

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

**Neuartige Nitroimidazol-Derivate als mögliche  
hypoxische Radiosensitizer in der Radiotherapie  
solider Tumoren**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

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

**vorgelegt von**

**Langenbacher, Matthias Klaus**

**2017**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder

Tag der Disputation: 24.05.2017

## **Inhaltsverzeichnis**

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Tumorhypoxie .....	1
1.2 Hypoxie und Radioresistenz .....	1
1.3 Hypoxie als Ausgangspunkt verschiedener Behandlungsstrategien.....	5
1.4 Wirkungsweise der Nitroimidazole.....	6
1.5 Nitroimidazole und ihr Wirkungsnachweis in klinischen Studien.....	8
1.6 Nitroimidazole und Toxizität.....	10
1.7 Zielsetzung .....	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	13
2.1.2 Medien und Lösungen.....	13
2.1.2.1 Zellkultur .....	13
2.1.2.2 FACS .....	14
2.1.2.3 Koloniebildung .....	14
2.1.3 Nitroimidazol-Derivate .....	14
2.1.4 Zelllinien .....	15
2.1.5 Laborgeräte.....	15
2.1.6 Verbrauchsmaterial .....	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Zellkultur.....	16
2.2.1.1 Kultivierung der Zellen .....	16

2.2.1.2 Auftauen der Zellen .....	17
2.2.1.3 Langzeitlagerung der Zellen .....	17
2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl .....	17
2.2.2 Behandlung der Zellen .....	18
2.2.2.1 Nitroimidazol-Derivate und Herstellung der Stammlösungen ....	18
2.2.2.2 Sterilfiltration der Nitroimidazole .....	20
2.2.2.3 Schaffung eines anaeroben Milieus.....	20
2.2.2.4 Bestrahlung der Zellen.....	20
2.2.3 Kombinierte Behandlungsansätze.....	21
2.2.3.1 Sequenzielle Verdünnungsreihe .....	21
2.2.3.2 Koloniebildungsassays .....	23
2.2.4. Durchflusszytometrie.....	26
2.2.4.1 Apoptose und Zellzyklus (Nicoletti).....	28
2.2.4.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials (TMRE) .....	30
2.2.4.3 Annexin-V-/Propidiumiodid-Doppelfärbung von Glioblastomzellen .....	30
2.2.4.4 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels CM- H <sub>2</sub> DCFDA .....	32
2.2.5 Statistik.....	32
3. Ergebnisse .....	34
3.1 Hypoxisch-zytotoxische Wirkung der Nitroimidazol-Derivate im Vergleich .....	34
3.2 Hypoxisch-radiosensibilisierender Effekt von PRC .....	35
3.3 Vergleich der Zytotoxizität unter Hypoxie von PRC und F-Misonidazol ..	36
3.4 Koloniebildung von T98G-Zellen nach Behandlung mit PRC.....	39
3.5 Zellzyklusanalyse PRC-behandelter Glioblastomzellen .....	40
3.6 Apoptose-Assay, Annexin-V-/Propidiumiodid-Doppelfärbung.....	42

3.7 Einfluss von PRC auf das mitochondriale Membranpotential .....	45
3.8. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter PRC .....	47
3.9. Radiosensibilisierender Effekt von PRC unter Hypoxie .....	48
4. Diskussion .....	51
4.1. Neuartige Nitroimidazol-Derivate im Vergleich .....	51
4.2. Hypoxische Zytotoxizität von PRC im Vergleich mit F-Misonidazol .....	51
4.3. Einfluss von PRC auf den Zellzyklus von Glioblastomzellen .....	53
4.4. Hypoxisch-radiosensibilisierende Wirkung von PRC .....	54
5. Schlussfolgerung und Ausblick.....	56
6. Zusammenfassung.....	57
Literaturverzeichnis .....	59
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....	68
Veröffentlichungen .....	69

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Nitro-Reduktion von Nitroimidazolen (RNO <sub>2</sub> ) durch Reduktase unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen .....	6
<b>Abbildung 2:</b> Vorgeschlagener Mechanismus für die Reaktion von Nitroimidazolen mit zellulären Nukleophilen (Nu) .....	7
<b>Abbildung 3:</b> Synthese von N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin (PRC) .....	19
<b>Abbildung 4:</b> Bestrahlung der Zellen (Schema) .....	21
<b>Abbildung 5:</b> Schaffung eines anaeroben Milieus.....	22
<b>Abbildung 6:</b> Sequenzielle Verdünnung der Jurkat-Lymphomzellen .....	23
<b>Abbildung 7:</b> Histogramm mit Zellverteilung .....	27
<b>Abbildung 8:</b> Histogramme mit Dot-Plots.....	28
<b>Abbildung 9:</b> Hypoxisch-zytotoxische Wirkung der neuartigen Nitroimidazol-Derivate .....	35
<b>Abbildung 10:</b> Hypoxisch-zytotoxische und hypoxisch-radiosensibilisierende Wirkung des neuartigen Nitroimidazol-Derivats PRC .....	36
<b>Abbildung 11:</b> Hypoxisch-zytotoxische Wirkung von F-Misonidazol (F-Miso) und PRC auf Jurkat-Lymphomzellen im Vergleich .....	38
<b>Abbildung 12:</b> PRC wirkt auf T98G-Zellen hypoxisch-zytotoxisch .....	40
<b>Abbildung 13:</b> PRC stimuliert unter hypoxischem Stress den Übergang von der G <sub>1</sub> - in die S-Phase und führt zu einer Akkumulation in der G <sub>2</sub> -Phase des Zellzyklus.....	42
<b>Abbildung 14:</b> PRC führt bei T98G-Glioblastomzellen unter hypoxischem Stress zu einer Phospholipid-Translokation an der Plasmamembran .....	44
<b>Abbildung 15:</b> PRC beschleunigt bei T98G-Glioblastomzellen die durch Hypoxie und Reoxygenierung induzierte Hyperpolarisation und den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ M).....	46
<b>Abbildung 16:</b> PRC führt zu einer Zunahme der durch Hypoxie und Reoxygenierung induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	47
<b>Abbildung 17:</b> Radiosensibilisierender Effekt von PRC unter Hypoxie .....	49

## **Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Summenformeln der neusynthetisierten Nitroimidazolderivate ..... 18

## Abkürzungsverzeichnis

*OH	Hydroxylradikal
$\alpha$	Alpha
A-E-NI	N-[2-(Aminooxy)Ethyl]-2-Nitroimidazol
ANOVA	Analysis Of Variance
ATCC	American Type Culture Collection
Bak	Bcl-2 Antagonist
CCCP	Carbonylcyanid-m- Chlorophenylhydrazon
CHO	Chinese Hamster Ovary
CM-H <sub>2</sub> -DCFDA	5-(und 6)-chloromethyl-2',7'- dichlorodihydrofluorescein-Diazetat
DAHANCA	Danish Association of Head and Neck Cancer
$\Delta\Psi$	Mitochondriales Membranpotential
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Enhancement Ratio
FA	Formaldehyd
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
F-B-NI	N-{4-[(4- Fluorobenzyliden)Aminooxy]Butyl}-2- Nitroimidazol
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
F-Miso	F-Misonidazol
F-P-NI	N-{3-[(4- Fluorobenzyliden)Aminooxy]Propyl}-2- Nitroimidazol

FSC	Forward Scatter
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde
Gy	Gray
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HR	Homologe Rekombination
INO	1-Methyl-2-Nitrosoimidazol
LINAC	Linear Accelerator
MeV	Megaelektronenvolt
min	Minute
mg/mmol	Milligramm pro Millimol
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl
NHEJ	Non-Homologous End Joining
nM	Nanomolar (nmol/l)
nm	Nanometer
Nu	Nukleophil
OEF	Oxygen Enhancement Factor
p	p-Wert
PBS	Phosphat Buffered Saline
PE	Plating Efficiency
PI	Propidiumiodid

PRC	N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin
PS	Phosphatidylserin
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	RPMI-1640 Zellkulturmedium
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SE	Standard Error (Standardfehler)
SSC	Sideward Scatter
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
U/min	Umdrehungen pro Minute

# **1. Einleitung**

## **1.1 Tumorhypoxie**

Hypoxie ist ein besonderes Charakteristikum maligner Gewebe. Als Folge einer mangelhaften Blutversorgung ist Hypoxie in chronischer aber auch in intermittierend auftretender, akuter Form häufig in Tumoren nachweisbar [1-3]. Hypoxische Areale bilden sich schon früh im Verlauf der Tumorgenese aus und persistieren auch nach Vaskularisation des Tumorgewebes. Tumorhypoxie ist ein entscheidender Faktor für die Resistenz des Tumors gegenüber Strahlentherapie: Hypoxische Tumorzellen benötigen verglichen mit euoxischen Zellen eine ca. dreifach höhere Strahlendosis, um in gleichartiger Weise abgetötet zu werden [4]. Hypoxie beschleunigt zudem die Mutagenese der Tumorzellen und fördert die maligne Progression [5-8]. Daher ist die pharmakologische Sensibilisierung hypoxischer Zellen gegenüber Strahlentherapie ein vielversprechendes therapeutisches Prinzip. Eine wichtige Rolle spielen dabei auch die Vertreter der Gruppe der Nitroimidazole. Diese reichern sich in hypoxischen Tumorarealen an und imitieren als Elektronenakzeptoren die radiosensibilisierende Wirkung des Sauerstoffs [9]. Als Leitsubstanz der Nitroimidazole kann das Misonidazol angesehen werden, für das in klinischen Studien eine hypoxisch-radiosensibilisierende Wirkung angenommen wurde [10, 11]. Die klinische Anwendung von Misonidazol wird jedoch durch dessen neurotoxische Wirkung beschränkt, was als limitierender Faktor für das Erreichen der für eine Radiosensibilisierung nötigen Konzentrationen gilt [12].

## **1.2 Hypoxie und Radioresistenz**

Eine definitive Radio- bzw. Radiochemotherapie ist die einzige kurative Therapieoption bei lokal oder lokoregionär begrenzten und funktionell bzw. anatomisch inoperablen soliden Tumoren. Sie spielt auch insbesondere unter dem Gesichtspunkt des Organerhalts eine zentrale Rolle bei der Therapie

häufiger Tumorentitäten, wie lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, bei inoperablen, lokal begrenzten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Karzinomen des Oesophagus, beim Cervix-Karzinom oder bei Analkarzinomen. Voraussetzung für eine langfristige Heilung ist dabei das Abtöten bzw. die Inaktivierung aller klonogenen Tumorzellen, die ansonsten zu Lokalrezidiven oder potentiellen sekundären Fernmetastasen heranwachsen können.

Der radiogenen Tumorkontrolle liegen folgende zelluläre Mechanismen zugrunde:

1. Programmierter Zelltod: Zellulärer Stress, entstanden nach ionisierender Bestrahlung durch Schädigung der DNA, setzt eine Kaskade pro-apoptotischer Regulationsproteine in Gang und führt letztendlich zum Zelltod. Am Anfang dieser Kette steht das Tumorsuppressor-Protein p53. Dieses Protein gilt als einer der entscheidende Apoptoseinduktoren. Ebenso, wenn auch in weitaus geringerem Ausmaß, kann eine durch Radiatio hervorgerufene Schädigung auf Zellmembranebene über membrangebundene Moleküle wie zum Beispiel Sphingomyelin zu apoptosefördernden Signalen führen [13].

2. Nekroseinduktion: Im Gegensatz zur Apoptose kann die Nekrose sowohl programmiert (Nekroptose) als auch als passiver Prozess ablaufen. Dabei rupturiert die Plasmamembran, wobei die Freisetzung immunogen wirkender zytoplasmatischer Moleküle eine lokale Entzündungsreaktion auslöst [14].

3. Mitotische Katastrophe: Nicht reparierte durch ionisierende Bestrahlung verursachte DNA-Doppelstrangbrüche führen während der Mitose zu Chromosomenaberrationen. Dies verursacht die Bildung nonklonogener Tochterzellen und mündet für gewöhnlich in Nekrose [15, 16].

4. Seneszenz: Durch Radiatio verursachte DNA-Doppelstrangbrüche im Bereich der Chromosomenenden können Ursache extrinsischer, das heißt Telomer-unabhängiger, Seneszenz sein [17]. Man nimmt an, dass ähnlich dem programmierten Zelltod, das "Wächterprotein" p53 am Anfang einer Signalkette steht, in deren Verlauf unter anderem über eine Inaktivierung von

zellzyklussteuernden Proteinkomplexen ein Arrest in der G1-Phase stattfindet [18].

Das Ziel der Eradikation aller klonogenen Zellen ist in vielen Situationen durch Dosiskompromisse aufgrund der begrenzten Toleranz des benachbarten Lokalgewebes kompromittiert. Zudem wirken auch intrinsische Resistenzmechanismen des Tumorgewebes diesem Ziel entgegen. Die schlechte Sauerstoffversorgung maligner Gewebe stellt dabei einen ganz zentralen und radiobiologisch gut charakterisierten Resistenzfaktor dar: Schon seit mehr als einem halben Jahrhundert ist bekannt, dass die Effizienz einer Strahlentherapie oder bestimmter DNA-schädigenden Chemotherapeutika von einer adäquaten Sauerstoffkonzentration im Tumorgewebe abhängt und somit akute oder chronische Hypoxie ( $pO_2 < 10$  mmHg) direkt den klinischen Therapieerfolg mindert [4, 19].

In verschiedenen zellfreien und zellulären *in vitro* Systemen konnte dabei direkt gezeigt werden, dass Sauerstoff die Anzahl strahlungsinduzierter DNA-Strangbrüche erhöht. Sauerstoff-Verstärkungsfaktoren (oxygen enhancement factor; OEF) von 2.8 bis 6.3 wurden beobachtet [20-23]. Ionisierende Strahlung schädigt zum geringeren Teil direkt und zum überwiegenden Teil indirekt über homolytische Spaltung von Wasser in Hydroxylradikale (\*OH) die DNA. Hydroxylradikale bewirken die Bildung von DNA-Radikalen [24, 25]. Dabei hängt die Überführung der DNA-Radikale in Strangbruchvorstufen von dem Redoxstatus der Zelle ab. In euoxischen Zellen fördert  $O_2$  die Bildung von DNA-Strangbrüchen. Ein reduktives Milieu hingegen (niedriger Sauerstoff-Partialdruck, hoher Anteil von reduziertem Glutathion bezogen auf oxidiertes Glutathion) in hypoxischen Zellen wirkt durch Wasserstoffübertragung auf die DNA-Radikale der Bildung der Strangbruch-Vorstufen entgegen [26-31].

Zum Teil beruht die erhöhte Radioresistenz hypoxischer Zellen aber wohl auch auf indirekten Mechanismen: Ausgeprägte Hypoxie führt zur Reduktion der Teilungsaktivität und zur Arretierung hypoxischer Tumorzellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Als zusätzlicher Effekt wird auch eine Modifikation der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden in hypoxischen Tumorzellen diskutiert

[32]. Allerdings sind hierbei je nach untersuchtem Tumorsystem divergente Ergebnisse zur Qualität der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch die beiden dafür verantwortlichen Mechanismen des Non-Homologous-Endjoining (NHEJ) bzw. der Homologen Rekombination (HR) beschrieben [33, 34]. Zumindest ist belegt, dass ein reduzierter Redoxstatus unter Hypoxie die Reparatur von strahleninduzierten, potentiell letalen DNA-Schäden verbessert und so den Erfolg einer Strahlentherapie mindert [35].

Repetitive Hypoxie selektiert außerdem langfristig Zellklone mit erhöhter Stressresistenz gegenüber Hypoxie und anderen Auslösern mitochondrialer Apoptose wie ionisierende Strahlung [8, 36]. Als wichtiger Mediator der Adaptation von Tumorzellen an ein limitiertes Sauerstoffangebot gilt dabei der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF), dessen  $O_2$ -regulierte  $\alpha$ -Untereinheit unter hypoxischen Bedingungen intrazellulär akkumuliert und als Transkriptionsfaktor wirkt [37, 38]. Dabei fungiert HIF unter anderem als Antagonist p53-gesteuerter Apoptose, beispielsweise nach strahlungsinduzierter DNA-Schädigung, oder wirkt nach Radiotherapie der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) entgegen. Die Überexpression von HIF in Tumorzellen korreliert überwiegend mit aggressivem Wachstum und schlechter Prognose [39-45].

Messbare Sauerstoffeffekte treten bereits bei Sauerstoffpartialdrücken unter 25 mmHg auf. Eine steile Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zwischen  $O_2$ -Konzentration und Zelltod ist aber insbesondere zwischen  $pO_2$ -Werten von 10 bis 1 mmHg zu beobachten [46, 47]. Dies wurde zunächst *in vitro* und im Tiermodell festgestellt. Durch die Entwicklung polarographischer Elektroden, die *in vivo*-Messungen des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe von Tumorpatienten ermöglichen, konnte bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen diese steile  $pO_2$ -Wirkungs-Beziehung auch in prospektiven klinischen Studien bestätigt werden. Die meisten dieser Studien wurden bei Patienten mit Cervix-Karzinomen, Plattenepithel-Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs oder bei Patienten mit Sarkomen durchgeführt, da diese Entitäten einer invasiven Messung ohne allzu viel Aufwand zugänglich sind. Insbesondere bei Cervix-Karzinomen konnte durch eine ganze Reihe klinischer Studien die

Tumorhypoxie als wichtiger unabhängiger negativer Prognosefaktor identifiziert werden [5, 48-51]. Gerade ausgeprägt hypoxische Tumoren sind durch besonders aggressive Verläufe mit schlechter Prognose gekennzeichnet [48, 52-54]. Beispielsweise konnte durch *Xenotransplantation* menschlicher Pankreas-Karzinomzellen in immunsupprimierte Mäuse beschleunigtes Tumorwachstum sowie spontane Metastasierung in Zusammenhang mit Hypoxie festgestellt werden [55].

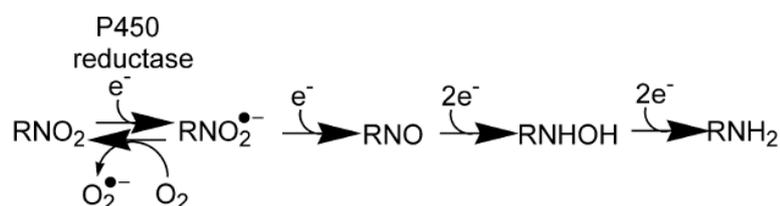
### **1.3 Hypoxie als Ausgangspunkt verschiedener Behandlungsstrategien**

In den letzten Jahrzehnten wurden deswegen mehrere Strategien verfolgt, um die Oxygenierung von Tumorgewebe zu verbessern. Dazu gehören optimierte Fraktionierung der Strahlendosis (das Absterben von Tumormasse zwischen den Fraktionen erhöht die Sauerstoffversorgung der überlebenden Tumorzellen) [56], erhöhte Sauerstoffpartialdrücke in der Atemluft, Durchblutungssteigerung durch vasoaktive Substanzen, Erhöhung des Hämatokrits, oder erleichterte Freisetzung des Sauerstoffs aus dem Hämoglobin [57]. Für diese Hypoxie-modifizierenden Methoden konnte in einer jüngeren Metaanalyse eine Verbesserung bezüglich der lokoregionären Tumorkontrolle sowie krankheitsspezifischem und Gesamtüberleben bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen werden [11]. Ein weiterer Ansatzpunkt, die Prognose hypoxischer Tumorerkrankungen zu verbessern, ist die Hemmung der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität [58, 59]. Bis auf oben genannte Metaanalyse fehlen jedoch für diese Ansätze zur Verbesserung der Tumoroxygenierung vor Radiotherapie weitere Wirksamkeitsnachweise aus klinischen Studien. Daher gewinnt ein anderer Blickwinkel auf das Problem der Tumorhypoxie zunehmend an Interesse: Hypoxie ist eine weitgehend exklusive Eigenart von Tumorgewebe, während Normalgewebe unter physiologischen Verhältnissen gut oxygeniert ist. Dieser Umstand böte daher zumindest theoretisch die Möglichkeit die Tumorhypoxie als therapeutisches «Target» zu nutzen [60].

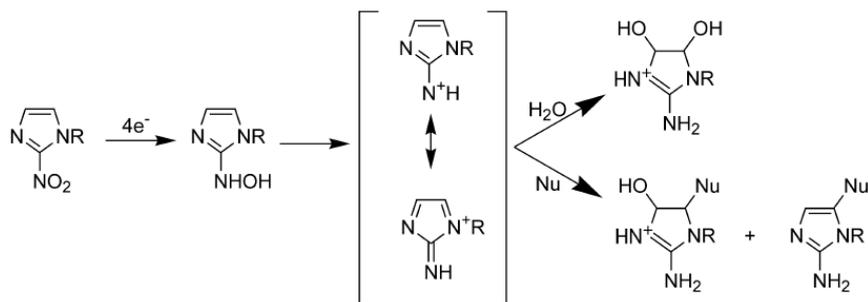
Solche Therapieansätze versuchen, beispielsweise durch Induktion der endogenen NO-Synthese [61, 62] oder mit bioreduktiven Pharmaka spezifisch hypoxische Tumorzellen zu schädigen. So werden etwa Mitomycin C oder Tirapazamin in die Zelle aufgenommen und bei niedrigen Sauerstoffspannungen zu zytotoxischen Wirkstoffen reduziert [57]. Ähnlich wirken Nitroimidazole, die sich wie die hypoxischen Zytotoxine in hypoxischen Zellen anreichern, dort aber zusätzlich als Sauerstoff-Mimetika den radiosensibilisierenden Sauerstoffeffekt imitieren.

#### 1.4 Wirkungsweise der Nitroimidazole

Nitroimidazole mit ihrem prominentesten Vertreter Misonidazol wirken im hypoxischen Gewebe als Sauerstoff-Mimetika, die als Elektronenakzeptoren, den oben beschriebenen strahlensensibilisierenden Effekt von Sauerstoff imitieren. Unter Hypoxie werden die Elektronen der Atmungskette auf Nitroimidazole übertragen und diese Substanzen zu reaktiven Stickstoffverbindungen reduziert (Abbildung 1). Diese binden kovalent an Makromoleküle und reichern sich so im hypoxischen Gewebe intrazellulär an (Abbildung 2). Die Reaktivität dieser Stickstoffverbindungen verhindert dabei die Diffusion aus der Zelle, sodass extrazelluläre Proteine nicht alkyliert werden können [63]. Ist im Gewebe ausreichend Sauerstoff vorhanden, wird dieser Mechanismus durch Reoxidation des Reduktionsprodukts in Schritt eins (Abbildung 1) inhibiert.



**Abbildung 1. Nitro-Reduktion von Nitroimidazolen (RNO<sub>2</sub>) durch Reduktase unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen** (nach Nagasawa et al. [9]).



**Abbildung 2. Vorgeschlagerter Mechanismus für die Reaktion von Nitroimidazolen mit zellulären Nucleophilen (Nu)** (nach Nagasawa et al. [9]).

Diese hypoxische Anreicherung der Nitroimidazole wird zum einen für bildgebende Verfahren ausgenutzt. Zum Beispiel wird der Tracer  $^{18}\text{F}$ -Misonidazol routinemäßig in der Positronen-Emissions-Tomographie zur Darstellung hypoxischer Tumorareale verwendet [64]. Zum anderen lässt sich über bifunktionelle Nitroimidazole der radiosensibilisierende Effekt mit einem hypoxisch-zytotoxischen Effekt kombinieren [9]. Als mögliche Auslöser dieser hypoxischen Zellzytotoxizität rücken dabei die reaktiven Reduktionsprodukte der Nitroimidazole in den Fokus. Diese sind in der Lage an zelluläre DNA zu binden, interagieren jedoch auch mit weiteren intrazellulären Bestandteilen. Vor allem 1-Methyl-2-Nitrosoimidazol (INO), das  $2e^-$ -Reduktionsprodukt, führt unter hypoxischen Bedingungen zu einem Verbrauch intrazellulärer Thiole und damit weiterführend zur Beeinträchtigung zellulärer Proteinfunktionen. Unter anderem davon betroffen ist der Elektrolyt-Stoffwechsel mit unphysiologischem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Daneben findet die Bildung stabiler Konjugate mit Glutathion statt und daraus resultierend ein vermehrter Verbrauch des einflussreichen Antioxidans, von welchem erhöhte Level nachgewiesenermaßen vor oxidativem Stress schützen. In Versuchen mit CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) unter Hypoxie korrelierte der Glutathion-Verbrauch mit der Zytotoxizität. Bei einem Glutathion-Level  $< 20\%$  zur Kontrollgruppe (aerobes Setting) setzte gar ein signifikantes Zellsterben ein. Zudem konnten neben den oben beschriebenen Effekten elektromikroskopisch

der Apoptose entsprechende Veränderungen in der zellulären Morphologie beobachtet werden [65-67].

Diese zellulären Veränderungen führen letztlich zum Zelltod, jedoch konnte bisher nicht endgültig geklärt werden ob die alleinige Bindung an DNA durch reduziertes Nitroimidazol oder daneben auch Interaktionen mit weiteren intrazellulären Bestandteilen als primäre Ursache für das Sterben der Zellen verantwortlich sind.

Auch unter aeroben Bedingungen sind Nitroradikalanionen in der Lage zytotoxisch zu wirken. Im Falle von nitrosativem Stress kommt es in Gegenwart von Superoxidanionen zur Bildung von hochreaktivem Peroxynitrit, welches durch Reaktion mit aromatischen Aminosäuren verschiedenster, unter anderem für den Zellstoffwechsel wichtiger Proteine, wie z. B. Enzyme der Atmungskette und Ionenkanäle, stark gewebeschädigend wirkt [65, 68]. Neben einer Vielzahl anderer zellulärer Effekte führen Peroxinitritradikale über DNA-Modifikationen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, sowie zur Induktion von Reparaturmechanismen und Apoptose [69].

### **1.5 Nitroimidazole und ihr Wirkungsnachweis in klinischen Studien**

Vor mehr als 30 Jahren wurden für das bis dahin hauptsächlich als Antibiotikum eingesetzte 5-Nitroimidazol Metronidazol in ersten klinischen Studien radiosensibilisierende Effekte angenommen. Später stellte sich heraus, dass 2-Nitroimidazole wie Misonidazol mit ihrer höheren Elektronenaffinität eine effizientere Wirkung aufweisen [70]. In *in vitro*-Modellen lässt sich der strahlensensibilisierende Effekt leicht direkt nachweisen. So steigert Misonidazol die Anzahl der strahleninduzierten Doppelstrangbrüche bzw. den Zelltod von *E. coli* um Faktor 2 bzw. 2.6 [21]. Zwar erwies sich Misonidazol in präklinischen Studien als effektiver Radiosensitizer, jedoch wurden dosislimitierende Nebeneffekte, allen voran eine Beeinträchtigung des peripheren Nervensystems, beobachtet [71]. Besser toleriert als Misonidazol wird Etanidazol, ein Nitroimidazol der zweiten Generation, welches in bis zu

dreifach höheren Dosen gegeben werden kann. In randomisierten Studien konnte für Etanidazol allerdings keine signifikante Effizienz als Radiosensitizer nachgewiesen werden [72, 73]. Auch weitere, neuer entwickelte, weniger neurotoxische Nitroimidazole zeigen *in vitro* durchaus vielversprechende Ansätze. So wurde beispielsweise für Doranidazol unter hypoxischen Bedingungen nach Bestrahlung eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens bzw. ein erhöhtes Zellsterben kolorektaler Karzinomzellen beobachtet [74]. Ebenso konnten für dieses Nitroimidazol erhöhte bestrahlungsinduzierte Apoptoseraten in Maus-Lymphomzellen nachgewiesen werden [75]. Auch eine gesteigerte lokale Tumorkontrolle von in Mäusen wachsenden Mamma-Karzinomen konnte durch Behandlung mit Doranidazol unmittelbar vor einfacher oder fraktionierter Bestrahlung festgestellt werden [76]. Der Einsatz von Sanazol, einem Nitroimidazol der dritten Generation, führt in Kombination mit ionisierender Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate humaner Lymphomzellen. Ohne kombinierte Radiatio indes wird durch Sanazol keine Apoptose induziert [77]. Ein weiterer Ansatz ist der Versuch, durch neu konfigurierte Nitroimidazole gezielt membranständige Transportsysteme, wie beispielsweise Nukleosid- oder Glucose-Transporter, zur intrazellulären Anreicherung der hypoxischen Radiosensitizer zu nutzen. Erste *in-vitro*-Versuche zeigten dabei radiosensibilisierende Effekte [78, 79].

In klinischen Phase-3-Studien (Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) und Danish Association of Head and Neck Cancer (DAHANCA)) dagegen ließ sich ein hypoxisch-radiosensibilisierender Effekt der untersuchten Nitroimidazole (Misonidazol, Nimorazol und oben erwähntes Etanidazol) bei Kopf-Hals-, Zervix- und Lungenkarzinomen zunächst nicht feststellen [10, 80-84]. Zwei jüngere Studien jedoch zeigten, dass eine mit Misonidazol kombinierte Strahlentherapie das Einjahresüberleben von Patienten mit High-grade-Astrozytomen signifikant um 8% erhöht [85], und dass eine Radiochemotherapie mit Nimorazol die lokoregionäre Tumorkontrolle und das tumorabhängige Überleben von Patienten mit Kehlkopf-Rachen-Tumoren signifikant verbessert [86]. Radiochemotherapie mit Nimorazol zeigte ebenso eine Verbesserung der Prognose bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen in

Verbindung mit einem erhöhten Plasmaspiegel von Osteopontin, einem Glykoprotein, dessen Überexpression als negativer Prognosefaktor gilt [87]. Eine jüngere Metaanalyse konnte dagegen keine positiven Effekte von Nitroimidazolen auf die Therapie von Zervixkarzinomen feststellen [88]. Dennoch wird zumindest Nimorazol als hypoxischer Radiosensitizer bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich in Dänemark bereits im klinischen Routineeinsatz verwendet [89]. Eine weitere randomisierte Phase-3-Studie mit Doranidazol in Kombination mit intraoperativer Radiotherapie bei nicht resektablen Pankreaskarzinomen ergab, bei unverändertem Kurzzeitüberleben, eine signifikante Erhöhung der 3-Jahres-Überlebensrate (Doranidazol-Gruppe vs. Placebo-Gruppe; 23% vs. 0%,  $p=0.0192$ ) [90].

Darüber hinaus werden weitere Wirkungen neuartiger Nitroimidazol-Derivate wie die Hemmung tumoröser Angiogenese, anti-metastasierende Effekte oder der Einsatz in Kombination mit stereotaktischen Bestrahlungstechniken diskutiert [89, 91].

### **1.6 Nitroimidazole und Toxizität**

Wie bereits erwähnt wurde, ist das Nebenwirkungsprofil der Nitroimidazole ein entscheidender Aspekt im Hinblick auf die klinische Einsatzfähigkeit dieser Substanzen. Vor allem das klinisch am ausführlichsten untersuchte 2-Nitroimidazol Misonidazol zeigte sich, neben tolerablen Nebenwirkungen wie gastrointestinale Störungen mit Übelkeit und Erbrechen oder leichtgradige allergische Hautreaktionen, für eine signifikante Neurotoxizität verantwortlich. Periphere und zentrale Neuropathien bis hin zu irreversiblen Axondegenerationen sind beschrieben [92-97] und begrenzen den Einsatz der Nitroimidazole als hypoxische Radiosensitizer und als Hypoxie-spezifische Tracer in bildgebenden Verfahren. Patienten entwickelten im Verlauf unter der Einnahme vom Misonidazol erste Symptome, wie leichte Parästhesien und Taubheitsgefühle in den distalen Extremitäten, später zeigte sich teilweise das Vollbild einer peripheren sensiblen Polyneuropathie, einzeln auch in Kombination mit einem akuten organischen Psychosyndrom. Unter höheren

Dosen wurden vereinzelt epileptische Anfälle beobachtet. Selten entwickelten sich motorische Störungen. Nicht immer waren die Symptome im Verlauf nach Absetzen der Substanz komplett reversibel. Als entscheidend für den Grad der Ausprägung der Polyneuropathie stellte sich dabei unter anderem die Einnahmefrequenz des hypoxischen Radiosensitizers heraus. So entwickelten Patienten mit täglichem Einnahmeschema deutlich stärkere Symptome als Patienten, die das Nitroimidazol maximal zweimal pro Woche einnahmen, obwohl die Gesamtdosis und der Wirkspiegel im Serum in beiden Fällen identisch waren [98-100]. In Nervenbiopsien bei Patienten mit einer durch Misonidazol induzierten sensiblen Polyneuropathie konnten mikroskopisch distale axonale Degenerationen mit segmentaler Demyelinisierung festgestellt werden [101]. Zwar konnte durch Reduktion der Gesamtdosis von Misonidazol ( $< 12 \text{ g/m}^2$ ) ein vermindertes Auftreten peripherer Neuropathien unter den Wert von 10% festgestellt werden, gleichzeitig erzielten Radiochemotherapien verschiedener Tumorentitäten unter dieser Dosisbeschränkung aber auch keinen nachweisbaren klinischen Benefit [12, 102-104].

Ein Ansatzpunkt zur Entwicklung brauchbarer Substanzen für den klinischen Einsatz ist die Anreicherung im Nervengewebe zu verringern. In Tierversuchen konnte für im Vergleich zu Misonidazol weniger lipophile 2-Nitroimidazole eine verminderte Neurotoxizität nachgewiesen werden [105-107]. Des Weiteren wurden Versuche unternommen durch Entwicklung effektiverer Nitroimidazol-Derivate und damit verbundener Dosisreduktion mögliche Nebenwirkungen zu minimieren [108]. Doch wie bereits beschrieben (unter 1.5), zeigten sich trotz teils vielversprechender Ansätze anhand von *in-vitro*-Modellen klinisch meist nur geringe Erfolge [11]. Einzelne Nitroimidazole müssen zukünftig in weiteren klinischen Tests noch auf ihre radiosensibilisierende Wirkung bei tolerablem Nebenwirkungsprofil hin geprüft werden.

### **1.7 Zielsetzung**

Tumorhypoxie und schnelle maligne Tumorprogression bedingen sich gegenseitig. Hypoxische Tumorareale zeichnen sich zudem durch eine höhere

Resistenz gegenüber Strahlentherapie aus und sind daher potentiell eine der Hauptursachen für Lokalrezidive, obwohl die Tumorregion bis an die Grenze der tolerablen Dosis behandelt wurde. Die Kombination von Radiotherapie mit Substanzen, die selektiv hypoxische Zellen radiosensibilisieren und/oder spezifisch auf hypoxische Zellen zytotoxisch wirken, ist daher ein vielversprechendes Therapieprinzip.

Nitroimidazole sind Sauerstoff-Mimetika, die nachgewiesenerweise als hypoxische Radiosensitizer die Hypoxie-vermittelte Radioresistenz aufheben und sich als hypoxische Zellgifte in hypoxischen Zellen anreichern. Sie sind deswegen ideale Substanzen für eine zur Radiotherapie konkomitante Chemotherapie. Die neurotoxischen Nebenwirkungen der derzeit erprobten Nitroimidazole erlauben jedoch kaum deren klinischen Einsatz in effektiven Konzentrationen. In Zusammenarbeit mit Dr. Raid J. Abdel-Jalil, Vice Dean, Faculty of Science, Hashemite University, Jordanien in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Voelter, Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen, sind daher neuartige, bifunktionelle Nitroimidazol-Derivate entwickelt worden, die in der vorliegenden Arbeit auf ihre hypoxisch-zytotoxischen und hypoxisch-radiosensibilisierenden Eigenschaften *in vitro* getestet wurden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

5 D-Glucose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Annexin-V-Fluos	Roche (Mannheim, Deutschland)
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CCCP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Coomassie Blue	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DMSO (Dimethyl Sulphoxide)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
FA (Formaldehyd)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	MP Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
NaCl (Natriumchlorid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KCl (Kaliumchlorid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumhydrogenphosphat)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TMRE	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Triton-X 100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

#### 2.1.2 Medien und Lösungen

##### 2.1.2.1 Zellkultur

PBS: 0,8 g/l NaCl

1,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

0,2 g/l KCl  
0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4-7,6

RPMI 1640 (Nährmedium)	Gibco Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)
DMSO (für Zellkultur)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
0,05% Trypsin/EDTA	Gibco Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

### 2.1.2.2 FACS

Nicoletti-Lösung:	0,1% NaCitrat	
	0,1% TritonX 100	
	10 µg/ml Propidium Iodid	
TMRE:	25 nM TMRE in Medium	
PI-Lösung:	10 µg/ml PI (Stock 1 mg/ml)	
Annexin-V-FLUOS- Bindungspuffer:	10 mM HEP	
	140 mM NaCl	
	5 mM CaCl <sub>2</sub>	
FACS-Routine:	FACS Flow	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
	FACS Clean	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
	FACS Rinse	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

### 2.1.2.3 Koloniebildung

3,7% Formaldehyd  
70% Ethanol

Coomassie-Färbelösung:	20% Methanol
	7,5% Essigsäure
	Aqua dest.
	0,05% Coomassie Blue

### 2.1.3 Nitroimidazol-Derivate

F-Misonidazol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
---------------	--

PRC	N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin
A-E-NI	N-[2-(Aminooxy)Ethyl]-2-Nitroimidazol
F-B-NI	N-{4-[(4-Fluorobenzyliden)Aminooxy]Butyl}-2-Nitroimidazol
F-P-NI	N-{3-[(4-Fluorobenzylidene)Aminooxy]Propyl}-2-Nitroimidazol

### 2.1.4 Zelllinien

JCAM 1.6	Humane Jurkat Zelllinie, JCAM Bak-positiv, ATCC (Bethesda, USA)
T98G	Humane Glioblastom Zelllinie, ATCC (Bethesda, USA)

### 2.1.5 Laborgeräte

Begasungsbrutschrank HERAcell 240	Heraeus-Kendro (Hanau, Deutschland)
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Linearbeschleuniger LINAC SL25 6 MV	Philips (Hamburg, Deutschland)
Linearbeschleuniger LINAC 6 MV	Elekta (Stockholm, Schweden)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Mikroskop Wilovert S	Hund (Wetzlar, Deutschland)
Mixer Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin, Deutschland)
Pipetboy acu	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Pipette Research	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterile Werkbank SterilGARD III	Labotec (Dillenburg, Deutschland)
Waage Präzisionswaage R510	Kern (Balingen, Deutschland)
Wasserbad Haake DC10-P21	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zählkammer nach Neubauer	NeoLab (Heidelberg, Deutschland)
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Rotanta RPC	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

### 2.1.6 Verbrauchsmaterial

2 / 5 / 10 / 25 / 50 ml Pipetboy-Spitzen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
6- / 96-Well Zellkultur-Platten	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

50 / 250 ml Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
250 ml Zellkulturflaschen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
10 / 20 ml Spritzen	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
1,5 / 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
15 / 50 ml Zentrifugenröhrchen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
1,8 ml Cryotubes	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
0,20 µm Sterilfilter	Merck (Darmstadt, Deutschland)
5 ml Flow Cytometry Tubes	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
20 x 20 mm Deckgläser	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
GasPak-EZ Beutelsysteme	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Unter der sterilen Arbeitsbank wurden sowohl die Jurkat-Zelllinie JCAM 1.6, als auch die Glioblastom-Zelllinie T98G unter Zusatz von 10% FCS in RPMI Vollmedium kultiviert (Langzeit-Kulturmedium).

Die Inkubation beider Zelllinien fand im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre statt.

Um optimale Wachstumsverhältnisse zu erreichen, wurden die Jurkat-Zellen in Abständen von 3-7 Tagen, je nach Wachstumsverhalten, im Verhältnis 1:10 verdünnt und neu ausplattiert. Die adhärenenten Glioblastom-Zellen wurden, ebenfalls in Abhängigkeit ihres Wachstums, alle 3-7 Tage neu ausplattiert. Dabei wurde der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und 5 Minuten mit 2 ml 0,05% Trypsin/EDTA behandelt. Anschließend wurde zu den jetzt abgelösten Zellen 8 ml Medium gegeben und das Gemisch bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:10 ausgesät.

#### 2.2.1.2 Auftauen der Zellen

Die Jurkat-Zelllinie sowie die Glioblastom-Zelllinie T98G wurden für die Langzeitlagerung in einer Anzahl von jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen in einem Einfriermedium, bestehend aus RPMI-Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO, in Cryotubes in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Einfrierröhrchen wurden nach Entnahme aus dem Stickstofftank zuerst mit der Hand erwärmt und das Zellenmedium anschließend in 10 ml bei 37°C im Wasserbad vorgewärmtes Medium überführt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1200 U/min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml frisches Medium, unter gründlichem Durchmischen beim Pipettieren, aufgenommen.

#### 2.2.1.3 Langzeitlagerung der Zellen

Auf entgegengesetztem Weg wurden pro Cryotube jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml Einfriermedium gelöst. Vor der Lagerung im Stickstofftank wurden die Einfrierröhrchen für 24 Stunden in Isopropanol auf -80°C heruntergekühlt.

#### 2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Mit der Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter einer bestimmten Zellsuspension ermittelt. Um zwischen vitalen und toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen zunächst mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt. Der bei intakten Zellen vorhandene Transport des proteingebundenen Farbstoffes in den Extrazellularraum ist bei toten Zellen nicht mehr funktionsfähig, weshalb diese, nach dem Färben, unter dem Mikroskop blau zur Darstellung kommen. Nach Auflegen eines Deckglases wurde die Zählkammer mit der verdünnten Zellsuspension befüllt. Anschließend wurde unter dem Mikroskop die Zellzahl in den vier Großquadranten des Kammersystems bestimmt und die Anzahl pro Milliliter wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der Großquadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Aus der Zellanzahl der vier Quadranten wurde anschließend der Mittelwert berechnet.

## 2.2.2 Behandlung der Zellen

### 2.2.2.1 Nitroimidazol-Derivate und Herstellung der Stammlösungen

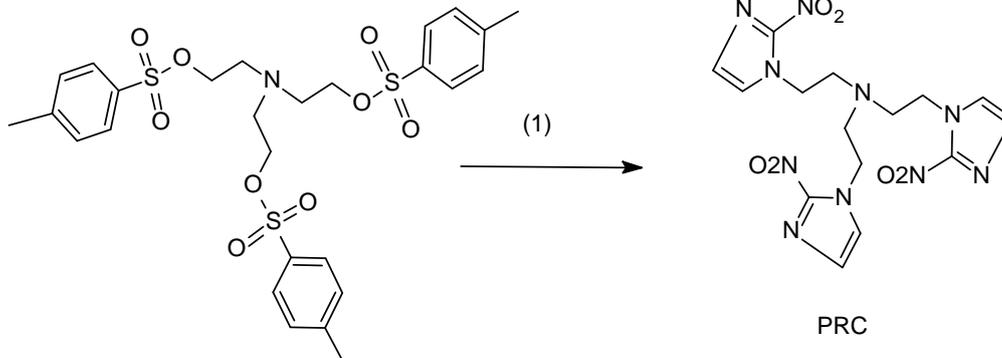
An der Hashemite Universität in Jordanien hat Herr Dr. Raid J. Abdel-Jalil in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Voelter, Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen, die in Tabelle 1 dargestellten neuen Nitroimidazol-Derivate synthetisiert. Diese Derivate wurden bereits aufgereinigt in großen Mengen unserer Abteilung zur Verfügung gestellt. Bei der Synthese der Nitroimidazol-Derivate wurden unterschiedliche funktionelle Gruppen (Amino, Fluorbenzol) über Aminooxy-Verbindungen (verknüpft über Ethyl-, Propyl- bzw. Butylketten) an die Nitroimidazol-Gruppe angehängt, um so bifunktionelle Derivate mit unterschiedlicher Lipid-Löslichkeit zu erhalten.

**Tabelle 1. Summenformeln der neusynthetisierten Nitroimidazol-Derivate.** A-E-NI: N-[2-(Aminooxy)Ethyl]-2-Nitroimidazol, F-P-NI: N-{3-[(4-Fluorobenzyliden)Aminooxy]Propyl}-2-Nitroimidazol, F-B-NI: N-{4-[(4-Fluorobenzyliden)Aminooxy]Butyl}-2-Nitroimidazol, PRC: N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amine. Die Nitroimidazole sind jeweils mit Summenformel und Molekulargewicht aufgeführt [109].

Nitroimidazol	Summenformel	Molekulargewicht [mg/mmol]
A-E-NI	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	172,142
F-P-NI	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	292,266
F-B-NI	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	306,292
PRC	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	434,367

In einem weiteren Ansatz (Abbildung 3) wurden in Gegenwart von Kaliumkarbonat (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) und Dimethylformamid (DMF) über ein tertiäres Amin drei Ethyl-Nitroimidazol-Gruppen bei 110°C über eine Reaktionszeit von 7 Stunden miteinander verknüpft [109]. Dadurch wurde zum einen eine erhöhte Elektronenakzeptorkapazität erreicht, zum anderen entstand ein Molekül,

welches unter Hypoxie Makromoleküle quervernetzen kann und somit verstärkt zytotoxisch wirkt.



(1): 2-Nitroimidazole;  $K_2CO_3$  / DMF, Hitze

**Abbildung 3. Synthese von N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin (PRC).** (1): in Gegenwart von 2-Nitroimidazolen, Kaliumkarbonat ( $K_2CO_3$ ) und Dimethylformamid (DMF) entsteht bei einer Temperatur von  $110^\circ C$  aus Tris(2-Chloroethyl)Aminhydrochlorid das Nitroimidazol PRC (modifiziert nach Langenbacher et al. [110]).

Die pulverförmigen Nitroimidazol-Derivate lagerten bei  $+8^\circ C$  im Kühlschrank. Zur Herstellung von Nitroimidazol-Stammlösungen wurden die Derivate jeweils in einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst. Dafür wurde die Einwaage mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Einwaage [mg]} = \text{Konzentration} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] \times \text{Molekulargewicht} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \right] \times \text{Volumen [l]}$$

Durch Aufwärmen im Wasserbad bei  $37^\circ C$  und mit Hilfe eines Magnetrührers konnten die Nitroimidazole vollständig in DMSO gelöst werden. Die Stammlösungen wurden zu aliquoten Teilen (1 ml) bei  $-20^\circ C$  gelagert.

#### 2.2.2.2 Sterilfiltration der Nitroimidazole

Für die jeweiligen Versuchsansätze wurden sowohl die Lymphom- als auch die Glioblastomzellen im Vorfeld für 24 oder 48 Stunden in Anwesenheit der Nitroimidazole (in Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$ ) kultiviert. Im ersten Schritt wurden die Nitroimidazol-Stammlösungen (100 mM) mit frischem Kulturmedium jeweils auf die entsprechende Konzentration verdünnt und als nächstes, um das Risiko beeinflussender Mikroorganismen möglichst gering zu halten, sterilfiltriert. Dafür wurde das Nitroimidazol-Medium-Gemisch in einer 10 ml Braun Injekt Spritze vorsichtig unter Druck durch einen Sterilfilter mit 0,20  $\mu\text{m}$  Porenweite (Millex®-FG) gepresst und in sterile 10 ml Röhrchen aufgenommen.

#### 2.2.2.3 Schaffung eines anaeroben Milieus

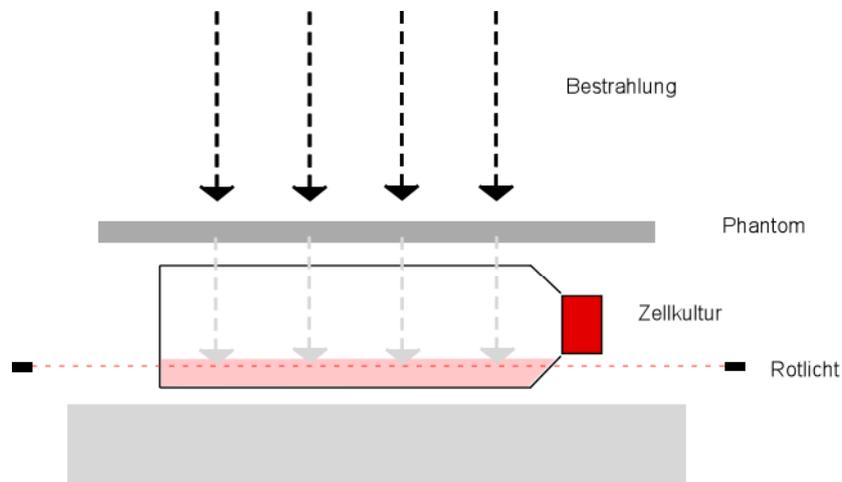
Zur Schaffung eines anaeroben Milieus wurden die Zellen je nach Experiment in Zellkulturplatten und Zellkulturflaschen luftdicht in GasPak-EZ-Beutelsysteme eingeschlossen und für mindestens 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Zur Kontrolle hypoxischer Verhältnisse im Beutel (0,1% O<sub>2</sub>) diente ein CO<sub>2</sub>-Indikatorstreifen, der per Farbumschlag ein anaerobes Milieu bestätigte.

#### 2.2.2.4 Bestrahlung der Zellen

Nach 24 oder 48 Stunden Kultivierungszeit im Brutschrank wurden die behandelten Zellen mittels einem Linearbeschleuniger (LINAC, englisch LINear ACcelerator) mit 6 MV Photonen bestrahlt (dies wurde mit einem Philips LINAC SL25 oder einem Elekta LINAC durchgeführt).

Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen in Kulturflaschen, bei anaeroben Bedingungen in Kulturflaschen in Beutelsystemen, mit Energiedosen von 2, 4, 5, 6, 8 oder 10 Gy bestrahlt. Zum Energieaufbau wurde eine die Körperoberfläche simulierende Bestrahlungsplatte (sogenanntes Phantom, siehe auch Abbildung 4) über den Kulturflaschen positioniert. Mit Hilfe von

Rotlichtsensoren konnte das Dosismaximum auf Höhe der Zellkulturen ausgerichtet werden.



**Abbildung 4. Bestrahlung der Zellen (Schema).** Je nach Versuchsansatz wurden die Zellkulturen mit Dosen von 2 bis 10 Gy bestrahlt. Mittels eines Phantoms wurde das Umgebungsgewebe des menschlichen Körpers simuliert.

## 2.2.3 Kombinierte Behandlungsansätze

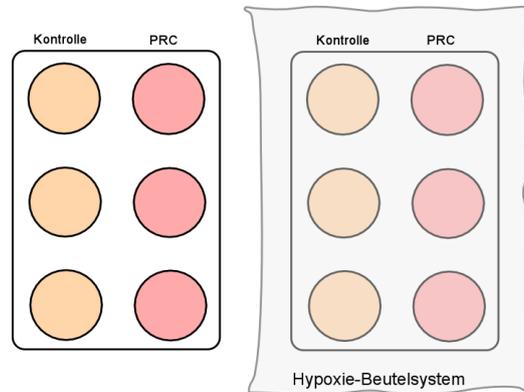
### 2.2.3.1 Sequenzielle Verdünnungsreihe

Bei diesem Experiment wurden Lymphomzellen in Ab- und Anwesenheit des Nitroimidazol-Derivats PRC unter norm- und hypoxischen Bedingungen kultiviert, mit 5 Gy bestrahlt und anschließend zur Bestimmung der niedrigsten Zellzahl, aus der noch eine Kultur angezogen werden kann, sequentiell verdünnt.

Zunächst wurden die Zellen der Jurkat-Lymphomreihe im Verhältnis 1:10 mit frischem Kulturmedium verdünnt und mit Hilfe der Neubauerzählkammer die Zellzahl pro Milliliter bestimmt.

Für den Versuchsansatz unter Normoxie wurde mit frischem Medium eine Zellsuspension der Konzentration  $25 \times 10^4$  Zellen/ml, für den Hypoxie-Ansatz eine Konzentration von  $50 \times 10^4$  Zellen/ml hergestellt und je zwei 6-Well-Zellkulturplatten mit 2 ml/Well der vorgesehenen Zellsuspension beladen. Drei

Wells pro Platte wurden zusätzlich mit 2  $\mu\text{l}$  der PRC-DMSO-Suspension (100  $\mu\text{M}$ ) behandelt.



**Abbildung 5. Schaffung eines anaeroben Milieus.** Inkubation von Jurkatzellen unter Normoxie (links) und Hypoxie im GasPak-EZ-Beutelsystem (0,1%  $\text{O}_2$ , rechts). Die rechte Spalte der 6-Well-Platten zeigt jeweils den zusätzlich mit PRC (100  $\mu\text{M}$ ) behandelten Ansatz.

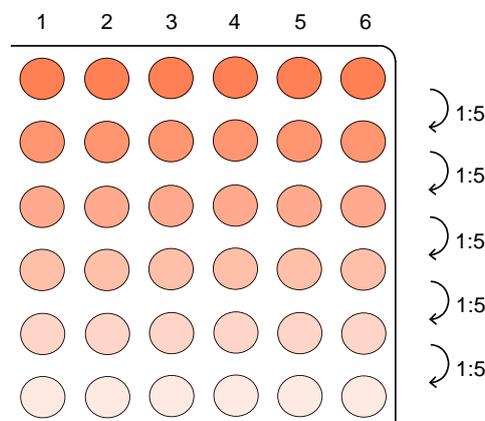
Zur Schaffung eines anaeroben Milieus (0,1%  $\text{O}_2$ ) wurden die Zellkulturplatten des hypoxischen Ansatzes luftdicht in GasPak-EZ-Beutelsysteme eingeschlossen. Alle 6-Loch-Platten wurden für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert (Abbildung 5). Anschließend wurden die für die Radiatio vorgesehenen Zellen mittels Linearbeschleuniger mit 5 Gy 6 MV Photonen bestrahlt.

Zur Herstellung der sequenziellen Verdünnungsreihen wurden nun im nächsten Schritt die Zellzahlen pro Well bestimmt und jeweils der Mittelwert aus den dreifachen Ansätzen pro Bedingung ermittelt. Dafür wurden die unter Hypoxie befindlichen Zellen aus den GasPak-EZ-Beutelsystemen herausgenommen. Alle Zellen wurden dann nach folgendem Schema verdünnt:

- Normoxie: 1000 Zellen/ml
- Normoxie + PRC: 1000 Zellen/ml
- Normoxie + 5 Gy: 100 000 Zellen/ml
- Normoxie + PRC + 5 Gy: 100 000 Zellen/ml
  
- Hypoxie: 50 000 Zellen/ml

- Hypoxie + PRC: 50 000 Zellen/ml
- Hypoxie + 5 Gy: 100 000 Zellen/ml
- Hypoxie + PRC + 5 Gy: 200 000 Zellen/ml

Jetzt wurden von diesen Verdünnungen jeweils in 6-facher Ausführung 200 µl/Well in 96-Well-Zellkulturplatten ausplattiert und in fünf Verdünnungsschritten je 1:5 mit Medium diluiert (Abbildung 6).



**Abbildung 6. Sequenzielle Verdünnung der Jurkat-Lymphomzellen.** Zwischen 1000 Zellen/ml (0 µM PRC, Normoxie, 0 Gy Radiatio) und 200000 Zellen (100 µM PRC, Hypoxie, 5 Gy Radiatio) wurden schrittweise (1:5) zur Bestimmung des klonogenen Überlebens verdünnt.

Die Zellen wurden für 14 bis 21 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde anhand des Medium-Farbumschlags von rot auf gelb, der Verbrauch an Nährstoffen und somit ein Zellwachstum registriert. Anschließend konnten dann die niedrigsten Zellzahlen, bei denen noch eine Kultur angezogen werden konnte, ermittelt werden.

### 2.2.3.2 Koloniebildungsassays

Mit Hilfe des Koloniebildungstests wurde das klonogene Überleben von Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie T98G ermittelt. Die Zellen wurden dabei in Ab- und Anwesenheit des Nitroimidazol-Derivats PRC unter norm- und

hypoxischen Bedingungen kultiviert und mit Dosen von bis zu 10 Gy bestrahlt. Nach einer Inkubationszeit zwischen 14 bis 21 Tagen wurden dann die Zellen bestimmt, die in der Lage waren, durch Zellteilung Kolonien von 50 oder mehr Tochterzellen zu bilden.

Im ersten Schritt wurden zwischen  $2 \times 10^4$  (Kontrolle, aerobe Bedingungen) und maximal  $3 \times 10^5$  (anaerobe Bedingungen, behandelt und mit 10 Gy bestrahlt) Zellen in Abhängigkeit ihrer vorgesehenen Behandlung in 50 bzw. 250 ml Zellkulturflaschen ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Anschließend wurde für die Chemotherapie das RPMI Vollmedium mit 10% FCS durch 100 µM PRC-DMSO-Suspension ersetzt und die Zellkulturflaschen, für die hypoxische Bedingungen vorgesehen waren, in GasPak-EZ-Beutelsysteme eingeschlossen.

Nach weiteren 48 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurde nun ein Teil der Zellen mit einem Linearbeschleuniger bestrahlt. Um vergleichbare Werte im Bezug auf das klonogene Überleben der Glioblastomzellen in Abhängigkeit verschiedener durch ionisierende Strahlung verursachte Energiedosen zu erhalten, wurden die Zellen mit 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt, sodass schließlich folgende Bedingungen verglichen werden konnten:

Kontrollgruppe (Normoxie):

- Unbehandelte Zellen
- Zellen behandelt mit PRC (100 µM)
- Zellen bestrahlt (mit 2, 4, 6, 8 oder 10 Gy 6MV Photonen)
- Zellen behandelt mit PRC (100 µM) und bestrahlt (mit 2, 4, 6, 8 oder 10 Gy 6MV Photonen)

Anaerobe Gruppe ( 48 Stunden Hypoxie; 0,1% O<sub>2</sub>):

- Unbehandelte Zellen
- Zellen behandelt mit PRC (100 µM)
- Zellen bestrahlt (mit 2, 4, 6, 8 oder 10 Gy 6MV Photonen)

- Zellen behandelt mit PRC (100  $\mu$ M) und bestrahlt (mit 2, 4, 6, 8 oder 10 Gy 6MV Photonen)

Unmittelbar nach der Radiatio wurden die adhärenenten Glioblastom-Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst (pro Zellkulturprobe 2 ml der Dissoziationslösung, nach 10- bis 15-minütiger Inkubation im Brutschrank lösten sich die Zellen deutlich sichtbar vom Flaschenboden). Das Zell-Medium-Gemisch wurde in Zentrifugenröhrchen aufgenommen und bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und verworfen, die Zellen wurden je Probe in 10 ml frisches Medium aufgenommen.

Jetzt wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer von allen vorbereiteten Proben die Zellzahl pro Milliliter bestimmt und die Zellen je nach Art der Behandlung in unterschiedlicher Zelldichte (200 bis 4000 Zellen/Well) in 6-Well-Platten ausgesät. Pro Ansatz wurden jeweils weitere drei bis vier Verdünnungsstufen (jeweils 1:2) angesetzt.

Die 6-Well-Platten wurden im Brutschrank inkubiert und unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen, in Abhängigkeit ihres Wachstumsverhaltens und der Bildung von Kolonien, nach 10 bis 28 Tagen abgestoppt. Als Abstoppen bezeichnet man das Fixieren und Färben der Zellkolonien. Dafür wurde unter dem Abzug der Überstand in den Wells abgesaugt, die Zellen für 10 Minuten mit 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert, weitere 10 Minuten mit 70%igem Ethanol behandelt und die Wells mit destilliertem Wasser gut ausgespült. Anschließend wurden die fixierten T98G-Zellen für 10 Minuten mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau (0,05%) angefärbt, danach wurde erneut mit Aqua dest. nachgespült.

Zur Auswertung der Koloniebildungstests wurden nach Fixation und Färbung unter dem Mikroskop alle Kolonien > 50 Zellen gezählt. Aus dem Mittelwert der gewachsenen Kolonien durch die Anzahl ausgesäter Zellen wurde die *plating efficiency* (PE) berechnet. Die später im Diagramm dargestellte *surviving*

*fraction* (SF) wurde, bezogen auf die *surviving fraction* der unbehandelten Kontrolle mit einem Wert von 1, bestimmt.

$$\text{plating efficiency (PE)} = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen}}$$

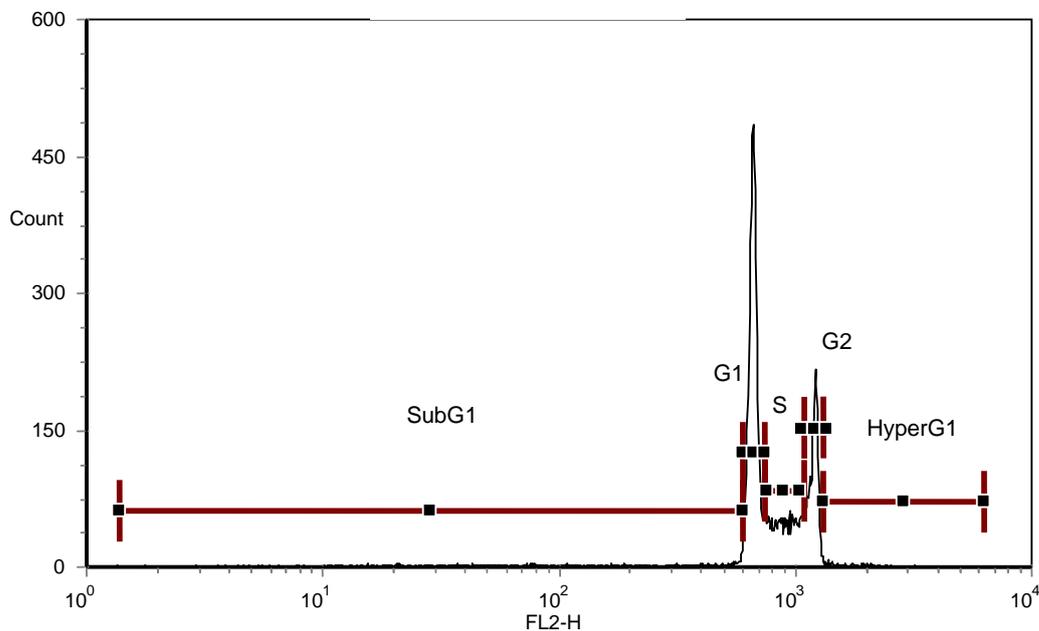
$$\text{surviving fraction (SF)} = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen} \times PE_{0Gy}}$$

#### **2.2.4. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie dient anhand quantitativer Vermessung und molekularer Charakterisierung der Analyse von Zellen. Eine Form der Durchflusszytometrie stellt dabei FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) dar. Dabei werden in Suspension befindliche Zellen in einem Durchflusszytometer von einer Injektionsnadel angesaugt und einzeln der Reihe nach rechtwinklig an einer Lichtquelle, meist einem Argon-Laser (Wellenlänge 488 nm), vorbeigeführt. An diesem Kreuzungspunkt von Laserstrahl und Zellen kommt es zu einer Streuung des Anregungslichts, sowie, bei zuvor spezifischer Färbung der Zellen, zur Anregung von Fluoreszenzen. Mittels Photoelektronenvervielfacher (Photomultiplier) wird dieses gestreute Licht detektiert, in elektrische Signale umgewandelt und anschließend in digitaler Form gespeichert. Die zum Laserstrahl in kleinem Winkel abgelenkte Vorwärtslichtstreuung (FSC = „forward scatter“) dient dabei der Bestimmung der Zellgröße, die zum Laserstrahl rechtwinklige Seitwärtslichtstreuung (SSC = „side scatter“) wird vor allem von der Granularität und intrazellulären Struktur bestimmt. Streusignale fluoreszierender Farbstoffe werden ebenfalls im rechten Winkel zur Lichtquelle aufgefangen. Diese können mithilfe von

Farbteilerspiegeln und Bandpassfiltern je nach Emissionsspektrum (FL1= 530/30 nm; FL2 = 585/42 nm; FL3 = >670 nm) optisch getrennt und ebenfalls über Photomultiplier selektiv gemessen werden.

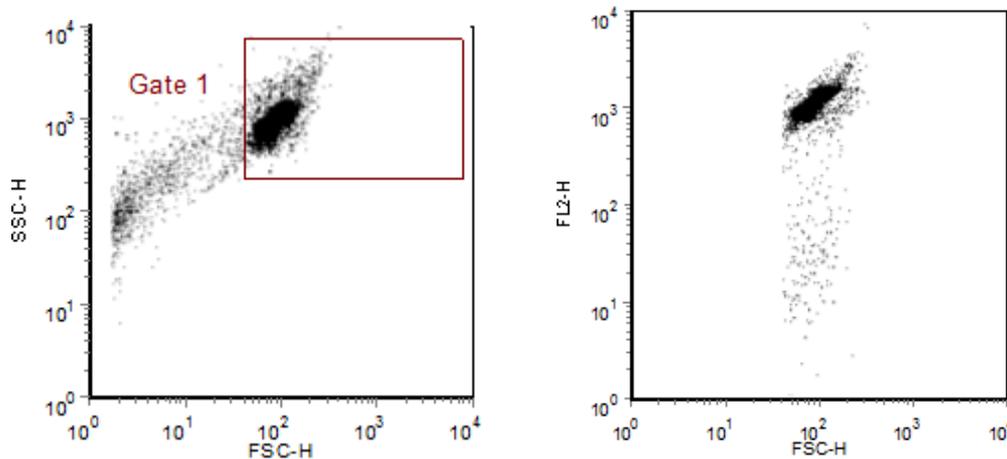
Zur Auswertung und Darstellung der digitalisierten Daten kommen unter anderem eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale Dot-Plots (Punktwolkendarstellung) zur Anwendung. In einem Histogramm wird die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Zahl der Zellen, die mit einer bestimmten Intensität gemessen wurden (y-Achse), aufgetragen.



**Abbildung 7. Histogramm mit Zellverteilung.** Darstellung der Anzahl an Zellen (Count, y-Achse) in Abhängigkeit ihrer gemessenen Fluoreszenzintensität (FL2, x-Achse). Entsprechend dem DNA-Gehalt findet eine Verteilung in die Zellzyklusphasen subG1 (apoptotische Zellen mit geringster Fluoreszenzintensität), G1s, S (Chromatidenreplikation), G2, und hyperG (polyploide Zellen) statt.

Zwei beliebige Messparameter, beispielsweise Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung, werden in einem Dot-Plot auf der x- und y-Achse anhand ihrer Lichtintensität gegeneinander aufgetragen. Dabei steht jeder Punkt für ein gemessenes Ereignis. Unabhängige Messparameter zeigen dabei

verschiedene Zellpopulationen, korrelierende Parameter eine Zellverteilung als Diagonale an.



**Abbildung 8. Histogramme mit Dot-Plots.** Darstellung der gemessenen Vorwärtslichtstreuung (FSC, x-Achse) und der Seitwärtslichtstreuung (SSC, y-Achse). Die Zellen mit ähnlicher Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) werden zusammengefasst (Gate 1, links). Darstellung von Vorwärtslichtstreuung (FSC, x-Achse) und Fluoreszenzintensität (FL2, y-Achse)(rechts).

Die Arbeiten am Durchflusszytometer wurden an dem Gerät FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt. Als Software wurde CellQuest Pro (BD Biosciences) zur digitalen Darstellung des emittierenden Lichts und FCS-Express (De Novo) zur Auswertung der Signale benutzt.

#### 2.2.4.1 Apoptose und Zellzyklus (Nicoletti)

Der Einfluss der neuartigen Nitroimidazol-Derivate auf Zellzyklus und Apoptose wurde durch Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (PI) nach Nicoletti [111] mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Sowohl Zellen der Jurkat- als auch der Glioblastom-Zelllinie wurden dazu in einer Anzahl von ca.  $10^5$  Zellen je Zellkulturflasche unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in Ab- und Anwesenheit des jeweiligen Nitroimidazols in einer Konzentration von 100  $\mu$ M für 48 Stunden kultiviert. Die T98G-Zellen wurden dann für weitere 24 bzw. 48 Stunden aus der Hypoxie

befreit und reoxygeniert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in FACS-Röhrchen resuspendiert (die adhärenen Glioblastomzellen mussten zuvor mit 2 ml 0,05% Trypsin/EDTA gelöst werden), pelletiert (1800 U/min, 8 Minuten) und der Überstand verworfen. Jetzt wurden die Zellpellets in Nicoletti-Lösung (0,1% NaCitrat, 0,1% TritonX 100, 10 µg/ml PI) aufgenommen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln angefärbt.

PI, ein spezifischer Fluoreszenzfarbstoff, ist in der Lage, intrazellulär in die DNA zu interkalieren und die Zelle anzufärben. Da PI im Normalfall nicht membrangängig ist, kann es nur in Zellen mit gestörter Barrierefunktion gelangen. Dies trifft auf nekrotische oder sich in der späten Apoptosephase befindliche Zellen zu, was eine Lebend-Tot-Diskriminierung erlaubt. Um in Abhängigkeit des DNA-Gehalts die Zyklusphase aller Zellen sichtbar zu machen, wird mittels detergenten Bestandteile der Nicoletti-Lösung (Triton-X und hypotoner Puffer) eine Permeabilität der Zellen mit intakter Membranbarriere erreicht.

Direkt nach dem Anfärben fand die FACS-Messung der Proben statt. Dabei wurde die Vorwärtslichtstreuung und die Fluoreszenz im FL2-Kanal (Anregungswellenlänge 488 nm, Emission bei 564-606 nm), die Zellzyklusphasen im FL3-Kanal (Anregungswellenlänge 488 nm, Emission bei >670 nm) gemessen. Bei normaler Zellpopulation zeigt sich entsprechend dem Anstieg des DNA-Gehalts der einzelnen Zellzyklusphasen ein typisches Bild im Histogramm. Apoptotische Zellen bilden durch Fragmentierung des Zellkerns und Abbau von DNA oder durch DNA-haltige Vesikelbildung den Bereich der geringsten Fluoreszenzintensität, die sog. subG1-Fraktion. Zellen der G1- und G2-Phase bilden zwei Peaks, dazwischen liegen Zellen der S-Phase. Der hyperG-Bereich wird schließlich aus Zellen mit höherem DNA-Gehalt als in der G2-Phase, also polyploiden Zellen, gebildet (siehe auch Abbildung 7).

Da PI kanzerogene Eigenschaften besitzt, war es wichtig während der Benutzung des Farbstoffes stets Nitrilhandschuhe zu tragen und die Entsorgungsrichtlinien zu beachten.

#### 2.2.4.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials (TMRE)

TMRE (Tetramethylrhodaminethylester) ist ein lipophiler, positiv geladener Fluoreszenzfarbstoff, der sich an der durch das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\psi_M$ ) negativ geladenen Innenmembran intakter Mitochondrien anreichert und diese anfärbt [112]. Kommt es zum Zusammenbruch von  $\Delta\psi_M$ , diffundiert der Farbstoff aus der mitochondrialen Membran und der Zelle, dementsprechend sinkt die von TMRE emittierte Fluoreszenzintensität, was sich im Durchflusszytometer messen lässt.

Jeweils ca.  $10^5$  Glioblastomzellen wurden über 48 Stunden unter Hypoxie mit dem Nitroimidazol-Derivat PRC (100  $\mu\text{M}$ ) versetzt, nach anschließend 24-stündiger Reoxygenierungsphase trypsinisiert, in FACS-Röhrchen überführt und bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 300  $\mu\text{l}$  25 nM TMRE-Medium-Gemisch aufgenommen, für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend am FACS-Gerät gemessen. Die Fluoreszenzintensität wurde dabei wie nach PI-Färbung im FL2-Kanal erfasst und im Histogramm dargestellt.

Als Positiv-Kontrolle diente CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon), ein künstlicher Entkoppler, der nach Zugabe zu den Zellproben (je 1  $\mu\text{M}$ ) zu einer vollständigen Depolarisation des Membranpotentials führte.

#### 2.2.4.3 Annexin-V-/Propidiumiodid-Doppelfärbung von Glioblastomzellen

Das Anfärben der Zellen mit Annexin-V zur Quantifizierung apoptotischer Zellen macht sich ein weiteres Charakteristikum in der Frühphase der Apoptose zu nutzen. An der Plasmamembran findet dabei ein Zusammenbruch der Lipid-Asymmetrie statt. Phosphatidylserin (PS), das in intakten Zellen ständig durch energieabhängige Prozesse auf das innere Membranblatt transloziert wird, erscheint nun auf der Zelloberfläche [113]. Annexin-V bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig mit einer hohen Affinität von außen an dieses Phospholipid [114, 115]. Da jedoch auch bei spätapoptotischen und nekrotischen Zellen durch Verlust ihrer Membranintegrität der PS-Nachweis mit Annexin-V positiv ist, gilt es diese Zellen durch Doppelfärbung mit PI abzugrenzen. Dies ist möglich, da PI nur in

nekrotischen Zellen mit rupturierter Plasmamembran in die Zelle gelangen kann.

Adhärenz T98G-Zellen wurden in einer Zellzahl von  $10^5$  in Kulturflaschen ausgesät und nach Schema mit 100  $\mu$ M PRC behandelt. Die für 48 Stunden unter Hypoxie gehaltenen Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden reoxygeniert. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Für den nächsten Schritt mussten ein Inkubationspuffer sowie die Annexin-V-Fluos-Markierungslösung hergestellt werden:

- Inkubationspuffer:
  - 10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4)
  - 140 mM NaCl
  - 5 mM  $\text{CaCl}_2$
- Markierungslösung:
  - 1000  $\mu$ l Inkubationspuffer
  - + 20  $\mu$ l Annexin-V-Fluos-Stammlösung
  - + 10  $\mu$ l PI-Stammlösung (Stock 1 mg/ml)

Je Probe wurde das Zellpellet jetzt in 100  $\mu$ l Markierungslösung resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Direkt vor der anschließenden Zellmessung am FACS-Gerät wurde dann noch jeweils 0,4  $\mu$ l Inkubationspuffer hinzugegeben.

Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden die Bandpassfilter zur Detektion der Emissionsspektren von PI und Annexin entsprechend eingestellt (FL1 (Annexin), FL3 (PI)). Nach der Messung konnten die mit beiden Farbstoffen angefärbten Zellen nun in Dot-Plots als Annexin-V- und PI-negative, Annexin-V-positive und PI-negative apoptotische sowie Annexin-V- und PI-positive (sekundär) nekrotische Zellen dargestellt und unterschieden werden.

#### 2.2.4.4 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels CM-H<sub>2</sub>DCFDA

Um das Ausmaß des zellulären oxidativen Stresses unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen nach Zugabe des Nitroimidazol-Derivats PRC vergleichen zu können, diente 5-(und -6) -Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diazetat (CM-H<sub>2</sub>-DCFDA) als Indikator intrazellulärer ROS-Bildung. Dieses Molekül ist in der Lage passiv durch die Zellmembran zu diffundieren und wird anschließend durch zelleigene Esterasen zu nicht-fluoreszierendem CM-H<sub>2</sub>-DCF deazetyliert. In Gegenwart der reaktiven Sauerstoffspezies Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid wird durch Oxidation das stark fluoreszierende CM-DCF gebildet [116, 117].

Für die Zellfärbung wurde CM-H<sub>2</sub>-DCFDA so in DMSO gelöst, dass die Endkonzentration 10 µM betrug. Weiter wurde eine Pufferlösung hergestellt:

- NaCl-Ringer-Lösung (pH 7.3):
  - 125 mM NaCl
  - 5 mM KCl
  - 5 mM Glucose
  - 32 mM Hepes

Erneut wurden Glioblastomzellen in einer Zellzahl von 10<sup>5</sup> in Kulturflaschen ausgesät, nach Schema mit 100 µM PRC behandelt, für 48 Stunden unter Hypoxie inkubiert und anschließend für weitere 24 Stunden reoxygeniert.

Als Nächstes wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert (200 U/min, 5 Minuten), in die Pufferlösung resuspendiert und mit 10 µM CM-H<sub>2</sub>-DCFDA für exakt 20 Minuten bei 37°C behandelt. Danach wurde die Emissionsintensität der Zellen am FACS-Gerät analysiert und anhand der Fluoreszenz die intrazelluläre ROS-Bildung nach unterschiedlicher Behandlungsart verglichen.

#### 2.2.5 Statistik

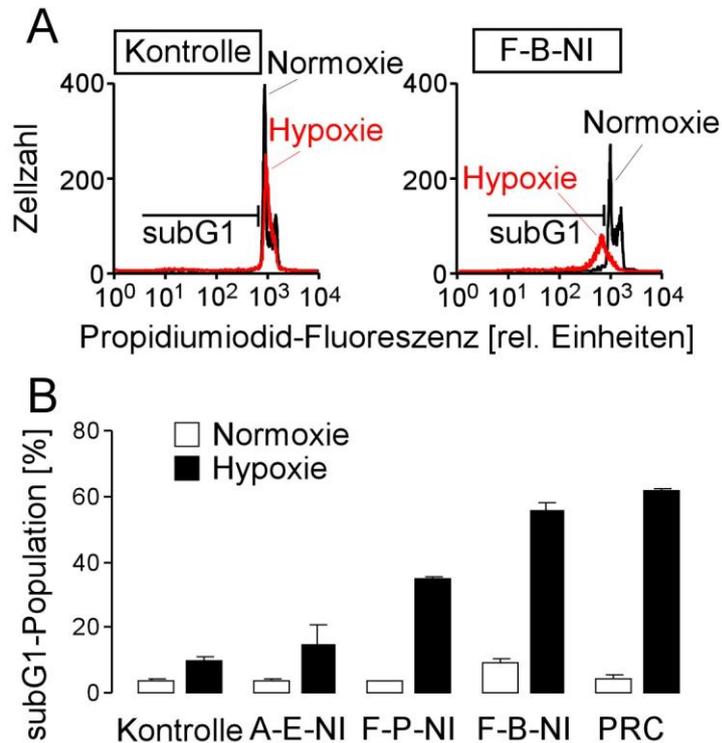
Die ermittelten Daten wurden statistisch ausgewertet. Dabei wurden von den jeweils in mehrfacher Ausführung erfassten Versuchsergebnissen die

Mittelwerte bestimmt. Mittels Einstichproben- und zweiseitigem t-Test wurde bei Normalisierung der Daten auf die Kontrollwerte die Abweichung vom Sollwert 1.0 abgeschätzt. Unterschieden sich die Standardabweichungen zweier Gruppen nicht, wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test angewandt. Differierten dagegen die Standardabweichungen signifikant wurde der korrigierte t-Test nach Welch [118] verwendet. Um bei Mehrfachvergleichen die Mittelwerte der Datensätze vergleichen zu können, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA), entweder als Tukey-Kramer Post-hoc-Test (Standardabweichungen unterschieden sie nicht) oder als parameterfreier Kruskal-Wallis- und Dunn's Post-hoc-Test (Standardabweichungen differierten) durchgeführt. Zur Berechnung wurde die Software InStat (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) verwendet. Dabei wurden p-Werte  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant erachtet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Hypoxisch-zytotoxische Wirkung der Nitroimidazol-Derivate im Vergleich**

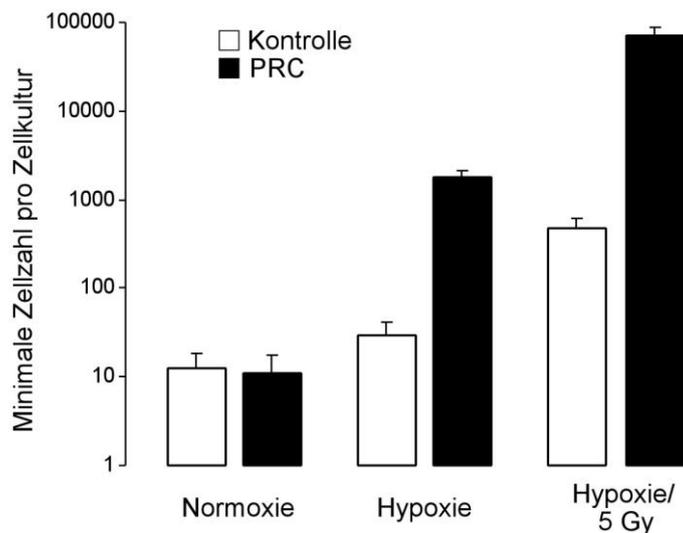
Die zytotoxische Potenz der verwendeten Nitroimidazol-Derivate wurde anhand ihres Einflusses auf das zelluläre Überleben von Jurkat-Lymphomzellen verglichen. Der Zelltod wurde als subG1-Population im Nicoletti-Färbehistogramm in der Durchflusszytometrie definiert. Alle vier untersuchten Nitroimidazole zeigten hierbei eine zytotoxische Wirkung auf hypoxische Zellen (Abbildung 9). Im Vergleich zu den mit jeweils nur einer Nitroimidazol-Gruppe ausgestatteten Derivaten (A-E-NI, F-P-NI und F-B-NI) stellte sich das tertiäre Amin PRC (N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin) mit seinen drei Ethyl-Nitroimidazol-Gruppen als hypoxisch-zytotoxisch am wirksamsten heraus (Abbildung 9, B). Bei unter Normoxie kultivierten und behandelten Lymphomzellen zeigte PRC ebenso wie A-E-NI und F-P-NI im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe keine zytotoxische Wirkung. Lediglich bei F-B-NI fiel eine leicht erhöht messbare subG1-Population im Vergleich zur Kontrolle auf. Basierend auf diesen Daten wurde PRC für die weiterführenden Untersuchungen ausgewählt.



**Abbildung 9. Hypoxisch-zytotoxische Wirkung der neuartigen Nitroimidazol-Derivate.** Jurkat-Lymphomzellen wurden 48 Stunden unter normoxischen (schwarze Linien in A und weiße Balken in B) bzw. hypoxischen (0.1% O<sub>2</sub>) Bedingungen (rote Linien in A, schwarze Balken in B) in Ab- (Kontrolle) und Anwesenheit von Nitroimidazolen (je 100 µM) kultiviert, danach mit Propidiumiodid nach Nicoletti gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. **A.** Histogramme. Der Marker umspannt die subG1-Population bestehend aus den toten Zellen. **B.** Mittelwerte der subG1-Population (± SE, n = 4) in %; (A-E-NI: N-[2-(Aminoxy)Ethyl]-2-Nitroimidazol F-P-NI: N-{3-[(4-Fluorobenzyliden)Aminoxy]Propyl}-2-Nitroimidazol, F-B-NI: N-{4-[(4-Fluorobenzyliden)Aminoxy]Butyl}-2-Nitroimidazol, PRC: N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin).

### 3.2 Hypoxisch-radiosensibilisierender Effekt von PRC

Um einen radiosensibilisierenden Effekt des Nitroimidazol-Derivats PRC unter Hypoxie von einer rein hypoxisch-zytotoxischen Wirkung abzugrenzen, wurden Lymphom-Zellen in einem ersten Experiment in Ab- und Anwesenheit des Nitroimidazols unter norm- und hypoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend mit einer Dosis von 5 Gy am Linearbeschleuniger bestrahlt. Durch sequentielle Verdünnung wurden für die unterschiedlichen Behandlungsstränge jeweils die niedrigsten Zellzahlen bestimmt, aus denen noch eine Kultur angezogen werden konnte (Abbildung 10).



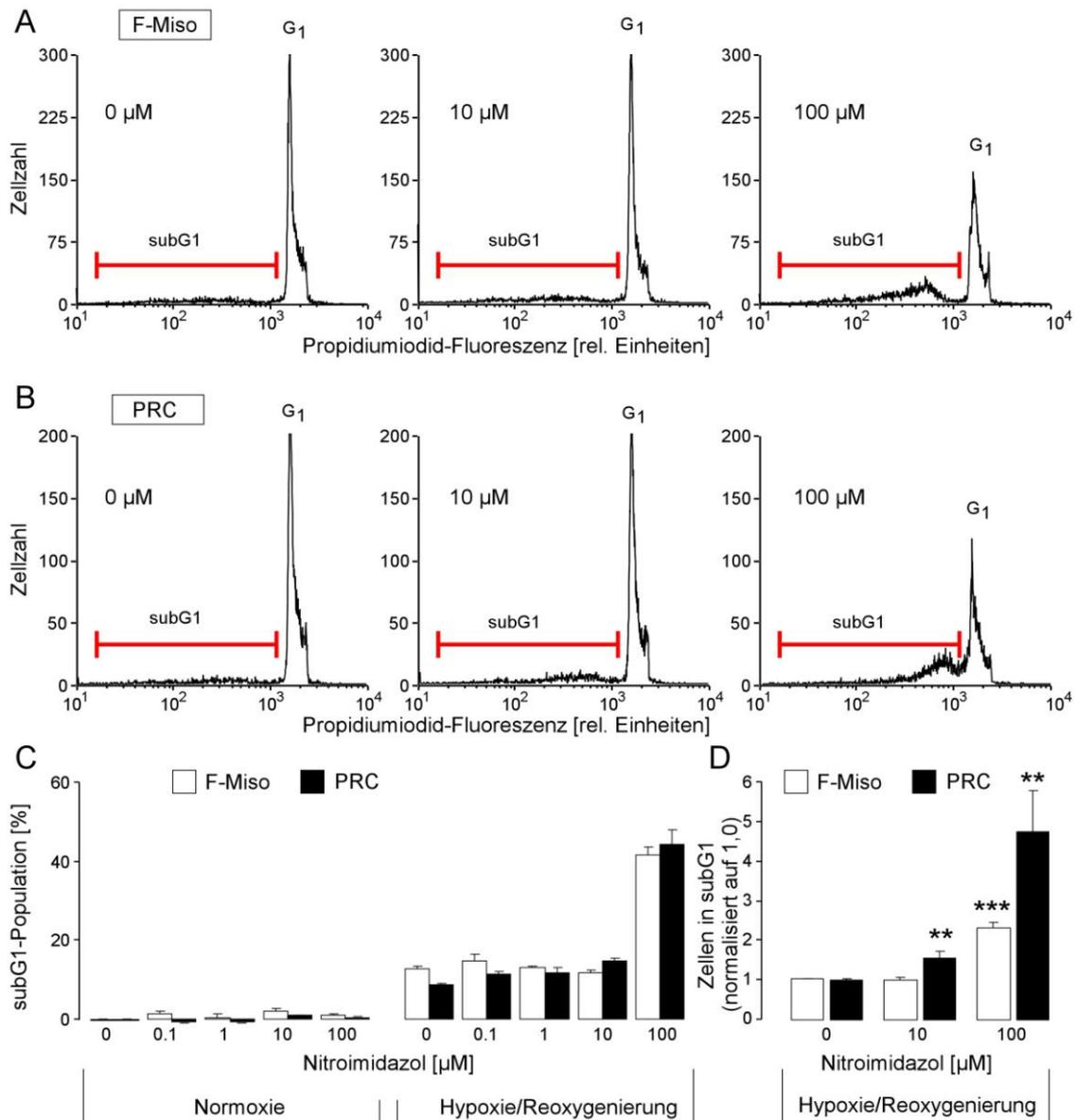
**Abbildung 10. Hypoxisch-zytotoxische und hypoxisch-radiosensibilisierende Wirkung des neuartigen Nitroimidazol-Derivats PRC.** Jurkat-Lymphomzellen wurden 24 Stunden mit PRC (0 bzw. 100  $\mu\text{M}$ ) unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend bestrahlt (5 Gy). Danach wurde die minimale Zellzahl (Mittelwerte  $\pm$  SE,  $n = 6$ ) bestimmt, aus der noch Kulturen gezogen werden konnten (PRC: N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin).

Unter normoxischen Verhältnissen bestätigte sich der fehlende zytotoxische Einfluss von PRC. Unbehandelte und mit PRC behandelte Zellen dieser Gruppe wiesen keine signifikante Differenz bezüglich des klonogenen Überlebens auf. Unter Sauerstoffmangel (0.1%  $\text{O}_2$ ) trat die bereits beobachtete und erwartete hypoxisch-zytotoxische Wirkung durch das Nitroimidazol ein, die minimale Zellzahl, aus der noch eine Kultur gezogen werden konnte, lag bei den behandelten Lymphomzellen ca. 60-fach höher. Wurden die Zellen zusätzlich mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt, konnte eine deutliche hypoxisch-radiosensibilisierende Wirkung von PRC festgestellt werden. Hierbei lag die minimale Zellzahl für das klonogene Überleben um etwa den Faktor 150 höher (Abbildung 10, Hypoxie/5 Gy).

### 3.3 Vergleich der Zytotoxizität unter Hypoxie von PRC und F-Misonidazol

Die Zytotoxizität von PRC und F-Misonidazol unter Hypoxie wurde verglichen. Mit in Zehnerpotenzen aufsteigenden Konzentrationen (0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$ ) beider Nitroimidazol-Derivate wurden humane Jurkat-Lymphomzellen unter

Normoxie sowie unter Hypoxie und anschließender Reoxygenierungsphase inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde im Durchflusszytometer anschließend die subG1-Fraktion (als Maß der sich in Apoptose befindenden Zellpopulation) gemessen (Abbildung 11 A, B). Bei etwa 10% der Jurkat-Zellen wurden bereits durch Hypoxie und Reoxygenierung Zelltod induziert, was als Indiz für die sensitive Reaktion der Zellen auf Sauerstoffmangel zu werten war. Unter normoxischen Bedingungen konnte weder für PRC noch für F-Misonidazol unter den gewählten Höchstkonzentrationen (jeweils 100  $\mu\text{M}$ ) eine signifikante Steigerung der subG1-Population im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollzellpopulation beobachtet werden (Abbildung 11 C, links). Im Gegensatz dazu war eine durch Hypoxie ausgelöste Zunahme apoptotischer Zellen nach Behandlung mit beiden Nitroimidazolen in unterschiedlichem Ausmaß messbar (Abbildung 11 C, rechts). Ein signifikant bestimmbarer hypoxisch-zytotoxischer Effekt war nach Behandlung mit PRC bereits unter der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  sichtbar. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich unter F-Misonidazol erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Anhand dieser Daten erscheint die zytotoxische Potenz von PRC unter Hypoxie im direkten Vergleich mit F-Misonidazol etwas höher (Abbildung 11 D).



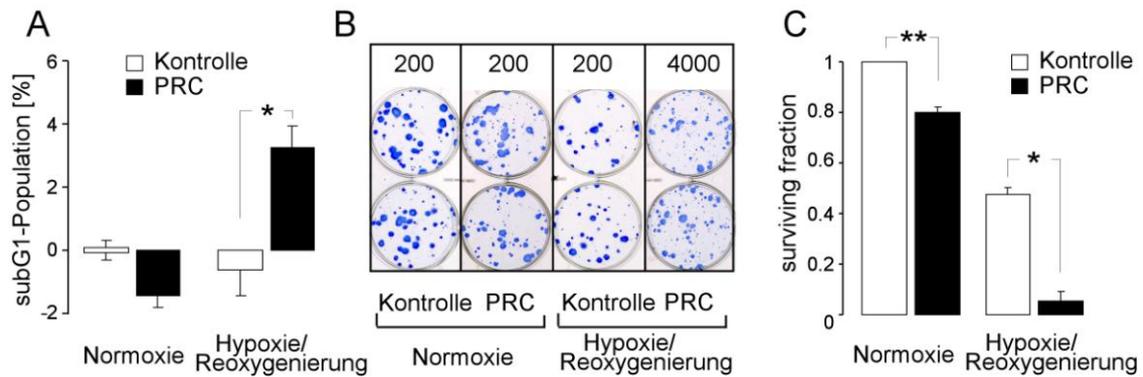
**Abbildung 11. Hypoxisch-zytotoxische Wirkung von F-Misonidazol (F-Miso) und PRC auf Jurkat-Lymphomzellen im Vergleich. A, B.** Die Lymphomzellen wurden für 48 Stunden entweder unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (0.1% O<sub>2</sub>) in Ab- oder Anwesenheit ansteigender Konzentrationen von F-Miso (A) bzw. PRC (B) inkubiert, anschließend 24 Stunden normoxisch weiterkultiviert (Reoxygenierung), permeabilisiert, und mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität von PI im Durchflusszytometer gemessen nach Hypoxie und Reoxygenierungsphase. Der Marker umfasst die toten Zellen der subG<sub>1</sub>- Population. **C.** Durchschnittlicher Anteil (± SE, n = 3) der durch die Behandlung abgetöteten Zellen (basale Apoptoserate nicht berücksichtigt). **D.** Durchschnittliche hypoxische Zytotoxizität der 2-Nitroimidazole (± SE, n = 6 für F-Miso und 9-15 für PRC). \*\* und \*\*\* geben signifikante Unterschiede von 1.0 an, Einstichproben- und zweiseitiger t-Test (p ≤ 0.01 und entsprechend p ≤ 0.001) (modifiziert nach Langenbacher et al. [110]).

### 3.4 Koloniebildung von T98G-Zellen nach Behandlung mit PRC

Um die Mechanismen der hypoxischen Zyto- und Radiotoxizität von PRC genauer zu untersuchen, wurde für weitere Experimente die maligne Glioblastom-Zelllinie T98G, welche sich durch eine höhere Resistenz gegen Hypoxie auszeichnet, gewählt.

Passend zu dieser Zelleigenschaft konnte nach 48-stündiger Inkubation unter Hypoxie und anschließender Reoxygenierungsphase (24 Stunden) im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Jurkat-Lymphomzellen keine Zunahme der subG1-Population im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe im Durchflusszytometer gemessen werden. Wurden die Glioblastomzellen jedoch mit PRC (100  $\mu\text{M}$ ) behandelt, war eine signifikant messbare hypoxisch-zytotoxische Wirkung des Nitroimidazols auch in dieser Zelllinie nachweisbar. Unter normalen Sauerstoffpartialdrücken war auch hier keine zytotoxische Wirkung von PRC auf T98G-Zellen feststellbar (Abbildung 12 A).

Um den Einfluss des Nitroimidazols auf das klonogene Überleben zu bestimmen, wurde die *surviving fraction* nach PRC-Behandlung (100  $\mu\text{M}$ ) bei niedrigen Sauerstoff-Partialdrücken (0.1%  $\text{O}_2$  für 48 Stunden) und anschließend 24-stündiger Reoxygenierung im Koloniebildungstest ermittelt. Hierfür wurden die Zellen im Anschluss an die Behandlung sequentiell verdünnt und in Nitroimidazol-freies Kulturmedium ausplattiert. Bei den unbehandelten T98G-Zellen verminderte bereits Hypoxie und anschließende Reoxygenierung das klonogene Überleben um etwa 50% im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe (Abbildung 12 B und C).



**Abbildung 12. PRC wirkt auf T98G-Zellen hypoxisch-zytotoxisch.** T98G-Zellen wurden in Ab- (Kontrolle) und Anwesenheit von PRC (100  $\mu$ M) unter Sauerstoff-Partialdrücken von 21% (Normoxie) oder 0.1% (Hypoxie) für 48 Stunden inkubiert und anschließend für 24 Stunden reoxygeniert. **A.** Zur Bestimmung des durch PRC induzierten Zelltods wurden die T98G-Zellen permeabilisiert und mit DNA-spezifischem Propidiumiodid (PI) gefärbt. Das Histogramm zeigt den durchschnittlichen Anteil ( $\pm$  SE,  $n = 6-9$ ) durch die Behandlung abgetöteter Zellen (subG1-Population, basale Apoptoserate nicht berücksichtigt). **B.** Im Koloniebildungs-Test wurden die Zellen in Abwesenheit von PRC schrittweise verdünnt und in 6-Well-Platten ausgesät. Der Bildausschnitt zeigt das Koloniewachstum nach weiteren 14 Tagen Kultivierung. Die Anzahl ausgesäter Zellen pro Well ist angegeben. **C.** Durchschnittliche *surviving fraction* ( $\pm$  SE,  $n = 13-27$  von mindestens 3 unabhängigen Experimenten). \* und \*\* geben entsprechend  $p \leq 0.05$  bzw.  $p \leq 0.01$  im Kruskal-Wallis-Test an (parameterfreie ANOVA) (modifiziert nach Langenbacher et al. [110]).

Auch bei normoxischen Sauerstoffverhältnissen zeigten die Nitroimidazol-behandelten Glioblastomzellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen eine verminderte *surviving fraction* ( $SF = 0,80 \pm 0,14$ ). PRC führte hier zu einer signifikanten Reduzierung der Überlebensfraktion um 20% und machte damit eine normoxisch-zytotoxische Wirkung nachweisbar. Noch deutlicher zeigte sich die PRC-vermittelte Zytotoxizität aber unter Hypoxie. Unter verminderten Sauerstoff-Partialdrücken ergab sich bei behandelten T98G-Zellen eine signifikante Abnahme des Zellüberlebens von etwa 90% (Abbildung 12).

### 3.5 Zellzyklusanalyse PRC-behandelter Glioblastomzellen

Untersucht wurde der Einfluss von PRC auf den Zellzyklus der Glioblastomzellen. Dafür wurden die Zellen erneut für jeweils 48 Stunden unter Normoxie und Hypoxie behandelt. Die Zellen unter Hypoxie wurden anschließend für 24 Stunden reoxygeniert. Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen dann mit Propidiumiodid (PI) nach Nicoletti angefärbt und

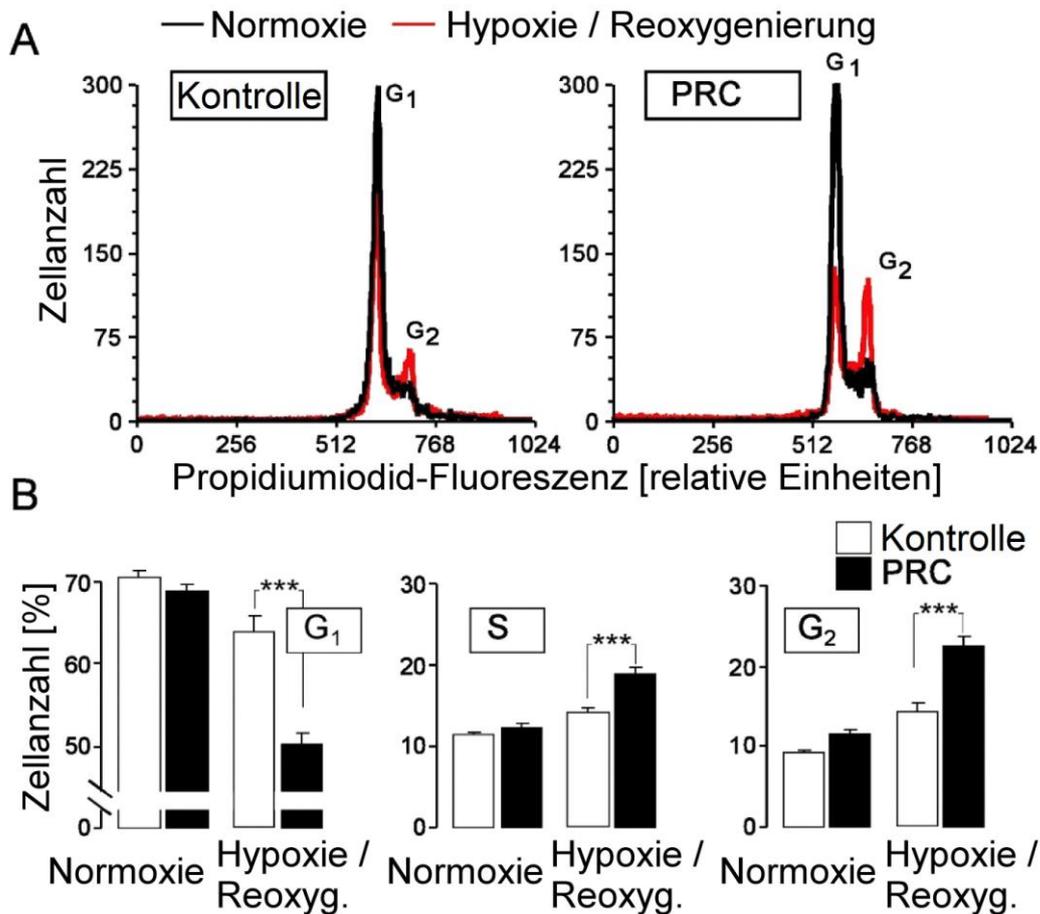
durchflusszytometrisch anhand ihrer Fluoreszenzintensitäten in die einzelnen Subpopulationen G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M, subG1 und hyperG unterteilt.

Als Kontrollgruppe (Kontrolle in Abbildung 13 A) galten unbehandelte T98G-Zellen, welche unter Normoxie inkubiert wurden. Diese befanden sich nach 48 Stunden zu etwa 70% in der G<sub>1</sub>-Phase, der Anteil an Zellen der S- und G<sub>2</sub>-Phase betrug jeweils etwa 10%. Der Anteil apoptotischer Zellen (subG1) lag bei ca. 5%.

Eine Behandlung mit 100 µM PRC unter Normoxie zeigte keinen Einfluss auf die Zellverteilung nach 48 Stunden (Abbildung 13 B).

Unter Hypoxie stellten sich die unbehandelten Glioblastomzellen relativ stressresistent dar mit nur leichten Verschiebungen im Zellzyklus. Wurden die Zellen für 48 Stunden unter Hypoxie mit dem Nitroimidazol-Derivat behandelt und anschließend für 24 Stunden reoxygeniert, verschob sich die Zellverteilung der einzelnen Zyklusphasen jedoch deutlich (Abbildung 13 A und B). Hinweisend auf einen durch PRC induzierten S- und G<sub>2</sub>/M-Arrest, stimulierte PRC eine Verkleinerung der G<sub>1</sub>- und eine Vergrößerung der S- und G<sub>2</sub>/M-Population (Abbildung 13 B). Der Anteil apoptotischer Zellen der subG1-Phase stieg um etwa 4% an, das heißt ein zytotoxischer Effekt des Nitroimidazols konnte nur in Verbindung mit Hypoxie beobachtet werden (durchschnittlicher prozentualer Anteil in der unbehandelten Zellpopulation von 3,9 (± 0,9, n = 6), in der mit PRC-behandelter Zellpopulation von 7,7 (± 1, n = 9)).

Auffallend unter hypoxischem Stress war zudem eine Abnahme von in der hyperG-Phase befindlichen Zellen (höherer DNA-Gehalt als in der G<sub>2</sub>-Phase) unter dem Einfluss des Nitroimidazols (durchschnittlicher prozentualer Anteil in der unbehandelten Zellpopulation von 3,1 (± 0,8, n = 6), in der mit PRC-behandelten Zellpopulation von 0,5 (± 0,1, n = 9)).



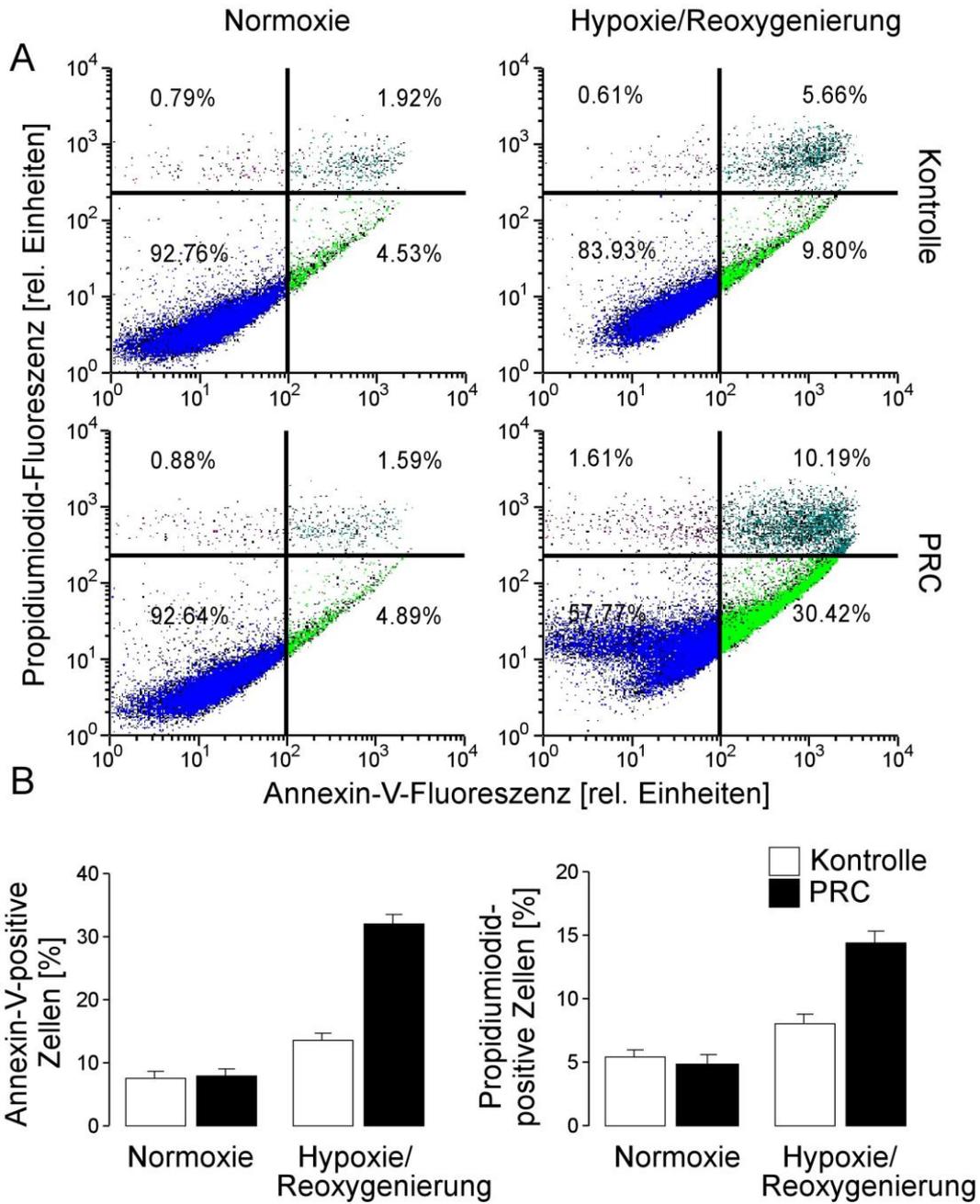
**Abbildung 13. PRC stimuliert unter hypoxischem Stress den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase und führt zu einer Akkumulation in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus. A.** Die Histogramme zeigen die DNA-spezifische Propidiumiodid-Fluoreszenz der unbehandelten (Kontrolle, links) und der mit 100  $\mu$ M PRC (PRC, rechts) behandelten T98G-Zellen, durchflusszytometrisch gemessen unter normoxischen Bedingungen (schwarze Linie) und nach hypoxischem Stress (48 Stunden Hypoxie / 24 Stunden Reoxygenierung, rote Linie). G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase sind abgebildet. **B.** Durchschnittlicher prozentualer Anteil ( $\pm$  SE, n = 7-9) von unbehandelten (Kontrolle) und PRC-behandelten Zellen in der G<sub>1</sub>- (links), S- (Mitte) und G<sub>2</sub>-Phase (rechts). Wie unter **A.** wurden die Zellen unter Normoxie (1. und 2. Balken) und nach hypoxischem Stress (48 Stunden Hypoxie / 24 Stunden Reoxygenierung, 3. und 4. Balken) gemessen. \*\*\* gibt einen p-Wert von  $\leq 0.001$  in der Varianzanalyse (ANOVA) an (modifiziert nach Langenbacher et al. [110]).

### 3.6 Apoptose-Assay, Annexin-V-/Propidiumiodid-Doppelfärbung

Um die zytotoxische Wirkung von PRC genauer zu charakterisieren, wurden T98G-Zellen mit Annexin-V und Propidiumiodid (PI) doppelt angefärbt. Am Durchflusszytometer konnte so zusätzlich zur Zellzyklusanalyse mit dem Nicoletti-Protokoll (siehe Abbildung 13) eine Differenzierung zwischen apoptotischen Zellen, bei denen es zum Verlust des asymmetrischen Phospholipidaufbaus der Zellmembran kommt (Annexin-V bindet an

Phospholipide die zu diesem Zeitpunkt an die äußere Seite der Plasmamembran translozieren), und den primär bzw. sekundär nekrotischen Zellen, die sich zusätzlich mit PI anfärben lassen, stattfinden.

Unter Hypoxie und anschließender Reoxygenierung war eine durch PRC (100  $\mu$ M) verursachte starke Zunahme an Glioblastomzellen mit apoptotisch bzw. durch Zellnekrose bedingter Phospholipid-Translokation an der Plasmamembran messbar. In der FACS-Analyse war ein Anstieg Annexin-V-positiver/PI-negativer Zellen um etwa das 3-fache (von 9,8% auf etwa 30,4%) nachweisbar. In geringerem Ausmaß, um etwa das Doppelte, stieg der Zellenanteil mit intrazellulärer PI-Aufnahme im Zuge des Nekroseprozesses (rechte Dot-Plots in Abbildung 14 A und Balkendiagramme in Abbildung 14 B). Im normoxischen Setting war erneut kein Einfluss durch das Nitroimidazol auf die T98G-Zellen nachweisbar, der Anteil Annexin-V- bzw. PI-positiver Zellen blieb unverändert (linke Dot-Plots in Abbildung 14 A und Balkendiagramme in Abbildung 14 B).



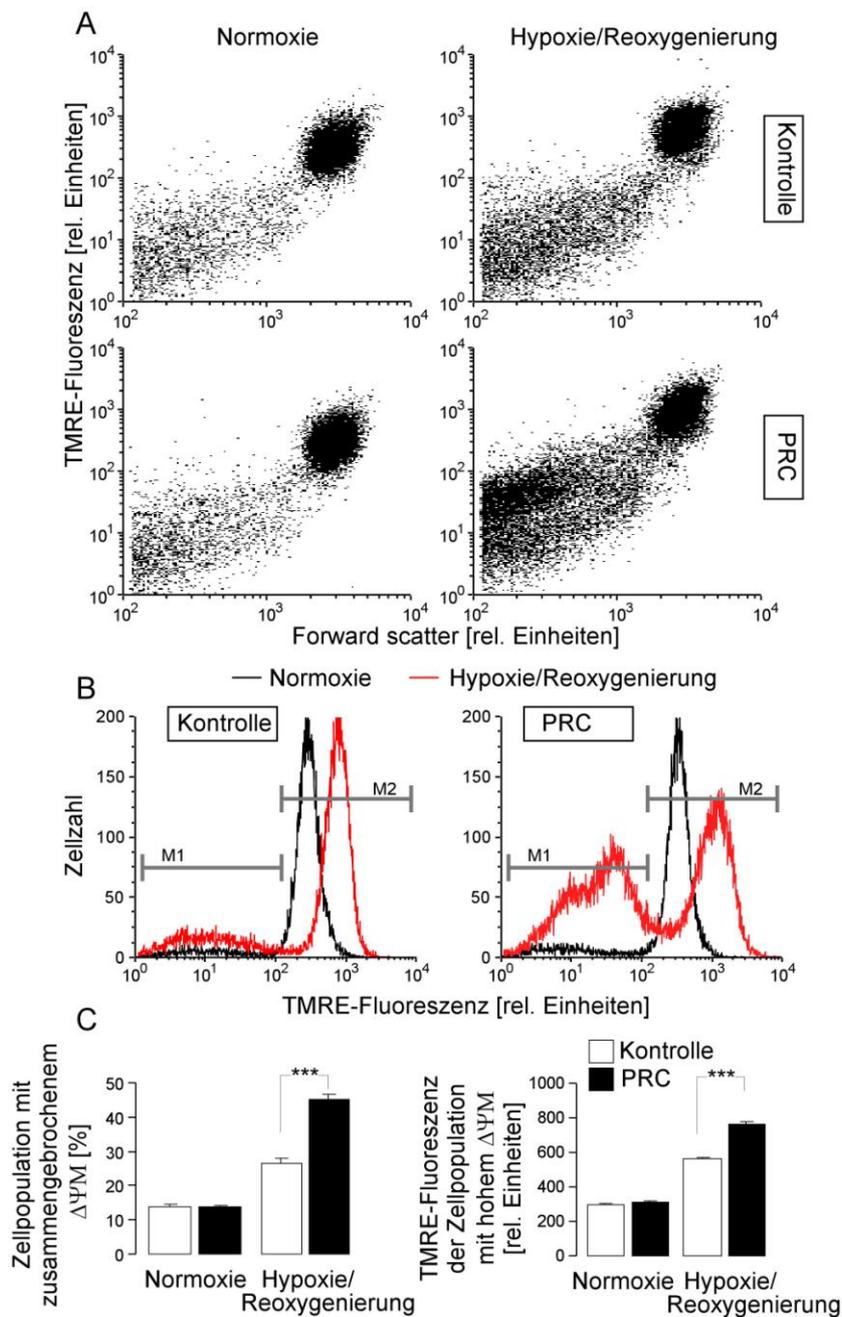
**Abbildung 14. PRC führt bei T98G-Glioblastomzellen unter hypoxischem Stress zu einer Phospholipid-Translokation an der Plasmamembran. A.** Die Dot-Plots zeigen Zellen nach Annexin-V-/Propidiumiodid (PI)-Doppelfärbung. Annexin-V bindet an Phospholipide, die bereits während früher Apoptose an die Außenseite der Plasmamembran translozieren. PI detektiert nekrotische Zellen. Dargestellt sind unbehandelte (Kontrolle, obere Plots) und mit 100  $\mu$ M PRC behandelte (PRC, untere Plots) T98G-Zellen, durchflusszytometrisch gemessen unter normoxischen Bedingungen (links) und nach hypoxischem Stress (48 Stunden Hypoxie / 24 Stunden Reoxygenierung, rechts). In den Quadranten angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil von Annexin-V- und PI-negativen Zellen (unten links), Annexin-V-positiven und PI-negativen apoptotischen Zellen (unten rechts) und Annexin-V- und PI-positiven (sekundär) nekrotischen Zellen (oben rechts). **B.** Durchschnittlicher prozentualer Anteil ( $\pm$  SE, n = 12) von Annexin-V- (links) und PI-positiven (rechts) unbehandelten (Kontrolle) und PRC-behandelten Zellen, durchflusszytometrisch (wie unter **A.**) unter normoxischen Bedingungen (1. und 2. Balken) und unter hypoxischem Stress (3. und 4. Balken) gemessen. \*\*\* gibt einen p-Wert  $\leq$  0.001 in der Varianzanalyse an (modifiziert nach Langenbacher et al. [110]).

### 3.7 Einfluss von PRC auf das mitochondriale Membranpotential

Durchflusszytometrisch untersucht wurde das mitochondriale Membranpotential  $\Delta\psi_M$  der Glioblastomzellen unter dem Einfluss von PRC (100  $\mu\text{M}$ ) unter Normoxie und unter Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung. Von besonderem Interesse war dabei nicht nur der Effekt von hypoxischem Stress, sondern auch in wieweit das Nitroimidazol-Derivat unter Hypoxie auf  $\Delta\psi_M$  einwirkt und somit eine Aufrechterhaltung der Zellfunktionen gestört wird bzw. dies zum Absterben betroffener Zellen führt.

Gemessen wurde dabei die von Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) emittierte Fluoreszenzintensität der vorbehandelten und mit dem Farbstoff angefärbten T98G-Zellen. Bei der FACS-Analyse wurde die zu untersuchende Zellpopulation im Dot-Plot anhand der Seitwärtslichtstreuung (SSC, intrazelluläre Struktur) und Vorwärtslichtstreuung (FCS, Zellgröße) mittels "Gating" ausgewählt (Abbildung 15 A).

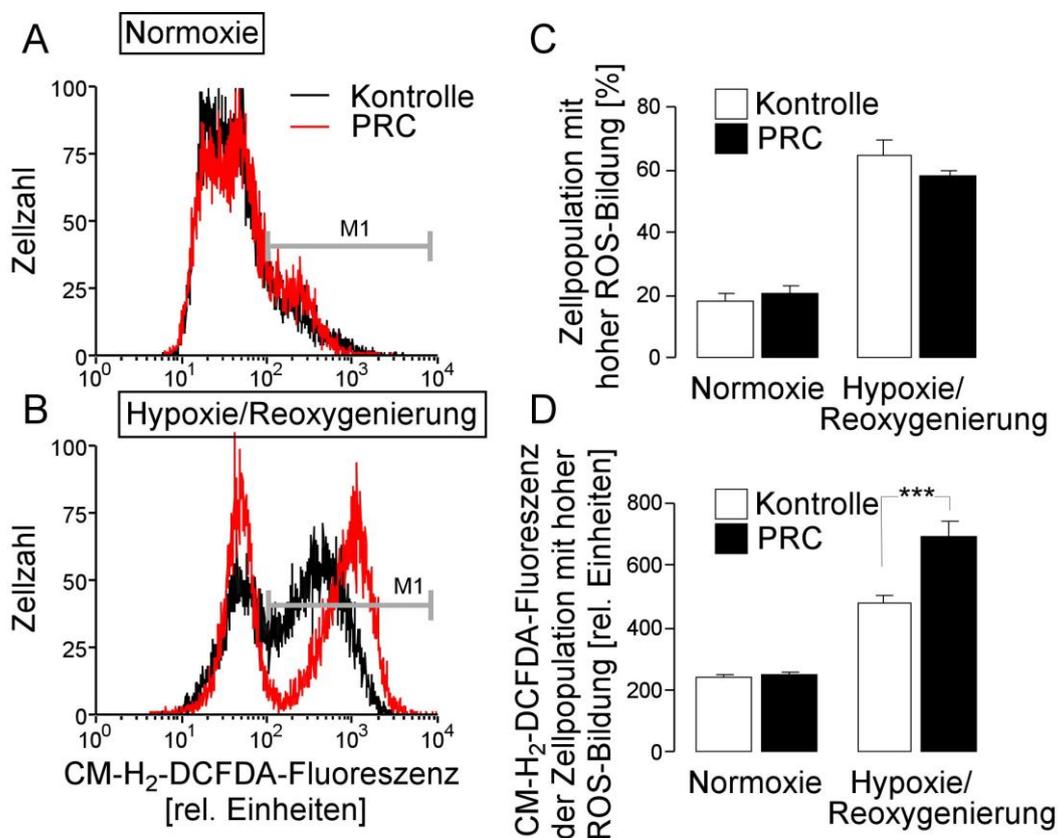
Unter normalen Sauerstoffpartialdrücken konnte kein Unterschied zwischen unbehandelten und mit PRC (100  $\mu\text{M}$ ) behandelten Zellen beobachtet werden. Bei beiden Gruppen lag der Anteil von Zellen mit zusammengebrochenem Membranpotential bei knapp 14%. Setzte man die T98G-Zellen für 48 Stunden hypoxischem Stress aus, konnte nach weiteren 24 Stunden Reoxygenierung schon ein Anstieg dieser Zellpopulation auf 25,4% gemessen werden. Wurden die Zellen zusätzlich unter Hypoxie mit 100  $\mu\text{M}$  PRC behandelt, zeigte sich ein beschleunigter Zusammenbruch des  $\Delta\psi_M$ . Die Zellen mit niedrigem mitochondrialem Membranpotential lagen hier bei 44,8% und damit um fast 20% höher als bei den unbehandelten, der Hypoxie ausgesetzten Zellen (Abbildung 15 B und C, links). Zudem wurde eine durch PRC verursachte signifikante Erhöhung von  $\Delta\psi_M$  der unter Hypoxie und Reoxygenierung überlebenden Zellen beobachtet. Dies führt zu der Annahme eines  $\Delta\psi_M$ -hyperpolarisierenden Effekts durch PRC unter Sauerstoffmangel und Reoxygenierung (Abbildung 15 C, rechts).



**Abbildung 15. PRC beschleunigt bei T98G-Glioblastomzellen die durch Hypoxie und Reoxygenierung induzierte Hyperpolarisation und den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_M$ ).** **A.** Dot-Plots und **B.** Histogramme zeigen die Vorwärtslichtstreuung (Forward scatter) und die TMRE-Fluoreszenz entsprechend als Maße für Zellgröße und  $\Delta\Psi_M$  an. Unbehandelte (Kontrolle **A**, oben und **B**, links) sowie mit 100  $\mu\text{M}$  PRC behandelte (PRC **A**, unten und **B**, rechts) Zellen wurden durchflusszytometrisch unter normoxischen Bedingungen (**A**, links und schwarze Linien in **B**) und nach hypoxischem Stress (48 Stunden Hypoxie / 24 Stunden Reoxygenierung; **A**, rechts und **B**, rote Linien) gemessen. Zellpopulationen mit zusammengebrochenem  $\Delta\Psi_M$  werden in **A** und **B** entsprechend durch Gate bzw. Marker angezeigt. **C.** Durchschnittlich prozentualer Anteil unbehandelter (Kontrolle) und PRC-behandelter Zellen mit zusammengebrochenem  $\Delta\Psi_M$  (**C**, links) und durchschnittlicher TMRE-Fluoreszenzintensität der Zellpopulationen mit hohem  $\Delta\Psi_M$  (**C**, rechts) ( $\pm$  SE,  $n = 21 - 23$ ) gemessen (wie in **A**, **B**) unter normoxischen Bedingungen (links) und nach hypoxischem Stress (48 Stunden Hypoxie / 24 Stunden Reoxygenierung, rechts). \*\*\* gibt einen p-Wert von  $\leq 0.001$  in der Varianzanalyse an (modifiziert nach Langenbacher et al. [110]).

### 3.8. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter PRC

Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials steht in engem Zusammenhang mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Mittels dem als Indikator intrazellulärer ROS-Bildung fungierenden Farbstoff CM-H<sub>2</sub>-DCFDA wurde durchflusszytometrisch oxidativer Stress der Glioblastomzellen nach Behandlung mit PRC (100 µM) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen erfasst und verglichen.



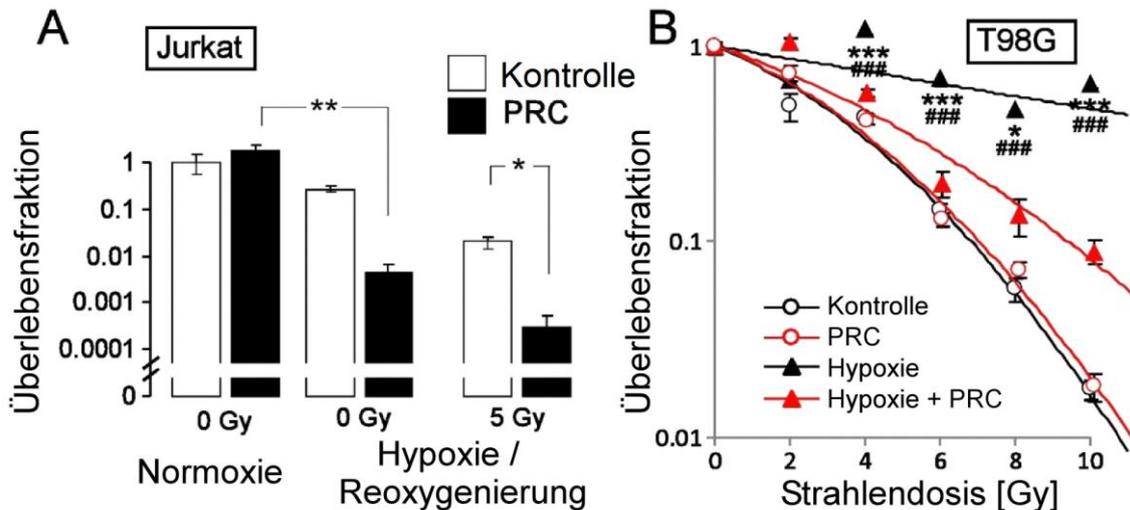
**Abbildung 16. PRC führt zu einer Zunahme der durch Hypoxie und Reoxygenierung induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).** A., B. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenz von 5-(und 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diazetat Acetylesther (CM-H<sub>2</sub>-DCFDA) als Maß der intrazellulären ROS-Bildung. A. Unbehandelte (Kontrolle, schwarze Linie) und mit 100 µM PRC (schwarze Linie) behandelte T98G-Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen und in B. nach hypoxischem Stress (48 Stunden Hypoxie und 6 Stunden Reoxygenierung) durchflusszytometrisch gemessen. Der Marker (M1) umfasst die Zellpopulation mit erhöhter ROS-Bildung. C., D. Durchschnittlicher Anteil von Zellen mit hoher ROS-Bildung und in D. durchschnittliche Fluoreszenzintensität von CM-H<sub>2</sub>-DCFDA (± SE, n = 6). Wie in A., B. unter Normoxie (1. und 2. Balken) und nach hypoxischen Stress (48 Stunden Hypoxie und 6 Stunden Reoxygenierung, 3. und 4. Balken) durchflusszytometrisch gemessen. \*\*\* gibt einen p-Wert von ≤ 0.001 in der Varianzanalyse an (modifiziert nach Langenbacher et al. [110]).

Die Behandlung der Glioblastomzellen mit dem Nitroimidazol unter Hypoxie und Reoxygenierung ergab dabei im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen keine nachweisbare Zunahme des Zellenanteils mit hoher ROS-Bildung (Abbildung 16 C). Allerdings war das Ausmaß der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in dieser Zellpopulation unter Zugabe des Nitroimidazols signifikant höher messbar (Abbildung 16 D). Unter normoxischen Verhältnissen war kein Einfluss von PRC auf die intrazelluläre ROS-Bildung nachweisbar.

### **3.9. Radiosensibilisierender Effekt von PRC unter Hypoxie**

Hierfür wurde der Einfluss von PRC auf das klonogene Überleben hypoxischer Jurkat-Lymphomzellen und T98G-Glioblastomzellen nach ionisierender Bestrahlung ermittelt.

Ein erwarteter radiosensibilisierender Effekt von Sauerstoff konnte nach Bestrahlung der Jurkat-Zellen nicht nachgewiesen werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die durch Hypoxie und anschließender Reoxygenierung bedingte Abnahme des klonogenen Zellüberlebens (Abbildung 17 A, 1. und 3. Balken) den in Bezug auf ionisierende Bestrahlung zu erwartende protektiven Effekt unter Hypoxie vermutlich bei weitem übertraf. Die Bestrahlung hypoxischer und anschließend reoxygenierter Lymphomzellen mit einer Dosis von 5 Gy führte nichtsdestotrotz zu einer weiteren signifikanten Abnahme des klonogenen Überlebens (Abbildung 17 A, 3. und 5. Balken). Nach Behandlung der Zellen mit dem Nitroimidazol konnte sowohl bei den unbestrahlten, als auch bei den zusätzlich bestrahlten Jurkat-Zellen unter Hypoxie mit Reoxygenierungsphase eine signifikante Reduktion der *surviving fraction* festgestellt werden (Abbildung 17 A, 4. und 6. Balken), was zum einen den hypoxisch-zytotoxischen Effekt des Nitroimidazol-Derivats bestätigte, zum anderen aber auch zusätzlich einen hypoxisch-radiosensibilisierenden Effekt von PRC nachweisbar machte. Unter normoxischen Bedingungen ohne Radiatio war, wie zu erwarten, erneut kein Einfluss von PRC auf das klonogene Überleben feststellbar (Abbildung 17 A, 1. und 2. Balken).



**Abbildung 17. Radiosensibilisierender Effekt von PRC unter Hypoxie.** **A.** Durchschnittliche *surviving fraction* ( $\pm$  SE,  $n = 6$ ) von unbehandelten (Kontrolle) und mit 100  $\mu$ M PRC behandelten und für 48 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubierten Jurkatzellen ohne oder nach ionisierender Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy. \* gibt einen p-Wert von  $\leq 0.05$  an, Welch-korrigierter T-Test und \*\* gibt einen p-Wert von  $\leq 0.01$  an, Kruskal-Wallis-Test (nicht-parametrische Varianzanalyse). **B.** Durchschnittliche *surviving fraction* ( $\pm$  SE,  $n = 24-130$ ) von unbehandelten (Kontrolle bzw. Hypoxie, schwarze Kurven) und mit 100  $\mu$ M behandelten (PRC, Hypoxie + PRC, rote Kurven) T98G-Glioblastomzellen nach Bestrahlung mit den angegebenen Bestrahlungsdosen (in Gy, x-Achse) unter Normoxie (Kreise) und Hypoxie (Dreiecke). Die *surviving fraction* wurde mittels Koloniebildungstest bestimmt. Die durchschnittliche *plating efficiency* der Kontrollen (Normoxie, 0 Gy, 0  $\mu$ M PRC) ergab dabei jeweils  $0.19 \pm 0.08$ ,  $n = 6$  (Jurkatzellen) und  $0.25 \pm 0.01$ ,  $n = 130$  (T98G). \* und \*\*\* geben signifikante Unterschiede ( $p \leq 0.05$  bzw.  $p \leq 0.001$ ) zwischen der Kontroll- (Normoxie) und der Hypoxie-Gruppe (Hypoxie) an (Kruskal-Wallis Test, nicht-parametrischer ANOVA) (modifiziert nach Langenbacher et al. [110]).

Die im Vergleich zu der Lymphomzelllinie gegenüber Hypoxie resistenteren Glioblastomzellen T98G wurden mit Dosen von 2 Gy bis 10 Gy bestrahlt. Wurden die Zellen unter Hypoxie kultiviert und bestrahlt, zeigten sie sich bezüglich des klonogenen Überlebens dementsprechend deutlich resistenter als die unter Normoxie inkubierten Kontrollen. Nach Behandlung mit PRC (100  $\mu$ M) unter Hypoxie und anschließender Reoxygenierung konnte zusätzlich zu der hypoxisch-zytotoxischen Wirkung auch ein radiosensibilisierender Effekt des Nitroimidazols nachgewiesen werden (Abbildung 17 B, rote und schwarze Dreiecke). Die Effektivität der ionisierenden Bestrahlung wurde um eine *enhancement ratio* (ER) von 2.2 ( $ER_{80\%}$ ) und 2.5 ( $ER_{50\%}$ ) verstärkt. Die *enhancement ratio* wurde von den jeweiligen Bestrahlungsdosen abgeleitet, welche in An- und Abwesenheit des Nitroimidazols benötigt wurden, um das dementsprechende Zellüberleben auf 80% bzw. 50% zu senken. Dieser

radiosensibilisierende Effekt von PRC war unter Normoxie nicht nachweisbar, ebenso konnte unter normalen Sauerstoffpartialdrücken keine zytotoxische Wirkung auf die Glioblastomzellen beobachtet werden, was eine in diesen Versuchen kaum messbare geringe bzw. gar keine Toxizität unter Normoxie vermuten lässt (Abbildung 17 B, weiße Kreise der Kontrollgruppen (schwarze Linie) und der mit PRC behandelten Zellen (rote Linie)). Anhand Abbildung 17 B lässt sich der hypoxisch-zytotoxische sowie der hypoxisch-radiosensibilisierende Effekt von PRC in der Behandlung hypoxieresistenter und hypoxiesensitiver Tumorzellen darstellen.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Neuartige Nitroimidazol-Derivate im Vergleich**

Die für Nitroimidazole bekannte selektive zellschädigende Wirkung in hypoxischen Arealen wurde anhand der neu synthetisierten 2-Nitroimidazole A-E-NI, F-P-NI, F-B-NI und PRC untersucht und verglichen. Wie angenommen, konnte dabei für alle vier Derivate eine hypoxisch-zytotoxische Wirkung in Bezug auf das zelluläre Überleben von Jurkat-Lymphomzellen nachgewiesen werden. Unter normoxischen Sauerstoffverhältnissen wurde dabei keine signifikante Zytotoxizität nachgewiesen. Die größte zellschädigende Potenz unter Hypoxie konnte beim tertiären Nitroimidazol PRC beobachtet werden. Bereits nach 48 h Inkubation erhöhte PRC den Anteil toter Zellpopulation um ca. 60% zur Kontrollgruppe. Eine mögliche Ursache der Überlegenheit im Vergleich zu den drei konkurrierenden Nitroimidazolen könnte in der Struktur des Derivats liegen. Durch seine drei Ethyl-Nitroimidazol-Gruppen weist PRC eine höhere Elektronenakzeptorkapazität auf [9] (siehe Abbildung 1) und kann dadurch äußerst reaktive Stickstoffverbindungen entstehen lassen. Zudem bewirkt die Quervernetzung intrazellulärer nukleophiler Makromoleküle durch reaktive Bindung an die drei Ethyl-Nitroimidazol-Gruppen unter Hypoxie eine verstärkte Anreicherung im Gewebe [63] und lässt auch dadurch eine erhöhte Zytotoxizität vermuten.

### **4.2. Hypoxische Zytotoxizität von PRC im Vergleich mit F-Misonidazol**

Diese Mechanismen könnten auch für die im nächsten Schritt nachgewiesene Überlegenheit von PRC gegenüber Misonidazol (F-Misonidazol, Sigma-Aldrich) verantwortlich sein. Nach Bestimmung der minimalen Anzahl von Lymphomzellen, aus der sich noch Zellkulturen entwickelten, konnte eine leichte Überlegenheit von PRC gegenüber F-Misonidazol im Bezug auf die hypoxisch-zytotoxische Potenz festgestellt werden. Ein signifikanter hypoxisch-zytotoxischer Effekt konnte durchflusszytometrisch bei einer Behandlung mit F-Misonidazol erst bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ , bei PRC bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Dies könnte ein weiteres Indiz für

eine erhöhte Zellschädigung durch die bereits beschriebene Möglichkeit einer stärkeren Fähigkeit der Quervernetzung von intrazellulären Makromolekülen durch das tertiäre Nitroimidazol PRC sein. Denn auch F-Misonidazol verfügt im Vergleich nur über eine Nitroimidazol-Gruppe. Was PRC als Hypoxie-spezifisches Zytotoxin zudem interessant macht, ist die Beobachtung, dass auch bei der hypoxieresistenten Glioblastomzellreihe T98G eine deutliche Abnahme des zellulären Überlebens nach Behandlung mit dem Nitroimidazol unter Hypoxie und anschließender Reoxygenierung nachweisbar war. Eine eindeutig hypoxieabhängige Zytotoxizität von PRC konnte also nachgewiesen werden. Eine zytotoxische Wirkung konnte bei unter Normoxie kultivierten und mit 100 µM PRC behandelten Jurkat-Lymphomzellen in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies wäre allerdings zu erwarten gewesen, da nach initialer Reduktion von Nitroimidazole Nitroradikalanionen entstehen, welche in Gegenwart von Superoxidanionen zur Bildung von reaktivem Peroxynitrit führen. Durch Eingriffe in intrazelluläre Stoffwechselprozesse weist dieses Anion eine zytotoxische Wirkung auf [65, 68]. Möglicherweise war die Nitroimidazol-Konzentration zu gering gewählt, um ausreichend gewebebeschädigendes Peroxynitrit zu bilden, bzw. war in dem gut oxygenierten Gewebe zu wenig oxidativer Stress und damit zu wenig Bildung von ROS vorhanden. Zwar konnte in der FACS-Analyse der unter Normoxie mit 100 µM PRC behandelten Glioblastomzellen keine Zunahme der apoptotischen subG1-Fraktion gemessen werden, in der Bestimmung der *surviving fraction* im Koloniebildungstest nach selbigem Behandlungsschema konnte jedoch im Vergleich eine durch das Nitroimidazol verursachte signifikante Reduktion der Überlebensfraktion um 20 % festgestellt werden. In Zusammenschau dieser Daten ist von einer selektiven, im Vergleich mit F-Misonidazol ausgeprägteren, hypoxisch-zytotoxischen Wirkung von PRC auch auf gegen Hypoxie resistente Tumorzellen auszugehen. Gleichzeitig besteht wohl nur eine geringe, mit F-Misonidazol vergleichbare Toxizität in normoxischem Zellgewebe. Diese Feststellungen führen zu der Annahme, dass PRC im Vergleich mit F-Misonidazol ein überlegenes Zytotoxin in hypoxischem Tumorgewebe darstellt

bei insgesamt geringen zellschädigenden Auswirkungen auf normoxisches Zellgewebe.

#### **4.3. Einfluss von PRC auf den Zellzyklus von Glioblastomzellen**

In der Zellzyklusanalyse (FACS) konnte ein durch PRC (100  $\mu\text{M}$ ) induzierter  $G_2/M$ -Arrest unter Hypoxie nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass dieser Zellzyklusarrest unter anderem die Folge von vermehrtem oxidativem Stress darstellt. Reaktive Reduktionsprodukte des Nitroimidazols führen zu Interaktionen mit intrazellulären Bestandteilen, zum Beispiel können Konjugate mit dem wichtigen Antioxidans Glutathion entstehen, welches dann vermehrt verbraucht wird und nicht mehr in der Lage ist vor freier Radikalbildung zu schützen [66]. ROS-Bildung findet vor allem in der mitochondrialen Atmungskette statt [119, 120] und wird vermutlich unter anderem über das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi\text{M}$ ) reguliert. Dabei wird angenommen, dass ein hohes  $\Delta\Psi\text{M}$  die Bildung von ROS begünstigt, während ein erniedrigtes  $\Delta\Psi\text{M}$  dem entgegenzuwirken scheint [121]. Nach Inkubation unter Hypoxie und anschließender Reoxygenierungsphase wurde durch den Einfluss von PRC mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Fluoreszenzintensität nach TMRE-Färbung zum einen eine deutliche Zunahme an Glioblastomzellen mit zusammengebrochenem mitochondrialem Membranpotential festgestellt. Dies lässt sich mit der hypoxisch-zytotoxischen Wirkung des Nitroimidazols und dementsprechend eines im Rahmen der Apoptose ablaufenden Prozesses werten [122]. Unter Normoxie zeigte PRC keinen Einfluss auf  $\Delta\Psi\text{M}$ . Zum anderen konnte bei den T98G-Zellen, welche eine Hypoxie- und Nitroimidazolbehandlung überlebten, sogar eine Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials belegt werden, was einen  $\Delta\Psi\text{M}$ -hyperpolarisierenden Effekt von PRC unter Hypoxie vermuten lässt. Die intrazelluläre ROS-Bildung in T98G-Zellen wurde mit dem Indikator-Farbstoff CM-H<sub>2</sub>-DCFDA durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei war nach Behandlung der Glioblastomzellen mit dem Nitroimidazol unter Hypoxie und Reoxygenierung der Zellenanteil mit hoher ROS-Bildung im Vergleich mit den unbehandelten

Kontrollen nahezu unverändert. Die Menge reaktiver Sauerstoffspezies in dieser Zellpopulation war jedoch unter Zugabe des Nitroimidazols signifikant höher, was sich möglicherweise durch die Hyperpolarisation von  $\Delta\Psi$  erklären lässt. Allerdings wurden in dieser Arbeit weiterführende Regulatoren der ROS-Bildung, wie beispielsweise die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder der Einfluss durch Stickstoffmonoxid, nicht berücksichtigt. Im Zuge der Apoptose ließ sich also unter Hypoxie ein PRC-induzierter Zusammenbruch von  $\Delta\Psi$  bei einem Großteil der Glioblastomzellen nachweisen, passend hierzu stieg auch die Anzahl an Glioblastomzellen mit apoptotisch bzw. durch Zellnekrose bedingter Phospholipid-Translokation an der Plasmamembran nach Anfärben der Zellen mit Annexin-V. Dies belegt erneut den hypoxisch-zytotoxischen Effekt des Nitroimidazols. Zusammengefasst ist anhand dieser Daten davon auszugehen, dass PRC bei hypoxischen T98G-Zellen durch Beeinflussung mitochondrialer Funktionen reaktiven Sauerstoff-Stress und damit verbundene DNS-Schäden, Zellzyklusarrest und bei irreparabler Zellschädigung intrinsische Apoptose auslöst.

#### **4.4. Hypoxisch-radiosensibilisierende Wirkung von PRC**

Ein zu der zytotoxischen Wirkung additiver radiosensibilisierender Effekt von PRC unter Hypoxie konnte in einem ersten Schritt anhand behandelter und mit 5 Gy bestrahlter Jurkat-Lymphomzellen nachgewiesen werden. Es ist bekannt dass Hypoxie in Tumorgewebe die Wirkung einer Strahlentherapie abschwächt [1, 43, 55, 123]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bei den T98G Zellen Glioblastomzellen gezeigt werden. Nitroimidazole wirken als Sauerstoff-Mimetika der hypoxischen Radioresistenz entgegen. In T98G-Zellen war bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  PRC im klonogenen Überleben eine Verstärkung der ionisierenden Strahlenwirkung um eine *enhancement ratio* (ER) von 2.2 ( $\text{ER}_{80\%}$ ) und 2.5 ( $\text{ER}_{50\%}$ ) messbar. Für andere Nitroimidazole, wie beispielsweise Sanazol, Nimorazol und KU-2285 (jeweils in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$ ) wurden  $\text{ER}_{10\%}$  von 1.4 - 1.8 beschrieben [124]. In einer weiteren Arbeit konnten  $\text{ER}_{80\%}$  von 2.2 für Etanidazol und  $\text{ER}_{80\%}$  von 1.3 für Nimorazol

(jeweils 1 mM) festgestellt werden [125]. Es kann zwar kein direkter Vergleich zwischen diesen verschiedenen Nitroimidazol-Derivaten gezogen werden, da in den jeweiligen Untersuchungen Parameter wie Stoffkonzentration und Bestrahlungsdosis, sowie verwendete Zelllinien divergieren. Trotzdem kann bei einer im Vergleich 5- bis 10-fach geringeren Konzentration von PRC (100  $\mu$ M) ein radiosensibilisierender Effekt ähnlicher Größenordnung angenommen werden.

## 5. Schlussfolgerung und Ausblick

Basierend auf den *in vitro* Daten der vorliegenden Arbeit, zeichnet sich das neuartige 2-Nitroimidazol PRC (N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin) als aussichtsreich für die Radiotherapie hypoxischer Tumoren *in vivo* aus. Aufgrund seiner molekularen Struktur kann es zudem als Leitsubstanz in der Entwicklung zukünftiger Nitroimidazol-Derivate mit optimierten molekularbiologischen Eigenschaften eingesetzt werden. Ein ausgeprägter hypoxisch-zytotoxischer und hypoxisch-radiosensibilisierender Effekt in der Jurkat-Lymphom- sowie der T89G-Glioblastom-Zelllinie wurde nachgewiesen. Zudem konnte belegt werden, dass PRC unter Hypoxie mitochondrialen Stress, Zellzyklusarrest und intrinsische Apoptose auslöst. Ausblickend gilt es allerdings, spezifische molekulare Wirkmechanismen des Nitroimidazol-Derivats aufzudecken, Zielmoleküle zu finden und somit eine mögliche Tumorspezifische Toxizität zu ermitteln. Weiterführend stellt sich zudem die Frage, ob sich die zytotoxischen und radiosensibilisierenden Eigenschaften unter Hypoxie auch *in vivo* bestätigen lassen und welche pharmakokinetischen Eigenschaften zu berücksichtigen sind, nicht zuletzt auch bezüglich den Nebenwirkungen, allen voran die für Nitroimidazole vielfach beschriebene Neurotoxizität.

## 6. Zusammenfassung

Tumorhypoxie stellt sowohl in chronischer als auch in intermittierend auftretender akuter Form ein erhebliches Problem in der Behandlung maligner Gewebe durch Strahlentherapie dar, da vor allem der für eine wirksame Bestrahlung wichtige radiosensibilisierende Effekt von Sauerstoff nicht zum Tragen kommt. Eine Strategie, diesem Umstand entgegenzuwirken, ist die Entwicklung von Substanzen wie Nitroimidazole, welche in hypoxischem Tumorgewebe akkumulieren und als Sauerstoff-Mimetika, zusätzlich aber auch als Zytotoxine wirken können. Bis auf wenige Ausnahmen erfüllen bisher erprobte Substanzen dieser Gruppe nicht die Anforderungen an ein für den klinischen Routineeinsatz geeignetes Radiochemotherapeutikum. Dies ist vor allem einem dosislimitierenden neurotoxischen Nebenwirkungsprofil bzw. dem fehlenden Nachweis einer ausreichenden klinischen Wirksamkeit geschuldet. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit, neuartige, bifunktionelle Nitroimidazol-Derivate hinsichtlich ihrer hypoxisch-zytotoxischen und hypoxisch-radiosensibilisierenden Eigenschaften in einer hypoxiesensitiven Lymphom- und einer hypoxieresistenten Glioblastom-Zelllinie näher charakterisiert werden. In einem ersten Schritt konnte mittels Durchflusszytometrie unter vier neuartigen Nitroimidazol-Derivaten das tertiäre Amin PRC (N,N,N-Tris[2-(2-Nitro-1H-Imidazol-1-yl)Ethyl]Amin) als potentestes Zytotoxin unter Hypoxie ausgemacht werden. Auch im Vergleich mit der Nitroimidazol-Leitsubstanz F-Misonidazol zeigte PRC bereits in 10-fach geringerer Konzentration eine signifikante hypoxisch-zytotoxische Wirkung, ohne dass sich eine begleitend erhöhte Toxizität in normoxischem Zellgewebe beobachten ließ. Insgesamt konnte ein selektiver zytotoxischer Effekt auf hypoxische Zellen nachgewiesen werden, ein additiver hypoxisch-radiosensibilisierender Effekt von PRC ließ sich zudem anhand von Koloniebildungstests sowohl in der Lymphom- als auch in der Glioblastom-Zelllinie belegen. Bei den letztgenannten hypoxieresistenten Zellen wurde dabei eine Verstärkung der ionisierenden Strahlenwirkung um eine *enhancement ratio* (ER) von 2.2 (ER<sub>80%</sub>) bzw. 2.5 (ER<sub>50%</sub>) registriert. Ursächlich für die hypoxisch-zytotoxische sowie -radiosensibilisierende Potenz scheint die molekulare Struktur von PRC mit drei Ethyl-Nitroimidazol-Gruppen

und dadurch bedingter hoher Elektronenakzeptorkapazität zu sein. Anhand der hier erhobenen Daten ist neben einer verstärkten Anreicherung in hypoxischen Geweben und der Sauerstoff-imitierenden Funktion, von einer PRC-induzierten Beeinflussung mitochondrialer Funktionen (Interaktionen reaktiver Nitroimidazol-Reduktionsprodukte mit intrazellulären Bestandteilen) auszugehen. In der Durchflusszytometrie konnte dabei nachgewiesen werden, dass PRC exklusiv unter Hypoxie mitochondrialen Stress, einen G<sub>2</sub>/M-Zyklus-Arrest und intrinsische Apoptose auslöst.

Diese Daten weisen PRC als vielversprechendes neues 2-Nitroimidazol aus, das für die Radiotherapie hypoxischer Tumoren *in vivo* geeignet erscheint.

## Literaturverzeichnis

- [1] Bayer C, Vaupel P. Acute versus chronic hypoxia in tumors: Controversial data concerning time frames and biological consequences. *Strahlenther Onkol.* 2012 Jul;188(7):616-27.
- [2] Maftai CA, Bayer C, Shi K, Astner ST, Vaupel P. Quantitative assessment of hypoxia subtypes in microcirculatory supply units of malignant tumors using (immuno-)fluorescence techniques. *Strahlenther Onkol.* 2011 Apr;187(4):260-6.
- [3] Maftai CA, Bayer C, Shi K, Vaupel P. Intra- and intertumor heterogeneities in total, chronic, and acute hypoxia in xenografted squamous cell carcinomas. Detection and quantification using (immuno-)fluorescence techniques. *Strahlenther Onkol.* 2012 Jul;188(7):606-15.
- [4] Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology.* 1953 Dec;26(312):638-48.
- [5] Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996 Oct 1;56(19):4509-15.
- [6] Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 1996 Jan 4;379(6560):88-91.
- [7] Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(24):9533-7.
- [8] Giaccia AJ. Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Seminars in radiation oncology.* 1996 Jan;6(1):46-58.
- [9] Nagasawa H, Uto Y, Kirk KL, Hori H. Design of hypoxia-targeting drugs as new cancer chemotherapeutics. *Biological & pharmaceutical bulletin.* 2006 Dec;29(12):2335-42.
- [10] Overgaard J, Hansen HS, Andersen AP, Hjelm-Hansen M, Jorgensen K, Sandberg E, et al. Misonidazole combined with split-course radiotherapy in the treatment of invasive carcinoma of larynx and pharynx: report from the DAHANCA 2 study. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1989 Apr;16(4):1065-8.
- [11] Overgaard J. Hypoxic modification of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck - A systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol.* 2011 Jul;100(1):22-32.
- [12] Dische S. Chemical sensitizers for hypoxic cells: a decade of experience in clinical radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1985 Feb;3(2):97-115.
- [13] Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2004 Jul 15;59(4):928-42.
- [14] Elizabeth Cohen-Jonathan EJBaWGM. How does radiation kill cells. *Chemical Biology.* 1999;3:77-83.
- [15] Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation.* 2008 Jul;15(7):1153-62.

- [16] Lauber K, Ernst A, Orth M, Herrmann M, Belka C. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Frontiers in oncology*.2:116.
- [17] Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*. 2004;5(1):1-10.
- [18] Crompton NE. Telomeres, senescence and cellular radiation response. *Cell Mol Life Sci*. 1997 Jul;53(7):568-75.
- [19] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis reviews*. 2007 Jun;26(2):225-39.
- [20] Johansen I, Brustad T, Rupp WD. DNA strand breaks measured within 100 milliseconds of irradiation of *Escherichia coli* by 4 MeV electrons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Jan;72(1):167-71.
- [21] Tilby MJ, Loverock PS. Measurements of DNA double-strand break yields in *E. coli* after rapid irradiation and cell inactivation: the effects of inactivation technique and anoxic radiosensitizers. *Radiation research*. 1983 Nov;96(2):309-21.
- [22] Prise KM, Folkard M, Davies S, Michael BD. The irradiation of V79 mammalian cells by protons with energies below 2 MeV. Part II. Measurement of oxygen enhancement ratios and DNA damage. *International journal of radiation biology*. 1990 Aug;58(2):261-77.
- [23] Rosander K, Zackrisson B. DNA damage in human endothelial cells after irradiation in anoxia. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 1995;34(1):111-6.
- [24] Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*. 1991 Apr 9;281(1-2):9-19.
- [25] Hada M, Georgakilas AG. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2008 May;49(3):203-10.
- [26] Frankenberg D, Kistler M, Eckardt-Schupp F. Effect of cellular glutathione content on the induction of DNA double strand breaks by 25 MeV electrons. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1987 Aug;52(2):185-90.
- [27] Frankenberg D, Michael BD, Frankenberg-Schwager M, Harbich R. Fast kinetics of the oxygen effect for DNA double-strand breakage and cell killing in irradiated yeast. *International journal of radiation biology*. 1990 Mar;57(3):485-501.
- [28] Revesz L. The role of endogenous thiols in intrinsic radioprotection. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1985 Apr;47(4):361-8.
- [29] van der Schans GP, Vos O, Roos-Verheij WS, Lohman PH. The influence of oxygen on the induction of radiation damage in DNA in mammalian cells after sensitization by intracellular glutathione depletion. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1986 Sep;50(3):453-70.
- [30] Vos O, van der Schans GP, Roos-Verheij WS. Reduction of intracellular glutathione content and radiosensitivity. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1986 Jul;50(1):155-65.
- [31] Bump EA, Brown JM. Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharmacology & therapeutics*. 1990;47(1):117-36.
- [32] Chan N, Koritzinsky M, Zhao H, Bindra R, Glazer PM, Powell S, et al. Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to

offset chemoresistance and radioresistance. *Cancer Res.* 2008 Jan 15;68(2):605-14.

[33] Kang MJ, Jung SM, Kim MJ, Bae JH, Kim HB, Kim JY, et al. DNA-dependent protein kinase is involved in heat shock protein-mediated accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in hypoxic preconditioned HepG2 cells. *Febs J.* 2008 Dec;275(23):5969-81.

[34] Um JH, Kang CD, Bae JH, Shin GG, Kim DW, Kim DW, et al. Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells. *Exp Mol Med.* 2004 Jun 30;36(3):233-42.

[35] Midander J, Deschavanne PJ, Debieu D, Malaise EP, Revesz L. Reduced repair of potentially lethal radiation damage in glutathione synthetase-deficient human fibroblasts after X-irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1986 Mar;49(3):403-13.

[36] Weinmann M, Belka C, Guner D, Goecke B, Muller I, Bamberg M, et al. Array-based comparative gene expression analysis of tumor cells with increased apoptosis resistance after hypoxic selection. *Oncogene.* 2005 Sep 1;24(38):5914-22.

[37] Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Genes & development.* 1998 Jan 15;12(2):149-62.

[38] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5510-4.

[39] Sandoel A, Kohler I, Fellmann C, Lowe SW, Hengartner MO. HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase. *Nature.* Jun 3;465(7298):577-83.

[40] Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, Lam JC, Ditsworth D, Keith B, et al. HIF2 $\alpha$  inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 25;106(34):14391-6.

[41] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nature reviews.* 2008 Dec;8(12):967-75.

[42] Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* Feb 4;29(5):625-34.

[43] Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat.* Jun;14(3):191-201.

[44] Rohwer N, Dame C, Haugstetter A, Wiedenmann B, Detjen K, Schmitt CA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF- $\kappa$ B. *PloS one.*5(8):e12038.

[45] Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2008 Apr 18;283(16):10892-903.

[46] Vaupel PK D. Tumor Hypoxia: Pathophysiology, clinical significance and therapeutic Perspectives. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.* 1999.

[47] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):266-76.

- [48] Sundfor K, Lyng H, Trope CG, Rofstad EK. Treatment outcome in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix: relationships to pretreatment tumor oxygenation and vascularization. *Radiother Oncol.* 2000 Feb;54(2):101-7.
- [49] Hockel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, et al. Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol.* 1993 Jan;26(1):45-50.
- [50] Fyles A, Milosevic M, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L, et al. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 1;20(3):680-7.
- [51] Knocke TH, Weitmann HD, Feldmann HJ, Selzer E, Potter R. Intratumoral pO<sub>2</sub>-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Radiother Oncol.* 1999 Nov;53(2):99-104.
- [52] Nordmark M, Alsner J, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM, Horsman MR, et al. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer.* 2001 Apr 20;84(8):1070-5.
- [53] Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Aral B, Schaffer U, Vaupel P. Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. *International journal of cancer.* 1998 Aug 21;79(4):365-9.
- [54] Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res.* 1999 Sep 15;59(18):4525-8.
- [55] Chang Q, Jurisica I, Do T, Hedley DW. Hypoxia predicts aggressive growth and spontaneous metastasis formation from orthotopically grown primary xenografts of human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2011 Apr 15;71(8):3110-20.
- [56] Dietz A, Rudat V, Vanselow B, Wollensack P, Bettscheider C, Conradt C, et al. Rise of oxygenation in cervical lymph node metastasis during the initial course of radiochemotherapy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Dec;121(6):789-96.
- [57] Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, Hu K, Shasha D. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *The oncologist.* 2002;7(6):492-508.
- [58] Schilling D, Bayer C, Emmerich K, Molls M, Vaupel P, Huber RM, et al. Basal HIF-1 $\alpha$  expression levels are not predictive for radiosensitivity of human cancer cell lines. *Strahlenther Onkol.* 2012 Apr;188(4):353-8.
- [59] Staab A, Fleischer M, Loeffler J, Said HM, Katzer A, Plathow C, et al. Small interfering RNA targeting HIF-1 $\alpha$  reduces hypoxia-dependent transcription and radiosensitizes hypoxic HT 1080 human fibrosarcoma cells in vitro. *Strahlenther Onkol.* 2011 Apr;187(4):252-9.
- [60] Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1999 Dec 1;59(23):5863-70.
- [61] De Ridder M, Van Esch G, Engels B, Verovski V, Storme G. Hypoxic tumor cell radiosensitization: role of the iNOS/NO pathway. *Bulletin du cancer.* 2008 Mar;95(3):282-91.
- [62] De Ridder M, Verellen D, Verovski V, Storme G. Hypoxic tumor cell radiosensitization through nitric oxide. *Nitric Oxide.* 2008 Sep;19(2):164-9.

- [63] Born JL, Smith BR, Harper N, Koch CJ. Metabolism and radiosensitization of 4,5-dimethylmisonidazole, a ring-substituted analog of misonidazole. *Biochem Pharmacol.* 1992 Mar 17;43(6):1337-44.
- [64] Padhani AR. Where are we with imaging oxygenation in human tumours? *Cancer Imaging.* 2005;5:128-30.
- [65] Frank J, Lambert C, Biesalski HK, Thews O, Vaupel P, Kelleher DK. Intensified oxidative and nitrosative stress following combined ALA-based photodynamic therapy and local hyperthermia in rat tumors. *International journal of cancer.* 2003 Dec 20;107(6):941-8.
- [66] Brezden CB, McClelland RA, Rauth AM. Mechanism of the selective hypoxic cytotoxicity of 1-methyl-2-nitroimidazole. *Biochemical pharmacology.* 1994 Jul 19;48(2):361-70.
- [67] Cline JM, Thrall DE, Page RL, Franko AJ, Raleigh JA. Immunohistochemical detection of a hypoxia marker in spontaneous canine tumours. *British journal of cancer.* 1990 Dec;62(6):925-31.
- [68] Biesalski HK, Lambert C, Frank J. Antioxidant micronutrients as additives in oncology. *Onkologe.* 2004;10:230-43.
- [69] Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Aug;6(8):662-80.
- [70] Shibamoto Y, Sugie C, Ito M, Ogino H. The Japanese experiences with hypoxia-targeting pharmacoradiotherapy: from hypoxic cell sensitizers to radiation-activated prodrugs. *Expert opinion on pharmacotherapy.* 2004 Dec;5(12):2459-67.
- [71] Bischoff P, Altmeyer A, Dumont F. Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: advances in traditional and hypoxia targeted radiosensitizers. *Expert Opin Ther Pat.* 2009 May;19(5):643-62.
- [72] Eschwege F, Sancho-Garnier H, Chassagne D, Brisgand D, Guerra M, Malaise EP, et al. Results of a European randomized trial of Etanidazole combined with radiotherapy in head and neck carcinomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1997 Sep 1;39(2):275-81.
- [73] Coleman CN, Halsey J, Cox RS, Hirst VK, Blaschke T, Howes AE, et al. Relationship between the neurotoxicity of the hypoxic cell radiosensitizer SR 2508 and the pharmacokinetic profile. *Cancer Res.* 1987 Jan 1;47(1):319-22.
- [74] Zhang L, Gong A, Ji J, Wu Y, Zhu X, Lv S, et al. The radiosensitizing effect of doranidazole on human colorectal cancer cells exposed to high doses of irradiation. *BMC cancer.* 2007;7:188.
- [75] Aoki M, Furusawa Y, Shibamoto Y, Kobayashi A, Tsujitani M. Effect of a hypoxic cell sensitizer doranidazole on the radiation-induced apoptosis of mouse L5178Y lymphoma cells. *Journal of radiation research.* 2002 Jun;43(2):161-6.
- [76] Murata R, Tsujitani M, Horsman MR. Enhanced local tumour control after single or fractionated radiation treatment using the hypoxic cell radiosensitizer doranidazole. *Radiother Oncol.* 2008 Jun;87(3):331-8.
- [77] Yu DY, Zhao QL, Wei ZL, Nomura T, Kashiwakura I, Kagiya TV, et al. Enhancement of radiation-induced apoptosis of human lymphoma U937 cells by sanazole. *Apoptosis.* 2009 May;14(5):655-64.

- [78] Emami S, Kumar P, Yang J, Kresolic Z, Paproski R, Cass C, et al. Synthesis, transportability and hypoxiaselective binding of 1-beta-D-(5-Deoxy-5-fluororibofuranosyl)-2-nitroimidazole (beta-5-FAZR), a configurational isomer of the clinical hypoxia marker, FAZA. *J Pharm Pharm Sci.* 2007;10(2):237-45.
- [79] Nakae T, Uto Y, Tanaka M, Shibata H, Nakata E, Tominaga M, et al. Design, synthesis, and radiosensitizing activities of sugar-hybrid hypoxic cell radiosensitizers. *Bioorganic & medicinal chemistry.* 2008 Jan 15;16(2):675-82.
- [80] Grigsby PW, Winter K, Wasserman TH, Marcial V, Rotman M, Cooper J, et al. Irradiation with or without misonidazole for patients with stages IIIB and IVA carcinoma of the cervix: final results of RTOG 80-05. *Radiation Therapy Oncology Group. International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1999 Jun 1;44(3):513-7.
- [81] Wasserman TH, Lee DJ, Cosmatos D, Coleman N, Phillips T, Davis L, et al. Clinical trials with etanidazole (SR-2508) by the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG). *Radiother Oncol.* 1991;20 Suppl 1:129-35.
- [82] Lee DJ, Pajak TF, Stetz J, Order SE, Weissberg JB, Fischer JJ. A phase I/II study of the hypoxic cell sensitizer misonidazole as an adjunct to high fractional dose radiotherapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck: a RTOG randomized study (#79-04). *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1989 Feb;16(2):465-70.
- [83] Overgaard J, Bentzen SM, Kolstad P, Kjoerstad K, Davy M, Bertelsen K, et al. Misonidazole combined with radiotherapy in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1989 Apr;16(4):1069-72.
- [84] Lee DJ, Cosmatos D, Marcial VA, Fu KK, Rotman M, Cooper JS, et al. Results of an RTOG phase III trial (RTOG 85-27) comparing radiotherapy plus etanidazole with radiotherapy alone for locally advanced head and neck carcinomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1995 Jun 15;32(3):567-76.
- [85] Huncharek M. Meta-analytic re-evaluation of misonidazole in the treatment of high grade astrocytoma. *Anticancer Res.* 1998 May-Jun;18(3B):1935-9.
- [86] Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, Bastholt L, Berthelsen A, Specht L, et al. A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiother Oncol.* 1998 Feb;46(2):135-46.
- [87] Overgaard J, Eriksen JG, Nordmark M, Alsner J, Horsman MR. Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitiser nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial. *The lancet oncology.* 2005 Oct;6(10):757-64.
- [88] Dayes IS, Abuzallouf S. Local tumour control in women with carcinoma of the cervix treated with the addition of nitroimidazole agents to radiotherapy: a meta-analysis. *The British journal of radiology.* 2005 Sep;78(933):777-82.
- [89] Overgaard J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol.* 2007 Sep 10;25(26):4066-74.

- [90] Karasawa K, Sunamura M, Okamoto A, Nemoto K, Matsuno S, Nishimura Y, et al. Efficacy of novel hypoxic cell sensitiser doranidazole in the treatment of locally advanced pancreatic cancer: long-term results of a placebo-controlled randomised study. *Radiother Oncol.* 2008 Jun;87(3):326-30.
- [91] Brown JM, Diehn M, Loo BW, Jr. Stereotactic ablative radiotherapy should be combined with a hypoxic cell radiosensitizer. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2010 Oct 1;78(2):323-7.
- [92] Coxon A, Pallis CA. Metronidazole neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1976 Apr;39(4):403-5.
- [93] Snavely SR, Hodges GR. The neurotoxicity of antibacterial agents. *Ann Intern Med.* 1984 Jul;101(1):92-104.
- [94] Duffy LF, Daum F, Fisher SE, Selman J, Vishnubhakat SM, Aiges HW, et al. Peripheral neuropathy in Crohn's disease patients treated with metronidazole. *Gastroenterology.* 1985 Mar;88(3):681-4.
- [95] Takeuchi H, Yamada A, Touge T, Miki H, Nishioka M, Hashimoto S. Metronidazole neuropathy: a case report. *Jpn J Psychiatry Neurol.* 1988 Jun;42(2):291-5.
- [96] Boyce EG, Cookson ET, Bond WS. Persistent metronidazole-induced peripheral neuropathy. *Dicp.* 1990 Jan;24(1):19-21.
- [97] McGrath NM, Kent-Smith B, Sharp DM. Reversible optic neuropathy due to metronidazole. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007 Aug;35(6):585-6.
- [98] Wasserman TH, Phillips TL, Johnson RJ, Gomer CJ, Lawrence GA, Sadee W, et al. Initial United States clinical and pharmacologic evaluation of misonidazole (Ro-07-0582), an hypoxic cell radiosensitizer. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1979 Jun;5(6):775-86.
- [99] Kogelnik HD, Meyer JH, Jentzsch K, Szepesi T, Karcher KH, Maida E, et al. Further clinical experiences of a phase I study with the hypoxic cell radiosensitizer misonidazole. *Br J Cancer Suppl.* 1978 Jun;3:281-5.
- [100] Dische S, Saunders MI, Lee ME, Adams GE, Flockhart IR. Clinical testing of the radiosensitizer Ro 07-0582: experience with multiple doses. *British journal of cancer.* 1977 May;35(5):567-79.
- [101] Urtasun RC, Chapman JD, Feldstein ML, Band RP, Rabin HR, Wilson AF, et al. Peripheral neuropathy related to misonidazole: incidence and pathology. *Br J Cancer Suppl.* 1978 Jun;3:271-5.
- [102] Sealy R, Williams A, Cridland S, Stratford M, Minchinton A, Hallet C. A report on misonidazole in randomized trial in locally advanced head and neck cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1982 Mar-Apr;8(3-4):339-42.
- [103] Saunders ME, Dische S, Anderson P, Flockhart IR. The neurotoxicity of misonidazole and its relationship to dose, half-life and concentration in the serum. *Br J Cancer Suppl.* 1978 Jun;3:268-70.
- [104] Panis X, Nguyen TD, Froissart D, Demange L. Hyperfractionated radiotherapy with or without misonidazole: results of a prospective randomized study in stage III-IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1984 Oct;10(10):1845-9.

- [105] Brown JM, Workman P. Partition coefficient as a guide to the development of radiosensitizers which are less toxic than misonidazole. *Radiation research*. 1980 Apr;82(1):171-90.
- [106] Brown JM, Yu NY, Brown DM, Lee WW. SR-2508: a 2-nitroimidazole amide which should be superior to misonidazole as a radiosensitizer for clinical use. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1981 Jun;7(6):695-703.
- [107] White RA, Workman P. Pharmacokinetic and tumour-penetration properties of the hypoxic cell radiosensitizer desmethylmisonidazole (Ro 05-Ro-9963) in dogs. *British journal of cancer*. 1980 Feb;41(2):268-76.
- [108] Stratford IJ. Mechanisms of hypoxic cell radiosensitization and the development of new sensitizers. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1982 Mar-Apr;8(3-4):391-8.
- [109] Abdel-Jalil RJ VW, Loeffler D et al Crystal structure of N,N,N-tris[2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl]amine, C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub>. *Z Kristallogr (NCS)*. 2008;223:505-6.
- [110] Langenbacher M, Abdel-Jalil RJ, Voelter W, Weinmann M, Huber SM. In vitro hypoxic cytotoxicity and hypoxic radiosensitization. Efficacy of the novel 2-nitroimidazole N,N,N-tris[2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl]amine. *Strahlenther Onkol*. Mar;189(3):246-54.
- [111] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 1991 Jun 3;139(2):271-9.
- [112] Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal*. 1999 Jan;76(1 Pt 1):469-77.
- [113] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 1992 Apr 1;148(7):2207-16.
- [114] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51.
- [115] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1415-20.
- [116] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*. 1992 Mar-Apr;5(2):227-31.
- [117] Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*. 1983 Apr;130(4):1910-7.
- [118] Welch BL. The Significance of the Difference Between Two Means when the Population Variances are Unequal *Biometrika*. 1938;29, No. 3/4 (Feb., 1938):350-62.

- [119] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*. 1979 Jul;59(3):527-605.
- [120] Boveris A CE. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Superoxide Dismutase*. 1982;2:15-30.
- [121] Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American journal of physiology*. 2007 May;292(5):H2023-31.
- [122] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*. 2006 Feb 10;311(5762):847-51.
- [123] Jiang J, Tang YL, Liang XH. EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer biology & therapy*. Apr 15;11(8):714-23.
- [124] Sugie C, Shibamoto Y, Ito M, Ogino H, Suzuki H, Uto Y, et al. Reevaluation of the radiosensitizing effects of sanazole and nimorazole in vitro and in vivo. *Journal of radiation research*. 2005 Dec;46(4):453-9.
- [125] Skov KA, MacPhail S. Low concentrations of nitroimidazoles: effective radiosensitizers at low doses. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1994 Apr 30;29(1):87-93.

## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde in der Klinik für Radioonkologie im Labor für Experimentelle Radioonkologie unter Betreuung von Professor Stephan Huber durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Professor Stephan Huber durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 16.03.2017

Matthias Klaus Langenbacher

## **Veröffentlichungen**

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

**Langenbacher M**, Abdel-Jalil RJ, Voelter W, Weinmann M, Huber SM. In vitro hypoxic cytotoxicity and hypoxic radiosensitization. Efficacy of the novel 2-nitroimidazole N,N,N-tris[2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl]amine. *Strahlentherapie und Onkologie* 2013, 189 (3): 246-254.