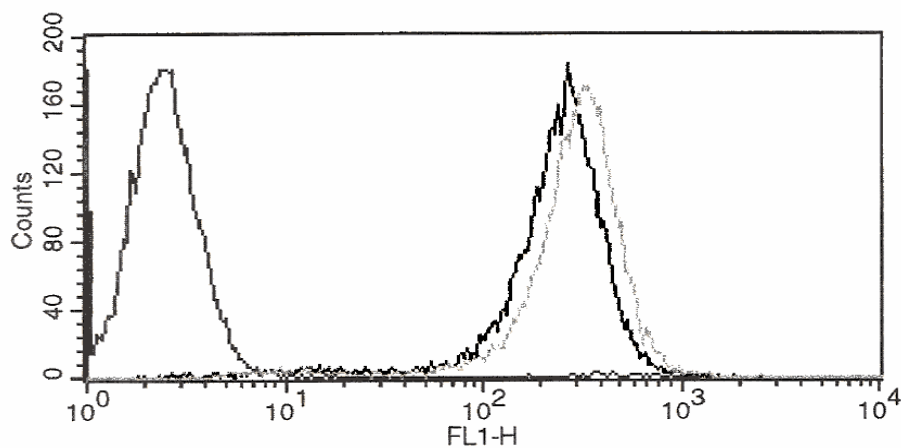


Abbildung 8: Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse des Rhodamin-Transports. (Kurve links stellt die ungefärbten Kontrollzellen dar; die mittlere Kurve die gefärbten Zellen ohne Verapamil; die rechte graue Kurve die gefärbten Zellen mit Verapamil; hier am Beispiel der Zelllinie U87MG bei pH 6,6).

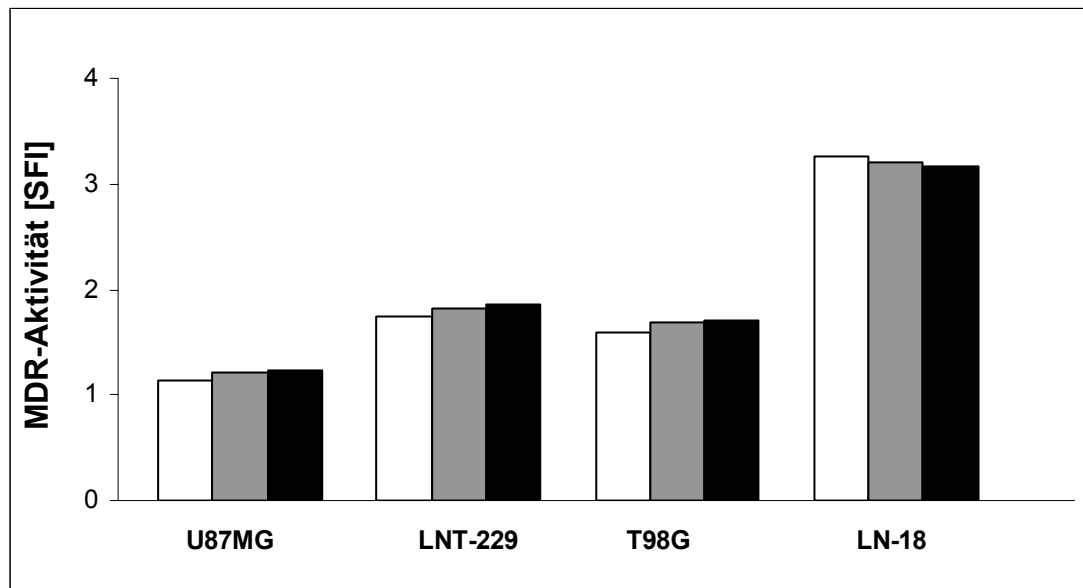


Abbildung 9: P-gp-Aktivitäts-Messung mittels Rhodamin-123-Transport. Die SFI (spezifische Fluoreszenzindex)-Werte (siehe Abschnitt „2 Material und Methoden“) sind jeweils für die einzelnen Zelllinien und pH-Werte als Säulen dargestellt. Dabei kennzeichnen offene Säulen die Werte bei pH 7,4, die grauen Säulen Werte bei pH 7,0 und die schwarzen Säulen Werte bei pH 6,6.

### 3.6.2 Modulation der Zytotoxizität von Vincristin durch Verapamil unter Azidose

Um die direkte Wirkung von Verapamil auf die Zytotoxizität von Vincristin unter extrazellulärer Azidose zu untersuchen, wurde als nächster Schritt ein Zytotoxizitäts-Assay mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt (Abb. 10). Dabei zeigte sich ein von Azidose unabhängiger Verapamil-Effekt. Dies kann unter anderem mit der in 3.6.1 beschriebenen quasi unveränderten P-gp-Aktivität unter Azidose im Vergleich zu physiologischen pH-Werten erklärt werden. Somit kann von keiner verstärkten Wirkung von Verapamil auf azidotische Tumoranteile ausgegangen werden.

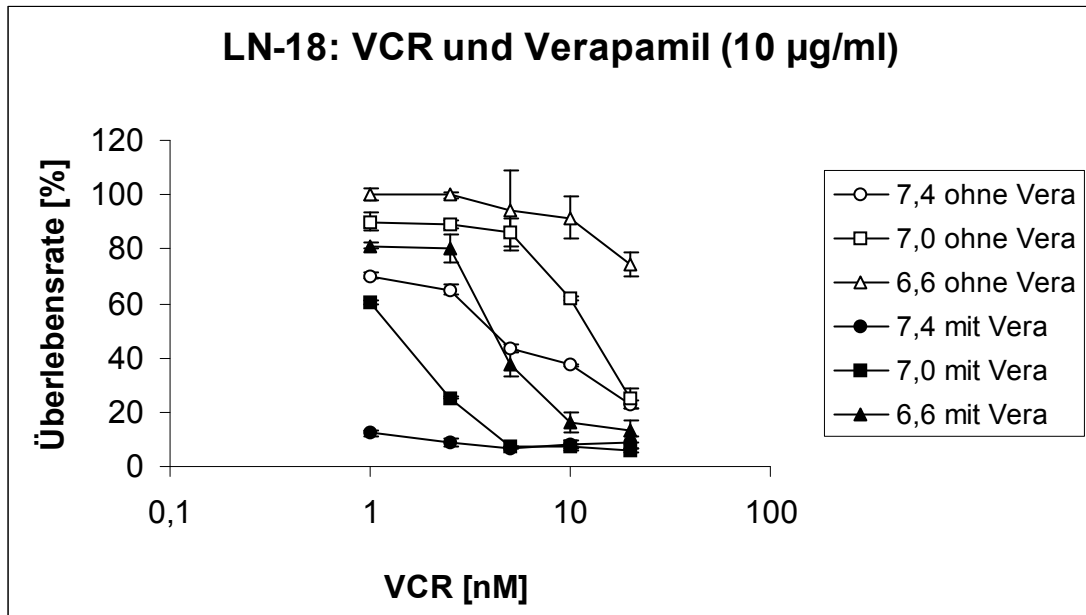


Abbildung 10: Modulation der Zytotoxizität von Vincristin durch Verapamil unter Azidose. Die Zellen (5000 Zellen pro well der Zelllinie LN-18) konnten nach dem Aussäen für 24 Stunden in Medium mit einem physiologischen pH-Wert anwachsen. Danach erfolgte ein Mediumwechsel und für 24 Stunden eine Adaptation bei einem pH-Wert von 6,6 (offene Dreiecke), 7,0 (offene Quadrate) oder 7,4 (dunkle Kreise). Nach der dann erfolgten zeitgleichen Vincristin (VCR)- und Verapamilgabe (10 µg/ml) unter dem jeweils gleichbleibenden pH-Wert wurden diese für weitere 72 Stunden belassen. Die Überlebensrate wurde anschließend mit Kristallviolettffärbung gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte der Überlebensrate der Zellen und den Standardabweichungen dargestellt (VCR: Vincristin; Vera: Verapamil).



---

### **3.7 Modulation der Chemosensitivität von humanen Gliomzellen unter Hypoxie**

Da Hypoxie häufig - mit oder ohne Azidose verbunden - in soliden Tumoren eine Veränderung der Chemosensitivität bewirkt, wurde als nächstes deren Wirkung an malignen Gliomzellen untersucht. Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Wirkstoffen (Lomustin, Cisplatin, Gemcitabin, Teniposid, Topotecan und Vincristin) eine Resistenz unter Hypoxie (Abb. 11 A und B). Wie im Abschnitt „2 Material und Methoden“ beschrieben, kam es bei diesem Versuchsaufbau zwischenzeitlich zu einer Sauerstoffzufuhr; weiter ist eine zusätzliche Azidose anzunehmen, da keine Puffersysteme eingesetzt wurden. Diese Kombination aus Hypoxie, Azidose und Reoxygenierung kann in soliden Tumoren durch kollabierende und sich wieder öffnende pathologische Gefäße durchaus auftreten. Somit ist Hypoxie als ein weiterer wichtiger Faktor der Chemoresistenz in malignen Gliomen anzusehen.

### 3 Ergebnisse

Abbildung 11 A und B: Chemoresistenz unter Hypoxie.

Es wurden 5000 Gliomzellen pro Kavität einer 96-well-Platte ausgesät, die für 24 Stunden in DMEM mit 5%FCS anwachsen konnten. Dem folgte eine 24-stündige Adaptation an Hypoxie (1% Sauerstoff, 99% Stickoxid) in einem C42-Inkubator der Firma Labotect (Göttingen). Danach erfolgte die Behandlung mit den Chemotherapeutika und die Beendigung des Versuches nach 72 Stunden mittels Kristallviolett-färbung. Die gleiche Prozedur nur komplett unter Normoxie erfuhren die Kontrollzellen (Hypoxie: offene Dreiecke; Normoxie: dunkle Kreise). Die Daten sind als Mittelwerte der Überlebensrate der Zellen und den Standardabweichungen dargestellt.

Abbildung 11 A: Resistenz gegenüber Lomustin (CCNU), Cisplatin und Gemcitabin unter Hypoxie.

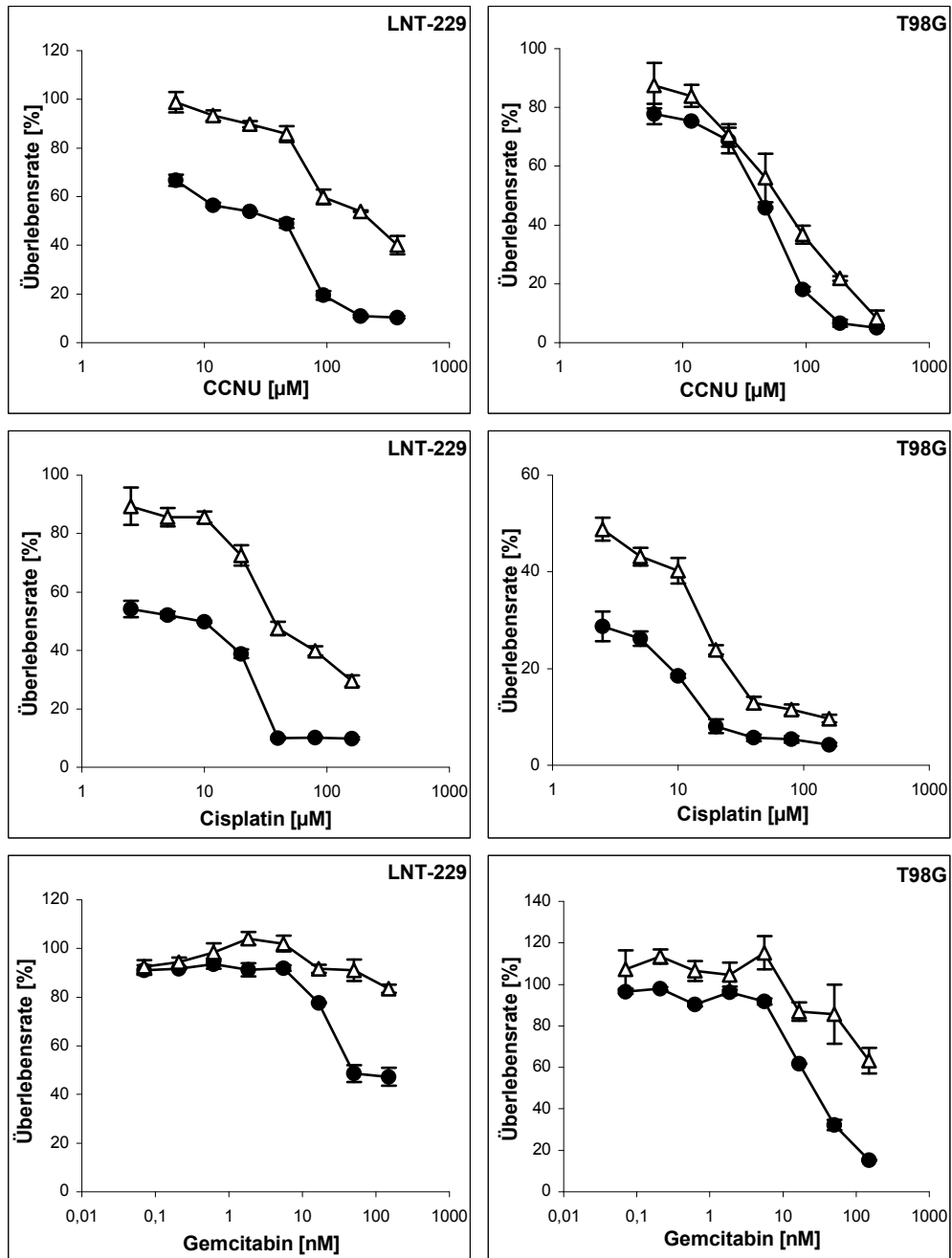
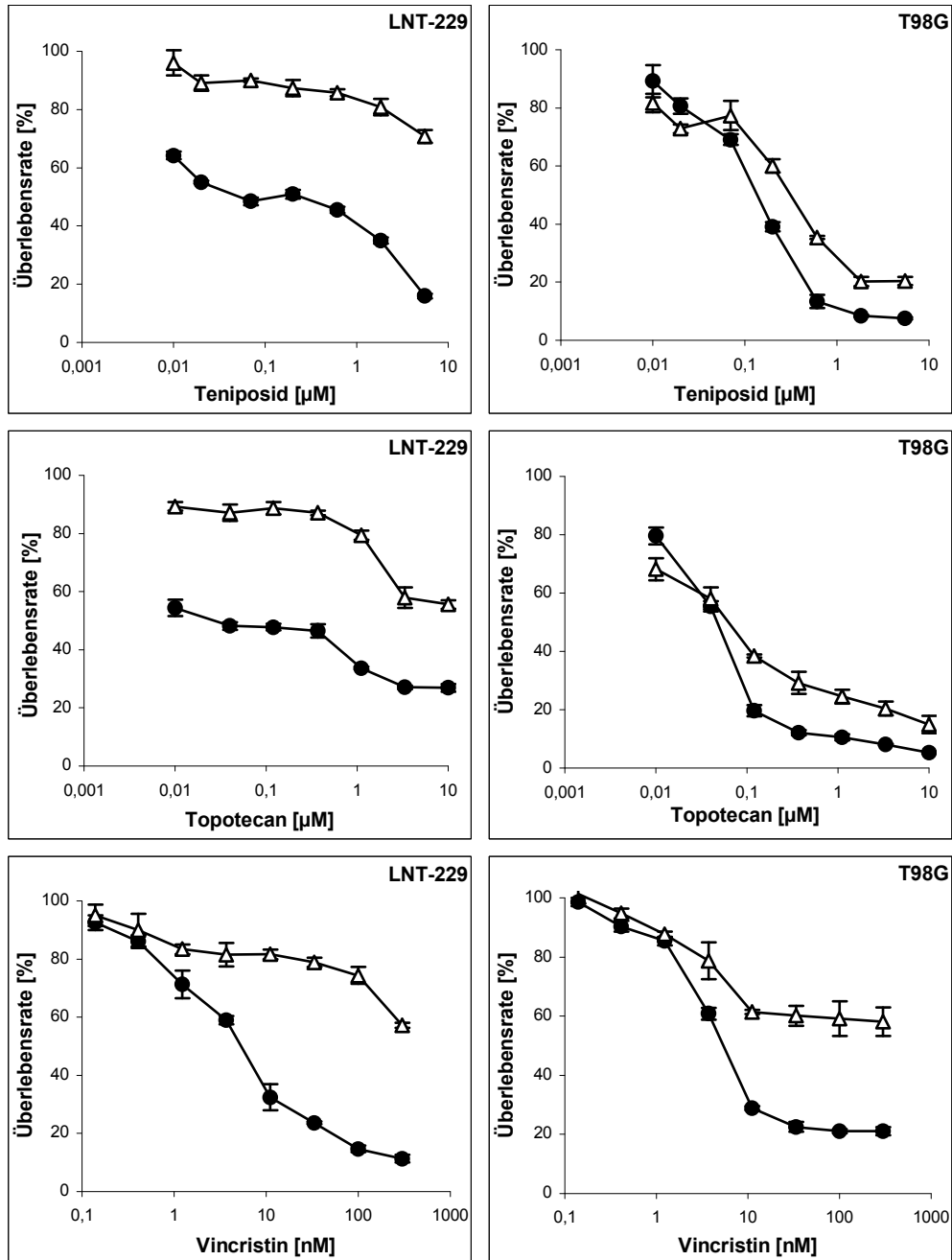


Abbildung 11 B: Resistenz gegenüber Teniposid, Topotecan und Vincristin unter Hypoxie.



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Wirkung von Azidose auf die Proliferation maligner Gliomzellen untersucht. Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob dabei p53 eine Rolle spielt. Außerdem wurde der Effekt der Azidose auf die Strahlen- und Chemosensitivität sowie von Hypoxie auf die Chemosensitivität maligner Gliomzellen bestimmt. Zusätzlich wurden die Stabilität verschiedener Chemotherapeutika unter azidotischen Bedingungen sowie der Einfluss von Azidose auf die MDR/P-Glykoprotein-Aktivität gemessen.

### 4.1 Modulation der Gliomzellproliferation unter Azidose

Als erstes wurde die Veränderung des Wachstumsverhaltens von Gliomzellen unter Azidose untersucht. Dabei war bei milder Azidose (pH 7,0) eine Wachstumshemmung bei Zellen mit Wildtyp-p53 (U87MG und LNT-229) erkennbar, wohingegen Zellen mit mutiertem p53 (T98G und LN-18) keine Veränderung ihres Wachstumsverhaltens aufwiesen. Bei starker Azidose (pH 6,6) wurde das Wachstum aller Zellen gehemmt (Abb. 1). Die Wachstumshemmung war mit keinem spezifischen Zellzyklusarrest verbunden (Abb. 2).

Somit ließ sich zeigen, dass die Proliferation von Gliomzellen durch Azidose beeinflusst wird.

Diese Beeinflussung fällt je nach Zelltyp verschieden aus. Woher diese unterschiedlichen Reaktionen des Wachstums unter Azidose herrühren, ist unklar. Die Gruppe um Garcia-Canero untersuchte unter physiologischen pH-Werten die Auswirkungen einer Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausches, der für die intrazelluläre pH-Regulation von Bedeutung ist. Dadurch wurde eine intrazelluläre Azidose und ein vermindertes Zellwachstum von hepatozellulären Karzinomen verursacht [43]. Somit scheint unter anderem die intrazelluläre pH-Regulation beim Zellwachstum eine Rolle zu spielen. Dabei sind Zellen mit

---

einem weniger ausgeprägten Regulationssystem wahrscheinlich unter Azidose im Nachteil.

#### 4.2 Inhibition der Proliferation unter Azidose: Die Rolle von p53

Da das Wachstum von Zellen mit Wildtyp-p53 unter Azidose stärker gehemmt wurde als das von Zellen ohne Wildtyp-p53, wurde als nächster Schritt die Bedeutung von p53 für die Proliferation unter Azidose untersucht (Abb. 3 und 4).

Dabei zeigte sich nach Transfektion von p53<sup>V135A</sup> weiter eine Wachstumshemmung von LNT-229- und U87MG-Zellen unter Azidose (Abb. 3 A-C; Abb. 4 E). Weiter wurde sichtbar, dass der Gehalt an p21-Protein in p53<sup>V135A</sup>-transfizierten U87MG-Zellen nach 48-stündiger Azidose vermindert war und unter Azidose in den Kontroll-transfizierten Zellen auch nicht anstieg. Somit scheint Wildtyp-p53 nicht direkt verantwortlich für das verminderte Wachstum von LNT-229- und U87MG-Zellen unter Azidose zu sein.

In einer von Ohtsubo und Mitarbeitern 1997 veröffentlichten Arbeit wurde im Gegensatz hierzu eine unter Azidose auftretende p53-abhängige Induktion von p21 in der humanen Glioblastomzelllinie A172 beschrieben [113]. Dabei war die Proteinmenge von p53 und p21 nach sechs- bis 24-stündiger Behandlung mit Azidose bestimmt worden. Nach 24-stündiger Azidose erreichte p53 wieder seinen Ausgangswert; p21 sank nach einem *peak* bei 12 Stunden wieder ab. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Messungen einmalig nach 48 Stunden Azidose durchgeführt. Somit ist unklar, was bei kürzerer Azidosebehandlung geschieht.

### **4.3 Modulation der Bestrahlungssensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose**

Um die Bedeutung von Azidose auf die bestehenden Therapieoptionen zu beleuchten, wurde als nächstes die Veränderung der Wirkung von Bestrahlung unter Azidose untersucht.

Dabei waren die Ergebnisse in den untersuchten drei Zelllinien (LNT-229, LN-18, T98G) komplex und zeigten kein einheitliches Muster (Abb. 5). Infolgedessen sind keine klaren Schlussfolgerungen zur Rolle von Azidose auf eine Strahlentherapie *in vivo* möglich.

Schon in früheren Arbeiten wurde die Auswirkung von extrazellulärer Azidose auf die Strahlensensitivität beschrieben [37, 61, 125]. Auch hier waren unterschiedliche Resultate beobachtet worden.

Keine Veränderung der Strahlensensitivität fand die Gruppe um Lee, die nachwies, dass bestrahlte SCK-Tumorzellen bei akuter Azidose annähernd gleiche Überlebenskurven wie physiologisch gehaltene Zellen besitzen [89]. Hierbei erfolgte 48 Stunden nach Bestrahlung ein Mediumwechsel für alle Zellen auf einen pH-Wert von 7,5. Daran anschließend wurde ein Klonogenitäts-Assay durchgeführt. Wurde der azidotische pH-Wert beibehalten, trat Apoptose jedoch vermindert auf.

Eine Resistenz gegenüber Bestrahlung unter Azidose zeigte die gleiche Arbeitsgruppe an menschlichen RKO.C-Kolorektaltumorzellen mit Wildtyp-p53. Dabei trat nach akuter Azidose und einem nach 72 Stunden durchgeführten Mediumwechsel auf einen pH-Wert von 7,5 weniger Apoptose wie auch ein gesteigertes klonogenes Überleben auf [116].

Um die Auswirkungen einer chronischen Azidose auf die Strahlensensitivität zu untersuchen, führte diese Gruppe auch Untersuchungen an Karzinomzellen durch, die zuvor über mindestens drei Monate bei einem pH-Wert von 6,8 kultiviert wurden. Dabei war direkt nach Bestrahlung bei allen Zellen ein Mediumwechsel auf einen pH-Wert von 7,4 zur weiteren Inkubation erfolgt. Es

zeigte sich eine ähnliche Überlebensrate nach Bestrahlung bei akuter wie auch bei chronischer Azidose im Vergleich zu physiologischen Bedingungen [112].

Eine unter Azidose verstärkte Sensibilität gegenüber Bestrahlung fanden demgegenüber Zölzer und Streffer, die die Wirkung von Bestrahlung und Hyperthermie auf menschliche Melanomzellen, die zuvor bis zu sechs Tagen azidotischen extrazellulären pH-Werten (pH 6,5) ausgesetzt waren, untersucht hatten [170]. Nach Bestrahlung waren die Zellen abgelöst und zur Klonogenitätsbestimmung erneut ausgesät worden. Unter welchem pH-Wert das Wachstum erfolgte, wurde nicht beschrieben.

Somit zeigen sich je nach Versuchsaufbau unterschiedliche Ergebnisse. Dabei ist kritisch anzumerken, dass häufig, wie auch in der vorliegenden Arbeit, aufgrund eines unter azidotischen Bedingungen deutlich verminderten Wachstums die Klonogenitätsbestimmung nach Bestrahlung bei einem physiologischen pH-Wert erfolgte.

Eine Arbeit von Jang und Hill zeigt dabei unter anderem, dass Zellen nach Wachstum unter Azidose ein verstärktes Wanderungspotential aufwiesen, und das um so mehr, wenn sie sich nach Azidose unter physiologischen Bedingungen erholen konnten [69]. Damit könnte eine Hypothese folgendermaßen lauten: Die bestrahlten, unter Azidose gehaltenen Zellen wandern nach dem Mediumwechsel eher als dass sie wachsen und Zellklone bilden.

Weiter wiesen Freeman und Sierra nach, dass ein azidotisches Milieu die Fixierung von potentiell letalen Strahlenschäden vermindern kann [38].

Konsequenzen für den klinischen Einsatz der Strahlentherapie lassen sich damit aus den eigenen Arbeiten und der publizierten Literatur nicht ableiten. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Mechanismen, die zu Sensibilisierung oder Resistenzbildung bei Bestrahlung unter azidotischen Bedingungen führen, besser zu verstehen.

#### **4.4 Modulation der Chemosensitivität von humanen Gliomzellen unter Azidose**

Es wurde weiter ein Zytotoxizitäts-Assay mit verschiedenen Wirkstoffen an mehreren Gliomzelllinien durchgeführt, um die Veränderung der Wirksamkeit der Chemotherapeutika bei malignen Gliomzellen unter Azidose zu untersuchen.

Dabei zeigte sich alleinig bei Behandlung mit Lomustin bei allen Zelllinien eine erhöhte Sensibilität unter Azidose (Abb. 6). Diese verstärkte Zytotoxizität von Lomustin unter Azidose kann hierbei durch seine erhöhte Stabilität bei niedrigen pH-Werten erklärt werden (Abb. 7 A). Eine Stabilitätssteigerung von Lomustin unter azidotischen Bedingungen wurde in einer Arbeit von Bosanquet ebenfalls beschrieben [14].

Die erhöhte Stabilität von Lomustin unter Azidose könnte ein entscheidender Faktor für die besondere Wirksamkeit von Lomustin bei Hirntumoren sein.

Gegenüber den anderen hier untersuchten Chemotherapeutika war im Gegensatz dazu unter Azidose eine Resistenz zu erkennen. Diese war in allen untersuchten Zelllinien relativ gleichförmig (Abb. 6).

Eine Sonderstellung nimmt Topotecan ein, weil je nach Zelllinie und Ausmaß der Azidose teilweise auch eine Sensibilisierung in Erscheinung trat.

Die in der Einleitung bei den einzelnen Wirkstoffen vorgestellten Resistenzmechanismen sind in den bisher veröffentlichten Arbeiten zum Thema Azidose und Auswirkung auf die Sensitivität nur wenig untersucht worden. Somit ist eine gezielte Umgehung der gegebenenfalls spezifisch bei Azidose auftretenden Resistenzmechanismen zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

Im folgenden sollen die Arbeiten, welche Zytotoxizität unter Azidose abhandeln, im Einzelnen vorgestellt und mit den hier dargestellten Ergebnissen verglichen werden.



#### 4.4.1 Lomustin

Kwok und Twentyman untersuchten die Wirkung von Lomustin an Maustumorzellen nach 24-stündiger Azidose-Adaptation. Dabei waren die Zellen unter Azidose resistenter; nur bei Wechsel auf einen pH-Wert von 7,4 während der einstündigen Behandlung mit Lomustin zeigte sich eine Sensibilisierung. Weitere Arbeiten zu diesem Thema untersuchten Carmustin, einen weiteren Nitrosoharnstoff. Die Zytotoxizität von Carmustin unter Azidose war dabei in einer Arbeit bei gleichzeitiger Carmustin- und Azidose-Behandlung allenfalls minimal erhöht [51]; in einer anderen Arbeit nach vorheriger zweistündiger Azidose-Adaptation deutlich verstärkt [126]. Letztere beschrieb dabei einen verringerten Abbau von Carmustin bei einem pH-Wert von 6,5. Alle drei Arbeitsgruppen hatten nach der Behandlung einen Mediumwechsel durchgeführt, so dass das anschließende Wachstum unter einem pH-Wert von 7,4 erfolgte. Welche Folgen dieser Wechsel für das Überleben der Tumorzellen hat, ist unklar. Damit ist keine Aussage über die Lomustinsensitivität von konstant in einem azidotischen Mikromilieu lebenden Tumorzellen möglich. In der hier vorgestellten Arbeit war im Gegensatz dazu die Zytotoxizität bei konstanter Azidose untersucht worden, um den Bedingungen *in vivo* eher zu entsprechen.

Zusammengefasst kann somit gesagt werden, dass neben der guten ZNS-Gängigkeit die Stabilisierung von Lomustin unter Azidose zu dessen besonderen Wirksamkeit bei malignen Gliomen im Allgemeinen wie auch bei einem Teil der Temozolomid-resistenten Patienten beitragen könnte.

#### 4.4.2 Topotecan

Von den anderen in der hier vorgestellten Arbeit untersuchten Chemotherapeutika zeigte außer Lomustin nur Topotecan eine teilweise erhöhte Zytotoxizität unter Azidose. Dabei wurde die Zytotoxizität von Topotecan durch milde Azidose (pH 7,0) in T98G- und LN-18-Zellen verstärkt (beides Zelllinien mit mutiertem p53); jedoch nicht in den anderen untersuchten Zelllinien (mit Wildtyp-p53). Eine stärkere Azidose von pH 6,6 führte hingegen

in allen Zelllinien zu Resistenz. Ob p53 hierbei eine Rolle spielt, ist unklar, weil keine funktionellen Experimente durchgeführt wurden. In einer früheren Arbeit war ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten p53-Proteinspiegel und einer verstärkten Bildung der durch Topotecan induzierten DNS/Topoisomerase I – Komplexe bei physiologischen pH-Werten gefunden worden [129].

Die zur Zytotoxizität von Topotecan unter Azidose veröffentlichten Arbeiten kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine verstärkte Zytotoxizität von Topotecan unter akuter und chronischer Azidose (pH 6,4 bis 6,8) beschrieben verschiedene Arbeitsgruppen [1, 35, 41, 140]. Eine Resistenz gegenüber Topotecan war hingegen von Gabr und Mitarbeitern bei einem pH-Wert von 6,2 und von Vukovic und Tannock (pH-Wert 6,5) gezeigt worden [41, 150].

Für die unterschiedliche Wirksamkeit von Topotecan scheinen zum einen eine veränderte Aufnahme und zum anderen ein unterschiedliches Verhältnis zwischen aktiver geschlossener Laktonform und offener inaktiver Lakton-Ringform unter Azidose mitverantwortlich zu sein [1, 41, 150]. Weiter scheinen auch unter Azidose veränderte Transportmechanismen (wie zum Beispiel durch das *breast cancer resistance protein*=ABCG2) dabei eine Rolle zu spielen [16].

### 4.4.3 Cisplatin

Die bei den hier vorgestellten Untersuchungen gezeigte Resistenz gegenüber Cisplatin unter Azidose ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von Wachsberger und Mitarbeitern [151], die mit Zellen arbeiteten, die vor Behandlung an einen pH-Wert von 6,7 adaptiert wurden.

Demgegenüber gibt es zahlreiche Arbeiten, die eine Sensibilisierung gegenüber Cisplatin unter Azidose beschreiben [4, 50, 56, 87, 138]. Dabei waren für die Untersuchungen häufig niedrigere pH-Werte (zwischen 6,0 und 6,45) gewählt worden. Bei pH-Werten von 6,4 und 6,8 ergab sich bei Laurencot und Kennedy keine veränderte Wirkung im Vergleich zu physiologischen pH-Werten [87].

#### 4.4.4 Gemcitabin

Zu den Auswirkungen von Azidose auf die Zytotoxizität von Gemcitabin liegen bislang keine weiteren Veröffentlichungen vor. Mögliche Mechanismen, die die in dieser Arbeit beobachtete Resistenz gegenüber Gemcitabin unter Azidose erklären könnten, sind die in der Einleitung im Kapitel Gemcitabin Erwähnten, zum Beispiel eine reduzierte Gemcitabinaufnahme, eine verminderte oder weniger aktive Desoxycytidinkinase, vermehrte oder aktivere 5'-Nukleotidasen und andere.

#### 4.4.5 Temozolomid

Gegenüber Temozolomid zeigte sich in den hier vorgestellten Versuchen sowohl bei einem pH-Wert von 6,6 wie auch 7,0 eine Resistenz im Vergleich zu den Ergebnissen bei einem physiologischen pH-Wert. Zu diesem Thema liegen ebenfalls keine Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen vor. Temozolomid ist bei azidotischen pH-Werten stabil, die Abbaugeschwindigkeit zu 5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-Carboxamid (MTIC) steigt jedoch bei Übergang über neutrale zu basischen pH-Werten ( $\text{pH} > 7$ ) schnell an. Für MTIC ist das Gegenteil der Fall: bei basischen pH-Werten ist es relativ stabil, wird bei Azidose ( $\text{pH} < 7$ ) jedoch schnell zum aktiven Methyldiazonium-Ion abgebaut, das mit der DNS in Form von Alkylierung reagiert. Unter alkalischen Bedingungen kann es deshalb vorkommen, dass kein reaktives Methyldiazonium-Ion gebildet wird, und die Reaktion bei MTIC endet [135]. In Tumorzellen besteht intrazellulär häufig ein alkalischer pH-Wert, der durch diverse Regulierungsmechanismen aufrechterhalten wird (siehe Kapitel 1 Einleitung). Bei extrazellulärer Azidose können diese verstärkt in Aktion treten und damit zu einer verstärkten Alkalisierung intrazellulär führen. Dies könnte einer der Gründe für die in dieser Arbeit dargelegte Resistenz gegenüber Temozolomid unter azidotischen Bedingungen sein.

### 4.4.6 Teniposid

Die bei Teniposid gefundene Resistenzbildung unter Azidose entspricht den Ergebnissen von Jensen und Mitarbeitern [71]. Sie zeigten eine verringerte Zytotoxizität von Teniposid bei pH-Werten zwischen 6,3 und 6,8 im Vergleich zur Zytotoxizität bei pH 7,4. Hierzu waren Mausleukämiezellen (L1210) wie auch Zellen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms des Menschen (OC-NYH) bei gleichzeitiger Azidose und Wirkstoffgabe über eine Stunde und anschließendem Wachstum bei einem pH-Wert von 7,4 untersucht worden. Weitere Arbeiten zu diesem Thema liegen nicht vor.

### 4.4.7 Vincristin

Eine unter Azidose bestehende Resistenz gegenüber Vincristin beschreiben neben der vorliegenden Arbeit auch andere Arbeitsgruppen.

Kobayashi und Mitarbeiter zeigten, dass Vincristin bei einem niedrigen extrazellulären pH-Wert (pH 6,3) eine geringere Zytotoxizität im Vergleich zu physiologischen Bedingungen besitzt [79].

Einer der Erklärungsansätze für die verminderte Vincristinwirkung unter extrazellulärer Azidose ist eine reduzierte Aufnahme. Es wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Vincristin in die Zelle pH-abhängig geschieht, wobei bei steigenden extrazellulären pH-Werten (zwischen 5,5 und 7,5) eine zunehmende Aufnahme zu beobachten war [34]. Somit scheint Vincristin unter Azidose vermindert aufgenommen zu werden.

## **4.5 Verstärkte Lomustinwirkung unter Azidose ist mit einer erhöhten Stabilität dieses Wirkstoffes bei niedrigen pH-Werten verbunden**

Um die verstärkte Wirkung von Lomustin und die Resistenzbildung gegenüber den anderen Chemotherapeutika unter einem extrazellulären pH-Wert von 6,6 näher zu untersuchen, wurde die biologische Stabilität dieser Wirkstoffe bei einem pH-Wert von 6,6 im Vergleich zu 7,4 untersucht. Dabei zeigte sich nur

bei Lomustin eine erhöhte Stabilität unter Azidose; bei den anderen Wirkstoffen war keine signifikante Änderung zu erkennen (Abb. 7 A und B).

Für Lomustin war dies schon in einer anderen Arbeit beschrieben worden [14].

In einer Arbeit von Zieske und Mitarbeitern war auch für Cisplatin eine erhöhte Stabilität bei niedrigeren pH-Werten (4,3 bis 6,3) gemessen worden [169]. In der vorliegenden Arbeit wurden im Vergleich dazu höhere pH-Werte (6,6 versus 7,4) verglichen. Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete jedoch auch bei höheren pH-Werten eine erhöhte Stabilität von Cisplatin unter Azidose (pH 3; 5; 6; 7 und 9; [107]). Diese Gruppe hatte ebenso untersucht, inwieweit Chlorid beim Abbau von Cisplatin eine Rolle spielt und festgestellt, dass höhere Chloridkonzentrationen diesen verlangsamen. In der Zelle werden die Chloridliganden von Cisplatin durch Wassermoleküle ersetzt. Die so entstehende Diaquo-Form ist zytotoxisch. Inwieweit die in der vorliegenden Arbeit zum Einstellen des Medium-pH-Wertes eingesetzte Salzsäure (HCl) die Cisplatinwirkung beeinflusst, ist unklar.

Für die anderen hier untersuchten Wirkstoffe liegen keine weiteren Arbeiten zur Stabilitätsprüfung unter Azidose vor.

#### **4.6 *Multidrug resistance*-Transporter unter Azidose**

Manche der Zytostatika, bei denen eine verstärkte Resistenz unter Azidose beobachtet wurde, sind klassische MDR-Substrate (zum Beispiel Vincristin und Teniposid; [13, 47]). Daher wurde untersucht, ob der Einfluss der Azidose auf die Zytostatikaresistenz MDR-abhängig ist. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der MDR-Aktivität unter Azidose im Vergleich zur Aktivität unter physiologischen pH-Werten (Abb. 9). Die Modulation der Zytotoxizität von Vincristin durch Verapamil war Azidose-unabhängig (Abb. 10). Daher ist der Mechanismus, über den Azidose Zytostatikaresistenz vermittelt, als MDR-unabhängig anzusehen.

Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen von Untersuchungen an Lungenfibroblasten vom Hamster und menschlichen Mammakarzinomzellen [3].

Bei dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Veränderungen des intra- oder extrazellulären pH-Wertes keinen Einfluss auf die P-Glykoprotein-vermittelte Resistenz haben.

Demgegenüber fanden Wei und Roepe bei menschlichen Kolon- und Nierenkarzinomzellen eine erhöhte Expression von MDR-Protein unter Azidose. Dies konnten sie jedoch bei anderen Zellen wie zum Beispiel menschlichen Myelomzellen (RPMI8226), Balb/c-Maus-3T3, chinesischen Hamsterlungenfibroblasten (DC-3F) und Fibroblasten des Ovars (LR73) nicht nachweisen [156].

In Tumorzellen, die gegen zahlreiche Chemotherapeutika resistent sind, ist der intrazelluläre pH-Wert auch bei einem azidotischen extrazellulären pH-Wert häufig alkalisch. Dabei wird eine direkte oder indirekte Wirkung von P-Glykoprotein auf die pH-Regulation postuliert. Weiter kann auch die pH-Regulation von Zellorganellen wie zum Beispiel Lysosomen in diesen Zellen modifiziert und dabei die intrazelluläre Verteilung von Wirkstoffen verändert werden [86, 114, 131, 137]. Somit kann die in der hier vorliegenden Arbeit beschriebene Resistenz vieler Wirkstoffe unter anderem auch durch eine verminderte Aufnahme oder intrazelluläre Umverteilung der Wirkstoffe in Zellorganellen aufgrund eines veränderten pH-Gradienten mitverursacht worden sein.

### **4.7 Modulation der Chemosensitivität von humanen Gliomzellen unter Hypoxie**

Als ein weiterer wichtiger Resistenzfaktor neben der Azidose wird eine Hypoxie in soliden Tumoren angesehen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit als nächstes die Wirkung von Hypoxie auf die Chemoresistenz von malignen Gliomzellen untersucht. Es zeigte sich bei beiden untersuchten Zelllinien (LNT-229 und T98G) und allen Wirkstoffen (Lomustin, Cisplatin, Gemcitabin, Teniposid, Topotecan und Vincristin) eine Resistenz unter Hypoxie (Abb. 11). Dabei ist kritisch anzumerken, dass bei diesem Versuchsaufbau aufgrund des

offenen Systems und Nichtanwenden eines Puffersystems eine Reoxygenierung wie auch Azidose während des Versuches auftrat, so dass die Hypoxiewirkung nicht klar von den anderen Wirkungen getrennt werden kann.

Bemerkenswert ist bei diesem Versuch, dass die Sensibilisierung gegenüber Lomustin unter Azidose hier ins Gegenteil verkehrt, und eine Resistenz trotz gleichzeitig auftretender Azidose zu beobachten war. Somit spielt die Wirkung von Hypoxie auf das Ausmaß des Ansprechens auf Chemotherapeutika in malignen Gliomzellen anscheinend eine große Rolle.

Die zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Ebenfalls eine Resistenz unter Hypoxie wurde für Lomustin [83], Gemcitabin [33, 80, 167], Teniposid [12] und Vincristin [65, 141, 153] beobachtet.

Für Lomustin wurde auch eine Arbeit veröffentlicht, die keinen Wirkungsunterschied bei Hypoxie im Vergleich zu Normoxie fand [141].

Für Cisplatin gibt es Arbeiten, die eine Resistenz [80, 91, 134, 153], keinen Wirkungsunterschied [104, 141, 163] oder aber eine Sensibilisierung unter Hypoxie [102] zeigten.

Eine Sensibilitätssteigerung unter Hypoxie wurde daneben nur für Topotecan [95] beschrieben.

Zusammengefasst ist Hypoxie somit ein wichtiger Faktor bei der Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika und muss bei der Therapie mitberücksichtigt werden.

## 5 Zusammenfassung

Azidose und Hypoxie sind wichtige Komponenten des Mikromilieus von Glioblastomen und anderen soliden Tumoren. Dennoch sind ihre Auswirkungen auf die bestehenden Therapieoptionen des Glioblastoms bislang nur unzureichend untersucht.

Die vorliegende Arbeit liefert einen Einblick vor allem hinsichtlich der Auswirkung von extrazellulärer Azidose auf Wachstum, Strahlen- und Chemosensitivität sowie der Bedeutung von Hypoxie für die Chemosensitivität bei malignen Gliomzellen.

Dabei wurde zunächst das Wachstum der Tumorzellen unter Azidose untersucht. Hierbei war eine Wachstumshemmung vor allem in Zellen mit Wildtyp-p53 nachweisbar. Die Proliferation wurde jedoch in diesen Zellen nicht durch ein dominant-negatives p53 beeinflusst. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben keinen veränderten Zellzyklus unter Azidose.

Weiter zeigten die Versuche zur Bestrahlungssensitivität unter Azidose je nach Zelllinie und pH-Wert ein komplexes Bild mit überwiegender Resistenz, zum Teil jedoch auch erhöhter Sensitivität gegenüber Strahlentherapie, so dass keine klaren Schlussfolgerungen zum Einfluss von Azidose auf eine Strahlentherapie *in vivo* möglich sind.

Die Untersuchungen zur Chemosensitivität der Glioblastomzellen unter extrazellulärer Azidose ergaben bei allen untersuchten Zelllinien eine Resistenz gegenüber vielen Chemotherapeutika, darunter Cisplatin, Gemcitabin, Temozolomid, Teniposid und Vincristin. Dabei war die Abschwächung der Wirkung von Temozolomid unter Azidose von besonderer Bedeutung, da dieser Wirkstoff als einer der wenigen wirksameren Chemotherapeutika beim Glioblastom gilt. Überraschend war bei diesen Untersuchungen die einzig bei Lomustin unter Azidose auftretende verstärkte Zytotoxizität. Als wahrscheinlicher Mechanismus wurde eine verlängerte Wirksamkeit von Lomustin unter Azidose nachgewiesen.



Eine Zwischenstellung nahm Topotecan ein, da abhängig von Zelllinie und Azidoseausmaß eine Resistenz oder aber verstärkte Zytotoxizität unter Azidose möglich war.

Als weiterer Resistenzmechanismus neben der Stabilitätsveränderung unter Azidose wurde als nächstes die Aktivität eines *multidrug resistance*-Transporters (P-Glykoprotein) bestimmt. Dabei zeigten sich unter Azidose jedoch keine Veränderungen seiner Aktivität, so dass ein verstärkter Efflux durch P-Glykoprotein als Mechanismus der Chemoresistenz bei Glioblastomzellen unter Azidose keine Rolle zu spielen scheint.

Untersuchungen zur Chemosensitivität der malignen Gliomzellen unter Hypoxie zeigten für alle untersuchten Chemotherapeutika (Lomustin, Cisplatin, Gemcitabin, Teniposid, Topotecan und Vincristin) eine Resistenz.

Die vorliegende Arbeit liefert somit einige Grundlagen für das Verständnis der Auswirkung von Azidose auf Wachstum, Bestrahlungs- und Chemosensitivität sowie von Hypoxie auf die Chemosensitivität von malignen Gliomzellen und kann daher möglicherweise zur Entwicklung wirksamerer Therapiestrategien für Glioblastome beitragen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adams DJ, Dewhirst MW, Flowers JL, Gamcsik MP, Colvin OM, Manikumar G, Wani MC, Wall ME (2000) Camptothecin analogues with enhanced antitumor activity at acidic pH. *Cancer Chemother Pharmacol* 46:263-271
2. Ali-Osman F, Caughlan J, Gray GS (1989) Decreased DNA interstrand cross-linking and cytotoxicity induced in human brain tumor cells by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea after in vitro reaction with glutathione. *Cancer Res* 49:5954-5958
3. Altenberg GA, Young G, Horton JK, Glass D, Belli JA, Reuss L (1993) Changes in intra- or extracellular pH do not mediate P-glycoprotein-dependent multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9735-9738
4. Atema A, Buurman KJ, Noteboom E, Smets LA (1993) Potentiation of DNA-adduct formation and cytotoxicity of platinum-containing drugs by low pH. *Int J Cancer* 54:166-172
5. Baer JC, Freeman AA, Newlands ES, Watson AJ, Rafferty JA, Margison GP (1993) Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br J Cancer* 67:1299-1302
6. Baguley BC, Holdaway KM, Thomsen LL, Zhuang L, Zwi LJ (1991) Inhibition of growth of colon 38 adenocarcinoma by vinblastine and colchicine: evidence for a vascular mechanism. *Eur J Cancer* 27:482-487
7. Bahr O, Wick W, Weller M (2001) Modulation of MDR/MRP by wild-type and mutant p53. *J Clin Invest* 107:643-646
8. Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ (2002) Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist Updat* 5:19-33
9. Bergman AM, Pinedo HM, Talianidis I, Veerman G, Loves WJ, van der Wilt CL, Peters GJ (2003) Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer* 88:1963-1970
10. Berhane K, Hao XY, Egyhazi S, Hansson J, Ringborg U, Mannervik B (1993) Contribution of glutathione transferase M3-3 to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea resistance in a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Res* 53:4257-4261
11. Binks SP, Dobrota M (1990) Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochem Pharmacol* 40:1329-1336
12. Boller YC, Brandes LM, Russell RL, Lin ZP, Patierno SR, Kennedy KA (2000) Prostaglandin A1 inhibits stress-induced NF-kappaB activation and reverses resistance to topoisomerase II inhibitors. *Oncol Res* 12:383-395

13. Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-592
14. Bosanquet AG (1985) Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays. General considerations, the nitrosoureas and alkylating agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 14:83-95
15. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG (2004) Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* 64:920-927
16. Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Dahlhaus F, van Eijndhoven MA, de Wolf CJ, Kuil A, Beijnen JH, Scheffer GL, Jansen G, Borst P, Schellens JH (2007) The effect of low pH on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, methotrexate diglutamate, folic acid, mitoxantrone, topotecan, and resveratrol in in vitro drug transport models. *Mol Pharmacol* 71:240-249
17. Bugg BY, Danks MK, Beck WT, Suttle DP (1991) Expression of a mutant DNA topoisomerase II in CCRF-CEM human leukemic cells selected for resistance to teniposide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7654-7658
18. Canitrot Y, Cazaux C, Frechet M, Bouayadi K, Lesca C, Salles B, Hoffmann JS (1998) Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12586-12590
19. Chau Q, Stewart DJ (1999) Cisplatin efflux, binding and intracellular pH in the HTB56 human lung adenocarcinoma cell line and the E-8/0.7 cisplatin-resistant variant. *Cancer Chemother Pharmacol* 44:193-202
20. Ciccarelli RB, Solomon MJ, Varshavsky A, Lippard SJ (1985) In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: differential repair, DNA-protein cross-linking, and inhibition of replication. *Biochemistry* 24:7533-7540
21. Clark PI, Slevin ML (1987) The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clin Pharmacokinet* 12:223-252
22. Curtin NJ, Wang LZ, Yiakouvaki A, Kyle S, Arris CA, Canan-Koch S, Webber SE, Durkacz BW, Calvert HA, Hostomsky Z, Newell DR (2004) Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 10:881-889
23. Danks MK, Schmidt CA, Deneka DA, Beck WT (1989) Increased ATP requirement for activity of and complex formation by DNA topoisomerase II from human leukemic CCRF-CEM cells selected for resistance to teniposide. *Cancer Commun* 1:101-109

24. Deans B, Tisdale MJ (1992) Antitumour imidazotetrazines XXVIII 3-methyladenine DNA glycosylase activity in cell lines sensitive and resistant to temozolomide. *Cancer Lett* 63:151-157
25. Dempke W, Voigt W, Grothey A, Hill BT, Schmoll HJ (2000) Cisplatin resistance and oncogenes--a review. *Anticancer Drugs* 11:225-236
26. Dennis MJ, Beijnen JH, Grochow LB, van Warmerdam LJ (1997) An overview of the clinical pharmacology of topotecan. *Semin Oncol* 24:S5-12-S15-18
27. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33:9045-9051
28. Dive C, Workman P, Watson JV (1989) Inhibition of cellular esterases by the antitumour imidazotetrazines mitozolomide and temozolomide: demonstration by flow cytometry and conventional spectrofluorimetry. *Cancer Chemother Pharmacol* 25:149-155
29. Dolan ME, Moschel RC, Pegg AE (1990) Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5368-5372
30. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L, Senger DR (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 107:233-235
31. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343:1350-1354
32. Faraoni I, Turriziani M, Masci G, De Vecchis L, Shay JW, Bonmassar E, Graziani G (1997) Decline in telomerase activity as a measure of tumor cell killing by antineoplastic agents in vitro. *Clin Cancer Res* 3:579-585
33. Fechner G, Dederichs F, Schmidt D, Muller S, Vaupel P, Albers P (2005) Hyperoxia-induced improvement of the in vitro response to gemcitabine in transitional cell carcinoma. *Anticancer Res* 25:3413-3418
34. Ferguson PJ, Phillips JR, Selner M, Cass CE (1984) Differential activity of vincristine and vinblastine against cultured cells. *Cancer Res* 44:3307-3312
35. Flowers JL, Hoffman RM, Driscoll TA, Wall ME, Wani MC, Manikumar G, Friedman HS, Dewhirst M, Colvin OM, Adams DJ (2003) The activity of camptothecin analogues is enhanced in histocultures of human tumors and human tumor xenografts by modulation of extracellular pH. *Cancer Chemother Pharmacol* 52:253-261

36. Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31
37. Freeman ML, Holahan EV, Highfield DP, Raaphorst GP, Spiro IJ, Dewey WC (1981) The effect of pH on hyperthermic and x ray induced cell killing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7:211-216
38. Freeman ML, Sierra E (1984) An acidic extracellular environment reduces the fixation of radiation damage. *Radiation research* 97:154-161
39. Froberg MK, Gerhart DZ, Enerson BE, Manivel C, Guzman-Paz M, Seacotte N, Drewes LR (2001) Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport* 12:761-765
40. Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK (2001) Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* 61:6020-6024
41. Gabr A, Kuin A, Aalders M, El-Gawly H, Smets LA (1997) Cellular pharmacokinetics and cytotoxicity of camptothecin and topotecan at normal and acidic pH. *Cancer Res* 57:4811-4816
42. Gandhi V, Legha J, Chen F, Hertel LW, Plunkett W (1996) Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA. *Cancer Res* 56:4453-4459
43. Garcia-Canero R, Trilla C, Perez de Diego J, Diaz-Gil JJ, Cobo JM (1999) Na<sup>+</sup> :H<sup>+</sup> exchange inhibition induces intracellular acidosis and differentially impairs cell growth and viability of human and rat hepatocarcinoma cells. *Toxicol Lett* 106:215-228
44. Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4:891-899
45. Gerweck LE, Seetharaman K (1996) Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 56:1194-1198
46. Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T (1999) Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res* 31:549-558
47. Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV (1996) P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 6:610-617
48. Griffiths JR (1991) Are cancer cells acidic? *Br J Cancer* 64:425-427
49. Grindey GB, Hertel LW, Plunkett W (1990) Cytotoxicity and antitumor activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine). *Cancer Invest* 8:313
50. Groos E, Walker L, Masters JR (1986) Intravesical chemotherapy. Studies on the relationship between pH and cytotoxicity. *Cancer* 58:1199-1203
51. Hahn GM, Shiu EC (1983) Effect of pH and elevated temperatures on the cytotoxicity of some chemotherapeutic agents on Chinese hamster cells in vitro. *Cancer Res* 43:5789-5791

52. Hamza M, Canal P, Bugat R, Soula G, Douste-Blazy L (1987) Uptake and binding of teniposide (VM26) in Krebs II ascites cells. *Biochem Pharmacol* 36:1599-1603
53. Hayot C, Farinelle S, De Decker R, Decaestecker C, Darro F, Kiss R, Van Damme M (2002) In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton. *Int J Oncol* 21:417-425
54. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997-1003
55. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997) Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3:177-182
56. Herman TS, Teicher BA, Collins LS (1988) Effect of hypoxia and acidosis on the cytotoxicity of four platinum complexes at normal and hyperthermic temperatures. *Cancer Res* 48:2342-2347
57. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann RD, Steinbach JP, Hundsberger T, Wick W, Meyermann R, Tan TC, Sommer C, Bamberg M, Reifenberger G, Weller M (2006) Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol* 24:4412-4417
58. Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB (1990) Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res* 50:4417-4422
59. Himes RH (1991) Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol Ther* 51:257-267
60. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO (2001) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* 61:1957-1963
61. Holahan EV, Stuart PK, Dewey WC (1982) Enhancement of survival of CHO cells by acidic pH after x irradiation. *Radiation research* 89:433-435
62. Hromas RA, North JA, Burns CP (1987) Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 36:197-201
63. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260:14873-14878
64. Hunsucker SA, Spychala J, Mitchell BS (2001) Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *J Biol Chem* 276:10498-10504

65. Hussein D, Estlin EJ, Dive C, Makin GW (2006) Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 5:2241-2250
66. Imperatori L, Damia G, Taverna P, Garattini E, Citti L, Boldrini L, D'Incalci M (1994) 3T3 NIH murine fibroblasts and B78 murine melanoma cells expressing the Escherichia coli N3-methyladenine-DNA glycosylase I do not become resistant to alkylating agents. *Carcinogenesis* 15:533-537
67. Ishikawa T, Ali-Osman F (1993) Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 268:20116-20125
68. Jamieson ER, Lippard SJ (1999) Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 99:2467-2498
69. Jang A, Hill RP (1997) An examination of the effects of hypoxia, acidosis, and glucose starvation on the expression of metastasis-associated genes in murine tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 15:469-483
70. Jasmin BJ, Changeux JP, Cartaud J (1990) Compartmentalization of cold-stable and acetylated microtubules in the subsynaptic domain of chick skeletal muscle fibre. *Nature* 344:673-675
71. Jensen PB, Sorensen BS, Sehested M, Grue P, Demant EJ, Hansen HH (1994) Targeting the cytotoxicity of topoisomerase II-directed epipodophyllotoxins to tumor cells in acidic environments. *Cancer Res* 54:2959-2963
72. Jordan P, Carmo-Fonseca M (2000) Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 57:1229-1235
73. Kalayda GV, Jansen BA, Molenaar C, Wielaard P, Tanke HJ, Reedijk J (2004) Dinuclear platinum complexes with N, N'-bis(aminoalkyl)-1,4-diaminoanthraquinones as linking ligands. Part II. Cellular processing in A2780 cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cells: new insights into the mechanism of resistance. *J Biol Inorg Chem* 9:414-422
74. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 11:448-457
75. Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, Matsuda T, Saijo N (1991) Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res* 51:3237-3242
76. Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, He L, Horwitz SB, Norris MD, Haber M (2001) Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res* 61:5803-5809
77. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257

78. Kleihues P, Sobin LH (2000) World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88:2887
79. Kobayashi H, Takemura Y, Ohnuma T (1992) Relationship between tumor cell density and drug concentration and the cytotoxic effects of doxorubicin or vincristine: mechanism of inoculum effects. *Cancer Chemother Pharmacol* 31:6-10
80. Koch S, Mayer F, Honecker F, Schittenhelm M, Bokemeyer C (2003) Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro. *Br J Cancer* 89:2133-2139
81. Koike K, Abe T, Hisano T, Kubo T, Wada M, Kohno K, Kuwano M (1996) Overexpression of multidrug resistance protein gene in human cancer cell lines selected for drug resistance to epipodophyllotoxins. *Jpn J Cancer Res* 87:765-772
82. Kurzen H, Schmitt S, Naher H, Mohler T (2003) Inhibition of angiogenesis by non-toxic doses of temozolomide. *Anticancer Drugs* 14:515-522
83. Kwok TT, Twentyman PR (1988) Effects of changes in oxygen tension, pH, and glucose concentration on the response to CCNU of EMT6 mouse tumor monolayer cells and multicellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14:1221-1229
84. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
85. Larrivee B, Averill DA (1999) Melphalan resistance and photoaffinity labelling of P-glycoprotein in multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells: reversal of resistance by cyclosporin A and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 58:291-302
86. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A (2000) Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 85:217-229
87. Laurencot CM, Kennedy KA (1995) Influence of pH on the cytotoxicity of cisplatin in EMT6 mouse mammary tumor cells. *Oncol Res* 7:371-379
88. LeCluyse EL, Ahlgren-Beckendorf JA, Carroll K, Parkinson A, Johnson J (2000) Regulation of glutathione S-transferase enzymes in primary cultures of rat hepatocytes maintained under various matrix configurations. *Toxicol In Vitro* 14:101-115
89. Lee HS, Park HJ, Lyons JC, Griffin RJ, Auger EA, Song CW (1997) Radiation-induced apoptosis in different pH environments in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38:1079-1087
90. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331
91. Liang BC (1996) Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines. *J Neurooncol* 29:149-155



92. Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J, Lage H (2003) Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *J Invest Dermatol* 121:172-176
93. Lien S, Larsson AK, Mannervik B (2002) The polymorphic human glutathione transferase T1-1, the most efficient glutathione transferase in the denitrosation and inactivation of the anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem Pharmacol* 63:191-197
94. Ludlum DB (1997) The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level. *Cancer Invest* 15:588-598
95. Lund EL, Hansen LT, Kristjansen PE (2005) Augmenting tumor sensitivity to topotecan by transient hypoxia. *Cancer Chemother Pharmacol* 56:473-480
96. Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, Crawford CR, Cass CE (1998) Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 58:4349-4357
97. Malapetsa A, Noe AJ, Poirier GG, Desnoyers S, Berger NA, Panasci LC (1996) Identification of a 116 kDa protein able to bind 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-damaged DNA as poly(ADP-ribose) polymerase. *Mutat Res* 362:41-50
98. Mann SC, Andrews PA, Howell SB (1991) Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 48:866-872
99. Mao Q, Deeley RG, Cole SP (2000) Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 275:34166-34172
100. Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ (1996) Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 14:176-186
101. Materna V, Holm PS, Dietel M, Lage H (2001) Kinetic characterization of ribozymes directed against the cisplatin resistance-associated ABC transporter cMOAT/MRP2/ABCC2. *Cancer Gene Ther* 8:176-184
102. Matthews JB, Adomat H, Skov KA (1993) The effect of hypoxia on cytotoxicity, accumulation and DNA binding of cisplatin in Chinese hamster ovary cells. *Anticancer Drugs* 4:463-470
103. Mello JA, Lippard SJ, Essigmann JM (1995) DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry* 34:14783-14791
104. Mellor HR, Snelling S, Hall MD, Modok S, Jaffar M, Hambley TW, Callaghan R (2005) The influence of tumour microenvironmental factors

- on the efficacy of cisplatin and novel platinum(IV) complexes. *Biochem Pharmacol* 70:1137-1146
105. Mukanganyama S, Widersten M, Naik YS, Mannervik B, Hasler JA (2002) Inhibition of glutathione S-transferases by antimalarial drugs possible implications for circumventing anticancer drug resistance. *Int J Cancer* 97:700-705
  106. Murakami T, Shibuya I, Ise T, Chen ZS, Akiyama S, Nakagawa M, Izumi H, Nakamura T, Matsuo K, Yamada Y, Kohno K (2001) Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance. *Int J Cancer* 93:869-874
  107. Nagai N, Okuda R, Kinoshita M, Ogata H (1996) Decomposition kinetics of cisplatin in human biological fluids. *J Pharm Pharmacol* 48:918-924
  108. Neff T, Blau CA (1996) Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp Hematol* 24:1340-1346
  109. Negendank W (1992) Studies of human tumors by MRS: a review. *NMR Biomed* 5:303-324
  110. Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C (1997) Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23:35-61
  111. Nutt CL, Chambers AF, Cairncross JG (1996) Wild-type p53 renders mouse astrocytes resistant to 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea despite the absence of a p53-dependent cell cycle arrest [corrected]. *Cancer Res* 56:2748-2751
  112. Ohtsubo T, Igawa H, Saito T, Matsumoto H, Park HJ, Song CW, Kano E, Saito H (2001) Acidic environment modifies heat- or radiation-induced apoptosis in human maxillary cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:1391-1398
  113. Ohtsubo T, Wang X, Takahashi A, Ohnishi K, Saito H, Song CW, Ohnishi T (1997) p53-dependent induction of WAF1 by a low-pH culture condition in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 57:3910-3913
  114. Ouar Z, Lacave R, Bens M, Vandewalle A (1999) Mechanisms of altered sequestration and efflux of chemotherapeutic drugs by multidrug-resistant cells. *Cell Biol Toxicol* 15:91-100
  115. Ozgen U, Savasan S, Stout M, Buck S, Ravindranath Y (2000) Further elucidation of mechanism of resistance to vincristine in myeloid cells: role of hypochlorous acid in degradation of vincristine by myeloperoxidase. *Leukemia* 14:47-51
  116. Park HJ, Lee SH, Chung H, Rhee YH, Lim BU, Ha SW, Griffin RJ, Lee HS, Song CW, Choi EK (2003) Influence of environmental pH on G2-phase arrest caused by ionizing radiation. *Radiation research* 159:86-93

117. Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V (1995) Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation. *Semin Oncol* 22:3-10
118. Pommier Y, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco GS (1999) Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug Resist Updat* 2:307-318
119. Rasheed ZA, Rubin EH (2003) Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. *Oncogene* 22:7296-7304
120. Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Alunni-Fabbroni M, Casavola V, Tommasino M (2000) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *Faseb J* 14:2185-2197
121. Rich IN, Worthington-White D, Garden OA, Musk P (2000) Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger. *Blood* 95:1427-1434
122. Rieger L, Rieger J, Winter S, Streffer J, Esser P, Dichgans J, Meyermann R, Weller M (2000) Evidence for a constitutive, verapamil-sensitive, non-P-glycoprotein multidrug resistance phenotype in malignant glioma that is unaltered by radiochemotherapy in vivo. *Acta Neuropathol (Berl)* 99:555-562
123. Roos A, Boron WF (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev* 61:296-434
124. Rotin D, Steele-Norwood D, Grinstein S, Tannock I (1989) Requirement of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger for tumor growth. *Cancer Res* 49:205-211
125. Rottinger EM, Mendonca M (1982) Radioresistance secondary to low pH in human glial cells and Chinese hamster ovary cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8:1309-1314
126. Rottinger EM, Smith BD, Weidenmaier W (1986) pH-induced modification of BCNU toxicity on glial cells. *Radiother Oncol* 5:23-27
127. Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Vermorken JB, Peters GJ (1993) 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem Pharmacol* 46:762-766
128. Schmaltz C, Hardenbergh PH, Wells A, Fisher DE (1998) Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Mol Cell Biol* 18:2845-2854
129. Schmidt F, Rieger J, Wischhusen J, Naumann U, Weller M (2001) Glioma cell sensitivity to topotecan: the role of p53 and topotecan-induced DNA damage. *Eur J Pharmacol* 412:21-25
130. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D (2003) Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 29:297-307

131. Simon S, Roy D, Schindler M (1994) Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1128-1132
132. Sirotnak FM, Danenberg KD, Chen J, Fritz F, Danenberg PV (2000) Markedly decreased binding of vincristine to tubulin in vinca alkaloid-resistant Chinese hamster cells is associated with selective overexpression of alpha and beta tubulin isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 269:21-24
133. Sirotnak FM, Yang CH, Mines LS, Oribe E, Biedler JL (1986) Markedly altered membrane transport and intracellular binding of vincristine in multidrug-resistant Chinese hamster cells selected for resistance to vinca alkaloids. *J Cell Physiol* 126:266-274
134. Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, Yu J (2006) Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene. *Cancer Chemother Pharmacol* 58:776-784
135. Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA, et al. (1987) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res* 47:5846-5852
136. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996
137. Takahashi M, Misawa Y, Watanabe N, Kawanishi T, Tanaka H, Shigenobu K, Kobayashi Y (1999) Role of P-glycoprotein in human natural killer-like cell line-mediated cytotoxicity. *Exp Cell Res* 253:396-402
138. Tanaka F, Whitworth CA, Rybak LP (2004) Round window pH manipulation alters the ototoxicity of systemic cisplatin. *Hear Res* 187:44-50
139. Tannock IF, Rotin D (1989) Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* 49:4373-4384
140. Teicher BA, Holden SA, Khandakar V, Herman TS (1993) Addition of a topoisomerase I inhibitor to trimodality therapy [cis-diamminedichloroplatinum(II)/heat/radiation] in a murine tumor. *J Cancer Res Clin Oncol* 119:645-651
141. Teicher BA, Lazo JS, Sartorelli AC (1981) Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 41:73-81

142. Tentori L, Leonetti C, Aquino A (1995) Temozolomide reduces the metastatic potential of Lewis lung carcinoma (3LL) in mice: role of alpha-6 integrin phosphorylation. *Eur J Cancer* 31A:746-754
143. Tentori L, Portarena I, Torino F, Scerrati M, Navarra P, Graziani G (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor increases growth inhibition and reduces G(2)/M cell accumulation induced by temozolomide in malignant glioma cells. *Glia* 40:44-54
144. Tuvesson H, Gunnarsson PO, Seidegard J (1993) Measurement and characterization of the denitrosation of tauromustine and related nitrosoureas by glutathione transferases in liver cytosol from various species. *Carcinogenesis* 14:1143-1147
145. Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC, Chaney SG (1998) The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* 58:3579-3585
146. van der Wilt CL, Kroep JR, Bergman AM, Loves WJ, Alvarez E, Talianidis I, Eriksson S, van Groeningen CJ, Pinedo HM, Peters GJ (2000) The role of deoxycytidine kinase in gemcitabine cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol* 486:287-290
147. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49:6449-6465
148. Vaupel P, Schaefer C, Okunieff P (1994) Intracellular acidosis in murine fibrosarcomas coincides with ATP depletion, hypoxia, and high levels of lactate and total Pi. *NMR Biomed* 7:128-136
149. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M (2001) Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 18:243-259
150. Vukovic V, Tannock IF (1997) Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *Br J Cancer* 75:1167-1172
151. Wachsberger PR, Landry J, Storck C, Davis K, O'Hara MD, Owen CS, Leeper DB, Coss RA (1997) Mammalian cells adapted to growth at pH 6.7 have elevated HSP27 levels and are resistant to cisplatin. *Int J Hyperthermia* 13:251-255; discussion 257-259
152. Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-314
153. Watanabe M, Tanaka R, Hondo H, Kuroki M (1992) Effects of antineoplastic agents and hyperthermia on cytotoxicity toward chronically hypoxic glioma cells. *Int J Hyperthermia* 8:131-138
154. Watt PM, Hickson ID (1994) Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem J* 303 ( Pt 3):681-695
155. Weber GF, Waxman DJ (1993) Denitrosation of the anti-cancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea catalyzed by microsomal glutathione S-transferase and cytochrome P450 monooxygenases. *Arch Biochem Biophys* 307:369-378

156. Wei LY, Roepe PD (1994) Low external pH and osmotic shock increase the expression of human MDR protein. *Biochemistry* 33:7229-7238
157. Weller M, Rieger J, Grimm C, Van Meir EG, De Tribolet N, Krajewski S, Reed JC, von Deimling A, Dichgans J (1998) Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *Int J Cancer* 79:640-644
158. Wike-Hooley JL, van den Berg AP, van der Zee J, Reinhold HS (1985) Human tumour pH and its variation. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21:785-791
159. Wilson L, Jordan MA (1995) Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chem Biol* 2:569-573
160. Withoff S, de Vries EG, Keith WN, Nienhuis EF, van der Graaf WT, Uges DR, Mulder NH (1996) Differential expression of DNA topoisomerase II alpha and -beta in P-gp and MRP-negative VM26, mAMSA and mitoxantrone-resistant sublines of the human SCLC cell line GLC4. *Br J Cancer* 74:1869-1876
161. Wong P, Kleemann HW, Tannock IF (2002) Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH. *Br J Cancer* 87:238-245
162. Xu GW, Nutt CL, Zlatescu MC, Keeney M, Chin-Yee I, Cairncross JG (2001) Inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 61:4155-4159
163. Yamagata M, Kanematsu T, Matsumata T, Utsunomiya T, Ikeda Y, Sugimachi K (1992) The difference in chemosensitivity to antineoplastic agents of human hepatocellular carcinoma cells under normo-oxygenated or hypoxic conditions. *Eur J Surg Oncol* 18:379-382
164. Yang DI, Yin JH, Mishra S, Mishra R, Hsu CY (2002) NO-mediated chemoresistance in C6 glioma cells. *Ann N Y Acad Sci* 962:8-17
165. Yang XL, Wang AH (1999) Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol Ther* 83:181-215
166. Yao D, Ding S, Burchell B, Wolf CR, Friedberg T (2000) Detoxication of vinca alkaloids by human P450 CYP3A4-mediated metabolism: implications for the development of drug resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 294:387-395
167. Yokoi K, Fidler IJ (2004) Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clin Cancer Res* 10:2299-2306
168. Zhou XJ, Rahmani R (1992) Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs* 44 Suppl 4:1-16; discussion 66-19
169. Zieske PA, Koberda M, Hines JL, Knight CC, Sriram R, Raghavan NV, Rabinow BE (1991) Characterization of cisplatin degradation as affected by pH and light. *Am J Hosp Pharm* 48:1500-1506

170. Zolzer F, Streffer C (1999) Radiation and/or hyperthermia sensitivity of human melanoma cells grown for several days in media with reduced pH. *Strahlenther Onkol* 175:325-332

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BCNU	1,3-Bis-(2-Chloräthyl)-1- Nitrosoharnstoff
BSO	Buthioninsulfoximin
CCNU	1-(2-Chloräthyl)-3-Cyclohexyl-1-Nitrosoharnstoff, Lomustin
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
cpm	<i>counts per minute</i>
DIDS	<i>4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	<i>median effect concentration</i> ; Konzentration, die 50 % Zelltod bewirkt
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
GST	Glutathion S-Transferase
Gy	Gray
HCL	Salzsäure
MCT	Monocarboxylattransporter
MDR	<i>multidrug resistance</i> (multiple Zytostatikaresistenz)
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MRP	<i>multidrug resistance associated protein</i>
MTIC	5-(3-Methyltriazen-1-yl)Imidazol-4-Carboxamid



---

NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
P-gp	P-Glykoprotein
pH	Abkürzung für Potenz (p, nach anderen pondus hydrogenii), Maß für Wasserstoffionenkonzentration. Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration: $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ .
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SFI	Spezifischer Fluoreszenz-Index
TEMED	N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-Alpha
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VCR	Vincristin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor, vascular permeability factor</i>
VERA	Verapamil
VM26	Teniposid
ZNS	Zentralnervensystem

## **7.2 Publikation**

Reichert M, Steinbach JP, Supra P, Weller M (2002) Modulation of growth and radiochemosensitivity of human malignant glioma cells by acidosis. Cancer 95:1113-9

## **7.3 Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. Michael Weller, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt hat, für seine vielen wertvollen Anregungen und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Weiter möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Neuroonkologie (unter Leitung von Herrn Professor Dr. Michael Weller) bedanken und hier im Besonderen Privatdozent Dr. Joachim Steinbach, Monika Kermer, Dr. Tamara Glaser und Petra Supra.