

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROCHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. ALEXANDER BRAWANSKI  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE EFFEKTE DER CARBOANHYDRASE IX-INHIBITION  
AUF DIE CHEMO- UND STRAHLENSENSIBILITÄT VON  
GLIOBLASTOMZELLEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Jana Paulina Teresa Baumgartner

2014



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROCHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. ALEXANDER BRAWANSKI  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE EFFEKTE DER CARBOANHYDRASE IX-INHIBITION  
AUF DIE CHEMO- UND STRAHLENSENSIBILITÄT VON  
GLIOBLASTOMZELLEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Jana Paulina Teresa Baumgartner

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Martin Proescholdt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Hau
Tag der mündlichen Prüfung:	28.08.2014

*Meinen Eltern*

---

*in Liebe und Dankbarkeit*

# Zusammenfassung

**Fragestellung:** Das Glioblastom, der häufigste hirneigene maligne Tumor im Erwachsenenalter, weist trotz multimodaler Therapie eine schlechte Prognose auf. Ein gesteigerter glykolytischer Metabolismus, intratumorale Hypoxie sowie eine resultierende erhöhte Expression der Carboanhydrase IX sind charakteristische Merkmale des Glioblastoms. Die CAIX ist in die Regulation des tumoralen pHs entscheidend involviert und für die Säurepufferung der Tumorzellen überwiegend verantwortlich. Dieses membranständige Enzym stellt den Export der im glykolytischen Metabolismus anfallenden Säuren sicher und trägt außerdem durch die Produktion von Bikarbonat zur Pufferung des Zytoplasmas bei. Deshalb nehmen wir an, dass die Induktion der CAIX mit der Entwicklung eines aggressiveren Phänotyps einhergeht.

Diese Eigenschaften machen die CAIX zu einem attraktiven Angriffspunkt einer zielgerichteten Tumorthherapie. Die vorliegende Studie hat zum Ziel, die Wirkung der CAIX-Inhibition auf das Ansprechen von Glioblastomzellen auf Temozolomid-Chemotherapie und Bestrahlung zu untersuchen.

**Material und Methodik:** Für die Versuche wurden Glioblastomzellen der Zelllinie U251 verwendet. Der genetische Knockout der CAIX erfolgte durch die Transfektion der Zellen mit spezifischer CAIX siRNA, die Kontrollgruppe wurde mit unspezifischer siRNA NSC transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe der 5 mM- bzw. 125 mM Glucoselösungen und die anschließende Kultivierung der Zellen für 24 h in einer Hypoxiekammer (Luftzusammensetzung: 5% CO<sub>2</sub> und 95% N<sub>2</sub>) bzw. unter Normoxie. Die Studie umfasste somit folgende Kombinationen: CAIX-Knockout/NSC-Kontrolle, Hypoxie/Normoxie, niedrige/hohe Glucosekonzentration. Nach Ablauf der 24 h wurden die Zellen den verschiedenen Behandlungen zugeführt. Es erfolgte die Zugabe von 50 µmol des alkylierenden Chemotherapeutikums Temozolomid bzw. die einmalige Bestrahlung der Zellen mit 10 Gy. Anschließend wurden die Hypoxieplatten für weitere 24 h unter Hypoxie kultiviert. Der Zustand der Zellen musste 24 h, 48 h, 120 h sowie 144 h nach Bestrahlung bzw. Chemotherapie kontrolliert und mittels mikroskopischer Aufnahmen dokumentiert werden.

Am 6. Tag nach Bestrahlung bzw. Temozolomid-Gabe wurde ein Proliferationsassay (96® AQueous One Solution) durchgeführt, um die noch zur Zellteilung fähigen Zellen zu quantifizieren. In einem weiteren Ansatz mussten die Zellen auf Deckgläsern kultiviert werden, sodass am 6. Tag nach Bestrahlung bzw. Temozolomid-Gabe frühapoptotische Zellen mittels Annexin-Färbung und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung bestimmt werden konnten.

**Ergebnisse:** Die CAIX-Expression in U251-Zellen wurde unter Hypoxie dramatisch hochreguliert. Eine erfolgreiche Hemmung der CAIX-Expression in hypoxischen Glioblastomzellen durch RNA-Interferenz konnte mittels molekularbiologischen Untersuchungen verifiziert werden.

Schließlich führte die Inaktivierung der Carboanhydrase IX nach Bestrahlung sowie nach TMZ-Chemotherapie zu einer reduzierten Proliferationsrate sowie zu einer erhöhten Apoptoserate der Tumorzellen, sodass die CAIX-Inhibition das Ansprechen von Glioblastomzellen auf diese Therapien *in vitro* verbessert, wobei der Effekt unter TMZ-Chemotherapie stärker ausgeprägt war als unter Bestrahlung. Außerdem waren Hypoxie und glykolytische Bedingungen erforderlich, um eine optimale Wirkung der CAIX-Inhibition zu erzielen, wodurch ein Zusammenhang zwischen CAIX-Expression und therapeutischem Effekt nachgewiesen werden konnte.

**Schlussfolgerung:** Die spezifische Inhibition der Carboanhydrase IX sensibilisiert Glioblastomzellen für Bestrahlung und Temozolomid-Chemotherapie unter hypoxischen und glykolytischen Bedingungen und könnte eine attraktive Strategie darstellen, um als eine metabolisch orientierte Therapie die Behandlung maligner Gliome zu verbessern.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>I.1. Glioblastoma multiforme .....</b>	<b>6</b>
<i>I.1.1. Epidemiologie.....</i>	<i>6</i>
<i>I.1.2. Klassifikation.....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.3. Ätiologie.....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.4. Histologie .....</i>	<i>10</i>
<i>I.1.5. Pathogenese .....</i>	<i>13</i>
<i>I.1.5.1. Genetische Alterationen .....</i>	<i>13</i>
<i>I.1.5.2. Wachstumsfaktor-Signalwege .....</i>	<i>15</i>
<i>I.1.5.3. Weitere Einflüsse auf die Entwicklung maligner Gliome / Epigenetik .....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.6. Klinik .....</i>	<i>18</i>
<i>I.1.7. Diagnostik.....</i>	<i>19</i>
<i>I.1.8. Therapie.....</i>	<i>21</i>
<i>I.1.8.1. Allgemeine medizinische Maßnahmen.....</i>	<i>22</i>
<i>I.1.8.2. Radikale Tumoresektion.....</i>	<i>22</i>
<i>I.1.8.3. Postoperative Strahlentherapie .....</i>	<i>24</i>
<i>I.1.8.4. Chemotherapie .....</i>	<i>24</i>
<i>I.1.9. Prognose.....</i>	<i>29</i>
<i>I.1.10. Metabolismus .....</i>	<i>30</i>
<i>I.1.10.1. Glykolyse .....</i>	<i>30</i>
<i>I.1.10.2. Hypoxie.....</i>	<i>33</i>
<i>I.1.10.3. Nekrose .....</i>	<i>37</i>
<b>I.2. Carboanhydrase IX.....</b>	<b>40</b>
<i>I.2.1. Aufbau und Funktion .....</i>	<i>40</i>
<i>I.2.2. Assoziation mit Tumoren.....</i>	<i>43</i>
<i>I.2.3. Vorkommen in Hirntumoren .....</i>	<i>46</i>
<i>I.2.4. Induktionsmechanismen.....</i>	<i>47</i>
<i>I.2.5. Therapeutisches Potential.....</i>	<i>51</i>
<b>I.3. Fragestellungen und Ziele der Studie .....</b>	<b>53</b>



<b>II. Material und Methodik .....</b>	<b>55</b>
<b>II.1. Zelllinie U251 .....</b>	<b>55</b>
<b>II.2. Zellkultur .....</b>	<b>55</b>
II.2.1. Mediumwechsel .....	57
II.2.2. Subkultivierung der Zellen.....	57
II.2.3. Zellzählung mit der Neubauer-Kammer .....	58
II.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	59
<b>II.3. Untersuchung der CAIX-Expression unter Normoxie und Hypoxie .....</b>	<b>60</b>
II.3.1. Hypoxie / Normoxie der U251-Zellen für 24 h.....	60
II.3.2. RNA-Isolierung.....	62
II.3.3. Umschreiben der RNA in cDNA .....	64
II.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	66
II.3.5. Agarosegel-Elektrophorese.....	69
II.3.6. Nachweis auf Proteinebene .....	70
II.3.6.1. Proteinisolierung aus den U251-Zellen .....	70
II.3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	71
II.3.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	72
II.3.6.4. Western Blot .....	74
II.3.6.5. Immunoblot-Analyse.....	75
<b>II.4. Transfektion mit siRNA und anschließendem Hypoxie-Versuch .....</b>	<b>78</b>
II.4.1. Transfektion.....	79
II.4.2. Hypoxie/Normoxie der transfizierten U251-Zellen.....	80
II.4.3. Quantitative Real-Time-PCR mit dem Light Cycler.....	82
II.4.4. Nachweis auf Proteinebene .....	84
II.4.5. Immunfluoreszenzfärbung (Streptavidin-Biotin-Methode).....	84
<b>II.5. Bestrahlung und Chemotherapie der CAIX-Knockout-Zellen.....</b>	<b>87</b>
II.5.1. Bestrahlungs-Ansatz .....	87
II.5.2. Chemotherapie-Ansatz .....	89
II.5.3. Proliferationsassay .....	90
II.5.4. Annexin V-Färbung .....	91
 <b>III. Ergebnisse.....</b>	 <b>93</b>
<b>III.1. CAIX-Expression unter Hypoxie .....</b>	<b>93</b>
<b>III.2. Inhibition der CAIX-Expression durch siRNA .....</b>	<b>96</b>
<b>III.3. Bestrahlung/TMZ-Chemotherapie CAIX-defizitärer Glioblastomzellen...</b>	<b>99</b>

<i>III.3.1. Bestrahlungs-Versuch .....</i>	<i>100</i>
<i>    III.3.1.1. Morphologie der transfizierten U251-Zellen nach Bestrahlung.....</i>	<i>100</i>
<i>    III.3.1.2. Proliferationsassay .....</i>	<i>104</i>
<i>    III.3.1.3. Annexin-V-Färbung .....</i>	<i>105</i>
<i>III.3.2. Chemotherapie-Versuch.....</i>	<i>106</i>
<i>    III.3.2.1. Morphologie der transfizierten U251-Zellen nach TMZ-Gabe.....</i>	<i>106</i>
<i>    III.3.2.2. Proliferationsassay .....</i>	<i>110</i>
<i>    III.3.2.3. Annexin-V-Färbung .....</i>	<i>111</i>
 <b>IV. Diskussion .....</b>	 <b>113</b>
<b>    IV.1. Motivation und Ziele der Studie.....</b>	<b>113</b>
<b>    IV.2. CAIX-Expression unter Hypoxie .....</b>	<b>114</b>
<b>    IV.3. Inhibition der CAIX-Expression durch siRNA.....</b>	<b>116</b>
<b>    IV.4. Bestrahlung/TMZ-Chemotherapie CAIX-defizitärer Glioblastomzellen</b>	<b>120</b>
<b>    IV.5. Ausblick.....</b>	<b>128</b>
 <b>V. Literaturverzeichnis.....</b>	 <b>130</b>
 <b>VI. Anlagen .....</b>	 <b>147</b>

# I. Einleitung

## I.1. Glioblastoma multiforme

### *I.1.1. Epidemiologie*

Das Glioblastom ist der häufigste hirneigene maligne Tumor des Erwachsenen (Jukich, McCarthy et al. 2001). Die Inzidenz in der westlichen Welt beträgt 2-3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und ist somit höher als die der afrikanischen oder asiatischen Länder.

Der Altersgipfel der Erkrankung liegt dabei zwischen 50 und 70 Jahren, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen und Menschen mit weißer Hautfarbe doppelt so oft wie die schwarze Bevölkerung (Ohgaki 2009).

Eine Zunahme der Inzidenz über die letzten zwei Jahrzehnte, v.a. in der älteren Bevölkerung, lässt sich zum Teil durch die verbesserte diagnostische Bildgebung erklären. Trotz multimodaler Therapiemöglichkeiten beträgt die mittlere Überlebenszeit nur 14,9 Monate (Paravati, Heron et al. 2010). Die therapeutische Anwendung ionisierender Strahlung, z.B. aufgrund einer Leukämie in der Kindheit, repräsentiert den einzigen, erwiesenen, umgebungsbedingten Risikofaktor für die Entstehung maligner Gliome (Ohgaki and Kleihues 2005).

Ein möglicher Zusammenhang mit dem Gebrauch von Mobiltelefonen, dem Vorkommen magnetischer Feldern sowie Nahrungsmittelkontaminationen durch Stickstoffverbindungen konnte bis heute nicht bewiesen werden. Momentan werden ferner virale Infektionen (z.B. CMV-Viren, Simian Virus 40, JC Virus, HHV 6) sowie chemische Kanzerogene als Risikofaktoren diskutiert (Ohgaki and Kleihues 2005; Schwartzbaum, Fisher et al. 2006). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Assoziation zwischen immunologischen Faktoren und dem Auftreten von Gliomen. Es stellte sich heraus, dass Menschen mit Atopien ein geringeres Risiko für die Entwicklung eines Glioms aufweisen als Menschen, die nicht zu Überempfindlichkeitsreaktionen neigen, und dass Gliom-Patienten mit einem erhöhten IgE-Level länger überleben als Patienten mit normalen IgE-Leveln (Wiemels, Wiencke et al. 2002; Linos, Raine et al. 2007; Wiemels, Wilson et al. 2009).

Nur 5 % der Patienten weisen eine positive Familienanamnese auf, wovon die wenigsten Fälle mit genetischen Syndromen wie der Neurofibromatose Typ 1 und 2, der tuberösen Sklerose, dem Retinoblastom, dem multiplen Hamatom, dem Li-Fraumeni-Syndrom oder dem Turcot-Syndrom assoziiert sind (Farrell and Plotkin 2007).

### *1.1.2. Klassifikation*




Maligne Gliome sind histopathologisch heterogene, invasive Tumoren, die von den Stützzellen des ZNS auszugehen scheinen. Die WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS graduiert die verschiedenen Tumorentitäten anhand ihrer histologischen Eigenschaften und ermöglicht somit eine Voraussage über das Ansprechen eines Hirntumors auf verschiedene Therapiestrategien sowie über die Prognose des Patienten.

Gliome zählen zu den neuroepithelialen hirneigenen Tumoren und umfassen astrozytäre Tumore, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome, Ependymome, Tumore des Plexus choroideus sowie seltene Tumore neuroepithelialen Ursprungs.

Die Gliome werden anhand ihrer Differenzierung in vier Grade unterteilt (I-IV), wobei die Malignität mit jedem Grad zunimmt.

Das Glioblastoma multiforme, im Folgenden als Glioblastom bezeichnet, ist ein Gliom Grad IV und zählt somit zu den hochgradigen (WHO-Grad III-IV) Gliomen mit hoher Malignität und schlechter Prognose.

1926 versuchten Bailey und Cushing erstmals eine Klassifikation der Gliome zu etablieren (Bailey and Cushing 1926). Mittlerweile existiert die vierte überarbeitete Auflage der WHO-Klassifikation maligner Gliome, welche folgende Einteilung festlegte:

WHO-Klassifikation der Gliome <sup>1</sup>		Histologie	Alter bei Diagnose	Inzidenz
Grad I	Pilozytisches Astrozytom	Zytologische Atypien  	18,2 ± 12,2	0,38
Grad II	Diffuses Astrozytom			0,26
	• Fibrilläres Astrozytom		39,5 ± 13,0	0,22
	• Gemistozytäres Astrozytom		50,1 ± 21,9	0,04
	Pilomyxoides Astrozytom		< 1 Jahr	
	Pleomorphes Xanthoastrozytom		19,0 ± 4,6	0,02
Grad III	Oligodendrogliom	 + Zellularität ↑ + Kernatypien ↑, + Mitotische Aktivität↑,	40,9 ± 15,1	0,27
	Oligoastrozytome		41,1 ± 9,9	0,10
	Anaplastisches Astrozytom		45,5 ± 16,2	0,25
	Anaplastisches Oligodendrogliom		50,4 ± 13,9	0,07
Grad IV	Anaplastisches Oligoastrozytom	 + Mikrovaskuläre Gefäßproliferationen +/-oder Nekrosezonen	48,2 ± 17,4	0,06
	Gliomatosis cerebri		n.a.	n.a.
	Glioblastom		62,2 ± 13,4	3,55
	• Riesenzellglioblastom			
	• Gliosarkom			

*Tabelle 1: Dargestellt ist die WHO-Klassifikation der Gliome, die entsprechende Histologie, das Alter bei Diagnosestellung sowie die zugehörigen Inzidenzen.*

*Quelle: Angelehnt an Kleihues (Klassifikation, Grading und genetisches Profil der Gliome)*

*1 (Louis, Ohgaki et al. 2007)*

### I.1.3. Ätiologie

Obwohl die Terminologie Glioblastom oder Oligodendrogliom den zellulären Ursprung maligner Hirntumore benennt, ist bis heute unklar, aus welchen Zellen das Glioblastom hervorgeht.

Bis vor einigen Jahren ging man davon aus, dass das Gehirn nur wenig regenerationsfähig ist und Stammzellen nur in der embryonalen und frühen postnatalen Phase vorhanden sind. Mittlerweile konnten jedoch multipotente neuronale Stammzellen sowie Progenitorzellen in der subventrikulären Zone, dem Hippocampus sowie der subcortikalen weißen Substanz des adulten Gehirns nachgewiesen werden (Sanai, Alvarez-Buylla et al. 2005).

Eine aktuelle Hypothese geht deshalb von im adulten Gehirn verbliebenen neuronalen Stammzellen oder ihren Vorläuferzellen aus, welche durch genetische Alterationen zur Entstehung primärer Hirntumore führen (2002; Singh, Clarke et al.

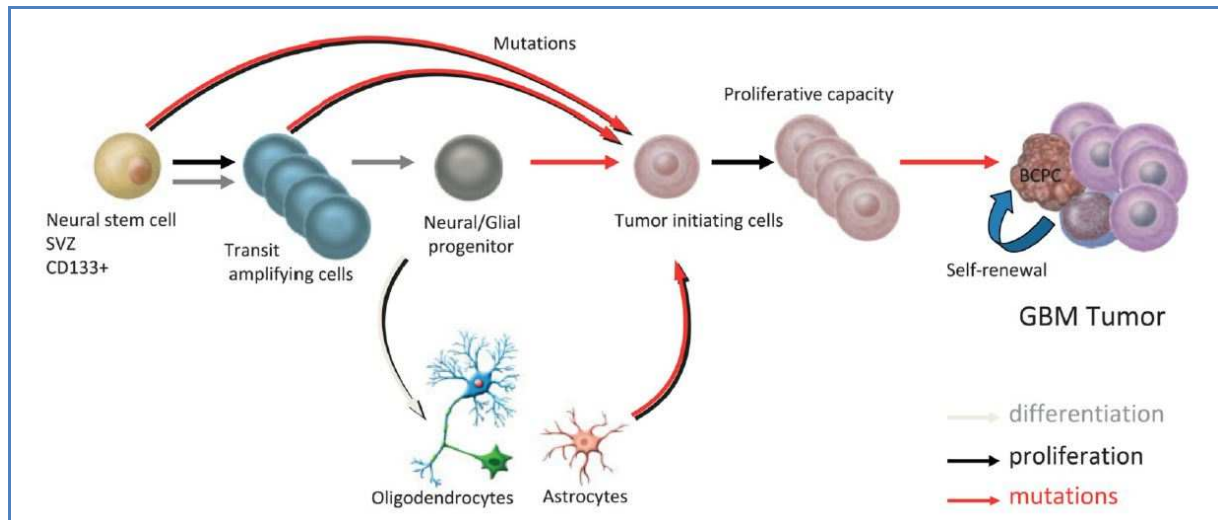
2003; Singh, Clarke et al. 2004; Singh, Hawkins et al. 2004; Sanai, Alvarez-Buylla et al. 2005; Hadjipanayis and Van Meir 2009; Hadjipanayis and Van Meir 2009).

Die sogenannte Tumorstammzellhypothese setzt voraus, dass nicht alle Tumorzellen in der Lage sind, zu proliferieren und das Tumorstadium zu unterhalten. Nur ein kleiner Teil der Tumorzellen, die sogenannten Tumorstammzellen (TSZ), behalten die Fähigkeit zur Proliferation und zur Selbsterneuerung und können das Wachstum des Tumors gewährleisten oder sogar in geringer Zahl selbst Tumore bilden. Die meisten Tumorzellen verlieren diese Fähigkeit und differenzieren zu malignen Zellen, die je nach Differenzierungsgrad ihrem Ursprungsgewebe ähneln.

Die Heterogenität des Glioblastoms bezüglich seiner Proliferation und Differenzierung sowie das Vorkommen von CD 133<sup>-</sup>-Zellen und CD 133<sup>+</sup>-Zellen (CD 133 dient als stammzellspezifischer Marker) suggeriert eine von Stammzellen ausgehende hierarchische Organisation. Im Einklang damit, konnte gezeigt werden, dass neuronale Stammzellen durch bestimmte, in vielen Hirntumoren ebenfalls vorkommende, zelluläre Signalwege reguliert werden (Reya, Morrison et al. 2001). Folglich weisen sie viele charakteristische Merkmale maligner Gliome auf. Dazu zählen die hohe Motilität, die Assoziation zu Blutgefäßen und Nervenfaserbündel der weißen Substanz, die Vielfältigkeit der Abkömmlinge, die starke Proliferationsfähigkeit sowie das für maligne Gliome charakteristische Expressionsprofil der Stammzellen (Singh, Hawkins et al. 2004; Sanai, Alvarez-Buylla et al. 2005).

Gemäß der Tumorstammzellhypothese können Resistenzen der TSZ gegenüber Chemotherapien sowie ihre Fähigkeiten neue Tumore zu bilden, Rezidive maligner Hirntumore nach 3-6 Monaten erklären. Der Großteil des Tumors würde demnach auf die Chemotherapie ansprechen, wohingegen die TSZ unbeeinträchtigt blieben und in der Lage wären den Tumor neu zu bilden (Hadjipanayis and Van Meir 2009).

Ob die TSZ aus normalen Stammzellen, Progenitorzellen oder de novo aus mutierten differenzierten Zellen hervorgehen, bleibt bis heute unklar.



**Abbildung 1:** Gezeigt ist eine mögliche Abstammungslinie für die Ontogenese und Produktion von Tumorstammzellen (Tumor Initiating Cells, TIC) sowie für die Entwicklung eines Glioblastoms. Während der normalen ZNS-Differenzierung erfahren neuronale Stammzellen verschiedene Amplifikationen, die es ihnen ermöglichen Transit Amplifying Cells (TAC) zu produzieren, welche wiederum zu neuronalen/glialen Vorläuferzellen differenzieren. Diese Vorläuferzellen besitzen die Fähigkeit entweder neuronale oder gliale Zellen zu bilden. Mutationen, die zur Entwicklung eines GBM beitragen, können auf allen Stufen dieser Abstammungslinie auftreten und TICs bilden. Ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Proliferation sowie ihr Vermögen BCPCs (Brain Cancer Propagating Cells), differenzierte Tumorzellen oder Tumovorläuferzellen zu bilden, weist auf die stammzellähnlichen Eigenschaften der TICs hin.

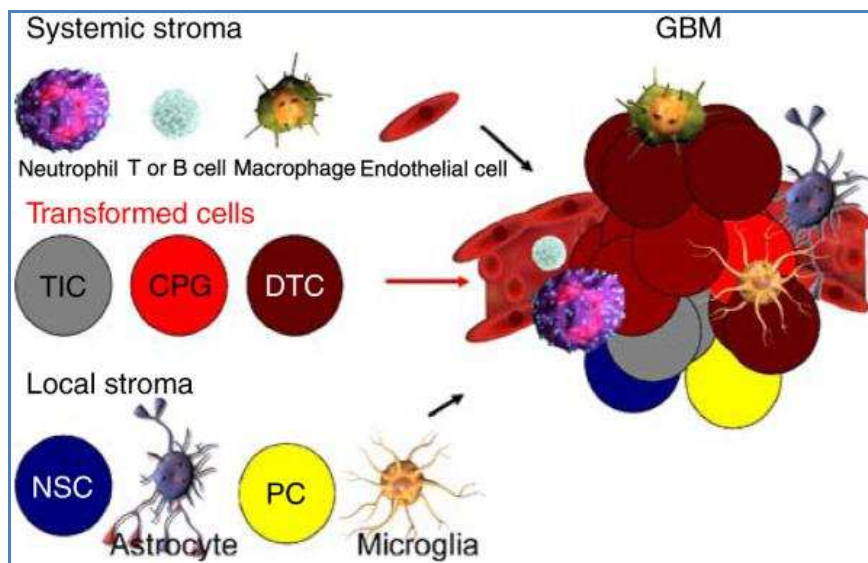
Quelle: (Van Meir, Hadjipanayis et al.)

### I.1.4. Histologie

Histologisch ist das Glioblastom durch nukleäre Atypien, hohe Mitoseaktivitäten, eine hohe Zelldichte sowie Nekroseherde gekennzeichnet. Auffällig sind außerdem die massiv gesteigerte Angiogenese, definiert als die Bildung von Gefäßproliferaten, sowie die gesteigerte Thrombosierungsneigung der Tumorgefäße. Das Vorkommen von vitalem Tumorgewebe neben Stromazellen, Einblutungen sowie narbigen und zystischen Veränderungen führt zu dem typischen heterogenen Bild des Tumors und ist für das unterschiedliche Outcome der Patienten mitverantwortlich. *In vivo* imponiert das Glioblastom durch eine zentrale Nekrosezone, die von einem pallisadenartigen Tumorsaum umgeben ist. Letzterer geht wiederum in infiltratives Tumorgewebe über, welches dem Glioblastom seine Aggressivität verleiht und eine vollständige Resektion meist nicht möglich macht (Burger 1983).

Häufig ist das Glioblastom in der weißen Substanz der Großhirnhemisphären lokalisiert, wo es sich über den Balken als sogenanntes Schmetterlingsgliom auf die gegenüberliegende Hemisphäre ausbreiten kann. Der Tumor ist gewöhnlich von

einem ausgedehnten Ödem der weißen Hirnsubstanz umgeben. 5 % -10 % der Glioblastome sind bei Diagnosestellung bereits multifokal (Bailey and Cushing 1926).



*Abbildung 2: Gezeigt ist die heterogene Zusammensetzung eines Glioblastoms. Systemische Stromazellen (Neutrophile, T- und B-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen) und lokale Stromazellen (Neuronale Stammzellen, Astrozyten, Vorläuferzellen, Mikroglia) scheinen während der Tumorentstehung mit transformierten Zellen (TSZ, Tumovorläuferzellen, differenzierte Tumorzellen) zu interagieren.*

*Quelle: (Hadjipanayis and Van Meir 2009)*

Ein charakteristisches Merkmal astrozytärer Tumore ist ihre diffuse Invasivität. Niedrig- und hochgradige Astrozytome wachsen in das Hirngewebe, sodass sich Tumorzellen mit normalen Zellen vermischen und die Tumorgrenze zunehmend in gesundes Hirnparenchym übergeht. Die Tumorzellen migrieren bevorzugt entlang Nervenfaserbündeln der weißen Substanz (z.B. Corpus callosum), entlang der Basallamina von Hirngefäßen sowie längs der Glia limitans externa (Burger 1983; Bellail, Hunter et al. 2004).

Der extrazellulären Matrix (EZM) des Hirnparenchyms fehlen diverse, in anderen Organen enthaltene Bestandteile, wie z.B. die Basallamina und das Stromagewebe. Es scheint so, als hätten die Gliomzellen bestimmte Infiltrations-Mechanismen entwickelt, die an die einzigartige Zusammensetzung und Struktur der zerebralen EZM angepasst sind (Bellail, Hunter et al. 2004). Dies würde auch erklären, warum bei Metastasen extrazerebraler Tumore keine invasiven Tochterzellen gefunden werden, sondern meistens scharfe Tumorgrenzen bestehen.

Die Fähigkeit der Gliomzellen tief ins gesunde Hirngewebe zu infiltrieren, stellt eine große klinische Herausforderung dar, zumal sie unter anderem für Rezidive nach



Resektion, Strahlen- und Chemotherapie verantwortlich gemacht wird (Van Meir, Hadjipanayis et al.).

Extrakraniale Filialisierungen sind eine seltene Manifestation des Glioblastoms. Die Gründe für die Seltenheit dieses Phänomens sind bis heute weitgehend ungeklärt. Eine mögliche Erklärung ist die extrem verkürzte Überlebenszeit der Patienten, welche den Glioblastomzellen zu wenig Zeit für das Bilden von Metastasen in extrakraniellen Organen lässt. Außerdem existieren intrinsische Hindernisse, die ein Infiltrieren und Überleben der Tumorzellen jenseits der neuronalen Umgebung verhindern, wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke, die Thrombosierung intrazerebraler Venen durch den Tumor, das Fehlen eines lymphatischen Systems innerhalb des Gehirns und Rückenmarks sowie eine die Hirnvenen umgebende Dura. Durch diese Barrieren werden eine Penetration sowie eine systemische Dissemination der Tumorzellen erheblich erschwert. Zusätzlich fehlt das nährnde Stützgewebe in den anderen Organen, welches das Überleben und die Proliferation der Glioblastomzellen erleichtern würde (Lun, Lok et al. 2011).

Es konnten jedoch, entgegen dieser Abwehrmechanismen, in einigen Glioblastom-Patienten extrakranielle Metastasen nachgewiesen werden.

Die häufigsten Zielorgane systemischer Metastasierung von Gliomen sind die Lunge, die Pleura sowie zervikale und mediastinale Lymphknoten. Das Achsenskelett sowie die Leber sind seltener betroffen. Pasquier et al. stellten außerdem fest, dass der Großteil dieser Patienten jünger (zwischen 20 und 50 Jahren) und männlichen Geschlechts waren. 89 % von ihnen erhielten mindestens eine Kraniotomie, was zu Spekulationen über eine intraoperative Tumorverschleppung führte. Nur in 11 % der Fälle wurden extrakranielle Metastasen ohne Voroperationen oder Shuntimplantationen beobachtet (Pasquier, Pasquier et al. 1980).

Des Weiteren wurden in der Vergangenheit Transmissionen von extrakraniellen Glioblastom-Metastasen von Organspender auf Organempfänger beschrieben (Frank, Muller et al. 1998; Armanios, Grossman et al. 2004; Fatt, Horton et al. 2008). In allen Fällen konnte der gliale Ursprung der Metastasen im Transplantat durch Immunhistochemie nachgewiesen werden. In vielen Fallbeispielen verstarben die Organempfänger innerhalb weniger Wochen an den Folgen der durch infiltrierende Glioblastom-Zellen entstandenen Organschäden.

### *1.1.5. Pathogenese*

Die maligne Transformation von Gliomzellen resultiert aus einem Zusammenspiel genetischer Abberationen und unkontrollierten Wachstumsfaktor-Signalwegen. Die Mutationen werden durch chromosomale Analysen des Karyotyps sichtbar gemacht und triggern typischerweise die Aktivierung von Onkogenen sowie das Stilllegen von Tumorsuppressorgenen.

Die Glioblastome werden anhand ihrer Biologie sowie ihren genetischen Alterationen (s. Abb. 2) in zwei Subtypen unterteilt. Die primären Glioblastome entstehen aus gesundem Hirngewebe und treten in der Regel bei älteren Patienten auf, wohingegen die selteneren sekundären Glioblastome (5 % aller GBM) aus niedrigmalignen Astrozytomen im Laufe mehrerer Jahre hervorgehen und häufig jüngere Patientinnen betreffen. Morphologisch lassen sich die Subtypen nicht voneinander abgrenzen und auch im Ansprechen auf die konventionelle Therapie scheinen sie sich nicht zu unterscheiden (Ohgaki and Kleihues 2007).

#### 1.1.5.1. Genetische Alterationen

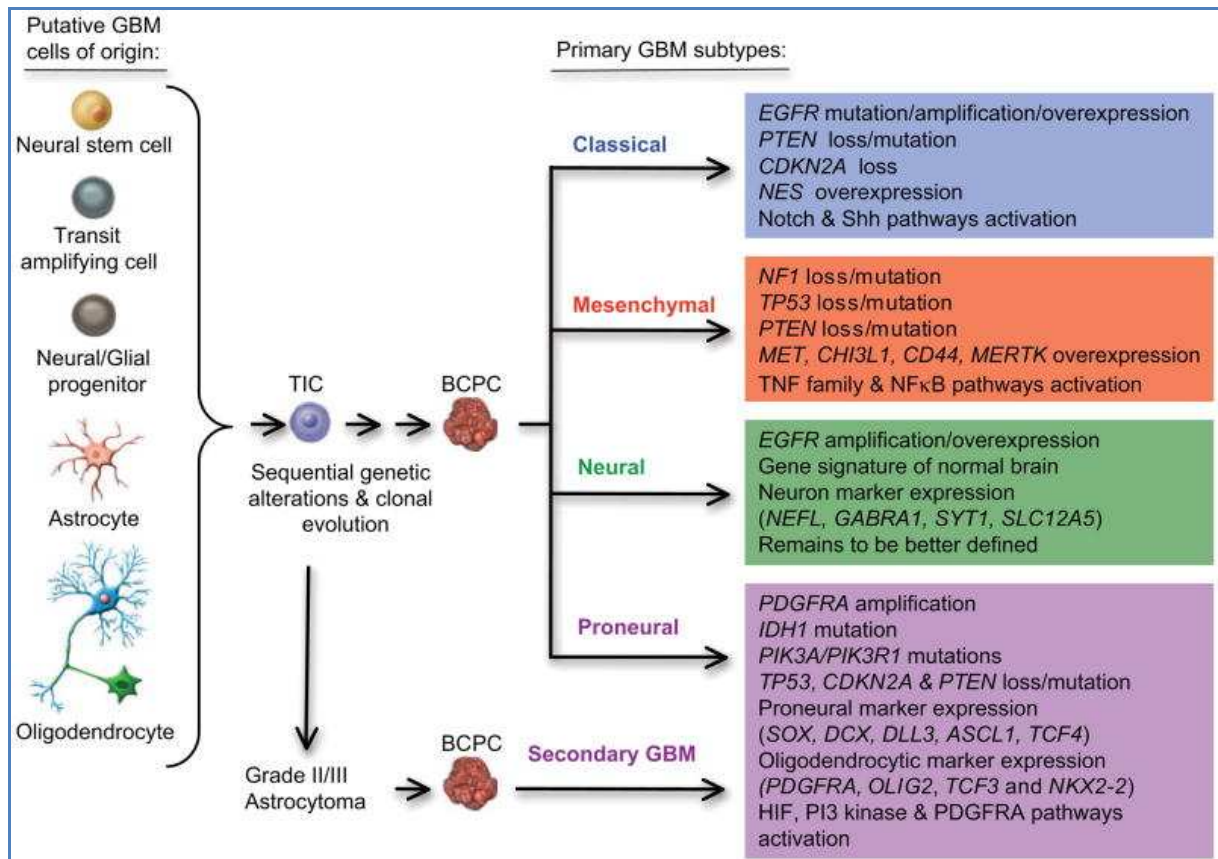
Primäre Glioblastome sind zum größten Teil durch Mutationen und Amplifikationen des EGFR-Gens (Epidermal Growth Factor Receptor), Deletionen der Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) sowie p16INK4a-Deletionen charakterisiert.

Sekundäre Glioblastome sind dagegen vorwiegend durch Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen, Überexpression des PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor), Mutationen im IDH-1-Gen sowie Abnormalitäten im p16- und Retinoblastom-Signalweg gekennzeichnet (Ichimura, Ohgaki et al. 2004; Parsons, Jones et al. 2008).

Der LOH (Loss of Heterozygosity) auf dem langen Arm des Chromosoms 10, ein Ort der Tumorsuppressorgene, ist die häufigste Aberration beider Subtypen (Ohgaki and Kleihues 2007).

Das Tumorsuppressorprotein p53 gilt als Wächter des Genoms (Lane 1992) und beeinflusst DNA-Reparatur-Mechanismen, Zellzyklusproteine, die Zellproliferation und die Neovaskularisierung sowie die Apoptose (Bogler, Huang et al. 1995). Die verschiedenen Lokalisationen der p53-Punktmutationen in primären und sekundären Glioblastomen bestärken die Annahme unterschiedlicher Entstehungswege dieser Subtypen. In sekundären Glioblastomen sind 57 % der Mutationen in sogenannten

Hotspot-Codons lokalisiert, wohingegen die Mutationen in primären Glioblastomen gleichmäßig auf die Exons verteilt sind (Ohgaki 2005).



**Abbildung 3:** Das Cancer Genome Atlas Network katalogisierte vor kurzem wiederholt auftretende genomische Alterationen in Glioblastomen. Sie entwarfen eine auf genetischen Expressionen basierende molekulare Klassifikation des Glioblastoms. Beim primären GBM werden somit klassische, mesenchymale, neurale und proneurale Subtypen unterschieden (Verhaak, Hoadley et al.). Diese genetischen Expressionsprofile können verwendet werden, um die Klassifikation des Tumors, sein Ansprechen auf die Therapie sowie das Outcome der Patienten zu prognostizieren. Die Untersuchungen führten außerdem zu der Erkenntnis, dass jeder Tumor in seiner Expression einzigartig ist und somit einer individuellen Therapie bedarf.

- Der klassische Subtyp enthält hoch proliferierende Zellen und wird durch Amplifikationen auf Chromosom 7, Verluste auf Chromosom 10 sowie Verluste auf Chromosom 9p21.3 charakterisiert. Das klassische GBM spricht gut auf die konventionelle Strahlen- und Chemotherapie an, da in dieser Gruppe die p53-DNA-Reparaturmechanismen weitgehend intakt sind.
- Das Expressionsprofil des zweiten Subtyps ist v.a. mit Mesenchym und Angiogenese assoziiert, wobei der Tumor auf aggressive Chemotherapie sowie eventuell zusätzlich auf Ras-, PI3K- und Angiogenese-Inhibitoren anspricht.
- In der proneuralen Gruppe, welche weniger häufig Amplifikationen auf Chromosom 7 und Verluste auf Chromosom 10 aufweisen, sind die Patienten jünger und haben eine geringfügig bessere Prognose als Patienten mit Tumoren der anderen Subtypen. Das proneurale GBM spricht am besten auf HIF-, PI3K-, und PDGFRA-Signalweg-Inhibitoren an.
- Der weniger gut definierte neuronale Subtyp ist durch eine geringe Infiltration normaler Zellen gekennzeichnet.

Quelle: Modifiziert nach (Van Meir, Hadjipanayis et al.)

### I.1.5.2. Wachstumsfaktor-Signalwege

Wachstumsfaktor-Signalwege führen zu einer Aktivierung von transkriptionalen Programmen, die das Überleben, die Proliferation und Invasion sowie die Angiogenese fördern.

EGFR ist ein Transmembranrezeptor, der nach Binden eines Liganden das Zellwachstum stimuliert und die Apoptose verhindert. Die Hälfte aller Tumore mit EGFR-Amplifikationen exprimieren die konstitutive Variante des EGFR (EGFRvIII), welche ohne extrazelluläre Bindungsdomäne aktiv ist (Pelloski, Ballman et al. 2007).

PDGF spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von Gliazellen und wird zusammen mit seinem Rezeptor häufig in malignen Gliomen exprimiert. Sie erzeugen einen autokrinen Kreislauf, welcher die Proliferation des Tumors stimuliert (Furnari, Fenton et al. 2007).

Der MAPK (Mitogen-Activated-Protein-Kinase)-Signalweg ist an der Proliferation sowie am Ablauf des Zellzyklus beteiligt. Die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Akt-mTOR (mammalian Target of Rapamycin)-Signaltransduktion ist in die Hemmung der Apoptose sowie die Zellproliferation involviert und wird von PTEN, ein Tumorsuppressorgen, negativ beeinflusst. PTEN ist in 40-50 % der Glioblastom-Patienten inaktiviert (Furnari, Fenton et al. 2007).

Viele von den oben genannten Signalwegen führen zu einer vermehrten Bildung von VEGF, ein überwiegend durch Hypoxie induzierter Wachstumsfaktor (Ragel, Couldwell et al. 2007), der die Angiogenese steigert und somit die Versorgung von Tumoren aufrechterhält.

Weitere, zu den Eigenschaften maligner Gliome beitragende Faktoren, sind u. a. der Hedgehog-, Wnt-, Notch-, CXCR4 (CXC-Chemokine Receptor 4)-Signalweg sowie die BMP (Bone Morphogenetic Proteins)-Proteine (Wen and Kesari 2008).

Medikamente, die an diesen Signalwegen ansetzen, sind Gegenstand aktueller Forschung.

### I.1.5.3. Weitere Einflüsse auf die Entwicklung maligner Gliome / Epigenetik

Momentan werden auch zunehmend epigenetische Modifikationen und Einflüsse anderer Moleküle in die Biologie der Gliome involviert.

Isocitrat-Dehydrogenasen (IDH) sind Enzyme, die die oxidative Carboxylierung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat katalysieren und als Teil des Citratzyklus zur Produktion von NADPH beitragen.

Mutationen in den Isoformen IDH1 und 2 treten in 70 % der niedriggradigen Gliome und sekundären Glioblastome auf (Parsons, Jones et al. 2008).

Die IDH 1-Mutation, die nur eine Kopie des Gens betrifft, ist sehr spezifisch und führt zum Austausch einer Aminosäure, sodass das Enzym nicht mehr in der Lage ist, seine Funktion im Citratzyklus auszuüben.

Die Mutation verleiht ihnen jedoch eine neue enzymatische Fähigkeit, nämlich die Produktion von D2-Hydroxyglutarat aus  $\alpha$ -Ketoglutarat (Dang, White et al. 2009).

Die Rolle der IDH1-Mutationen in der Tumorentwicklung ist bis heute weitgehend unbekannt. Jüngste Erkenntnisse (Borodovsky, Seltzer et al.) zeigen, dass IDH 1/2-mutierte Zellen Alterationen in Signalwegen aufweisen, die in die Glutamin-, Fettsäure- sowie Citratsynthese involviert sind. Außerdem kann das produzierte D2-Hydroxyglutarat  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Enzyme, darunter Histon-Demethylasen und DNA-Hydroxylasen, kompetitiv hemmen und so möglicherweise zu einem individuellen epigenetischen Phänotyp führen. IDH 1/2 -Mutationen scheinen somit durch einen veränderten Tumormetabolismus sowie DNA-Methylierungen zur Tumorigenese beizutragen.

TGF- $\beta$ 2 (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) wird in über 90% der hochgradig malignen Gliome überexprimiert (Fontana, Bodmer et al. 1991; Maxwell, Galanopoulos et al. 1992) und scheint als autokriner Wachstums- und Entdifferenzierungsstimulus eine zentrale Rolle in der Karzinogenese maligner Gliome zu spielen (Thiery 2002). Neben den autokrinen Effekten scheint TGF- $\beta$ 2 mit seinen parakrinen Wirkungen die Tumor-induzierte Immunsuppression, die Angiogenese, die Zellmotilität sowie die maligne Invasion zu begünstigen (Stiles, Ostrow et al. 1997; Platten, Wick et al. 2000; Wick, Grimm et al. 2001). In der Behandlung hochgradig maligner Gliome befinden sich Targettherapien mit dem TGF- $\beta$ 2-Inhibitor Trabectedin bereits in klinischer Erprobung (Bogdahn, Hau et al.).

Es stellte sich außerdem heraus, dass erhöhte TGF- $\beta$ 2-Konzentrationen in Gliomzelllinien mit einer Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) einhergehen (Rooprai, Rucklidge et al. 2000; Wick, Platten et al. 2001).

MMPs sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die in der Lage sind, viele Bestandteile der extrazellulären Matrix zu zersetzen. Die Isoform MMP2 wird in hochgradigen Gliomen dramatisch überexprimiert (Sawaya, Yamamoto et al. 1996) und scheint die Zellmigration sowie -invasion zu modulieren (Deryugina, Luo et al. 1997; Deryugina, Bourdon et al. 2000).

Mi-RNAs (Micro-RNAs) sind 18-25 Nukleotid lange nicht-kodierende RNAs, die endogen exprimiert werden und die Proteintranslation unterdrücken, indem sie komplementär an die mRNA binden. Sie spielen eine entscheidende Rolle bezüglich der Regulation des Zellzyklus, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung sowie der Apoptose (Esquela-Kerscher and Slack 2006). Da die mi-RNAs sowohl die Translation von Onkogenen als auch die der Tumorsuppressorgene regulieren, liegt ihre Beteiligung an der Pathogenese von Tumoren nahe. Häufig sind sie in Tumor-assoziierten genomischen oder fragilen Bereichen lokalisiert (Calin, Sevignani et al. 2004).

Sowohl in primären Glioblastomen als auch in Zelllinien ist die aberante Expression oder Repression multipler mi-RNAs auffällig (Nicoloso and Calin 2008).

Mehrere kleine Studien untersuchten die Expression von mi-RNAs in Glioblastomen und zeigten, dass sie einen Einfluss auf die Tumorigenese ausüben (Novakova, Slaby et al. 2009) sowie mit dem unterschiedlichen Überleben der Patienten assoziiert sind (Srinivasan, Patric et al.).

Ob die Dysregulation von mi-RNAs ein Auslöser oder eine Konsequenz maligner Tumortransformation ist, muss noch weiter untersucht werden.

Epigenetische Alterationen beeinflussen ebenfalls die Tumorphathogenese und stehen im Mittelpunkt der heutigen Forschung.

Vor kurzem stattgefundenen Follow-up-Studien zeigten eine globale Hypomethylierung in 80 % der primären Glioblastome, welche eine auffällig hohe Proliferationsrate besaßen und mit dem vermeintlichen Onkogen MAGEA 1 assoziiert waren (Nagarajan and Costello 2009).

Außerdem scheint auch die Locus-spezifische Hypermethylierung von CpG-Inseln eine Rolle bei der Tumorgenese sowie Tumorprogression zu spielen. Zum Beispiel sind der Retinoblastom-, TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor), PI3K- und p53-Signalweg sowie Gene, die zu einer Metastasierung und Invasion von Tumoren beitragen, von der Hypermethylierung betroffen (Nagarajan and Costello 2009).

Die Methylierung des MGMT (O6-Methyl-Guanin-Methyl-Transferase)-Promotors ist ein Beispiel für epigenetisches Gensilencing in Glioblastomen.

MGMT ist ein DNA-Reparatur-Protein, welches alkylierende Substanzen von Basen der DNA entfernt und somit normale Zellen vor einer Entartung bewahrt. MGMT schützt jedoch auch die Tumorzellen vor alkylierenden Chemotherapeutika, sodass es zu einer Resistenz gegenüber diesen Medikamenten kommen kann. Demzufolge geht das Stilllegen des MGMT-Gens durch Methylierung des Promotors mit einer reduzierten DNA-Reparatur-Aktivität in Glioblastomzellen einher und ist somit ein prognostisch günstiges Zeichen.

Eine reduzierte Methylierung des MGMT-Promotors führt zu einer erhöhten Aktivität des DNA-Reparatur-Gens und folglich zu einem schlechteren Ansprechen der Glioblastomzellen auf eine Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen wie Temozolomid. Demnach ist eine Hypomethylierung mit einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert (Hegi, Diserens et al. 2005; Everhard, Kaloshi et al. 2006).

### *1.1.6. Klinik*

In den meisten Fällen ist die präklinische Anamnese relativ kurz. Bei Patienten mit einem primären Glioblastom vergehen vom Auftreten erster klinischer Symptome bis zur Diagnosestellung meist nur wenige Monate. Allerdings kann diese Zeitspanne bei sekundären Glioblastomen, die aus einem niedrigmalignen Astrozytom entstehen, mehrere Jahre betragen (Ohgaki and Kleihues 2007).

Hirntumore können praktisch jede neurologische Beeinträchtigung hervorrufen. Die Art der Störung hängt entscheidend von der Histologie des Tumors sowie von seiner Lokalisation ab. Die klinische Manifestation kann lokal sein, wie z.B. Müdigkeit, Verlust der Somatosensibilität, Sehverlust oder Aphasie. Die intrakranielle Druckerhöhung führt dagegen eher zu einer globalen Symptomatik, wie z.B. Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie Bewusstseinsstörungen. Die Kopfschmerzen sind typischerweise intermittierend und erreichen wegen des

nächtlichen Druckanstiegs am Morgen ihren Höhepunkt. Patienten mit hochgradigen Gliomen neigen dazu ein schleichendes hirnnorganisches Psychosyndrom zu entwickeln, welches nicht selten Fehldiagnosen nach sich zieht. Niedriggradige Gliome verursachen dagegen häufig fokale oder generalisierte Anfälle, die eine Folge der tumorbedingten Kompression umliegender Hirnstrukturen darstellen und im Gegensatz zu den oben genannten Symptomen, am ehesten zu einer diagnostischen Abklärung führen.

Nur selten erfolgt die Erstvorstellung der Patienten plötzlich. In solchen Fällen lässt sich die akut aufgetretene Symptomatik meist auf schlaganfallartige Ereignisse infolge tumorbedingter intrazerebraler Blutungen zurückführen (Albert 1986).

Früherkennung, Prävention und Screening sind aufgrund der unklaren Genese sowie der momentan weitgehend unbekannten Risikofaktoren des Glioblastoms bisher nicht möglich. Eine Ausnahme stellen die in I.1.1. erwähnten genetischen Syndrome dar, die gehäuft zu einem Auftreten von primären Hirntumoren führen.

Differentialdiagnostisch müssen u.a. Hirnmetastasen extrazerebraler Tumoren, zerebrale Lymphome, intrazerebrale Blutungen anderer Genese, Hirninfarkte, entzündliche Prozesse, Infektionen, Keimzelltumore sowie psychische Krankheiten ausgeschlossen werden.

### *I.1.7. Diagnostik*

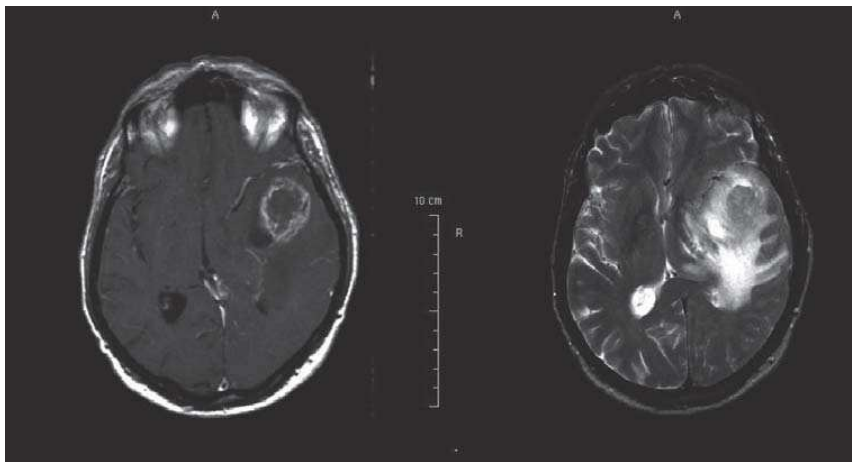
Besteht aufgrund von klinisch-neurologischer Symptomatik der Verdacht auf einen Hirntumor, muss eine zerebrale Bildgebung erfolgen.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Computertomographie sind, neben der histopathologischen Sicherung, die wichtigsten diagnostischen Hilfsmittel (Jacobs, Kracht et al. 2005).

Die MRT sollte, als Standardverfahren in der Diagnose und Verlaufskontrolle von Hirntumor-Patienten, native und kontrastmittelverstärkte T1- und T2-gewichtete Bilder sowie FLAIR (Fluid Attenuation Inversion Recovery) Sequenzen beinhalten (Schneider, Mawrin et al.). Außerdem müssen die Bilder in 3 Ebenen (axial, sagittal und coronar) wiedergegeben werden. Die bildgebenden Untersuchungen zeigen eine heterogene hypo-hyperdense Raumforderung ohne scharfe Begrenzung, umgeben von einem peritumoralen Ödem. Die Destruktion der Blut-Hirn-Schranke durch



hochgradige Gliome führt zu einer Kontrastmittel-Aufnahme, welche in der T1-Wichtung von der zentralen hypodensen Nekrose des Tumors differenziert werden kann (Ullrich, Kracht et al. 2008). Histologisch erweist sich die ringförmige Kontrastmittelanreicherung als hoch proliferatives Tumorgewebe mit Neovaskularisierung und erhöhter Gefäßpermeabilität. Nach außen hin wird der Tumor von einem perifokalen Ödem umgeben, dessen hyperdense Ausbreitung sich in der T2-Wichtung gut darstellen lässt. Die Infiltration maligner Tumorzellen reicht weit in das perifokale Ödem hinein (Burger 1983).



*Abbildung 4: Gezeigt ist die Kernspintomographie eines Glioblastoms in axialer Schnittebene mit zentraler Nekrose und starker peripherer Kontrastverstärkung sowie einem ausgeprägtem perifokalen Ödem.*

*a) T1-gewichtetes Bild mit ringförmiger Kontrastmittelanreicherung*

*b) T2-gewichtetes Bild zeigt ein perifokales Ödem*

*Quelle: (Schneider, Mawrin et al.)*

Ferner bietet die Magnetresonanzspektroskopie die Möglichkeit, die Signalstärke verschiedener zerebraler Metabolite (wie z.B. N-Acetylaspartat, Cholin, Kreatin, Laktat, Lipide) zu messen, was die Differenzierung der Hirntumore von nicht-neoplastischen Hirnläsionen erleichtert und außerdem einen Hinweis auf den Grad der Malignität des Tumors geben kann (Law, Yang et al. 2003).

Die Messung des regionalen zerebralen Blutflusses durch die perfusionsgewichtete Bildgebung liefert Informationen über die Angiogenese sowie das Grading des Tumors. Eine Steigerung des Blutflusses kann einen Hinweis auf die maligne Transformation eines niedriggradigen Glioms geben und somit helfen, eine Voraussage bezüglich Prognose und Überlebenszeit zu treffen (Danchaivijitr, Waldman et al. 2008).

Die funktionale MRT (fMRT) macht sich den Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und lokaler Perfusionsänderung bei funktioneller Stimulation zu Nutze und erstellt dadurch ein Bild der Gehirnaktivität, welches eine Identifikation funktionell wichtiger Hirnareale zulässt und so die neurochirurgische OP-Planung erleichtert.

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (SPECT) ermöglichen mittels geeigneter Tracer eine hochsensitive Messung molekularer und metabolischer Prozesse, die eine Aussage über die Ausdehnung des Hirntumors, seine proliferative Aktivität, seinen Metabolismus sowie seine Relation zu funktionell relevanten Bereichen des Gehirns erlauben. Somit dient die PET der Abschätzung von Radionekrosen, der frühzeitigen Entdeckung von Rezidiven, der Vorbereitung von Biopsien oder Strahlentherapien sowie der Erkennung von Pseudoprogressionen (s. I.1.5.3.). Die am häufigsten verwendeten Tracer in der Hirntumor-Diagnostik sind radioaktiv-markiertes Fluoroethyl Tyrosin (FET), D-Glucose, L-Tymin und L- Methionin. Ihre Anreicherung spiegelt die Aktivität ihrer Transporter in der Blut-Hirn-Schranke sowie die Aktivität der für ihre Metabolisierung notwendigen spezifischen Enzyme wider (Ullrich, Kracht et al. 2008).

Im Einzelfall können auch Elektroenzephalographie oder ophthalmologische Befunde auf eine zerebrale Raumforderung hinweisen.

Vor dem Beginn einer Therapie muss die Sicherung der Diagnose anhand des Tumorgewebes, welches mittels stereotaktischer oder intraoperativer Biopsie gewonnen wurde, erfolgen.

### *I.1.8. Therapie*

Das Ziel der Behandlung von Glioblastom-Patienten umfasst eine Druckentlastung, eine Ödemreduktion, die Eradikation von Epilepsieherden, eine Zytoreduktion sowie die Diagnosestellung.

Eine randomisierte prospektive Studie, die gemeinsam von EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) und NCIC (National Cancer Institute of Canada) durchgeführt und von Stupp et al. 2005 veröffentlicht wurde, belegte einen Überlebensvorteil unter begleitender und erhaltender TMZ-Chemotherapie zusätzlich zur Radiotherapie und zu der Etablierung einer neuen Standardtherapie (Stupp, Mason et al. 2005).

Die heutige Standardtherapie beinhaltet eine radikale Tumorresektion, gefolgt von einer sechswöchigen postoperativen Radiochemotherapie sowie einer sich anschließenden aus 6 Zyklen bestehenden adjuvanten TMZ-Chemotherapie.

#### I.1.8.1. Allgemeine medizinische Maßnahmen

Patienten, die unter fokalen oder generalisierten Anfällen leiden, sollten mit antiepileptischen Medikamenten behandelt werden, die keine Induktion der Cytochrom P450-Enzyme zur Folge haben (z.B. Levetiracetam), um einen beschleunigten Metabolismus der Chemotherapeutika zu verhindern. Kortikosteroide, wie Dexamethason, werden häufig verwendet, um das peritumorale Ödem zu verringern. Patienten, die Kortikosteroide einnehmen, haben jedoch ein erhöhtes Risiko, an einer Pneumozystis jirovecii Pneumonitis zu erkranken, weshalb eine prophylaktische Antibiotika-Therapie bedacht werden sollte (Wen, Schiff et al. 2006). Außerdem müssen auch die Langzeitschäden, wie Osteoporose, durch präventive Gabe von Vitamin D, Calcium und Bisphosphonaten verhindert werden.

Zusätzlich haben Patienten mit malignen Gliomen ein erhöhtes Risiko für venöse Thrombembolien (Wen, Schiff et al. 2006). Falls solche Patienten keine Kontraindikationen, wie intratumorale Blutungen, aufweisen, sollte eine Antikoagulanzen-Therapie mit vorzugsweise niedermolekularen Heparinen begonnen werden (Lee, Levine et al. 2003). Hirntumor-Patienten leiden häufig an Müdigkeit und könnten von einer Behandlung mit Modafinil oder Methylphenidat profitieren. Depressionen werden häufig unterdiagnostiziert, obwohl Antidepressiva und eine psychiatrische Unterstützung entscheidend zu einer verbesserten Lebensqualität beitragen würden (Litofsky, Farace et al. 2004).

#### I.1.8.2. Radikale Tumorresektion

Auch wenn maligne Gliome aufgrund ihrer infiltrativen Eigenschaften nicht vollständig entfernt werden können, sollten sich Patienten einer operativen Tumorresektion unterziehen. Die Radikalität der Operation wird entscheidend durch die Nähe des Tumors zu funktionell bedeutsamen Hirnarealen limitiert. Die operative Tumorverkleinerung reduziert die durch die Raumforderung hervorgerufenen klinischen Symptome und liefert Gewebe für die histologische und molekulare Diagnostik. Technische Fortschritte wie Neuronavigation, funktionelles MRT, intraoperative MRT, intraoperatives Mapping sowie Fluoreszenz-gestützte Resektion

minimieren Verletzungen des umliegenden gesunden Gewebes und erhöhen gleichzeitig das Ausmaß der maximal möglichen Resektion (Berger and Hadjipanayis 2007).

Die fluoreszenzgestützte Resektion beruht auf der oralen Gabe von nicht-fluoreszierender 5-Aminolävulinsäure (ALA), welche in der Häm-Biosynthese zu fluoreszierendem Protoporphyrin IX (Pp IX) metabolisiert wird. Die erhöhte Akkumulation von Pp IX in malignen Gliomen Grad III und IV könnte durch eine gesteigerte Aufnahme von 5-ALA in das Tumorgewebe (gestörte Blut-Hirn-Schranke, Neovaskularisierung, Überexpression der Membrantransporter) oder durch eine veränderte Expression bzw. Aktivität der Enzyme der Hämoglobin-Synthese erklärt werden (Van Meir, Hadjipanayis et al. ; Stummer, Stocker et al. 1998). Da die 5-ALA-induzierte Pp IX-Anreicherung in gesundem Hirngewebe sehr gering ist, zeichnet sich eine scharfe Tumorgrenze ab, die dem Neurochirurgen eine makroskopische Totalresektion ermöglichen kann.

Der Nutzen einer radikalen zytoreduktiven Operation wurde bereits in zahlreichen Studien analysiert. 2006 untersuchten Stummer et al. mittels fluoreszenzgestützter Resektion das Ausmaß von Glioblastom-Resektionen und erkannten, dass eine gründliche Tumorentfernung mit einem verbesserten Outcome sowie einer verlängerten progressionsfreien Überlebenszeit der Patienten einhergeht. Die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit kontrastverstärktem Resttumor im postoperativen MRT betrug nur 11,8 Monate, wohingegen Patienten mit einer makroskopischen Totalresektion 16,7 Monate überlebten (Pichlmeier, Bink et al. 2008). Weitere Studien sowie Risikofaktoranalysen beobachteten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen radikaler Zytoreduktion und verlängerter Überlebenszeit (Lacroix, Abi-Said et al. 2001; Pichlmeier, Bink et al. 2008).

Stereotaktische Biopsien sollten demnach nur bei Patienten mit inoperablen Tumoren erfolgen.

Eine R0-Resektion des Glioblastoms ist aufgrund der Invasivität der Tumorzellen praktisch unmöglich, deshalb bedarf es nach einer radikalen Tumorsektion weiterer Behandlungen.

#### I.1.8.3. Postoperative Strahlentherapie

Die Radiotherapie ist die tragende Säule der Therapie maligner Gliome. Die Ergänzung der chirurgischen Tumorresektion durch Bestrahlung verlängert die Überlebenszeit von Glioblastom-Patienten von 3-4 Monaten auf 7-12 Monate (Fine, Dear et al. 1993; Stupp, Mason et al. 2005).

Die konventionelle Radiotherapie besteht aus einer Gesamtdosis von 60 Gy und wird in 1,8 bis 2 Gy-Fraktionen 5 Tage pro Woche gegeben (Laperriere, Zuraw et al. 2002). Eine Ganz-Hirn-Bestrahlung ist in der Glioblastom-Therapie längst obsolet. Der Fokus der Strahlung sollte auf der kontrastverstärkten Tumormasse sowie einem begrenzten Randbereich liegen, wobei die Intensität im umliegenden Gewebe stark abnehmen sollte.

Patienten, die älter als 70 Jahre alt sind, haben eine schlechtere Prognose und tolerieren die Radiotherapie weniger gut als jüngere Patienten, sodass eine verkürzte Bestrahlung mit 40 Gy in 15 Fraktionen über 3 Wochen sinnvoll erscheint (Wen and Kesari 2008).

Nach einer Standard-Radiotherapie kommt es jedoch in 90 % der Fälle zu einem Lokalrezidiv (Hochberg and Pruitt 1980).

Mehrere Studien versuchten die Wirksamkeit der Radiotherapie durch Steigerung der Strahlendosis im Tumervolumen durch Brachytherapie (Selker, Shapiro et al. 2002) sowie stereotaktische Radiochirurgie (Souhami, Seiferheld et al. 2004; Tsao, Mehta et al. 2005) zu optimieren, konnten aber keine Verbesserung der Überlebenszeit nachweisen.

Der Verbesserung der Effektivität sind technische Grenzen gesetzt, sodass in Zukunft Medikamente, die das Ansprechen des Tumors auf die Bestrahlung modulieren, immer mehr an Bedeutung gewinnen werden.

#### I.1.8.4. Chemotherapie

Obwohl anfängliche randomisierte Studien mit adjuvanten Nitrosoharnstoff-basierten Chemotherapien nicht zum gewünschten Erfolg führten, suggerierten zwei Metaanalysen einen Zusammenhang zwischen adjuvanter Chemotherapie und moderatem Überlebenszeitgewinn (Fine, Dear et al. 1993; Stewart 2002).

Ein Meilenstein in der Behandlung des Glioblastoms stellte schließlich das alkylierende oral verabreichbare Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) dar. Stupp et al. belegten in einer randomisierten prospektiven 573 Probanden

umfassenden Studie, dass eine konkomitante Gabe von TMZ zur Radiotherapie sowie eine adjuvante TMZ-Chemotherapie das Überleben von Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom signifikant verbessert (Stupp, Mason et al. 2005). Die mittlere Überlebenszeit der Patienten, die eine kombinierte Radiochemotherapie erhielten, betrug 14,6 Monate, wohingegen Patienten, die nur bestrahlt wurden, lediglich 12,1 Monate überlebten. Außerdem stieg die 2-Jahres-Überlebensrate durch die zusätzliche Therapie mit TMZ von 10,4 % auf 26,5 %.

Die Wirksamkeit des TMZ in der Therapie maligner Gliome lässt sich u.a. auf die gute Bioverfügbarkeit (bei oraler Applikation nahezu 100 %) sowie die ausreichende Liquorgängigkeit zurückführen.

Die TMZ-Einnahme erfolgt täglich und begleitend zur 6-wöchigen Strahlentherapie, wobei die Dosierung 75 mg TMZ / m<sup>2</sup> Körperoberfläche beträgt. Nach einer 4-wöchigen Pause schließt sich die adjuvante TMZ-Chemotherapie an, welche mit einer täglichen Dosierung von 150-200 mg TMZ / m<sup>2</sup> Körperoberfläche einhergeht. Die Chemotherapie besteht aus 6 Zyklen, wobei jeder Zyklus 5 Tage umfasst und sich im Abstand von 28 Tagen wiederholt.

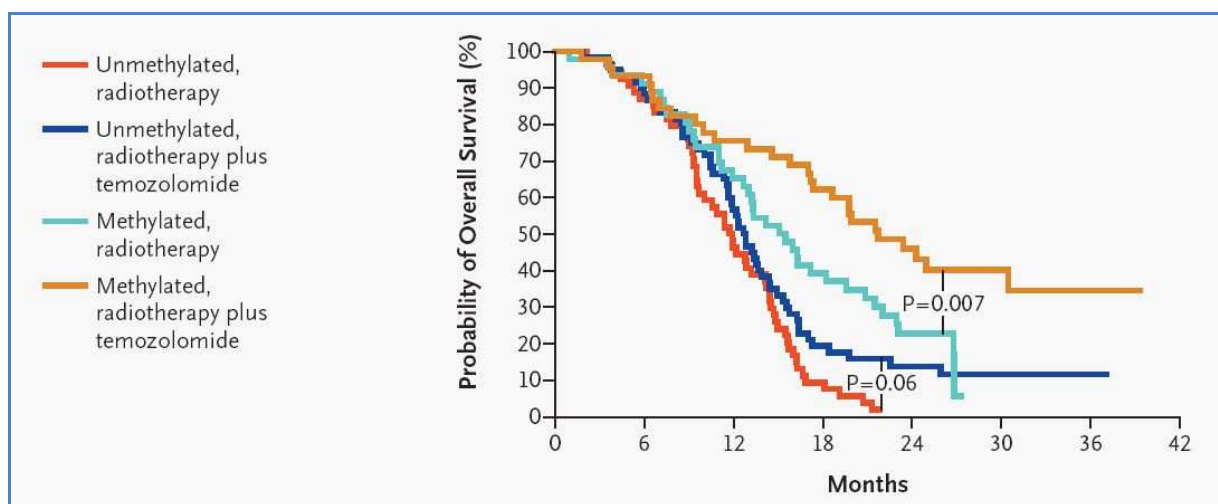
Die häufigsten Nebenwirkungen beinhalten v.a. Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit sowie Infektionen aufgrund einer Lymphozytopenie (van den Bent, Taphoorn et al. 2003). Die relativ selten auftretenden Knochenmarksdepressionen stellen, wie bei vielen zytotoxischen Substanzen, die dosislimitierenden Folgen der TMZ-Toxizität dar.

Eine Folge der TMZ-Radiochemotherapie in der Bildgebung stellt die im unmittelbaren Anschluss an die Radiotherapie gesteigerte Kontrastmittelverstärkung im MRT dar, die, als sogenannte Pseudoprogression, ein Tumorwachstum nachahmt (Hoffman, Levin et al. 1979). Chirurgische Interventionen schlossen ein Rezidiv als Ursache aus, sodass dieses Phänomen letztlich durch ein frühzeitiges Auftreten von Nekrosen, Ödemen sowie abnormen Gefäßpermeabilitäten zustande kommt (Brandes, Tosoni et al. 2008; Brandsma, Stalpers et al. 2008; Chamberlain 2008; Taal, Brandsma et al. 2008).

MGMT (s. I.1.4.2.) ist ein DNA-Reparatur-Protein, welches die von TMZ verursachten DNA-Schäden behebt und dabei selber inaktiviert und proteolytisch abgebaut wird. Die Methylierung des MGMT-Promotors führt zu einer verminderten Transkription des

MGMT-Gens, was eine herabgesetzte DNA-Reparatur zur Folge hat, sodass die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber TMZ erheblich gesteigert wird.

In einer die EORTC/NCIC-Untersuchungen begleitenden Studie wurden Tumorproben auf epigenetisches Silencing des MGMT-Gens untersucht. Bei 45% der Glioblastom-Patienten konnte eine Methylierung des MGMT-Promotors nachgewiesen werden. Patienten, die diese epigenetische Modifikation aufwiesen und sich einer TMZ-Chemotherapie unterzogen, hatten einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber TMZ-behandelten Patienten, bei denen kein MGMT-Silencing vorlag (21,7 Monate vs. 12,7 Monate) (Hegi, Diserens et al. 2005). Außerdem betrug die 2-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit MGMT-Silencing 46 %, wohingegen sie bei Patienten mit normaler Aktivität der MGMT-Proteine nur 13,8 % betrug.



**Abbildung 5:** Gezeigt sind die Ergebnisse der oben genannten Studie ((Hegi, Diserens et al. 2005)). Die Überlebenszeit der Patientengruppe mit methyliertem MGMT-Promotor und kombinierter Radiochemotherapie ist am längsten, wohingegen in der Patientengruppe ohne MGMT-Silencing mit Radiotherapie das ungünstigste Outcome beobachtet wird.

Andere Studien zeigten, dass die MGMT-Methylierung, unabhängig von der TMZ-Therapie, mit einem besseren Ansprechen des Tumors auf Radiotherapie assoziiert ist (Rivera, Pelloso et al. 2010). Da dieser Biomarker ebenso eine prädiktive Rolle bezüglich des Ansprechens von Glioblastom-Patienten auf TMZ-Chemotherapie zu spielen scheint, kann dem MGMT-Status möglicherweise eine generell prognostische Bedeutung im Hinblick auf das Überleben von Glioblastom-Patienten zugeschrieben werden.

Versuche, die MGMT-Aktivität zu unterdrücken, beinhalten MGMT-depletierende Hochdosis-TMZ-Therapien, die die MGMT-Enzyme der Zellen aufbrauchen sollen sowie eine Kombinationstherapie mit O<sup>6</sup>-Benzylguanin oder anderen MGMT-Inhibitoren (Van Meir, Hadjipanayis et al.). Die Effektivität der MGMT-Inhibitoren in Kombination mit zytotoxischen Chemotherapeutika ist jedoch aufgrund dosislimitierender Knochenmarksdepressionen gering. Die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) begünstigt als DNA-Reparatur-Enzym ebenso eine Chemotherapie-Resistenz gegenüber alkylierenden Substanzen, weshalb PARP-Inhibitoren in Kombination mit Strahlen- und Chemotherapie effektiv sein könnten (Donawho, Luo et al. 2007).

Weitere chemotherapeutische Ansätze drehen sich um die Implantation von biologisch abbaubaren Polymeren in das Bett des resezierten Tumors, welche nach und nach das alkylierende Chemotherapeutikum Carmustin (auch Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea (BCNU) genannt) freigeben, um verbliebene Tumorzellen zu zerstören (Giese, Kucinski et al. 2004; Westphal, Ram et al. 2006).

Da hochgradige Gliome Abnormalitäten in ihren zellulären Signaltransduktionswegen aufweisen, besitzen gezielt an diesen Wegen ansetzende Medikamente therapeutisches Potential. Antiangiogene, Target- sowie Gen- und Immuntherapien sind Gegenstand aktueller Forschung.

Die folgende Tabelle soll verdeutlichen, dass eine Vielfalt neuer Therapiestrategien in der Behandlung maligner Gliome existiert, welche jedoch bis heute zu keiner drastischen Überlebenszeitverlängerung, geschweige denn zu Heilungsaussichten führen konnte.



Zielstruktur	Beispiel
Konvektionsverstärkte Applikation von pharmakologischen Wirkstoffen	Cintredekin Besudotox
Medikamente, die die TMZ-Resistenzen überwinden: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hochdosis TMZ-Therapie</li> <li>• MGMT-Inhibitoren</li> <li>• PARP-Inhibitoren</li> </ul>	O <sup>6</sup> -Benzylguanin BSI-201, ABT-888
Neue Chemotherapien	RTA744, ANG1005
Antiangiogene Therapie: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-αvβ5 Integrin</li> <li>• Anti-Hepatozyten-Wachstumsfaktor</li> <li>• Anti-VEGF</li> <li>• Anti-VEGFR</li> <li>• Andere</li> </ul>	Cilengitid AMG-102 Bevacizumab, Aflibercept Cediranib, Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib, Vandetinib, Vatalanib, XL184, CT-322
Targettherapien: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Akt-Inhibitor</li> <li>• EGFR-Inhibitoren</li> <li>• FTI-Inhibitoren</li> <li>• HDAC-Inhibitoren</li> <li>• HSP90-Inhibitor</li> <li>• Met-Inhibitor</li> <li>• mTOR-Inhibitoren</li> </ul>	Perifosin Erlotinib, Gefitinib, Lapatinib, BIBW2992, Nimotuzumab, Cetuximab Tipifarnib, Ionafarnib  Vorinostat, Depsipeptid, LBH589 ATI3387 XL184 Everolimus, Sirolimus, Temsirolimus, Deforolimus
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PI3K-Inhibitoren</li> <li>• PKCβ-Inhibitor</li> <li>• PDGFR-Inhibitoren</li> <li>• Proteasom-Inhibitor</li> <li>• Raf-Inhibitor</li> <li>• Src-Inhibitor</li> <li>• TGF-β-Inhibitor</li> <li>• HIF-1-Inhibitoren (Jensen 2009)</li> </ul>	BEZ235, XL765 Enzastaurin Dasatinib, Imatinib, Tandutinib Bortezomib Sorafenib Dasatinib AP12009 103D5R, AP Endonuklease, 19 Furospingolide, Chetomin, Echinomycin, Geldanamycin, Noscapine
Immuntherapien <ul style="list-style-type: none"> <li>• EGFRvIII-gezielte Impfung</li> <li>• Tumorantigen-tragende dendritische Zellen als Impfstoff</li> <li>• Monoklonale Antikörper</li> </ul>	CDX-110 DCVax  131I-anti-Tenascin Antikörper
Gentherapien	

**Tabelle 2:** Dargestellt sind ausgewählte, neue Therapiestrategien in der Behandlung maligner Gliome. FTI (Farnesyltransferase), HDAC (Histon-Deacetylase), HSP90 (Heat-Shock-Protein 90), PKCβ (Proteinkinase C β)

Quelle: Modifiziert nach (Wen and Kesari 2008)

### I.1.9. Prognose

Entgegen aller Versuche in den letzten 30 Jahren, die Therapie maligner Gliome zu verbessern, bleibt das Glioblastom eine fatale Erkrankung, welche in den meisten Fällen trotz aggressiver Behandlung innerhalb kürzester Zeit zum Tode führt.

Das Glioblastom besitzt durchweg in allen Altersgruppen die schlechteste Prognose, wobei jüngere Patienten eine längere Überlebenszeit aufweisen als ältere (Ohgaki and Kleihues 2005). Dies würde u.a. die bessere Prognose der sekundären Glioblastom-Patienten, welche im Schnitt 17 Jahre jünger sind als Patienten mit primären Glioblastomen, erklären (Ohgaki and Kleihues 2007).

Die beobachteten Überlebensraten betragen nach 1 Jahr 17,7 %, nach 2 Jahren 3,3 % und nach 3 Jahren nur noch 1,2 % (Ohgaki, Dessen et al. 2004).

Die mittlere Überlebenszeit von Glioblastom-Patienten, die sich einer Standardtherapie unterziehen, beläuft sich auf 14,6 Monate (Stupp, Mason et al. 2005).

Die RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)-Studie aus dem Jahr 2003 unterteilt mittels der RPA (Recursive Partitioning Analysis)-Technik die Prognose von Glioblastom-Patienten in vier unterschiedliche Gruppen (Curran, Scott et al. 1993).

RTOG Klasse	Prognostische Faktoren	Mittlere Überlebenszeit (Monate)
<b>III</b>	Alter < 50, GBM, KPS 90-100	17,9
<b>IV</b>	Alter < 50, GBM, KPS < 90 Alter > 50, GBM, Resektion, keine neurologischen Defizite	11,1
<b>V</b>	Alter > 50, KPS 70-100, GBM, Resektion mit neurologischen Defiziten oder nur Biopsie gefolgt von Bestrahlung mit mind. 54,4Gy Alter > 50, KPS < 70, keine neurologischen Defizite	8,9
<b>VI</b>	Alter > 50, KPS 70-100, GBM, nur Biopsie gefolgt von Bestrahlung mit weniger als 54,4 Gy Alter > 50, KPS < 70, neurologische Defizite	4,6

*Tabelle 3: Dargestellt sind die von der RTOG festgelegten prognostischen Gruppen des Glioblastoms. Quelle: Modifiziert nach Brandes et al. (Brandes, Tosoni et al. 2008)*

Dieser prognostische Index basiert dabei auf dem Alter der Patienten, den histologischen Eigenschaften des Glioblastoms, dem Karnofsky-Index (Karnofsky Performance Status = KPS) sowie auf dem Ausmaß der Tumoresektion (Curran, Scott et al. 1993; Mirimanoff, Gorlia et al. 2006). Ein ungünstiger prognostischer Faktor stellt der LOH auf Chromosom 10q dar (Ohgaki and Kleihues 2005), wohingegen ein methylierter MGMT-Promoter sowie IDH1-Mutationen mit einer besseren Prognose einhergehen (Hegi, Diserens et al. 2005; Parsons, Jones et al. 2008). Außerdem beeinflusst die Größe der im MRT sichtbaren Nekrosezone das Outcome der Patienten entscheidend. (Lacroix, Abi-Said et al. 2001).

Derzeit ist eine Heilung des Glioblastoms mit den zur Verfügung stehenden Behandlungen nicht möglich, weshalb neue Therapieansätze notwendig sind, um die Lebensqualität sowie die Überlebenszeit der Patienten zu verbessern.

#### *I.1.10. Metabolismus*

Hypoxie, ein veränderter Glukosemetabolismus sowie extrazelluläre Azidose treten aufgrund unzureichender Perfusion sowie onkogener Mechanismen regelmäßig in malignen Tumoren auf (Stubbs, McSheehy et al. 2000).

##### I.1.10.1. Glykolyse

Maligne Gliome weisen eine hohe Glukoseverwertung auf (Di Chiro, DeLaPaz et al. 1982), welche mit einer massiven Laktatproduktion einhergeht (Herholz, Heindel et al. 1992) und vermutlich auf eine gesteigerte Glykolyse zurückgeführt werden kann (Imaya 1994).

In normalen Zellen wird die Glukosezufuhr bzw. die anaerobe Glykolyse in Anwesenheit von Sauerstoff weitgehend reduziert, da die unter aeroben Bedingungen in den Mitochondrien ablaufende Oxidation von Pyruvat zu H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> vergleichsweise wenig Glukose benötigt (Pasteur Effekt) (Racker 1974).

Bereits 1930 beobachteten Warburg et al. in Tumoren einen gesteigerten Abbau von Glukose zu Laktat unter aeroben Bedingungen, auch aerobe Glykolyse oder Warburg-Effekt genannt (Warburg 1930).

Der Vorteil der aeroben Glykolyse ist nicht sofort offensichtlich, da die anaerobe Verstoffwechselung von Glukose hinsichtlich der Energiebilanz ineffizient ist. Pro

Glukose entstehen nur 2 Moleküle ATP, wohingegen die vollständige Oxidation eines Glukose-Moleküls 38 ATP-Moleküle liefert. Außerdem entstehen bei der Glykolyse metabolische Produkte wie  $H^+$ -Ionen, welche zu einer Azidifizierung des Extrazellulärraums und so zu einer zellulären Toxizität führen können.

Trotz dieser Tatsachen zeigt der weitverbreitete klinische Gebrauch der Fluorodeoxyglucose PET, dass ein glykolytischer Phänotyp in den meisten menschlichen Tumoren vorhanden ist (Shaw 2006).

Auch in Gliomzellen konnte diese metabolische Abnormalität *in vitro* (Imaya 1994) und *in vivo* (Herholz, Heindel et al. 1992) bestätigt werden.

Nach Gatenby und Gillies liegt die hohe aerobe Glykolyse von Tumoren in der Darwinschen Evolutionstheorie „Survival of the Fittest“ begründet.

Die Karzinogenese ist demnach ein Prozess der somatischen Evolution, welcher bestimmte Merkmale maligner Tumore, wie z.B. die Hochregulation der Glykolyse, als Resultat eines aktiven Selektionsprozesses hervorbringt, die den Tumorzellen einen signifikanten Wachstumsvorteil verleihen.

Die konstitutive Hochregulation der Glykolyse in Tumorzellen scheint eine Adaptation an die durch das Wachstum des Tumors bedingten hypoxischen Bedingungen darzustellen. Außerdem kann die Glykolyse, im Gegensatz zur mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, binnen kurzer Zeit Energie in Form von ATP bereitstellen. Die folglich zunehmende Säureproduktion resultiert in einer azidotischen Umgebung, welche weitere Adaptationsmechanismen der Tumorzellen erfordert und so die Selektion säureresistenter Phänotypen begünstigt.

Die Azidifizierung des tumoralen Mikromilieus beeinträchtigt normale Zellen, wohingegen den säure- und hypoxieresistenten Tumorzellen ein großer Überlebensvorteil zukommt, da ihnen die Migration ins umliegende Gewebe durch die Zerstörung angrenzender Populationen sowie der extrazellulären Matrix erleichtert wird (Gatenby and Gillies 2004).

Die molekularen Mechanismen der gesteigerten Glykolyse in Tumorzellen sind noch nicht genau definiert. Die erhöhte Glukoseaufnahme maligner Tumorzellen kann jedoch auf die vermehrte Expression der Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 sowie der Hexokinasen I und II, Schlüsselenzyme der Glykolyse, zurückgeführt werden (Younes, Brown et al. 1997; Burt, Humm et al. 2001; Bos, van Der Hoeven et

al. 2002). Die onkogene Aktivierung von Signalwegen, die in die Glucoseaufnahme involviert sind, scheint für die Entstehung eines glykolytischen Metabolismus verantwortlich zu sein, wobei dem durch Hypoxie induzierbarem Transkriptionsfaktor HIF (s. I.1.7.2.) eine große Bedeutung zukommt (Chiche, Brahimi-Horn et al.).

Sowohl eine durch onkogene Mechanismen gesteigerte Glykolyse in Anwesenheit von Sauerstoff als auch ein hypoxieinduzierter anaerober Metabolismus der Tumorzellen resultiert letztendlich aufgrund der massiven Laktat- und Kohlendioxidproduktion in einer Azidose (Harris 2002; Helmlinger, Sckell et al. 2002; Raghunand, Gatenby et al. 2003).

*In vivo* Messungen mit pH-Mikroelektroden zeigten, dass der Extrazellulärraum von Tumoren einen azidotischen pH aufweist (Jahde, Rajewsky et al. 1982).

Überraschenderweise ist der zytoplasmatische pH maligner Gliome jedoch wesentlich alkalischer als der pH des normalen Hirnparenchyms (Rottenberg, Ginos et al. 1984; Arnold, Junck et al. 1985; Rottenberg, Ginos et al. 1985; Cadoux-Hudson, Blackledge et al. 1989),

Folglich scheinen Tumorzellen durch eine erhöhte Aktivität von pH-regulierenden Enzymen sowie Protonenpumpen und -austauschern einen pH-Gradienten zwischen intrazellulär ( $pH_i$ ) und extrazellulär ( $pH_e$ ) aufrecht zu halten, um die in alkalischem Milieu bevorzugt ablaufenden zellulären Prozesse zu gewährleisten, und um sich selber vor einer Azidose-induzierten Apoptose zu schützen (Mangiardi and Yodice 1990; Stubbs, McSheehy et al. 2000).

Die extrazelluläre Azidose von Tumoren führt zu einer erhöhten Produktion von Wachstumsfaktoren, angiogenen Faktoren und Proteasen, sie stimuliert die Zellinvasion und –motilität und beeinflusst das Ansprechen von Neoplasien auf Medikamente und konventionelle Therapien (Martinez-Zaguilan, Seftor et al. 1996; Webb, Sherratt et al. 1999; Stubbs, McSheehy et al. 2000; Gatenby and Gillies 2004).

Außerdem führt eine prolongierte Exposition normaler Zellen gegenüber einer sauren Umgebung durch p53- bzw. Caspase-abhängige Mechanismen zur ihrer Nekrose oder Apoptose (Park, Lyons et al. 1999; Williams, Collard et al. 1999).

Folglich verschafft die extrazelluläre Azidose Tumorzellen einen entscheidenden Selektionsvorteil.

Zusätzlich zur erhöhten Glukoseaufnahme und der gesteigerten aeroben Glykolyse weisen Glioblastomzellen weitere Besonderheiten in ihrem Metabolismus auf, wie beispielsweise eine steigende Glutaminolyse (Wolf, Agnihotri et al.). Glutamin wird dabei über Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgesetzt. Diese anaplerotische Reaktion dient der Energiegewinnung und trägt als dem Zitratzyklus zuliefernder Stoffwechselweg zu einer erhöhten  $\text{CO}_2$ - und Laktatakkumulation in Tumorzellen bei. Zwei weitere wichtige biosynthetische Aktivitäten proliferierender Tumorzellen ist die Produktion von Ribose-5-Phosphat für die Nukleotidsynthese sowie die Produktion von Fettsäuren für die Lipidsynthese (Wolf, Agnihotri et al.). Ribose-5-Phosphat wird v.a. im nicht-oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Weges regeneriert, welcher in Glioblastomen eine erhöhte Aktivität zeigt. Tumorzellen weisen außerdem eine gesteigerte Fettsäuresynthese auf, die die Modifikation von Membran-assoziierten Signalmolekülen sowie die de novo Membransynthese erlaubt. Zur Generation von Fettsäuren werden ebenfalls Glucosemoleküle herangezogen.

#### I.1.10.2. Hypoxie

Das Auftreten hypoxischer Areale resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffzufuhr und -verbrauch und ist eine charakteristische Eigenschaft solider Tumore (Vaupel, Kelleher et al. 2001).

Im Jahr 1999 zeigten Collingridge et al. mittels polarographischer Messungen sowie Valk et al. mit Hilfe des Hypoxietracer  $^{18}\text{F}$ -Misonidazol, dass auch maligne Gliome hypoxisch sind (Valk, Mathis et al. 1992; Collingridge, Piepmeier et al. 1999).

Dies erscheint zunächst paradox, da histologische Untersuchungen diese Tumoren meist als gut vaskularisiert beschreiben. Andererseits ist die Neovaskularisation schnell wachsender Tumore schlecht organisiert und kann durch strukturelle Abnormitäten, wie z.B. arteriovenöse Anastomosen oder stark gewundene blind-endende Gefäße, zu einem stockenden bzw. retrograden Blutfluss führen, was die Blutversorgung funktionell relativ insuffizient erscheinen lässt (Vaupel, Kallinowski et al. 1989; Vaupel, Kallinowski et al. 1989).

Tumorhypoxie resultiert somit aus einer unzureichenden Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr, die durch ein insuffizientes Gefäßsystem zustande kommt, welches nicht in der Lage ist, das schnell wachsende neoplastische Gewebe zu versorgen. Die entstehende Hypoxie ruft multiple Reaktionen in den Tumorzellen hervor, die eine Adaptation an die niedrige Sauerstoffversorgung bewirken.

Ein Wechsel vom oxidativen zum anaeroben Metabolismus kann den Sauerstoffverbrauch senken und so die Oxygenierung der Tumorzellen verbessern, wobei die gesteigerte Glykolyse eine extrazelluläre Azidose zur Folge hat, welche das umliegende Gewebe schädigt und für Tumorzellen einen Selektionsvorteil bietet.

Ein Schlüsselrolle im glykolytischen Stoffwechsel maligner Tumore besitzt der Hypoxie-regulierter Transkriptionsfaktor HIF-1 (Semenza 1998; Lu, Forbes et al. 2002), welcher sich aus den Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  zusammensetzt. Während HIF-1 $\beta$  auf transkriptionalem Level konstitutiv exprimiert wird, ist der proteosomale Abbau des HIF-1 $\alpha$ -Proteins unter hypoxischen Bedingungen stark reduziert, was eine massive Akkumulation des Proteins im Zellkern zur Folge hat (Salceda and Caro 1997; Huang, Gu et al. 1998; Semenza 2001). Dort aktiviert HIF-1 $\alpha$  DNA-Promotor-Regionen, die sogenannten HREs (Hypoxia Response Elements) und induziert die Transkription mehrerer Dutzend Gene, die der Zelle helfen, mit den niedrigen O<sub>2</sub>-Konditionen umzugehen (Jiang, Rue et al. 1996; Semenza 2000; Semenza 2001). Zu den HIF-1 $\alpha$ -regulierten Molekülen, welche den Wechsel vom oxidativen zum glykolytischen Metabolismus vermitteln, zählen u.a. VEGF, Hexokinase II, Glucose-Transporter 1, Carboanhydrase 9 (CAIX), Laktat-Dehydrogenase, Enolase, Tyrosin-Hydroxylase, Erythropoetin, Transferrin sowie diverse Wachstumsfaktoren (Lal, Peters et al. 2001; Semenza 2001; Brat, Kaur et al. 2003; Yasuda, Arai et al. 2004). Das Auftreten hypoxischer Regionen in Tumoren scheint somit ein entscheidender Mechanismus des neoplastischen Gewebes zu sein, um die Angiogenese, den Energie- und Eisenstoffwechsel sowie die pH-Regulation an die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen anzupassen.

Der Grad der Hypoxie und folglich die Aktivität des HIF-1 $\alpha$  in diversen Tumoren geht mit einer gesteigerten Invasivität, einem erhöhten Metastasierungspotential, der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemo-, Strahlen- und antiangiogener Therapie sowie einer schlechteren Prognose einher (Brizel, Scully et al. 1996; Birner, Schindl et al. 2000; Aebersold, Burri et al. 2001; Hockel and Vaupel 2001; Bos, van der Groep et al. 2003; Pennacchietti, Michieli et al. 2003; Jensen 2009).

Hypoxie scheint somit die Progression von Tumoren zu einem aggressiveren Phänotyp zu begünstigen.

Auch bei Hirntumoren steigt die mittels Immunhistochemie sichtbar gemachte Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$ -regulierten Proteinen, wie beispielsweise der CAIX, VEGF und GLUT-1 mit der Malignität des Tumors, sodass die größte Akkumulation in Glioblastomen beobachtet wird (Zagzag, Zhong et al. 2000; Proescholdt, Mayer et al. 2005; Jensen 2006; Flynn, Wang et al. 2008; Sathornsumetee, Cao et al. 2008).

Die durch antiangiogene Therapie bedingte, intratumorale Hypoxie scheint die Expression alternativer proangiogener Faktoren (u.a. Fibroblast Growth Factor, Ephrin A1, Angiopoietin) zu steigern sowie BMDCs (Bone Marrow Derived Cells) zu rekrutieren, wodurch das Tumorwachstum durch die Bildung neuer, von Perizyten dicht bedeckter Gefäße begünstigt wird (Bergers and Hanahan 2008). Sie unterstützt insofern die Annahme einer Hypoxie-induzierten Progression von Tumoren.

Außerdem gibt es zunehmend Hinweise, dass Hirntumore mit genetisch oder pharmakologisch geblockter Angiogenese sich durch eine aggressivere Invasion in das normale Hirnparenchym an die iatrogen induzierten hypoxischen Bedingungen adaptieren (Bergers and Hanahan 2008).

Vor kurzem wurden zwei weitere O<sub>2</sub>-sensitive Signalwege in die Onkogenese hypoxischer Tumore involviert. Die mTOR-Kinase sowie die Aktivierung der Unfolded Protein Response (UPR) scheinen mit dem Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  im Hinblick auf nachgeschaltete Signalwege, die die Genexpression, den Metabolismus, die Tumorigenese sowie das Tumorwachstum beeinflussen, zu interagieren (Wouters and Koritzinsky 2008). Das UPR ist ein in Folge von ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Stress aktiviertes Programm, welches zu transkriptionalen und translationalen Veränderungen führt. Die UPR-Aktivierung unter hypoxischen Bedingungen verursacht eine unmittelbare, aber reversible, Abnahme der gesamten Proteinsynthese und kann somit zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase unter Hypoxie beitragen (Koumenis, Naczki et al. 2002; Koritzinsky, Magagnin et al. 2006; Koritzinsky, Rouschop et al. 2007). Die Phosphorylierung des eIF2 $\alpha$  (Eukaryotic Translation Initiation Factor) durch die PERK (ER-residente-Kinase) bewirkt dabei eine reduzierte mRNA-Translation und somit eine verminderte Proteinproduktion. Das Ausmaß der Translations-Inhibition ist dabei äußerst genspezifisch, sodass dieser Mechanismus zur Hypoxie-induzierten Modulation der Genexpression



beizutragen scheint (Koritzinsky, Magagnin et al. 2006; van den Beucken, Koritzinsky et al. 2006).

Neben der Induktion durch Hypoxie konnten weitere Mechanismen identifiziert werden, die zu einer Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  und seinen transkriptional aktivierten Genprodukten führen.

Eine erhöhte Konzentration von HIF-1 $\alpha$  und seinen nachgeschalteten Zielgenen konnte auch in Assoziation mit Aktivitätsverlusten in den Tumorsuppressorgenen VHL, p53 und PTEN sowie im Zusammenhang mit anderen Tumorsuppressorgenen, Onkogenen und Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (Semenza 2001; Jensen 2009). Anhand einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie beobachteten Robey et al. einen Zusammenhang zwischen der durch Mutationen im VHL-Gen bedingten konstitutiv hochregulierten HIF-1 $\alpha$ -Expression und einem wesentlich erhöhten Glukoseverbrauch der Tumorzellen (Robey, Lien et al. 2005).

Die Entstehung eines glykolytischen Phänotyps in der Tumorentwicklung wird jedoch nicht nur durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  bestimmt, sondern zusätzlich durch HIF-1 $\alpha$ -unabhängige zelluläre Signalwege.

Zum Beispiel scheint eine vermehrte Expression von GLUT-1 direkt durch MYC (Dang and Semenza 1999; Osthuis, Shim et al. 2000) zu erfolgen sowie die Hochregulation der Hexokinase II durch eine Mutante des p53-Tumorsuppressorgens (Mathupala, Heese et al. 1997) oder durch die Demethylierung ihres Promotors bedingt zu sein (Goel, Mathupala et al. 2003).

Zudem sind nicht alle Hypoxie-regulierten Gene von HIF-1 $\alpha$  abhängig. Es konnten einige Hypoxie-regulierte Moleküle in Glioblastomen mittels Microarray-Analyse nachgewiesen werden, deren Induktion nicht durch HIF-1 $\alpha$  vermittelt wird (Ragel, Couldwell et al. 2007).

### I.1.10.3. Nekrose

Die histologische Diagnose des Glioblastoms wird entscheidend von der Präsenz nekrotischer Areale bestimmt, welche im Zusammenhang mit der tumoralen Hypoxie stehen (Louis, Ohgaki et al. 2007).

Glioblastome besitzen intratumorale Nekrosen, welche von Tumor zu Tumor variieren und nicht mit der Größe des Tumors assoziiert sind (Jensen 2009). Interessanterweise besteht jedoch ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Ausdehnung der Nekrose und dem Überleben der Patienten (Zagzag, Zhong et al. 2000).

Diese Beobachtungen suggerieren somit die Mutmaßung, dass Nekrosen nicht nur durch eine unzureichende Vaskularisation des Tumors entstehen, sondern ein Resultat molekularer oder genetischer Veränderungen sind.

Rong et al. konnten beispielsweise zeigen, dass Hypoxie die Expression des Gewebefaktors, welcher die Entstehung von mikrovaskulären Thrombosen und folgend das Auftreten intratumoraler Nekrosen begünstigt, hochreguliert (HIF-1-unabhängig) (Rong, Hu et al. 2006).

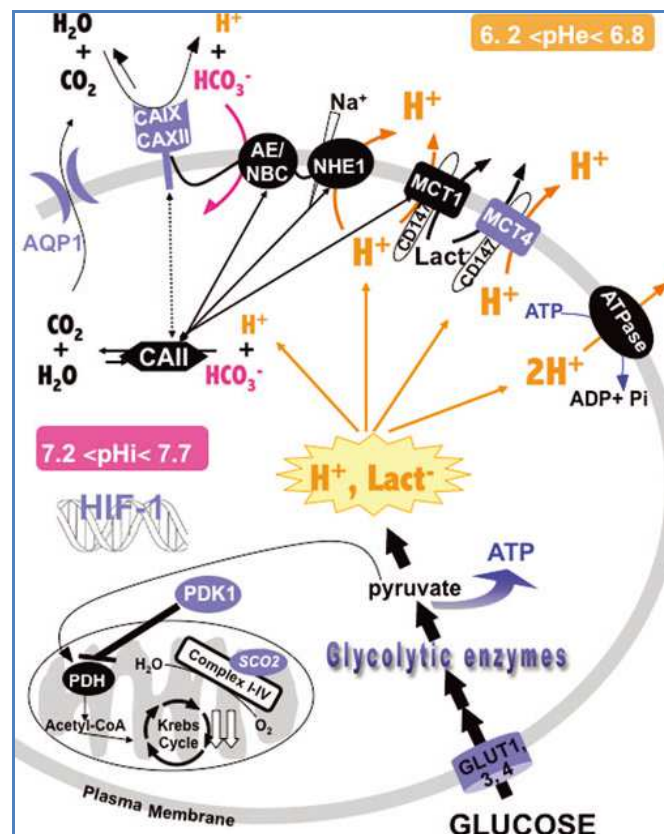
Hypoxie, ein erhöhter Glukoseverbrauch sowie extrazelluläre Azidose treten häufig in der Umgebung solider Tumore auf.

Die Azidifizierung der tumoralen Umgebung wurde hauptsächlich auf die in Folge einer gesteigerten Glykolyse auftretende massive Laktatproduktion sowie auf den schlechten Abtransport durch das insuffiziente Gefäßsystem zurückgeführt (Warburg 1930; Vaupel, Kallinowski et al. 1989; Herholz, Heindel et al. 1992; Imaya 1994). Die erhöhte Glykolyserate ist v.a. für hypoxische Zellen wichtig, deren Energieproduktion vom anaeroben Metabolismus abhängt. Allerdings konnten Experimente mit Glykolyse-defizitären Zellen zeigen, dass Laktatproduktion nicht der einzige Grund für die beobachtete Tumoralazidität sein kann (Newell, Franchi et al. 1993). Ein Vergleich der metabolischen Profile Glykolyse-beeinträchtigter Zellen und parenteraler Zellen zeigte, dass, neben Laktat, auch die Bildung von CO<sub>2</sub> eine wichtige Rolle im Azidifizierungsprozess spielt (Helmlinger, Sckell et al. 2002).

Diverse pH-Messungen zeigten außerdem, dass Tumorzellen trotz ihrer sauren Umgebung einen höheren intrazellulären pH aufweisen als nicht kanzeröse Zellen. Die Umkehr des pH-Gradienten (hoher pH<sub>i</sub> vs. niedriger pH<sub>e</sub>) ist, im Vergleich zu

normalen Zellen, eine charakteristische Eigenschaft von Tumoren (Vaupel, Kallinowski et al. 1989; Griffiths, McIntyre et al. 2001; Gatenby, Gawlinski et al. 2006).

Infolgedessen ist der gegenwärtige Konsens der Literatur, dass Tumorzellen ein effizientes Membrantransportsystem besitzen, welches Säuren aus der Zelle und  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen in die Zelle transportiert, um einen alkalischen intrazellulären pH zu gewährleisten. Der gesamte Regulationsmechanismus des intrazellulären pHs scheint diverse Ionentransporter sowie die Carboanhydrasen II, IX, XII zu umfassen, welche koordiniert zusammenarbeiten (Chiche, Brahimi-Horn et al.; Cardone, Casavola et al. 2005; Pouyssegur, Dayan et al. 2006; Swietach, Vaughan-Jones et al. 2007; Chiche, Ilc et al. 2009).



**Abbildung 6:** Dargestellt ist die für invasive Tumore charakteristische Hochregulation der Glykolyse und der intrazellulären pH-Regulation. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 stimuliert die Glykolyse, indem er die Expression von Glucosetransporter (GLUT) und glykolytischen Enzymen aktiviert. Der Inhibitor PDK (Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase) hemmt die mitochondriale Aufnahme von Pyruvat. Trotz der enormen Säureproduktion halten Tumorzellen durch ein spitzfindiges Ionentransportsystem ihren intrazellulären pH aufrecht, um fundamentale zelluläre Funktionen zu gewährleisten.  $\text{Na}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher I (NHEI),  $\text{Cl}^{-}/\text{HCO}_3^{-}$ -Austauscher (CBE),  $\text{Na}^{+}/\text{HCO}_3^{-}$ -Kotransporter (NBC),  $\text{H}^{+}$ /Laktat Kotransporter (MCT), Anionenaustauscher (AE), ATPasen, AQP 1 (Aquaporin 1) sowie CAII, IX und XII scheinen dabei involviert zu sein. Viele dieser Transporter formen sehr wahrscheinlich funktionelle Metabolons, die den Fluss von Protonen, Laktat, Kohlenstoffdioxid und Bikarbonat sicherstellen.

Quelle: (Chiche, Brahimi-Horn et al.)

Diese Daten implizieren somit eine mögliche Funktion der Carboanhydrasen (s.I.2.), welche die reversible Hydratation von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$ -Ionen katalysieren. Die durch den Tumormetabolismus entstehenden Säuren diffundieren in Form von  $\text{CO}_2$  aus der Zelle und werden durch die extrazellulär positionierten Carboanhydrasen in Protonen und Bikarbonat-Ionen umgewandelt. Die entstehenden Protonen verursachen eine extrazelluläre Azidifizierung, wohingegen das Bikarbonat-Ion nach intrazellulär transportiert wird und durch die Anhebung des zytoplasmatischen pHs einer durch Laktatakkumulation verursachten Azidose entgegenwirkt. Die extrazelluläre Azidifizierung führt zur Aktivierung proteolytischer Enzyme (u.a. Cathepsin B) und erleichtert den Tumorzellen somit die Invasion in das umliegende Gewebe (Webb, Sherratt et al. 1999). Das Aufrechterhalten eines hohen intrazellulären pHs verhindert den Zusammenbruch fundamentaler Zellfunktionen, wie z.B. Membranpermeabilität, Enzymaktivitäten, Metabolismus, ATP-Produktion, Proliferation und Migration sowie Apoptosemechanismen (Roos and Boron 1981; Pouyssegur, Sardet et al. 1984; Brooks, Ketsawatsomkron et al. 2005).

Da die Carboanhydrase IX (s.I.2.) als membranständiges Enzym ihre pH-regulierenden Funktionen direkt an der Zellmembran ausübt, könnte sie zum Aufrechterhalten des in Hirntumoren beobachteten pH-Gradienten beitragen (Breton 2001; Swietach, Patiar et al. 2009). Diese Säureresistenz unterhält das Tumorstadium und verleiht Zellen, die einer hypoxischen und sauren Umgebung ausgesetzt sind, einen wesentlichen Überlebensvorteil (Chiche, Ilc et al. 2009).

Die Assoziation dieses transmembranen Enzyms mit vielen menschlichen Tumoren sowie ihre erhöhte Expression unter hypoxischen Bedingungen verschafft der CAIX alle Prädispositionen, die nötig sind, um Einfluss auf die tumorale pH-Regulation und somit auch auf die Tumorprogression zu nehmen (Svastova, Hulikova et al. 2004).

## I.2. Carboanhydrase IX

### *I.2.1. Aufbau und Funktion*

Carboanhydrasen sind Zink-Metalloenzyme, die ubiquitär in höheren Vertebraten, grünen Pflanzen, Algen, Bakterien sowie Archaeen vorkommen. Diese essenziellen Enzyme katalysieren die reversible Hydratisierung von Kohlendioxid zu einem Hydrogencarbonat-Ion und einem Proton und beeinflussen als Teil des wichtigsten Puffersystems des Organismus entscheidend den extra- und intrazellulären pH.



Die Carboanhydrase ist eines der schnellsten Enzyme. Sie kann pro Sekunde  $10^6$  Moleküle  $\text{CO}_2$  hydratisieren, womit die natürliche Reaktion um das  $10^7$ -fache beschleunigt wird (Wingo, Tu et al. 2001).

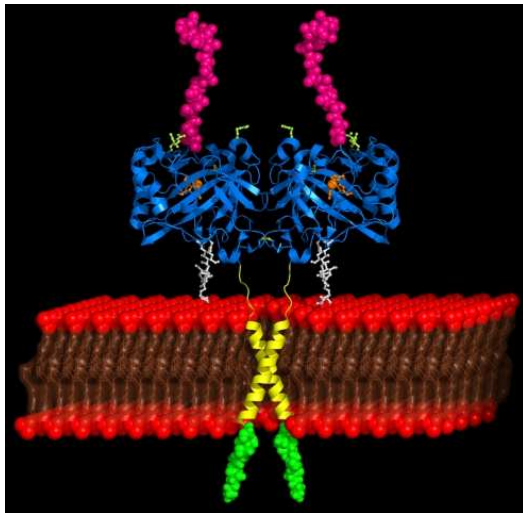
Als Kofaktor für das Metalloenzym dient ein Zinkion, welches im aktiven Zentrum mit drei Imidazolringen dreier Histidinreste koordiniert ist. Ein Wassermolekül kann sich an das Zinkion anlagern und wird durch Abspaltung eines Protons leicht in ein nukleophiles Hydroxidion verwandelt. Das  $\text{CO}_2$ -Molekül wird in der Nähe von einer Gruppe von Resten gebunden und so positioniert, dass der nukleophile Angriff des Hydroxidions auf das C-Atom erfolgen kann (Sly and Hu 1995). Das entstandene  $\text{HCO}_3^-$ -Ion ist wasserlöslich und muss aktiv über Membranen transportiert werden, wohingegen  $\text{CO}_2$  als lipophiles Molekül gut membrangängig ist. Diese reversible Reaktion kann sowohl die Aufnahme als auch die Abgabe von  $\text{CO}_2$  bedingen und besitzt durch die Produktion von  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  einen hohen Stellenwert in der pH-Regulation.

Es konnten 3 distinkte Carboanhydrasen-Subklassen identifiziert werden ( $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ ), welche durch ihre geringe Sequenzhomologie eine unabhängige Entwicklung suggerieren. Die  $\alpha$ -Carboanhydrasen sind v.a. in Säugetieren weit verbreitet.

Es sind bereits fünfzehn unterschiedliche zu den  $\alpha$ -Carboanhydrasen gehörende Isoformen in Menschen identifiziert worden, welche sich bezüglich ihrer Enzym-Kinetik, ihrer Gewebeverteilung, ihrem Expressionslevel sowie ihren subzellulären Lokalisationen unterscheiden. Sie spielen eine große Rolle in diversen biologischen Prozessen, darunter die pH Homöostase, der Ionentransport, die Respiration, die

Glukoneogenese, die Knochenresorption, die renal-tubuläre Azidifizierung sowie die Bildung des Liquor cerebrospinalis und der Magensäure (Sly and Hu 1995).

Die Carboanhydrase IX (früher als MN bezeichnet) ist eine hochaktive, tumorassoziierte Isoform der  $\alpha$ -Carboanhydrasen (Chegwidden and Carter 2000) und als transmembranes Enzym selbst unter extrem sauren Bedingungen funktionsfähig



*Abbildung 7: Schematische Darstellung der CAIX-Struktur. Die dimere Struktur der katalytischen Domäne ist in blau dargestellt mit Arginin (hellgrün), Polysaccharidanteil (weiß) und Histidin (orange). Die Proteoglykan-ähnliche Region, die helikalen transmembranen Anker sowie die zytoplasmatischen Anteile sind in violett, gelb und grün abgebildet.*

Quelle: (Alterio, Hilvo et al. 2009)

(Opavsky, Pastorekova et al. 1996; Pastorekova, Parkkila et al. 2006). Sie ist ein membranassoziiertes Glykoprotein und bildet durch Disulfidbrücken (zwischen Cysteinresten) verbundene Homodimere, die jeweils aus einer extrazellulären katalytischen Domäne, einem transmembranen Anker gefolgt von einem C-terminalen zytoplasmatischen Schwanz bestehen. Das katalytische Zentrum enthält 3 Histidinreste, welche Zink-Ionen binden (Alterio, Hilvo et al. 2009).

Eine Verlängerung der extrazellulären N-terminalen Seite mit einer Proteoglykan-ähnlichen Region ist nur bei dieser Isoform zu finden (Opavsky, Pastorekova et al. 1996).

Die Proteoglykandomäne mit Homologie zu

Aggrecan scheint die Ausbreitung sowie die Adhäsion von Gliazellen durch die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine und Zelloberflächenrezeptoren zu vermitteln (Barnea, Grumet et al. 1994; Peles, Nativ et al. 1995; Tashian, Hewett-Emmett et al. 2000). Wie auch schon von Pastorek et al. beobachtet, zeigt die N-terminale Region der CAIX ein Helix-Loop-Helix-Motiv (Pastorek, Pastorekova et al. 1994), welches ein typisches Merkmal DNA-bindender Proteine darstellt und für die beachtliche DNA-Bindungskapazität der CAIX verantwortlich ist. Eine potentielle Rolle dieses Enzyms in der Regulation des Zellzyklus sowie in der Onkogenese wird daher denkbar (Nogradi 1998).

Mit ihrer extrazellulären Orientierung trägt die CAIX nicht nur zur Azidifizierung der tumoralen Mikroumgebung bei (Li, Tu et al. ; Svastova, Hulikova et al. 2004; Chiche,

Ilc et al. 2009; Swietach, Patiar et al. 2009), sondern führt auch zu einer Erhöhung des intrazellulären pHs (Swietach, Wigfield et al. 2008; Chiche, Ilc et al. 2009; Swietach, Patiar et al. 2009).

Aufgrund ihrer räumlichen Struktur ist die CAIX in der Lage die extrazelluläre Konzentration von  $\text{HCO}_3^-$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen sowie von  $\text{CO}_2$  zu regulieren.

Die durch den Zellmetabolismus anfallenden Säuren, v.a. in Form von  $\text{H}^+$ -Ionen und  $\text{CO}_2$  akkumulieren im Zellinneren und erzeugen einen transmembranen Gradienten, welcher Substrate für die extrazelluläre katalytische Domäne der CAIX liefert. Protonen können durch Bikarbonat-Ionen im Zellinneren neutralisiert werden, wobei diese CA-katalysierte Reaktion  $\text{CO}_2$  liefert. Das  $\text{CO}_2$ -Molekül diffundiert entlang seines Gradienten durch die Zellmembran und wird von der CAIX in  $\text{H}^+$ -Ionen und  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen umgewandelt, wodurch der  $\text{CO}_2$ -Gradient von intra- nach extrazellulär aufrechterhalten wird. Folglich scheint die CAIX-Aktivität die Exkretion von  $\text{CO}_2$  aus der Zelle zu erleichtern und so zur intrazellulären Alkalisierung beizutragen (Swietach, Patiar et al. 2009). Die durch die Reaktion entstehenden Protonen führen zu einer extrazellulären Azidifizierung, wohingegen das entstehende Bikarbonat-Ion durch Transportproteine, vorwiegend über  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter, nach intrazellulär gelangt und dort zur Alkalisierung des  $\text{pH}_i$  beiträgt (Swietach, Vaughan-Jones et al. 2007).

Die CAIX scheint außerdem mit  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern ein funktionelles Transportmetabolon (Transporteinheit) zu bilden, welches die Produktion von Bikarbonat sowie seinen Transport ins Zellinnere sicherstellt. Die Effektivität der intrazellulären pH-Regulation wird somit erhöht (Morgan, Pastorekova et al. 2007).

Auch die Proteoglykandomäne, welche nur bei der transmembranen Isoform der CAIX zu finden ist, scheint das intrinsische Puffersystem zu beeinflussen. In Gegenwart einer extrazellulären Azidose, die in der Umgebung hypoxischer Tumore meist vorhanden ist, fördert sie die Hydratation von  $\text{CO}_2$  und steigert somit die  $\text{CO}_2$ -Extrusion aus der Zelle sowie die  $\text{HCO}_3^-$ -Produktion (Innocenti, Pastorekova et al. 2009).

Die CAIX beeinflusst somit sowohl den extrazellulären als auch den intrazellulären pH.

Der Effekt der CAIX auf den  $\text{pH}_i$  scheint dabei sogar unabhängig vom Schlüsselprotein der intrazellulären pH-Regulation, NHE 1, zu sein (Chiche, Ilc et al. 2009).

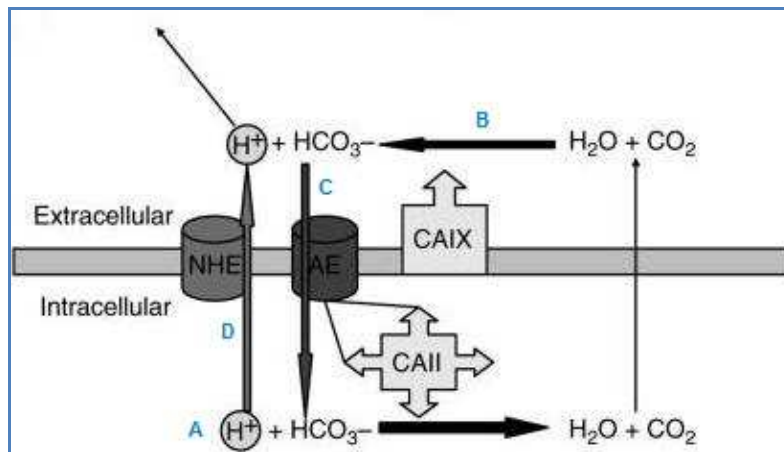


Abbildung 8: Dargestellt ist die potentielle Funktion der CAIX in der pH-Regulation von Tumoren.

**A** Die durch den metabolischen Stoffwechsel von Tumorzellen anfallenden Protonen müssen in  $\text{CO}_2$  umgewandelt werden, um ihre Diffusion durch die Lipiddoppelschicht zu ermöglichen. Diese Bikarbonat-abhängige Reaktion wird von der zytosomatischen CAII katalysiert. **B** Nachdem das  $\text{CO}_2$ -Molekül durch die Zellmembran diffundiert ist, regeneriert die membranständige CAIX Protonen, um den  $\text{CO}_2$ -Diffusionsgradienten aufrecht zu erhalten. Diese Protonen tragen zur extrazellulären Azidifizierung bei. **C** Das durch die CAIX-Reaktion entstehende Bikarbonat kann durch den Anionenaustauscher (AE) nach intrazellulär transportiert werden und wiederum die in **A** anfallenden Protonen abfangen und so zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pHs beitragen. Dabei werden auch die Gradienten des Membrantransportsystems unterhalten. Dieses Recycling von Bikarbonat mit einer netto Protonen-Extrusion ist bekannt als Jacob-Stewart Zyklus.

**D** Außerdem existieren noch andere Membrantransportsysteme, die zur pH-Regulation beitragen. Beispielsweise kann der  $\text{Na}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher (NHE) aktiv Protonen aus dem Intrazellulärraum transportieren.

Quelle: modifiziert nach (Potter and Harris 2003)

### 1.2.2. Assoziation mit Tumoren

Die Identifikation der CAIX als nicht nur membranständiges sondern auch nukleäres Protein erfolgte als Erstes in HeLa-Zellen, eine permanente Zelllinie, welche von menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms abstammt (Pastorek, Pastorekova et al. 1994).

Diese neu entdeckte Isoform brachte Eigenschaften mit sich, die sie von anderen bekannten Isoformen der  $\alpha$ -Carboanhydrasen abhoben und ihr eine mögliche Bedeutung in der Onkogenese zuschrieben. Zu diesen Besonderheiten zählen ihre dichteabhängige Expression in HeLa-Zellen, die Korrelation ihrer Expression mit der Tumorigenität somatischer Zellhybriden zwischen HeLa- und Fibroblastenzellen, ihre starke Assoziation mit anderen menschlichen Karzinomen sowie ihre Abwesenheit in entsprechenden normalen Geweben (Zavada, Zavadova et al. 1993).



Die Verteilung der CAIX in normalen Geweben ist sehr gering und beschränkt sich auf den gastrointestinalen Trakt, v.a. auf die drüsenreichen Magenmukosa, wo sie einen starken Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung nimmt (Pastorek, Pastorekova et al. 1994; Opavsky, Pastorekova et al. 1996; Pastorekova, Parkkila et al. 1997).

Der Zusammenhang zwischen Carboanhydrasen und der Tumorigenese ist seit der Identifizierung und Sequenzierung der tumorassoziierten membranständigen Isoformen CAIX und CAXII bekannt (Pastorek, Pastorekova et al. 1994; Opavsky, Pastorekova et al. 1996; Tureci, Sahin et al. 1998). Seither konnte eine erhöhte Expression beider Enzyme in diversen menschlichen Tumoren nachgewiesen werden (Liao, Aurelio et al. 1997; Saarnio, Parkkila et al. 1998; Liao and Stanbridge 2000; Wykoff, Beasley et al. 2000; Ivanov, Liao et al. 2001; Proescholdt, Mayer et al. 2005).

Dabei zeigten immunhistochemische Färbungen, dass die CAIX in Tumoren v.a. um nekrotische Areale verteilt ist (Giatromanolaki, Koukourakis et al. 2001; Ivanov, Liao et al. 2001; Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2001; Lancaster, Harris et al. 2001; Proescholdt, Mayer et al. 2005).

Die Adaptation von Tumorzellen an Hypoxie und Azidose stellt die treibende Kraft für Tumorprogression und Metastasierung dar (Pouyssegur, Dayan et al. 2006; Brahimi-Horn, Chiche et al. 2007) und involviert somit die Carboanhydrase IX als pH-regulierendes Enzym von Tumoren (Chiche, Ilc et al. ; Dorai, Sawczuk et al. 2006).

Zavada et al. beobachteten bereits 1993 eine dichteabhängige Expression der CAIX in HeLa-Zellen, wobei die CAIX-Expression mit der Konfluenz der Zellen anstieg (Zavada, Zavadova et al. 1993).

Einige Studien konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen CAIX-Expression und erhöhter Zellproliferation nachweisen (Saarnio, Parkkila et al. 1998; Saarnio, Parkkila et al. 1998; Vermeylen, Roufosse et al. 1999; Proescholdt, Mayer et al. 2005). Auch *in vitro* zeigte die CAIX transformierende Eigenschaften. Die Transfektion normaler Zellen mit CAIX cDNA führte zu einer unkontrollierten Proliferationsrate, einer verstärkten DNA-Synthese, morphologischen Veränderungen sowie zu einer reduzierten Kontaktinhibition der Zellen (Pastorek, Pastorekova et al. 1994). Ergänzend zeigten Zavada et al., dass isolierte CAIX über ihre Proteoglykandomäne die Überlebensrate sowie die Adhäsion und -ausbreitung von Zellen *in vitro* steigert

und suggeriert somit eine Rolle der CAIX in der Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion (Zavada, Zavadova et al. 2000).

Zudem wurde beobachtet, dass die CAIX auch direkt auf die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion Einfluss nimmt, indem sie die Bindung dieses Moleküls an  $\beta$ -Catenin reduziert und somit die Zellmotilität sowie die Zellinvasion begünstigt (Svastova, Zilka et al. 2003).

Überdies konnten andere Studien eine klare Assoziation zwischen erhöhter CAIX-Expression und einem schlechten Ansprechen auf adjuvante Therapie (Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2001; Potter and Harris 2003; Span, Bussink et al. 2003; Sathornsumetee, Cao et al. 2008) sowie einer schlechten Prognose nachweisen (Chia, Wykoff et al. 2001; Giatromanolaki, Koukourakis et al. 2001).

Dennoch bleibt die genaue Funktion der CAIX in der Onkogenese unklar.

Neben der Bedeutung der CAIX in der Tumorentstehung wurde auch ihr Nutzen als Hypoxiemarker diskutiert, da hypoxische Tumore für ihre relativ schlechte Prognose bekannt sind (Hockel and Vaupel 2001). Die positive Korrelation zwischen der CAIX-Verteilung im Gewebe und dem Ausmaß der *in vivo* mittels Mikroelektroden gemessenen Hypoxie (Loncaster, Harris et al. 2001) bestätigte das Potential der CAIX als hypoxiespezifischer Marker. Heutzutage ist die CAIX ein anerkannter Tumorphypoxiemarker sowie ein klinischer Indikator aggressiver Tumore (z.B. Mamma-Ca und Bronchial-Ca) mit schlechter Prognose (Lou, McDonald et al. ; Chia, Wykoff et al. 2001; Giatromanolaki, Koukourakis et al. 2001; Generali, Fox et al. 2006).

Im Vergleich der beiden tumorassoziierten Carboanhydrasen IX und XII weist die CAIX eine höhere extrazelluläre Aktivität auf, wobei die mit der Zelladhäsion assoziierte Proteoglykandomäne bei der CAXII gänzlich fehlt (Whittington, Waheed et al. 2001; Pastorekova, Zatovicova et al. 2008). Ferner geht die CAIX-Expression mit einer schlechten Prognose einher, während diese Korrelation bei der CAXII weniger ersichtlich ist (Pastorekova, Zatovicova et al. 2008). Zuletzt wird die CAXII, im Gegensatz zur CAIX, auch in vielfältigen normalen Gewebe exprimiert (Tureci, Sahin et al. 1998).

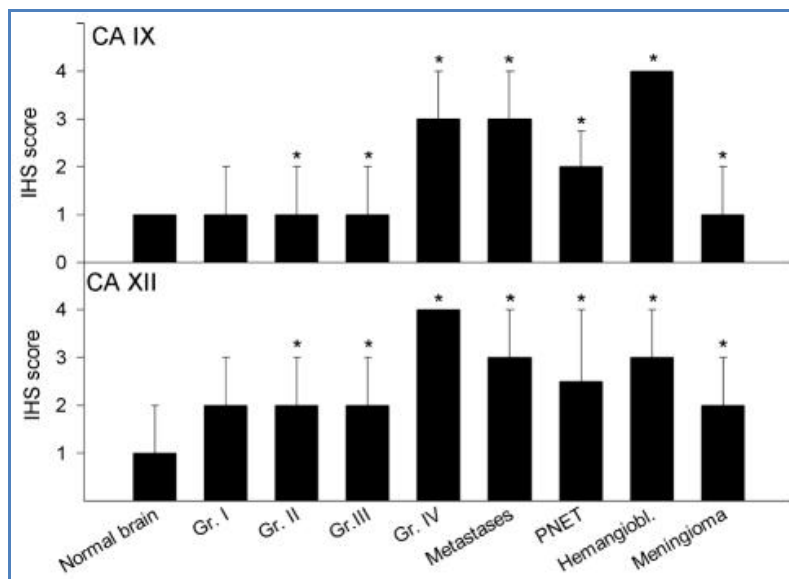
Angesichts dessen scheint der CAIX eine größere Bedeutung in der Onkogenese zuzukommen als der CAXII.

### 1.2.3. Vorkommen in Hirntumoren

Normales Hirnparenchym zeigt nur eine geringe CAIX-Expression. Die CAIX-Aktivität beschränkt sich dabei auf den Plexus choroideus sowie die Ventrikel auskleidenden Zellen (Ivanov, Liao et al. 2001).

Proescholdt et al. untersuchten die CAIX-Verteilung in diversen Hirntumoren und zeigten, dass primäre Hirntumore sowie zerebrale Metastasen, im Vergleich zu normalem Hirnparenchym, eine signifikant gesteigerte CAIX-Expression aufweisen.

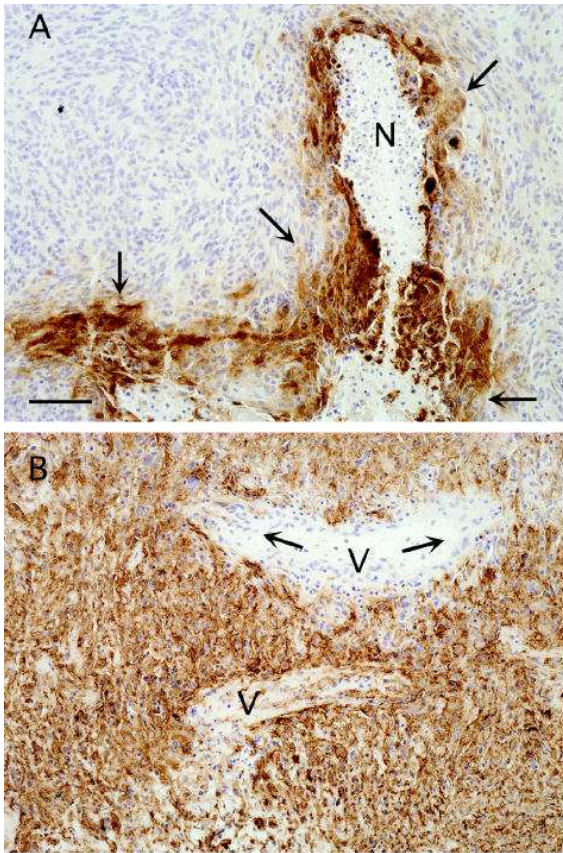
Die Quantität dieses Enzyms steigt dabei mit dem Malignitätsgrad des Tumors, sodass die stärkste CAIX-Akkumulation um nekrotische Areale von Glioblastomen beobachtet wurde. Ferner korrelierte das Ausmaß der CAIX-Expression mit dem Proliferationsmarker Ki67, sodass die CAIX zur Aufrechterhaltung der Zellproliferation unter hypoxischen Bedingungen beizutragen scheint (Proescholdt, Mayer et al. 2005).



**Abbildung 9:** Semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen (CAIX oben, CA XII unten) und der Tumorart. Die Auswertung der CA-Färbung (IHS) ist auf der y-Achse, die histologische Klassifikation auf der x-Achse aufgetragen. Das Glioblastom entspricht einem Gliom Grad IV. Statistische Analysen zeigten, dass die CAIX- und die CA XII-Expression in Hirntumoren, im Vergleich zu normalem Hirnparenchym, signifikant erhöht ist (Proescholdt, Mayer et al. 2005).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Proescholdt et al. konnten andere Studien ebenfalls eine erhöhte CAIX-Expression in höhergradigen Hirntumoren (Zagzag, Zhong et al. 2000; Ihnatko, Kubes et al. 2006; Jensen 2006; Flynn, Wang et al. 2008) nachweisen.

Die nebenstehende Abbildung zeigt die starke CAIX-Akkumulation um nekrotische Areale eines Glioblastoms.



Interessanterweise konnte die CAIX auch in Zellen nachgewiesen werden, die sich in der Nähe von Blutgefäßen befanden, weshalb Hypoxie nicht der einzige Induktionsmechanismus zu sein scheint. Diesbezüglich war außerdem auffällig, dass die an der Zellmembran lokalisierte CAIX eine breitere und stärkere Verteilung innerhalb der Zellen aufwies als der eher nukleär lokalisierte Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  (Proescholdt, Mayer et al. 2005).

*Abbildung 10: A Dargestellt ist die mittels Immunhistochemie sichtbar gemachte CAIX-Expression um nekrotische Areale (N) eines Glioblastoms. B Zeigt ebenfalls die mittels Immunhistochemie sichtbar gemachte CAIX-Expression eines Glioblastoms. Das Bild soll verdeutlichen, dass die positiv gefärbten Zellen unmittelbar in der Nähe von Blutgefäßen (V) liegen, wodurch eine hypoxische CAIX-Induktion dieser Zellen relativ unwahrscheinlich scheint (Proescholdt, Mayer et al. 2005).*

#### 1.2.4. Induktionsmechanismen

Heute ist bekannt, dass die Expression von CAIX unter hypoxischen Bedingungen dramatisch gesteigert ist. (Wykoff, Beasley et al. 2000; Ivanov, Liao et al. 2001; Olive, Aquino-Parsons et al. 2001; Stewart, Talks et al. 2002). Es handelt sich dabei um eine direkte Aktivierung des CAIX-Gens durch den Transkriptionsfaktor HIF, welcher wiederum durch die Sauerstoffkonzentration negativ reguliert wird. Dieser Regulationsmechanismus wird über das Wildtyp VHL-Protein vermittelt (Wykoff, Beasley et al. 2000). Somit kann die erhöhte CAIX-Expression in VHL-defekten Zellen auf den konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktor HIF zurückgeführt werden und erklärt die hohe CAIX-Akkumulation in Hämangioblastomen (Proescholdt, Mayer et al. 2005).

Der HIF-Transkriptionsfaktor bindet an die im CAIX-Genpromoter enthaltenen HREs, welche am negativen DNA-Strang lokalisiert und dem Transkriptionsstart direkt vorgeschaltet sind (Wykoff, Beasley et al. 2000). Die Nähe der HREs zum Startpunkt

der Transkription könnte erklären, weshalb die CAIX von allen HIF-1-regulierten Genen, das am stärksten induzierbare ist (Lal, Peters et al. 2001).

Hypoxie induziert die extrazelluläre katalytische Enzymdomäne der CAIX und verstärkt so die Azidifizierung des EZR. Die extrazelluläre Azidose scheint durch die Aktivierung proteolytischer Enzyme, wie beispielsweise Cathepsin B, die Tumordinvasion zu erleichtern (Martinez-Zaguilan, Seftor et al. 1996; Webb, Sherratt et al. 1999) und das Metastasierungspotential sowie die Chemo- und Strahlentherapieresistenz der Tumorzellen zu fördern (Stubbs, McSheehy et al. 2000).

Während eine CAIX-Aktivität in dünnen einschichtigen Zellkulturen normalerweise nicht detektierbar ist, erhöht sich der CAIX-Level mit steigendem Zellcrowding, sodass von einer zusätzlichen Regulation der CAIX-Transkription durch die Zelldichte ausgegangen werden kann (Zavada, Zavadova et al. 1993; Pastorek, Pastorekova et al. 1994; Kaluz, Kaluzova et al. 2002; Svastova, Hulikova et al. 2004).

Kaluz et al. konnten zeigen, dass die dichteabhängige CAIX-Induktion über den PI3K-Signalweg vermittelt wird und mit einer perizellulären Hypoxie assoziiert ist. Da die O<sub>2</sub>-Konzentration in diesem Versuch aber über dem für eine HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung notwendigen Bereich gehalten wurde, scheint dieser dichteabhängige Induktionsmechanismus weitgehend unabhängig von HIF-1 $\alpha$  zu sein (Kaluz, Kaluzova et al. 2002).

Bezüglich der basalen, Hypoxie- sowie Zelldichte-induzierten CAIX-Expression kooperieren die HREs somit zusätzlich mit der ebenfalls in der CAIX-Promotor Region enthaltenen SP1-Bindungsstelle (Kornitzer and Ciechanover 2000; Kaluz, Kaluzova et al. 2002; Kaluz, Kaluzova et al. 2003), deren DNA-Bindungskapazität mit sinkendem pH steigt (Torigoe, Izumi et al. 2003).

Neben der Hypoxie stellen Mutationen im p53-Gen, welche gleichzeitig zu den häufigsten genetischen Alterationen in malignen Gliomen zählen (Maher, Furnari et al. 2001), einen weiteren Induktionsmechanismus der CAIX-Expression dar.

Das durch DNA-Schäden aktivierte p53-Tumorsuppressorprotein vermittelt einen beschleunigten Abbau des HIF-1 $\alpha$ -Proteins und führt somit letztlich zu einer

reduzierten CAIX-Transkription (Kaluzova, Pastorekova et al. 2000; Kaluzova, Kaluz et al. 2004).

Vor kurzem erst konnte gezeigt werden, dass außer HIF-1 $\alpha$  auch UPR-Signalwege (s.I.1.7.) erforderlich sind, um eine optimale CAIX-Expression *in vitro* und *in vivo* zu gewährleisten (van den Beucken, Koritzinsky et al. 2009). Folglich hat ein defekter PERK/eIF2 $\alpha$ - bzw. UPR-Signalweg eine stark reduzierte CAIX-Expression zur Folge, welche unter sauren Umgebungsbedingungen mit einer verringerten Proliferationsfähigkeit sowie einer verkürzten Überlebensdauer der Zellen einhergeht (van den Beucken, Ramaekers et al. 2009). Somit scheint die UPR-abhängige CAIX-Aktivität hypoxische Tumorzellen vor den schädlichen Effekten einer azidotischen Umgebung zu schützen.

Trotz der signifikanten Induktion durch Hypoxie überschneidet sich die CAIX-Akkumulation nur partiell mit der Verteilung anderer Hypoxiemarker, wie Pimonidazol, HIF-1 $\alpha$ , und VEGF (Wykoff, Beasley et al. 2000; Proescholdt, Mayer et al. 2005).

Eine Erklärung für diese Beobachtung würde eine besonders strenge transkriptionale Regulation des CAIX-Gens sowie eine hohe posttranslationale Stabilität des CAIX-Proteins darstellen. Eine erhöhte CAIX-Konzentration könnte demnach sowohl eine aktuelle als auch eine zurückliegende Hypoxie anzeigen. Rafajova et al. untersuchten die posttranslationale Stabilität der CAIX in reoxygenierten HeLa-Zellen und ermittelten eine Halbwertszeit (HWZ) des Proteins von 38 Stunden. Die HWZ war dabei unabhängig von der Dauer der vorangegangenen Hypoxie (Rafajova, Zatovicova et al. 2004).

Auch zusätzliche Hypoxie-unabhängige CAIX-Induktionswege können eine Erklärung für die oben aufgeführten Verteilungsunterschiede der Hypoxiemarker sein.

Neben Mutationen im VHL- oder p53-Gen können weitere von der Sauerstoffkonzentration unabhängige Faktoren zu einer Steigerung der CAIX-Konzentration in Tumoren beitragen.

Ihnatko et al. untersuchten die CAIX-Expression in Abhängigkeit des extrazellulären pHs. Sie zeigten, dass Glioblastomzellen in saurem Medium eine erhöhte Expression von CAIX, sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranslationaler Ebene,

aufweisen und konnten somit eine Hypoxie-unabhängige Modulation der CAIX nachweisen. Die Reaktion des CAIX-Gens auf eine extrazelluläre Azidose läuft jedoch nicht von alleine ab. Es scheint, als würde ein saures Milieu vielmehr die basale CAIX-Transkription modulieren, die am CAIX-Promotor erfolgt und HREs sowie SP1-Bindungsstellen involviert. Letztere werden über MAPK- und/oder PI3K-Signalwege aktiviert, sodass eine Inhibition dieser Signaltransduktion trotz saurem Umgebungsmilieu eine vollständige Blockade der CAIX-Transkription zur Folge hat, womit ein induzierender Effekt der extrazellulären Azidose unwahrscheinlich ist (Ihnatko, Kubes et al. 2006).

Auch epigenetische Modifikationen stellen Hypoxie-unabhängige Induktionsmechanismen dar.

Die Aktivierung des CAIX-Gens in Nierzellkarzinomen ist mit einer Hypomethylierung des CAIX-Promotors assoziiert (Cho, Grabmaier et al. 2000).

Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass die Methylierung einer einzelnen CpG-Insel an Position -74 des CAIX-Promotors in Zellkulturen hoher Konfluenz mit einer erniedrigten CAIX-Expression einhergeht, sodass die Methylierung des CAIX-Promotors einen zusätzlichen, dichteabhängigen Regulationsmechanismus der CAIX-Expression darzustellen scheint, welcher von der zellulären Sauerstoffversorgung unabhängig ist (Jakubickova, Biesova et al. 2005).

Zuletzt spielen auch die Interaktionen der CAIX mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle.

Die CAIX-Induktion verursacht beispielsweise eine Herunterregulation der intrazellulären Isoform CAII (Swietach, Wigfield et al. 2008), wohingegen das Ausschalten des CAIX-Gens eine kompensatorische Hochregulation der CAIX-Expression zur Folge hat (Chiche, Ilc et al. 2009). Demnach deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die CAIX mit Signalwegen interagieren kann, um die Expression anderer Gene und Proteine zu kontrollieren.

Vor kurzem zeigte sich außerdem eine Korrelation zwischen AQP 1 (Aquaporin 1) und der HIF1 $\alpha$ -Expression in Mammakarzinomzellen (Yin, Yu et al. 2008).

Aquaporine sind Wasserkanäle, die u.a. den Durchtritt von Wasser und CO<sub>2</sub> vermitteln. Sie scheinen eine wichtige Rolle in der Tumorphysiologie zu spielen, da sie durch die Exkretion von CO<sub>2</sub> zur extrazellulären Azidifizierung in Tumoren

beitragen und wahrscheinlich mit der zytosolischen CAII sowie der membranständigen CAIX und CAXII unter Hypoxie interagieren (Hayashi, Edwards et al. 2007).

### *1.2.5. Therapeutisches Potential*

Die Adaptation von Tumorzellen an Hypoxie und Azidose stellt die treibende Kraft für Tumorprogression und Metastasierung dar (Pouyssegur, Dayan et al. 2006; Brahimi-Horn, Chiche et al. 2007) und involviert pH-regulierende Enzyme, wie beispielsweise die Carboanhydrase IX (Swietach, Patiar et al. 2009).

Die tumorspezifische Expression der CAIX sowie ihre Assoziation mit Tumorprogression und einem schlechten therapeutischen Outcome machen dieses pH-regulierende Enzym zu einem attraktiven Angriffspunkt einer zielgerichteten Tumorthherapie.

Primäre Sulfonamide sowie Sulfamate inhibieren die CA, indem sie an das im katalytischen Zentrum sitzende Zink-Ion binden und seine Funktion hemmen (Supuran ; Supuran 2008). Der klassische Sulfonamidinhibitor Azetazolamid hemmt die meisten Isoformen der Carboanhydrasen und fungierte als Ausgangspunkt nachfolgender Inhibitoren mit verbesserter Selektivität (Ahlskog, Dumelin et al. 2009). Es kam zur Entwicklung von Prodrugs, die durch die reduzierenden Bedingungen hypoxischer Tumore in aktive CA-Inhibitoren (CAI) umgewandelt werden und somit auf die tumorassoziierte Isoform CAIX abzielen (De Simone, Vitale et al. 2006). Einen weiteren Fortschritt stellte die Ergänzung der Sulfonamide mit positiver oder negativer Ladung sowie die Bildung von Zucker-enthaltenden Sulfonamiden dar. Diese Inhibitoren sind nicht mehr in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren und weisen somit eine verbesserte Spezifität für die extrazellulär gelegenen CAIX und CAXII auf (Supuran ; De Simone, Vitale et al. 2006; Supuran 2008). Es konnte gezeigt werden, dass nicht-membrangängige Sulfonamidderivate das Wachstum klarzelliger Nierenzellkarzinome *in vivo* unterdrücken (Ahlskog, Dumelin et al. 2009). Die Ergebnisse weiterer Studien bestätigten den hemmenden Einfluss der spezifisch gegen die CAIX gerichteten Sulfonamidderivate auf das Wachstum von primären Tumoren sowie Metastasen (Buller, Steiner et al. ; Lou, McDonald et al. ; Pacchiano, Carta et al.). Außerdem wurde beobachtet, dass die Inhibition der CAIX in



Kombination mit Bestrahlung synergistische antitumorale Effekte besitzt (Dubois, Peeters et al.).

Ferner halfen fluoreszierende Sulfonamide die Funktion der CAIX im Tumormetabolismus *in vivo* besser zu verstehen (Supuran 2008) und könnten ein geeignetes Mittel darstellen, um Hypoxie in soliden Tumoren zu visualisieren und Patienten für eine CAIX-gezielte Therapie zu selektionieren (Dubois, Lieuwes et al. 2009).

Eine neue Klasse der Carboanhydraseinhibitoren stellen Kumarine und Thiokumarine dar, welche in ihrer hydrolysierten Form an das aktive Zentrum der CA binden ohne mit dem Zink-Ion zu interagieren (Maresca, Temperini et al. 2009).

Monoklonale Antikörper bieten ebenfalls eine Möglichkeit, Carboanhydrasen spezifisch zu hemmen. M75 ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen die Proteoglykandomäne der CAIX gerichtet ist (Chrastina, Zavada et al. 2003). Mit PET-Tracern markierte monoklonale Antikörper könnten somit für die Detektion hypoxischer Tumore, die CAIX überexprimieren, eingesetzt werden (Neri and Supuran). WX-G250 ist ein weiterer CAIX-spezifischer monoklonaler Antikörper, der sich in Kombination mit INF- $\alpha$  als adjuvante Therapie metastasierter Nierenzellkarzinome bereits in klinischer Erprobung befindet (Siebels, Rohrmann et al.).

Auch siRNAs (small interfering RNA) finden in der Grundlagenforschung häufig Verwendung und hemmen die Transkription der CAIX. Robertson et al. machten sich die RNA-Interferenz zu Nutze, um die Funktion der CAIX in Mammakarzinomzellen zu untersuchen. Das Stilllegen des CAIX-Gens blockierte die Hypoxie-induzierte CAIX-Aktivität vollständig und war mit einem reduzierten Wachstum sowie einer verkürzten Überlebensdauer der Tumorzellen assoziiert (Robertson, Potter et al. 2004).

Zuletzt existieren auch indirekte CAIX-Inhibitoren. HIF-1 $\alpha$ - oder glykolytische Inhibitoren führen beispielsweise über eine Verminderung der HIF-1 $\alpha$ -Konzentration zu einer Transkriptionshemmung der Hypoxie-regulierten Gene, darunter auch die CAIX (Said, Supuran et al.).

### I.3. Fragestellungen und Ziele der Studie

Die gegenwärtigen Forschungsergebnisse werfen die Frage auf, welche Rolle der Carboanhydrase IX in malignen Hirntumoren wirklich zukommt:

Fungieren diese pH-regulierenden Enzyme lediglich als Stressenzyme oder sind sie in die Tumorigenese entscheidend involviert? Findet die CAIX nur als Hypoxiemarker Verwendung oder besitzt ihre selektive Inhibition therapeutisches Potential?

Die vorliegende experimentelle Studie untersucht die Reaktionen CAIX-defizitärer U251-Glioblastomzellen auf Bestrahlung bzw. in einem weiteren Ansatz auf TMZ-Chemotherapie.

Zur Inhibition der CAIX wurden die Zellen mit siRNA (komplementär zu einem Teil der CAIX-RNA) transfiziert. Vor Beginn des Experiments wurde die Zelllinie auf eine vermehrte CAIX-Akkumulation unter hypoxischen Bedingungen untersucht sowie die Wirkung der siRNA auf die CAIX-Expression mittels quantitativer PCR, Westernblot und Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Um die *in vivo* anzutreffenden Umgebungsbedingungen von Hirntumoren auch in vorliegendem *in vitro* Experiment zu gewährleisten, wurden die transfizierten Zellen sowohl unter glykolytischen als auch unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Das Verhalten der Zellen auf die jeweilige Behandlung wurde über 6 Tage mikroskopisch dokumentiert.

Um die Effizienz der Therapie zu quantifizieren, wurde ein Proliferationsassay angeschlossen, welcher die Anzahl der noch zur Zellteilung fähigen Zellen mittels Photometrie bestimmte. Als weiteres Detektionsverfahren kam in einem neuen Ansatz die Annexin V-Färbung zur Anwendung, welche die apoptotischen Zellen mit fluoreszierenden Molekülen markierte.

Basierend auf bereits bekannten Forschungsergebnissen wurde für die vorliegende Studie folgende Arbeitshypothese entworfen:

„Die *in vitro* Inhibition der CAIX führt zur Beeinträchtigung der tumoralen pH-Regulation und folglich zu einem zellulären Stress, welcher Glioblastomzellen empfindlicher auf Bestrahlung und TMZ-Chemotherapie reagieren lässt.“

Zudem zielte diese experimentelle Arbeit auf die Beantwortung folgender Fragestellungen ab:

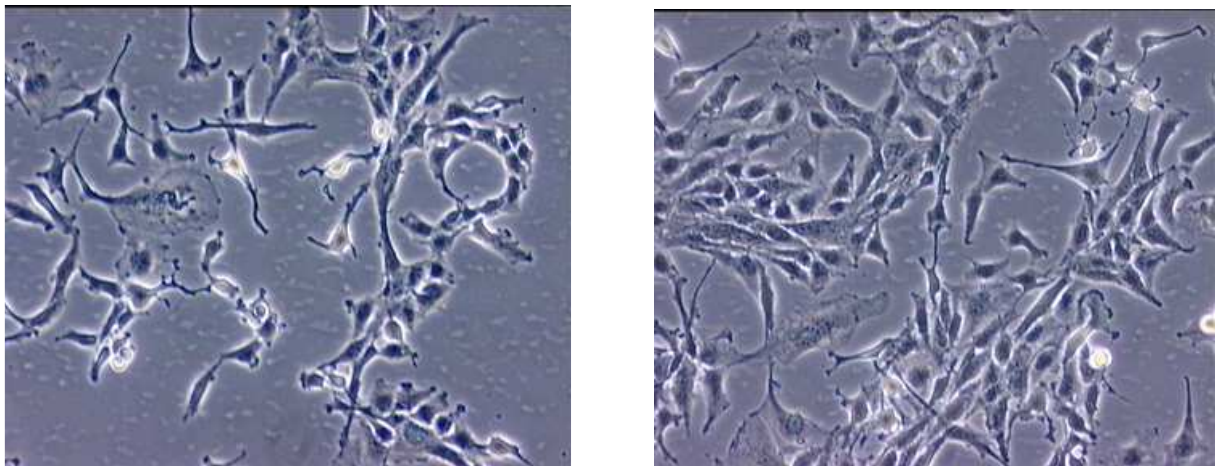
- Wird die CAIX in U251-Glioblastomzellen unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert?  
Ist die Hochregulation der CAIX sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachweisbar?
- Kann die Hypoxie-induzierte CAIX-Expression durch das Einbringen einer spezifischen siRNA supprimiert werden?  
Ist diese Suppression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachweisbar?
- „Welche Auswirkungen hat die *in vitro* Inhibition der CAIX auf das Ansprechen von Glioblastomzellen auf Bestrahlung und TMZ-Chemotherapie?  
Zeigen sich Unterschiede im Ansprechen der Zellen zwischen den verschiedenen Kultivierungen (Glucosemedium/Sauerstoffgehalt)?
- Welche Behandlung (TMZ oder Bestrahlung) schädigt CAIX-defizitäre Glioblastomzellen am stärksten?

## II. Material und Methodik

### II.1. Zelllinie U251

Für die Untersuchungen wurden Glioblastomzellen der Zelllinie U251 verwendet (s. Abb. 1), welche das National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Die Etablierung der Zelllinie U251, welche aus dem Glioblastom eines fünfundsiebzigjährigen Mannes gewonnen wurde, erfolgte 1973 durch Westermarck und Pontén in Uppsala (Westermarck, Ponten et al. 1973).



*Abbildung 11: Mikroskopische Bilder der Zelllinie U251-P13 in der Zellkulturflasche.*

### II.2. Zellkultur

Alle Arbeiten im Bereich der Zellkultur fanden unter einer Sterilwerkbank statt.

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in 175 cm<sup>3</sup>-Zellkulturflaschen mit dem unten aufgeführten Mediumansatz (s. II.2.1.).

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 5 % Kohlendioxidgehalt, 100 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C inkubiert.

Ihr Wachstum wurde mehrmals pro Woche mikroskopisch kontrolliert, um eine erhöhte Konfluenz der Zellen zu verhindern.

Geräte	Hersteller
Sterilwerkbank Hera Safe EN 12469	Thermo Scientific, Langenselbold, Dtld.
Brutschrank Heracell 150	Thermo Scientific, Langenselbold, Dtld.
Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Dtld.
Vakuum Pumpe	Neuberger, Freiburg, Dtld.
Elektrophoresis Power Supply	Renner, Dannstadt, Dtld.
Wasserbad	Julabo EM, Seelbach, Dtld.
BP61 Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Dtld.
Acculab Waage	Sartorius, Göttingen, Dtld.
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Dtld.
Mini Rocker	Kisker, Steinfurt, Dtld.
Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg, Dtld.
Umkehrmikroskop Olympus IX70	Olympus, Hamburg, Dtld.
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51	Olympus, Hamburg, Dtld.
PCR Cycler	VWR, Geldenaaksebaan, Belgien
Precision Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr, Biberach an der Riss, Dtld.
Tiefkühlschrank -80 °C	Thermo Scientific, Langenselbold, Dtld.
Laborabzug	Renggli Laboratory, Rotkreuz, Schweiz
Mikrowelle	Privileg, Stuttgart, Dtld.
Material	
Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml	Corning, New York, USA
PCR-Röhrchen	Biozym Scientific, Oldendorf, Dtld.
Sterilfilter Steritop	Billerica, Massachusetts, USA
Zellkulturflasche	Sarstedt, Newton, USA
Zellkultur Testplatte 6, 24, 96	TPP, Trasadingen, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Dtld.
Multistep Pipette	Eppendorf, Hamburg, Dtld.
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Dtld.
Pipet Boy	Neolab, Heidelberg, Dtld.
Glaspipetten Pasteurpipetten	Hirschmann, Eberstadt, Dtld.
Duran Flasche 100 ml/500 ml	Schott, Mainz, Dtld.
Duran Maßkolben	Schott, Mainz, Dtld.
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Dtld.
Erlenmeyerkolben	VWR, Wien, Österreich
Touch n tuff Nitrile Gloves	Ansell, Brüssel, Belgien

Tabelle 4: Material und Geräte für die experimentelle Laborarbeit

Weitere Materialien sind unter den entsprechenden Methoden aufgeführt.

### II.2.1. Mediumwechsel

Für die Kultivierung der U251-Zellen wurden nachfolgende Mediumzusätze verwendet (s. Tab. 1).

Das Kulturmedium wurde anschließend steril filtriert und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Der Wechsel des Mediums erfolgte zweimal pro Woche, indem das alte Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 20 ml des im Wasserbad erwärmten frischen Mediums in die Zellkulturflaschen gegeben wurden.

Handelsname	Inhalt	Menge	Hersteller
Dulbecco's MEM	3,7g/L NaHCO <sub>3</sub> 1,0 g/L D-Glucose Low Endotoxin	500 ml	Biochrom, Berlin, Dtld.
FCS 10%	Fetales Kälberserum	50 ml	Biochrom, Berlin, Dtld.
NEA 1%	Non Essential Aminoacids	5 ml	Biochrom, Berlin, Dtld.
MEM-Vitamine 1%		5 ml	Biochrom, Berlin, Dtld.
L-Glutamin 1%		5 ml	Biochrom, Berlin, Dtld.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Kulturmediums

Dieses Medium wird im Weiteren als Kulturmedium bezeichnet.

### II.2.2. Subkultivierung der Zellen

Die Vermehrung der Zellen wurde mikroskopisch überwacht. Sobald die Konfluenz über 80 % betrug, mussten die Zellen subkultiviert werden. Durch die Reduktion der Zellzahl wurde die Zelldichte in der Zellkulturflasche auf mittlerem Niveau gehalten, um einen potenziellen Störfaktor auszuschalten. Eine erhöhte Konfluenz der Zellen führt schon frühzeitig zu einer Akkumulation von CAIX und hätte somit das Ergebnis der Hypoxie-Versuche verfälscht.

Dafür wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen einmal mit 3 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, wodurch sie sich von dem Boden der Zellkulturflasche lösten. Dieser Vorgang konnte durch das Beklopfen der Flasche von außen beschleunigt und das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert werden. Trypsin gehört zu den Endopeptidasen und spaltet Bindungen innerhalb von

Proteinen. Solange das Trypsin nur kurzzeitig einwirkt, werden nur die extrazellulären Proteine gespalten, so dass sich die adhärenen Zellen vom Boden lösen. Es kommt dabei zu keiner Schädigung der Zellen. Die Trypsin-Reaktion wurde anschließend mit 6 ml Kulturmedium gestoppt. Für die Inaktivierung des Trypsins ist das im fetalen Rinderserum enthaltene Antitrypsin verantwortlich. Nach mehrmaligem Ansaugen und Ablassen des Pipetteninhaltes, wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1200 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert.

Danach musste der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml vorgewärmten Medium resuspendiert werden. Anschließend wurden die Zellen, nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer (s. III.2.3.), für die Versuchsansätze eingesetzt oder zur Weiterführung der Zellkultur, je nach Vermehrungsverhalten, 1:X subkultiviert. Die abgelösten Zellen wurden auf neue Zellkulturflaschen verteilt und mit 20 ml Medium aufgefüllt. Mit jeder Subkultivierung erhöhte sich die Passagezahl um eine Einheit.

Name	Inhalt	Hersteller
Dulbecco's PBS	Phosphat-Buffered Saline Ohne $Ca^{2+}$ + $Mg^{2+}$	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin EDTA		PAA, Pasching, Österreich

Tabelle 6: Substanzen für die Subkultivierung

### II.2.3. Zellzählung mit der Neubauer-Kammer

Von den resuspendierten Zellen wurden 40 µl in ein Reaktionsgefäß gefüllt und mit 10 µl Trypanblau gemischt. Davon wurden ca. 8 µl unter ein Objektträgerglas, welches der Neubauer-Zählkammer auflag, pipettiert. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Das Trypanblau färbte die bereits abgestorbenen Zellen, die somit nicht in die Berechnung mit eingingen. Die Zellzahl wurde mittels folgender Formel berechnet:

$\text{Mittelwert der 4 Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor } (=1,25) \times 10^4 = \text{Zellanzahl/ml}$
--

Mit dieser Methode konnte durch das Pipettieren eines bestimmten Volumens des Suspensionsansatzes eine definierte Zellzahl ausgesät werden.

Handelsname	Hersteller
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtld.
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Dtld.

Tabelle 7: Material für die Zellzählung

#### II.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst (s. II.2.2. Subkultivierung der Zellen). Nach der Zentrifugation der Zellsuspension erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit einer bestimmten Menge an Medium, welche sich an der Größe des Zellpellets orientierte. Danach wurde die Zellzahl bestimmt (s. II.2.3. Zellzählung mit der Neubauer-Kammer), um die gewünschte Anzahl der Zellen auf 1,5 ml Reaktionsgefäße zu verteilen. Diese wurden daraufhin mit 1200 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, in Einfriermedium aufgenommen und in Einfriergefäße überführt. Sie wurden auf mindestens 1,5 ml mit Einfriermedium aufgefüllt und über Nacht bei -80° C in einem Cryo-Einfriergerät langsam eingefroren. Anschließend wurden sie in einer Cryobox aufbewahrt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad solange erwärmt, bis nur noch ein kleines Stück Eis enthalten war. Nachdem die Zellen in 50 ml Röhrchen pipettiert wurden, erfolgte ihre Resuspension mit 5 ml angewärmten Medium, eine anschließende Zentrifugation und schließlich ihre Überführung in die Zellkulturflasche. Diese wurde, wie üblich, mit 20 ml Medium aufgefüllt.

Name	Inhalt	Hersteller
Kryo-Röhrchen		TPP, Trasadingen, Schweiz
Einfriermedium	90 % FCS 10 % DMSO ( Dimethylsulfoxid )	Biochrom, Berlin, Dtld. Carl Roth, Karlsruhe, Dtld.
Cryo-Einfriergerät Nalgene		VWR, Wien, Österreich
Cryobox	System 100 TM Nalgene	VWR, Wien, Österreich

Tabelle 8: Material für das Einfrieren von Zellen



## II.3. Untersuchung der CAIX–Expression unter Normoxie und Hypoxie

Dieses Experiment untersuchte die CAIX–Expression von Glioblastomzellen unter hypoxischen Bedingungen. Dazu wurde einer Zellkulturflasche mit 70–80 %iger Konfluenz der Zellen der Sauerstoff für 24 h entzogen. Als Kontrolle fungierte dieselbe Zellkultur, welche allerdings unter normoxischen Konditionen kultiviert wurde.

Die CAIX-Transkription unter Sauerstoffmangel wurde molekularbiologisch mittels PCR nachgewiesen. Um das Ergebnis quantifizieren zu können, wurde ebenso eine qPCR (s. II.4.3.) durchgeführt.

Der sich anschließende Western Blot sollte das Ergebnis auf Protein-Ebene widerspiegeln.

### *II.3.1. Hypoxie / Normoxie der U251-Zellen für 24 h*

Einen Tag vor der künstlichen Hypoxie wurde das Kulturmedium beider Flaschen durch Medium ohne FCS (= Medium  $\emptyset$  FCS) ersetzt, da das fetale Rinderserum beim Begasen des Mediums zu einer massiven Schaumbildung geführt hätte.

Am nächsten Tag wurde zunächst das Medium  $\emptyset$  FCS mittels eines Exsikkators (s. Abb. 3) entgast, um den Sauerstoffausschluss der Hypoxieflasche zu gewährleisten.

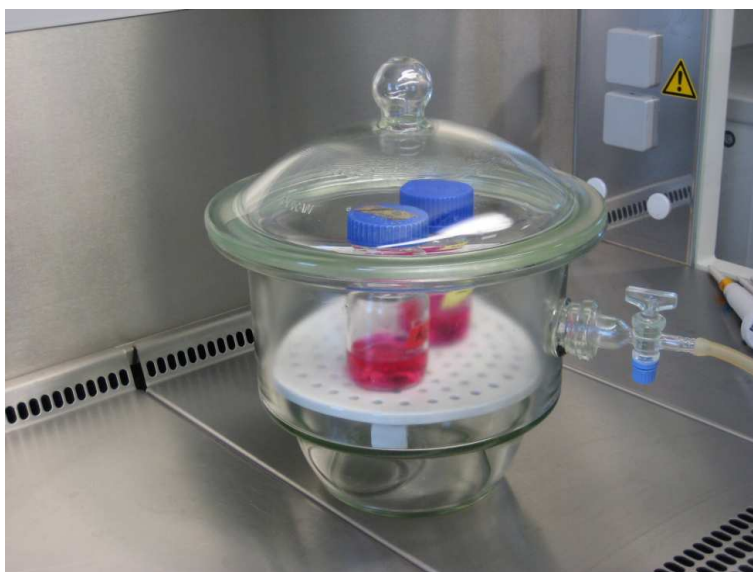


Abbildung 12: Dargestellt ist der Exsikkator, der zum Entgasen des Mediums verwendet wurde.

Von dem Medium  $\varnothing$  FCS mussten 23 ml in eine 100 ml Duran Flasche abgefüllt, der Deckel aufgedreht und nach Einfetten des Randes in den Exsikkator gestellt werden. Dieser wurde mit dem Deckel verschlossen. Nach dem Anschließen des Schlauches an den geöffneten Exsikkator-Hahn konnte die Vakuumpumpe gestartet werden.

20 min später wurde der Hahn verschlossen, die Pumpe abgeschaltet und der Exsikkator für 3 h stehen gelassen.

Nach Ablauf der Zeit musste die Werkbank ausgeschaltet werden, um eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr zu vermeiden.

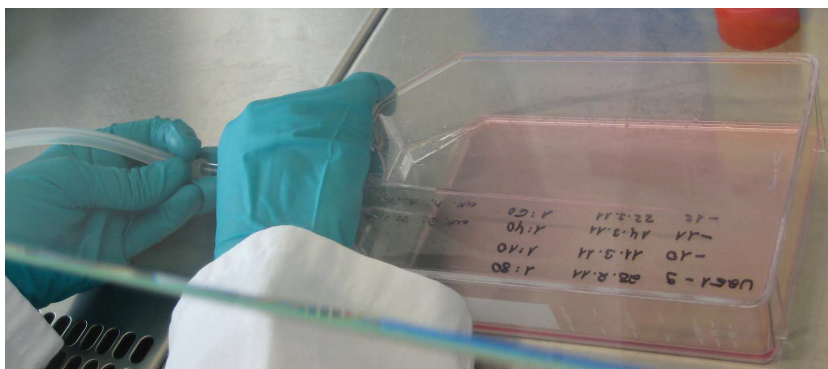
Zum Lösen des Vakuums wurde solange Prüfgas durch einen Schlauch vor die Öffnung des Exsikkator-Hahns geleitet, bis sich der Deckel verschieben ließ. Daraufhin wurde die Flasche entnommen und fest verschlossen.

Anschließend sollte das Medium  $\varnothing$  FCS mit einer an den Prüfgasschlauch gesteckten Pasteur-Pipette für 20 min begast werden.

Währenddessen wurde das Medium der Hypoxie-Zellkulturflasche verworfen und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen.

Als Nächstes mussten 20 ml des begasten Mediums  $\varnothing$  FCS hinzugegeben und die Zellkulturflasche über eine angesteckte Pasteur-Pipette für 5 min mit Prüfgas begast werden (s. Abb. 4). Nach Ablauf der Zeit wurde die Flasche fest verschlossen, mit Parafilm umwickelt und für 24 h in den Brutschrank gestellt.

Die Normoxie-Zellkulturflasche erhielt neues Medium  $\varnothing$  FCS und wurde anschließend für 24 h in den Brutschrank gestellt.



*Abbildung 13: Dargestellt ist das Begasen der Zellkulturflasche mit Prüfgas über eine angesteckte Pasteur-Pipette.*

Nach 24 h wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, PBS hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellkulturschaber vom Boden der Flasche

gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Röhrchen überführt, mit 1200 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Pellets im –80° C-Tiefkühlschrank gelagert.

Name	Inhalt	Hersteller
Exsikkator	Aus Duran Glas	VWR, Wien, Österreich
Exsikkatorfett		Merck, Darmstadt, Dtlid.
Prüfgas	5 % Kohlendioxid 95 % Stickstoff	Linde, Unterschleißheim, Dtlid.
Zellkulturschaber		Corning, Amsterdam, Niederlande
Parafilm		Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

Tabelle 9: Material für den Hypoxie-Versuch

Eine Luftzusammensetzung aus 5 % Kohlendioxid und 95 % Stickstoff wird in Folgendem als Hypoxie bezeichnet.

### *II.3.2. RNA-Isolierung*

Ribonukleinsäure (RNA) ist ebenso wie die DNA eine Nukleinsäure. Sie dient als mRNA, im Sinne eines Informationsüberträgers, der Umsetzung des genetischen Codes in ein Protein. Die mRNA ist eine Kopie der Basenabfolge der DNA (Transkription) und wird an den Ribosomen in ein Protein übersetzt (Translation).

Durch die Isolierung der RNA ist eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit möglich, da nur diejenigen Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiv sind, die auch als mRNA-Transkript vorliegen.

Dieses Verfahren wurde genutzt, um die CAIX-Expression nach 24 h Hypoxie zu untersuchen.

Um die RNA vor RNAsen zu schützen, musste immer auf Eis gearbeitet werden. Außerdem sollten die Arbeitsflächen zuvor mit RNase-freiem Spray gereinigt werden, um das Einbringen von RNAsen aus der Umgebung zu verhindern.

Die Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Quiagen.

Das Prinzip beruht auf der spezifischen Bindungsfähigkeit der RNA an eine Silikon-Gel-Membran und der Mikrosprintechnologie. Nachdem die RNA an die Membran

gebunden hat, wird sie mit Puffern gewaschen und zum Schluss mit Elutionspuffern von der Membran gelöst.

Die Durchführung der RNA-Isolierung aus den U251-Zellen erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

Um die Zellen zu lysieren, wurden pro Pellet 600 µl RLT-Puffer zugegeben.

Durch die Zugabe von 600 µl des 70 %igen Ethanolts sollten außerdem optimale Bindungsbedingungen geschaffen werden.

Nach mehrmaligem Resuspendieren wurde das Gemisch auf eine RNeasy Mini Säule pipettiert, welche anschließend für 15 s bei 8000 g zentrifugiert wurde. Dadurch kam es zur Bindung der freien RNA an die Silikon-Gel-Membran.

Die durchgetretene Flüssigkeit musste verworfen werden. Durch einen ersten Waschvorgang wurde die RNA von eventuell vorhandenen Verunreinigungen befreit. Dazu erfolgte die Zugabe von 350 µl des RW1-Puffers auf die Säule und die anschließende Zentrifugation bei 8000 g für 15 s.

Die restlichen DNA-Rückstände wurden durch eine 15 minütige Inkubation mit 80 µl der DNase-Pufferlösung bei Raumtemperatur eluiert. Anschließend wurde die Membran wieder mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und für 15 min bei 8000 g zentrifugiert. Für den dritten Waschschrift wurden 500 µl des RPE-Puffers auf die Säule gegeben und bei 8000 g für 15 s zentrifugiert. Dieser Vorgang wiederholte sich mit 2-minütiger Zentrifugationsdauer.

Um die Membran zu trocknen, erfolgte nach dem Wechsel des Röhrchens die Zentrifugation der Säule mit Höchstgeschwindigkeit. Danach wurde die Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben, um die adsorbierte RNA von der Membran zu lösen. Nach einer Minute Zentrifugation bei 8000 g befand sich schließlich die eluierte RNA in dem Reaktionsgefäß.

Die Messung der RNA erfolgte photometrisch. Dazu wurde jede Probe 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnt und in eine Präzisions-Küvette gefüllt. Die Bestimmung des Leerwertes erfolgte anhand des DEPC-Wassers.

Die isolierte RNA wurde im -80 °C-Tiefkühlschrank gelagert.

Name	Inhalt	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Zentrifugenröhrchen (1,5 ml) Mini Spin Säule Rnase-freies Wasser RW1-Waschpuffer RLT-Lysepuffer: 1 ml RLT-Puffer + 10 µl β-Mercaptoethanol RPE-Puffer + Ethanol	Quiagen, Hilden, Dtlid.
RNase-free DNase Set	DNase I RDD Puffer Rnase freies Wasser	
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
β-Mercaptoethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Carl Roth, Karlsruhe, Dtlid.
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Dtlid.
Ultrospec 3000	Spectrophotometer	Pharmacia, Cambridge, England
Präzisions-Küvetten	Aus Quarzglas	Hellma, Müllheim, Dtlid.
RNase Zap	RNase-free Spray	Ambion, Austin, USA

Tabelle 10: Material für die RNA-Isolation

### II.3.3. Umschreiben der RNA in cDNA

Um die Genexpressionsanalyse fortzuführen, musste die extrahierte RNA in eine komplementäre DNA (= cDNA) umgeschrieben werden, damit sie mittels PCR vervielfältigt werden konnte.

Das Schlüsselenzym dieser Methode ist die Reverse Transkriptase. Es wurde die Super Script II RT verwendet, welche aus E. Coli extrahiert worden ist.

Sie ist eine DNA-Polymerase, welche einen komplementären DNA-Strang zu einzelsträngiger RNA, DNA oder einem RNA-DNA-Hybrid synthetisieren kann. Sie unterscheidet sich von den üblicherweise verwendeten RT durch eine reduzierte RNase H-Funktion, so dass der Abbau von RNA während der Synthese des ersten cDNA-Strangs reduziert wird. Der Gewinn an vollständigen cDNA-Strängen wird dadurch erheblich gesteigert.

Für die cDNA-Synthese wurden Random Primer verwendet. Sie sind eine Mischung aus einzelsträngigen Hexanukleotiden zufälliger Sequenz mit 3'-Hydroxylenden und binden an die RNA. Durch das freie 3'-Ende der Primer wird es der RT ermöglicht,

den komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Hierfür benötigt sie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs).

Dithiothreitol (DTT) zerstört durch das Brechen von Disulfidbrücken die Sekundärstruktur der RNA und erleichtert der RT somit den Zugang zu ihr. Das Produkt ist ein cDNA-Strang, der mit dem ursprünglichen RNA-Strang hybridisiert ist. Letzterer wird nun mit der Endoribonuklease RNase H hydrolytisch abgespalten.

Als Nächstes synthetisiert die RT mittels ihrer DNA-abhängigen DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Strang zum schon bestehenden cDNA-Einzelstrang. Das Ergebnis ist eine doppelsträngige cDNA.

Da die mRNA das Splicing schon durchlaufen hat, besitzt die entstandene cDNA, im Gegensatz zur natürlichen DNA, keine Introns mehr.

Für die Umschreibung wurden zunächst drei Gemische hergestellt:

Name	Inhalt	Hersteller
X = Anzahl der Proben		
Mix 1	1 µl ✕ X Random Primer 1 µl ✕ X dNTP-Mix	Invitrogen, Carlsbad, Dtlid.
Mix 2	4 µl ✕ X First Strand Buffer 2 µl ✕ X 0,1 M DTT	
Mix 3	1 µl ✕ X Super Script II RT 1 µl ✕ X RNase-freies Wasser	

Tabelle 11: Material für die Umschreibung der RNA

Anschließend wurde 1 µg der jeweiligen RNA-Probe mit 2 µl des Mix 1 vermischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 12 µl gebracht. Als cDNA-Kontrolle diente eine Probe, die anstelle der RNA steriles Wasser enthielt.

Danach wurden die Proben in einem PCR-Cycler für 5 min auf 65 °C erhitzt, damit die Primer an die RNA hybridisieren konnten.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben für 1 min bei 4 °C gekühlt und 6 µl des Mix 2 in jede Probe pipettiert. Nach Erhöhung der Temperatur für 2 min auf 25 °C folgten die Zugabe von 2 µl des Mix 3 und die Erwärmung der Proben für weitere 10 min bei 25 °C. Die reverse Transkription lief bei 42 °C ab und wurde nach 50 min durch das 15 minütige Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Die Kühlung der Proben bis zu ihrer

Entnahme erfolgte bei 4 °C. Die entstandene cDNA wurde mit 80 µl des RNase freien Wassers verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### *II.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Die PCR (= Polymerase Chain Reaction) ist ein Verfahren, um bestimmte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen.

Als Kettenreaktion wird in diesem Zusammenhang die Tatsache bezeichnet, dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus dienen.

Die PCR findet in einem Thermocycler statt, welcher die Proben präzise auf die für den jeweiligen Reaktionsschritt notwendige Temperatur erhitzt oder kühlt.

Die Amplifikation diente dem Nachweis der CAIX-Expression der hypoxischen U251-Zellen. Als Kontrolle wurde die cDNA der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) vervielfältigt. Sie ist ein Enzym der Glykolyse und unentbehrlich für jede Zelle, sodass die zugehörige Bande in jeder Probe gleichstark ausgeprägt sein muss.

Somit kann einerseits überprüft werden, ob in jede Tasche die gleiche Menge an cDNA-Probe gegeben wurde und andererseits sicher gestellt werden, dass ein negatives Ergebnis nicht durch das Fehlen von cDNA entstanden ist.

Um die Gene dieser Enzyme auf der DNA zu erkennen, wurden spezifische Primer-Paare verwendet, die als kurze DNA-Einzelstränge komplementär zu Teilsequenzen der gesuchten Gene sind und somit an die Proben-DNA hybridisieren.

Die PCR besteht aus 30-45 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht (s. Abb. 7).

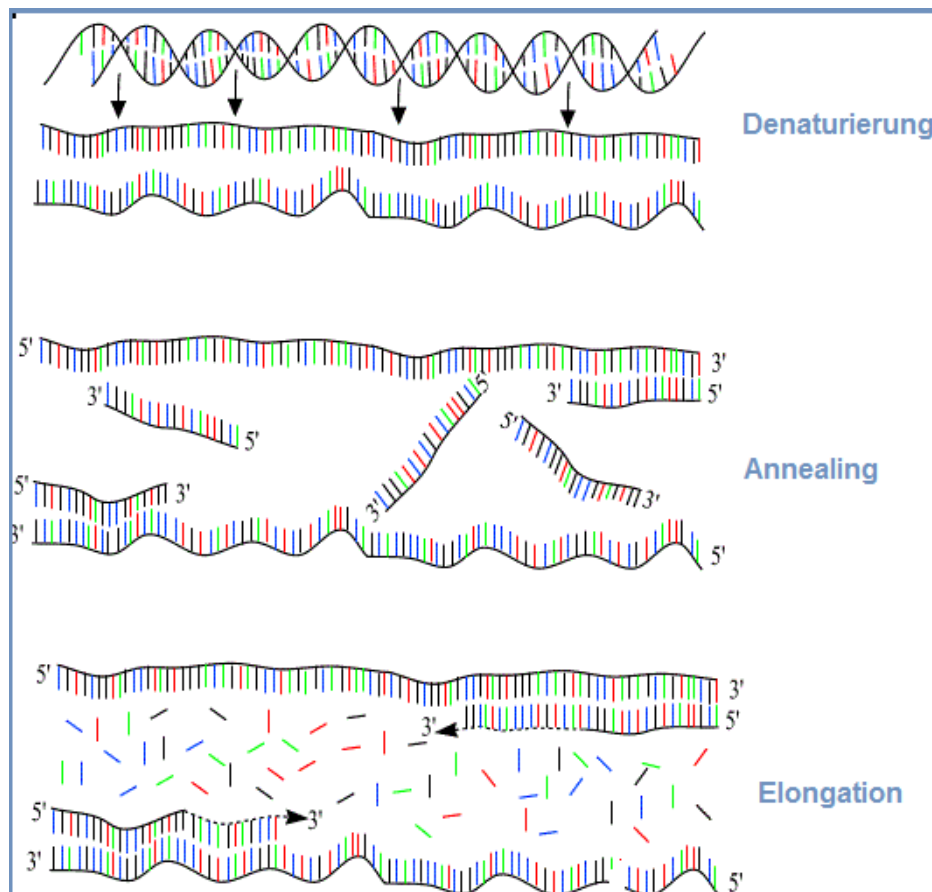
Als Erstes werden die Proben für 30 s auf 94°C erhitzt, um die DNA-Doppelstränge aufzubrechen (Denaturierung). Beim ersten Durchgang wird 5 min länger erhitzt, damit sich die Ausgangs-DNA und die Primer-Paare vollständig trennen können (Initialisierung).

Nach Ablauf der Zeit liegen die DNA-Proben nur noch als Einzelstränge vor und die Temperatur wird für 1 min auf 66 °C herabgesetzt. Es kommt zur genspezifischen Anlagerung der Primer an die komplementäre Sequenz der Proben-DNA (Annealing). Die beiden Primer stellen das 5'- bzw. das 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes (Amplikon) dar.

Danach wird die Temperatur für 2 min auf 72 °C erhöht. Nun arbeitet die hitzestabile Taq DNA-Polymerase optimal und verlängert beide hybridisierten Primer in 3'-Richtung (Elongation).

Im nächsten Schritt werden die Proben wieder auf 94 °C erhitzt, um die neu entstandenen Doppelstränge zu denaturieren.

Der Zyklus wird nun mehrmals wiederholt. Am Ende der PCR werden die Proben für 8 min auf 72 °C erwärmt und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Bei jedem Zyklus kommt es zumindest theoretisch zu einer Verdopplung der Amplikonzahl, so dass am Ende der PCR millionenfache Kopien des amplifizierten DNA-Segments vorliegen.



*Abbildung 14: Gezeigt ist die schematische Darstellung eines PCR-Zyklus. (Quelle: Andy Vierstraete)*



Die PCR bestand aus 25 Zyklen und wurde mit den oben genannten Temperaturen durchgeführt. Das zu erwartende Amplikon besitzt eine Länge von 252 Basenpaaren (bp).

Es wurden zunächst der CAIX- und der GAP-DH-Ansatz hergestellt:

Name	Inhalt	Hersteller
X = Anzahl der Proben		
12,5 µl X Taq PCR Mastermix	Taq DNA-Polymerase PCR Puffer dNTPs	Quiagen, Hilden, Dtld.
1 µl X Vorwärtsprimer (1:10)	<u>CAIX:</u> 5'-CCG AGC GAC GCA GCC TTT GA-3' <u>GAP-DH:</u> 5'-GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG-3'	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Dtld.
1 µl X Rückwärtsprimer (1:10)	<u>CAIX:</u> 5'-GGC TCC AGT CTC GGC TAC CT-3' <u>GAP-DH:</u> 5'-GTG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3'	
9,5 µl X RNase-freies Wasser		Quiagen, Hilden, Dtld.

Tabelle 12: Herstellung der PCR-Ansätze

Anschließend wurde 1 µl der zuvor mittels eines Vortexers gemischten cDNA-Proben mit 24 µl des CAIX-Ansatzes vermischt. Dasselbe erfolgte mit 24 µl des GAP-DH-Ansatzes. Als PCR-Kontrolle diente in beiden Ansätzen eine Probe, die an Stelle der cDNA steriles Wasser enthielt.

Danach wurden die Proben mit dem PCR-Cycler amplifiziert und im 4 °C Kühlschrank aufbewahrt.

### *II.3.5. Agarosegel-Elektrophorese*

Der qualitative Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mit einer Agarosegel-Elektrophorese. Die Proben wurden nach Anlegen eines elektrischen Feldes in einem 2 %igen Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Moleküle sind negativ geladen und wandern vom negativen zum positiven Pol. Die längeren DNA-Stränge bewegen sich nur langsam durch das Gel, sodass die kürzeren DNA-Abschnitte weiter wandern. Somit werden verschieden lange Moleküle voneinander getrennt. Die Nukleinsäurebanden wurden anschließend mittels eines UV-Transilluminators bei 230 nm sichtbar gemacht.

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde zunächst das 2%ige Agarosegel in einem Glaskolben hergestellt. Dazu wurden 2 g des Agarosepulvers in 100 ml 1xTBE gelöst. Die Suspension musste solange in der Mikrowelle erhitzt werden, bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlung des Gemisches wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das flüssige Gel in den mit einem Kamm versehenen Gelschlitten gefüllt. Die entstandenen Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze zur Seite geschoben.

Nach ausreichender Polymerisation wurde das Agarosegel in die Gelkammer gegeben, der Kamm entfernt und mit 1xTBE vollständig bedeckt.

Für die Vorbereitung der PCR-Produkte wurden 10 µl der Proben mit 2 µl eines 6x-Ladepuffers versehen, welcher sicherstellte, dass die Proben in die Taschen niedersanken. Außerdem enthält er eine Indikatorfarbe, die es ermöglichte, den Verlauf der Elektrophorese zu verfolgen.

Die Geldaschen wurden mit jeweils 12 µl der vorbereiteten Proben gefüllt. In der ersten Tasche mussten 5 µl eines Längenstandards (DNA-Leiter) mitgeführt werden, um die aufgetrennten PCR-Produkte anhand ihres Wanderungsverhaltens den entsprechenden Längen (in Basenpaaren) zuordnen zu können.

Nachdem alle Proben aufgetragen waren, wurde die Elektrophorese mit 100 V gestartet.

Nach 1 h war die Trennung der DNA-Moleküle ausreichend, sodass sie mittels eines UV-Transilluminators in einer Geldokumentationskammer, bei 230 nm, sichtbar gemacht werden konnten. Anschließend wurde das Bandenmuster auf Thermopapier dokumentiert.

Name	Inhalt	Hersteller
Seakem LE Agarose		Cambrex, Rockland, USA
TBE (10x)	108 g Tris (Tetramethylethylenediamine) 55 g Borsäure 40 ml EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	USB, Cleveland, USA  Sigma, Steinheim, Dtld. Carl Roth, Karlsruhe, Dtld.
Ethidiumbromid		Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtld.
6x Ladepuffer		Peq Lab, Erlangen, Dtld.
Quantitas Standard	25 bp-500bp	Biozym Scientific, Oldendorf, Dtld.
Gelkammer		Peq Lab, Erlangen, Dtld.
Geldokumentationskammer System Photo-Print		LTF Labortechnik, Wasserburg, Dtld.

Tabelle 13: Material für die Agarosegel-Elektrophorese

### *II.3.6. Nachweis auf Proteinebene*

Nach Extraktion der Proteine aus den Zellen des Hypoxie-Versuchs wurden sie mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet, wo die gesuchten Proteine durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden konnten.

#### II.3.6.1. Proteinisolierung aus den U251-Zellen

Die U251-Zellen des Hypoxie-Versuches wurden als Pellets bei -80 °C weggefroren (s. II.3.1).

Diese Zellpellets wurden nun mit 100-200 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert, um die Zellmembranen aufzulösen. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit bei 4°C auf dem Schüttler, wurden die Suspensionen in Reaktionsgefäße pipettiert und für 10 min mit 13000 rpm/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die isolierten Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Name	Inhalt	Hersteller
10xPBS	10 g KCL 10 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 450 g NaCl 108 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Dtlid.
RIPA-Puffer	10 ml 10xPBS 1 ml Nonidetp40 Detergent 0,5 ml Natriumdodecylsulfat (SDS) 20% 500 mg Natriumdesoxycholat <i>Auf 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt</i>	ICN Biomedicals, Ohio, Dtlid. Serva, Heidelberg, Dtlid. Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtlid.
RIPA-Lysepuffer 1ml	958 $\mu\text{l}$ RIPA-Puffer 2 $\mu\text{l}$ AEBSF (1:500) (Aminoethylbenzensulfonylfluorid) 40 $\mu\text{l}$ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtlid.  Roche, Mannheim, Dtlid.

Tabelle 14: Material für die Proteinisolierung

### II.3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels der Lowry-Methode bestimmt. Der erste Schritt beruht darauf, dass die Peptidbindungen der Proteine eine Verbindung mit einem alkalischen  $\text{Cu}^{2+}$ -Reagenz eingehen. In einem zweiten Schritt wird das  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches wiederum das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau reduziert. Die intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie bei 650 nm gemessen. Als Referenz wurde mit bovinem Serum-Albumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen eine Eichkurve erstellt, um die ermittelten Extinktionen in die entsprechenden Proteinkonzentrationen zu überführen.

Für die Proteinbestimmung wurde zunächst der RIPA-Puffer 1:10 mit Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Zelllysate aufgetaut und mit obigem RIPA-Puffer 1:10 verdünnt. Für die Herstellung des BSA-Standards musste aus einer Stocklösung (30 %iges BSA 1:150 verdünnt mit dem obengenannten RIPA-Puffer) eine Verdünnungsreihe erstellt werden. Die Stocklösung enthielt 2000  $\mu\text{g}$  Protein/ml.

Der fertig gestellte BSA-Standard wurde daraufhin in die Mikrotiterplatte überführt. Als Leerwert diente der zur BSA-Verdünnung eingesetzte RIPA-Puffer.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 17,5 µl des Reagenz AS (bestehend aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S) in die Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte. Danach wurden die Proben ebenfalls in die Vertiefungen überführt und anschließend mit 140 µl des Reagenz B benetzt. Nach Inkubation der Proben für 10 min bei RT erfolgte die Messung des Farbumschlags bei 650 nm mittels Photometrie.

Name	Inhalt	Hersteller
Reagenz A	Alkalische Kupferlösung	Bio-Rad, München, Dtlid.
Reagenz S	Surfactantlösung	
Reagenz B	Folin-Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren)	
BSA	Bovines Serumalbumin	PAA, Pasching, Dtlid.

*Tabelle 15: Material für die Bestimmung der Proteinkonzentration*

### II.3.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zum Auftrennen von Proteinen in einem elektrischen Feld. Hierbei wandern die Proteine zuerst in ein Sammelgel, in dem sie sich konzentrieren und anschließend in ein Trenngel, in dem die eigentliche Separierung stattfindet.

Es wurde ein Polyacrylamid-System als Trägermedium verwendet. Die Zugabe von APS führt zu einer Polymerisation des Acrylamids, die durch TEMED beschleunigt wird. Methylenbisacrylamid dient der Quervernetzung der linearen Acrylamidketten, sodass ein festes Gel entsteht.

SDS ist ein stark negatives Detergens, das die Eigenladung der Proteine maskiert. Die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe ist der Proteinmasse proportional, sodass alle Proteine die gleiche Ladung besitzen und zum positiven Pol der elektrischen Spannung wandern. Durch die Zugabe des SDS und das anschließende Erhitzen auf 95 °C werden zudem Wasserstoffbrücken gebrochen und somit die Sekundärstruktur der Proteine zerstört. Der Zusatz von Mercaptoethanol reduziert ihre Disulfidbrücken, sodass sie nun als lineare Aminosäureketten vorliegen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt demnach umgekehrt proportional zur Länge ihrer Peptidketten, wobei kleine Proteine schneller durch das Gel wandern als große.

Die Vorbereitung der SDS-PAGE begann mit der Reinigung und dem Zusammenbau der Gelelektrophorese-Materialien.

Daraufhin erfolgte die Herstellung des Trenngels in folgender Zusammensetzung.

<b>Sammelgel 5%ig</b>	<b>Trenngel 12%ig</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
5,5 ml	9,9 ml	Aqua dest.	
1,3 ml	12,0 ml	30%ige Acrylamidstammlösung	Bio-Rad, München, Dtlid.
1,0 ml	7,5 ml	1,5 M Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	USB, Cleveland, USA
0,08 ml	0,3 ml	10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg, Dtlid.
0,08 ml	0,3 ml	10 % APS (Ammonium persulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtlid.
0,008 ml	0,012 ml	TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Bio-Rad, München, Dtlid.

*Tabelle 16: Zusammensetzung der Gele*

Das Trenngel wurde gevortext, sofort zwischen die dafür vorgesehenen Glasplatten gefüllt und mit 50 %igem Ethanol überschichtet, um einen glatten Gelrand zu erhalten. Nach dem Festwerden des Gels wurde das Ethanol durch Ausspülen mit destilliertem Wasser entfernt. Oberhalb des Trenngels wurde nun das Sammelgel eingebracht, in das ein Kamm eingesetzt wurde, um die Probentaschen zu formen.

Um die isolierten Proteine zu denaturieren, mussten sie 1:1 mit reduzierendem 2x-Probenpuffer verdünnt und für 5 min in kochendes Wasser gehalten werden.

Die erstarrten Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese wurde anschließend mit 1xSDS-Laufpuffer gefüllt und erhielt Anschluss an ein Kühlsystem. Mittels einer mit angesteckter Kanüle versehenen Spritze erfolgten die Entfernung von Luftblasen zwischen den Glasplatten und die Reinigung der Taschen des Sammelgels.

Nach kurzem Zentrifugieren wurden 20 µg der Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wurden 7 µl eines mit blauem Farbstoff gekoppelten Protein-Markers, der zehn Proteine von 10-180 kDa als Größenreferenzen enthält, mit 13 µl eines Ladepuffers gemischt und in die erste Tasche gegeben.

Die Elektrophorese wurde mit 120 V gestartet. Nachdem die Proben ins Sammelgel gelaufen waren, wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Die Proteinauftrennung erfolgte über 2,25h.

Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten entnommen und vorsichtig mittels eines Spatels voneinander gelöst, sodass das Gel an einer Glasplatte haften blieb. Das Sammelgel sowie die Laufront mussten mit einem Skalpell abgetrennt werden.

Name	Inhalt	Hersteller
Reduzierender Probenpuffer (5x)	0,6 ml 1M Tris-HCL 5,0 ml 50 %iges Glycerol 2,0 ml 10 %iges SDS 0,5 ml Mercaptoethanol 1,9 ml steriles Wasser 1 Spatelspitze Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Dtld. Sigma, Steinheim, Dtld. Serva, Heidelberg, Dtld. Carl Roth, Karlsruhe, Dtld. Sigma, Steinheim, Dtld. Merck, Darmstadt, Dtld.
Protein-Marker IV	Mischung aus 10 rekombinant in E. Coli hergestellten Proteinen (10-180kDa)	Peq Lab, Erlangen, Dtld.
1xSDS-Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % SDS	Bio-Rad, München, Dtld.
Gel Loading Buffer	95 % Formamid 18 mM EDTA 0.025 % SDS 0.025 % Xylencyanol 0.025 % Bromphenolblau	Ambion, Austin, USA
Gelelektrophoresekammer		Biometra, Göttingen, Dtld.
Gel Loading Spitzen		Süd-Laborbedarf, Gauting, Dtld.

Tabelle 17: Material für die SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese

#### II.3.6.4. Western Blot

Der Western Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran. Dabei wird das Acrylamidgel zusammen mit einer Nitrocellulosemembran horizontal zwischen puffergetränkten Filterpapieren plaziert und eine elektrische Spannung angelegt. Der Vorteil dieses Transfers liegt darin, dass die Proteine auf der Membran für Antikörper besser zugänglich sind als im Gel.

Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern die Proteine im Acrylamidgel zur Anode und werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Nitrocellulosemembran gebunden. Dieser Effekt wird durch vorherige Aktivierung der Membran durch das im Transferpuffer enthaltene Methanol verstärkt. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten.

Zunächst wurden 2x5 Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des Polyacrylamidgels (s. II.3.6.3.) zugeschnitten und in kalten Transferpuffer gelegt. Nach dem Entfernen von eventuell vorhandenen Luftblasen erfolgte die Platzierung von 5 Filterpapieren auf den unteren Teil der Blotkammer. Anschließend wurde das Gel vorsichtig auf die Filterpapiere gelegt und exakt mit der Nitrocellulosemembran bedeckt. Um Transfereinbußen zu vermeiden, musste darauf geachtet werden, dass sich zwischen dem Gel und der Membran keine Luftblasen befanden. Zum Schluss wurde die Membran mit 5 getränkten Filterpapieren überdeckt und die Blotkammer mit dem Anodendeckel verschlossen.

Nach Beschweren der Kammer mit 1 kg erfolgte der Proteintransfer mit 100,8 mA (*Fläche des Filterpapiers x 0,8*) über 75 min.

Um sicherzustellen, dass die Proteinübertragung erfolgreich war, wurde die Membran mit Panceau gefärbt. Panceau ist ein roter Azofarbstoff, der reversibel an die Aminogruppen der Proteine bindet. Die Färbung wurde anschließend wieder mit Wasser ausgewaschen.

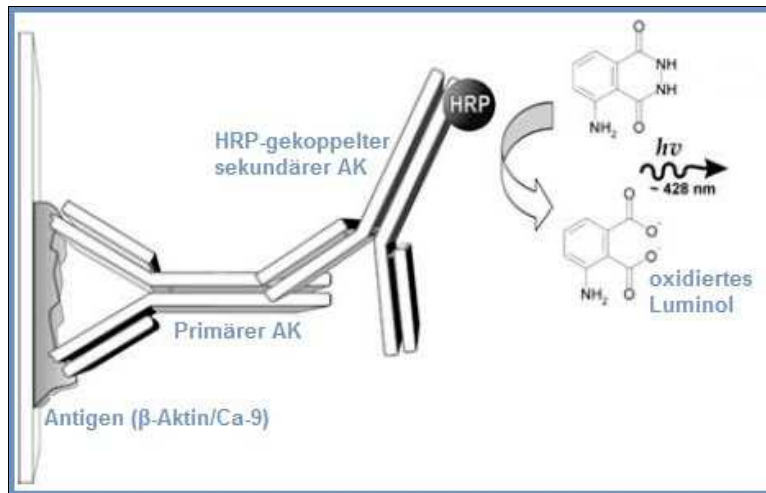
Handelsname	Inhalt	Hersteller
Filterpapiere		VWR, Wien, Österreich
Protran Nitrocellulose Transfer Membran		Whatman Dassel, Dtl.
Transferpuffer	39 mM Glycine 40 mM Tris 0,03 % SDS 20% Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Panceau		Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Blotkammer		Renner, Dannstadt, Dtl.

*Tabelle 18: Material für den Western Blot*

### II.3.6.5. Immunoblot-Analyse

Das gesuchte Protein, in diesem Fall die Carboanhydrase IX, wurde mittels spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Das Prinzip beruht auf Primärantikörpern, die an die CAIX-Proteine auf der Nitrocellulosemembran binden. An die F<sub>c</sub>-Regionen dieser Antikörper binden wiederum Sekundärantikörper, die mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt sind. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol, welche eine detektierbare Lumineszenz erzeugt.





**Abbildung 15:** Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Immunoblot-Prinzips. (Quelle: modifiziert nach Academic)

Nach einem ersten Waschvorgang mit PBS-Tween wurde die Nitrocellulose-Membran mit 3 %iger Milch in PBS-Tween für 30 min inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blocken. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. Tab. 2) bei 4 °C über Nacht. Dafür wurde der Antikörper mit Blocklösung 1:5000 verdünnt, wovon 5 ml zur Anwendung kamen.

Am nächsten Tag musste die Membran dreimal für 10 min mit PBS-Tween gewaschen, bevor die Verdünnung des zweiten Antikörpers (s. Tab. 3) 1:20000 mit Blocklösung erfolgen konnte. Nach einstündiger Inkubation mit 5 ml der Ak-Lösung wurde die Membran erneut dreimal für 10 min gewaschen.

Als Nächstes folgte die Benetzung der Membran mit ECL-Detektionslösung für 5 min. Das enthaltene Luminol wurde mittels der HRP oxidiert und mit der entstehenden Lumineszenz wurde ein Röntgenfilm belichtet.

Die beschriebene Prozedur wurde mit Antikörpern gegen β-Aktin wiederholt. Sie wird auch Beladungskontrolle genannt.

β-Aktin ist ein 42 kDa großes Protein, welches auch als sogenanntes „housekeeping gene“ bezeichnet wird. Es polymerisiert zu Aktinfilamenten, die der Zelle Stabilität verleihen und wird somit in jeder Körperzelle exprimiert. Da folglich die zugehörige Bande in jeder Probe gleichstark ausgeprägt sein muss, kann mit Hilfe der β-Aktin-Kontrolle überprüft werden, ob in jede Tasche die gleiche Menge an Zelllysat gegeben wurde. Außerdem kann sicher gestellt werden, dass ein negatives Ergebnis nicht durch das Fehlen von Protein entstanden ist.

Um zuvor die gebundenen CAIX-spezifischen Antikörper von der Membran zu entfernen, ohne dabei die Proteine zu lösen, wurde sie für 10 min mit Stripping-Puffer inkubiert.

Da der Proteinmarker nur auf der Nitrocellulosemembran sichtbar ist, erfolgte die Größenzuordnung der sichtbaren Banden durch Vergleich der Membran mit dem Röntgenfilm. Die CAIX-Bande war auf Höhe von 54-58 kDa zu erwarten.

Name	Inhalt	Hersteller
PBS-Tween	PBS + Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Blocklösung	3 g Magermilchpulver in 100 ml PBS-Tween verdünnt	Sucofin, Zeven, Dtl.
Primärantikörper Rbt anti-CAIX	Polyklonale Ak gegen CAIX aus dem Kaninchen Als Immunogen diente eine C-terminale Sequenz des menschlichen CAIX-Proteins Verdünnung 1:5000	Novus Biologicals , Littleton, USA
Sekundärantikörper Gt anti-rbt-IgG, HRP	HRP-gekoppelter Ak gegen Kaninchen-Ak aus der Ziege Verdünnung 1:20000	Bio Source, Camarillo, USA
Primärantikörper Ms anti- $\beta$ -Actin	Monoklonaler Ak gegen $\beta$ -Aktin aus Hybridzelle (Fusion von Splenozyten d. immunisierten Maus mit Myelomzellen d. Maus) Als Immunogen diente eine synthetisch modifizierte N-terminale Sequenz des zytoplasmatischen $\beta$ -Aktins Verdünnung 1:5000	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Sekundärantikörper Dky anti-ms-IgG, HRP	HRP-gekoppelter Ak gegen Maus-Ak aus dem Affen Verdünnung 1:5000	Chemicon, Temecula, USA
ECL-Lösung:	100 mM Tris/HCl 0,2 mM p-Cumarsäure (in Dimethylsulfoxid gelöst) 1,2 mM Luminol (Natriumsalz, in Dimethylsulfoxid gelöst) 0,01 %iges Wasserstoffperoxid.	Thermo Scientific, Rockford, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer		Pierce, Rockford, Dtl.

WB-Entwickler	M35X-OMAT Processor	Kodak, Stuttgart, Dtl.
ECL High Performance Chemiluminescence film		Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Hypercassette		

*Tabelle 19: Material für den Immunoblot*

## II.4. Transfektion mit siRNA und anschließendem

### Hypoxie-Versuch

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. In diesem Versuch erfolgte der Einsatz von Liposomen, in welche die siRNAs eingeschlossen wurden. Liposomen bestehen aus einer oder mehreren Phospholipiddoppelschichten und können deshalb leicht mit der Zellmembran fusionieren.

SiRNAs (small interfering RNAs) sind 20-22 Nukleotide lange, doppelsträngige RNA-Fragmente, die von einer Endoribonuklease (Dicer) aus dsRNA herausgeschnitten wurden. Diese kleinen RNA-Moleküle sind zu einem Stück der mRNA eines Gens komplementär, binden an dieses und verhindern somit seine Translation. *In vivo* sind sie an der Regulation der Gen- und Transposonaktivität sowie der zellulären Virusabwehr beteiligt. Durch RNA-Interferenz kann gentechnisch fast jedes beliebige Gen ausgeschaltet werden.

Die synthetisch hergestellten siRNAs CAIX bzw. Non-Specific Control (NSC) wurden über Liposomen in die U251-Zellen eingebracht. Die spezifische CAIX-siRNA bindet komplementär an Teile der mRNA des CAIX-Gens und verringert so seine Expression: es entstehen sogenannte CAIX-Knockout-Zellen. Als Kontrollansatz dienten U251-Zellen, die mit unspezifischer NSC-siRNA transfiziert wurden (=NSC-Kontrolle).

Nach Stimulation der CAIX-Expression durch hypoxische Bedingungen wurde die Transfektion der Zellen mittels quantitativer PCR, Western Blot-Analyse und Immunfluoreszenzfärbung überprüft.

### II.4.1. Transfektion

Die Transfektion erfolgte in zwei 6-Loch-Mikrotiterplatten. Dafür wurden die Zellen abtrypsiniert, gezählt (s. II.2. Zellkultur) und 6x300000 Zellen in ein Röhrchen überführt, welches daraufhin zentrifugiert wurde. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Mediums  $\emptyset$  FCS gewaschen, zentrifugiert und bis zur Ansaat der Zellen stehen gelassen.

Als Nächstes erfolgte die Herstellung des Transfektionsreagenz. Dazu wurden jeweils 1625  $\mu$ l des Opti-MEM-Mediums in vier Röhrchen vorgelegt. Zwei der Röhrchen wurden mit 32,5  $\mu$ l des Lipofektamins für 5 min bei RT inkubiert. Röhrchen 3 bzw. 4 wurden mit 6,5  $\mu$ l siRNA CAIX bzw. si RNA NSC (s. Tab. 4) für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden Röhrchen 1 und 3 bzw. 2 und 4 zusammen pipettiert und für 20 min bei RT inkubiert.

Kurz vor Ablauf der Zeit wurde das Zellpellet in 26 ml des Mediums  $\emptyset$  FCS (s. II.3.1.) aufgenommen und auf die 6-Loch-Mikrotiterplatten (2 ml pro Loch) verteilt.

Es erwies sich als vorteilhaft, 500  $\mu$ l des Transfektionsreagenz siRNA CAIX bzw. NSC tropfenweise auf die Zellen zu geben. Es wurden eine Normoxie- und eine Hypoxie-Platte verwendet, welche je 3 Löcher mit CAIX-Knockout-Zellen und je 3 Löcher mit NSC-Zellen enthielten. Nach vorsichtigem Beklopfen wurden die Platten für 4 h in den Brutschrank gestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 2 ml Kulturmedium in jede Vertiefung, um die Erholung der Zellen zu beschleunigen. Die transfizierten Zellen blieben über Nacht im Brutschrank stehen.

Name	Inhalt	Hersteller
SiRNA CA9AS	5'-CAA-UGG-CCA-CAG-UGU-GCAA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Dtld.
SiRNA Non-Specific Control	5'-UAA-UGU-AUU-GGA-ACG-CAUA-3'	
Lipofektamin 2000		Invitrogen, Carlsbad, Dtld.
Opti-MEM+ GlutaMax-1-Medium		Gibco/Invitrogen, Carlsbad, Dtld.

Tabelle 20: Material für die Transfektion

#### *II.4.2. Hypoxie/Normoxie der transfizierten U251-Zellen*

Am nächsten Morgen wurde das Medium  $\emptyset$  FCS unter Vakuum entgast und für 3 h im Exsikkator stehen gelassen (s. II.3.1. Hypoxie / Normoxie der U251 für 24 h).

In der Zwischenzeit wurden die transfizierten Zellen aus dem Brutschrank entnommen und unter dem Mikroskop begutachtet.

##### Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung:

Um die CAIX-Expression der Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen zu können, mussten sie vor dem Hypoxie-Versuch auf Deckgläser überführt werden.

2 Vertiefungen pro Kondition und Platte wurden für die spätere Analyse mittels quantitativer PCR belassen.

Die Zellen der verbliebenen 2 Vertiefungen wurden mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und anschließend mit 500  $\mu$ l Trypsin vom Boden der Platte gelöst. Nach dem Abstoppen der Trypsin-Reaktion durch die Zugabe von 1 ml Kulturmedium, wurden die Zellen in Röhrchen überführt und mit 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Zellpellets mit 3 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 4x40000 Zellen pro Kondition (CAIX/NSC) und Platte (Normoxie/Hypoxie) in die entsprechenden Röhrchen pipettiert und anschließend zentrifugiert.

Nach Ablauf der 3 h musste die Werkbank ausgeschaltet, das Vakuum des Exsikkators gelöst, das Medium  $\emptyset$  FCS entnommen und für 20 min mit Prüfgas begast werden (s. II.3.1.).

Für den Versuch wurden zwei 24-Loch-Mikrotiterplatten verwendet, in die am Tag zuvor 4 desinfizierte Deckgläser pro Kondition (CAIX/NSC) und Platte (Normoxie/Hypoxie) eingesetzt wurden.

Nach 20 min wurden die Überstände der zentrifugierten Hypoxie-Röhrchen abgesaugt und die Zellpellets mit 5 ml des begasten Mediums resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml der entsprechenden Zellsuspension auf die Deckgläser der Hypoxieplatte.

Die Platte wurde sofort in die Hypoxiekammer (s. Abb. 5) gestellt, fest verschlossen und mit Prüfgas begast.

Die Arbeit mit der Normoxie-Platte erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Dazu wurden die Normoxie-Röhrchen aus der Zentrifuge entnommen und die Zellpellets mit 5 ml Medium  $\emptyset$  FCS resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der entsprechenden

Zellsuspension auf die Deckgläser der Normoxieplatte gegeben, welche ebenfalls für 24 h im Brutschrank stehen blieb.

### Zellen für die quantitative PCR:

Die Arbeit mit der Hypoxie-Platte erfolgte unter einer ausgeschalteten Werkbank.

Als Erstes wurden die belassenen Vertiefungen der 6-Loch-Mikrotiterplatte mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml des begasten Mediums in jede Vertiefung, musste die Platte für 10 min mit Prüfgas begast werden (s. II.3.1.). Anschließend wurde sie ebenfalls in die Hypoxiekammer gestellt, welche fest verschlossen und nun für weitere 20 min begast wurde. Nach Ablauf der Zeit wurde die Begasung eingestellt, die Schläuche abgeklemmt und die Kammer für 24 h im Brutschrank aufbewahrt.

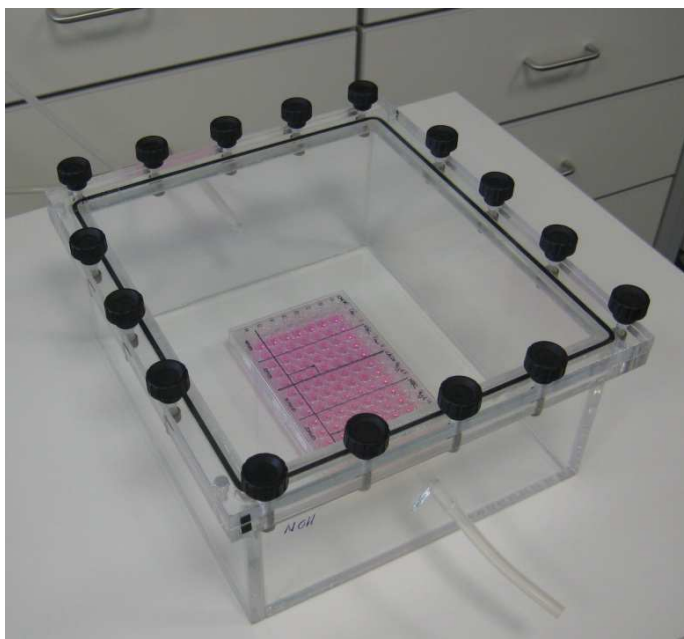


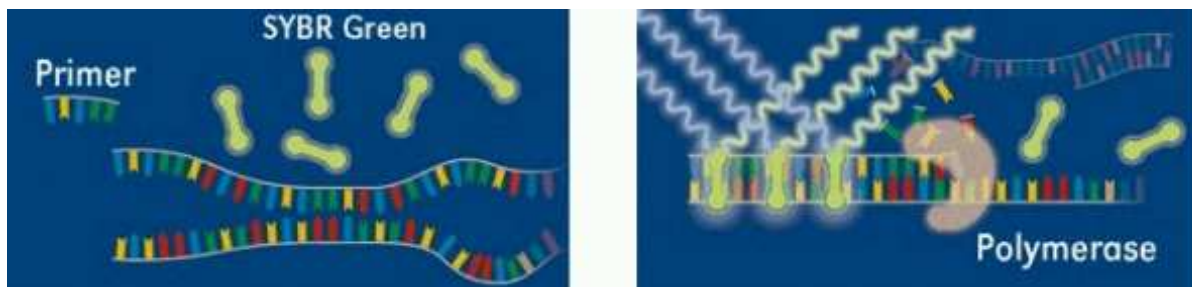
Abbildung 16: Dargestellt ist die verwendete Hypoxiekammer.

Die Normoxieplatte wurde unter sterilen Bedingungen mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml des begasten Mediums in jede Vertiefung, blieb die Platte ebenfalls für 24 h im Brutschrank stehen.

Nach 24 h wurden die Zellen aus der Hypoxiekammer entnommen und für die folgenden Untersuchungen vorbereitet.

### II.4.3. Quantitative Real-Time-PCR mit dem Light Cycler

Die qPCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (II.3.4.), mit dem Unterschied, dass sie zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung kann auf verschiedene Weise ablaufen und während des PCR-Vorgangs überwacht werden. In diesem Fall ist die Schlüsselsubstanz ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR Green I), der sich sequenzunabhängig in doppelsträngige DNA einlagert. Angeregt durch eine Lichtquelle im PCR-Gerät nimmt die Fluoreszenz proportional zu der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs wird anhand der in der exponentiellen Phase der PCR erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung vorgenommen. Mittels einer Eichkurve, welche mit bekannten Konzentrationen des Standards erstellt wird, kann die Software die Menge der DNA bestimmen. Es handelt sich um ein geschlossenes System, in dem Glaskapillaren als Reaktionsgefäße fungieren, um eine schnelle Verteilung der Temperatur zu gewährleisten und die Messung der Fluoreszenzintensitäten zu erleichtern.



*Abbildung 17: Gezeigt ist die Wirkungsweise des interkalierenden Farbstoffs SYBR-Green im Rahmen der qPCR. (Quelle: Deutsches Krebsforschungszentrum)*

Nach Ablauf der 24 h wurden die Zellen aus der Hypoxiekammer entnommen (s. II.4.2.).

Die Zellen jeder Vertiefung wurden mit 500 µl PBS gewaschen und darauf mit 300 µl RLT-Lysepuffer lysiert. Die Zellen der vier Vertiefungen mussten anschließend in entsprechende Röhrchen pipettiert werden, um sie der weiteren RNA-Isolation zugänglich zu machen (s. II.3.2.).

Daraufhin wurde die Menge der extrahierten RNA bestimmt (s. II.3.2.), um sie später mit dem Cycler in cDNA umzuschreiben (s. II.3.3.).

Die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte. Der Lauf bestand aus 40 Zyklen, wobei die Annealing-Temperatur 63 °C betrug. Das zu erwartende Amplikon besitzt eine Länge von 252 bp.

Es wurde zunächst eine Standardreihe erstellt. Jeweils 3 µl der cDNA-Proben bildeten einen Pool, mit welchem anschließend eine Verdünnungsreihe generiert wurde. Die Proben bzw. Standards wurden als 2-Fach-Bestimmungen pipettiert. Als PCR-Kontrolle setzte man 3 µl eines sterilen Wassers ein. Pro Vertiefung wurden 3 µl Probe bzw. Standard vorgelegt und 22 µl Mastermix zugegeben, sodass sich ein Endvolumen von 25 µl ergab. Der Mastermix für CAIX bzw. GAP-DH wurde zuvor entsprechend der Probenanzahl hergestellt:

Name	Inhalt	Hersteller
X = Anzahl der Proben		
12,5 µl X Taq PCR Mastermix	Hot Star Taq-DNA-Polymerase SYBR Green PCR-Puffer dNTP Mix SYBR Green I Farbstoff ROX Farbstoff	Quiagen, Hilden, Dtlid.
1 µl X Vorwärtsprimer (1:10)	<u>CAIX:</u> 5'-CCG AGC GAC GCA GCC TTT GA-3' <u>GAP-DH:</u> 5'-GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG-3'	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Dtlid.
1 µl X Rückwärtsprimer (1:10)	<u>CAIX:</u> 5'-GGC TCC AGT CTC GGC TAC CT-3' <u>GAP-DH:</u> 5'-GTG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3'	
7,5 µl X Rnase-freies Wasser		Quiagen, Hilden, Dtlid.
96-V-Thin-Wall-Mikrotiterplatte		Biozym Scientific, Oldendorf, Dtlid.
L Cycler IQ 5 Multicolor Realtime PCR Detection System		Bio-Rad, München, Dtlid.

*Tabelle 21: Material für die quantitative Real-Time-PCR*



#### II.4.4. Nachweis auf Proteinebene

Um die Folgen der Transfektion von mit spezifischer CAIX-siRNA behandelten U251-Zellen bzw. den NSC-Kontrollen auf Proteinebene sichtbar zu machen, wurde ein Western Blot angeschlossen. Die Methode wurde, wie bereits in Kapitel II.3.6 beschrieben, durchgeführt. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgte dabei mit 62 mA über 115 min.

#### II.4.5. Immunfluoreszenzfärbung (Streptavidin-Biotin-Methode)

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung kann genutzt werden, um bestimmte Proteine sichtbar zu machen, in unserem Fall die CAIX. Dabei bindet zunächst ein spezifischer Primärantikörper an die CAIX und wird anschließend durch einen biotinylierten Sekundärantikörper markiert. Dieser sogenannte Brücken-Ak steigert die Empfindlichkeit der Methode um das Zehnfache, da mehrere dieser Ak an das F<sub>c</sub>-Fragment des Erstantikörpers binden können. Um eine weitere Verstärkung der Sensitivität zu erreichen, wurde die Streptavidin-Biotin-Methode angewandt. Sie macht sich die starke Affinität von Streptavidin für Biotin zu Nutze und führt zur der Bildung von Komplexen aus Streptavidin und biotinyliertem Sekundärantikörper. An das Streptavidin ist der fluoreszierende Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gebunden, welcher bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt wird und somit die Antigen-Ak-Komplexe im Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht.

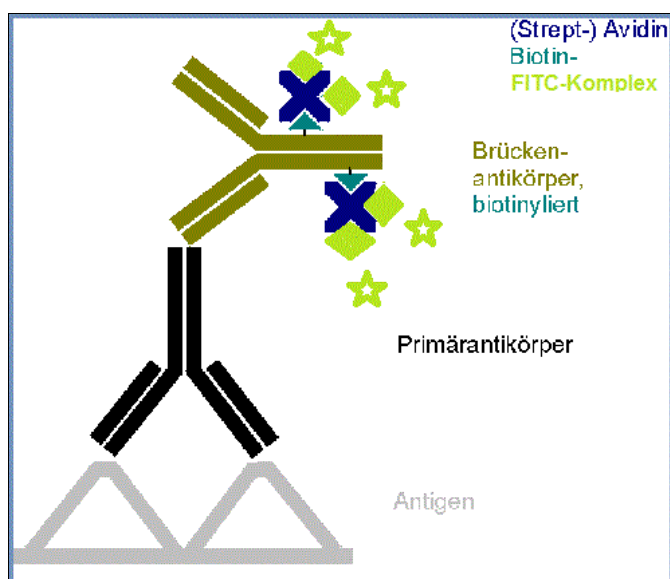


Abbildung 18: Gezeigt ist eine schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit Streptavidin-FITC. (Quelle: modifiziert nach Pathologie-online)

Nach Ablauf der 24 h erfolgte die Entnahme der Zellen aus der Hypoxiekammer (s. II.4.2.).

Um die Zellen auf den Deckgläsern zu fixieren, wurden nach Absaugen des Mediums 500 µl des 4 %igen PFA in jede Vertiefung gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend musste das PFA verworfen und die fixierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen werden. Nach der Zugabe von 1 ml PBS in jede Vertiefung wurde die Platte mit Parafilm verschlossen und bis zum Färben bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Dazu wurde zunächst das alte PBS abgesaugt und die fixierten Zellen mit frischem PBS für 10 min auf dem Schüttler gewaschen.

Anschließend erfolgte die Herstellung einer 3 %ige Blocklösung aus Esel-Serum und 0,1 %igen Triton X-100 (in PBS), wovon 300 µl in jede Vertiefung gegeben wurden und für 30 min einwirken sollten. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, musste Serum derjenigen Tierspezies verwendet werden, aus welcher der Zweitantikörper stammte. Somit wurde die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer potentiellen Hintergrundstrahlung minimiert und die Spezifität der Färbung erhöht. Das beigefügte Triton X-100 löst als Detergenz die Zellmembranen auf und macht die Antigene somit für die Ak zugänglich.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 300 µl der Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Dafür wurde der Antikörper (s. Tab. 5) mit Blocklösung 1:1000 verdünnt.

Als Kontrolle diente ein mit unspezifischen Kaninchen-Ak inkubiertes Deckglas, anhand dessen die Anzahl der nicht-spezifischen Bindungen bestimmt werden konnten.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl des 1:500 verdünnten Sekundärantikörpers (s. Tabelle 6) für 2 h bei RT benetzt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde das Streptavidin-FITC 1:300 mit Blocklösung verdünnt, wovon 300 µl in jede Vertiefung gegeben wurden und für 2 h bei RT im Dunkeln einwirkten.

Nach einem letzten Waschschrift wurden die Deckgläser mit PVA-DABCO auf einen Objektträger gebracht und unter Lichtausschluss getrocknet. PVA-DABCO verhinderte dabei ein frühzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenzmoleküle.

Name	Inhalt	Hersteller
Normal Donkey Serum	Esel-Serum	Jackson Immuno-Research, Suffolk, England
Triton X-100	T-Octylphenoxy-Polyethoxyethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtld.
Primärantikörper Rbt anti-CAIX	Polyklonale Ak gegen CAIX Herstellung im Kaninchen Als Immunogen diente eine C-terminale Sequenz des menschlichen CAIX-Proteins Verdünnung 1:5000	Novus Biologicals , Littleton, USA
Sekundärantikörper Dk anti rbt-bt	Biotinylierte Ak gegen Kaninchen Ak Herstellung im Esel Verdünnung 1:300	Jackson Immuno-Research, Suffolk, England
Kontroll-Antikörper Rb-IgG	Unspezifische Kaninchen-Ak Herstellung aus Kaninchen-Serum Verdünnung 1:500	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtld.
Fluorescein Streptavidin		Vector, Burlingame, USA
PVA-DABCO	12 g Glycerol 4,8 g Polyvinylalkohol 24 ml 0,2 M Tris 2,5% DABCO (Diazabicyclooctane)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtld.
Coverslips	Menzel Gläser	Thermo Scientific, Braunschweig, Dtld.
Objektträger		Engelbrecht, Edermünde, Dtld.

Tabelle 22: Material für die Immunfluoreszenzfärbung

## II.5. Bestrahlung und Chemotherapie der CAIX-Knockout-Zellen

Dieses Experiment untersuchte die Reaktionen der CAIX-Knockout-Zellen auf Bestrahlung bzw. in einem weiteren Ansatz auf Chemotherapie. Dabei wurden die CAIX-Knockout-Zellen unter glykolytischen und unter nicht-glykolytischen Bedingungen kultiviert. Die Kultivierung der Zellen mit einer Glucosekonzentration von 125 mmol/ml definierte die Glykolyse-Induktion. Außerdem erfolgten die Versuche sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen.

Das Verhalten der Zellen auf die jeweilige Behandlung wurde über 5 bzw. 6 Tage mikroskopisch dokumentiert. Um die Effizienz der Therapie zu quantifizieren, wurde ein Proliferationsassay angeschlossen, welcher die Anzahl der noch zur Zellteilung fähigen Zellen mittels Photometrie bestimmte.

Als weiteres Detektionsverfahren kam in einem neuen Ansatz die Annexin V-Färbung zur Anwendung, welche die apoptotischen Zellen mit fluoreszierenden Molekülen markierte.

### *II.5.1. Bestrahlungs-Ansatz*

Ionisierende Strahlung ruft die Entstehung freier Radikale in den betroffenen Geweben hervor. Diese sind hochtoxisch und führen zu DNA-Doppelstrangbrüchen, welche die Zelle in ihrer Proliferationsfähigkeit einschränken oder sogar ihre Apoptose auslösen können.

#### Transfektion

Als Erstes erfolgte die Transfektion der Zellen mit spezifischer CAIX-siRNA bzw. unspezifischer NSC-siRNA für den Kontrollansatz in zwei separaten 6-Loch-Mikrotiterplatten (s. II.4.1.).

#### Hypoxie/Normoxie

Am nächsten Morgen wurden die 5 mM- bzw. 125 mM-Glucose-Lösungen (s. Tab. 7) unter Vakuum entgast und für 3 h im Exsikkator stehen gelassen (s. II.3.1.).

In der Zwischenzeit wurde das Medium abgesaugt und jede Vertiefung einmal mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit 500 µl Trypsin vom Boden gelöst, in Röhrchen überführt und für 5 min mit 1200 rpm bei 15 °C zentrifugiert. Um die Zellzahl zu bestimmen mussten die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und während des Zählvorgangs erneut zentrifugiert werden.

Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium  $\varnothing$  FCS aufgenommen und 24x10000 Zellen pro Kondition in zwei Röhrchen pipettiert, damit später 10000 Zellen pro Vertiefung verteilt werden konnten.

Nach Ablauf der 3 h wurde die Werkbank ausgeschaltet, das Vakuum des Exsikkators gelöst, die 5 mM- bzw. 125 mM-Glucose-Lösung entnommen und für 20 min mit Prüfgas begast (s. II.3.1.).

Für den Versuch wurden zwei 96-Loch-Mikrotiterplatten verwendet.

Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen eines Röhrchens pro Kondition mit 3 ml der begasten 5 mM-Glucose-Lösung resuspendiert, das andere Röhrchen entsprechend mit 125 mM-Glucose-Lösung. Von diesen Zellsuspensionen wurden 100 µl in die entsprechende Vertiefung der Hypoxieplatte gegeben.

Als Leerwert für den sich anschließenden Proliferationsassay dienten 4 Vertiefungen pro Platte, die nur mit 5 mM- bzw. 125 mM-Glucose-Lösung gefüllt waren.

Nach dem Begasen der Platte mit Prüfgas für 10 min (s. Abb. 6 ) wurde sie sofort in die Hypoxiekammer gestellt und für weitere 20 min begast. Nach Ablauf der Zeit wurden die Schläuche abgeklemmt und die Kammer für 24 h in den Brutschrank gestellt.

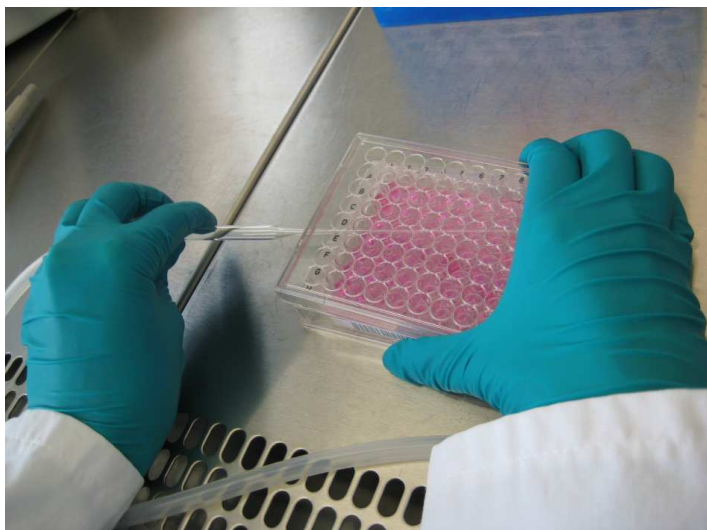


Abbildung 19: Dargestellt ist das Begasen der 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Prüfgas.

Die Arbeit mit der Normoxie-Platte erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Die Normoxie-Röhrchen wurden entsprechend der Hypoxie-Röhrchen behandelt, wobei jedoch nicht-entgaste 5 mM- bzw. 125 mM-Glucose-Lösung verwendet wurde. Nach Zugabe von 100 µl der Zellsuspensionen in die entsprechenden Vertiefungen blieb die Platte für 24 h im Brutschrank stehen.

Am nächsten Tag wurde die Platte aus der Hypoxiekammer entnommen, die Zellen beider Platten mikroskopisch begutachtet und ihr Aussehen dokumentiert.

### Bestrahlung

Nach 24 h Hypoxie bzw. Normoxie wurden die Zellen einmalig mit 10 Gy bestrahlt.

Anschließend erfolgte das Begasen der Hypoxieplatte für 5 min in der Hypoxiekammer. Diese wurde zusammen mit der Normoxieplatte für weitere 24 h in den Brutschrank gestellt.

Der Zustand der Zellen wurde 24 h, 48 h, 120 h sowie 144 h nach Bestrahlung kontrolliert und mittels mikroskopischer Aufnahmen dokumentiert.

### *II.5.2. Chemotherapie-Ansatz*

Temozolomid (TMZ) wird als alkylierendes Zytostatikum oral verabreicht und zählt momentan zur Standardtherapie des Glioblastoms. Es baut Alkylgruppen ( $C_nH_{2n+1}$ ) in die DNA ein, sodass es zu einer Veränderung der Erbsubstanz kommen kann. Die betroffene Zelle ist nicht mehr in der Lage sich zu teilen und kann überdies apoptotisch werden.

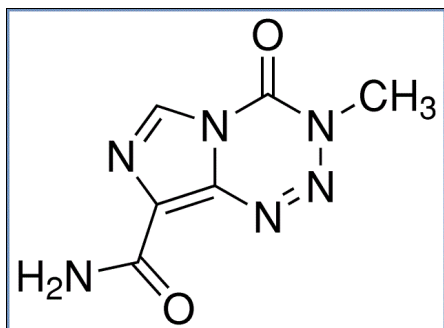
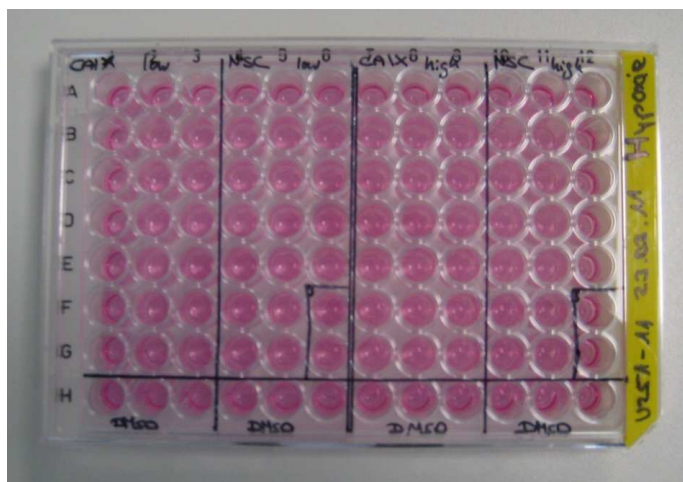


Abbildung 20: Gezeigt ist die Strukturformel des alkylierenden Zytostatikums Temozolomid.

Sowohl die Transfektion als auch die Hypoxie bzw. Normoxie der Zellen wurden in ähnlicher Weise durchgeführt (s. II.5.1. Bestrahlungs-Ansatz). Der Unterschied ist, dass zu den resuspendierten Zellen Temozolomid (50  $\mu\text{mol}$ ) gegeben wurde. Die Verdünnung des TMZ in der Zellsuspension betrug 1:200.

Die beiden Ansätze unterschieden sich außerdem hinsichtlich der Plattenbelegungen (s. Abb. 7), da der TMZ-Ansatz eine zusätzliche Kontrolle mitführte. Weil TMZ in DMSO gelöst ist, wurde eine Vertiefung pro Kondition und Platte mit DMSO (50  $\mu\text{mol}$ ) statt mit TMZ belegt. Die Verdünnung des DMSO in der Zellsuspension betrug 1:200.



*Abbildung 21: Dargestellt ist die Plattenbelegung der Hypoxieplatte (TMZ-Ansatz).*

Nach 24 h wurde die Platte aus der Hypoxiekammer entnommen.

Der Zustand der Zellen beider Platten wurde 24 h, 48 h, 120 h sowie 144 h nach TMZ-Gabe kontrolliert und durch mikroskopische Aufnahmen dokumentiert.

### *II.5.3. Proliferationsassay*

Am 6. Tag nach Bestrahlung bzw. Zytostatikum-Gabe wurde ein Proliferationsassay durchgeführt, um die noch zur Zellteilung fähigen Zellen zu quantifizieren. Es wurde das CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit verwendet. Das Prinzip beruht auf einem Tetrazolium-haltigen Substratgemisch, welches nur von proliferierenden, viablen Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt reduziert werden kann. Die Reaktion wird von NADH/NADPH-abhängigen Dehydrogenasen

der Atmungskette aktiver Zellen katalysiert. Der Farbumschlag wird mittels Photometrie bei 490 nm gemessen.

Zur Durchführung des Assays wurden 20 µl der AQ-Lösung in die Vertiefungen der Platten gegeben und im Brutschrank inkubiert. Die photometrische Messung der Vitalfärbung erfolgte nach 1h bzw. nach 2 h.

#### *II.5.4. Annexin V-Färbung*

In der frühen Phase der Apoptose finden Änderungen in der Zellmembran statt. Phosphatidylserin ist normalerweise an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert und wird bei apoptotischen Zellen auf die Außenseite verlagert. Durch diesen Mechanismus können sie von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden, sodass die Freisetzung zellulärer Proteasen verhindert wird.

Annexin-V ist mit einem fluoreszierenden Molekül konjugiert und bindet in Gegenwart von Calcium an Phosphatidylserine, sodass diese mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Annexin-V hat nur eine geringe Affinität zu anderen Phospholipiden. Um auszuschließen, dass Annexin-V an freie Phosphatidylserine bindet, wird mit Propidiumiodid (PI) gegengefärbt. PI ist ein DNA-Farbstoff, der permeabilisierte Membranen passieren kann und durch die Färbung des Zellkerns das Vorliegen einer Zelle verifiziert.

Um die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilen zu können, erfolgte ihre Kultivierung auf Deckgläsern.

Die Transfektion der Zellen mit siRNA CAIX bzw. NSC erfolgte wie üblich in einer 6-Loch-Mikrotiterplatte (s. II.4.1.).

Auch die Normoxie bzw. Hypoxie erfolgte gleichermaßen (s. II.5.1. Bestrahlungs-Ansatz), außer dass 24-Loch-Mikrotiterplatten mit zuvor verteilten Deckgläsern verwendet wurden. Auf jedes Deckglas wurden 30000 Zellen gegeben.

Die Reaktionen der Zellen auf die Bestrahlung (s. II.5.1.) bzw. auf die Chemotherapie (s. II.5.2.) wurden in zwei separaten Ansätzen untersucht und mikroskopisch dokumentiert.

Am 6. Tag nach Bestrahlung bzw. TMZ-Gabe wurde die Annexin-Färbung durchgeführt.



Es erfolgte zunächst die Herstellung des Inkubations-Puffers. Zu 1 ml dieses Puffers wurden 20 µl des Annexin-V-Fluos-Reagenz und 20 µl der Propidiumiodid-Stocklösung (50 µg/ml) gegeben. Jedes Deckglas wurde mit 120 µl dieser Lösung für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend mussten die Deckgläser mit PVA-DABCO auf Objektträger gebracht werden, um sie 1h später unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachten zu können.

Name	Inhalt	Hersteller
5 mM Glucose-Lösung	0,099 g Glucose in 100 ml Medium ø FCS	
125 mM Glucose-Lösung	2,477 g Glucose in 100 ml Medium ø FCS	
D(+)-Glucose Monohydrat		Merck, Darmstadt, Dtld.
Temozolomid	4-Methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trien-9-carboxamid	Sigma, Steinheim, Dtld.
DMSO	Dimethylsulfoxid	Carl Roth, Karlsruhe, Dtld.
Linear-Beschleuniger Primus		Siemens, Erlangen, Dtld
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	[3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Inner salt (MTS) Phenazine ethosulfate (PES)	Promega, Madison, USA
Annexin-V-Fluos		Roche, Mannheim, Dtld.
Propidiumiodid-Lösung		Sigma, Steinheim, Dtld.
Inkubations-Puffer	10 mM Hepes 140 mM Natriumchlorid 5 mM Calciumchlorid pH 7,4	Merck, Darmstadt, Dtld.
PVA-DABCO	12 g Glycerol 4,8 g Polyvinylalkohol 24 ml 0,2 M Tris 2,5% DABCO (Diazabicyclooctane)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtld.
Coverslips	Menzel Gläser	Thermo Scientific, Braunschweig, Dtld.
Objektträger		Engelbrecht, Edermünde, Dtld.

Tabelle 23: Materialien für die Bestrahlungs- bzw. Chemotherapie-Ansätze

## III. Ergebnisse

Das Glioblastom, der häufigste hirneigene, maligne Tumor Erwachsener, weist trotz multimodaler Therapiemöglichkeiten eine infauste Prognose auf. Da die Carboanhydrase IX in malignen Hirntumoren erheblich überexprimiert wird und die Induktion dieses Enzyms mit der Entwicklung eines aggressiveren Phänotyps einhergeht, könnte ihre Inhibition therapeutisches Potential besitzen. Die CAIX scheint das Tumorwachstum zu fördern, indem sie der Hypoxie-induzierten Azidose glykolytischer Glioblastomzellen durch die Alkalisierung des intrazellulären pHs entgegenwirkt.

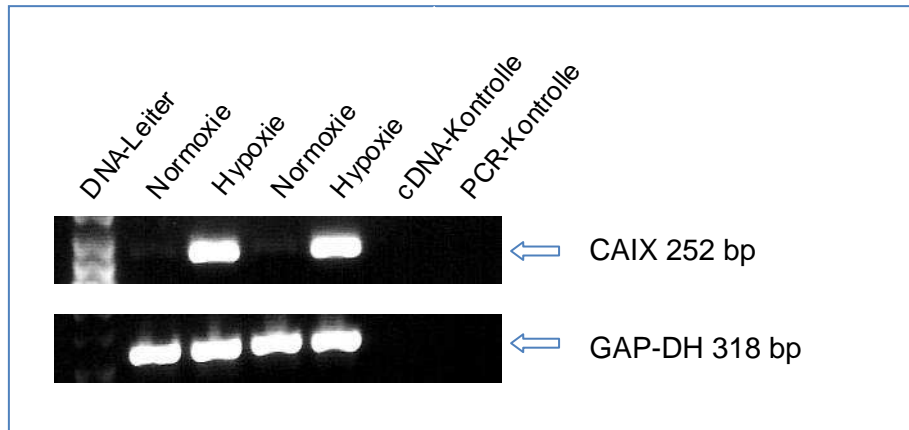
Um die funktionelle Rolle der CAIX zu untersuchen, sollte die CAIX-Expression mittels RNA-Interferenz inhibiert werden.

Das eigentliche Ziel dieser Arbeit war, das Ansprechen von U251-Glioblastomzellen auf Bestrahlung bzw. auf TMZ-Chemotherapie zu untersuchen, nachdem die CAIX-Expression durch siRNA supprimiert wurde.

### III.1. CAIX-Expression unter Hypoxie

Im Rahmen dieser Arbeit musste zunächst das CAIX-Expressionsverhalten von U251-Glioblastomzellen untersucht werden. Dazu wurden U251-Zellen für 24 h unter hypoxischen bzw. die Kontrollgruppe unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Die Atmosphäre in den hypoxischen Zellkulturflaschen bestand dabei aus 5 % Kohlendioxid und 95 % Stickstoff. Nach Ablauf der 24 h wurde RNA aus den Zellen isoliert, um die CAIX-Transkription mittels PCR molekularbiologisch zu ermitteln. Ferner wurde eine Western Blot-Analyse zur Identifizierung der CAIX-Protein Expression durchgeführt.

Mit den in II.3.4. (Tab. 8) aufgeführten Primerpaaren für CAIX sowie für GAP-DH als Kontrolle wurde zunächst eine konventionelle PCR mit U251-cDNA als Template durchgeführt. Das zu erwartende Amplikon besaß eine Länge von 252 Basenpaaren.



**Abbildung 22:** Gezeigt ist die mittels PCR amplifizierte CAIX-cDNA in U251-Glioblastomzellen nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Ethidiumbromidfärbung; Spur 1: DNA-Leiter (25-500bp), Spur 2+4: CAIX-cDNA unter normoxischen Bedingungen (Kontrolle), Spur 3+5: CAIX-cDNA unter hypoxischen Bedingungen, Spur 6: cDNA-Leerkontrolle, Spur 7: PCR-Leerkontrolle.

In den unter Hypoxie kultivierten U251-Zellen konnte CAIX-cDNA detektiert werden, wobei die unter Normoxie kultivierten Kontrollen nur ein sehr schwaches Signal lieferten. Die cDNA-Kontrolle sowie die PCR-Kontrolle waren negativ.

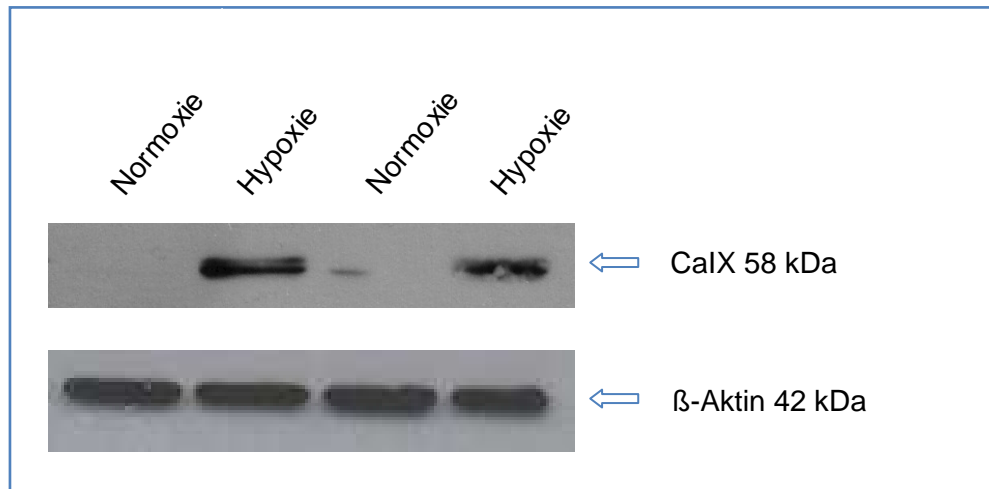
Wie in Abb.22 zu erkennen ist, existieren deutliche Unterschiede in der CAIX-Transkription hypoxischer und normoxischer Zellen.

Nach Amplifikation der cDNA war bei den hypoxischen Zellen jeweils in der zu erwartenden Höhe bei 252 bp eine Bande zu sehen, d.h. es konnte CAIX-kodierende mRNA nachgewiesen werden, wohingegen bei den unter Sauerstoff kultivierten Zellen nur ein sehr schwaches Signal detektierbar war. Die Ergebnisse konnten somit eine Hochregulation der CAIX-Transkription in Glioblastomzellen unter Hypoxie nachweisen.

Die entsprechende GAP-DH-Kontrolle zeigte jeweils eine Bande bei 318 bp und stellte somit sicher, dass von jeder Probe die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde und dass ein negatives Ergebnis nicht durch das Fehlen von cDNA entstanden war.

Da in den Kontrollspalten kein amplifiziertes Produkt sichtbar war, konnte davon ausgegangen werden, dass weder Verunreinigungen beim Umschreiben der RNA in cDNA, noch beim Amplifizieren der Proben stattfanden.

Um die Ergebnisse auch auf Proteinebene zu verifizieren, erfolgte eine Western Blot-Analyse.



**Abbildung 23:** Der dargestellte Western Blot zeigt die mittels polyklonaler Antikörper (gegen die C-terminale Sequenz des menschlichen CAIX-Proteins gerichtet) sichtbargemachten CAIX-Proteine in U251-Glioblastomzellen unter Hypoxie bzw. Normoxie.

Es konnte eine CAIX-Expression in den hypoxischen U251-Zellen detektiert werden, wohingegen bei den in Anwesenheit von Sauerstoff kultivierten Kontrollen nur eine sehr geringe CAIX-Konzentration nachweisbar war.

Als Ladungskontrolle wurden monoklonale Antikörper gegen β-Aktin eingesetzt. Da der Größenmarker (Proteinmarker) nur auf der Nitrocellulosemembran sichtbar ist, erfolgte die Größenzuordnung durch Vergleich der Membran mit dem Röntgenfilm.

Aus Abb. 23 wird ersichtlich, dass die Lysate hypoxischer Zellen jeweils eine Bande bei 58 kDa aufwiesen, wodurch die CAIX-Expression der hypoxischen Zellen verifiziert werden konnte. Die normoxischen Zellen zeigten hingegen nur ein sehr schwaches Signal.

Im Anschluss wurde als sogenannte Ladungskontrolle die Expression des in allen humanen Zellen gleich stark exprimierten β-Aktin Proteins untersucht. Die vorliegende Detektion einer Bande bei 42 kDa stellte somit sicher, dass von jeder Probe die gleiche Menge an Zelllysate eingesetzt wurde und dass ein negatives Ergebnis nicht durch das Fehlen von Protein entstanden war.

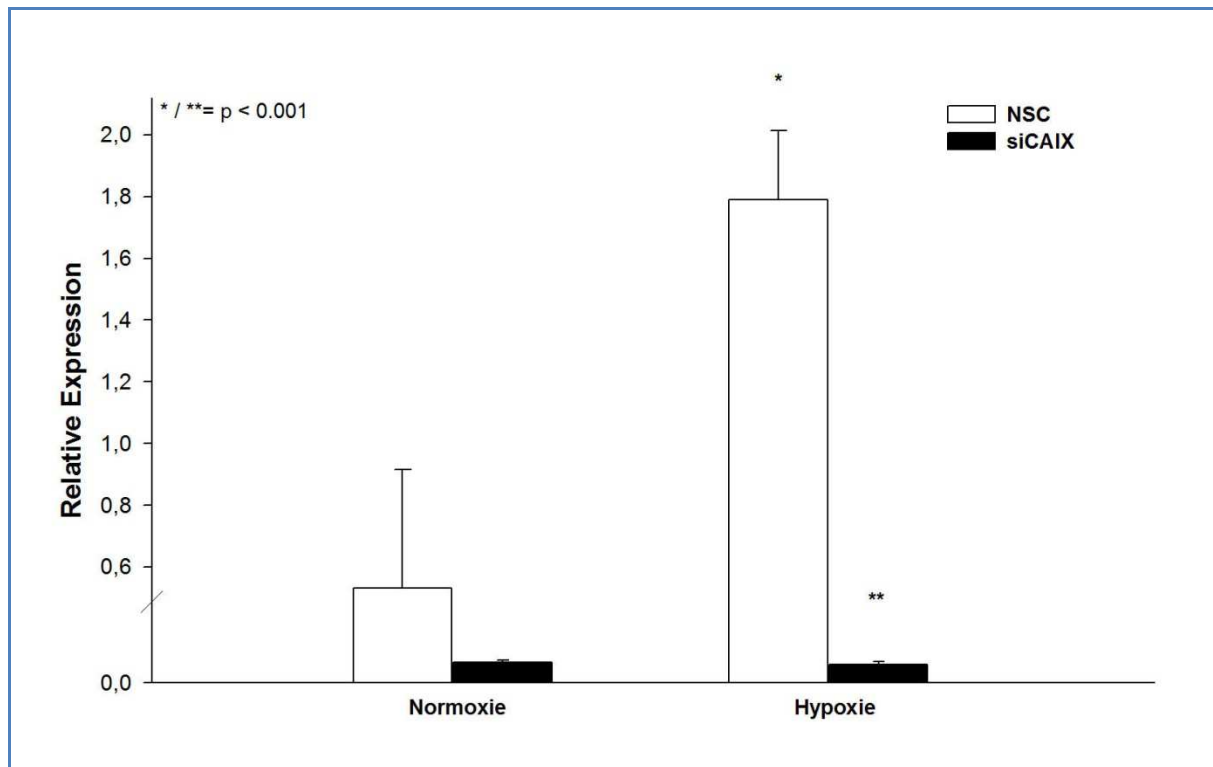
Es zeigte sich somit, dass Hypoxie, im Vergleich zur Anwesenheit von Sauerstoff, mit einer höheren CAIX-Akkumulation in U251-Glioblastomzellen einhergeht.

Die Ergebnisse des Western Blots konnten folglich die schon in der PCR-Analyse sichtbargemachten CAIX-Expressionen bestätigen.

## III.2. Inhibition der CAIX-Expression durch siRNA

Um die Ausschaltung des CAIX-Gens in Versuch III.3. zu gewährleisten, musste zuvor die Wirkung der siRNA überprüft werden. Dazu wurden synthetisch hergestellte siRNAs, komplementär zu einem Teil des CAIX-Gens (s. II.4.1. Tab.20), über Liposomen in die U251-Zellen eingebracht. Für den Kontrollansatz wurden U251-Zellen mit unspezifischen siRNAs NSC (Non Specific Control) transfiziert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen für 24 h unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen kultiviert, bevor die Untersuchung der CAIX-Expression mittels qPCR, Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung erfolgte.



**Abbildung 24:** Grafische Darstellung der relativen CAIX-Expressionen (y-Achse) der mit siRNA CAIX bzw. NSC transfizierten Zellen, unter Normoxie bzw. Hypoxie kultivierten U251-Zellen (x-Achse). Die Fehlerbalken repräsentieren  $\pm 1$  Standardabweichung.

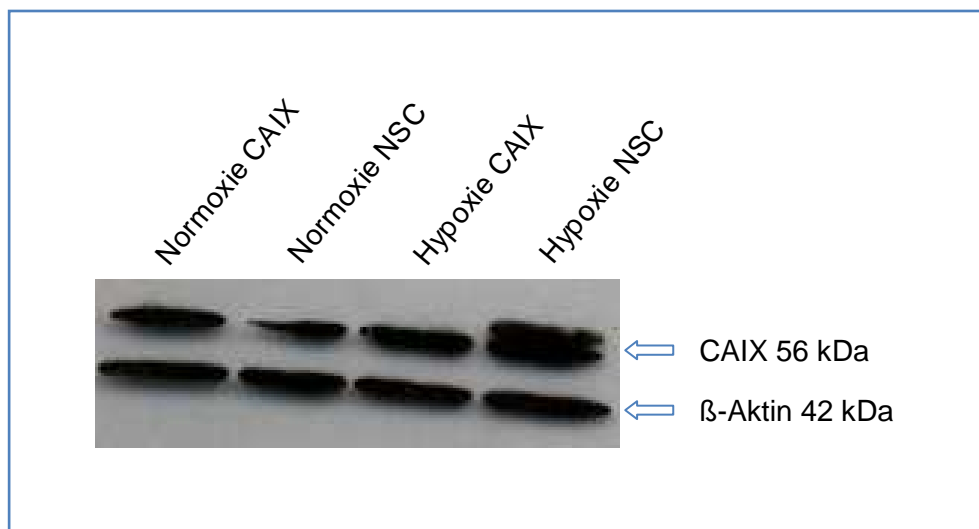
Die CAIX-Expression der mit siRNA CAIX behandelten Zellen unter Hypoxie war im Vergleich zur NSC-Kontrolle signifikant ( $**p < 0,001$ ) reduziert. Außerdem zeigte die statistische Analyse, dass die CAIX-mRNA-Konzentration der NSC-Kontrolle unter Hypoxie signifikant ( $*p < 0,001$ ) höher war als unter Normoxie.

In der qPCR zeigten die mit CAIX-spezifischer siRNA behandelte Zellen (im Weiteren als CAIX-Knockout-Zellen bezeichnet) unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Reduktion der CAIX-Transkriptmenge im Vergleich zu den mit

unspezifischer siRNA NSC behandelten Zellen (=NSC-Kontrolle), wohingegen dieses Phänomen unter normoxischen Bedingungen schwächer ausgeprägt war. Die unter Hypoxie kultivierten NSC-Zellen zeigten eine sehr hohe CAIX-mRNA-Konzentration, während die unter Sauerstoff kultivierten Kontrollansätze eine signifikant geringere mRNA-Menge lieferten.

Dieses Ergebnis bestätigte sowohl die starke Induktion der CAIX-Transkription in Glioblastomzellen unter Hypoxie als auch die erfolgreiche Suppression der CAIX-Expression durch RNA-Interferenz. Die Reduktion der CAIX-Transkription war dabei im Vergleich zur NSC-Kontrolle, unter Hypoxie sehr viel stärker ausgeprägt als unter Normoxie.

Um die Auswirkungen der RNA-Interferenz auf die CAIX-Expression in U251-Zellen auch auf Proteinebene sichtbar zu machen, wurde eine Western Blot-Analyse mit polyklonalen Antikörpern gegen die C-terminale Sequenz des CAIX-Proteins durchgeführt.



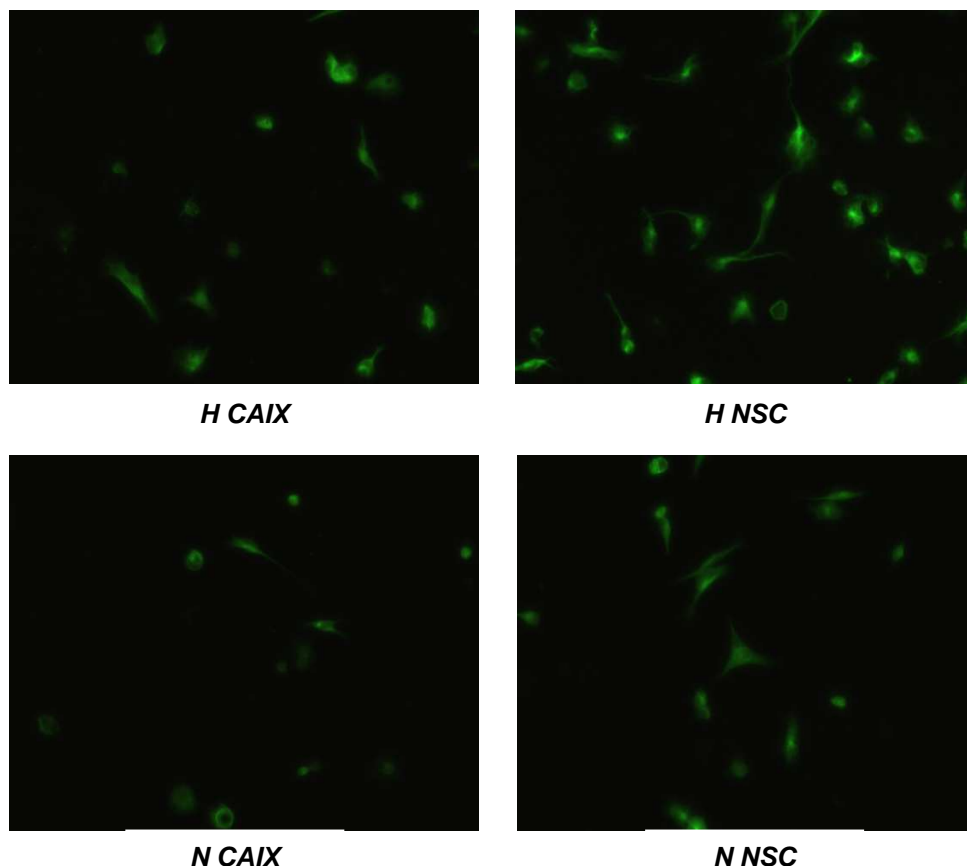
*Abbildung 25:* Gezeigt ist das Ergebnis einer Western Blot-Analyse der CAIX-Knockout-Zellen (CAIX) bzw. der NSC-Kontrollen (NSC) nach 24 h Normoxie bzw. Hypoxie. Es konnten CAIX-Expressionen sowohl in den NSC-Kontrollen als auch in den CAIX-Knockout-Zellen unter Normoxie und unter Hypoxie nachgewiesen werden. Die Spur der unter Hypoxie kultivierten NSC-Kontrollen zeigte sogar eine Doppelbande auf Höhe von 56/58 kDa. Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin wurden als Ladungskontrolle eingesetzt.

Wie aus Abb. 25 ersichtlich wird, konnten sowohl bei den CAIX-Knockout-Zellen als auch bei den NSC-Kontrollen CAIX-Banden auf der Höhe von 56 kDa detektiert werden. Der unter Hypoxie kultivierte Kontrollansatz wies sogar eine CAIX-

Doppelbande auf, womit, in Übereinstimmung mit den qPCR-Ergebnissen, die größte CAIX-Proteinmenge in den hypoxischen NSC-Zellen beobachtet und damit die starke CAIX-Expression in Glioblastomzellen unter hypoxischen Bedingungen bestätigt wurde. Auffällig ist jedoch, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen der qPCR, die CAIX-Knockout-Glioblastomzellen ebenfalls CAIX-Protein enthielten. Auch bei den unter Normoxie kultivierten Zellen konnte ein ähnlicher CAIX-Proteinspiegel nachgewiesen werden.

Die  $\beta$ -Aktin-Expressions-Analyse zeigte, dass von jeder Probe die gleiche Menge eingesetzt wurde und die vorliegenden Ergebnisse nicht auf einen unterschiedlichen CAIX-Gehalt der Zellen zurückzuführen sind.

Zur Analyse des Inhibitionseffekts auf die Expression sowie die Lokalisation der CAIX in Glioblastomzellen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen die C-terminale Sequenz des CAIX-Proteins angeschlossen.



**Abbildung 26:** Dargestellt sind ausgewählte Aufnahmen der CAIX-Immunfluoreszenzfärbung der CAIX-Knockout-Zellen (CAIX) sowie der NSC-Kontrollen (NSC) nach 24 h Normoxie (N) bzw. Hypoxie (H). Das Signal der hypoxischen CAIX-Knockout-Zellen war schwächer ausgeprägt als das der entsprechenden NSC-Zellen. Außerdem zeigte die CAIX-spezifische Immunfluoreszenzfärbung bei den hypoxischen NSC-Zellen ein membranäres Verteilungsmuster, wohingegen sie bei den CAIX-Knockout-Zellen eher nukleär lokalisiert war. Unter Normoxie waren die Unterschiede in den Signalstärken schwächer ausgeprägt. (Vergrößerung: 20x)

Das stärkste Signal wurde bei den zur CAIX-Expression fähigen NSC-Kontrollen unter Hypoxie beobachtet, wohingegen das Signal der CAIX-Knockout-Zellen unter Hypoxie viel schwächer ausgeprägt war. Auch die Signale der unter Normoxie kultivierten Zellen waren nur schwach detektierbar, wobei ein geringer Unterschied zwischen den CAIX-Knockout-Zellen und den NSC-Zellen vorhanden war. Der Unterschied in den Signalstärken nach Immunfluoreszenzfärbung zwischen CAIX-Knockout-Zellen und den NSC-Kontrollen nach 24 h Hypoxie zeigte, dass die Suppression der CAIX-Transkription sich ebenso auf Proteinebene widerspiegeln lässt, wodurch die Ergebnisse der qPCR und des Western Blots verifiziert werden konnten. Der sichtbare Inhibitionseffekt war auch in diesem Versuch unter Hypoxie stärker ausgeprägt als unter Normoxie. Außerdem fiel auf, dass die CAIX-Immunfluoreszenzfärbung der hypoxischen NSC-Kontrollen neben dem membranären Signal ein verstärktes intrazelluläres sowie nukleäres Signal lieferte. Das CAIX - Signal der unter Sauerstoff kultivierten Zellen sowie der hypoxischen CAIX-Knockout-Zellen zeigte ein diffuses membranäres Verteilungsmuster und nur eine schwache nukleäre Lokalisation.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte von einer erfolgreichen siRNA-vermittelten Inhibition der CAIX in U251-Glioblastomzellen für die folgenden Versuche ausgegangen werden.

### III.3. Bestrahlung/TMZ-Chemotherapie CAIX-defizitärer Glioblastomzellen

Das vorliegende Experiment untersuchte die Reaktionen CAIX-defizitärer Glioblastomzellen auf Bestrahlung bzw. in einem weiteren Ansatz auf TMZ-Chemotherapie.

Zur Inhibition der CAIX wurden die Zellen mit spezifischer CAIX-siRNA transfiziert (CAIX-Knockout-Zellen). Als Kontrollen dienten U251-Glioblastomzellen, die mit unspezifischer NSC-siRNA behandelt wurden (NSC-Kontrollen).

Um die *in vivo* anzutreffenden Umgebungsbedingungen von Hirntumoren auch in vorliegendem *in vitro* Experiment zu gewährleisten, wurden die transfizierten Zellen sowohl unter glykolytischen als auch unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Es



ergaben sich also folgende Konditionen: CAIX/NSC-Transfektion, niedrige (5 mM)/hohe (125 mM)/ Glucosekonzentration im Medium und Hypoxie/Normoxie.

Das Verhalten der Zellen auf die jeweilige Behandlung wurde über 5 bzw. 6 Tage mikroskopisch dokumentiert. Um die Effizienz der Therapie zu quantifizieren, wurde ein Proliferationsassay angeschlossen, welcher die Anzahl der noch zur Zellteilung fähigen Zellen mittels Photometrie bestimmte.

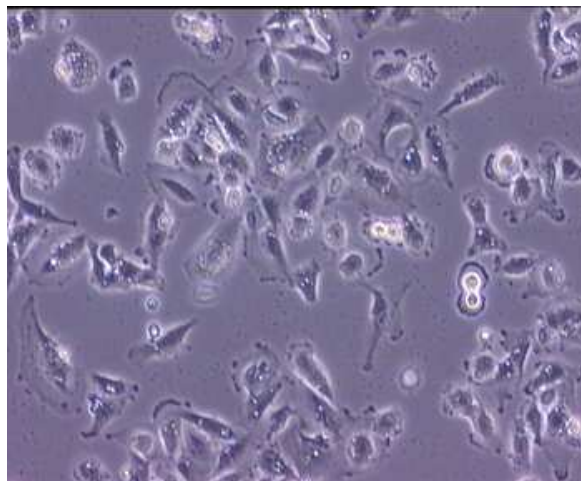
Als weiteres Detektionsverfahren kam in einem neuen Ansatz die Annexin-Färbung zur Anwendung, welche die apoptotischen Zellen mit fluoreszierenden Molekülen markierte.

### *III.3.1. Bestrahlungs-Versuch*

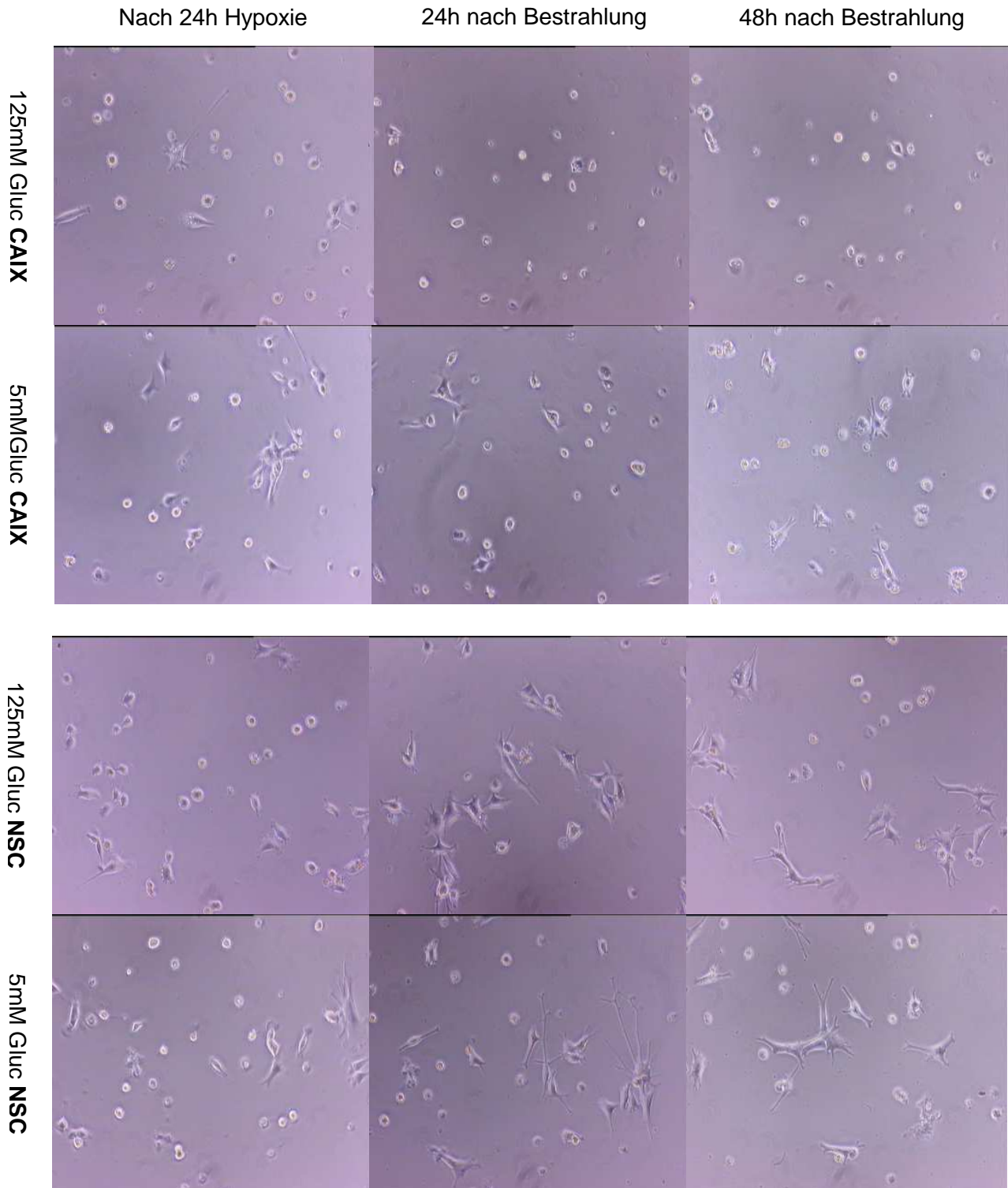
Die Bestrahlung der transfizierten U251-Zellen erfolgte nach 24 h Hypoxie bzw. Normoxie einmalig mit 10 Gy. Nach der Strahlentherapie wurden die Glioblastomzellen erneut für 24 h unter Hypoxie bzw. unter Normoxie kultiviert.

#### III.3.1.1. Morphologie der transfizierten U251-Zellen nach Bestrahlung

Der Zustand der Zellen wurde 24 h, 48 h, 120 h sowie 144 h nach Bestrahlung kontrolliert und mittels mikroskopischer Aufnahmen dokumentiert.

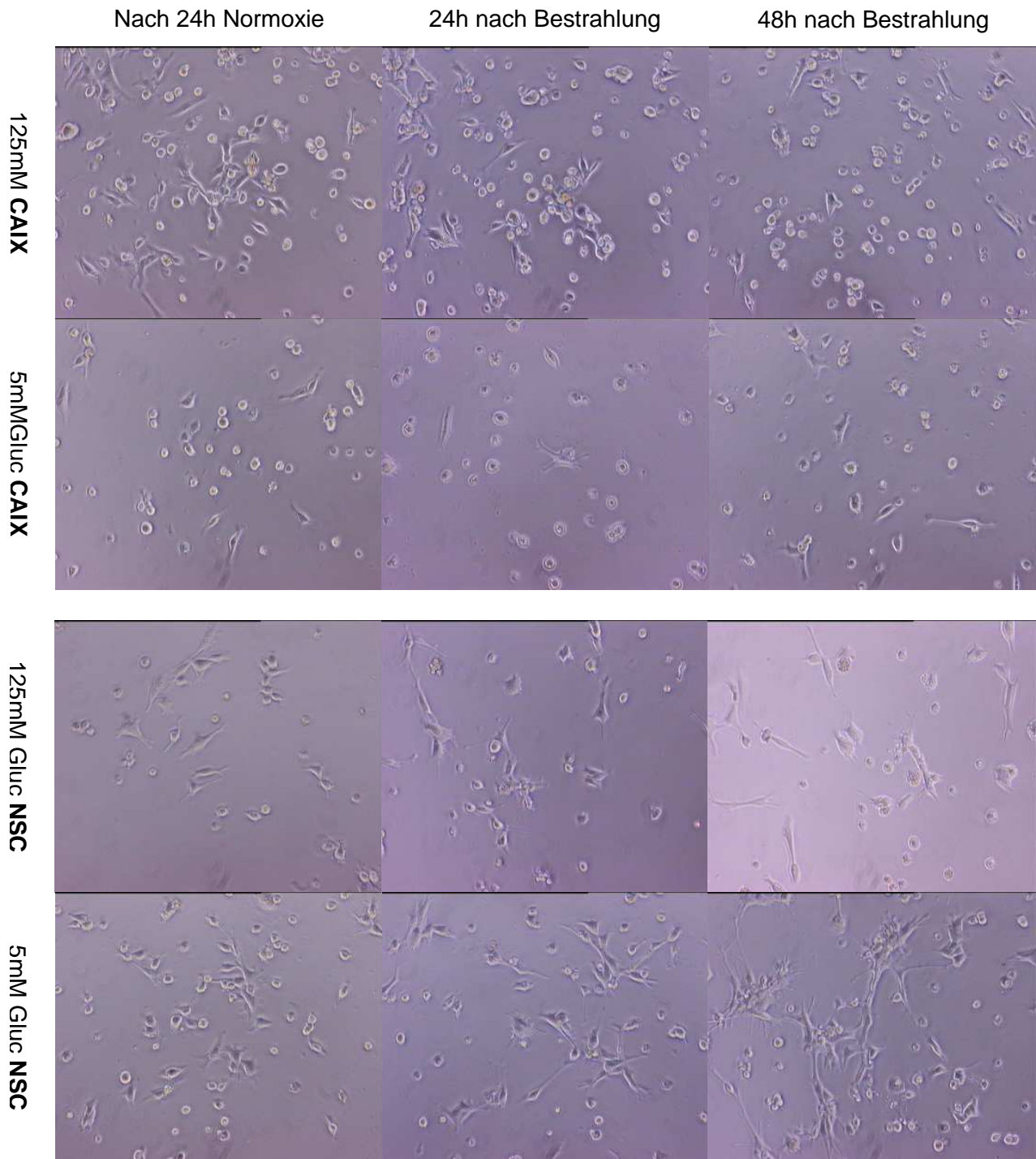


Nach 24 h Transfektion

**Hypoxie:**

**Abbildung 27:** Gezeigt sind ausgewählte phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der bestrahlten, unter hypoxischen Bedingungen kultivierten U251-Glioblastomzellen. Gluc steht für Glucose, CAIX steht für CAIX-Knockout-Zellen und NSC bezeichnet die Kontrollgruppe, d.h. die mit unspezifischer siRNA behandelten U251-Zellen. Die 24 h bzw. 48 h nach Bestrahlung erstellten Aufnahmen repräsentieren den Kulturverlauf.

Im Laufe der Beobachtung verloren die CAIX-Knockout-Zellen ihre für Glioblastomzellen typische sternförmig verzweigte Gestalt, nahmen eine Kugelform an, wiesen nur noch vereinzelt Ausläufer auf, wobei die nicht-glykolytischen Zellen noch mehr Zellfortsätze bildeten als die glykolytischen Zellen, und zeigten immer mehr Einschlusskörperchen. Die NSC-Kontrollen zeigten sich während des Verlaufs morphologisch vitaler. (Vergrößerung: 10x)

**Normoxie:**

**Abbildung 28:** Gezeigt sind ausgewählte phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der bestrahlten, in Anwesenheit von Sauerstoff kultivierten U251-Glioblastomzellen. Gluc steht für Glucose, CAIX steht für CAIX-Knockout-Zellen und NSC bezeichnet die Kontrollgruppe, d.h. die mit unspezifischer siRNA behandelten U251-Zellen. Die 24 h bzw. 48 h nach Bestrahlung erstellten Aufnahmen repräsentieren den Kulturverlauf. Auch unter Normoxie bildeten die NSC-Kontrollen mehr Ausläufer als die CAIX-Knockout-Zellen, der Unterschied war jedoch schwächer ausgeprägt als unter Hypoxie. (Vergrößerung: 10x)

Wie aus Abb. 27 hervorgeht, konnten Unterschiede im mikroskopischen Aussehen zwischen CAIX-Knockout-Zellen und den Kontrollansätzen festgestellt werden.

Unter Hypoxie verloren die CAIX-Knockout-Zellen im Laufe der Beobachtung ihre für Glioblastomzellen typische sternförmig verzweigte Gestalt, nahmen eine Kugelform an, wiesen nur noch vereinzelt Ausläufer auf, wobei die nicht-glykolytischen Zellen noch mehr Zellfortsätze bildeten als die glykolytischen Zellen, und zeigten immer mehr Einschlusskörperchen. Außerdem lösten sich einige Zellen sogar vom Boden der 96-Loch-Mikrotiterplatte ab, auf dem sie adhärent wuchsen. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte eine vermehrte Ausbildung von Zellfortsätzen. Zudem blieb die Dichte der NSC-Zellen annähernd konstant, da sich die Ablösung der Zellen vom Boden nur selten ereignete. Ein wesentlicher Unterschied zwischen hohem und niedrigem Glucosemedium wurde bei der Kontrollgruppe nicht beobachtet.

Die unter Normoxie behandelten Zellen zeigten ebenfalls Unterschiede in ihrem Aussehen. Obwohl im Verlauf der Beobachtung die Zellen der Kontrollgruppen mehr Ausläufer bildeten als die CAIX-Knockout-Zellen, war der Unterschied nicht so ausgeprägt, wie unter hypoxischen Bedingungen.

Im Vergleich bildeten die normoxisch kultivierten, CAIX-defizitären U251-Zellen insgesamt mehr Zellfortsätze als unter hypoxischen Bedingungen.

Die NSC-Kontrollen sahen außerdem unter Normoxie morphologisch weniger viabel aus als unter Hypoxie.

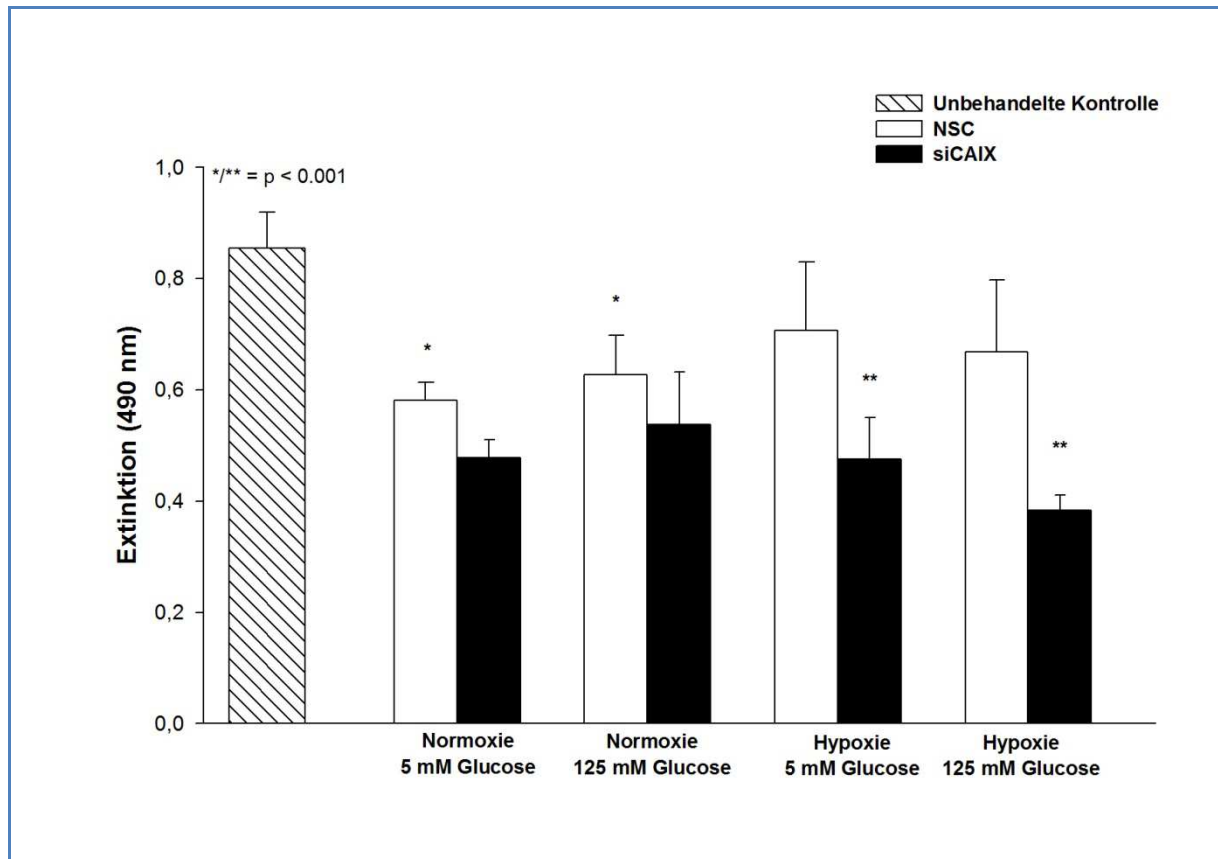
Die Veränderung der Zellmorphologie von hypoxischen CAIX-Knockout-Zellen, im Vergleich zu den sehr viel vitaler aussehenden Kontrollgruppen, lässt auf eine stärkere zelluläre Schädigung der CAIX-defizitären Glioblastomzellen unter Bestrahlung schließen, wobei die glykolytischen Zellen sensibler auf die CAIX-Inaktivierung reagieren als die in niedrigem Glucosemedium kultivierten Zellen.

Der Morphologie nach zu urteilen, stellte sich also heraus, dass die Stilllegung des CAIX-Gens in hypoxischen Glioblastomzellen die zelluläre Toxizität der Bestrahlung zu erhöhen scheint.

### III.3.1.2. Proliferationsassay

Um die noch zur Zellteilung fähigen Zellen zu quantifizieren, wurde am 6. Tag nach Bestrahlung ein Proliferationsassay mit dem CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit angeschlossen.

Die photometrische Messung der Vitalfärbung erfolgte 1 h bzw. 2 h nach Zugabe von 20 µl der AQ-Lösung.



**Abbildung 29:** Grafische Darstellung der am 6. Tag nach Bestrahlung mittels AQ bestimmten Proliferationsraten (y-Achse) der CAIX-Knockout-Zellen (siCAIX) bzw. der NSC-Kontrollen (NSC), die unter beiden Konditionen (Normoxie/Hypoxie) sowie mit beiden Glucosekonzentrationen (5 mM/125 mM) kultiviert wurden (x-Achse). Die unbehandelte Kontrolle repräsentiert die Proliferationsrate von U251-Zellen, die weder transfiziert noch bestrahlt wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren  $\pm 1$  Standardabweichung. Unter Hypoxie kam es bei den CAIX-Knockout-Zellen zu einer signifikanten ( $**p < 0,001$ ) Reduktion der Proliferationsrate im Vergleich zu den NSC-Kontrollen, wobei der Unterschied unter glykolytischen Bedingungen größer ausfiel als unter nicht-glykolytischen Bedingungen. Außerdem wurde deutlich, dass die Proliferationsraten der unter Normoxie kultivierten NSC-Kontrollen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert waren, wohingegen diese Reduktion unter Hypoxie nicht signifikant war. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich zudem, dass Bestrahlung per se einen signifikanten Effekt ( $*p < 0,001$ ) auf die Proliferationsraten aller Glioblastomzellen hatte.

Die Grafik verdeutlicht, dass die CAIX-Knockout-Glioblastomzellen eine niedrigere Proliferationsrate aufwiesen als die entsprechenden NSC-Kontrollen. Unter Hypoxie kam es bei den CAIX-Knockout-Zellen zu einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Proliferationsraten im Vergleich zu den NSC-Kontrollen, wobei der Unterschied unter glykolytischen Bedingungen größer war als unter nicht-glykolytischen Bedingungen. Außerdem zeigte sich, dass die Proliferationsraten der unter Normoxie kultivierten NSC-Kontrollen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant verringert waren, wohingegen diese Reduktion unter Hypoxie nicht signifikant war.

In Übereinstimmung mit dem morphologischen Aussehen der Zellen demonstrierte der Proliferationsassay somit, dass die hypoxischen CAIX-defizitären Glioblastomzellen nach Bestrahlung das niedrigste Zellwachstum aufwiesen, sodass das Ausschalten des CAIX-Gens in hypoxischen Glioblastomzellen die zelluläre Toxizität der Bestrahlung signifikant zu erhöhen scheint.

#### III.3.1.3. Annexin-V-Färbung

Um die apoptotischen U251-Zellen zu bestimmen, wurden die während des Apoptosevorgangs typischerweise an die Außenseite der Plasmamembran verlagerten Phosphatidylserine mittels Annexin-V-Färbung am 6. Tag nach Bestrahlung sichtbar gemacht.

Es waren deutliche Unterschiede in der Annexin-V-Färbung erkennbar (s. III.3.2.3.) Das stärkste Signal und somit die höchste Apoptoserate wurde bei den CAIX-Knockout-Zellen unter Hypoxie beobachtet, wobei die glykolytischen Zellen ein intensiveres Signal zeigten als die nicht-glykolytischen. Das schwache Signal der entsprechenden NSC-Kontrolle demonstrierte, dass sich in dieser Gruppe weniger Zellen im Apoptosevorgang befanden.

Unter Normoxie zeigten ebenfalls die CAIX-Knockout-Zellen eine höhere Apoptoserate als die NSC-Kontrolle, wobei jedoch die Intensität der Färbung insgesamt schwächer ausfiel als unter Hypoxie. Das Signal der glykolytischen Zellen war dabei etwas stärker als das der nicht-glykolytischen Zellen.



Infolgedessen konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des CAIX-Gens Glioblastomzellen nach Bestrahlung öfter in die Apoptose treibt als die zur CAIX-Expression fähigen NSC-Kontrollen, wobei dieses Phänomen unter Hypoxie und glykolytischen Bedingungen stärker ausgeprägt ist als unter Normoxie und nicht-glykolytischen Bedingungen.

Die Versuchsergebnisse zeigen folglich, dass das Stilllegen des CAIX-Gens, die Proliferationsrate von hypoxischen U251-Zellen nach Bestrahlung signifikant reduziert sowie ihre Apoptoserate erhöht, sodass die CAIX-Inhibition das Ansprechen von hypoxischen Glioblastomzellen auf Bestrahlung *in vitro* signifikant zu verbessern scheint.

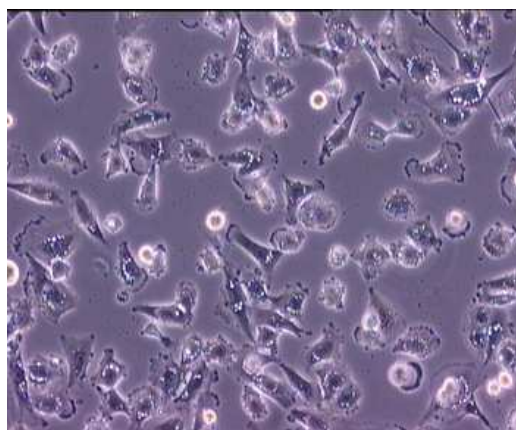
### *III.3.2. Chemotherapie-Versuch*

24 h nach Transfektion der Zellen mit spezifischer CAIX-siRNA bzw. NSC-siRNA als Kontrolle, wurde das Chemotherapeutikum Temozolomid (50  $\mu\text{mol}$ ) zu den Zellen gegeben. Da TMZ in DMSO gelöst ist, wurde eine zusätzliche DMSO-Kontrolle mitgeführt.

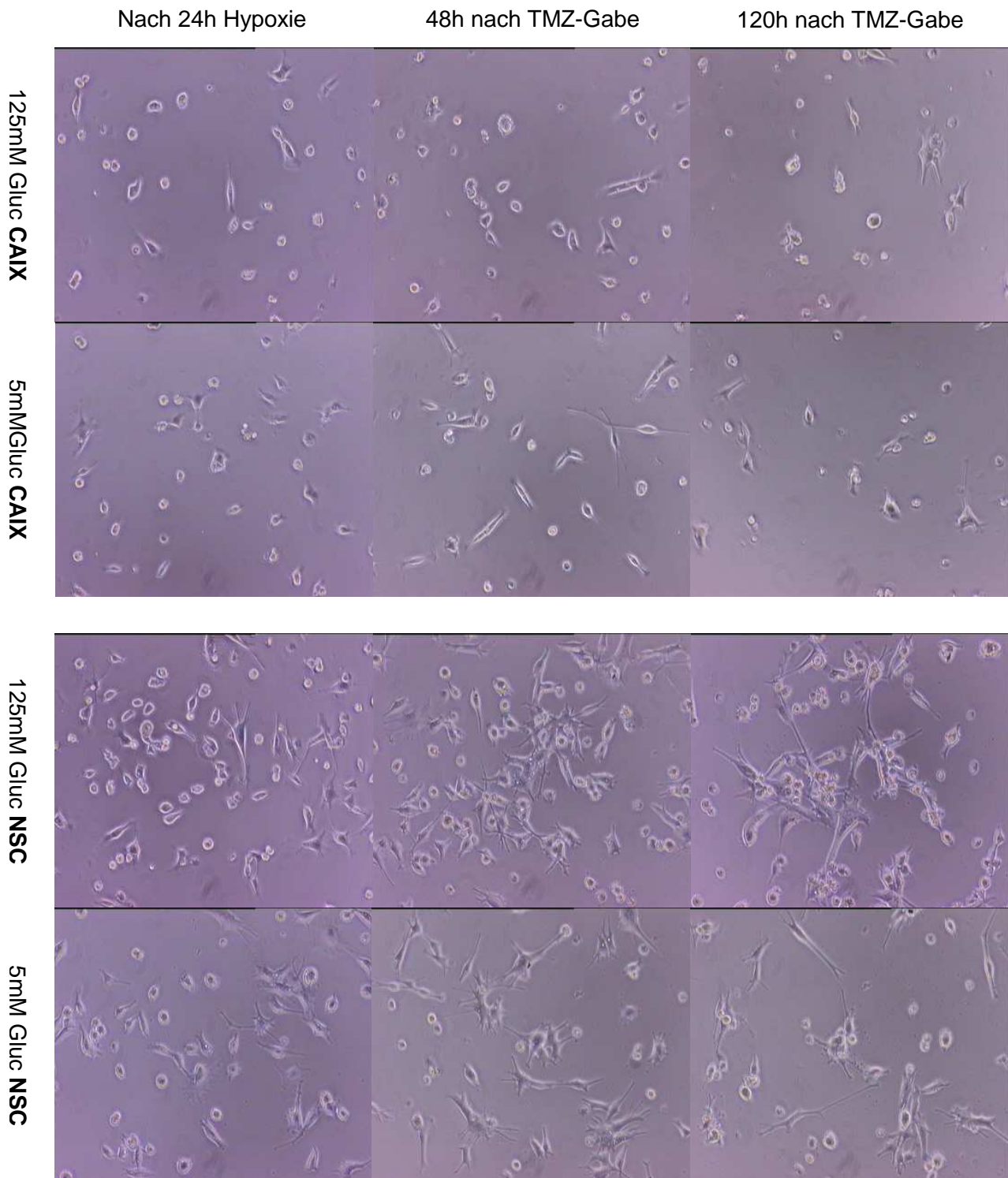
Anschließend wurden die Zellen für 24 h unter Hypoxie bzw. Normoxie kultiviert.

#### III.3.2.1. Morphologie der transfizierten U251-Zellen nach TMZ-Gabe

Der Zustand der Zellen wurde 24 h, 48 h, 120 h sowie 144 h nach TMZ-Gabe kontrolliert und mittels mikroskopischer Aufnahmen dokumentiert.

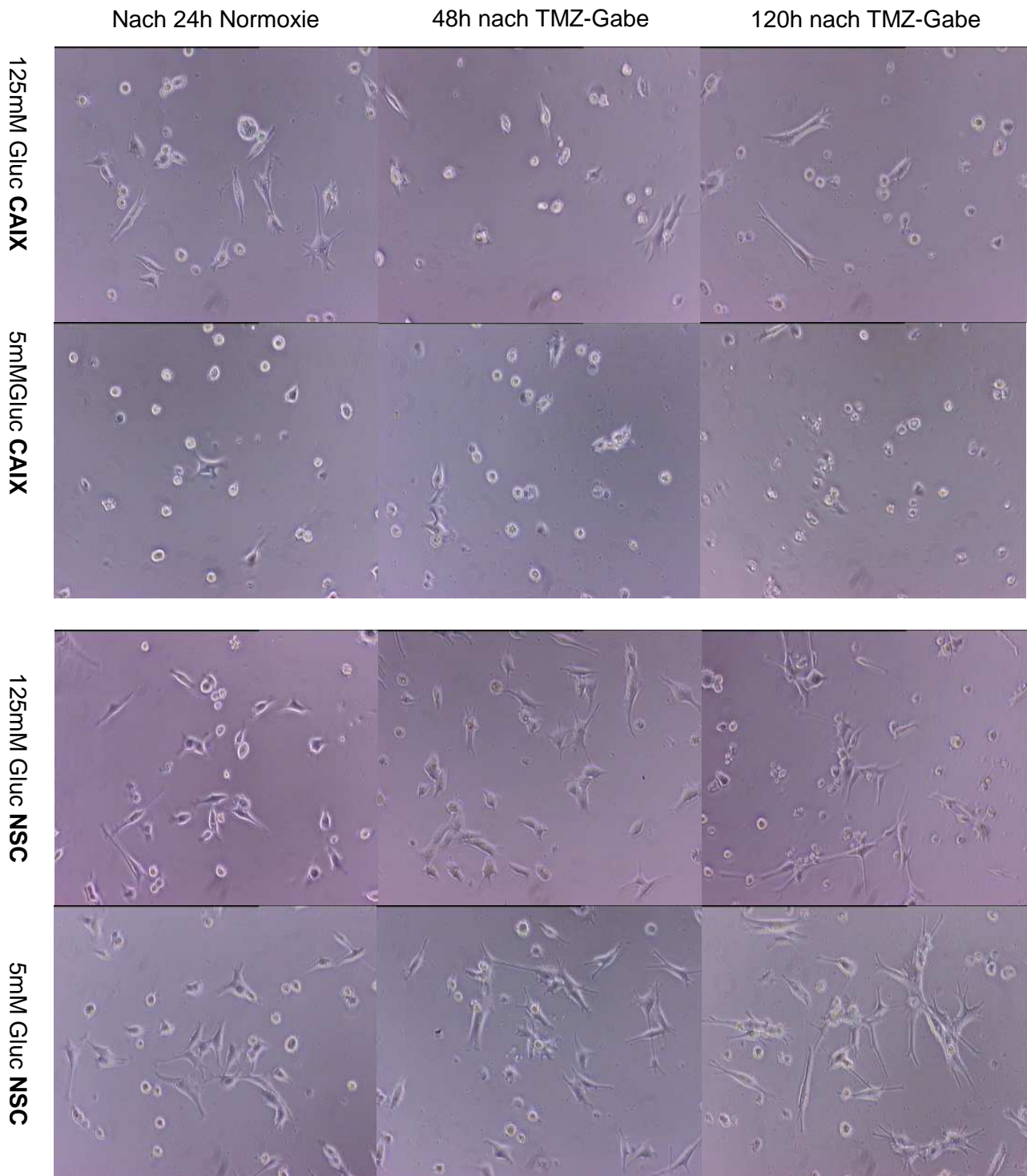


Nach 24 h Transfektion

**Hypoxie:**

**Abbildung 32:** Gezeigt sind ausgewählte phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der TMZ-behandelten U251-Glioblastomzellen unter Hypoxie. Gluc steht für Glucose, CAIX steht für CAIX-Knockout-Zellen und NSC bezeichnet die Kontrollgruppe, d.h. die mit unspezifischer siRNA behandelten U251-Zellen. Die 48 h bzw. 120 h nach TMZ-Gabe erstellten Aufnahmen repräsentieren den Kulturverlauf. Im Laufe der Beobachtung verloren CAIX-Knockout-Zellen ihre für Glioblastomzellen typische sternförmig verzweigte Gestalt, nahmen eine Kugelform an, wiesen nur noch vereinzelt Ausläufer auf, wobei die nicht-glykolytischen Zellen noch mehr Zellfortsätze bildeten als die glykolytischen Zellen. Die NSC-Kontrollen zeigten sich während des Verlaufs morphologisch vitaler. (Vergrößerung: 10x)



**Normoxie:**

**Abbildung 33:** Gezeigt sind ausgewählte phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der TMZ-behandelten U251-Glioblastomzellen unter Hypoxie. Gluc steht für Glucose, CAIX steht für CAIX-Knockout-Zellen und NSC bezeichnet die Kontrollgruppe, d.h. die mit unspezifischer siRNA behandelten U251-Zellen. Die 48 h bzw. 120 h nach TMZ-Gabe erstellten Aufnahmen repräsentieren den Kulturverlauf.

Auch unter Normoxie bildeten die NSC-Kontrollen mehr Ausläufer als die CAIX-Knockout-Zellen, der Unterschied war jedoch schwächer ausgeprägt als unter Hypoxie. (Vergrößerung: 10x)

Auch nach TMZ-Behandlung konnten im Laufe der Beobachtung Unterschiede in der Morphologie von CAIX-Knockout-Zellen und der zur CAIX-Expression fähigen Kontrollansätze festgestellt werden. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den CAIX-Knockout-Zellen und den NSC-Kontrollen stärker ausgeprägt als beim Bestrahlungsversuch.

Die CAIX-Knockout-Zellen verloren unter Hypoxie ihre für Glioblastomzellen typische sternförmig verzweigte Gestalt, nahmen eine Kugelform an, wiesen nur noch vereinzelt Ausläufer auf, wobei die nicht-glykolytischen Zellen noch mehr Zellfortsätze bildeten als die glykolytischen Zellen, und zeigten immer mehr Einschlusskörperchen. Außerdem lösten sich einige Zellen sogar vom Boden der 96-Loch-Mikrotiterplatte, auf dem sie adhärent wuchsen, ab. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte eine vermehrte Ausbildung von Zellfortsätzen. Zudem blieb die Dichte der NSC-Zellen annähernd konstant, da die Ablösung der Zellen vom Boden sich nur selten ereignete. Ein wesentlicher Unterschied zwischen hohem und niedrigem Glucosemedium wurde bei der Kontrollgruppe nicht beobachtet.

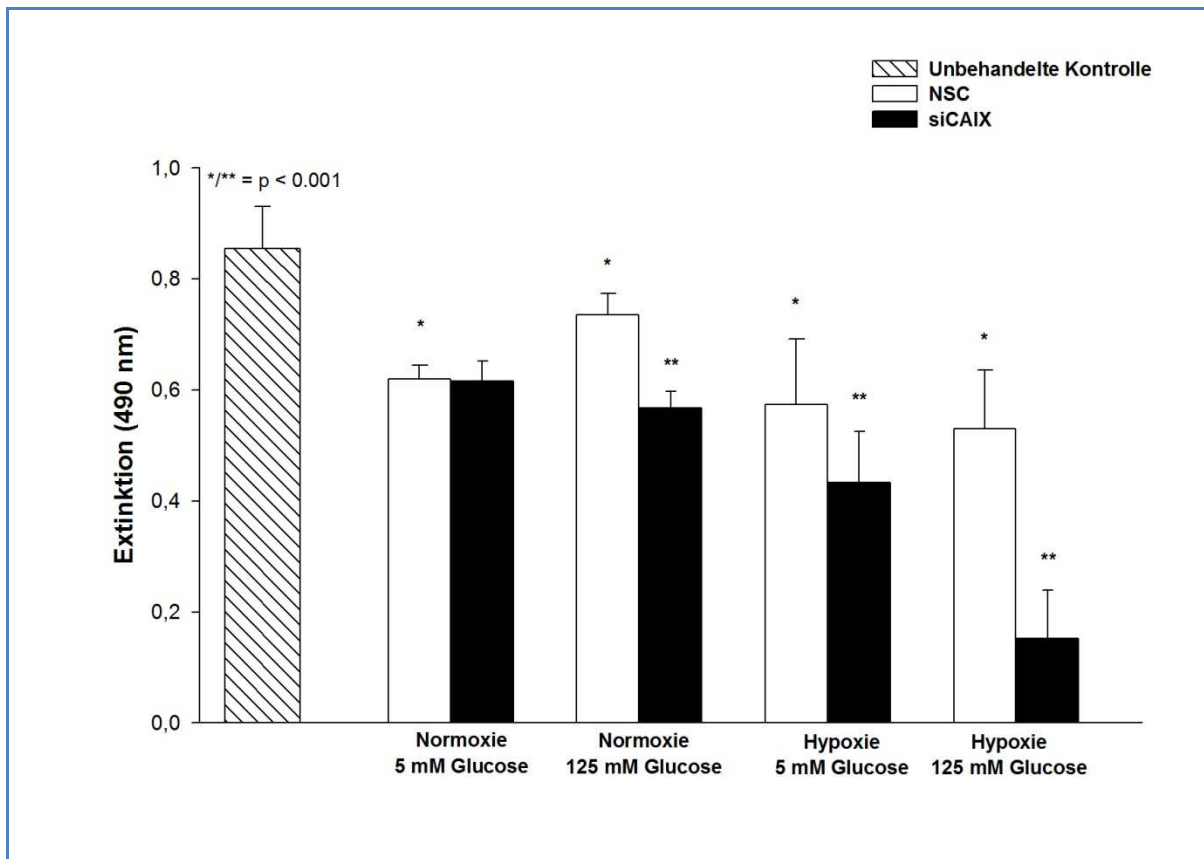
Die unter Normoxie behandelten Zellen zeigten ebenfalls Unterschiede in ihrem Aussehen. Obwohl im Verlauf der Beobachtung die Zellen der Kontrollgruppen mehr Ausläufer bildeten als die mit spezifischer CAIX-siRNA behandelten glykolytischen Zellen, war der Unterschied nicht so ausgeprägt wie unter hypoxischen Bedingungen. Abgesehen davon fiel auf, dass die NSC-Kontrollen in Anwesenheit von Sauerstoff weniger Zellfortsätze bildeten als unter Hypoxie.

Der Zellmorphologie nach zu urteilen, scheint folglich die Inhibition der CAIX-Expression das Ansprechen von hypoxischen Glioblastomzellen auf TMZ-Chemotherapie zu verbessern, wobei dieses Phänomen unter glykolytischen Bedingungen stärker ausgeprägt ist als unter nicht-glykolytischen.

Außerdem zeigte sich im Vergleich, dass das Ausschalten des CAIX-Gens die Sensitivität von Glioblastomzellen gegenüber TMZ-Chemotherapie stärker zu erhöhen scheint als ihr Ansprechen auf Bestrahlung.

### III.3.2.2. Proliferationsassay

Der Proliferationsassay erfolgte am 6. Tag nach TMZ-Gabe.



**Abbildung 34:** Grafische Darstellung der am 6. Tag nach TMZ-Gabe gemessenen Proliferationsraten (y-Achse) der CAIX-Knockout-Zellen (siCAIX) bzw. der NSC-Kontrollen (NSC), die unter beiden Konditionen (Normoxie/Hypoxie) sowie mit beiden Glucosekonzentrationen (5 mM/125 mM) kultiviert wurden (x-Achse). Die unbehandelte Kontrolle repräsentiert die Proliferationsrate von U251-Zellen, die weder transfiziert wurden noch TMZ-Chemotherapie erhielten. Die Fehlerbalken repräsentieren  $\pm 1$  Standardabweichung. Unter Hypoxie kam es bei den CAIX-Knockout-Zellen zu einer signifikanten ( $**p < 0,001$ ) Reduktion der Proliferationsraten im Vergleich zu den NSC-Kontrollen, wobei der Unterschied unter glykolytischen Bedingungen sehr viel größer ausfiel als unter nicht-glykolytischen Bedingungen. Außerdem waren die Proliferationsraten der NSC-Kontrollen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie signifikant reduziert ( $*p < 0,001$ ).

Die Grafik verdeutlicht, dass die CAIX-defizitären Glioblastomzellen eine niedrigere Proliferationsrate aufwiesen als die entsprechenden NSC-Kontrollen. Unter Hypoxie kam es bei den CAIX-Knockout-Zellen zu einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduktion der Proliferationsraten im Vergleich zu den NSC-Kontrollen, wobei der Unterschied unter glykolytischen Bedingungen sehr viel größer ausfiel als unter nicht-glykolytischen Bedingungen. Außerdem konnte auch unter Normoxie eine signifikante Reduktion des Zellwachstums von glykolytischen CAIX-Knockout-Zellen beobachtet werden.

Ferner zeigte sich, dass die mit unspezifischer siRNA behandelten NSC-Kontrollen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie eine niedrigere Proliferationsrate aufwiesen als die unbehandelte Kontrolle.

Zusätzlich fiel auf, dass die Reduktion der Proliferationsrate (im Vergleich zur NSC-Kontrolle) von unter Hypoxie kultivierten, glykolytischen, CAIX-defizitären Glioblastomzellen nach TMZ-Chemotherapie größer war als nach Bestrahlung.

In Übereinstimmung mit dem morphologischen Aussehen der Zellen, demonstrierte der Proliferationsassay somit, dass die hypoxischen CAIX-defizitären Glioblastomzellen nach TMZ-Chemotherapie das niedrigste Zellwachstum aufwiesen, sodass das Ausschalten des CAIX-Gens die zelluläre Toxizität des Temozolomids *in vitro* signifikant zu erhöhen scheint, wobei dieser Effekt unter TMZ-Chemotherapie stärker ausgeprägt war als unter Bestrahlung.

#### III.3.2.3. Annexin-V-Färbung

Die Annexin-V-Färbung erfolgte am 6. Tag nach TMZ-Gabe.

Das stärkste Signal und somit die höchste Apoptoserate wurde bei den CAIX-Knockout-Zellen unter Hypoxie beobachtet, wobei die glykolytischen Zellen ein stärkeres Signal zeigten als die nicht-glykolytischen. Im Vergleich zur Annexin-V-Färbung des Bestrahlungsversuchs war die Intensität der Färbung stärker, sodass folglich nach TMZ-Gabe mehr CAIX-Knockout-Zellen apoptotisch wurden.

Das schwache Signal der hypoxischen NSC-Kontrollen demonstrierte, dass sich in dieser Gruppe weniger Zellen im Apoptosevorgang befanden.

Unter Normoxie zeigten ebenfalls die CAIX-Knockout-Zellen eine höhere Apoptoserate als die NSC-Kontrolle, wobei jedoch die Intensität der Färbung insgesamt schwächer ausfiel als unter Hypoxie.

Infolgedessen konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des CAIX-Gens Glioblastomzellen nach TMZ-Chemotherapie öfter in die Apoptose treibt als die zur CAIX-Expression fähigen NSC-Kontrollen, wobei dieses Phänomen unter Hypoxie und glykolytischen Bedingungen stärker ausgeprägt war als unter Normoxie und nicht-glykolytischen Bedingungen. Im Vergleich zum Bestrahlungsversuch stellte sich heraus, dass die TMZ-Chemotherapie eine höhere Apoptoserate der CAIX-defizitären Glioblastomzellen zur Folge hat.

Die Versuchsergebnisse zeigten somit, dass die Inaktivierung der Carboanhydrase IX, die Proliferationsrate von U251-Zellen nach Bestrahlung sowie nach TMZ-Chemotherapie reduziert sowie ihre Apoptoserate erhöht, sodass die CAIX-Inhibition das Ansprechen von Glioblastomzellen auf diese Therapien *in vitro* zu verbessern scheint, wobei der Effekt unter TMZ-Chemotherapie stärker ausgeprägt war als unter Bestrahlung. Außerdem zeigte sich, dass eine optimale Wirkung der CAIX-Inhibition hypoxische sowie glykolytische Umgebungsbedingungen der Glioblastomzellen erfordert.

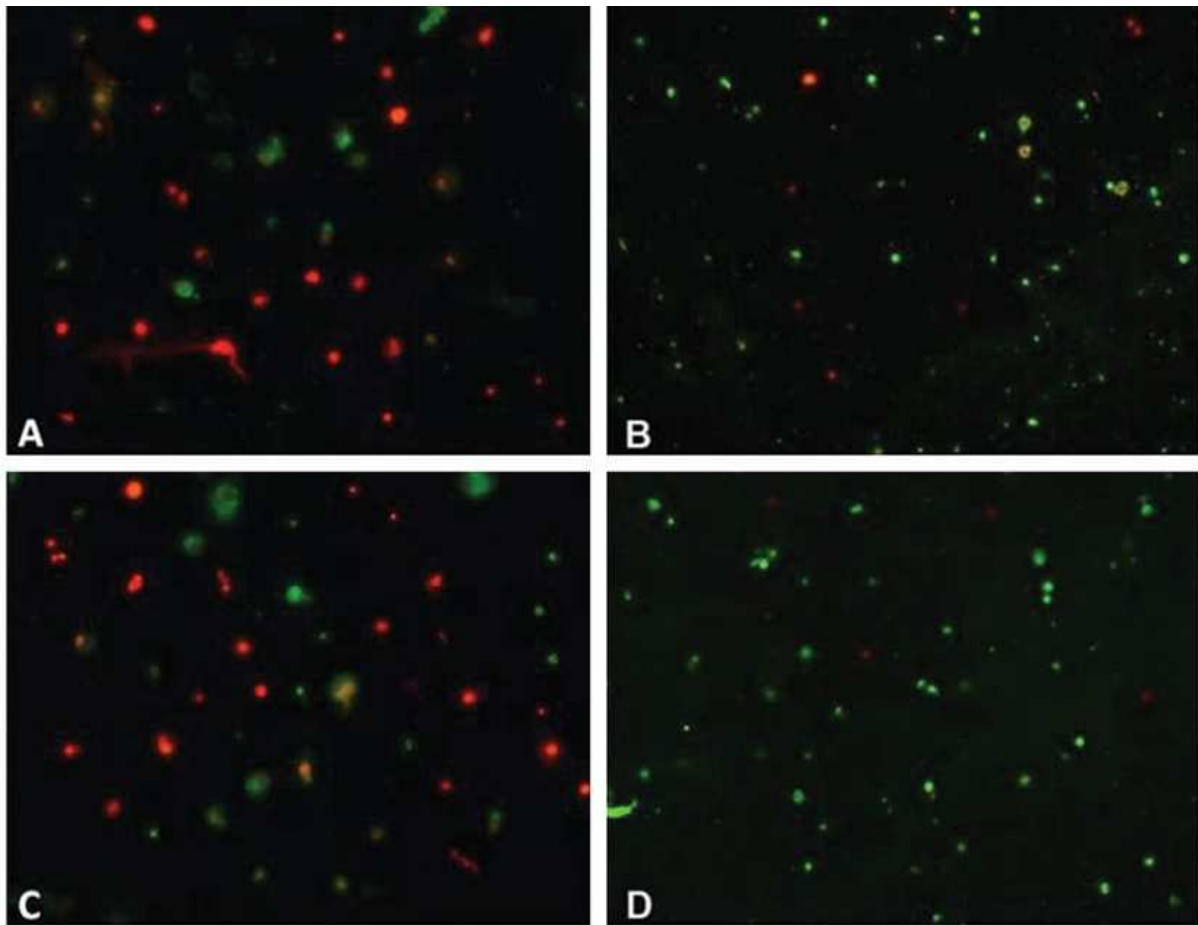


Abbildung 34: Dargestellt sind ausgewählte Aufnahmen der Annexin-V-Färbungen (grün). Die Zellen wurden mit Propidiumjodid (rot) gegengefärbt. Es konnte eine erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen nach CAIX-Knockout unter glykolytischen Bedingungen sowohl nach Bestrahlung (B) als auch nach TMZ-Chemotherapie (D) im Vergleich zu den NSC-Kontrollen (A und C) detektiert werden. (Vergrößerung: 200x)

## IV. Diskussion

### IV.1. Motivation und Ziele der Studie

Das Glioblastom ist der häufigste hirneigene maligne Tumor des Erwachsenen und führt trotz multimodaler Therapiemöglichkeiten innerhalb weniger Monate zum Tod des Patienten (Stupp, Mason et al. 2005). Solange eine kurative Therapie nicht existiert, bleiben die Verlängerung des progressionsfreien Überlebens sowie die Verbesserung der Lebensqualität Ziele der klinischen Forschung.

Bisher konnte die Literatur eine erhöhte Expression der Carboanhydrase IX in malignen Hirntumoren, besonders in Glioblastomen, nachweisen (Proescholdt, Mayer et al. 2005). Sie ist sowohl in die extra- als auch intrazelluläre pH-Regulation von Tumorzellen involviert (Swietach, Patiar et al. 2009) und fördert die Entwicklung zu einem aggressiveren Phänotyp (Pastorek, Pastorekova et al. 1994; Martinez-Zaguilan, Seftor et al. 1996; Stubbs, McSheehy et al. 2000; Svastova, Zilka et al. 2003; Proescholdt, Mayer et al. 2005), welcher durch eine erhöhte Resistenz gegenüber adjuvanter Therapie (Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2001; Potter and Harris 2003; Span, Bussink et al. 2003; Sathornsumetee, Cao et al. 2008) sowie durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet ist (Yoo, Sohn et al. ; Chia, Wykoff et al. 2001; Giatromanolaki, Koukourakis et al. 2001; Haapasalo, Nordfors et al. 2006).

Die Beeinträchtigung der intra - und extrazellulären pH-Regulation als therapeutische Strategie gründet auf der tumoralen Stoffwechselsituation, die noch von keiner konventionellen Tumorthherapie ausgenutzt wurde und derzeit im Mittelpunkt intensiver Forschungen steht (Neri and Supuran).

Um die Säureresistenz, die den Tumorzellen einen progressionsfördernden Selektionsvorteil verschafft (Gatenby and Gillies 2004), aufzuheben, muss die Therapie an pH-regulierenden Enzymen ansetzen. Eines dieser pH-regulierenden Enzyme fällt durch sein Vorkommen in Tumoren und seine Abwesenheit in normalen Geweben auf: die Carboanhydrase IX (Liao, Aurelio et al. 1997; Pastorekova, Parkkila et al. 1997; Saarnio, Parkkila et al. 1998; Liao and Stanbridge 2000; Wykoff, Beasley et al. 2000; Ivanov, Liao et al. 2001; Proescholdt, Mayer et al. 2005).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde folgende Arbeitshypothese (s. I.2.) postuliert:

„Die *in vitro* Inhibition der CAIX führt zur Beeinträchtigung der tumoralen pH-Regulation und folglich zu einem erhöhten zellulären Stress, welcher Glioblastomzellen empfindlicher auf Bestrahlung und TMZ-Chemotherapie reagieren lässt.“

Die Ergebnisauswertung (s. III) der verschiedenen Versuche ergab signifikante Resultate, welche nun nachfolgend kritisch betrachtet, interpretiert und in den Kontext des aktuellen Wissenstandes eingeordnet werden.

## IV.2. CAIX-Expression unter Hypoxie

Die Ergebnisse des Hypoxieversuchs zeigen, dass die CAIX-Transkription (III.1., Abb.1) sowie -Translation (III.2., Abb.2) in U251-Glioblastomzellen unter Hypoxie hochreguliert werden und bestätigen die bereits bekannte Hypoxie-induzierte CAIX-Expression (Wykoff, Beasley et al. 2000; Ivanov, Liao et al. 2001; Olive, Aquino-Parsons et al. 2001; Stewart, Talks et al. 2002) in Glioblastomzellen.

Das Auftreten hypoxischer Areale resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffzufuhr und -verbrauch (Vaupel, Kelleher et al. 2001) und ist eine charakteristische Eigenschaft maligner Gliome (Valk, Mathis et al. 1992; Collingridge, Piepmeier et al. 1999).

Durch eine gesteigerte Glykolyse halten Glioblastomzellen ihre Energiegewinnung selbst unter hypoxischen Bedingungen aufrecht (Di Chiro, DeLaPaz et al. 1982; Imaaya 1994).

Dieser anaerobe Metabolismus hat eine vermehrte Produktion von Säuren, v.a. Laktat und CO<sub>2</sub>, zur Folge und erfordert eine strenge pH-Regulation der Tumorzellen (Harris 2002; Helmlinger, Sckell et al. 2002; Raghunand, Gatenby et al. 2003). Angesichts dessen, erscheint es plausibel, dass die Carboanhydrase IX als pH-regulierendes Enzym unter Hypoxie dramatisch überexprimiert wird.

Die Aktivierung des CAIX-Gens erfolgt dabei durch die Bindung des Hypoxie-regulierten Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  an die dem CAIX-Promotor direkt vorgeschalteten HREs (Wykoff, Beasley et al. 2000).

Durch die Extrusion von Säuren in Form von CO<sub>2</sub> sowie die extrazelluläre Bildung von Bikarbonat mit anschließendem Transport nach intrazellulär in Kooperation mit Bikarbonattransportern trägt sie zur Neutralisierung des Zellinneren und somit zur

Aufrechterhaltung fundamentaler zellulärer Funktionen bei (Swietach, Patiar et al. 2009). Die CAIX-Aktivität führt durch den Export von Säuren zu einer extrazellulären Azidose, welche ebenfalls progressionsfördernd auf Tumorzellen wirkt (Svastova, Hulikova et al. 2004; Swietach, Vaughan-Jones et al. 2007; Swietach, Patiar et al. 2009).

Die CAIX hält somit einen pH-Gradienten zwischen extra-und intrazellulär aufrecht und scheint maßgeblich an der Säureresistenz von Tumorzellen beteiligt zu sein.

Das Ausmaß der durch die insuffiziente Angiogenese entstehenden intratumoralen Hypoxie und somit auch die CAIX-Akkumulation gehen mit einer gesteigerten Invasivität, einem erhöhten Metastasierungspotential, der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemo-, Strahlen- und antiangiogener Therapie sowie einer schlechteren Prognose einher (Brizel, Scully et al. 1996; Birner, Schindl et al. 2000; Aebersold, Burri et al. 2001; Hockel and Vaupel 2001; Bos, van der Groep et al. 2003; Pennacchietti, Michieli et al. 2003; Jensen 2009).

Obwohl auf eine geringe Konfluenz der Zellen geachtet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es durch das bevorzugte Übereinanderwachsen der U251-Zellen ebenfalls zu einer Zelldichte-induzierten CAIX-Aktivierung gekommen ist (Zavada, Zavadova et al. 1993; Pastorek, Pastorekova et al. 1994; Kaluz, Kaluzova et al. 2002; Svastova, Hulikova et al. 2004). Letzteres kann eine Erklärung für das schwache CAIX-Signal der unter Normoxie kultivierten Zellen darstellen. Außerdem ist heute bekannt, dass die CAIX eine hohe posttranslationale Stabilität besitzt (Pastorek, Pastorekova et al. 1994; Rafajova, Zatovicova et al. 2004).

Mit einer Halbwertszeit von 38 h, unabhängig von der Dauer der vorangegangenen Hypoxie, kann die Akkumulation der CAIX somit Ausdruck einer aktuellen als auch einer zurückliegenden Geninduktion sein. Somit ist möglich, dass die für 24 h unter Normoxie bzw. Hypoxie kultivierten Zellen vor Versuchsbeginn aufgrund einer hohen Konfluenz oder ausgeprägtem Zellcrowding bereits hypoxisch waren und die Zeitspanne von 24 h nicht ausreichend war, um eine auf die letzten 24 h beschränkte Expressionsanalyse der Zellen zu erhalten. Es gilt zu eruieren, ob eine Verlängerung der Hypoxiedauer einer Verfälschung der Ergebnisse durch die hohe posttranslationale Stabilität der CAIX, entgegenwirken kann.

Dennoch stammten die Zellen aus derselben Zellkulturflasche und wurden erst ein Tag vor der Hypoxie auf zwei Kulturflaschen verteilt, sodass die Zellen vor



Versuchsbeginn eine ähnliche Konfluenz aufwiesen und somit in ihrer CAIX-Expression vergleichbar waren. Demnach konnte gezeigt werden, dass die CAIX-Expression in hypoxischen Glioblastomzellen im Vergleich zur Kultivierung unter Normoxie erhöht ist und sich sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene widerspiegeln lässt.

In der quantitativen PCR-Analyse des folgenden Versuchs zeigte sich, dass der Unterschied in der CAIX-Expression zwischen normoxischen und hypoxischen Glioblastomzellen signifikant ist.

### IV.3. Inhibition der CAIX-Expression durch siRNA

Um eine spezifische CAIX-Inhibition zu erreichen, entschieden wir uns für eine posttranskriptionale Hemmung der CAIX-Expression durch RNA-Interferenz.

Die bisher verfügbaren selektiven Sulfonamide zielen auf die extrazellulär gelegenen tumorassoziierten CA-Isoformen (IX und XII) ab (Supuran) und hätten keine isolierte Inhibition der CAIX erlaubt. Die RNA-Interferenz machte es hingegen möglich, die Funktion der CAIX auf molekularer Ebene isoliert zu betrachten.

Die quantitative PCR-Analyse (III.2., Abb.3) zeigte eine signifikante Unterdrückung der CAIX-Expression in Glioblastomzellen unter Hypoxie durch RNA-Interferenz.

Der Vergleich normoxischer und hypoxischer NSC-Kontrollen zeigte außerdem, dass die CAIX-Expression in Glioblastomzellen unter Hypoxie signifikant hochreguliert ist und bestätigte somit die Ergebnisse des vorangegangenen Versuchs.

Da die CAIX v.a. unter Hypoxie überexprimiert wird, konnte unter Normoxie keine signifikante CAIX-Suppression beobachtet werden.

Die CAIX-Expression in den CAIX-Knockout-Zellen war jedoch auch unter Hypoxie nicht vollständig unterdrückbar. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass nicht alle Zellen mit siRNA transfiziert wurden, wodurch sich in der CAIX-Knockout-Gruppe auch zur CAIX-Expression fähige Glioblastomzellen befanden. Da die Transfektion der Zellen einheitlich erfolgte, war das Vorkommen untransfizierter Zellen in der Hypoxie- und in der Normoxie-Gruppe ungefähr gleich und verfälschte die Ergebnisse folglich nicht.

Angesichts der Ergebnisse kann von einer erfolgreichen Suppression der CAIX-mRNA-Konzentration durch RNA-Interferenz unter Hypoxie ausgegangen werden.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass der gesamte Proteinsyntheseapparat durch die Transfektion mit siRNA CAIX beeinträchtigt wurde, was u.a. eine geringe CAIX-mRNA-Konzentration in den CAIX-Knockout-Zellen zur Folge haben könnte. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass die mit siRNA NSC transfizierten Zellen eine hohe Konzentration an CAIX-mRNA enthielten, obwohl sie denselben Transfektionsstress erfuhren.

Mittels Western-Blot-Analyse (III.2., Abb.4) sollte die Suppression der CAIX-Expression auf Proteinebene verifiziert werden. Die Ergebnisse standen jedoch im Widerspruch zur qPCR-Analyse. Nicht nur die NSC-Kontrollen enthielten CAIX-Protein, sondern auch die CAIX-Knockout-Zellen wiesen eine CAIX-Akkumulation auf. Dagegen konnte in Übereinstimmung mit der qPCR bei der hypoxischen NSC-Kontrolle eine CAIX-Doppelbande detektiert werden, welche eine besonders hohe Proteinkonzentration repräsentiert. Die widersprüchlichen Ergebnisse gründen sehr wahrscheinlich auf der hohen posttranslationalen Stabilität der CAIX. Wie schon in IV.2. erläutert wurde, verhindert die Halbwertszeit der CAIX von 38 h, dass die Western-Blot-Analyse die CAIX-Translation der letzten 24 h Stunden wiedergibt. Somit scheint schon vor der Transfektion eine CAIX-Induktion, beispielsweise durch eine hohe Konfluenz oder Zellcrowding, erfolgt zu sein, sodass nach 24 h Hypoxie oder Normoxie immernoch CAIX-Protein in den CAIX-Knockout-Zellen detektierbar war, obwohl die CAIX-Expression durch die RNA-Interferenz weitgehend geblockt wurde. Auch unter Normoxie wiesen die NSC-Zellen CAIX-Protein auf, sodass sehr wahrscheinlich schon vor Versuchsbeginn eine CAIX-Aktivierung erfolgt sein muss. Die HREs sind dem Transkriptionsstart direkt vorgeschaltet und führen zu einer besonders strengen transkriptionalen Regulation des CAIX-Gens (Lal, Peters et al. 2001), sodass eine geringe Hypoxie ausreicht, um die CAIX-Transkription zu induzieren.

Da die Zellen der verschiedenen Konditionen erst am Tag der Transfektion auf verschiedene Platten verteilt wurden, geht aus der Western-Blot-Analyse trotzdem hervor, dass die CAIX-Expression in Glioblastomzellen unter Hypoxie dramatisch hochreguliert ist.

Der Abstand von 48 h zwischen Transfektion und Proteinisolierung scheint demnach nicht ausreichend zu sein, um die Inhibition der CAIX-Expression auf Proteinebene

zu verifizieren. Die Akkumulation des CAIX-Proteins kann somit Ausdruck einer aktuellen als auch einer zurückliegenden Geninduktion sein.

Neben der CAIX-Induktion durch eine hohe Konfluenz der Zellen oder Zellcrowding muss ebenfalls eine CAIX-Aktivierung durch Transfektionsstress in Betracht gezogen werden. Das Einbringen von siRNA ins Zellinnere stellt für die Glioblastomzellen eine Stresssituation dar, die die pH-Homöostase der Zellen beeinflusst und möglicherweise ebenfalls eine CAIX-Expression induzieren kann. Ferner können auch Hypoxie-unabhängige Induktionswege eine Erklärung für die CAIX-Aktivierung vor Versuchsbeginn oder während der Normoxie darstellen. Neben der Induktion durch eine erhöhte Zelldichte (Kaluz, Kaluzova et al. 2002) führen beispielsweise auch Mutationen im p53-Gen, eine der häufigsten genetischen Alterationen in malignen Gliomen (Maher, Furnari et al. 2001), zu einer CAIX-Aktivierung (Kaluzova, Pastorekova et al. 2000; Kaluzova, Kaluz et al. 2004). Ferner wird ebenfalls der Einfluss epigenetischer Modifikationen diskutiert. Es wurde beobachtet, dass die CAIX-Aktivierung in Nierenzellkarzinomen mit einer Hypomethylierung der Promotorregion einher geht (Cho, Grabmaier et al. 2000).

Die anschließende Immunfluoreszenzfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen die C-terminale Sequenz des CAIX-Proteins (zytoplasmatischer Anteil) konnte die Ergebnisse des Western Blots bestätigen.

Die CAIX-Färbung der NSC-Zellen fiel unter Hypoxie insgesamt um einiges intensiver aus als die Färbung der unter Normoxie kultivierten Zellen sowie der CAIX-Knockout-Zellen und bestätigte insofern die erfolgreiche Suppression der CAIX-Expression durch RNA-Interferenz.

Dennoch konnte sowohl unter Normoxie als auch bei den hypoxischen CAIX-Knockout-Zellen CAIX-Protein detektiert werden. Da auch in diesem Versuch die Zeit zwischen Transfektion und Färbung nur 48 h betrug, verhinderte sehr wahrscheinlich die lange Halbwertszeit der CAIX den Nachweis einer vollständigen CAIX-Suppression. Der Unterschied zwischen hypoxischen CAIX-Knockout-Zellen und NSC-Zellen in der Signalstärke verifizierten jedoch eine erfolgreiche Inhibition der CAIX-Expression unter Hypoxie auf Proteinebene.

Außerdem fiel auf, dass die CAIX-Immunfluoreszenzfärbung der hypoxischen NSC-Kontrollen neben dem membranären Signal ein verstärktes intrazelluläres sowie

nukleäres Signal lieferte. Die CAIX-Enzyme der unter Sauerstoff kultivierten Zellen sowie der hypoxischen CAIX-Knockout-Zellen zeigten vielmehr ein diffuses membranäres Verteilungsmuster.

Svastova et al. beobachteten schon vor einigen Jahren eine Internalisation der CAIX unter Hypoxie sowie ihre Relokalisation nach Reoxygenierung der Zellen in die Zellmembran. Unter normalen Bedingungen ist die CAIX an der basolateralen Zelloberfläche nahe der Zonula adhaerens lokalisiert, wo sie in Kooperation mit E-Cadherin die Zell-Zell-Adhäsion zu beeinflussen scheint. Hypoxie führt zur Internalisation beider Proteine und hat eine Deregulierung der Zell-Zell-Interaktionen zur Folge, welche die Invasion und Progression von Tumorzellen begünstigt. Die Hypoxie-induzierte Hochregulation der CAIX-Expression in Tumorzellen könnte demnach den Ersatz der internalisierten CAIX-Enzyme an der Plasmamembran sicherstellen, wodurch ein erhöhter zellulärer CAIX-Vorrat entstünde (Svastova, Zilka et al. 2003). Dieses Reservoir könnte daraufhin zur Aufrechterhaltung der zellulären pH-Homöostase während der anaeroben Stoffwechselsituation ausgeschöpft werden. Die Internalisation der CAIX kann demnach die intrazelluläre Färbung der NSC-Zellen unter Hypoxie erklären, wohingegen ihr nukleäres Signal durch die Hypoxie-induzierte Steigerung der CAIX-Expression (Wykoff, Beasley et al. 2000; Ivanov, Liao et al. 2001; Olive, Aquino-Parsons et al. 2001; Stewart, Talks et al. 2002) begründet werden kann, welche CAIX-Enzyme für die Zellmembran liefert und daher zusätzlich eine Erklärung für das starke membranäre Signal der hypoxischen NSC-Zellen darstellt.

Ergänzend dazu zeigten mehrere Studien, dass die CAIX unter Hypoxie akkumuliert und mit dem Bikarbonattransporter NBC 1 in der Zellmembran ein funktionelles Transportmetabolon bildet, welches den zellulären pH-Haushalt beeinflusst (Ditte, Dequiedt et al. ; Morgan, Pastorekova et al. 2007). Erst kürzlich wurde die Proteinkinase A (PKA) in die Aktivierung der CAIX- bzw. des NBC 1 involviert. In diesem Modell (Ditte, Dequiedt et al.) führt Hypoxie zu einem erhöhten cAMP-Level, welches eine gesteigerte PKA-Aktivität zur Folge hat. Die PKA phosphoryliert die CAIX und den Bikarbonattransporter und stimuliert somit die Produktion sowie den Import von  $\text{HCO}_3^-$ . Bemerkenswert ist, dass die CAIX die einzige transmembrane Isoform der CA-Familie ist, die einen Thr 443-Rest besitzt und daher Signale der PKA empfangen kann. Dieser Rest ist in der intrazellulären Domäne der CAIX

lokalisiert und scheint für die Regulation ihrer katalytischen Aktivität unter Hypoxie maßgeblich verantwortlich zu sein. Angesichts dessen gewinnt die intrazelluläre Domäne der CAIX immer mehr an Bedeutung und besitzt großes Potential, Ziel einer Targettherapie zu werden, die die CAIX-Funktion von „innen“ blockiert.

#### IV.4. Bestrahlung/TMZ-Chemotherapie CAIX-defizitärer Glioblastomzellen

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass die Inaktivierung der Carboanhydrase IX, die Proliferationsrate von U251-Zellen nach Bestrahlung sowie nach TMZ-Chemotherapie reduziert sowie ihre Apoptoserate erhöht, sodass die CAIX-Inhibition, wie in der Arbeitshypothese angenommen, das Ansprechen von Glioblastomzellen auf diese Therapien *in vitro* verbessert, wobei der Effekt unter TMZ-Chemotherapie stärker ausgeprägt ist als unter Bestrahlung.

Außerdem stellte sich heraus, dass der Effekt der CAIX-Inhibition nur in CAIX-exprimierenden Tumorzellen nachweisbar ist, also in den unter hypoxischen Konditionen kultivierten U251-Zellen, wodurch der Zusammenhang zwischen CAIX-Expression und therapeutischem Effekt nachgewiesen werden konnte.

In der letzten Zeit wurde der potentielle Einsatz von CA-Inhibitoren als neue Wirkstoffklasse in der Antitumorthherapie intensiv untersucht (Supuran, Briganti et al. 2001; Supuran 2008; Winum, Rami et al. 2008). Obwohl die Anwendung von CA-Inhibitoren eine Reduktion des Tumorwachstums sowie der Tumorzellmigration und -invasion bewirken konnte (Chiche, Ilc et al. ; Lou, McDonald et al. ; Pacchiano, Carta et al. ; Parkkila, Rajaniemi et al. 2000; Robertson, Potter et al. 2004; Ahlskog, Dumelin et al. 2009), bleibt die exakte Rolle der CAIX in der Proliferation und Progression von Tumoren unklar.

Ein erhöhter Glukoseverbrauch ist kennzeichnend für invasive Tumore und führt durch die typischerweise gesteigerte aerobe Glykolyse zu einer permanenten Laktatakkumulation im Zellinneren. Eine inadäquate Sauerstoffversorgung ruft zudem hypoxische Areale in Tumoren hervor, die ebenso wie ein onkogener Metabolismus eine überschüssige Säureproduktion zur Folge haben - es entstehen v.a. Protonen

und  $\text{CO}_2$ . Um den  $\text{pH}_i$  im Gleichgewicht zu halten, verfügen Tumorzellen über ein ausgeklügeltes Ionen-Transportsystem, welches die Elimination saurer Metabolite sicherstellt und eine Erniedrigung des extrazellulären  $\text{pH}_s$  verursacht (Neri and Supuran ; Swietach, Patiar et al. 2009).

Die bisher publizierte Literatur zeigt, dass die CAIX-Aktivität zur extrazellulären Azidifizierung in hypoxischen Tumoren maßgeblich beiträgt (Svastova, Hulikova et al. 2004; Swietach, Vaughan-Jones et al. 2007; Swietach, Patiar et al. 2009). Ein erniedrigter  $\text{pH}$  konnte seither in Verbindung mit tumorigener Transformation, chromosomalen Rearrangements, Zerstörung der EZM sowie Tumormigration und -invasion gebracht werden. Außerdem scheint ein niedriger  $\text{pH}$  das Ansprechen von Tumorzellen auf konventionelle Therapien negativ zu beeinflussen (Martinez-Zaguilan, Seftor et al. 1996; Webb, Sherratt et al. 1999; Stubbs, McSheehy et al. 2000; Gatenby and Gillies 2004; Swietach, Patiar et al. 2009). Der intrazelluläre  $\text{pH}$  von Tumoren liegt zwischen 7,0 und 7,4, wohingegen der Extrazellulärraum typischerweise einen  $\text{pH}$  zwischen 6,9 und 7,0 besitzt (Vaupel, Kallinowski et al. 1989). Das Aufrechterhalten eines normalen intrazellulären  $\text{pH}_s$  bewahrt die Tumorzellen vor Apoptose (Schmaltz, Hardenbergh et al. 1998) und ermöglicht ihre Proliferation, während ihnen die extrazelluläre Azidose einen selektiven Wachstumsvorteil verschafft (Pastorekova, Kopacek et al. 2007). Jüngste Forschungsergebnisse zeigten nun, dass die grundlegende Funktion der CAIX in der Aufrechterhaltung eines alkalischen intrazellulären  $\text{pH}_s$  auf Kosten eines sauren tumoralen Mikromilieus liegt (Swietach, Patiar et al. 2009).

Angesichts dessen werden die antitumoralen Effekte der CAIX-Inhibition auf eine Veränderung des extra- und intrazellulären  $\text{pH}_s$  zurückgeführt. Die Inhibition der CAIX hemmt den Export von sauren Metaboliten und vergiftet somit die Zelle mit ihren eigenen Säuren. Der sinkende  $\text{pH}_i$  unterdrückt das Tumorwachstum, wohingegen der steigende  $\text{pH}_e$  den Selektionsvorteil der Tumorzellen zerstört und ihr Metastasierungspotential senkt (Swietach, Patiar et al. 2009). Eine kontinuierliche Neueinstellung des  $\text{pH}_i$  ist für die Tumorzellen unerlässlich, da schon die geringste Abweichung diverse biologische Funktionen stören kann, einschließlich ATP-Produktion, Proteinsynthese, Zellproliferation- und migration, Membranpermeabilität, Enzymaktivitäten sowie Apoptosemechanismen (Roos and Boron 1981; Pouyssegur, Sardet et al. 1984; Brooks, Ketsawatsomkron et al. 2005).

Durch die CAIX-Inhibition wäre folglich die ATP-Produktion der Tumorzellen beeinträchtigt, wodurch ihre Energieproduktion zusammenbrechen und ihr nekrotischer Zelltod unabwendbar würde. Bisher konnte in diversen Studien ein erniedrigter intrazellulärer pH sowie eine erniedrigte ATP-Konzentration nach CAIX-Inhibition in Tumorzellen nachgewiesen werden (Cianchi, Vinci et al. ; Lou, McDonald et al.).

Cianchi et al. konnten zudem eine Reduktion der Zellproliferation sowie eine Apoptoseinduktion durch selektive CAIX-Inhibition in HeLa-Zellen nachweisen (Cianchi, Vinci et al.). Ein bedeutender Mechanismus dieser antitumoralen Effekte konnte dabei auf die Modifikation des intrazellulären pHs zurückgeführt werden. Die CAIX-Inhibitoren Azetazolamid, TR1 sowie GA15 erniedrigten signifikant den pH<sub>i</sub>, welcher mit einer erhöhten Ceramid-Synthese, einer Hochregulation der MAPK-Aktivität, der Entstehung von Nitrostress sowie mit der Apoptose von Tumorzellen einherging. Der MAPK-Signalweg sowie Nitroverbindungen sind Mediatoren der Ceramid-induzierten Apoptose. Die Studie zeigte außerdem, dass die Aktivierung dieser Apoptose-Kaskade überwiegend durch die Inhibition der Isoform CAIX in CAIX-exprimierenden Zellen vermittelt wird.

Auch in dieser Arbeit beschränkten sich die Effekte der CAIX-Inhibition vorwiegend auf CAIX-exprimierende Glioblastomzellen, sodass die erhöhte CAIX-Aktivität unter Hypoxie entscheidend zur Chemo- und Strahlentherapieresistenz in Tumorzellen beizutragen scheint.

Interessant war außerdem, dass nicht nur Hypoxie, sondern auch glykolytische Bedingungen nötig waren, um eine optimale Wirkung der CAIX-Inhibition zu erhalten. Hypoxische Areale sowie eine gesteigerte Glykolyse sind charakteristische Eigenschaften maligner Gliome, sodass die Inhibition der CAIX eine optimale Strategie darstellt, um die glykolytischen Tumorzellen mittels eigens produzierten Säuren anzugreifen. Vordermark et al. konnten sogar nachweisen, dass die hypoxische HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation sowie die CAIX-Expression von Tumorzellen *in vitro* von der Glucosekonzentration des Mediums abhängen (Vordermark, Kraft et al. 2005).

Angesichts dessen wird verständlich, weshalb in diesem Versuch die glykolytischen U251-Zellen unter Hypoxie durch CAIX-Inhibition am stärksten für Chemo- und Strahlentherapie sensibilisiert wurden.

Eine weitere Studie zeigte jüngst, dass die CAIX-Inhibition das Wachstum von Mammakarzinomzellen *in vivo* reduziert sowie die Bildung von Lungenmetastasen unterbindet. Außerdem führte die CAIX-Depletion unter hypoxischen Bedingungen zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod sowie zur Umkehr der extrazellulären Azidose *in vitro* (Lou, McDonald et al.).

Die extrazelluläre Azidose von Tumoren wurde schon länger in Verbindung mit Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika gebracht. Schwach basische Chemotherapeutika, wie beispielsweise die in der Mammakarzinomtherapie eingesetzten Medikamente Mitoxantrone und Doxorubicin, werden durch die tumorale Azidose in ihrer Diffusion ins Zellinnere sowie in ihrer Effizienz beeinträchtigt. Dieses sogenannte Ion Trapping ist pH-abhängig und verringert die Zytotoxizität basischer Chemotherapeutika, sodass die Störung der tumoralen pH-Regulation die Wirksamkeit bereits existierender Chemotherapeutika zu verbessern mag (Raghunand, Mahoney et al. 2003).

TMZ ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum mit einer oralen Bioverfügbarkeit von nahezu 100 %. In saurem Milieu ist das Alkylanz stabil, es zerfällt nach der Resorption bei einem pH > 7 jedoch spontan in seinen aktiven Metaboliten MTIC (5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid). Die Substanz durchdringt problemlos die Blut-Liquor-Schranke und ist im Liquorkompartiment somit gut verfügbar. Das MTIC wird bei pH-Werten < 7 instabil und zu AIC (5-Amino-imidazol-4-carboxamid) sowie zur hoch reaktiven Verbindung, einem Methyldiazoniumion, umgesetzt. Das Methyldiazoniumion methyliert die DNA der Zellen am Sauerstoffatom in Stellung 6 eines Guanins in einer Guanin-reichen Region. Die Toxizität des TMZ wird hauptsächlich über das so gebildete mutagene O6-Methylguanin vermittelt (Denny, Wheelhouse et al. 1994). Im Hinblick auf diese Pharmakokinetik wird deutlich, wie stark die Wirksamkeit des TMZ vom pH abhängt. Infolgedessen liegt es nahe, dass die Störung der pH-Regulation durch CAIX-Inhibition die Effizienz der TMZ-Therapie erhöhen kann.

Jede Zelle besitzt DNA-Reparatur-Mechanismen, die schädliche Veränderungen der DNA erkennen und beseitigen. Da die Enzymaktivität im Allgemeinen vom



umgebenden pH abhängt, sind auch die DNA-Reparaturenzyme durch eine Änderung des pHs zu beeinflussen. Angenommen die Inhibition der CAIX führt durch den fehlenden Export von Säuren zu einem sinkenden  $\text{pH}_i$ , wären auch DNA-Reparatur-Enzyme in ihrer Funktion beeinträchtigt, wodurch das Ansprechen der Tumorzellen auf Chemotherapie verbessert würde.

Ferner existieren weitere pH-abhängige Mechanismen, die zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen können. Tumorzellen sind in der Lage Xenobiotika aktiv durch diverse Transportproteine aus dem Zellinneren auszuschleusen und reduzieren dabei die Zytotoxizität dieser Medikamente. Die Transportproteine gehören zu den ABC-Transportern (ATP-Bindungskassetten-Transporter), wovon das P-Glykoprotein der prominenteste Vertreter ist (Schinkel and Jonker 2003). Extrazelluläre Azidose, die in Folge einer hypoxischen CAIX-Induktion in Tumoren auftritt, erhöht die funktionale Aktivität des P-Glykoprotein und begünstigt somit die Entstehung einer Multi-Drug-Resistance (Thews, Gassner et al. 2006; Lotz, Kelleher et al. 2007). Da diese Efflux-Transporter ATP-abhängig arbeiten, führt nicht nur die Erhöhung des  $\text{pH}_e$ , sondern auch die Erniedrigung des  $\text{pH}_i$  durch die Störung der ATP-Produktion zu ihrer Beeinträchtigung und somit zu einer verringerten Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CAIX-Inhibition U251-Glioblastomzellen mit hypoxischer CAIX-Aktivierung für das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid sensibilisiert. Der genaue Mechanismus bleibt unbekannt, könnte aber auf die Umkehr der extrazellulären Azidose sowie auf die Erniedrigung des  $\text{pH}_i$  mit den bereits erläuterten Folgen zurückgeführt werden.

Schon 1993 erwies sich der CA-Inhibitor Acetazolamid in Kombination mit Chemotherapie als nützlich, da er eine zusätzliche Reduktion des Tumorwachstums erbrachte (Teicher, Liu et al. 1993).

Das et al. untersuchten schon vor einigen Jahren die Wirkung von Acetazolamid in Kombination mit Temozolomid und beobachteten einen synergistischen Effekt, welcher sich in einer erhöhten Apoptoserate der Glioblastomzellen zeigte. Die Behandlung führte dabei zu proapoptotischen Mechanismen, wie u.a. Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, Calpain-Aktivierung, Aktivierung der Caspase 3

und 9, gesteigerte Bax-Expression sowie vermehrte mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C in den Glioblastomzellen (Das, Banik et al. 2008).

Die CAIX-Inhibition sensibilisierte Glioblastomzellen in der vorliegenden Studie nicht nur für das Alkylanz TMZ, sondern verbesserte ebenso das Ansprechen der Tumorzellen auf Bestrahlung. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass das Ausschalten der CAIX einen größeren Effekt auf die Behandlung mit TMZ als auf Bestrahlung hat. Nun stellt sich zurecht die Frage, wodurch dieser Unterschied zustande kommt.

Die Ergebnisse des Proliferationsassays ergaben sowohl für die unter Normoxie kultivierten Glioblastomzellen als auch für die unter Hypoxie kultivierten U251-Zellen eine signifikante Reduktion der Proliferationsraten durch TMZ-Chemotherapie ohne CAIX-Inhibition. Die zusätzliche Inhibition der CAIX führte zu einer signifikant reduzierten Proliferationsrate der Tumorzellen unter Hypoxie im Vergleich zur Monotherapie mit TMZ.

Die Auswertung des Bestrahlungsversuchs zeigte interessanterweise, dass Bestrahlung ohne CAIX-Inhibition die Proliferationsraten der U251-Zellen unter Normoxie signifikant senken konnte, wohingegen unter Hypoxie keine signifikante Reduktion beobachtet werden konnte.

Nur in Kombination mit CAIX-Inhibition zeigte sich eine signifikante Verringerung der Proliferationsfähigkeit von hypoxischen Glioblastomzellen. Aufgrund dieser Beobachtung, scheint Hypoxie per se die Toxizität der Bestrahlung herabzusetzen. Da die Wirksamkeit der Bestrahlung durch die Inhibition der CAIX verbessert wird, scheint die Regulation des pHs die Resistenz von Glioblastomzellen gegenüber Bestrahlung zu beeinflussen.

Auch andere Studien beobachteten, dass das Ansprechen von Tumoren auf fraktionierte Bestrahlung von der extrazellulären Säureproduktion abhängt (Sattler, Meyer et al. ; Quennet, Yaromina et al. 2006).

Dubois et al. untersuchten die Wirkung der CAIX-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung *in vivo* und zeigten, dass die spezifische Hemmung der CAIX den Effekt der Bestrahlung verstärkt. Das verzögerte Tumorwachstum konnte dabei nicht durch Veränderungen der intrinsischen Radiosensitivität erklärt werden, da unterschiedliche Strahlendosen keinen Effekt auf das Überleben der Zellen *in vitro* zeigten.

Demnach schien die Wirkung der CAIX-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung das Resultat von Veränderungen im Mikromilieu der Tumorzellen zu sein, welche dadurch für Bestrahlung sensibilisiert würde.

Lee et al. beobachteten schon zuvor, dass ein saures Mikromilieu die Strahlen-induzierte Apoptose in Tumorzellen unterdrücken kann. Die Störung von Prozessen vor oder während der DNA-Degradierung sowie eine Verlängerung des Strahlen-induzierten G2-Arrest durch extrazelluläre Azidose wurden in dieser Studie als Erklärung herangezogen (Lee, Park et al. 1997).

Apoptose ist die häufigste Form des Zelltodes nach Exposition gegenüber externem Stress, wie Bestrahlung und Chemotherapie. Dieses sogenannte Selbsttötungsprogramm ist ein mehrschrittiger Prozess und involviert eine Reihe komplizierter biochemischer Reaktionen, die zur Fragmentierung des Zellkerns sowie des Zytoplasmas führen. Die Phagozytose dieser Fragmente verhindert die Auslösung einer Entzündungsreaktion und ermöglicht somit einen individuellen Zelltod ohne Schädigung des Nachbargewebes. Eine zentrale Rolle im Apoptosevorgang spielen proteolytische Enzyme, die Caspasen. Die Aktivität dieser Enzyme sowie andere biochemische Prozesse sind stark von der Azidität des Umgebungsmilieus abhängig (Park, Lyons et al. 1999). Da auch eine optimale Einstellung des intrazellulären pHs für einen reibungslosen Apoptosevorgang unabdingbar ist, könnte die CAIX-Inhibition durch ihre Wirkung auf den  $\text{pH}_e$  und  $\text{pH}_i$  den Apoptoseprozess begünstigen und eine Erklärung für die erhöhte Apoptoserate der hypoxischen Glioblastomzellen nach Bestrahlung sowie TMZ-Chemotherapie in dieser Studie darstellen.

Zur Detektion der apoptotischen Zellen kam in dieser Studie am 6. Tag nach der jeweiligen Behandlung die Annexin-Färbung zur Anwendung.

In der frühen Phase der Apoptose finden Änderungen in der Zellmembran statt, Phosphatidylserine werden auf die Außenseite der Zellen verlagert.

Annexin-V ist mit einem fluoreszierenden Molekül konjugiert und bindet in Gegenwart von Calcium an Phosphatidylserine, wobei es nur eine geringe Affinität zu anderen Phospholipiden besitzt.

Die Annexin-Färbung zielt demnach nur auf solche Zellen ab, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, sodass späte Apoptosestadien nicht erkannt werden. Insofern wurden in dieser Studie höchstwahrscheinlich nicht alle apoptotischen

Glioblastomzellen erfasst, da der Apoptosebeginn von Zelle zu Zelle individuell variiert, sodass sich die Tumorzellen zum Zeitpunkt der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung in unterschiedlichen Stadien der Apoptose befanden, wovon nur die frühapoptotischen Zellen erfasst wurden. Die Annexin-Färbung scheint somit für die Erfassung aller apoptotischen Zellen ungeeignet zu sein, sodass eruiert werden sollte, ob eine Kombination mit dem Caspase-3-Aktivitätsassay oder dem TUNEL-Assay diese Problematik lösen kann.

Auch der verwendete Proliferationsassay schien nicht optimal zur Einschätzung der Viabilität der Glioblastomzellen zu sein. Am 6. Tag nach Bestrahlung bzw. Zytostatikum-Gabe wurde der Proliferationsassay (CellTiter 96® AQueous One Solution) durchgeführt, um die noch zur Zellteilung fähigen Zellen zu quantifizieren. Das Prinzip beruht auf einem Tetrazolium-haltigen Substratgemisch, welches nur von proliferierenden, viablen Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt reduziert werden kann. Die Reaktion wird von NADH/NADPH-abhängigen Dehydrogenasen der Atmungskette aktiver Zellen katalysiert. Der Farbumschlag wurde anschließend mittels Photometrie bei 490 nm gemessen. Die gemessenen Proliferationsraten stimmten jedoch mit dem morphologischen Bild der Zellen oft nicht überein. Häufig war das Aussehen der CAIX-Knockout-Zellen im Verlauf der mikroskopischen Beobachtung sehr viel schlechter als die entsprechenden Proliferationsraten. Cianchi et al. (Cianchi, Vinci et al.) verwendeten in ihrer Studie sowohl einen Viabilitätsassay (MTT-Test) als auch einen Proliferationsassay, der die DNA-Synthese der Tumorzellen abschätzt und somit eine exaktere Messung der Proliferation erlaubt. Ob diese Methode für nachfolgende Versuche geeigneter ist, gilt zu eruieren.

Der Grund für das stärkere Ansprechen CAIX-defizitärer Glioblastomzellen auf TMZ-Chemotherapie im Vergleich zur Bestrahlung bleibt unbekannt.

Die Resistenzentstehung von Glioblastomzellen gegenüber Bestrahlung scheint jedenfalls nicht nur durch den Einfluss der CAIX auf die pH-Regulation bedingt zu sein. Möglicherweise erniedrigen zusätzliche Enzyme oder Stoffwechselwege die Zytotoxizität der Bestrahlung, sodass die Inhibition der CAIX nicht ausreicht, um die Wirkung, die im TMZ-Versuch erbracht wurde, zu erzielen.

Die Laktatproduktion von Tumorzellen wird beispielsweise durch die Inhibition der CAIX kaum beeinflusst (Dubois, Peeters et al.), konnte jedoch in Verbindung mit der

Strahlenresistenz maligner Tumore gebracht werden (Sattler, Meyer et al. ; Quennet, Yaromina et al. 2006).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine gute Sauerstoffsättigung des Tumorgewebes unerlässlich für eine optimale Wirksamkeit der Strahlentherapie ist (Brown and Wilson 2004). Die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung sind durch die Bildung von Sauerstoffradikalen bedingt, welche Schäden in der DNS, v.a. DNS-Doppelstrangbrüche, hervorrufen und fixieren. Unter hypoxischen Konditionen sind die Strahlenschäden der DNS geringer, da reduzierende Bedingungen den Ausgangszustand der DNS wiederherstellen können und somit die Tumorzellen vor dem programmierten Zelltod bewahren.

Außerdem führt Hypoxie ebenfalls zu einer Hochregulation von Genen, die in die Entstehung einer Multi-Drug-Resistance involviert sind, wie beispielsweise das P-Glykoprotein (Comerford, Wallace et al. 2002).

Da die Inhibition der CAIX auf die Sauerstoffversorgung der Tumorzellen keinen Einfluss nimmt, kann die Abschwächung der Strahlenschäden durch Hypoxie nicht aufgehalten werden.

#### IV.5. Ausblick

Die Rolle der CAIX in der Tumorigenese steht derzeit im Mittelpunkt der aktuellen Tumorforschung. Die spezifische Inhibition der CAIX zeigte jüngst eine Reduktion des Tumorwachstums sowie der Tumorzellmigration und -invasion (Chiche, Ilc et al. ; Lou, McDonald et al. ; Pacchiano, Carta et al. ; Parkkila, Rajaniemi et al. 2000; Robertson, Potter et al. 2004; Ahlskog, Dumelin et al. 2009) und bestätigte somit ihr großes Potential als Targettherapie in der Tumorbehandlung Verwendung zu finden, um die mit hypoxischen Tumoren einhergehende schlechte Prognose der Patienten zu verbessern.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das Ausschalten der CAIX-Expression das Ansprechen von hypoxischen Glioblastomzellen auf Bestrahlung sowie auf TMZ-Chemotherapie *in vitro* verbessert. Der verstärkende Effekt war nur in CAIX-exprimierenden Zellen (unter Hypoxie) zu beobachten, wodurch dieser Effekt auf die fehlende CAIX-Aktivität zurückgeführt werden kann.

Folglich implizieren die Ergebnisse einen potentiellen Nutzen der CAIX-Inhibition als tumorspezifische Targettherapie, die möglicherweise das Ansprechen von Glioblastompatienten auf Chemo- und Strahlentherapie verbessert.

Zunächst muss allerdings in Folgestudien eruiert werden, ob die Ergebnisse dieser Studie auch *in vivo* zu verifizieren sind. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die simultane Hemmung der ebenfalls tumorassoziierten Isoform CAXII den Effekt der CAIX-Inhibition verstärken kann, da jüngste Forschungsergebnisse einen synergistischen Effekt nachweisen konnten (Chiche, Ilc et al. 2009).

Im Hinblick auf die Erkenntnisse aktueller Forschung erscheint der Einsatz von spezifischen CAIX-Inhibitoren im klinischen Management von Tumoren, die dieses Enzym exprimieren, höchst attraktiv.

## V. Literaturverzeichnis

- (2002). Cancer Facts and Figures 2002. American Cancer Society, Atlanta.
- Aebersold, D. M., P. Burri, et al. (2001). "Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer." Cancer Res **61**(7): 2911-6.
- Ahlskog, J. K., C. E. Dumelin, et al. (2009). "In vivo targeting of tumor-associated carbonic anhydrases using acetazolamide derivatives." Bioorg Med Chem Lett **19**(16): 4851-6.
- Albert, F. K. (1986). "[Tumor hemorrhage in intracranial tumors]." Neurochirurgia (Stuttg) **29**(3): 67-74.
- Alterio, V., M. Hilvo, et al. (2009). "Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16233-8.
- Armanios, M. Y., S. A. Grossman, et al. (2004). "Transmission of glioblastoma multiforme following bilateral lung transplantation from an affected donor: case study and review of the literature." Neuro Oncol **6**(3): 259-63.
- Arnold, J. B., L. Junck, et al. (1985). "In vivo measurement of regional brain and tumor pH using [14C]dimethyloxazolidinedione and quantitative autoradiography." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **5**(3): 369-375.
- Bailey, P. and H. Cushing (1926). A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia, J. B. Lippincott.
- Barnea, G., M. Grumet, et al. (1994). "Close similarity between receptor-linked tyrosine phosphatase and rat brain proteoglycan." Cell **76**(2): 205.
- Bellail, A. C., S. B. Hunter, et al. (2004). "Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion." The International Journal of Biochemistry and Cell Biology **36**(6): 1046-1069.
- Berger, M. S. and C. G. Hadjipanayis (2007). "Surgery of intrinsic cerebral tumors." Neurosurgery **61**(1 Suppl): 279-304; discussion 304-5.
- Bergers, G. and D. Hanahan (2008). "Modes of resistance to anti-angiogenic therapy." Nat Rev Cancer **8**(8): 592-603.
- Birner, P., M. Schindl, et al. (2000). "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer." Cancer Res **60**(17): 4693-6.
- Bogdahn, U., P. Hau, et al. "Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study." Neuro Oncol **13**(1): 132-42.
- Bogler, O., H. J. Huang, et al. (1995). "The p53 gene and its role in human brain tumors." Glia **15**(3): 308-27.

- Borodovsky, A., M. J. Seltzer, et al. "Altered cancer cell metabolism in gliomas with mutant IDH1 or IDH2." Curr Opin Oncol.
- Bos, R., P. van der Groep, et al. (2003). "Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma." Cancer **97**(6): 1573-81.
- Bos, R., J. J. van Der Hoeven, et al. (2002). "Biologic correlates of (18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography." J Clin Oncol **20**(2): 379-87.
- Brahimi-Horn, M. C., J. Chiche, et al. (2007). "Hypoxia signalling controls metabolic demand." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 223-9.
- Brandes, A. A., A. Tosoni, et al. (2008). "Glioblastoma in adults." Critical Reviews in Oncology/Hematology **67**(2): 139-152.
- Brandsma, D., L. Stalpers, et al. (2008). "Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas." Lancet Oncol **9**(5): 453-61.
- Brat, D. J., B. Kaur, et al. (2003). "Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: relevance to brain tumors." Front Biosci **8**: d100-16.
- Breton, S. (2001). "The cellular physiology of carbonic anhydrases." Journal of Pancreas **2**(4 Supplement): 159-164.
- Brizel, D. M., S. P. Scully, et al. (1996). "Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma." Cancer Res **56**(5): 941-3.
- Brooks, C., P. Ketsawatsomkron, et al. (2005). "Acidic pH inhibits ATP depletion-induced tubular cell apoptosis by blocking caspase-9 activation in apoptosome." Am J Physiol Renal Physiol **289**(2): F410-9.
- Brown, J. M. and W. R. Wilson (2004). "Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment." Nat Rev Cancer **4**(6): 437-47.
- Buller, F., M. Steiner, et al. "Selection of Carbonic Anhydrase IX Inhibitors from One Million DNA-Encoded Compounds." ACS Chem Biol **6**(4): 336-44.
- Burger, P. C. (1983). "Pathologic anatomy and CT correlations in the glioblastoma multiforme." Applied Neurophysiology **46**(1-4): 180-187.
- Burt, B. M., J. L. Humm, et al. (2001). "Using positron emission tomography with [(18)F]FDG to predict tumor behavior in experimental colorectal cancer." Neoplasia **3**(3): 189-95.
- Cadoux-Hudson, T. A., M. J. Blackledge, et al. (1989). "Human primary brain tumour metabolism in vivo: a phosphorus magnetic resonance spectroscopy study." British Journal of Cancer **60**(3): 430-6.
- Calin, G. A., C. Sevignani, et al. (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2999-3004.
- Cardone, R. A., V. Casavola, et al. (2005). "The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis." Nat Rev Cancer **5**(10): 786-95.



- Chamberlain, M. C. (2008). "Pseudoprogression in glioblastoma." J Clin Oncol **26**(26): 4359; author reply 4359-60.
- Chegwidden, W. R. and N. D. Carter (2000). "Introduction to the carbonic anhydrases." Experientia **90**: 14-28.
- Chia, S. K., C. C. Wykoff, et al. (2001). "Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma." Journal of Clinical Oncology **19**(16): 3660-3668.
- Chiche, J., M. C. Brahimi-Horn, et al. "Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer." J Cell Mol Med **14**(4): 771-94.
- Chiche, J., K. Ilc, et al. "Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration." Adv Enzyme Regul **50**(1): 20-33.
- Chiche, J., K. Ilc, et al. (2009). "Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH." Cancer Res **69**(1): 358-68.
- Cho, M., K. Grabmaier, et al. (2000). "Activation of the MN/CA9 gene is associated with hypomethylation in human renal cell carcinoma cell lines." Mol Carcinog **27**(3): 184-9.
- Chrastina, A., J. Zavada, et al. (2003). "Biodistribution and pharmacokinetics of 125I-labeled monoclonal antibody M75 specific for carbonic anhydrase IX, an intrinsic marker of hypoxia, in nude mice xenografted with human colorectal carcinoma." Int J Cancer **105**(6): 873-81.
- Cianchi, F., M. C. Vinci, et al. "Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells." J Pharmacol Exp Ther **334**(3): 710-9.
- Collingridge, D. R., J. M. Piepmeier, et al. (1999). "Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue." Radiotherapy and Oncology **53**(2): 127-131.
- Comerford, K. M., T. J. Wallace, et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene." Cancer Res **62**(12): 3387-94.
- Curran, W. J., Jr., C. B. Scott, et al. (1993). "Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials." J Natl Cancer Inst **85**(9): 704-10.
- Danchaivijitr, N., A. D. Waldman, et al. (2008). "Low-grade gliomas: do changes in rCBV measurements at longitudinal perfusion-weighted MR imaging predict malignant transformation?" Radiology **247**(1): 170-8.
- Dang, C. V. and G. L. Semenza (1999). "Oncogenic alterations of metabolism." Trends in Biochemical Sciences **24**(2): 68-72.
- Dang, L., D. W. White, et al. (2009). "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate." Nature **462**(7274): 739-44.
- Das, A., N. L. Banik, et al. (2008). "Modulatory effects of acetazolamide and dexamethasone on temozolomide-mediated apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells." Cancer Invest **26**(4): 352-8.

- De Simone, G., R. M. Vitale, et al. (2006). "Carbonic anhydrase inhibitors: Hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX." J Med Chem **49**(18): 5544-51.
- Denny, B. J., R. T. Wheelhouse, et al. (1994). "NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA." Biochemistry **33**(31): 9045-51.
- Deryugina, E. I., M. A. Bourdon, et al. (2000). "Functional activation of integrin alpha V beta 3 in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase." Int J Cancer **86**(1): 15-23.
- Deryugina, E. I., G. X. Luo, et al. (1997). "Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2." Anticancer Res **17**(5A): 3201-10.
- Di Chiro, G., R. L. DeLaPaz, et al. (1982). "Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [18F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography." Neurology **32**(12): 1323-9.
- Ditte, P., F. Dequiedt, et al. "Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors." Cancer Res.
- Donawho, C. K., Y. Luo, et al. (2007). "ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models." Clin Cancer Res **13**(9): 2728-37.
- Dorai, T., I. Sawczuk, et al. (2006). "Role of carbonic anhydrases in the progression of renal cell carcinoma subtypes: proposal of a unified hypothesis." Cancer Invest **24**(8): 754-79.
- Dubois, L., N. G. Lieuwes, et al. (2009). "Imaging of CA IX with fluorescent labelled sulfonamides distinguishes hypoxic and (re)-oxygenated cells in a xenograft tumour model." Radiother Oncol **92**(3): 423-8.
- Dubois, L., S. Peeters, et al. "Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation." Radiother Oncol **99**(3): 424-31.
- Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." Nat Rev Cancer **6**(4): 259-69.
- Everhard, S., G. Kaloshi, et al. (2006). "MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas." Annals of Neurology **60**(6): 740-3.
- Farrell, C. J. and S. R. Plotkin (2007). "Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes." Neurol Clin **25**(4): 925-46, viii.
- Fatt, M. A., K. M. Horton, et al. (2008). "Transmission of metastatic glioblastoma multiforme from donor to lung transplant recipient." J Comput Assist Tomogr **32**(3): 407-9.
- Fine, H. A., K. B. Dear, et al. (1993). "Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults." Cancer **71**(8): 2585-97.
- Flynn, J. R., L. Wang, et al. (2008). "Hypoxia-regulated protein expression, patient characteristics, and preoperative imaging as predictors of survival in adults with glioblastoma multiforme." Cancer **113**(5): 1032-42.

- Fontana, A., S. Bodmer, et al. (1991). "Expression of TGF-beta 2 in human glioblastoma: a role in resistance to immune rejection?" Ciba Found Symp **157**: 232-8; discussion 238-41.
- Frank, S., J. Muller, et al. (1998). "Transmission of glioblastoma multiforme through liver transplantation." Lancet **352**(9121): 31.
- Furnari, F. B., T. Fenton, et al. (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." Genes Dev **21**(21): 2683-710.
- Gatenby, R. A., E. T. Gawlinski, et al. (2006). "Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study." Cancer Research **66**(10): 5216-5223.
- Gatenby, R. A. and R. J. Gillies (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" Nature Reviews Cancer **4**(11): 891-899.
- Generali, D., S. B. Fox, et al. (2006). "Role of carbonic anhydrase IX expression in prediction of the efficacy and outcome of primary epirubicin/tamoxifen therapy for breast cancer." Endocr Relat Cancer **13**(3): 921-30.
- Giatromanolaki, A., M. I. Koukourakis, et al. (2001). "Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer." Cancer Research **61**(21): 7992-7998.
- Giese, A., T. Kucinski, et al. (2004). "Pattern of recurrence following local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) implants in patients with glioblastoma." Journal of Neuro-Oncology **66**(3): 351-360.
- Goel, A., S. P. Mathupala, et al. (2003). "Glucose metabolism in cancer. Evidence that demethylation events play a role in activating type II hexokinase gene expression." Journal of Biological Chemistry **278**(17): 15333-15340.
- Griffiths, J. R., D. J. McIntyre, et al. (2001). "Why are cancers acidic? A carrier-mediated diffusion model for H<sup>+</sup> transport in the interstitial fluid." Novartis Found Symp **240**: 46-62; discussion 62-7, 152-3.
- Haapasalo, J. A., K. M. Nordfors, et al. (2006). "Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis." Clin Cancer Res **12**(2): 473-7.
- Hadjipanayis, C. G. and E. G. Van Meir (2009). "Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies." Trends Mol Med **15**(11): 519-30.
- Hadjipanayis, C. G. and E. G. Van Meir (2009). "Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy." J Mol Med **87**(4): 363-74.
- Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." Nat Rev Cancer **2**(1): 38-47.
- Hayashi, Y., N. A. Edwards, et al. (2007). "Regulation and function of aquaporin-1 in glioma cells." Neoplasia **9**(9): 777-87.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." New England Journal of Medicine **352**(10): 997-1003.
- Helmlinger, G., A. Sckell, et al. (2002). "Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism." Clinical Cancer Research **8**(4): 1284-1291.

- Herholz, K., W. Heindel, et al. (1992). "In vivo imaging of glucose consumption and lactate concentration in human gliomas." Ann Neurol **31**(3): 319-27.
- Hochberg, F. H. and A. Pruitt (1980). "Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma." Neurology **30**(9): 907-11.
- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-76.
- Hoffman, W. F., V. A. Levin, et al. (1979). "Evaluation of malignant glioma patients during the postirradiation period." J Neurosurg **50**(5): 624-8.
- Huang, L. E., J. Gu, et al. (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7987-92.
- Ichimura, K., H. Ohgaki, et al. (2004). "Molecular pathogenesis of astrocytic tumours." Journal of Neuro-Oncology **70**(2): 137-160.
- Ihnatko, R., M. Kubes, et al. (2006). "Extracellular acidosis elevates carbonic anhydrase IX in human glioblastoma cells via transcriptional modulation that does not depend on hypoxia." Int J Oncol **29**(4): 1025-33.
- Imaya, H. (1994). "Lactate metabolism conducted by rat C6-glioma in the cells culture." Journal of Neurosurgical Sciences **38**(4): 223-227.
- Innocenti, A., S. Pastorekova, et al. (2009). "The proteoglycan region of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX acts as an intrinsic buffer optimizing CO2 hydration at acidic pH values characteristic of solid tumors." Bioorg Med Chem Lett **19**(20): 5825-8.
- Ivanov, S., S. Y. Liao, et al. (2001). "Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer." American Journal of Pathology **158**(3): 905-919.
- Jacobs, A. H., L. W. Kracht, et al. (2005). "Imaging in neurooncology." NeuroRx **2**(2): 333-347.
- Jahde, E., M. F. Rajewsky, et al. (1982). "pH distributions in transplanted neural tumors and normal tissues of BDIX rats as measured with pH microelectrodes." Cancer Research **42**(4): 1498-1504.
- Jakubickova, L., Z. Biesova, et al. (2005). "Methylation of the CA9 promoter can modulate expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX in dense carcinoma cell lines." International Journal of Oncology **26**(4): 1121-1127.
- Jensen, R. L. (2006). "Hypoxia in the tumorigenesis of gliomas and as a potential target for therapeutic measures." Neurosurg Focus **20**(4): E24.
- Jensen, R. L. (2009). "Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogession, and as a therapeutic target." J Neurooncol **92**(3): 317-35.
- Jiang, B. H., E. Rue, et al. (1996). "Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1." J Biol Chem **271**(30): 17771-8.
- Jukich, P. J., B. J. McCarthy, et al. (2001). "Trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994." Neuro-oncology **3**(3): 141-151.

- Kaluz, S., M. Kaluzova, et al. (2002). "Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible factor 1 alpha stabilization: a role for phosphatidylinositol 3'-kinase." Cancer Research **62**(15): 4469-4477.
- Kaluz, S., M. Kaluzova, et al. (2003). "Expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX is critically dependent on SP1 activity. Identification of a novel type of hypoxia-responsive enhancer." Cancer Research **63**(5): 917-922.
- Kaluzova, M., S. Kaluz, et al. (2004). "DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1alpha in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX." Molecular and Cellular Biology **24**(13): 5757-5766.
- Kaluzova, M., S. Pastorekova, et al. (2000). "P53 tumour suppressor modulates transcription of the TATA-less gene coding for the tumour-associated carbonic anhydrase MN/CA IX in MaTu cells." Biochimica et Biophysica Acta **1491**: 20-26.
- Koritzinsky, M., M. G. Magagnin, et al. (2006). "Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control." EMBO J **25**(5): 1114-25.
- Koritzinsky, M., K. M. Rouschop, et al. (2007). "Phosphorylation of eIF2alpha is required for mRNA translation inhibition and survival during moderate hypoxia." Radiother Oncol **83**(3): 353-61.
- Kornitzer, D. and A. Ciechanover (2000). "Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation." Journal of Cellular Physiology **182**(1): 1-11.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, et al. (2001). "Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy." Clinical Cancer Research **7**(11): 3399-3403.
- Koumenis, C., C. Naczki, et al. (2002). "Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha." Mol Cell Biol **22**(21): 7405-16.
- Lacroix, M., D. Abi-Said, et al. (2001). "A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival." Journal of Neurosurgery **95**(2): 190-198.
- Lal, A., H. Peters, et al. (2001). "Transcriptional response to hypoxia in human tumors." J Natl Cancer Inst **93**(17): 1337-43.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-6.
- Laperriere, N., L. Zuraw, et al. (2002). "Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review." Radiother Oncol **64**(3): 259-73.
- Law, M., S. Yang, et al. (2003). "Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging." AJNR Am J Neuroradiol **24**(10): 1989-98.
- Lee, A. Y., M. N. Levine, et al. (2003). "Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer." N Engl J Med **349**(2): 146-53.

- Lee, H. S., H. J. Park, et al. (1997). "Radiation-induced apoptosis in different pH environments in vitro." Int J Radiat Oncol Biol Phys **38**(5): 1079-87.
- Li, Y., C. Tu, et al. "Catalysis and pH control by membrane-associated carbonic anhydrase IX in MDA-MB-231 breast cancer cells." J Biol Chem **286**(18): 15789-96.
- Liao, S. Y., O. N. Aurelio, et al. (1997). "Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney." Cancer Research **57**(14): 2827-2831.
- Liao, S. Y. and E. J. Stanbridge (2000). "Expression of MN/CA9 protein in Papanicolaou smears containing atypical glandular cells of undetermined significance is a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and neoplasia." Cancer **88**(5): 1108-21.
- Linos, E., T. Raine, et al. (2007). "Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis." J Natl Cancer Inst **99**(20): 1544-50.
- Litofsky, N. S., E. Farace, et al. (2004). "Depression in patients with high-grade glioma: results of the Glioma Outcomes Project." Neurosurgery **54**(2): 358-66; discussion 366-7.
- Loncaster, J. A., A. L. Harris, et al. (2001). "Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix." Cancer Research **61**(17): 6394-6399.
- Lotz, C., D. K. Kelleher, et al. (2007). "Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells." Oncol Rep **17**(1): 239-44.
- Lou, Y., P. C. McDonald, et al. "Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors." Cancer Res **71**(9): 3364-76.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System." Acta Neuropathologica (Berl) **114**(2): 97-109.
- Lu, H., R. A. Forbes, et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis." Journal of Biological Chemistry **277**(26): 23111-25315.
- Lun, M., E. Lok, et al. (2011). "The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme." J Neurooncol.
- Maher, E. A., F. B. Furnari, et al. (2001). "Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter." Genes and Development **15**(11): 1311-1333.
- Mangiardi, J. R. and P. Yodice (1990). "Metabolism of the malignant astrocytoma." Neurosurgery **26**(1): 1-19.
- Maresca, A., C. Temperini, et al. (2009). "Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors." J Am Chem Soc **131**(8): 3057-62.
- Martinez-Zaguilan, R., E. A. Seftor, et al. (1996). "Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells." Clinical and Experimental Metastasis **14**(2): 176-186.

- Mathupala, S. P., C. Heese, et al. (1997). "Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53." Journal of Biological Chemistry **272**(36): 22776-22780.
- Maxwell, M., T. Galanopoulos, et al. (1992). "Effect of the expression of transforming growth factor-beta 2 in primary human glioblastomas on immunosuppression and loss of immune surveillance." J Neurosurg **76**(5): 799-804.
- Mirimanoff, R. O., T. Gorlia, et al. (2006). "Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial." J Clin Oncol **24**(16): 2563-9.
- Morgan, P. E., S. Pastorekova, et al. (2007). "Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters." Am J Physiol Cell Physiol **293**(2): C738-48.
- Nagarajan, R. P. and J. F. Costello (2009). "Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme." Seminars in Cancer Biology **19**(3): 188-97.
- Neri, D. and C. T. Supuran "Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy." Nat Rev Drug Discov **10**(10): 767-77.
- Newell, K., A. Franchi, et al. (1993). "Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(3): 1127-1131.
- Nicoloso, M. S. and G. A. Calin (2008). "MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside." Brain Pathology **18**(1): 122-129.
- Nogradi, A. (1998). "The role of carbonic anhydrases in tumors." American Journal of Pathology **153**(1): 1-4.
- Novakova, J., O. Slaby, et al. (2009). "MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis." Biochem Biophys Res Commun **386**(1): 1-5.
- Ohgaki, H. (2005). "Genetic pathways to glioblastomas." Neuropathology **25**(1): 1-7.
- Ohgaki, H. (2009). "Epidemiology of brain tumors." Methods in Molecular Biology **472**: 323-342.
- Ohgaki, H., P. Dessen, et al. (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." Cancer Res **64**(19): 6892-9.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." Acta Neuropathologica **109**(1): 93-108.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **64**(6): 479-489.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." Am J Pathol **170**(5): 1445-53.
- Olive, P. L., C. Aquino-Parsons, et al. (2001). "Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer." Cancer Research **61**(24): 8924-8929.

- Opavsky, R., S. Pastorekova, et al. (1996). "Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships." Genomics **33**(3): 480-487.
- Osthus, R. C., H. Shim, et al. (2000). "Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc." J Biol Chem **275**(29): 21797-800.
- Pacchiano, F., F. Carta, et al. "Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis." J Med Chem **54**(6): 1896-902.
- Paravati, A. J., D. E. Heron, et al. (2010). "Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma and anaplastic astrocytoma: validation of Radiation Therapy Oncology Group-Recursive Partitioning Analysis in the IMRT and temozolomide era." J Neurooncol.
- Park, H. J., J. C. Lyons, et al. (1999). "Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity." Br J Cancer **80**(12): 1892-7.
- Parkkila, S., H. Rajaniemi, et al. (2000). "Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(5): 2220-2224.
- Parsons, D. W., S. Jones, et al. (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." Science **321**(5897): 1807-1812.
- Pasquier, B., D. Pasquier, et al. (1980). "Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: clinicopathological study of two cases and review of literature." Cancer **45**(1): 112-25.
- Pastorek, J., S. Pastorekova, et al. (1994). "Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment." Oncogene **9**(10): 2877-2888.
- Pastorekova, S., J. Kopacek, et al. (2007). "Carbonic anhydrase inhibitors and the management of cancer." Curr Top Med Chem **7**(9): 865-78.
- Pastorekova, S., S. Parkkila, et al. (1997). "Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts." Gastroenterology **112**(2): 398-408.
- Pastorekova, S., S. Parkkila, et al. (2006). "Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance." Adv Clin Chem **42**: 167-216.
- Pastorekova, S., M. Zatovicova, et al. (2008). "Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition." Curr Pharm Des **14**(7): 685-98.
- Peles, E., M. Nativ, et al. (1995). "The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin." Cell **82**(2): 251-260.
- Pelloski, C. E., K. V. Ballman, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma." J Clin Oncol **25**(16): 2288-94.
- Pennacchietti, S., P. Michieli, et al. (2003). "Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene." Cancer Cell **3**(4): 347-61.



- Pichlmeier, U., A. Bink, et al. (2008). "Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients." Neuro-Onkology **10**(6): 1025-1034.
- Platten, M., W. Wick, et al. (2000). "Transforming growth factors beta(1) (TGF-beta(1)) and TGF-beta(2) promote glioma cell migration via Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression." Biochem Biophys Res Commun **268**(2): 607-11.
- Potter, C. P. and A. L. Harris (2003). "Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer." British Journal of Cancer **89**(1): 2-7.
- Pouyssegur, J., F. Dayan, et al. (2006). "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression." Nature **441**(7092): 437-43.
- Pouyssegur, J., F. Dayan, et al. (2006). "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression." Nature **441**(7092): 437-443.
- Pouyssegur, J., C. Sardet, et al. (1984). "A specific mutation abolishing Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(15): 4833-7.
- Proescholdt, M. A., C. Mayer, et al. (2005). "Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors." Neuro-oncology **7**(4): 465-475.
- Quennet, V., A. Yaromina, et al. (2006). "Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice." Radiother Oncol **81**(2): 130-5.
- Racker, E. (1974). "History of the Pasteur effect and its pathobiology." Mol Cell Biochem **5**(1-2): 17-23.
- Rafajova, M., M. Zatovicova, et al. (2004). "Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells." Int J Oncol **24**(4): 995-1004.
- Ragel, B. T., W. T. Couldwell, et al. (2007). "Identification of hypoxia-induced genes in a malignant glioma cell line (U-251) by cDNA microarray analysis." Neurosurg Rev **30**(3): 181-7; discussion 187.
- Raghunand, N., R. A. Gatenby, et al. (2003). "Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours." British Journal of Radiology **76 Spec No 1**: S11-22.
- Raghunand, N., B. P. Mahoney, et al. (2003). "Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents." Biochem Pharmacol **66**(7): 1219-29.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-11.
- Rivera, A. L., C. E. Pelloski, et al. (2010). "MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma." Neuro Oncol **12**(2): 116-21.
- Robertson, N., C. Potter, et al. (2004). "Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion." Cancer Res **64**(17): 6160-5.

- Robey, I. F., A. D. Lien, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors." Neoplasia **7**(4): 324-330.
- Rong, Y., F. Hu, et al. (2006). "Early growth response gene-1 regulates hypoxia-induced expression of tissue factor in glioblastoma multiforme through hypoxia-inducible factor-1-independent mechanisms." Cancer Res **66**(14): 7067-74.
- Rooprai, H. K., G. J. Rucklidge, et al. (2000). "The effects of exogenous growth factors on matrix metalloproteinase secretion by human brain tumour cells." Br J Cancer **82**(1): 52-5.
- Roos, A. and W. F. Boron (1981). "Intracellular pH." Physiol Rev **61**(2): 296-434.
- Rottenberg, D. A., J. Z. Ginos, et al. (1984). "In vivo measurement of regional brain tissue pH using positron emission tomography." Annals of Neurology **15**(102): S98-102.
- Rottenberg, D. A., J. Z. Ginos, et al. (1985). "In vivo measurement of brain tumor pH using [<sup>11</sup>C]DMO and positron emission tomography." Annals of Neurology **17**(1): 70-79.
- Saarnio, J., S. Parkkila, et al. (1998). "Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation." American Journal of Pathology **153**(1): 279-285.
- Saarnio, J., S. Parkkila, et al. (1998). "Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **46**(4): 497-504.
- Said, H. M., C. T. Supuran, et al. "Modulation of carbonic anhydrase 9 (CA9) in human brain cancer." Curr Pharm Des **16**(29): 3288-99.
- Salceda, S. and J. Caro (1997). "Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes." J Biol Chem **272**(36): 22642-7.
- Sanai, N., A. Alvarez-Buylla, et al. (2005). "Neural stem cells and the origin of gliomas." New England Journal of Medicine **353**(8): 811-822.
- Sathornsumetee, S., Y. Cao, et al. (2008). "Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan." J Clin Oncol **26**(2): 271-8.
- Sattler, U. G., S. S. Meyer, et al. "Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation." Radiother Oncol **94**(1): 102-9.
- Sawaya, R. E., M. Yamamoto, et al. (1996). "Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo." Clin Exp Metastasis **14**(1): 35-42.
- Schinkel, A. H. and J. W. Jonker (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 3-29.
- Schmaltz, C., P. H. Hardenbergh, et al. (1998). "Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia." Mol Cell Biol **18**(5): 2845-54.

- Schneider, T., C. Mawrin, et al. "Gliomas in adults." Dtsch Arztebl Int **107**(45): 799-807; quiz 808.
- Schwartzbaum, J. A., J. L. Fisher, et al. (2006). "Epidemiology and molecular pathology of glioma." Nature Clinical Practice Neurology **2**(9): 494-503; quiz 1 p following 516.
- Selker, R. G., W. R. Shapiro, et al. (2002). "The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine." Neurosurgery **51**(2): 343-55; discussion 355-7.
- Semenza, G. L. (1998). "Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis." Curr Opin Genet Dev **8**(5): 588-94.
- Semenza, G. L. (2000). "HIF-1 and human disease: one highly involved factor." Genes Dev **14**(16): 1983-91.
- Semenza, G. L. (2001). "HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 167-71.
- Semenza, G. L. (2001). "Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology." Trends Mol Med **7**(8): 345-50.
- Shaw, R. J. (2006). "Glucose metabolism and cancer." Current Opinion in Cell Biology **18**(6): 598-608.
- Siebel, M., K. Rohrmann, et al. "A clinical phase I/II trial with the monoclonal antibody cG250 (RENCAREX(R)) and interferon-alpha-2a in metastatic renal cell carcinoma patients." World J Urol **29**(1): 121-6.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2004). "Cancer stem cells in nervous system tumors." Oncogene **23**(43): 7267-73.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-8.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Sly, W. S. and P. Y. Hu (1995). "Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies." Annual Review of Biochemistry **64**: 375-401.
- Souhami, L., W. Seiferheld, et al. (2004). "Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol." Int J Radiat Oncol Biol Phys **60**(3): 853-60.
- Span, P. N., J. Bussink, et al. (2003). "Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome." Br J Cancer **89**(2): 271-6.
- Srinivasan, S., I. R. Patric, et al. "A Ten-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Glioblastoma." PLoS One **6**(3): e17438.

- Stewart, L. A. (2002). "Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials." Lancet **359**(9311): 1011-8.
- Stewart, M., K. Talks, et al. (2002). "Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma." Histopathology **40**(3): 253-60.
- Stiles, J. D., P. T. Ostrow, et al. (1997). "Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor beta 1 with malignancy and vascularity in human gliomas." J Neuropathol Exp Neurol **56**(4): 435-9.
- Stubbs, M., P. M. McSheehy, et al. (2000). "Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment." Molecular Medicine Today **6**(1): 15-19.
- Stummer, W., S. Stocker, et al. (1998). "Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence." Neurosurgery **42**(3): 518-525; discussion 525-526.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-96.
- Supuran, C. T. "Carbonic anhydrase inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **20**(12): 3467-74.
- Supuran, C. T. (2008). "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators." Nat Rev Drug Discov **7**(2): 168-81.
- Supuran, C. T., F. Briganti, et al. (2001). "Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents?" Bioorganic and Medicinal Chemistry **9**(3): 703-714.
- Svastova, E., A. Hulikova, et al. (2004). "Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH." FEBS Letters **577**(3): 439-445.
- Svastova, E., N. Zilka, et al. (2003). "Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin." Exp Cell Res **290**(2): 332-45.
- Swietach, P., S. Patiar, et al. (2009). "The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths." J Biol Chem **284**(30): 20299-310.
- Swietach, P., R. D. Vaughan-Jones, et al. (2007). "Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 299-310.
- Swietach, P., S. Wigfield, et al. (2008). "Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths." J Biol Chem **283**(29): 20473-83.
- Taal, W., D. Brandsma, et al. (2008). "Incidence of early pseudo-progression in a cohort of malignant glioma patients treated with chemoradiation with temozolomide." Cancer **113**(2): 405-10.
- Tashian, R. E., D. Hewett-Emmett, et al. (2000). "Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs), and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains." Experientia **90**: 105-120.

- Teicher, B. A., S. D. Liu, et al. (1993). "A carbonic anhydrase inhibitor as a potential modulator of cancer therapies." Anticancer Res **13**(5A): 1549-56.
- Thews, O., B. Gassner, et al. (2006). "Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs." Neoplasia **8**(2): 143-52.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Torigoe, T., H. Izumi, et al. (2003). "Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP." Nucleic Acids Res **31**(15): 4523-30.
- Tsao, M. N., M. P. Mehta, et al. (2005). "The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **63**(1): 47-55.
- Tureci, O., U. Sahin, et al. (1998). "Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(13): 7608-7613.
- Ullrich, R. T., L. W. Kracht, et al. (2008). "Neuroimaging in patients with gliomas." Seminars in Neurology **28**(4): 484-494.
- Valk, P. E., C. A. Mathis, et al. (1992). "Hypoxia in human gliomas: demonstration by PET with fluorine-18-fluoromisonidazole." Journal of Nuclear Medicine **33**(12): 2133-2137.
- van den Bent, M. J., M. J. Taphoorn, et al. (2003). "Phase II study of first-line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglial tumors: the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study 26971." Journal of Clinical Oncology **21**(13): 2525-2528.
- van den Beucken, T., M. Koritzinsky, et al. (2009). "Hypoxia-induced expression of carbonic anhydrase 9 is dependent on the unfolded protein response." J Biol Chem **284**(36): 24204-12.
- van den Beucken, T., M. Koritzinsky, et al. (2006). "Translational control of gene expression during hypoxia." Cancer Biol Ther **5**(7): 749-55.
- van den Beucken, T., C. H. Ramaekers, et al. (2009). "Deficient carbonic anhydrase 9 expression in UPR-impaired cells is associated with reduced survival in an acidic microenvironment." Radiother Oncol **92**(3): 437-42.
- Van Meir, E. G., C. G. Hadjipanayis, et al. "Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma." CA Cancer J Clin **60**(3): 166-93.
- Vaupel, P., F. Kallinowski, et al. (1989). "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review." Cancer Research **49**: 6449-6465.
- Vaupel, P., F. Kallinowski, et al. (1989). "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review." Cancer Research **49**(23): 6449-6465.
- Vaupel, P., D. K. Kelleher, et al. (2001). "Oxygenation status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy." Seminars in Oncology **28**(2 Suppl 8): 29-35.

- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, et al. "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.
- Vermynen, P., C. Roufosse, et al. (1999). "Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic malignant lesions in non-small cell lung carcinoma." European Respiratory Journal **14**(4): 806-811.
- Vordermark, D., P. Kraft, et al. (2005). "Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha)." Cancer Letters **230**(1): 122-133.
- Warburg, O. (1930). The metabolism of the carcinoma cell. The metabolism of tumours. O. Warburg. London, Richard R. Smith: 22-48.
- Webb, S. D., J. A. Sherratt, et al. (1999). "Alterations in proteolytic activity at low pH and its association with invasion: a theoretical model." Clin Exp Metastasis **17**(5): 397-407.
- Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). "Malignant gliomas in adults." New England Journal of Medicine **359**(5): 492-507.
- Wen, P. Y., D. Schiff, et al. (2006). "Medical management of patients with brain tumors." J Neurooncol **80**(3): 313-32.
- Westermarck, B., J. Ponten, et al. (1973). "Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas." Acta Pathol Microbiol Scand A **81**(6): 791-805.
- Westphal, M., Z. Ram, et al. (2006). "Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial." Acta Neurochir (Wien) **148**(3): 269-75; discussion 275.
- Whittington, D. A., A. Waheed, et al. (2001). "Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(17): 9545-9550.
- Wick, W., C. Grimm, et al. (2001). "Ezrin-dependent promotion of glioma cell clonogenicity, motility, and invasion mediated by BCL-2 and transforming growth factor-beta2." J Neurosci **21**(10): 3360-8.
- Wick, W., M. Platten, et al. (2001). "Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta." J Neurooncol **53**(2): 177-85.
- Wiemels, J. L., J. K. Wiencke, et al. (2002). "History of allergies among adults with glioma and controls." International Journal of Cancer **98**(4): 609-615.
- Wiemels, J. L., D. Wilson, et al. (2009). "IgE, allergy, and risk of glioma: update from the San Francisco Bay Area Adult Glioma Study in the temozolomide era." Int J Cancer **125**(3): 680-7.
- Williams, A. C., T. J. Collard, et al. (1999). "An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis." Oncogene **18**(21): 3199-3204.
- Wingo, T., C. Tu, et al. (2001). "The catalytic properties of human carbonic anhydrase IX." Biochemical and Biophysical Research Communications **288**(3): 666-669.

- Winum, J. Y., M. Rami, et al. (2008). "Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents." Medical Research Reviews **28**(3): 445-463.
- Wolf, A., S. Agnihotri, et al. "Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme." Oncotarget **1**(7): 552-62.
- Wouters, B. G. and M. Koritzinsky (2008). "Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer." Nat Rev Cancer **8**(11): 851-64.
- Wykoff, C. C., N. J. Beasley, et al. (2000). "Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases." Cancer Research **60**(24): 7075-7083.
- Yasuda, S., S. Arii, et al. (2004). "Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance." J Hepatol **40**(1): 117-23.
- Yin, T., S. Yu, et al. (2008). "Correlation between the expression of aquaporin 1 and hypoxia-inducible factor 1 in breast cancer tissues." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **28**(3): 346-8.
- Yoo, H., S. Sohn, et al. "The expressions of carbonic anhydrase 9 and vascular endothelial growth factor in astrocytic tumors predict a poor prognosis." Int J Mol Med **26**(1): 3-9.
- Younes, M., R. W. Brown, et al. (1997). "Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival." Cancer **80**(6): 1046-51.
- Zagzag, D., H. Zhong, et al. (2000). "Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression." Cancer **88**(11): 2606-18.
- Zavada, J., Z. Zavadova, et al. (2000). "Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion." British Journal of Cancer **82**(11): 1808-1813.
- Zavada, J., Z. Zavadova, et al. (1993). "Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens." International Journal of Cancer **54**(2): 268-274.

## VI. Anlagen

### *Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen*

Abb.	Abbildung
AE	Anion Exchanger
Ak	Antikörper
ALA	Aminolävulinsäure
AP 1	Activating Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BMDCs	Bone Marrow Derived Cells
C	Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CA	Carboanhydrase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CD 133	neuronaler Stammzellmarker (Oberflächenantigen)
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CMV	Zytomegalie-Virus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure



---

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 $\alpha$
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
EZR	Extrazellulärraum
FCS	Fetales Calf Serum
fMRT	funktionale Magnetresonanztomographie
G2-Phase	Interphase des Zellzyklus
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
Gluc	Glucose
Gy	Gray
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HIF	Hypoxie-induzierter-Faktor
H <sub>2</sub> O	Wasser
HREs	Hypoxia Response Elements
HRP	Meerrettichperoxidase
HWZ	Halbwertszeit
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
INF $\alpha$	Interferon $\alpha$
kDa	Kilodalton
KPS	Karnofsky Performance Status
LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	Loss of Heterozygosity

---

mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
µg	Mikrogramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MGMT	O6-Methyl-Guanin-Methyl-Transferase
min	Minute
Mi-RNA	Micro-Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	mmol/Liter
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBC	Natrium-Bikarbonat-Kotransporter
NCIC	National Cancer Institute of Canada
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NSC	Non-Specific Control (Kontrollgruppe dieser Studie)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERK	im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte PKR (Protein-Kinase-R)-ähnliche Kinase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie

---

pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH
pH <sub>e</sub>	extrazellulärer pH
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
Pp IX	Protoporphyrin IX
qPCR	quantitative PCR
RPA	Recursive Partitioning Analysis
RT	Raumtemperatur
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SP 1	Specificity Protein 1
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (SPECT)
Tab.	Tabelle
TGF-β2	Transforming Growth Factor β
TMZ	Temozolomid
TSZ	Tumorstammzellen
UPR	Unfolded Protein Response
U251-P13	U251 Passage 13
VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
VHL	von Hippel-Lindau
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

## *Danksagung*

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihr Mitwirken maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alexander Brawanski für die Möglichkeit zur Erstellung einer experimentellen Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Martin Proescholdt für die Übernahme der Doktorvaterschaft, die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die engagierte Betreuung sowie für die Korrektur des Manuskripts. Seine wissenschaftlichen Kenntnisse und Erfahrungen sowie seine konstruktiven Ratschläge haben mich immer wieder motiviert und diese Arbeit wesentlich geprägt.

Vor allem danke ich Anette Lohmeier für die kompetente Unterstützung und die umfassende Betreuung während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit. Sie brachte mir die Grundlagen der Laborarbeit bei und begleitete mit ihrer langjährigen Erfahrung und ihrer großen Hilfsbereitschaft nicht nur meine experimentellen Versuche. Sie stand mir jederzeit fachlich wie auch menschlich zur Seite und wusste stets schwierige Probleme zu lösen. Außerdem möchte ich Eva-Maria Störr für die gute Organisation im Labor und die Unterstützung während der Durchführung der Experimente danken. Ihre fachliche Anleitung sowie ihre lehrreichen Ratschläge wusste ich immer zu schätzen.

Schlussendlich, aber an erster Stelle, gilt mein Dank meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und mich immer unterstützen in dem, was ich tue.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name:	Jana Paulina Teresa Baumgartner
Geburtsdatum/ -ort:	10.05.1988 in Freiburg im Breisgau
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig, keine Kinder
Konfession:	römisch-katholisch

## Beruflicher Werdegang

Seit 03/2014	Assistenzärztin in der Pädiatrie, Universitätsklinikum Freiburg, Prof. Dr. Ute Spiekerkötter
--------------	--

## Dissertation

10/2010 - 12/2012	„Die Effekte der Carboanhydrase IX-Inhibition auf die Chemo- und Strahlensensibilität von Glioblastomzellen“
	Betreuer PD Dr. Martin Proescholdt, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

## Ausbildung

### Akademische Bildung:

10/2007-12/2013	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
12/2013	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2009	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2012-06/2013	Praktisches Jahr:
3. Tertial:	Pädiatrie, Prof. Dr. Spiekerkötter, Universitätsklinikum Freiburg
2. Tertial:	Chirurgie, Prof. Dr. Oertli, Universitätsspital Basel
1. Tertial:	Innere Medizin, Prof. Dr. Müller-Schilling, Universitätsklinikum Regensburg

### Schulische Bildung:

09/1998-07/2007	Rotteck-Gymnasium, Freiburg
06/2007	Allgemeine Hochschulreife