Untersuchungen zur Expression und Funktion pH-regulatorischer Transporter beim Glioblastoma multiforme

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von:

Nicole Basler

geb. am 26.07.1982

in Nordhausen

Greifswald, 05.06.2013

Dekan: Prof. Dr. K. Fesser

1. Gutachter: Prof. H. K. Kroemer

2. Gutachter: Prof. M. Michaelis

Tag der Promotion: 23.10.2013

1 Einleitung ---------- 1

1.1 Gliome ---------- 1

1.1.1 Das Glioblastom ---------- 3

1.1.2 Die Standardtherapie des Glioblastoms ---------- 3

1.1.3 Nichtsteroidale Antiphlogistika als neue Therapieoptionen ---------- 1

1.2 Die Bedeutung des pH-Wertes ---------- 4

1.2.1 Der pH-Wert in gesunden Zellen ---------- 4

1.2.2 Der pH-Wert von Tumoren ---------- 5

1.3 pH-regulatorische Transporter ---------- 7

1.3.1 Die Natrium-Protonenaustauscher ---------- 7

1.3.2 Die Monocarboxylattransporter ---------- 11

1.3.3 Der Natriumabhängige Chlorid-Bicarbonat-Austauscher ---------- 14

2 Zielstellung dieser Arbeit ---------- 16

3 Material und Methoden ---------- 17

3.1 Material ---------- 17

3.1.1 Geräte und Hilfsmittel ---------- 17

3.1.2 Chemikalien und Substanzen ---------- 19

3.1.3 Puffer und Lösungen ---------- 22

3.1.4 Konzentrationen verwendeter Substanzen ---------- 24

3.1.5 Patientenmaterial ---------- 25

3.1.6 Vektoren ---------- 26

3.1.7 Bakterienstämme ---------- 26

3.1.8 Zelllinien ---------- 26

3.1.8.1 Glioblastomzelllinien ---------- 26

3.1.8.1.1 Die humanen Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG ---------- 26

3.1.8.1.2 Die murine Glioblastomzelllinie GL261 ---------- 26

3.1.8.2 Sonstige verwendete Zelllinien ---------- 27

3.1.8.2.1 HEK-293-Zellen (Human embryonic kidney 293 cells) ---------- 27

3.1.8.2.2 HeLa (Henrietta Lacks) ---------- 27

3.1.9 Nährmedien ---------- 28

3.1.10 Antibiotika ---------- 28

3.1.11 Enzyme ---------- 28

3.1.12 Primäre Antikörper ---------- 29

3.1.13 Sekundäre Antikörper ---------- 29

3.1.14 Kommerziell erhältliche Kits ---------- 30

3.1.15 TaqMan®-Gene Expression Assays von Applied Biosystems ---------- 30

3.1.16 Größenstandards ---------- 31

3.1.16.1 DNA-Größenstandard ---------- 31

3.1.16.2 Protein-Größenstandard ---- 31

3.2 Methoden ---- 32

3.2.1 Zellbiologische Methoden ---- 32

3.2.1.1 Zellkultur ---- 32

3.2.1.2 Kultivierung von Zellen ---- 32

3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen ---- 33

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl ---- 33

3.2.1.5 Aussaat von Zellen ---- 34

3.2.2 Molekularbiologische Methoden ---- 34

3.2.2.1 RNA-Isolierung mittels PeqGold RNAPure™ ---- 34

3.2.2.2 RNA-Isolierung aus Zellen ---- 35

3.2.2.3 RNA-Isolierung aus Patientenmaterial ---- 35

3.2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration ---- 36

3.2.2.5 Reverse Transkription ---- 36

3.2.2.6 Quantifizierung der RNA mittels real-time PCR (TaqMan™-Prinzip) ---- 37

3.2.3 Generierung überexprimierender LN18-Zellen ---- 40

3.2.3.1 Restriktion von DNA-Fragmenten durch Endonukleasen ---- 40

3.2.3.2 DNA-Agarosegelelektrophorese ---- 41

3.2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ---- 41

3.2.3.4 Ligation ---- 42

3.2.3.5 Transformation ---- 42

3.2.3.6 Isolation von Plasmid-DNA ---- 43

3.2.3.7 Sequenzierung ---- 43

3.2.3.8 Transfektion von LN18 Zellen mit Plasmid-DNA ---- 43

3.2.3.9 Selektion stabiler Transfektanten ---- 44

3.2.3.10 Klonierung von SLC16A1-pcDNA™3.1/Hygro(+) ---- 44

3.2.4 Proteinanalytische Methoden ---- 45

3.2.4.1 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz ---- 45

3.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz von Zellen ---- 45

3.2.4.3 Färbung mit dem Lebendfarbstoff MitoTracker® Red FM ---- 46

3.2.4.4 Indirekte Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten ---- 47

3.2.4.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ---- 47

3.2.4.6 Mitochondrienanreicherung über Antikörper-gekoppelte Magnetbeads ---- 49

3.2.4.7 Immunpräzipitation mit Protein-A-Sepharose ---- 50

3.2.4.8 Isolation von Gesamtprotein ---- 51

3.2.4.9 Bestimmung des Proteingehalts ---- 51

3.2.4.10 Western Blot ---- 52

3.2.4.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ---- 52

3.2.4.10.2 Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran ---- 53

3.2.5 Funktionelle Untersuchungen ---- 55

3.2.5.1 Bestimmung der Zellviabilität ---- 55

3.2.5.2 Intrazelluläre pH-Messung ---- 55
3.2.5.2.1 Bestimmung der Transporter-Aktivität ---- 57
3.2.6 Murines Gehirntumor-Modell ---- 58
3.2.6.1 Zellpräparation ---- 58
3.2.6.2 Versuchstiere ---- 58
3.2.6.3 Intrakranielle Inokulation von GL261-GFP-Zellen in C57BL/6-Mäuse ---- 58
3.2.6.4 Verabreichung von nichtsteroidalen Antiphlogistika ---- 60
3.2.6.5 Euthanasie und Organentnahme ---- 61
3.2.6.6 Gefrierschnitte von Mäusegehirnen ---- 61
3.2.7 Statistische Auswertung und graphische Darstellung ---- 62

4 Ergebnisse ---- 63

4.1 Expression pH-regulatorischer Transporter in Patientenproben ---- 63
4.1.1 Untersuchungen zur mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter ---- 63
4.1.1.1 Vergleich der Expression in Glioblastomen (WHO Grad IV), Gehirntumoren WHO Grad I-III und gesundem Gehirngewebe ---- 63
4.1.1.2 Interindividuelle Expressionsunterschiede in den Glioblastomproben ---- 64
4.1.2 Proteinexpression pH-regulatorischer Transporter ---- 66

4.2 *In-vitro*-Untersuchungen zu pH-regulatorischen Transportern ---- 67
4.2.1 Einfluss ausgewählter Zytostatika auf pH-regulatorische Transporter ---- 68
4.2.1.1 Einfluss von Zytostatika auf die mRNA-Expression der Transporter ---- 68
4.2.1.2 Einfluss der Zytostatika auf die Viabilität von Glioblastomzellen ---- 71
4.2.1.3 Einfluss der Zytostatika auf die Proteinexpression ausgewählter Transporter ---- 73
4.2.2 Einfluss ausgewählter nichtsteroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) auf pH-regulatorische Transporter ---- 77
4.2.2.1 Einfluss der NSAIDs auf die mRNA-Expression ausgewählter Transporter ---- 77
4.2.2.2 Einfluss der NSAIDs auf die Viabilität von Glioblastomzellen ---- 80
4.2.2.3 Einfluss der NSAIDs auf die Proteinexpression ausgewählter Transporter ---- 82
4.2.3 Funktionelle Untersuchungen der pH-regulatorischen Transporter ---- 86
4.2.3.1 NHE1-Phosphorylierungsgrad ---- 86
4.2.3.2 Untersuchungen zum intrazellulären pH-Wert (pH_i) von Glioblastomzellen ---- 87
4.2.3.2.1 Einfluss ausgewählter Substanzen auf den pH_i von LN18-Zellen ---- 89
4.2.3.2.2 Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Aktivität pH-regulatorischer Transporter 90
4.2.3.2.2.1 Beeinflussung der MCT-Aktivität ---- 90
4.2.3.2.2.2 Beeinflussung der NHE1-Aktivität ---- 93
4.2.3.3 Lokalisation von NHE1 in subzellulären Organellen ---- 95
4.2.3.3.1 Immunfluoreszenzaufnahmen zur NHE1-Lokalisation ---- 96
4.2.3.3.2 Nachweis von NHE1 in Mitochondrien ---- 98
---- 98
4.2.3.4 Zeitabhängige Veränderung der Transporterlokalisation nach NSAID-Gabe ---- 99

4.2.4 Generierung überexprimierender Zellen ----------103
4.2.4.1 Identifizierung und Charakterisierung überexprimierender Klone ----------103
4.2.4.2 Einfluss ausgewählter Substanzen auf den pH_i und die Aktivität der MCT1-überexprimierenden Zellen ----------110
4.2.4.2.1 Bestimmung der MCT-Aktivität der MCT1-überexprimierenden Zellen nach Substanzgabe ----------111

4.3 *In-vivo*-Untersuchungen zum Einfluss von NSAIDs auf das Wachstum von Glioblastomzellen ---------- 112

4.3.1 Etablierung eines murinen Gehirntumormodells ----------112
4.3.2 Einfluss von Ibuprofen auf das Tumorwachstum *in vivo* ----------115
4.3.2.1 Expression pH-regulatorischer Transporter im murinen Glioblastommodell ----------119

5 Diskussion ---------- 122

5.1 Expression pH-regulatorischer Transporter in humanen Glioblastomproben 123

5.2 *In-vitro*-Untersuchungen zu pH-regulatorischen Transportern ---------- 128

5.2.1 Einfluss von Zytostatika auf die Expression und Aktivität pH-regulatorischer Transporter 128
5.2.2 Einfluss von NSAIDs auf die Expression und Aktivität pH-regulatorischer Transporter 132
5.2.3 Subzelluläre Lokalisation von NHE1 in humanen Glioblastomzellen----------138
5.2.4 Nachweis unterschiedlich großer NHE1-Varianten ----------139

5.3 *In-vivo*-Untersuchungen zum Einfluss von Ibuprofen auf das Wachstum von Glioblastomzellen ---------- 142

6 Zusammenfassung ---------- 146

7 Eidesstattliche Erklärung ---------- 148

8 Danksagung ---------- 149

9 Publikationen ---------- 150

10 Literaturverzeichnis ---------- 151

11 Anhang ---------- 157

11.1 Tabellarische Übersicht der mRNA-Expression pH-regulatorischen Transporter unter Zytostatikaeinfluss in LN18- und U87MG-Zellen ---------- 157

11.2 Tabellarische Übersicht der mRNA-Expression pH-regulatorischen Transporter unter NSAID-Einfluss in LN18- und U87MG-Zellen ---------- 159

11.3 Nukleotidsequenzvergleich der NHE1-Transkripte ---------- 161

11.4 Proteinsequenzvergleich der NHE1-Transkripte ---------- 166

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Destilliertes Wasser (*Aqua destillata*)
AK	Antikörper
AMP	Adenosin-5´-monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (*bicinchonic acid*)
BCECF-AM	2', 7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-Acetoxymethylester
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches AMP (*cyclic AMP*)
cDNA	Komplementäre DNA (*complementary DNA*)
cGMP	Zyklisches GMP (*cyclic GMP*)
COX	Cyclooxygenase
ds	Doppelsträngig (*double stranded*)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	*Dulbecco`s Minimal Essential Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
DPBS	*Dulbecco`s Phosphate buffered saline*
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	*Enhanced Chemiluminescence*
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetales Kälberserum (*fetal calf serum*)
GFP	*Green fluorescent protein*
GMP	Guanosinmonophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*)
IP	Immunpräzipitation

LB-Medium	*Luria-Bertani-Medium*
MEM	*Minimal Essential Medium*
NEAS	Nicht-essentielle Aminosäuren (*non essential amino acids)*
NSAID	nichtsteroidales Antiphlogistikum
mRNA	*Messenger* RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung (*Phosphate buffered saline*)
pCMB	p-Chlormercuribenzoesäure
PCR	Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*)
PCV-Therapie:	kombinierte Therapie mit Procarbazin, Lomustin (CCNU) und Vincristin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (*standard deviation*)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes *(standard error of the mean)*
SLC	*Solute-linked carrier*
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (*tris buffered saline*)
TBST	Tween20-haltige Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethyl-ethylen-diamin
TMD	Transmembranäre Domäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Gliome

Statistisch betrachtet erkrankt jeder zweite Mann und fast jede zweite Frau in Deutschland einmal im Leben an einem Tumor (*1*). Die absoluten 5-Jahres-Überlebensraten zeigen, dass 40-50% aller Erkrankten innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung sterben. Krebserkrankungen stellen somit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Das Bronchialkarzinom ist bei Männern mit knapp 26% die häufigste tödliche Krebserkrankung, bei Frauen steht das Mammakarzinom mit ca. 17% an erster Stelle. Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) liegen mit 2,6% bei beiden Geschlechtern im mittleren Bereich der Häufigkeitsverteilung (Abb. 1-1).

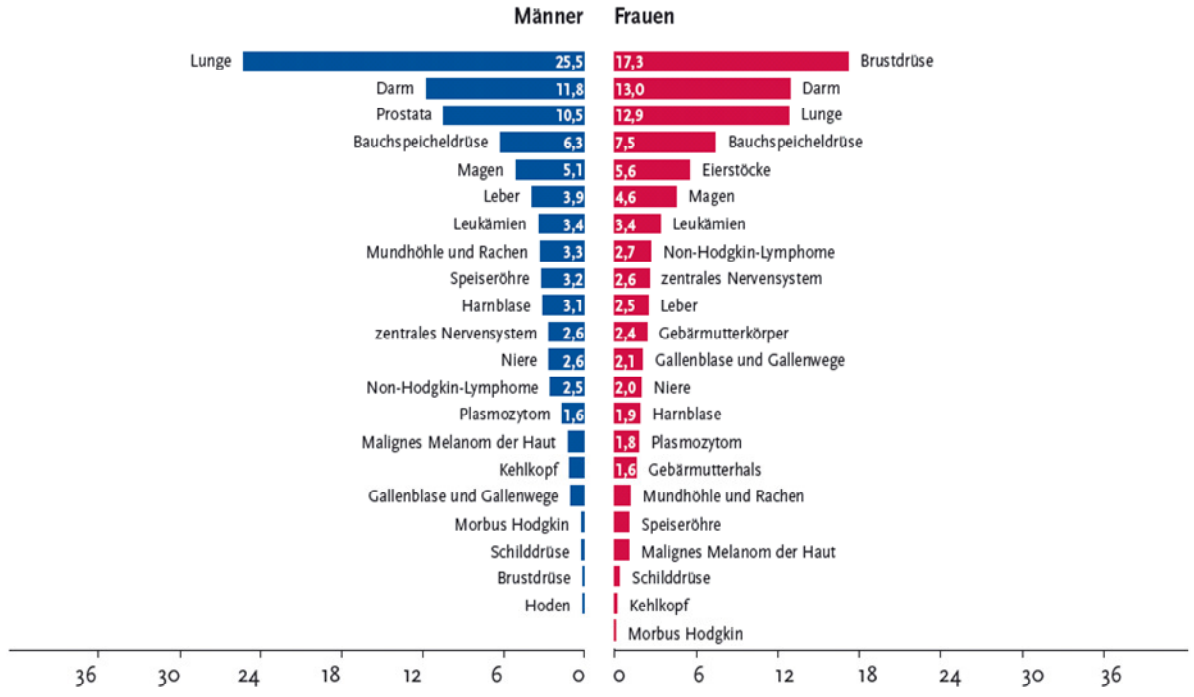


Abb. 1-1 Prozentuale Verteilung der am häufigsten von Tumoren betroffenen Organe bezogen auf alle Krebssterbefälle 2008 in Deutschland (entnommen aus: Krebs in Deutschland 2007/2008, Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.) (1)

In Deutschland erkranken ca. 7000 Menschen jährlich an einem Tumor des ZNS. 95% der Fälle betreffen das Gehirn und den Hirnstamm. Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate bei ZNS-Tumoren liegt zwischen 17% bei Männern und 21% bei Frauen. Im Kindesalter sind Gehirntumoren die häufigsten Krebserkrankungen nach Leukämien (*1*).

ZNS-Tumoren werden nach ihrem zellulären Ursprung und dem WHO-Grad (World Health Organization) eingeteilt. Der Tumor kann aus den verschiedenen Zellarten im ZNS, wie Gliazellen, Lymphozyten oder Zellen der Hirnhäute hervorgehen. Die häufigsten Gehirntumoren sind Gliome (Astrozytom, Glioblastom, Oligodendrogliom), Medulloblastome, Meningeome, Lymphome und Hypophysenadenome. Um eine weltweit vergleichbare Klassifizierung zu erreichen, werden seit 1979 alle Tumoren von der WHO in vier Grade eingeteilt. Tumoren des WHO-Grades I haben ein geringes proliferatives Potential und es besteht die Möglichkeit, dass nach einer operativen Entfernung Heilung eintritt. Grad-II-Tumoren sind ebenfalls durch eine geringe Proliferationsaktivität gekennzeichnet, treten aber nach der chirurgischen Entfernung häufig wieder auf und können zu höhergradigen Tumoren transformieren. Die Überlebensprognose liegt hier bei über fünf Jahren. Tumoren des WHO-Grades III zeigen charakteristische histologische Veränderungen wie atypische Zellkerne und erhöhte mitotische Aktivität. Die Überlebensprognose liegt hier bei zwei bis drei Jahren. Grad-IV-Tumoren weisen weitere zytologische Veränderungen wie Nekrosen und eine sehr weit fortgeschrittene Infiltrierung des umliegenden Gewebes auf. Grad-IV-Tumoren sind assoziiert mit einem schnellen prä- und postoperativen Krankheitsverlauf (*2*). Die Prognose der Grad-IV-Tumoren hängt stark vom Tumortyp und der Behandlung ab. Bei Grad-IV-Neoplasien wie dem Medulloblastom liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 60%, wenn eine kombinierte Behandlung aus Bestrahlung und Chemotherapie durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu verstirbt ein Großteil der Patienten mit einem Glioblastom innerhalb eines Jahres, trotz multimodaler Therapie.

Der Hauptteil aller ZNS-Tumoren geht aus Gliazellen hervor. Diese Tumoren werden unter dem Begriff Gliome zusammengefasst und sind in allen vier WHO-Graden vertreten (Tab 1-1). Zu den Gliazellen gehören Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependym-Zellen, deren physiologische Funktion im Nährstoff- und Sauerstofftransport für Neuronen besteht. Zudem sind sie an komplexen Signaltransduktions- und Neurotransmissions-Vorgängen beteiligt.

Tab 1-1 Einteilung verschiedener Gliome nach dem WHO-Grad (modifiziert nach Louis et al.) (2)

	WHO-Grad I	**WHO-Grad II**	**WHO-Grad III**	**WHO-Grad IV**
Astrozytäre Tumoren	Pilozytisches Astrozytom	Diffuses Astrozytom	Anaplastisches Astrozytom	Glioblastom
Oligodendrogliäre Tumoren		Oligodendrogliom	Anaplastisches Oligodendrogliom	
Oligoastrozytäre Tumoren		Oligoastrozytom	Anaplastisches Oligoastrozytom	
Ependymale Tumoren	Subependymom	Ependymom	Anaplastisches Ependymom	

1.1.1 Das Glioblastom

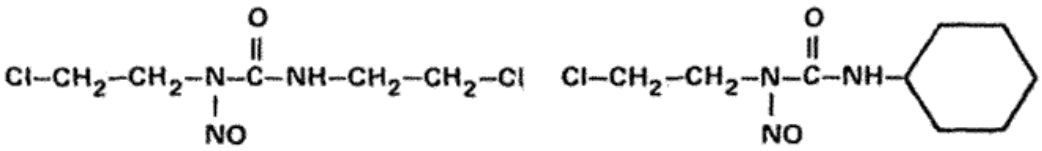
Das Glioblastom stellt den häufigsten und aggressivsten Vertreter maligner Gliome dar. Eigenschaften des Glioblastoms, die dessen Aggressivität begünstigen und die Therapie erschweren, sind eine erhöhte Angiogenese, eine starke Infiltrierung des umliegenden Gewebes, eine unkontrollierte Proliferation und eine Resistenz gegenüber Apoptose (*3*), (*4*). Des Weiteren konnte in den letzten Jahrzehnten eine erhöhte Hypoxie sowie eine vermehrte Laktatproduktion und gesteigerte glykolytische Aktivität in Glioblastomen gezeigt werden. Das extrazelluläre Milieu ist stark angesäuert und die Tumorzellen weisen einen alkalischen intrazellulären pH (pH_i) auf (*5*).

Das Alter der Patienten stellt einen wichtigen prognostischen Faktor beim Glioblastom dar. Je älter der Patient bei der Diagnosestellung ist, umso schlechter ist die Überlebensprognose. Die mediane 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter drei Prozent (*6*), wobei die Überlebensrate von 13% bei den 15-45-jährigen Patienten auf unter 1% bei den über 75-Jährigen sinkt. 60% aller Glioblastom-Patienten sind zwischen 55 und 74 Jahren alt. Das Alter bei Diagnosestellung spielt ebenfalls eine Rolle bei den Subtypen des Glioblastoms. Das Glioblastom kann in zwei Subtypen unterteilt werden: das primäre und das sekundäre Glioblastom. Primäre Glioblastome stellen den größten Anteil dar und sind vorwiegend bei älteren Patienten zu finden. Sie weisen vorrangig Deletionen im Gen für die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) sowie Amplifikationen des EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Gens auf. Sekundäre Glioblastome sind seltener und kommen vorrangig bei Patienten unter 45 Jahren vor. Sie entwickeln sich über eine Zeitspanne von fünf bis zehn Jahren aus niedrig-gradigeren Gliomen und zeigen häufig Mutationen im kodierenden Bereich des Tumorsuppressorgens p53 (*7, 8*). Am primären Glioblastom erkranken häufiger Männer, sekundäre Glioblastome treten hingegen vermehrt bei Frauen auf. Grundsätzlich erkranken Männer im Durchschnitt 1,5mal häufiger an einem Glioblastom als Frauen (*7, 9*).

1.1.2 Die Standardtherapie des Glioblastoms

Die Therapie der Wahl beim Glioblastom ist die chirurgische Entfernung. Durch die hohe Infiltrationsrate ist jedoch eine vollständige Resektion in der Regel nicht möglich, so dass eine nachfolgende Strahlentherapie und/oder Chemotherapie notwendig ist. Als Chemotherapeutika werden u.a. Carmustin, Lomustin, Temozolomid, Teniposid und Vincristin verwendet (*10*). Carmustin, Lomustin (Abb. 1-2) und Temozolomid (Abb. 1-3 S) sind alkylierende Substanzen. Durch Einfügen einer Alkylgruppe wird die DNA- und auch die

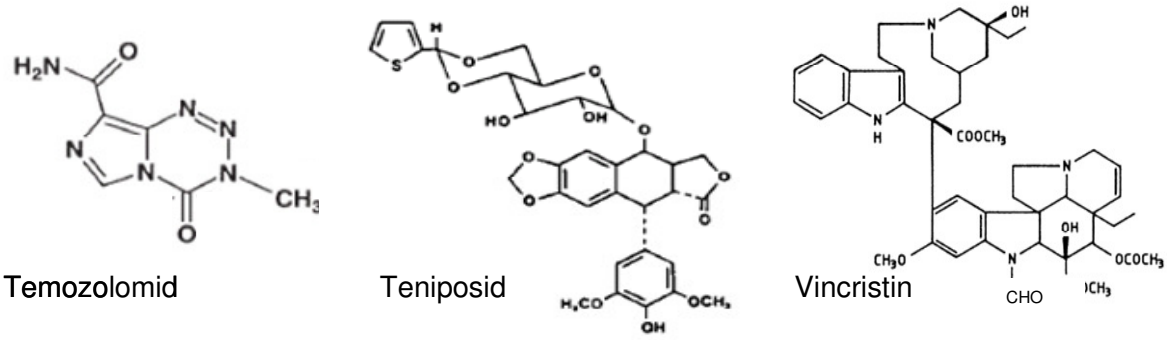
RNA-Synthese gestört. Außerdem können Vernetzungen zwischen den DNA-Strängen auftreten und somit die Aufwindung der Doppelhelix im Rahmen der Replikation verhindern (*11, 12*). Die Nitrosoharnstoffe Carmustin und Lomustin können als Monotherapeutika oder in Kombination mit weiteren Zytostatika eingesetzt werden. In der sogenannten PCV-Kombination wird Lomustin mit Procarbazin und Vincristin verwendet. Mit Carmustin beschichtete Polymere werden als lokale Therapie in die Resektionshöhle eingebracht wodurch Carmustin in das verbleibende Tumorgewebe penetriert (*10*).



Carmustin Lomustin

Abb. 1-2 Strukturformeln der Nitrosoharnstoffe Carmustin und Lomustin (entnommen aus Weiss *et al.*) (*11*)

Temozolomid ist eine Imidazotetrazin-Verbindung und wird als Vorstufe (*prodrug*) verabreicht. Bei physiologischem pH zerfällt Temozolomid spontan zu Monomethyl-triazen-imidazol-carboxamid (MITC), welches weiter in Amino-imidazol-carboxamid (AIC) und ein Methyldiazonium-Ion zerfällt, das für die Methylierung von Guanin verantwortlich ist (*13, 14*). Temozolomid wird als Standardtherapie in Verbindung mit einer Radiotherapie bei allen neu diagnostizierten Glioblastomen verwendet (*15, 16*). Durch diese kombinierte Therapie konnte in den letzten Jahren die mediane Überlebenszeit von 12,1 auf 14,6 Monate erhöht werden (*4, 17*).



Temozolomid Teniposid Vincristin

Abb. 1-3 Strukturformeln von Temozolomid, Teniposid und Vincristin (entnommen aus Holthuis *et al.*, Koukourakis *et al.*, Gidding *et al.*) (*18*), (*13*), *(19)*

Teniposid (Abb. 1-3) ist ein Epipodophyllotoxin-Derivat und wirkt als Topoisomerase-II-Inhibitor. Durch die Interaktion von Teniposid mit dem Topoisomerase-Komplex kommt es zum Arrest der mitotischen Zellen sowie zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA. In der Glioblastomtherapie wird es bei Rezidiven in einer Kombinationstherapie verwendet (*18*).

Vincristin (Abb. 1-3) gehört zu den Vinca-Alkaloiden und wird in der kombinierten Therapie (PCV) eingesetzt. Es bindet an Tubulin, verhindert durch Interaktionen mit dem Spindelapparat die Chromosomenseparation und inhibiert somit die Mitose. Des Weiteren wird der intrazelluläre Transport durch Störung des Mikrotubuli-Aufbaus vermindert (*19, 20*).

Trotz verbesserter chirurgischer Techniken, neuen Entwicklungen in der Radiotherapie und kombinierten Ansätzen aus klassischer Chemotherapie und zielgerichteten Therapien (Tyrosinkinaseinhibitoren, Antikörper gegen Wachstumsfaktoren) bleibt das Glioblastom einer der aggressivsten und tödlichsten Gehirntumore.

1.1.3 Nichtsteroidale Antiphlogistika als neue Therapieoptionen

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID, *nonsteroidal anti-inflammatory drug*) sind strukturell unterschiedliche Verbindungen. Allen ist jedoch gemein, dass sie das Enzym Cyclooxygenase (COX) hemmen (*21*). Die COX katalysiert die Synthese von Prostaglandin H2 aus Arachidonsäure, welches anschließend durch verschiedene Prostaglandinsynthasen zu weiteren Prostaglandinen verstoffwechselt wird (Abb. 1-4) (*22*). Allgemein dienen Prostaglandine als Botenstoffe bei physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Wundheilung oder der Aufrechterhaltung einer intakten Magenschleimhaut. Sie sind aber auch an pathologischen Zuständen, wie der Inflammation, Fieber und Schmerzvermittlung beteiligt (*23*). In den vergangenen Jahren wurde zudem eine Beteiligung von Prostaglandinen an neoplastischen Abläufen, wie der Stimulierung des Tumorzellwachstums und der Angiogenese beschrieben (Abb. 1-4). Des Weiteren sind Prostaglandine mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Radiotherapie durch gesteigerte Reparaturmechanismen (*24*) sowie einer Modulation von Tumorzell-Adhäsion und -Motilität assoziiert (*25-27*).

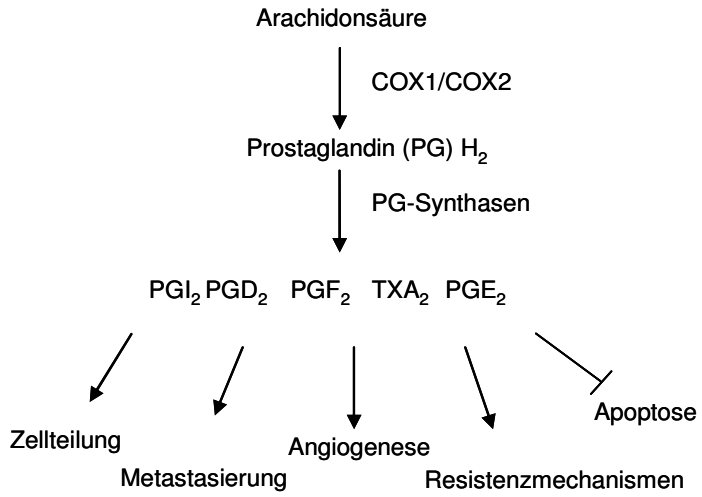


Abb. 1-4 Prostaglandinsynthese und neoplastische Effekte (modifiziert nach Grösch *et al.) (22)*
PG: Prostaglandin, TXA: Thromboxan

Es existieren zwei Isoformen der Cyclooxygenase (COX), die COX1 und die COX2. Die COX1 wird konstitutiv in zahlreichen Geweben exprimiert. Die Expression der COX2 wird durch proinflammatorische Zytokine, aber auch durch Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren, Hormone und Onkogene induziert (*23, 28*). Eine Überexpression der COX2 konnte in einer Vielzahl von Tumoren beobachtet werden. In Gliomen, aber auch im Kolorektalkarzinom, Magenkarzinom und Adenokarzinom ist die COX2-Expression mit einer statistisch signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit assoziiert. Shono *et al.* (*29*) zeigten zudem, dass in Gliomen eine gesteigerte COX2-Expression mit einem erhöhten Tumorgrad korreliert. Diese Ergebnisse rückten die NSAIDs erneut in den Fokus als potentielle neue Tumortherapeutika. Bereits seit den 1980er Jahren wird die Wirkung von NSAIDs auf Tumoren untersucht. Erste Studien zeigten eine verminderte kolorektale Karzinogenese nach Einnahme von Aspirin (*21, 30*). Bereits 1988 beschrieb die Arbeitsgruppe um Farrel *(30)* in einem Glioma-Modell der Ratte eine verminderte Tumorgröße bei Gabe von Ibuprofen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist Celecoxib als einziges NSAID in der Chemoprävention von Kolorektalkarzinomen bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis zugelassen (*31*).

Celecoxib ist ein selektiver, nicht-kompetitiver COX2-Inhibitor (Abb. 1-5). Weitere Vertreter dieser Substanzklasse sind Rofecoxib, Valdecoxib und Lumiracoxib, wobei Lumiracoxib die höchste Selektivität für die COX2 aufweist (*32*). Ursprünglich wurden die sogenannten Coxibe entwickelt um NSAID-typische Nebenwirkungen wie gastrointestinale Störungen und Nierenfunktionsstörungen zu vermeiden. Diese Nebenwirkungen treten vor allem durch die Hemmung der COX1 auf (*33*). Die Wirkung von Celecoxib auf das Wachstum von Gliomen

wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht. Arbeiten an humanen Glioma-Zelllinien zeigten, dass Celecoxib das invasive Potenzial der Zellen vermindert und einen Zellzyklusarrest induziert (*34*). Auch nach Inkubation mit Rofecoxib wurde ein Arrest im Zellzyklus nachgewiesen (*22*). In einem Maus-Modell mit intrazerebraler Implantation der humanen Glioblastomzelllinie U87MG konnte die Gesamtüberlebenszeit durch eine Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Celecoxibgabe verlängert werden (*24*). Erste Studien an Glioblastom-Rezidiv-Patienten, die mit einer Kombination aus Celecoxib und niedrig dosiertem Temozolomid (*35*) bzw. mit einer Therapie aus Celecoxib, Temozolomid, 6-Thioguanin und Capecitabin behandelt wurden (*36*), zeigten jedoch keine signifikanten Effekte auf das mittlere Gesamtüberleben der Patienten.

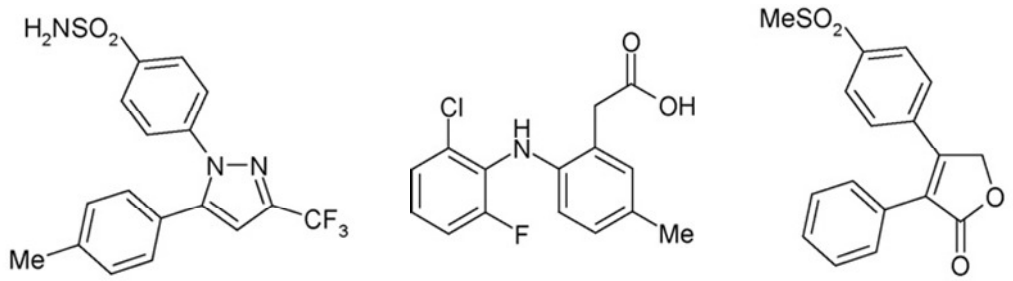


Abb. 1-5 Strukturformeln der COX2-selektiven NSAIDs Celecoxib, Lumiracoxib und Rofecoxib (entnommen aus: Bingham *et al.*) (*37*)

Neben den Coxiben werden auch COX-unselektive NSAIDs (Abb. 1-6) wie Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Diclofenac oder Indomethacin auf ihre antineoplastische Wirkung hin untersucht.

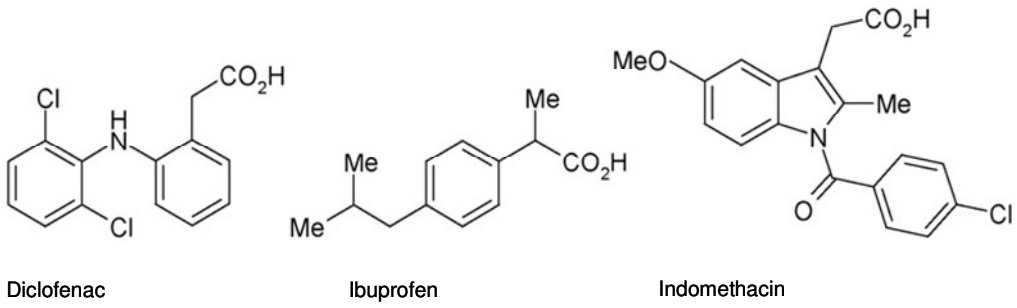


Abb. 1-6 Strukturformeln der COX-unselektiven NSAIDs Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin (entnommen aus: Bingham *et al.*) (*37*)

Diclofenac und Indomethacin sind Essigsäure-Derivate und sehr starke Inhibitoren beider Cyclooxygenasen. Der schwache nichtselektive COX-Hemmstoff Ibuprofen ist ein Arylpropionsäure-Derivat. Acetylsalicylsäure und Indomethacin reduzieren das Wachstum

von Ratten-Gliomazellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (*27*). Bei Anthrazyklin-resistenten Zellen konnte die Resistenz durch die Gabe von Ibuprofen und Diclofenac vermindert werden (*38*). Indomethacin bewirkt einen Zellzyklusarrest und einen Caspase-unabhängigen Zelltod in humanen Glioblastom-Zellen (*28*). Auch Ibuprofen zeigt eine zytotoxische Wirkung auf Glioma-Zelllinien (*39*).

Auf die alleinige Hemmung der Cyclooxygenasen ist die antineoplastische Wirkung der NSAIDs nicht zurückzuführen. In Untersuchungen wurden Effekte verschiedener Coxibe auf Tumorzellen nachgewiesen, welche keine COX2-Expression aufwiesen. Das Celecoxib-Derivat 2,5-Dimethyl-Celecoxib besitzt kein COX2-inhibitorisches Potential, wirkt aber dennoch antiproliferativ auf Tumorzellen (*40*). Der Zellzyklusarrest nach Gabe von Celecoxib und Rofecoxib kann durch Prostaglandin E2 nicht aufgehoben werden, was ebenfalls für einen COX-unabhängigen Mechanismus spricht (*34*). Des Weiteren interagieren die verschiedensten NSAIDs mit Transkriptionsfaktoren, wie NFκB, dessen Translokation in den Zellkern durch Ibuprofen und Sulindac inhibiert werden kann (*41*). Zudem wird die Expression von anti-apoptotischen Faktoren nach Gabe von Celecoxib und Sulindac-Sulfon vermindert, was die Apoptoseinduktion begünstigt (*22, 42*). Diese genannten antineoplastisch wirkenden Mechanismen laufen unabhängig von der Inhibition der Cyclooxygenasen ab.

1.2 Die Bedeutung des pH-Wertes

1.2.1 Der pH-Wert in gesunden Zellen

Die Kontrolle und Regulation des pH-Wertes ist für Eukaryoten und Prokaryoten unverzichtbar (*43*). Der physiologische intrazelluläre pH (pH_i) liegt im Bereich von 7-7,4 (*44*). Den pH_i innerhalb dieses physiologischen pH-Bereichs konstant zu halten, ist die Voraussetzung für viele zelluläre Vorgänge. Eine entscheidende Rolle bei der Regulation des pH_i spielt der Membrantransport von Protonen. Zudem ist der Aufbau von Protonengradienten für eukaryotische Zellen essentiell. Der pH_i und der Protonenfluss werden durch den primär-aktiven oder sekundär-aktiven Transport von Protonen durch verschiedene Transporter reguliert (*43, 45*). ATPasen, Kationen-Protonentransporter und Anionenaustauscher sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Organellen sind wesentliche Bestandteile der pH-Regulation. Der Zellzyklus, die Proliferation, die Volumenregulation, die Signaltransduktion, die Exozytose und weitere Vorgänge beim Metabolismus und der Zellfunktion sind vom pH_i und dem Protonenfluss abhängig (*44, 46*). Die Aktivität einiger Enzyme, wie der Phosphofruktokinase als wichtiger Regulationspunkt der Glykolyse, aber auch die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 zur Initiierung

der Proteinsynthese sind anfällig gegenüber Veränderungen im pH_i. Auch die Effizienz kontraktiler Elemente und die Leitfähigkeit von Ionenkanälen können durch pH_i-Veränderungen beeinflusst werden.

Im Gehirn ist die pH-Regulation von zentraler Bedeutung und wird durch die gleichen Regulationsmechanismen wie in den anderen Geweben gewährleistet. Die Erregbarkeit von Zellen, die Ausbildung des Membranpotentials und die synaptische Transmitterfreisetzung sind Beispiele für Vorgänge, welche maßgeblich durch den pH beeinflusst werden (*46, 47*). So spielen in Gliazellen natriumabhängige Protonentransporter und Monocarboxylattransporter sowie Bicarbonat-Transporter eine wichtige Rolle bei der pH-Regulation.

1.2.2 Der pH-Wert von Tumoren

An der Entstehung von Tumoren ist eine Vielzahl von Prozessen beteiligt. Unabhängig von ihrer Entstehung ist jedoch allen Tumorzellen gemein, dass sie Defekte in Mechanismen aufweisen, welche die Proliferation und die Homöostase der Zelle regulieren. Ein in Tumorzellen veränderter Mechanismus ist die Aufrechterhaltung bzw. Regulation des pH_i. Schon seit Mitte des letzten Jahrhunderts wird vermutet, dass sich solide Tumoren von gesundem Gewebe durch abweichende pH-Werte unterscheiden. Bis 1995 wurde angenommen, dass der pH_i in Tumoren saurer ist als in gesundem Gewebe. Diese Vermutung beruhte zum einen auf der These von Warburg (1956), dass Tumoren vermehrt Laktat bilden und die Zelle damit ansäuern, zum anderen bestätigten die verwendeten Messmethoden diese Hypothese. Der pH im Gewebe wurde durch Mikroelektroden bestimmt, hierbei wurde aber hauptsächlich der extrazelluläre pH (pH_e) gemessen (*48*). Im Jahr 1995 stellten Stubbs *et al.* (*48*) mittels Magnet-Resonanz-Spektroskopie fest, dass in Morris-Hepatomen der pH_i alkalisch und nur der pH_e sauer ist. Heute sind die intrazelluläre Alkalisierung und die Ansäuerung des Extrazellularraumes anerkannte Charakteristika von soliden Tumoren.

Die Ausbildung eines alkalischen pH_i ist ein frühes Ereignis bei der malignen Transformation von Zellen und spielt eine zentrale Rolle sowohl bei der neoplastischen Transformation als auch bei der Progression von Tumoren (*49*). Reshkin *et al.* (*50*) zeigten, dass die maligne Transformation von NIH3T3-Zellen und humanen Keratinozyten durch das E7-Onkogen des humanen Papillomavirus 16 an eine Alkalisierung des Intrazellulärraumes gekoppelt ist. Der Anstieg des pH_i führt zu einer Stimulation des glykolytischen Metabolismus. Die pathologische Alkalose und die hohe Glykoserate sind zwei prinzipielle Eigenschaften von Tumoren (*49*).

Durch den alkalischen pH_i werden zahlreiche Prozesse gefördert, die das Tumorwachstum begünstigen. Ein erhöhter pH_i korreliert mit einem gesteigerten Metabolismus und einer vermehrten Proliferation, da Enzyme für die DNA- und RNA-Synthese ihre pH-Optima im alkalischen Bereich haben (*51*). Eine unkontrollierte Proliferation durch den Verlust der Zellzyklus-Kontrolle kann ebenfalls pH-vermittelt sein. In über der Hälfte aller Tumoren liegt eine Mutation des Tumorsuppressors p53 vor, welcher den Zellzyklus reguliert und bei DNA-Schäden Reparaturmechanismen aktiviert oder die Apoptose einleitet. Einige der Mutationen können die Bildung eines stabilen p53-Tetramers beeinflussen und somit die Aktivität des Proteins herabsetzen. Ein alkalischer pH_i führt zu einer verminderten Stabilität dieses Komplexes und somit zum Funktionsverlust von p53 (*52*).

Die Resistenz vieler Tumorzellen gegenüber Apoptose ist ebenfalls eng mit dem Anstieg des pH_i verknüpft (*53-57*). Kennzeichen von apoptotischen Zellen sind u.a. die Ansäuerung des Zytosols, das Schrumpfen des Zellvolumens und die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen. Die Aktivierung der Endonuklease DNaseII erfolgt erst bei pH-Werten im sauren Bereich. Im alkalischen Milieu ist dieses Enzym nicht aktiv und eine DNA-Fragmentierung durch die DNaseII wird vermindert (*53-55*). Die Regulation des Zellvolumens wird u.a. durch die Aktivierung des Natrium-Protonenaustauschers beeinflusst. Eine erhöhte volumenregulierende Kapazität von Tumorzellen korreliert mit der Resistenz dieser Zellen gegenüber Apoptose (*56*). Die Prozessierung von Caspase3 und Caspase9 aus ihren Vorläuferformen wird zudem durch alkalische Bedingungen vermindert (*57*), dies unterstützt ebenfalls die Ausbildung einer Apoptoseresistenz bei alkalischen pH_i.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Progression von Tumoren ist die veränderte Verteilung und Wirkung von Chemotherapeutika durch den veränderten pH-Gradienten. Durch den sauren pH_e können schwache Säuren ungeladen in die Zelle gelangen. Dort werden sie deprotoniert und es kann zur Akkumulation im Zytosol kommen. Basische Medikamente hingegen können nach der Protonierung im Extrazellularraum die Membran als geladene Verbindungen nicht passieren (*58*). Auch innerhalb des Tumorgewebes kann sich der pH_e unterscheiden. In gefäßnahen Bereichen ist der pH_e weniger sauer als in hypoxischen, gefäßentfernten Gebieten. Dieser pH_e-Gradient hat Einfluss auf die Verteilung von Pharmaka im gesamten Tumorgewebe (*59*).

Durch eine häufig auftretende Hypoxie kommt es in soliden Tumoren zur Umstellung des Metabolismus. Im Anschluss an die Glykolyse wird ein Großteil des gebildeten Pyruvats zu Laktat verstoffwechselt. Um die Ansäuerung der Zelle durch die anfallenden Stoffwechselprodukte zu verhindern, werden pH-regulatorische Transportproteine exprimiert. Durch den Auswärtstransport von Protonen und Laktat kommt es zur Ansäuerung des pH_e. Der azide pH_e fördert die Zellmigration und Tumormetastasierung (*60*). Die bei Tumoren häufig auftretende Resistenz gegenüber Zytostatika (MDR, *multi drug resistance*) kann durch

das saure extrazelluläre Milieu ebenfalls begünstigt werden. In Untersuchungen an Prostatakrebszellen konnte belegt werden, dass die Aktivität des Effluxtransporters P-Glykoprotein im sauren pH_e erhöht ist (*61*).

Die auftretende Hypoxie, die Ansäuerung des Extrazellularraums und der alkalische pH_i begünstigen die genomische Instabilität und fördern das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors (Abb. 1-7). Der alkalische pH_i und der saure pH_e in Tumoren wird vorrangig von Protonenpumen, Natrium-Protonenaustauschern, Bicarbonat-Transportern und Monocarboxylattransportern aufrecht erhalten (*62*). Eine Regulation dieser pH-regulatorischen Transporter durch antikanzerogene Substanzen ist bisher kaum untersucht.

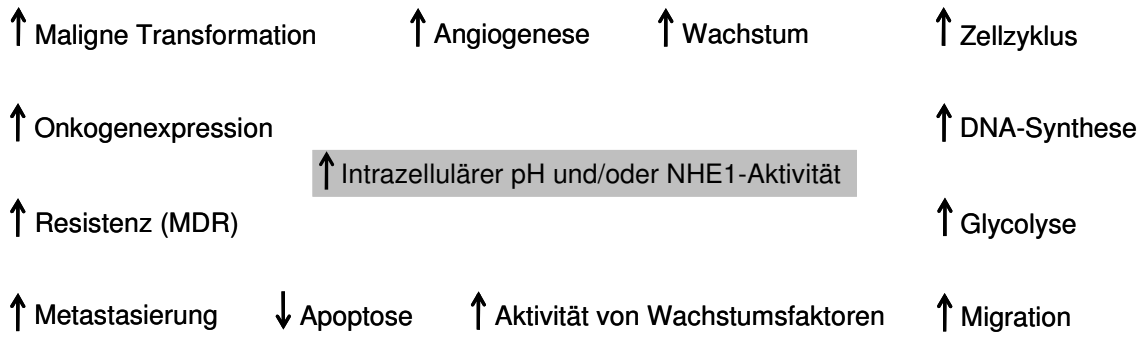


Abb. 1-7 Einfluss des pH_i und der Aktivität des Transporters NHE1 auf Prozesse bei der Tumorentstehung und beim Tumorwachstum (modifiziert nach Harguindey *et al.) (49)*

NHE1: Natrium-Protonenaustauscher 1, MDR: *multi drug resistance*

1.3 pH-regulatorische Transporter

1.3.1 Die Natrium-Protonenaustauscher

Die Familie der Natrium-Protonenaustauscher (*Na^+/H^+-exchanger*, NHE) umfasst neun Isoformen (NHE1-NHE9). Alle NHE-Isoformen transportieren ein Natriumion im Antiport mit einem Proton. Der sekundär-aktive Transport wird durch den Natrium-Gradienten angetrieben. Die NHE-Transporter bestehen aus einer kurzen N-terminalen Domäne, zwölf Transmembrandomänen (TMD) und einer längeren C-terminalen Domäne (*62, 63*). In den verschiedenen Isoformen sind die TMD sechs und sieben hochkonserviert, was eine Bedeutung dieser an der pH-Regulation und dem Ionentransport nahelegt (*64*). Die NHE-Isoformen unterscheiden sich in ihrer Gewebeverteilung und in ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Inhibitoren. NHE1 wird ubiquitär exprimiert und als „housekeeping"-Regulator für den zellulären pH-Wert betrachtet. NHE2, NHE3 und NHE4 sind vor allem im

Gastrointestinaltrakt und in der Niere exprimiert, während NHE5 vorrangig in nicht-epithelialem Gewebe gefunden wurde. Die höchste Expression zeigt NHE5 im Gehirn. Dieser Transporter ist aber auch in Milz, Testes und in der Skelettmuskulatur vorhanden. Die Isoformen NHE1 bis NHE5 werden als Plasmamembranproteine beschrieben. Für NHE1 konnte außerdem im Myokardgewebe von Ratten eine mitochondriale Lokalisation nachgewiesen werden (*65*). Die Isoformen NHE6 bis NHE9 sind in intrazellulären Organellen lokalisiert, vor allem in Membranen des Golgi-Apparats und in Endosomen (*63, 66, 67*).

Amilorid stellte den ersten bekannten Inhibitor der Na^+/H^+-Austauscher dar. NHE1 und NHE2 reagieren sehr sensitiv auf Amilorid, während NHE3 und NHE4 resistent sind. NHE5 wird durch Amilorid nur schwach gehemmt. Amilorid-Derivate wie EIPA (Ethylisopropylamilorid) sind schwache, selektive NHE1-Inhibitoren. Die Gruppe der Benzylguanidine wie HOE-694 und Cariporid zeigen eine bis zu 4000-fach stärkere inhibitorische Wirkung auf NHE1 als Amilorid und sind inaktiv in Bezug auf eine Hemmung von NHE3 und NHE5 (*68, 69*).

NHE1 ist die am besten untersuchte Isoform der Na^+/H^+-Austauscher und ist wesentlich an der Aufrechterhaltung des pH_i und des Zellvolumens beteiligt. Bei physiologischem pH ist NHE1 inaktiv, erst eine intrazelluläre Ansäuerung resultiert in einer Aktivierung von NHE1 (*64*). Auch ein Natriumverlust durch osmotische Bedingungen und ein damit verbundenes Zellschrumpfen steigert die NHE1-Aktivität. Externe Faktoren wie Hormone, Integrine und Wachstumsfaktoren erhöhen über verschiedene Signaltransduktionswege die Aktivität von NHE1 (*60, 64, 69, 70*). NHE1 besteht aus 815 Aminosäuren, wobei die ersten 500 Aminosäuren die kurze N-terminale zytoplasmatische Domäne und die 12 α-helikalen TMD darstellen (*71, 72*). Der 315 Aminosäure lange zytoplasmatische C-Terminus enthält verschiedene Regulationsstellen für die NHE1-Aktivität sowie die Protonen-sensitive-Region (*73, 74*). Die Aktivität von NHE1 kann durch eine direkte Phosphorylierung verschiedener Serine (*75*) aber auch durch die Bindung verschiedener regulatorischer Proteine wie Calmodulin und CHP (Calcineurin-B homolog protein) an die C-terminale Region gesteigert werden (*66*). Die Bindung des Proteins 14-3-3 nach Phosphorylierung von NHE1 schützt den Transporter vor Dephosphorylierung, stabilisiert die aktive Form und ermöglicht die Bindung weiterer regulatorischer Proteine (*76*). Die direkte Phosphorylierung von NHE1 kann durch $p90^{RSK}$ (90 kDa ribosomale S6 Kinase), p160ROCK (Rho-Kinase), p38 (MAP-Kinase) oder NIK (*Nck-interacting kinase*) erfolgen. Die $p90^{RSK}$–vermittelte Phosphorylierung erfolgt nach Stimulierung von MAPK-Signalwegen durch Bindung von Wachstumsfaktoren und Peptidhormone an Rezeptortyrosinkinasen aber auch durch die Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und der Phospholipase C (PLC). Die Kinase p160ROCK phosporyliert NHE1 nach Integrin-Bindung und Aktivierung der GTPase RhoA. Auch eine NHE1-Phosphorylierung nach Stimulierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren u.a. durch die Proteinkinase C wurde beschrieben.

Die Bindung der regulatorischen Proteine Calmodulin, CHP1 und 2 sowie Tescalin verändert ebenfalls die pH-abhängige NHE1-Aktivität. Die Proteine Calmodulin und CHP aktivieren NHE1, während Tescalin den Transporter inhibiert. Für Calmodulin existieren eine hoch-affine und eine niedrig-affine Bindungsstelle in der C-terminalen Region von NHE1. Nach Bindung des durch Calcium aktivierten Calmodulins an die hoch-affine Bindungsstelle wird die NHE1-Aktivität durch Verminderung der Autoinhibition erhöht, was vermutlich auf einer Konformationsänderung des Transporters beruht. Nicht nur die Bindung von Calmodulin auch die Anlagerung von CHP1 und 2 sind abhängig von der Calciumkonzentration. Durch die Bindung von Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) sowie Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) an NHE1 kann dessen Lokalisation beeinflusst werden. Die Bindung an den ERM-Komplex ermöglicht zudem Wechselwirkungen von NHE1 mit dem Zytoskelett (*51, 71, 75, 77-79*).

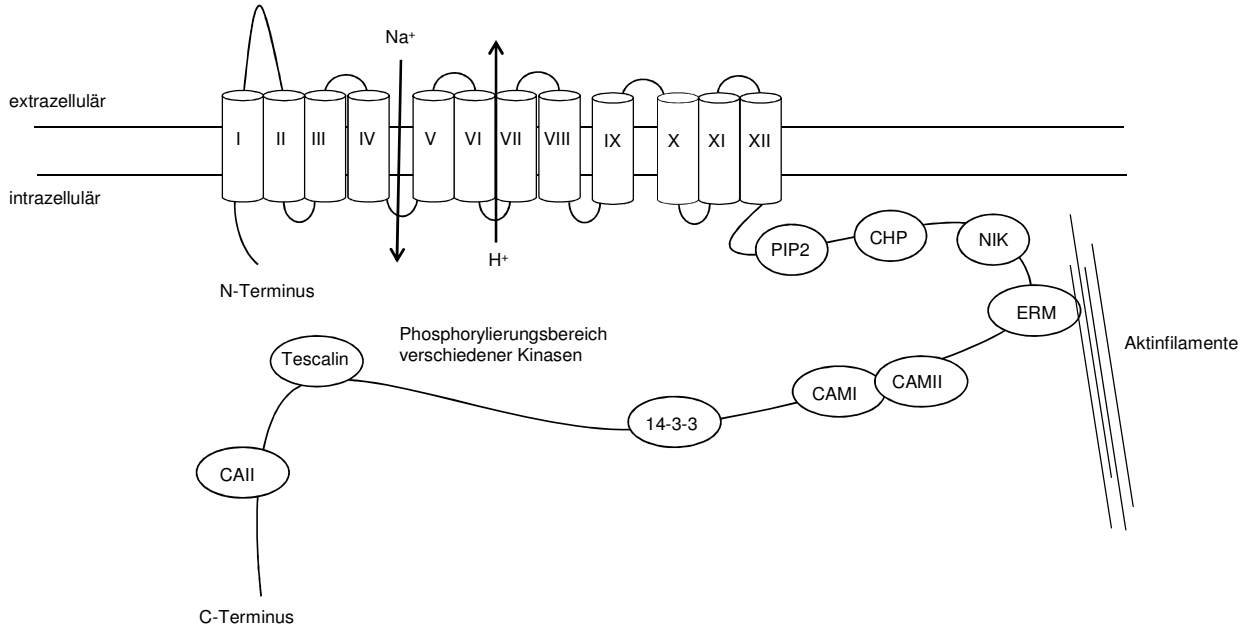


Abb. 1-8 Membrantopologie von NHE1 mit den regulatorischen Domänen sowie den Bindungsstellen für den Ionentransport (modifiziert nach Slepkov *et al.) (63)*

PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, CHP: Calcineurin-B homolog protein, NIK: Nck-interacting kinase ERM: Ezrin-Radixin-Moesin, CAM: Calmodulin, CAII: Carboanhydrase II

Im Glioblastom ist NHE1 der primäre pH-regulatorische Transporter und sorgt für eine starke intrazelluläre Alkalisierung (*80*). Im Gegensatz zu gesunden Zellen ist NHE1 in Tumorzellen auch im alkalischen pH_i aktiv und mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung der malignen Transformation (*50, 63*). Die NHE1-abhängige Alkalisierung der Tumorzelle hält den Status einer permanenten und unkontrollierten Proliferation aufrecht und fördert den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus. Zellen ohne NHE1 zeigen eine reduzierte Zellteilungsrate (*49, 67, 81*). In Leukämiezellen wurde eine direkte Korrelation des erhöhten pH_i und der Anzahl

der Zellen in der S-Phase gezeigt (*82*). Ebenso ist der Übergang der S-Phase in die G2/M-Phase mit einer pH_i-Erhöhung durch die Aktivität von NHE1 assoziiert (*83*). An der Migration und der damit verbundenen Metastasierung ist NHE1 ebenfalls beteiligt (*62, 84*). Durch die Bindung von NHE1 und dem ERM-Komplex entsteht eine wichtige Verknüpfung zwischen Aktinfilamenten und integralen Proteinen. Fehlt jedoch diese Interaktion verändert sich die Zellform und die Motilität ist eingeschränkt (*67, 81*). Die Polymerisation von Aktinfilamenten ist zudem pH-abhängig und wird bei alkalischem pH_i begünstigt (*84-86*). Eine über die Tyrosinkinase Met vermittelte Aktivierung von NHE1 ist für eine Translokation der Lysosomen zur Zellperipherie bei saurem pH_e verantwortlich. Dadurch werden aus den Lysosomen vermehrt Cathepsine und Metalloproteinasen in den Extrazellularraum freigesetzt, die eine Invasion der Tumorzellen durch eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix ermöglichen (*87-89*). Eine Vesikelverschiebung kann auch durch NHE5 vermittelt werden.

Die verringerte Apoptoseneigung von Tumorzellen wird ebenfalls durch den alkalischen pH_i und durch die Regulation des Zellvolumens begünstigt. An beiden Prozessen ist NHE1 maßgeblich beteiligt. So konnte in der Publikation von Lang *et al.* (*56*) gezeigt werden, dass eine CD95-Rezeptor-vermittelte Inhibierung von NHE1 zur Ansäuerung der Zelle sowie zum Zellschrumpfen beiträgt und die anschließende DNA-Fragmentierung begünstigt (*56*). Die NHE1-abhängige Erhöhung des pH_i nach Bindung des Proteins CHP2, welches in Tumoren vermehrt exprimiert wird, schützt Zellen vor Apoptose nach Serumentzug (*67, 81*). Die intrazelluläre Alkalisierung durch NHE1 verhindert zudem die Konformationsänderung des proapoptotischen Proteins Bax und vermindert die Caspase- und Endonukleaseaktivität (*55, 72*), wodurch ebenfalls die Apoptoseneigung verringert wird.

Eine hauptsächlich im Gehirn exprimierte NHE-Isoform ist NHE5. Über NHE5 ist im Vergleich zu NHE1 kaum etwas bekannt (*90*). Die Sequenzhomologie zu NHE1 ist sehr gering, vor allem in der regulatorischen C-terminalen Domäne zeigen sich deutliche Unterschiede. Die größte Ähnlichkeit besteht zu NHE3. Im Gegensatz zu NHE1 wird NHE5 durch die Proteinkinasen A und C inhibiert. Eine Verringerung des Zellvolumens führt zu einer verminderten Aktivität von NHE5 sowie NHE3, während die NHE1-Aktivität durch diesen Prozess ansteigt (*91*).

1.3.2 Die Monocarboxylattransporter

Neben NHE1 sind die Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT2 im Glioblastom an der Aufrechterhaltung des alkalischen pH_i beteiligt (*92*). Darüber hinaus wurde auch im Melanom, Neuroblastom (*93*), Kolorektalkarzinom (*94*), gastrointestinalen Stromatumor (*95*), Prostatakarzinom (*96*) sowie im Bronchial- und Mammakarzinom (*97*) eine erhöhte Expression von Monocarboxylattransportern nachgewiesen. Zur Familie der Monocarboxylattransporter (SLC16A) gehören 14 Isoformen. Nur ein Teil der Isoformen wurde bisher funktionell charakterisiert. Die Isoformen MCT1 bis MCT4 transportieren Monocarboxylate wie Laktat, Pyruvat, Butyrat und Ketonkörper im Symport mit Protonen in der Stöchiometrie von 1:1 (*98, 99*). Die Isoform MCT8 ist als Transporter für Schilddrüsenhormone beschrieben (*100*). MCT10 ist für den Transport aromatischer Aminosäuren verantwortlich (*98*). Für die anderen Isoformen sind bisher keine Substrate beschrieben. Auch exogene Verbindungen wie Statine (MCT4), Niacin (MCT1, MCT4), γ-Hydroxybutyrat (MCT1, 2, 4, 6), β-Laktamantibiotika und nichtsteroidale Antiphlogistika können als Substrate für MCTs fungieren (*98, 101, 102*). Als Inhibitoren werden substituierte aromatische Monocarboxylate wie CHC (α-Cyano-4-Hydroxycinnamat) oder Bioflavonoide wie Quercetin und p-Chloromercuribenzoesäure (pCMB) eingesetzt (*103*). Die Inhibition durch pCMB wird über das Ankerprotein CD147 vermittelt, so dass vor allem die Isoformen MCT1 und MCT4 irreversibel durch pCMB inhibiert werden (*101, 104*).

Allen MCTs ist eine hochkonservierte Struktur aus 12 TMD gemein. Sequenzunterschiede wurden vor allem in den N- und C-terminalen zytoplasmatischen Regionen sowie in der großen intrazellulären Schleife zwischen den TMD sechs und sieben beschrieben (*98, 102*). Die Regulation der Transporteraktivität kann transkriptionell, posttranskriptionell und posttranslationell erfolgen (*103*). Die Expression von MCT4 wird beispielsweise unter Hypoxie durch den Transkriptionsfaktor HIF1α erhöht (*105*). Generell scheinen metabolische Prozesse und Substratkonzentrationen die RNA- sowie Protein-Expression der MCTs zu beeinflussen (*102*). Der für die Transportfunktion notwendige Einbau der MCTs in die Membran wird durch Ankerproteine gewährleistet. Für MCT1, MCT3 und MCT4 wurde als Ankerprotein das Glykoprotein CD147 identifiziert, MCT2 ist mit dem Glykoprotein gp70 assoziiert (*101*). CD147 dient als Chaperon für MCT1 und MCT4 und fördert deren Dimerisierung mit weiteren MCT/CD147 Komplexen sowie den korrekten Einbau in die Zellmembran. Des Weiteren reguliert CD147 direkt die Aktivität von MCT1 und MCT4 (*106-108*). Eine Überexpression von MCT4 und CD147 ist mit einer schlechten Prognose bei Prostatakrebs assoziiert (*96*). Die Koexpression von MCT1 und CD147 ist ebenfalls mit einem verminderten Gesamtüberleben bei gastrointestinalen Stromatumoren verbunden (*95*). CD147 wird in vielen Tumoren überexprimiert und spielt hier u.a. bei der Aktivierung

von Matrixmetalloproteinasen und somit bei der Metastasierung eine entscheidende Rolle (*97, 109*). Die Reifung und Expression von CD147 wird durch MCT4 gefördert. Das Zusammenspiel aus beiden fördert die Migration von Tumorzellen (*110*).

Die MCT-Isoformen sind in verschiedenen Geweben exprimiert. MCT1 weist eine ubiquitäre Gewebeverteilung auf. MCT2 ist hingegen nur in der Leber, Neuronen und Testes exprimiert. Für MCT3 konnte eine besonders hohe Expression im retinalen Pigmentepithel aber auch im Darm, der Niere und glatten Muskelzellen gezeigt werden. MCT4 wird vorrangig in hochglykolytischem Gewebe wie weißen Muskelfasern, aber auch in Astrozyten und der Plazenta exprimiert. Die Isoformen MCT5 bis MCT14 wurden in verschiedenen Geweben wie Plazenta, Niere, Gehirn und Darm nachgewiesen (*98, 99, 103*). Im Gehirn spielen die Isoformen MCT1, MCT2 und MCT4 eine entscheidende Rolle im zellulären Metabolismus.

Laktat stellt im Gehirn eine wichtige Energiequelle nicht nur bei Nährstoffmangel dar. In Gehirn- und Muskelzellen haben sich Zell-Zell-„Laktatshuttle“ ausgebildet, die Laktat-verbrauchende Zellen mit glykolytischen Laktat-produzierenden Zellen verbinden. Im Gehirn nehmen Neuronen mittels MCT2 Laktat auf und verstoffwechseln es. Das hierfür benötigte Laktat wird von Astrozyten gebildet und mittels MCT4 abgegeben. Eine Expression von MCT1 in Astrozyten sowie in Mikrogefäßen wurde ebenfalls beschrieben (*111-114*) und weist auf dessen Bedeutung als „Laktatshuttle“ hin. In Tumoren sind diese „Laktatshuttle“ von besonderer Bedeutung sowohl für den Metabolismus als auch für die Aufrechterhaltung des Tumormilieus (Abb. 1-9). In soliden Tumoren kommt es durch rasches Wachstum und schlechte Versorgung mit Sauerstoff häufig zu einer Hypoxie im Tumorzentrum. Um Zellen in hypoxischer Umgebung ausreichend mit Nährstoffen versorgen zu können, entsteht eine Art Symbiose zwischen Zellen in Gefäßnähe und Zellen in unterversorgten Tumorregionen (*115*). In Gefäßnähe nehmen die Zellen trotz guter Sauerstoff-Versorgung Glukose nicht auf, sondern verstoffwechseln exogenes Laktat. Die Glukose kann so nach Diffusion in andere Tumorbereiche von hypoxischen Zellen aufgenommen werden. Durch die Hypoxie werden mittels des Transkriptionsfaktor HIF1α vermehrt Gene exprimiert, die die Glukoseaufnahme und die Verstoffwechslung zu Laktat fördern, wie die Laktatdehydrogenase-A und der Glukosetransporter GLUT1. Das gebildete Laktat wird über MCT4 aus der Zelle herausgeschleust, von den gefäßnahen Zellen über MCT1 aufgenommen und dient dort als Energiequelle (*115, 116*).

Eine vermehrte Laktatproduktion in malignem Gewebe resultiert nicht nur aus der Verstoffwechslung von Glukose in anaerober Umgebung sondern auch aus dem sogenannten Warburg-Effekt, bei dem auch unter aeroben Bedingungen Glukose zu Laktat verstoffwechselt wird (*117*). Nicht nur Tumorzellen, auch andere hochproliferative Gewebe nutzen die aerobe Glykolyse zur Energiegewinnung. Hierbei wird das gebildete Pyruvat großteils zu Laktat umgesetzt und das verbleibende Pyruvat in den Citratzyklus überführt.

Diese Umstellung im Stoffwechsel während der Proliferation dient der Bereitstellung von Zwischenprodukten aus der Glykolyse und dem Citratzyklus für die Biosynthese von Nukleotiden und Makromolekülen für die bevorstehende Zellteilung (*117, 118*). Parallel dazu wird durch eine hohe Glukoseaufnahme der ATP-Verbrauch der Zelle direkt über die Glykolyse gedeckt. Den hohen Glukoseumsatz in Tumorzellen, besonders in Glioblastomen, macht man sich in der Detektion von Tumoren mittels Applikation von [^{18}F]2-fluoro-2-deoxy-D-Glukose bei der Positronen-Emissionstomographie (PET) zunutze (*92*).

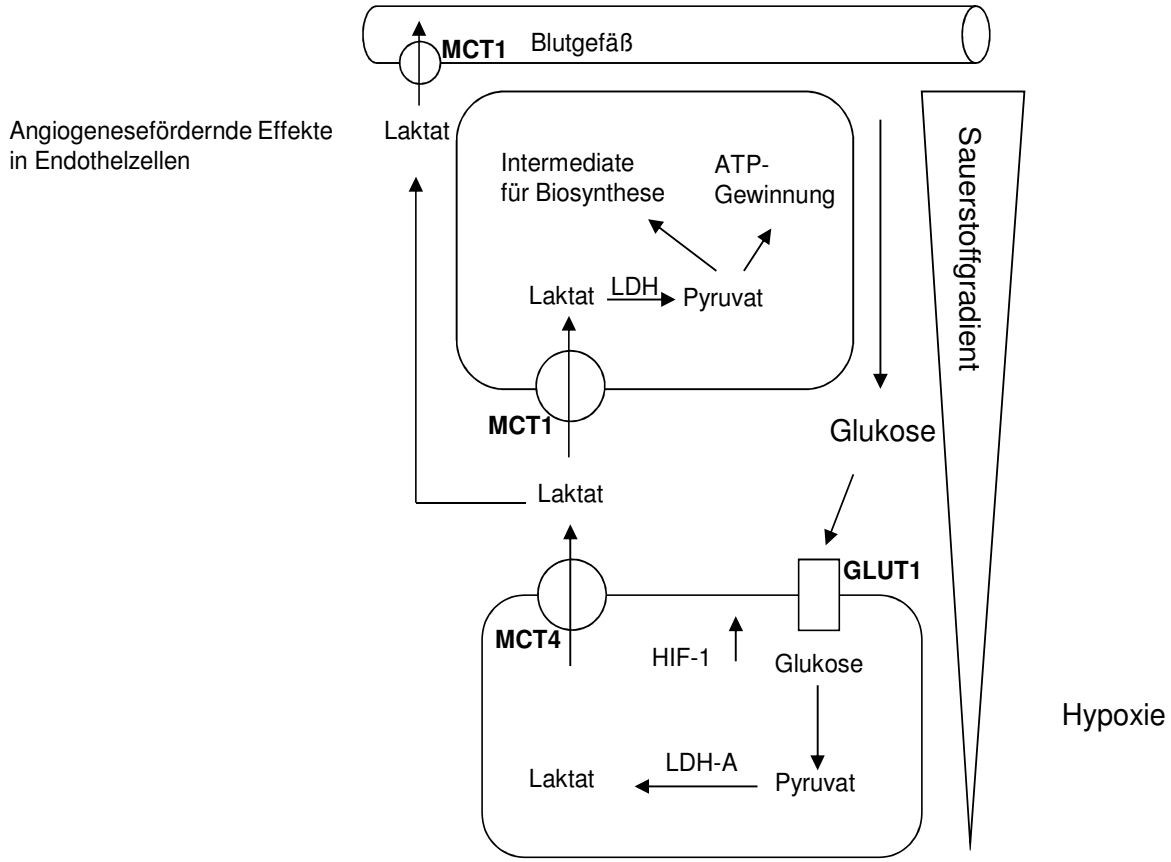


Abb. 1-9 „Laktatshuttle“ in Tumorzellen: Glukose diffundiert zu hypoxischen Zellen, wird dort mittels GLUT1 aufgenommen und zu Laktat verstoffwechselt. Laktat wird durch MCT4 aus hypoxischen Zellen heraustransportiert und über MCT1 in Zellen in sauerstoffreicher Umgebung aufgenommen und zur Energiegewinnung genutzt. (modifiziert nach Semenza *et al.* , Feron *et al.) (115, 116)*

Laktat wird in Tumoren nicht nur als Energiequelle verwendet, sondern dient auch als Botenstoff. Es wird über MCT1 in Endothelzellen aufgenommen und stimuliert dort Signaltransduktionswege mit Beteiligung von IL-8 und NFκB, um die Endothelzellmigration und die Gefäßbildung zu fördern (*111*). Durch den Kotransport von Protonen und Laktat tragen die MCTs zur Ansäuerung des extrazellulären Milieus bei, welches ebenfalls die Migration und Metastasierung fördert.

1.3.3 Der Natriumabhängige Chlorid-Bicarbonat-Austauscher

Zum jetzigen Zeitpunkt ist wenig über den elektroneutralen Natriumabhängigen Chlorid-Bicarbonat-Austauscher (SLC4A) bekannt, obwohl dieser Transporter einer der ersten beschriebenen Regulatoren des pH_i ist. Er vermittelt den Influx von einem Natriumion und zwei Bicarbonationen gekoppelt mit dem Efflux von einem Chloridion (*119, 120*). Zur SLC4A-Familie gehören des Weiteren elektrogene Natrium-Bicarbonat-Austauscher und elektroneutrale Natrium-Bicarbonat-Austauscher. Die Nomenklatur der Transporter ist nicht einheitlich, so dass häufig mehrere unterschiedliche Proteine denselben Namen tragen. Der Natriumabhängige Chlorid-Bicarbonat-Austauscher mit dem Gensymbol SLC4A8 wird als NBC3 und NDCBE bezeichnet. Als NBC3 wird aber auch der Transporter NBCn1 (SLC4A7) betitelt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich NDCBE (SLC4A8) betrachtet. NDCBE wird vor allem im Gehirn und in den Testes exprimiert. Daneben konnte eine geringere Expression von NDCBE in der Niere und im Ovar nachgewiesen werden (*121*). Im Gehirn stellt NDCBE einen der wichtigsten pH-Regulatoren dar. Er wird hier vorrangig in Neuronen exprimiert (*120, 122*) und spielt eine entscheidende Rolle bei der pH-abhängigen Glutamatfreisetzung (*123*). Untersuchungen an Nagern zeigten eine Steigerung der NDCBE-Expression unter chronischer, metabolischer Azidose (*124*), während eine chronische Hypoxie die Proteinexpression von NDCBE vermindert (*122*).

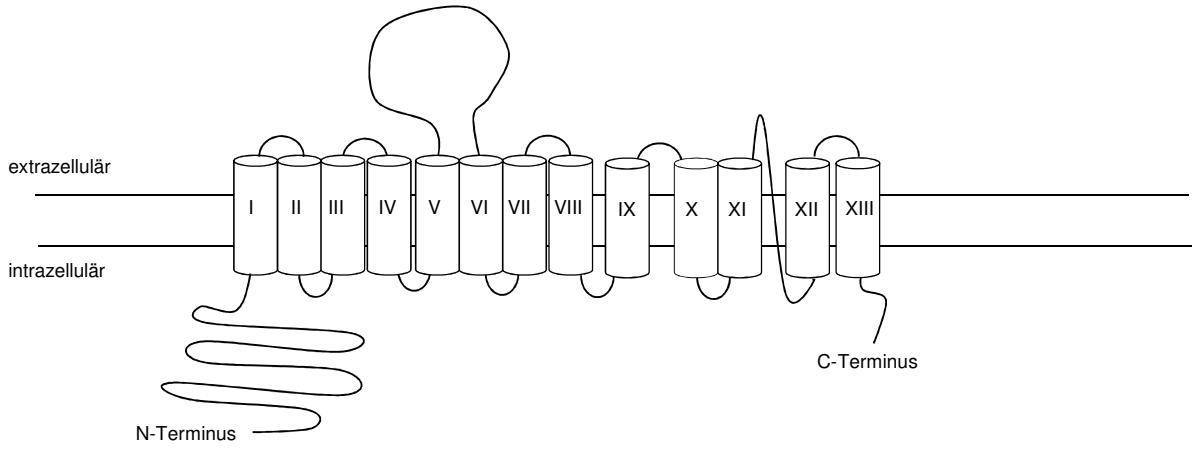


Abb. 1-10 Struktur des transmembranären Transporters NDCBE (modifiziert nach Parker *et al.*) *(125)*

Rückschlüsse auf die Struktur von NDCBE erbrachten Vergleiche mit den anderen Bicarbonattransportern. NDCBE besteht ebenfalls aus einem langen zytoplasmatischen N-Terminus, sowie einem kürzeren C-Terminus und 13 transmembranären Bereichen (TMD). Zwischen den TMD fünf und sechs befindet sich eine relativ große extrazelluläre Schleife. Durch Sequenzvergleiche konnten zwei potentielle autoinhibitorische Domänen sowie eine Bindungsdomäne für SH3 identifiziert werden. SH3-Domänen können die Kontrolle des

Proteins durch verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen (*126*). *In vivo* liegt NDCBE N-glykosyliert vor. Die Aktivität von NDCBE kann auch durch die Ausbildung verschiedener Splicevarianten reguliert werden. Es existieren vier Proteinvarianten NDCBE-A bis NDCBE-D. NDCBE-C und –D weisen verkürzte N-terminale Bereiche auf. NDCBE-D besitzt zusätzlich eine verkürzte C-terminale Region, dies ist auch bei NDCBE-B der Fall. Diese beiden Splicevarianten zeigen eine geringere Aktivität, was auf eine funktionelle Bedeutung des C-terminalen Bereichs hindeutet (*125, 127*).

Die pH-Regulation durch die beschriebenen Transportproteine hat einen großen Einfluss auf verschiedenste zelluläre Prozesse. Auch bei der Tumorentwicklung und der Tumorprogression nehmen sie einen großen Stellenwert ein. Bislang existieren keine Untersuchungen, in denen eine Regulation dieser Transporter durch antitumorale Substanzen betrachtet wurde. Derartige Untersuchungen könnten jedoch dazu beitragen weitere molekulare Wirkmechanismen von antikanzerogenen Substanzen in Tumorzellen aufzuklären und zu neuen Erkenntnissen in der Behandlung von malignen Tumoren führen.

2 Zielstellung dieser Arbeit

Glioblastome sind die häufigsten malignen Gehirntumoren. Trotz intensiver Forschung und Entwicklung neuer Strategien in der Tumortherapie konnte die Überlebenszeit von Patienten mit einem Glioblastom nur unwesentlich verlängert werden. Wie auch andere solide Tumoren weisen Glioblastome ein saures extrazelluläres Milieu und einen alkalischen intrazellulären pH auf. Dieses veränderte pH-Milieu hat einen großen Einfluss auf die Proliferation, die Metastasierung, die Apoptose, den Metabolismus und auf das Ansprechen des Tumors auf Medikamente. Um diese pH-Bedingungen aufrecht zu erhalten, sind pH-regulatorische Transporter entscheidend. Bei der pH-Regulation im Gehirn spielen insbesondere die Natrium-Protonenaustauscher NHE1 und NHE5, die Monocarboxylattransporter MCT1, MCT4 und MCT5 sowie der elektroneutrale Natriumabhängige Chlorid-Bicarbonat-Austauscher NDBCE eine wesentliche Rolle.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher, die Bedeutung der pH-regulatorischen Transporter NHE1, NHE5, MCT1, MCT4, MCT5 und NDCBE auf das Ansprechen von Glioblastomzelllinien (LN18, U87MG, GL261) auf ausgewählte Zytostatika sowie die Beeinflussung der Transporter durch diese Wirkstoffe *in vitro* zu untersuchen. Im Rahmen der stetigen Suche nach neuen antineoplastisch wirkenden Therapeutika sollten nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) in die Untersuchungen eingeschlossen werden. Durch die Bestimmung der Transporteraktivität und die intrazelluläre pH-Messung sollten die Wirkungen einzelner Zytostatika und NSAIDs auf die Transporter NHE1, MCT1 und MCT4 betrachtet werden. Des Weiteren sollten MCT1-überexprimierende LN18-Zellen generiert werden, um ein potentiell verändertes Ansprechen dieser Zellen auf die verwendeten Substanzen zu untersuchen. Ein weiteres Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigte sich zudem mit der subzellulären Lokalisation von NHE1 in Glioblastomzellen, da eine mitochondriale Lokalisation von NHE1 im Herzen sowie eine Beteiligung von NHE1 an der intrazellulären Lokalisation von Lysosomen beschrieben ist. Neben den *in-vitro*-Versuchen an humanen (LN18, U87MG) und murinen Glioblastomzellen (GL261) sollte der Zusammenhang zwischen der Malignität von Gehirntumoren und der Expression der ausgewählten pH-regulatorischen Transporter an Gewebeproben untersucht werden. Für diese Zwecke standen humane Gliomproben zur Verfügung. Des Weiteren sollte ein Glioblastom-Modell bei der Maus an der Universität Greifswald etabliert und an diesem der Einfluss von NSAIDs (Ibuprofen) auf das Glioblastomwachstum *in vivo* analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Firma
18G, 24G Kanülen	Neoject®, Dispomed Gelnhausen
26G Kanülen	BD MicrolanceTM 3, Franklin Lakes, USA
Blotapparatur Trans-Blot™ Cell	Biometra®, Göttingen
Brutschrank BBD 6220	Heraeus® Instruments, Hanau
Chemi Doc XRS	BioRad, München
Deckgläser 14 mm Ø	Marienfeld GmbH&CoKG, Lauda Königshofen
Hamilton Spritze 1 µl, 50µl	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz CH
Einfrierboxen	NalgeneTM, Roskilde, Dänemark
	VWR, Darmstadt
Feinscheren	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Filterpapier	Whatman International, Buckinghamshire
Gel Logic 200 Imaging Systems	Eastman Kodak Company
Heizblock Grant QBT	Grant Instruments, Cambridgeshire England
Inkubator	Memmert, Schwabach
Kryoröhrchen CRYO.S™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kryotom CM 1900	Leica Microsystems, Wetzlar
Küvette UVette 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührgerät MR 3001	Heidolph, Schwabach
MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
Mikro-Dismembrator S	Braun Biotech International

Mikroskope:	Zeiss, Jena
Axiovert 25	
LSM780	
Mikrotiterplatten 96-well	ThermoFisher Scientific, USA
Mikrotiterplattenlesegerät Infinite M200	Tecan, Crailsheim
MULTIWELL™ 6, 12 und 24-well-Platten	BD Falcon™, Heidelberg
Nadelhalter	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Nahtmaterial (Ethicon Perma-Hand Seide Schwarz 45cm, 12mm)	Johnson&Johnson, Norderstedt
Nitrozellulose Transfer Membran Whatman®	Schleicher & Schüll, Dassel
PCR Cycler GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Petrischalen 94/16 mm	BD Falcon™, Heidelberg
pH-Meter pH526	WTW, Weilheim
Pinzetten	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Schüttelwasserbad	GFL® 1083, Burgwedel
Schüttler (Rocking Platform)	Biometra®, Göttingen
SDS-Page Elektrophoresekammer	Biometra®, Göttingen
Skalpell	Dahlhausen, Köln
Spektrophotometer Nano Drop™ 1000	Peqlab, Erlangen
Spritze 1 ml	BD Plastipak, Franklin Lakes, USA
	Dispomed, Gelnhausen
Stereotaktischer Kopfhalter mit LED-Anzeige	Stoelting Co., Illinois, USA
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus® Instruments, Hanau
Stromversorgungsgerät Standard Power Pack P25	Biometra®, Göttingen
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Vakuumpumpe	Millipore, Billerica, MA
Vortexer (Reax top)	Heidolph, Schwabach
Waage Adventure Pro	Ohaus, Schweiz
Wasserbad Typ 5A	Julabo, Seelbach
Zellkulturflaschen (25 cm2, 75 cm2)	BD Falcon™, Heidelberg
Zellkulturschale mit 20 mm Netzraster (150 x 25 mm)	BD Falcon™, Heidelberg

Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellzählgerät CASY® ONE	Schärfe Systems, Reutlingen
Zentrifugen:	
CT15RE	VWR, Darmstadt
Centrifuge 4515R	Eppendorf, Hamburg
Biofuge fresco, Megafuge 1.0R	Heraeus® Instruments, Hanau
Mikrozentrifuge MC-13	Amicon/Millipore, Schwalbach
OptimaTM TL Ultrazentrifuge	Beckman, München

3.1.2 Chemikalien und Substanzen

Hersteller	**Chemikalien**
Amersham biosciences, Freiburg	ECL™ Plus Western Blotting Detection Reagents
AmplaChem, Carmel, USA	Celecoxib
Bayer Health Care, Leverkusen	Bepanthen Augen- und Nasensalbe
	Rompun (Xylazin) 20%ige Lösung
B. Braun, Melsungen	Aqua ad injectabilia
	0,9%ige isotone NaCl-Lösung
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	β-Mercaptoethanol
	2-Propanol
	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 0,8)
	Agarose NEEO Ultra Quality
	Aprotinin
	Bromphenolblau
	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	4´,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)
	Glycerol
	Glycin
	Ethanol
	HEPES
	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Natronlauge
	PMSF
	Roti ®-Histokitt

	Rotiphorese® Gel (37;5:1)
	Saccharose
	Tetramethylethylendiamin (TEMED)
	Trishydrochlorid (Tris-HCl)
	Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Ultra)
	Trypton
Dako Deutschland GmbH, Hamburg	DAKO® Fluorescence Mounting Medium
	DAKO® Pen
CEVA Sante Animal	Ketamin 10%ige Lösung
Delta Select, Rimbach	Isofluran
GIBCO®, Invitrogen, Karlsruhe	Fetales Kälberserum (FCS)
	Nicht Essentielle Aminosäuren (NEAS)
	Opti-MEM
Invitrogen, Karlsruhe	Hygromycin B
	Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent
	dNTPs (10 mM)
	BCECF-AM
	MitoTracker® Red FM
Johnson&Johnson, Norderstedt	Sprühpflaster BUND-AID
J.T. Baker, Deventer, Holland	Aceton
Leica, Wetzlar	Jung-Tissue Tek, Tissue Freezing Medium
Merck, Darmstadt	Calciumchlorid
	Glukose
	Dinatriumhydrogenphosphat
	Natriumdihydrogenphosphat
	Methanol
	Eosin G
	Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III
New England Biolabs, Frankfurt/M.	Restriktionsendonukleasen, -Puffer
Ochem Incorporation, Des Plaines, USA	Lumiracoxib
	Rofecoxib
PAA, Pasching	Bovines Serumalbumin (BSA)
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Kulturmedium DMEM
	Kulturmedium MEM
	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
	L-Glutamin (200 mM)

	Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)
	Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%)
PeqLab, Erlangen	PeqGold RNAPureTM
Ratiopharm	Ketamin
Roche, Mannheim	BSA
Sanofi-Aventis, Frankfurt/M.	Cariporid
Sarstedt	Li-Heparin- Monovette 5,5ml
Schärfe System, Reutlingen	CASY®ton
SERVA, Heidelberg	Triton X-100
Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen	Agar Select
	Ammoniumsulfat
	Ammoniumpersulfat (APS)
	Ampicillin
	Carmustin
	Chloroquin
	Cholinchlorid
	Diclofenac
	Dimethylformamid
	EDTA
	Ethidiumbromid
	Etoposid
	Hefeextrakt
	HEPES
	Ibuprofen
	Indomethacin
	Kaliumchlorid
	Kaliumdihydrogenphosphat
	Kupfer(II)-Sulfat-Lösung
	Leupeptin
	Magnesiumchlorid
	Natriumchlorid
	Natriumdeoxycholat
	Natriumlaktat
	Natriumphosphat
	Natrium Orthovanadat
	Neutral Red

	Nigericin
	Lomustin
	pCMB
	Phosphatase Inhibitor Cocktail 1
	Ponceau S
	Propionsäure
	Protein G Sepharose®, Fast Flow
	Temozolomid
	Teniposid
	Tween®-20
	Vincristin
ThermoFisher Scientific, USA	Bicinchoninic Acid Solution BCA
VEB Laborchemie Apolda	$MgSO_4$ * 7 H2O

3.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	**Zusammensetzung**	
Ammoniumpersulfat	Ammoniumpersulfat	1 g
10% (w/v)	A. dest.	ad 10 ml
DNA Ladepuffer	EDTA	0,25 M
(10x)	Saccharose	25%
	Bromphenolblau	0,25%
	A. dest.	ad 100 ml
Ethidiumbromidlösung	Ethidumbromid	10 mg
	A. dest.	ad 1 ml
KCl-HEPES Puffer,	KCl	140 mM
pH 6,4;6,6; 7; 7,4; 7,8; 8	$CaCl_2$	1 mM
	$MgCl_2$	1 mM
	HEPES	20 mM
		mit Tris-HCl bzw. Tris-Ultra einstellen
LB Medium	Trypton	1% (w/v)
(1x)	Hefeextrakt	0,5% (w/v)

	NaCl	1% (w/v)
	A. dest.	ad 1l
Lysepuffer für Proteine (pH 7,4)	Tris HCl	5 mM
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SDS	1 g
10% (w/v)	A. dest.	ad 10 ml
Na-HEPES Puffer	NaCl	135 mM
	KCl	5 mM
	$CaCl_2$	1 mM
	$MgCl_2$	1 mM
	Glukose	10 mM
	HEPES	20 mM
		pH 7,4 mit Tris-HCl bzw. Tris-Ultra einstellen
PBS (10x)	NaCl	80,0 g
pH 7,4	KCl	2,0 g
	Na_2HPO_4* 2 H_2O	14,4 g
	KH_2PO_4	2,4 g
	A. dest.	ad 1 l
RIPA-Lysepuffer für IP	Na_3PO_4	10 mM pH 7,2
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	1% (w/v)
	Natriumdeoxycholat	1% (w/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	EDTA	2 mM
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris-HCl	380 mM
	A. dest.	ad 250 ml
SDS-Laufpuffer (Tankpuffer)	Tris-Base	248 mM
(10x)	Glycin	1,5 M
	SDS	1%
	A. dest.	ad 2 l
SDS-Probenpuffer (Lämmli)	Tris pH 6,8	0,25 M
(4x)	SDS	8% (w/v)
	Glycerol	40% (v/v)
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
	β-Mercaptoethanol	2% (v/v)

Stripping-Puffer	Tris	62,5 mM
	SDS	2%
TBE (10x)	Tris-HCl	1 M
	Borsäure	900 mM
	EDTA pH 8,0	20 mM
	A. dest.	ad 1 l
Transferpuffer (Towbin)	Tris Ultra	250 mM
(10x)	Glycin	1,92 mM
	A. dest.	ad 1 l
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris-HCl	375 mM
	A. dest.	ad 250 ml
TBS (pH 7,4)	Tris-HCl	248 mM
(10x)	NaCl	1,4 M
	KCl	27 mM
	A. dest.	ad 1 l
TBST	10 x TBS	100 ml
(1x)	Tween 20	400 µl
	A. dest.	ad 1 l

3.1.4 Konzentrationen verwendeter Substanzen

Für verschiedene Untersuchungen wurden Zytostatika und nichtsteroidale Antiphlogistika verwendet. Als Zytostatika wurden Carmustin, Lomustin, Temozolomid, Teniposid und Vincristin ausgewählt. In Tab. 3-1 sind die verwendeten Konzentrationen aufgelistet.

Tab. 3-1 Konzentrationen der Zytostatika

Zytostatikum	Konzentration
Carmustin (Car)	10; 100 µM
Lomustin (Lom)	10; 100 µM
Temozolomid (Temo)	10; 100 µM
Teniposid (Teni)	1; 10; 100 µM
Vincristin (Vin)	6,5; 65 nM

Als nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) wurden Celecoxib, Diclofenac, Ibuprofen, Indomethacin, Lumiracoxib und Rofecoxib verwendet. Diese Substanzen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: COX-unselektive NSAIDs und COX2- selektive NSAIDs. In Tab. 3-2 sind die Konzentrationen der verwendeten Substanzen aufgelistet.

Tab. 3-2 Konzentrationen der NSAIDs

nichtsteroidales Antiphlogistikum	Konzentration [µM]	
Diclofenac	250, 500	
Ibuprofen	250, 500	COX-unselektive NSAIDs
Indomethacin	400, 800	
Celecoxib	50, 100	
Lumiracoxib	100, 200	COX2-selektive NSAIDs
Rofecoxib	200, 500	

Als Lösungsmittel diente für alle Substanzen DMSO, nur Ibuprofen wurde in Wasser gelöst.

3.1.5 Patientenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Universitätsmedizin Greifswald unter der Leitung von Prof. Henry W.S. Schroeder gesammelt. Das zu analysierende Tumorgewebe wurde während der Resektion des Tumors im Rahmen der Behandlung entnommen, in flüssigen Stickstoff überführt und langfristig bei -80°C gelagert. Das zum Vergleich verwendete nicht-maligne Gehirngewebe (Normalgewebe) umfasst Gewebe aus Frontal- und Temporallappen verstorbener Patienten und wurde uns freundlicherweise vom Institut für Pathologie (Ansprechpartner Frau PD Dr. Silke Vogelgesang) der Universitätsmedizin Greifswald zur Verfügung gestellt. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Greifswald liegt für die durchgeführten Untersuchungen vor (Reg.-Nr. BB 89/09).

3.1.6 Vektoren

Vektor	Bezugsquelle
pcDNA3.1/Hygro©(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pEF6/V5-His-TOPO®	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.7 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp
E.coli Solopack® Gold Supercompetent Cells	*Tetr Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* *Hte [F´ proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr].)*

3.1.8 Zelllinien

3.1.8.1 Glioblastomzelllinien

3.1.8.1.1 Die humanen Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG

Die Zelllinien LN18 und U87MG haben ihren Ursprung in humanen Glioblastomen. Beide Linien werden dem WHO Grad IV der Gehirntumoren zugeordnet. Die Zellen unterscheiden sich jedoch deutlich in Genotyp, Phänotyp, Wachstumsverhalten und Ansprechen auf verschiedene Stimuli. LN18-Zellen wurden 1981 erstmals von Diserens *et al*. (*128*) beschrieben. In dieser Publikation (Diserens *et al.)* wurde auf den gliären Ursprung der wenig differenzierten Zellen verwiesen, trotz des Fehlens von GFAP als biochemischen Marker in den passagierten Zellen. U87MG-Zellen sind ebenfalls gliären Ursprungs, jedoch stärker differenziert und weisen den Astrozyten-Marker GFAP auf. Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien stammen aus der Zellbank ATCC (*American Type Culture Collection*).

3.1.8.1.2 Die murine Glioblastomzelllinie GL261

Die Tumorzelllinie GL261 ist eine häufig eingesetzte Zelllinie für die Untersuchung von murinen Gehirntumoren. Der zu dieser Zelllinie führende Tumor wurde um 1939 von Seligmann und Shear (*129*) durch intrakranielle Verabreichung des Karzinogens 20-Methylcholanthren in C57BL/6-Mäusen erzeugt. Ähnlich wie die LN18-Zellen exprimieren die GL261-Zellen den Differenzierungsmarker GFAP auf Grund der Passagierung und

Etablierung als permanente Zelllinie nicht mehr. GL261-Zellen sind in Kultur rasch proliferierende Zellen, die ein aggressives Wachstum in C57BL/6-Mäusen zeigen. Die in dieser Arbeit verwendeten GL261-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Synowitz (MDC-Berlin, Buch) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um den Wildtyp der GL261-Zelllinie (GL261-wt) und die mit GFP-transfizierte Zelllinie (GL261-GFP). Zur intrakraniellen Implantation in Mäuse wurde die Zelllinie GL261-GFP verwendet.

A) B)

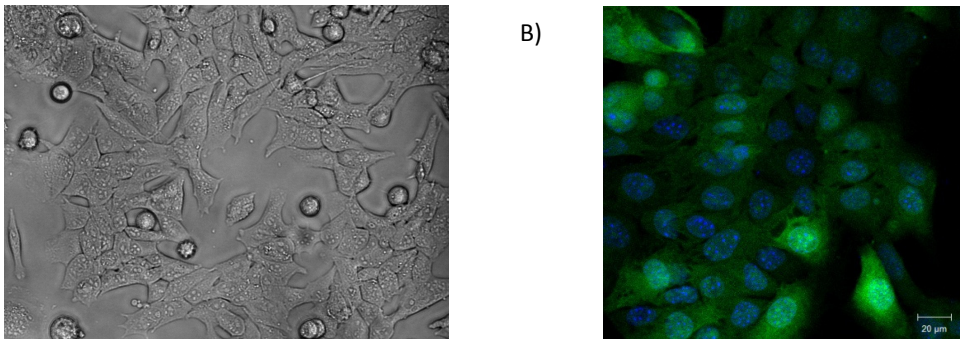


Abb. 3-1 A) Durchlichtaufnahme von GL261-GFP Zellen in Kulturmedium B) Fluoreszenzaufnahme von Paraformaldehyd-fixierten GL261-GFP-Zellen (grün). Für die in blau dargestellte Kernfärbung mittels DAPI wurden die Zellen mit Ethanol permeabilisiert.

3.1.8.2 Sonstige verwendete Zelllinien

3.1.8.2.1 HEK-293-Zellen (Human embryonic kidney 293 cells)

Bei den HEK-293-Zellen handelt es sich um eine permanent transformierte Zelllinie. Frank Graham transfizierte 1977 humane primäre embryonale Nierenzellen mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 (*130*). Die verwendeten HEK-293-Zellen stammen aus der Zellbank *European Collection of Cell Cultures* (Salisbury, United Kingdom).

3.1.8.2.2 HeLa (Henrietta Lacks)

HeLa-Zellen sind eine humane, permanente Zelllinie. Die Zellen wurden 1951 von Georg Gey aus dem zervikalen Adenokarzinom der Patientin Henrietta Lacks isoliert (*131*). HeLa-Zellen wachsen adherent und zeigen eine epitheliale Morphologie. Die verwendeten HeLa-Zellen stammen aus der Zellbank *European Collection of Cell Cultures* (Salisbury, United Kingdom).

3.1.9 Nährmedien

Zelllinie	Mediumbestandteile	
LN18, GL261-GFP, GL261-wt, HeLa, HEK-293	Kulturmedium DMEM (4,5 g Glukose/l)	500 ml
	FCS	10% (v/v)
	L-Glutamin	2 mM
	NEAS	2 mM
U87MG	Kulturmedium MEM (*Eagle with Earle's Balanced Salts*)	500 ml
	FCS	10% (v/v)
	L-Glutamin	2 mM
	NEAS	2 mM

3.1.10 Antibiotika

Das Antibiotika-Gemisch Penicillin/Streptomycin wurde nach dem Auftauen der Zellen hinzugegeben, um eventuelle Kontaminationen mit Bakterien zu verhindern. Zur Selektion positiver Transfektanten wurde Hygromycin B verwendet.

Antibiotikum	Konzentration (µg/ ml Medium)
Penicillin/Streptomycin	166
Hygromycin B	100

3.1.11 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/M.
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	Promega GmbH, Mannheim

3.1.12 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Herkunft
ANT (N-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Anti-Phospho-Ser/Thr/Tyr	Maus	Anaspec, San Jose, USA
GAPDH	Maus	Biodesign, Saco, USA
Grp75 (Mortalin)	Maus	Enzo Life Sciences, Lörrach
LAMP-2 (H4B4)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
MCT1 (ab35944)	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
MCT4 (H-90)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
NHE1 (ab67314)	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK

3.1.13 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Spezies	Herkunft
Anti-Ratte IgG	Alexa Fluor® 568	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (molecular probes)
Anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 488	Huhn	Invitrogen, Karlsruhe (molecular probes)
Anti-Maus IgG	Alexa Fluor® 568	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (molecular probes)
Anti-Kaninchen IgG	HRP	Ziege	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG	AP	Ziege	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Anti-Maus IgG	HRP	Ziege	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

3.1.14 Kommerziell erhältliche Kits

Verwendung	Reaktionskit	Hersteller
Western-Blot-Detektion	ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham™, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Plasmidisolation	NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
DNA-Fragmentisolation	NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Aufreinigung von PCR-Produkten	GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
Proteinbestimmung	BCA™ Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
RNA-Isolierung	PeqGold RNAPure™	PeqLab, Erlangen
Zellviabilitätsmessung	Resazurin-Assay	Promocell GmbH, Heidelberg
Mitochondrienanreicherung	Mitochondria Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

3.1.15 TaqMan®-Gene Expression Assays von Applied Biosystems

Assay	Bestellnummer
Eukaryotic 18S rRNA	4310893E
SLC9A1 (NHE1)	Hs00300047_m1
SLC9A5 (NHE5)	Hs00234441_m1
SLC16A1 (MCT1)	Hs00161826_m1
SLC16A3 (MCT4)	Hs00358829_m1
SLC 16A4 (MCT5)	Hs00190794_m1
SLC 4A8 (NDCBE3)	Hs01002224_m1

3.1.16 Größenstandards

3.1.16.1 DNA-Größenstandard

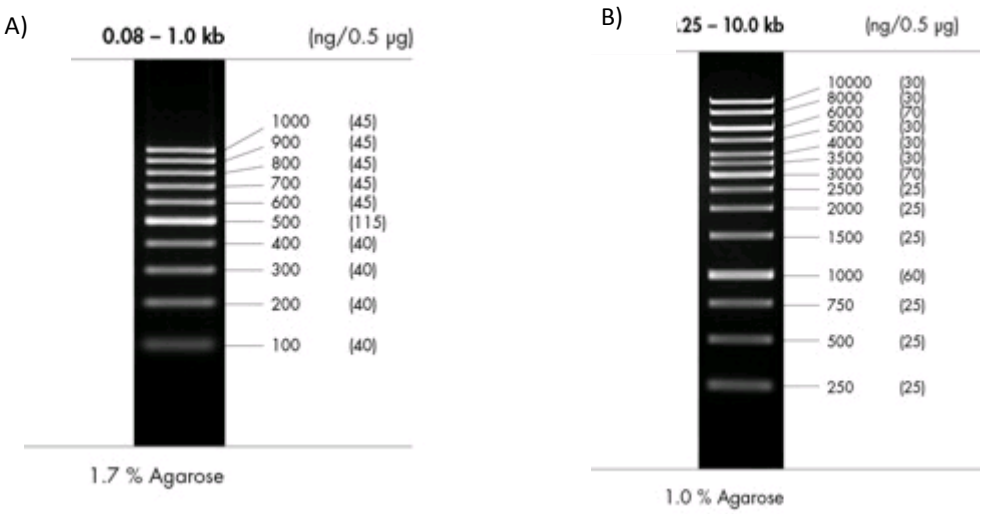


Abb. 3-2 DNA-Größenstandards für die Agarosegelelektrophorese: A) 100 bp DNA-Leiter (Peqlab, Erlangen), B) 1kb DNA-Leiter (Peqlab, Erlangen)

3.1.16.2 Protein-Größenstandard

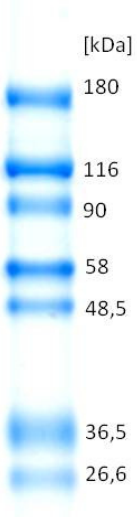


Abb. 3-3 Protein-Größenstandard für die SDS-PAGE: Prestained Molecular Weight Marker (MW 26,600-180,000 Da (Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen wurden unter konstanten Bedingungen bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einer 5%igen CO_2-Atmosphäre in Brutschränken kultiviert. Zur Kultivierung von Zellen ist ein steriles Umfeld erforderlich, dies setzt voraus, dass alle Arbeiten unter einer Sterilwerkbank mit sterilen Materialien stattfinden. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden die kultivierten Zellen täglich begutachtet und auf ihr Wachstumsverhalten sowie mögliche Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen untersucht.

3.2.1.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung fand je nach Zellbedarf und Wachstumsverhalten der Zellen in 25 cm^2 bzw. in 75 cm^2 Zellkulturflaschen statt. Alle zwei bis drei Tage wurde das verbrauchte Medium in den Kulturflaschen ausgewechselt, um den Zellen neue Nährstoffe zuzuführen und Stoffwechselendprodukte sowie abgestorbene Zellen zu entfernen. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit 1xPBS überschichtet und die Zellkulturflasche leicht geschwenkt, um Zelltrümmer und Mediumreste zu beseitigen. Mit einem bzw. drei Milliliter Trypsin/EDTA wurden die Zellen im Anschluss für ca. fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin, eine Protease, spaltet Proteine zwischen den Aminosäuren Arginin und Lysin, EDTA komplexiert Kationen, welche die Membranproteine stabilisieren können. Das Zusammenspiel beider Komponenten ermöglicht das Lösen von adhärenten Zellkulturen vom Gefäßboden. Um die Reaktion nach Ablösen der Zellen zu stoppen, wurde FCS-haltiges Kulturmedium hinzugegeben und die Zellsuspension mehrfach resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Eine definierte Menge dieser Zellsuspension wurde nun in die bereits mit Kulturmedium vorbereiteten Zellkulturflaschen überführt. Je nach Wachstumsverhalten der Zellen wurden sie in einer Verdünnung von 1:10 oder 1:20 passagiert. Für alle Arbeiten wurden die benötigten Medien und Lösungen im Wasserbad auf 37°C vortemperiert, mit Ethanol desinfiziert und ausschließlich unter der Sterilbank verwendet.

3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung können Zellen in bestimmten Einfriermedien über mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das hier verwendete Einfriermedium bestand aus fetalem Kälberserum mit 10% DMSO-Zusatz. DMSO dient als kryoprotektive Substanz und vermindert die schädliche Bildung von Wasserkristallen während des Einfrierprozesses. Die Zellen wurden wie unter 3.2.1.2 beschrieben trypsiniert und durch Zentrifugieren (1000 rpm, 5 min) pelletiert. Das Zellpellet wurde in einer entsprechenden Menge Einfriermedium aufgenommen, so dass eine Konzentration von $1x10^5$ bis $1x10^6$ Zellen/ ml vorlag. Ein Milliliter dieser Suspension wurde in geeignete Kryoröhrchen gegeben. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Kryokonservierung ist das schonende Absenken der Temperatur um ca. 1°C pro Minute. Durch die Lagerung der Kryoröhrchen in Isopropanol-gefüllten Einfrierboxen bei -80°C wurde dies ermöglicht. Nach 24h ist das Einfriermedium gefroren und für eine längere Lagerung können die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum erneuten Kultivieren der Zellen müssen diese im Gegensatz zum langsamen Einfrierprozess rasch aufgetaut werden. Dazu wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Die Zellkulturflasche wurde mit erwärmtem Medium vorbereitet. War der Auftauprozess abgeschlossen, wurde die Zellsuspension umgehend in die Kulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen adhärent waren, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um das in hoher Konzentration toxisch wirkende DMSO des Einfriermediums zu entfernen.

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Zellzählgerät CASY®ONE. In 10 ml der isotonischen Elektrolytlösung CASY®ton wurden 50 µl der Zellsuspension pipettiert und die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Das Prinzip beruht auf der elektrischen Widerstandsmessung. Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare definierter Größe gesogen. Durch die Elektrolytlösung und angelegte Elektroden fließt ein konstanter Strom. Verdrängen intakte Zellen die Elektrolytlösung erhöht sich der Widerstand. Nur viable Zellen dienen als Isolator, bei toten Zellen fehlt die Plasmamembran als elektrische Barriere. So kann zwischen viablen Zellen, toten Zellen und Zelltrümmern unterschieden werden.

3.2.1.5 Aussaat von Zellen

Je nach Zelllinie, Untersuchungsmethode und Fragestellung wurden verschiedene Zellzahlen ausgesät.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen (MDCK, HeLa, LN18, U87MG) wurden einige Milliliter der Zellsuspension auf Deckgläser in einer 12-well-Multiwellplatte getropft und so lange inkubiert, bis eine Zelldichte von ca. 70-80% erreicht wurde. Bei der zeit- und substanzabhängigen Immunfluoreszenzfärbung wurden 2-4x10^4 Zellen pro ml und Vertiefung ausgesät. In Tab. 3-3 sind die ausgesäten Zellzahlen pro Milliliter für verschiedene Methoden aufgeschlüsselt:

Tab. 3-3 Ausgesäte Zellzahlen/ml bei verschiedenen Methoden

	LN18	U87MG
Zellviabilität nach 48h und 72h Substanzgabe	7,5x10^4	1x10^5
RNA-Isolierung nach 48h Substanzgabe	3,3x10^4	5x10^4
Proteinisolierung nach 48h Substanzgabe		5x10^4
Immunpräzipitation nach 48h Substanzgabe	3,3x10^4	
Caspase-3-Assay nach 48h Substanzgabe	3,3x10^4	
BCECF-Messung (Substanzgabe, Transport)	2x10^4	2x10^4

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolierung mittels PeqGold RNAPure™

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen sowie aus Gewebe wurde mit Hilfe des kommerziellen Kits PeqGold RNAPure™ der Firma peqlab durchgeführt. Dieser Kit basiert auf der Phenol-Chloroform-Guanidinium-Isothiocyanat-Methode. Das Guanidinium-Isothiocyanat dient als Detergenz und ist für die RNA-Isolierung essentiell, da es u.a. RNasen denaturiert. Das Phenol senkt den pH und sorgt für das Lösen der Proteine und kleiner DNA-Stücke. Chloroform als wasserunlösliches organisches Lösungsmittel dient zur Bildung von zwei Phasen. Nach der Zentrifugation ist die RNA in der wässrigen oberen Phase enthalten. Proteine, DNA und Zelltrümmer befinden sich in der unteren organischen Phase oder an den Phasengrenzen als weiße Ablagerung. Die RNA wird mit Isopropanol gefällt und in weiteren Zentrifugationsschritten mit Ethanol gewaschen.

Die Isolierung der RNA aus homogenisiertem Patientengewebe und Zellkulturen erfolgte mit 250 µl PeqGold RNAPure™, 50 µl Chloroform, 125 µl Isopropanol und 350 µl 70% Ethanol

nach Vorschrift des Herstellers. Nachdem die RNA unter der Sterilbank getrocknet war, wurde sie durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 30-50 µl A. dest. gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Zellen wurden für die RNA-Isolierung in 6-well-Multiwellplatten (siehe Tab. 3-3) ausgesät und je nach Aufgabenstellung mit den entsprechenden Substanzen (siehe Tab. 3-1 und Tab. 3-2) behandelt. Nach Versuchsende wurde das Medium verworfen, die Zellen mit 250 µl PeqGold RNAPure™ für fünf Minuten inkubiert und in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss erfolgte die unter 3.2.2.1 beschriebene RNA-Isolierung mit PeqGold RNAPure™.

3.2.2.3 RNA-Isolierung aus Patientenmaterial

Um RNA aus Gewebe isolieren zu können, muss dieses zuerst homogenisiert werden. In dieser Arbeit wurde der elektrische Homogenisator der Firma B. Braun Biotech verwendet. Alle Arbeiten wurden mit stickstoffgekühltem Besteck, Mahlkugeln und Schüttelbehältern durchgeführt.

Das bei -80°C gelagerte Gewebe wurde während der Versuche mit flüssigem Stickstoff gekühlt, um ein Auftauen der Proben und somit eine Zerstörung des Gewebes zu vermeiden. Von dem Patientenmaterial wurde mit gekühltem Skalpell ein stecknadelgroßes Gewebestück abgetrennt und in ein vorbereitetes ebenfalls gekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser Probe wurden 250 µl PeqGold RNAPure™ pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das im gefrorenen PeqGold RNAPure™ enthaltene Patientenmaterial wurde in gekühlte Schüttelgefäße gegeben. Nach Zusatz der Mahlkugel wurde das Gefäß verschlossen und in den Dismembrator eingespannt. Bei 1500 rpm wurde das Gewebe im PeqGold RNAPure™ 90 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurde mit einem gekühlten Spatel das Homogenisat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolierung der RNA wurde das fertige Homogenisat fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 50 µl Chloroform versetzt. Die weiteren Isolierungsschritte erfolgten nach Herstellerangaben.

3.2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration und zur Reinheitsbestimmung wurden die Proben spektralphotometrisch mit dem Nano Drop™1000 untersucht. Da Purine und Pyrimidine im Bereich von 250-270 nm das UV-Licht absorbieren, erfolgt die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Reinheit der Probe wird durch den Quotienten aus 260 nm und 280 nm angegeben. Liegt dieser bei einem Wert von zwei, kann RNA als rein angesehen werden. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten hin. Zur Messung der aufgearbeiteten RNA wurde 1 µl Probe verwendet und auf den Leerwert des Lösungsmittels (A. dest.) bezogen.

3.2.2.5 Reverse Transkription

Um aus der isolierten RNA die Expression eines Gens mittels real-time PCR bestimmen zu können, muss diese vorher in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Durch die Verwendung des viralen Enzyms Reverse Transkriptase wird dieser Prozess ermöglicht. In dieser Arbeit wurde das TaqMan™ Reverse Transcription Kit von Applied Biosystem verwendet. Als Primer dienten Random Hexamere bei denen es sich um Oligonukleotide handelte, die aus einer zufälligen Kombination der vier Basen zusammengesetzt waren. Für die Reverse Transkription wurden 500 ng RNA als Ausgangsmaterial für 20 µl Ansätze verwendet. In Tab. 3-4 und Tab. 3-5 sind der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil der Reversen Transkription zusammengefasst.

Tab. 3-4 Pipettierschema für die Reverse Transkription

Komponente	Volumen in µl pro Reaktionsansatz
RNA (500 ng/20 µl)	variabel
10x RT-Puffer	2
25 mM $MgCl_2$	4,4
2,5 mM dNTP-Mix	4
Random-Hexamere	1
RNAse-Inhibitor	0,4
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	0,5
A. dest.	ad 20

Tab. 3-5 Temperaturprofil für die Reverse Transkription

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Hexamer-Anlagerung	25	10
Reverse Transkription	48	30
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	95	5

Nachdem die Reaktion beendet war, wurde der Ansatz mit A. dest. auf 50 µl aufgefüllt, so dass sich ein theoretischer cDNA-Gehalt von 10 ng/µl ergab.

3.2.2.6 Quantifizierung der RNA mittels real-time PCR (TaqMan™-Prinzip)

Die real-time PCR veränderte stark die Möglichkeiten zur Quantifizierung von DNA bzw. RNA mit PCR-basierten Methoden. Während die konventionelle PCR nur eine Endpunktanalyse darstellt, erfolgt bei der real-time PCR die Detektion der Amplifikate in der frühen exponentiellen Phase der PCR-Reaktion. Somit ist gewährleistet, dass das gemessene Signal direkt proportional zur Amplifizierung des gewünschten Zielgens ist.

Bei der real-time PCR finden verschiedene Systeme Anwendung. In dieser Arbeit wurde das TaqMan™-Prinzip der Firma Applied Biosystem verwendet. Die Grundlage der Messung ist das physikalische Prinzip des FRET (*Fluorescence resonance energy transfer* oder auch *Förster resonance energy transfer*). An diesem Prozess sind zwei fluoreszierende Farbstoffe beteiligt, der Reporter- und der Quencherfarbstoff. Am 5´-Ende eines Oligonukleotides befindet sich der Reporter und am 3`-Ende sitzt der Quencher. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe wird bei Anregung des Reporters das emittierte Licht vom Quencher absorbiert und die Emission des Reporters wird so verhindert bzw. abgeschwächt. Die fluoreszenzmarkierte Sonde bindet zwischen den Primern an ihre spezifische Matrize. Nach der Elongation der angelagerten Primer trifft die Polymerase auf die Sonde. Auf Grund der 5`-3`-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der Reporter von der Sonde gespalten und die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird aufgehoben. Durch die Trennung beider Fluoreszenzfarbstoffe kommt es zu einer Abnahme der FRET-Intensität und somit zur Erhöhung der Reporter-Fluoreszenz, welche ein Maß für die Konzentration der amplifizierten Nukleinsäure im Ansatz ist. Die aufgezeichnete Fluoreszenzmessung wird über die Zykluszahl aufgetragen und ergibt den typischen *Amplification plot* (Abb. 3-4). Zu Beginn der Reaktion wird die Hintergrundfluoreszenz gemessen, das spezifische Reportersignal ist auf Grund geringer cDNA-Mengen noch nicht detektierbar. Mit steigender Zyklenzahl erhöht sich die Fluoreszenzintensität des Reporters.

Bei dem sogenannten *Threshold Cycle* (C_T) hat die Reporterintensität ca. das 10-fache der Hintergrundfluoreszenz erreicht. Dieser C_T-Wert bildet die Grundlage für die Berechnung von Expressionsunterschieden. Wird ein niedriger C_T-Wert registriert, war die Ausgangskonzentration des zu untersuchenden Fragments hoch.

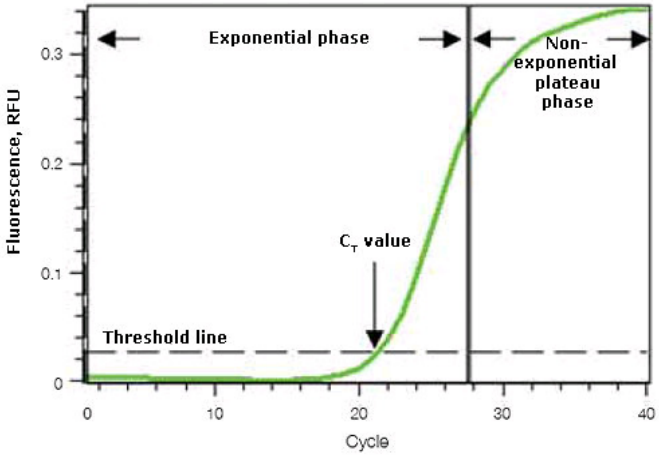


Abb. 3-4 Darstellung eines typischen *Amplification plot* bei der *real-time* PCR: Die Fluoreszenzintensität (RFU) wurde gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die *Threshold line* und der C_T-Wert sind abgebildet.(Quelle: BIORAD).

In dieser Arbeit erfolgte die real-time Messung mit dem ABI Prism 7900 Sequence Detection System von Applied Biosystems. Eine Übersicht über die verwendeten Primer-Sonden-Kombinationen (Assays) befindet sich in Abschnitt 3.1.15. Für den Reaktionsansatz diente der Curry-Master-Mix (Tab. 3-6) als Grundlage und wurde mit den jeweiligen Assays (10x konzentriert), der cDNA und A. dest. eingesetzt. Die 20 µl-Ansätze wurden auf 96-well-Mikrotiterplatten verteilt. Die Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt, zudem wurden bei jeder Messung Negativkontrollen (*NTC-non template control*) mitgeführt. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil sind in Tab. 3-7 und Tab. 3-8 dargestellt.

Tab. 3-6 Pipettierschema für den Ansatz des Curry-Master-Mix (CMM)

Komponente	Volumen [µl]
Wasser	596
1 M Tris-HCl pH=8,4	46
2 M KCl	57,5
25 mM $MgCl_2$	276
Glycerol	92
10 mM dNTP	46
Rox	23

Tab. 3-7 PCR-Reaktionsansatz für eine 96-well-Mikrotiterplatte.

Komponente	Volumen [µl]
CMM	1150
A.dest.	805
Primer-Sonden Mix, 10x	115
Taq-Polymerase	8

Das Temperaturprofil setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

Tab. 3-8 Temperaturprofil der real-time PCR

	Temperatur[°C]	Zeit [s]	
Vorinkubation	50	120	
Aktivierung der Polymerase	95	300	
Real-time PCR			
Denaturierung	95	15	} 45 Zyklen
Annealing/ Elongation	60	60	

Die Daten wurden mit der Methode der relativen Quantifizierung ausgewertet. Hierbei wird die Expression (C_T-Wert) der Zielsequenz auf die Expression (C_T-Wert) einer zweiten Sequenz normalisiert, die häufig einem sogenannten Housekeeping-Gen zugeordnet werden kann. Bekannte Housekeeping-Gene sind z.B. GAPDH, β-Aktin und 18S rRNA, da bei diesen Genen von einer konstanten Expression, unabhängig von Einflüssen auf die Zelle, ausgegangen wird. In dieser Arbeit wurde 18S rRNA als Referenzsequenz zur Normalisierung der Expressionswerte verwendet.

Zur Auswertung der mRNA-Expression diente die $2^{-\Delta\Delta CT}$-Methode nach Livak und Schmittgen (*132*). Bei dieser Methode werden ebenfalls die C_T-Werte des Zielgens und die C_T-Werte des Housekeeping-Gens der jeweiligen Probe subtrahiert. Dies ergibt den ΔC_T-Wert. Bei den Zellkulturuntersuchungen wurden die ΔC_T-Werte der Lösungsmittelkontrollen zum Mittelwert zusammengefasst und von den ΔC_T-Werten der behandelten Zellen abgezogen, so dass sich der $\Delta\Delta C_T$-Wert ergab. Dieser Wert wurde als negativer Exponent der Zahl 2 eingesetzt ($2^{-\Delta\Delta CT}$) und in den statistischen Auswertungen verwendet. Bei den Gewebeuntersuchungen wurde der Mittelwert aller gemessenen Proben einer 96-well-Mikrotiterplatte vom ΔC_T-Wert jeder Probe abgezogen und ergab den $\Delta\Delta C_T$-Wert der einzelnen Gewebeproben.

3.2.3 Generierung überexprimierender LN18-Zellen

In dieser Arbeit wurden stabile Transfektanten der Zelllinie LN18 generiert. Die Transfektanten überexprimierten den Transporter MCT1. Um stabile Transfektanten in Säugerzellen zu erhalten, wurde der Vektor pcDNA^{TM}3.1/Hygro(+)-Vektor der Firma Invitrogen^{TM} verwendet. In diesen Vektor wurde die kodierende Gensequenz SLC16A1 (MCT1) kloniert. Als Ausgangsplasmide für die MCT1-Klonierung diente das Plasmidkonstrukt SLC16A1-pEF6/V5-His-TOPO®. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Frau PD Meyer zu Schwabedissen zur Verfügung gestellt.

3.2.3.1 Restriktion von DNA-Fragmenten durch Endonukleasen

Endonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche eine DNA-Sequenz spezifisch erkennen und diese spalten. Die Restriktion kann zum einen eingesetzt werden, um gesuchte Fragmente zu identifizieren, zum anderen um Fragmente aus den Ausgangsplasmiden zu isolieren. Bei der Isolierung werden Enzyme gewählt, die das Insert flankieren. Dadurch wird das Insert vollständig aus dem Plasmid entfernt und besitzt nun definierte Sequenzen an seinen Enden. Wird nun ein anderer Vektor mit den gleichen Enzymen linearisiert, entstehen die gleichen Sequenzabschlüsse und es ist möglich über die Schnittstellen das Insert zielgerichtet in den Vektor zu ligieren. In verschiedenen Anwendungen ist es nötig mit Hilfe einer PCR kompatible Enzymsequenzen in Fragmente einzufügen. Dafür werden Primer mit Sequenzen der benötigten Schnittstellen konfiguriert, das durch PCR erhaltene Amplifikat mit dem gewünschten Enzym gespalten und in den Vektor ligiert. Mit Restriktionsenzymen werden auch Kontrollspaltungen durchgeführt. Bei den Kontrollspaltungen werden generierte Plasmidkonstrukte mit solchen Enzymen behandelt, die mindestens einmal im Insert spalten. Ist das Insert im Vektor vorhanden, ergeben sich dadurch spezifische Fragmentmuster, die sich von denen des Leervektors unterscheiden.

Die Spaltungen wurden mit Restriktionsenzymen und passenden Puffersystemen der Firma New England Biolabs (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt. Ein entsprechendes Pipettierschema ist in Tab. 3-9 dargestellt.

Tab. 3-9 Pipettierschema für eine Spaltung mit Restriktionsenzymen

Komponente	Volumen in µl/ 20µl Reaktionsansatz	Endkonzentration
BSA (10 x)	2 µl	1 x
Puffer (10 x)	2 µl	1 x
Plasmid-DNA	variabel	500 - 1000 ng
Restriktionsenzym	Variabel	5 U
A. dest.	ad 20 µl	-

3.2.3.2 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrem Molekulargewicht verwendet. Die DNA wandert im elektrischen Feld auf Grund ihrer negativen Ladung zur Anode. Fragmente mit niedrigen Molekulargewichten weisen eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit im Gel auf als Fragmente mit hohen Molekulargewichten. Somit richtet sich die Menge an verwendeter Agarose nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Je mehr Agarose verwendet wird, umso feinporiger wird das Gel und kleine Molekulargewichte lassen sich besser auftrennen.

In dieser Arbeit wurden 0,8-1,5%ige Agarosegele zur Isolierung von Amplifikaten sowie zum Nachweis und zur Größenkontrolle von Fragmenten nach Kontrollspaltungen benutzt. Für die Gele wurde Agarose in 1xTBE-Puffer unter Erhitzen gelöst, mit Ethidiumbromid (0,035 ng/ml) versetzt und in Gelkammern gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und dient zur späteren Detektion der Fragmente unter UV-Licht. Das polymerisierte Gel wurde in eine Laufkammer gelegt, welche mit 1xTBE Puffer gefüllt war. Die DNA-Proben wurden mit dem 10x DNA-Laufpuffer 1:10 verdünnt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 80 V für ca. 40 Minuten durchgeführt. Zur Auswertung wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid waren die Fragmente sichtbar und konnten mit dem mitgeführten Größenstandard verglichen werden.

3.2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden diese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgetrennt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Nucleo Spin® Extrakt II Kit der Firma Macherey Nagel nach Herstellerprotokoll.

3.2.3.4 Ligation

Bei einer Ligation werden die Enden zweier DNA-Fragmente unter ATP-Verbrauch miteinander verknüpft. Die Reaktion einer freien 5´-Phosphat- mit der 3´-OH-Gruppe eines benachbarten DNA-Fragments wird dabei von einer Ligase katalysiert. Für die Ligation der Fragmente in die Vektoren wurde die T4-Ligase verwendet. Um die Ligation von Vektor und Insert zu begünstigen, wurde das DNA-Fragment im Überschuss zum Ansatz gegeben. Ein Verhältnis von 1:3 (Vektor-Insert) wurde bevorzugt. Für den Vektor liegt die einzusetzende Menge zwischen 50-200 ng. Die Konzentration an Insert wurde nach folgender Formel unter Berücksichtigung des Molekulargewichts berechnet:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}} \times \frac{3}{1} = \text{ng Insert}$$

Der Ligationsansatz wurde nach Tab. 3-10 pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für die Transformation in kompetente E. coli Zellen verwendet.

Tab. 3-10 Reaktionsansatz für die Ligation

Komponente	Volumen je 10 µl Ansatz	Endkonzentration
Ligase-Puffer (10 x)	1 µl	1 x
Vektor-DNA	variabel	50 - 200 ng
Fragment-DNA	variabel	3-fach Überschuss
T4-DNA-Ligase	1 µl	1 U
A. dest.	ad 10 µl	-

3.2.3.5 Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen fremder DNA in Bakterien. Eine Voraussetzung dafür ist, dass Bakterienzellen u.a. durch chemische Behandlung transformationskompetent geworden sind. In dieser Arbeit wurden SoloPack®-Gold superkompetente E. coli Zellen verwendet. Zu 50 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten E.coli Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes pipettiert und vorsichtig vermischt. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Der Ansatz wurde nochmals für zwei Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 250 µl 1xLB-Medium versetzt. Im Schüttelinkubator wurde der Ansatz bei 37°C und 250 rpm für 90 Minuten inkubiert. Auf vorbereitete LB-Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin (50 µg/ml) wurden 50-200 µl des Ansatzes ausplattiert und über Nacht im

Brutschrank bei 37°C kultiviert. Auf den Kulturplatten konnten nur Bakterien wachsen, die das entsprechende Resistenzgen mit dem Plasmid aufgenommen hatten.

3.2.3.6 Isolation von Plasmid-DNA

Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden einzelne Kolonien nach der Transformation von der Agarplatte entfernt, in 2 ml 1xLB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) überführt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 250rpm vermehrt. Diese Ansätze wurden mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde in A. dest. eluiert und die Konzentration mit dem Nano Drop™1000 bestimmt. Zur Identifizierung positiver Klone wurden Kontrollspaltungen mit geeigneten Restriktionsenzymen sowie eine Sequenzierung durchgeführt. Positive Klone wurden für Transfektionen in die Zelllinie LN18 verwendet.

3.2.3.7 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden wurden 100 ng/µl Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl A. dest. aufgenommen. Dieser Ansatz wurde in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß zur Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) gesendet, welche die Sequenzierungen durchführte. Standard Primer für die Sequenzierungen konnten online bei der Firma ausgewählt werden.

3.2.3.8 Transfektion von LN18 Zellen mit Plasmid-DNA

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von fremder DNA in eukaryontische Zellen. Für diesen Prozess muss die DNA durch die Zellmembran gelangen. In der vorliegenden Arbeit geschah dies mit Hilfe des Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent der Firma Invitrogen. Das Prinzip beruht auf der Bildung eines Komplexes aus Lipiden und der DNA. Die Lipide bilden in wässriger Umgebung spontan Vesikel an die sich DNA durch elektrostatische Wechselwirkungen anheftet. Diese Lipidvesikel begünstigen die Aufnahme der DNA in die Zelle durch Lipid-Lipid-Wechselwirkungen mit der Zellmembran. Für die Transfektion wurden LN18-Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% in 6-well-Multiwellplatten angezogen. Von der Plasmid-DNA wurden 4 µg eingesetzt und mit dem Lipofectamin-Reagenz nach Herstellerangaben verwendet. Zur Transfektion wurde die Plasmid-DNA des Klons SLC16A1-pcDNA™3.1/Hygro(+) verwendet.

3.2.3.9 Selektion stabiler Transfektanten

Die Zellen wurden 48h nach erfolgter Transfektion abtrypsiniert und in einem Milliliter Medium resuspendiert. Von diesem Milliliter wurden 25 µl, 50 µl, 100 µl und 250 µl auf Zellkulturschalen mit Netzraster verteilt. In den Zellkulturschalen waren 20 ml Nährmedium und Hygromycin B (100 µg/ml) als Selektionsantibiotikum vorgelegt. Der Vektor pcDNA^{TM}3.1/Hygro(+) enthält ein Resistenzgen für dieses Antibiotikum, so dass nur erfolgreich transfizierte Zellen in diesem Medium wachsen konnten. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Waren ausreichend große Zellkolonien gewachsen, wurden diese vorsichtig mit 1 µl Trypsin gelöst, mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in eine Vertiefung einer 24-well-Multiwellplatte überführt. Die Selektion erfolgte weiterhin mit Hygromycin B. Positive Klone wurden durch Western-Blot-Analysen und Aktivitätsmessung der Transporter ermittelt, vermehrt und kryokonserviert.

3.2.3.10 Klonierung von SLC16A1-pcDNA^{TM}3.1/Hygro(+)

Um das gewünschte Fragment aus dem Ausgangsplasmid in den Zielvektor ligieren zu können, wurde ein Verdau von SLC16A1-pEF6/V5-His-TOPO® und des Zielvektors pcDNA^{TM}3.1/Hygro(+) mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI durchgeführt. Der linearisierte Vektor und das Fragment von SLC16A1 wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Gelextraktion aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte die Ligation des Fragments in den pcDNA^{TM}3.1/Hygro(+)-Vektor. Nach erfolgreicher Transformation in kompetente Bakterien wurde die Plasmid-DNA (SLC16A1-pcDNA^{TM}3.1) durch Kontrollspaltungen mit HindIII auf Vorhandensein des richtigen Inserts anhand von spezifischen Bandenmustern in der Agarosegelelektrophorese überprüft. Ausgewählte Klone wurden zudem sequenziert und bei korrekter DNA-Sequenz zur Transfektion in LN18-Zellen verwendet.

3.2.4 Proteinanalytische Methoden

3.2.4.1 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein spezifischer Primärantikörper bindet an sein Antigen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper ist gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet, bindet an diesen und der Komplex kann detektiert werden. Die Visualisierung des Signals erfolgt durch ein Fluoreszenzmikroskop. Hierbei wird das Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert darauf Licht in spezifischer Wellenlänge, das selektiv durch Filter zur Kamera, zum Okular oder zum Detektor gelenkt wird. In dieser Arbeit wurde das konfokale Laser-scanning Mikroskop LSM 780 der Firma Zeiss verwendet. Durch die Konfokalität des Mikroskops lassen sich vor allem Untersuchungen von Gewebeproben und zur subzellulären Lokalisation vornehmen. Durch die technische Ausstattung des Mikroskops sind Vergleiche von identisch behandelten Präparaten durch Immunfluoreszenzaufnahmen möglich.

Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der Fluoreszenzfarbstoff direkt an den Primärantikörper gekoppelt oder wechselwirkt mit Organellen und Zellbestandteilen. Beispiele sind der Kernfarbstoff DAPI, welcher sich in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA einlagert und der MitoTracker®, welcher in Mitochondrien akkumuliert.

3.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz von Zellen

Für Immunfluoreszenzaufnahmen wurden die Zellen in 12-well-Multiwell-Platten auf Deckgläsern ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80% kultiviert. War die gewünschte Konfluenz erreicht, wurde das Medium abgesaugt und die Zellkultur vorsichtig mit 1xPBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Durch Alkohole oder Aceton als Fixierungsmittel kann auf eine zusätzliche Permeabilisierung durch Detergentien, wie Triton X, verzichtet werden. Das in dieser Arbeit am häufigsten verwendete Fixierungsmittel für Zellen ist Ethanol. Für Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Antikörper gegen MCT4 wurde jedoch Aceton verwendet, da bei der Fixierung mit Ethanol kein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. Die Wahl von Fixierungs- und/oder Permeabilisierungsmittel wurde für alle Antikörper ausgetestet. Nach erfolgter Fixierung wurden die Zellen erneut mit 1xPBS gewaschen und für eine Stunde mit der Blockierlösung (5% FCS in 1xPBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primärantikörper wurden in der Blockierlösung 1:50 oder 1:100 verdünnt und 20-30 µl dieser Verdünnung wurden auf die Deckgläser getropft. Da die

Inkubation der Antikörper über Nacht bei 4℃ erfolgte, wurden die Deckgläser vorsichtig mit Parafilm bedeckt. Dies schützte vor Austrocknung und sorgte für eine gleichmäßige Verteilung der Antikörpersuspension auf dem Deckglas. Bei Kofärbungen mit zwei verschiedenen Primärantikörpern wurden diese zeitgleich in einer Suspension auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurde zum Entfernen ungebundener Antikörper dreimal mit 1xPBS gewaschen und der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben. Für diese Arbeit wurden ausschließlich Alexa-Fluor®-488 und Alexa-Fluor®-568 gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Die Verdünnung (1:200) der Sekundärantikörper erfolgte in Blockierlösung. Die Wahl der Sekundärantikörper richtet sich nach dem Wirtstier des Primärantikörpers. Bei Kofärbungen ist außerdem das Wirtstier der beiden Sekundärantikörper zu beachten, da sonst Interaktionen der beiden Sekundärantikörper untereinander die Ergebnisse verfälschen könnten. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluorochrome sollten bei Kofärbungen ausreichend weit voneinander getrennt liegen, damit eine separate Detektion möglich ist. Da die Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert waren, erfolgte die Inkubation der Zellen für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Nach Inkubation wurden die Zellen erneut dreimal mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser vorsichtig aus der Multiwellplatte gehoben und auf Objektträger mit Dako Eindeckmedium eingedeckelt. Für die Kernfärbung wurde DAPI (1 mg/ml) im Eindeckmedium 1:2000 verdünnt.

Um Kreuzreaktionen und unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper mit zellulären Proteinen auszuschließen, wurden einige Deckgläser nur mit Sekundärantikörpern und DAPI inkubiert und stellten somit die Negativkontrollen dar.

3.2.4.3 Färbung mit dem Lebendfarbstoff MitoTracker® Red FM

Zur Darstellung von Mitochondrien in der Fluoreszenzmikroskopie kann der Lebendfarbstoff MitoTracker® verwendet werden. Er diffundiert passiv durch die Plasmamembran und lagert sich in aktive Mitochondrien ein. Aus einer Stammlösung von 1 mM MitoTracker® wurde eine 1:40 Verdünnung in Kulturmedium angesetzt. Die auf Deckgläsern ausgesäten Zellen wurden mit der MitoTracker®-Verdünnung für 30 Minuten bei 37℃ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläser mit 1xPBS gewaschen und wie unter 3.2.4.2 beschrieben mit der indirekten Immunfluoreszenz begonnen.

3.2.4.4 Indirekte Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten

Die Immunfluoreszenz von Gewebe wurde an Gefrierschnitten durchgeführt. Dazu wurde das Gewebe in Tissue Tek eingebettet und 5-6 µm dünne Schnitte im Kryotom CM1900 der Firma Leica bei -20°C angefertigt. Die Schnitte wurden auf einen SuperFrost® Plus Objektträger gezogen und bei -80°C gelagert. Für die Färbung wurden die Objektträger bei 37°C auf einem Strecktisch getrocknet und in vorgekühltem Aceton bei -20°C fixiert und permeabilisiert. Die Objektträger wurden erneut getrocknet und je zwei bis drei Schnitte wurden mit einem Fettstift der Firma Dako umrandet. Durch das Umranden war es möglich mehrere Schnitte auf einem Objektträger zeitgleich mit unterschiedlichen Antikörpern zu inkubieren.

Die Objektträger wurden nun in Glasküvetten mit Blockierlösung für eine Stunde geschüttelt. Von den verdünnten Antikörpern wurden 30-40 µl vorsichtig auf die Schnitte gegeben. Die Objektträger wurden für die Antikörperinkubation über Nacht bei 4°C in feuchte Kammern gelegt. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal mit 1xPBS in Glasküvetten gewaschen und in abgedunkelten feuchten Kammern mit den fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern für zwei Stunden inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Sekundärantikörper wurde mit 1xPBS gewaschen. Zum Eindeckeln wurden die Objektträger vorsichtig mit Zellstoff abgetupft, um überschüssiges PBS zu entfernen. Eine Lösung aus DAPI und Eindeckmedium wurde auf Deckgläser getropft und diese langsam unter Vermeidung von Luftblasen auf die Schnitte gelegt.

3.2.4.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung ist eine häufig angewendete Übersichtsfärbung. Die Zellkerne werden durch das Hämatoxylin bläulich angefärbt, das Eosin sorgt für eine rötliche Plasmafärbung. Das Hämatoxylin lagert sich an Phosphatgruppen der DNA an. Durch anschließendes Überführen der Proben in Leitungswasser wird der Prozess des Bläuens eingeleitet. Durch das Leitungswasser wird der pH-Wert der einst sauren Hämatoxylin-Verbindung erhöht, wodurch es zur blauen Kernfärbung kommt. Das negativ geladene Eosin bindet an positive Gruppen u.a. von Proteingruppen und färbt dadurch das Zytoplasma. Nach der Eosinfärbung werden die Proben in A. dest. ausdifferenziert und es entwickelt sich eine rosa bis rötliche Färbung. Im Anschluss wird den Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe das Wasser entzogen. Das Eindecken erfolgt luftdicht mit wasserfreien Medien.

Mit der HE-Färbung wurden in dieser Arbeit zum einen Zellkulturen von Transfektanten gefärbt um Unterschiede in der Morphologie sichtbar zu machen, zum anderen wurden

Gefrierschnitte von Gehirnen der Versuchstiere gefärbt, um den Tumor nachweisen zu können. Die Färbungen in dieser Arbeit wurden nach folgendem Protokoll angefertigt:

Fixierung der Proben mit Aceton, 20min bei -20°C

Trocknung bei Raumtemperatur

Inkubation für 15min in Hämatoxylin

Kurzes Spülen mit A. dest.

Spülen in angesäuertem A. dest. (pH 6) zur besseren Ausdifferenzierung

Kurzes Spülen mit A. dest.

Bläuen in Leitungswasser (ca. 5min)

Inkubation für 1min in EosinG-Lösung

Spülen mit A. dest.

Je 1min in aufsteigender Alkoholreihe entwässern:

80% Ethanol

95% Ethanol

100% Ethanol

Trocknen der Schnitte

Eindecken mit Roti® Histokitt

Bei Färbungen von Gefrierschnitten wurden die Objektträger in Glasküvetten gestellt und mit den entsprechenden Lösungen behandelt. Erfolgte die Färbung von Zellen, wurden diese auf Deckgläser in 12-well-Multiwellplatten bis zur gewünschten Konfluenz angezogen. Die Fixierung und alle weiteren Färbeschritte wurden in der Multiwellplatte durchgeführt. Eingedeckt wurden die Zellen auf Objektträger. Die fotografische Dokumentation der Färbungen erfolgte bei Durchsicht mit dem Axiovert 25 Mikroskop der Firma Zeiss. Zur Größenermittlung der Tumoren in den HE-Färbungen wurde das Programm ImageJ verwendet.

3.2.4.6 Mitochondrienanreicherung über Antikörper-gekoppelte Magnetbeads

Die Anreicherung von isolierten Mitochondrien aus LN18-Zellen erfolgte mit Hilfe des Mitochondria Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec. Im Unterschied zur Gradientenzentrifugation, die zur Trennung von Zellbestandteilen häufig verwendet wird, basiert diese Methode auf Magnetbeads, die mit spezifischen Antikörpern gekoppelt sind und über Magnetfelder separiert werden.

Für diese Versuche wurden LN18-Zellen in T75 Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz von ca. 80% angezogen und mit Trypsin geerntet. Die Zellen wurden auf eine Gesamtzellzahl von $1x10^7$ in zehn Milliliter mit eiskaltem 1xPBS eingestellt und anschließend bei 300 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem Milliliter Lysepuffer resuspendiert. Alle anschließenden Arbeiten erfolgten auf Eis um Proteaseaktivitäten zu minimieren. Um die Zellen aufzuschließen, wurde die Suspension 20mal durch eine 26G Kanüle auf eine 2-ml-Spritze gezogen. Die so lysierten Zellen wurden in neun Milliliter 1x Separation-Buffer aufgenommen und gut gemischt. Zu der so vorbereiteten Zellsuspension wurden 50 µl der Magnetbeads hinzugegeben und eine Stunde unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Die in diesem Kit verwendeten Magnetbeads sind mit dem anti-TOM22-Antikörper gekoppelt. Das Protein TOM22 ist eine Translokase in der äußeren Mitochondrienmembran, so dass eine spezifische Anreicherung von Mitochondrien möglich ist. Während der Inkubation wurden die Säulen (LS Columns) in das magnetische Feld gebracht und mit Puffer gespült. Das magnetische Feld wurde durch den QuadroMacs® Magneten und dem MACS MultiStand erzeugt. Das Zelllysat wurde in Etappen von je drei Milliliter auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde zur Kontrolle der Aufreinigung aufgefangen. Durch die Bindung der Mitochondrien über den TOM22-Antikörper an die Magnetbeads wurden die Organellen in der Säule durch das Magnetfeld zurückgehalten. Nach Durchlaufen des Lysats wurde die Säule dreimal mit je drei Milliliter Separation-Buffer gewaschen. Um die Mitochondrien zu eluieren, wurde die Säule vom Magneten entfernt und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gestellt. Mit 1,5 ml Separation-Buffer wurden die an die Beads gebundenen Mitochondrien aus der Säule herausgewaschen indem ein Kolben mit leichtem Druck in die Säule eingeführt wurde. Um den Proteingehalt der Mitochondrienanreicherung für Immunoblots zu bestimmen, wurde das Eluat für zwei Minuten bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Milliliter Storage-Buffer aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 100 µl Storage-Buffer resuspendiert. Bis zur Verwendung wurde das Eluat und der Überstand bei -80°C gelagert.

3.2.4.7 Immunpräzipitation mit Protein-A-Sepharose

Um den Phosphorylierungsgrad von NHE1 bei LN18-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen zu untersuchen, wurde die Methode der Immunpräzipitation gewählt. Hierbei wird nach Lyse der Zellen ein spezifischer Antikörper hinzugegeben der an sein Antigen bindet. Um den Antikörper-Antigen-Komplex von den übrigen Zellbestandteilen zu separieren, werden Protein-A oder Protein-G verwendet. Diese Moleküle binden spezifisch an die Fc-Regionen von Antikörpern. Das in dieser Arbeit verwendete Sepharose-A besteht aus Sepharose-Kugeln (Beads), welche mit Protein-A beschichtet sind. Diese Sepharose-Beads binden an den Antikörper-Antigen-Komplex und können durch Zentrifugation separiert werden. Die isolierten Komplexe können nun mittels Western Blot untersucht werden. Um den Phosphorylierungsgrad von NHE1 zu bestimmen, wurde der anti-NHE1 Antikörper zur Immunpräzipitation verwendet und ein anti-Phospho- Ser/Thr/Tyr-Antikörper zur Detektion im Western Blot eingesetzt.

Für die Immunpräzipitation wurden LN18-Zellen in 6-well-Multiwellplatten ausgesät und 48h mit den Substanzen DMSO, Wasser, Diclofenac 250 µM, Ibuprofen 250 µM, Celecoxib 50 µM und Teniposid 10 µM inkubiert. Die Arbeitsschritte der Immunpräzipitation erfolgten auf Eis, um Degradationen durch Proteasen zu vermindern, zudem wurde allen Puffern Protease-Inhibitoren (PMSF 0,1 mM; Aprotinin 0,3 µM; Leupeptin 0,1 µM) zugesetzt. Dem Lysepuffer wurde zudem ein Phosphatase-Inihibitor-Cocktail (1:1000) sowie Natriumorthovanadat (1 mM) zugefügt um Dephosphorylierungen durch Phosphatasen zu vermeiden. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und mit 300 µl RIPA-Lysepuffer überschichtet. Die adhärenten Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet, in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben alle fünf Minuten mit einem Vortexer durchmischt. Durch 5minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 4000 rpm wurden Zelltrümmer entfernt. Das Lysat wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit 10 µl Sepharose-A für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt wird als „pre-clearing“ bezeichnet und soll mögliche unspezifische Bindungen vermindern. Um die Sepharose-A zu entfernen, wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung verwendet. Von den Überständen wurden 100 µg Protein mit 10 µl des anti-NHE1-Antikörpers versetzt und mit kaltem PBS auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Diese Suspension rotierte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde den Ansätzen 20 µl Protein-A–Sepharose-Beads zugesetzt und diese nochmals für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Die entstandenen Komplexe wurden durch kurzes Zentrifugieren bei 13000 rpm pelletiert. Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurde der Überstand aufgefangen. Die Beads wurden dreimal mit eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen und in 30 µl 4xLämmli-Puffer resuspendiert, um die Proteine von den

Sepharose-Beads zu eluieren. Das Gemisch wurde fünf Minuten bei 95°C erhitzt und für Analysen mittels SDS-PAGE verwendet.

3.2.4.8 Isolation von Gesamtprotein

Um die Proteinexpression der Transporter unter Einfluss der Substanzen zu untersuchen, wurde Gesamtprotein verwendet. Dafür wurden die Zellen in 6-well-Multiwellplatten ausgesät. 20-24 Stunden nach Aussaat wurden die Substanzen und die Lösungsmittelkontrollen hinzugegeben und die Zellkultur für 48h im Brutschrank inkubiert. Für die Proteinisolation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen um FCS-Reste und Zelltrümmer zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 5 mM Tris-HCl-Puffer, welcher zusätzlich Protease-Inhibitoren (PMSF: 0,1 mM, Aprotinin: 0,3 µM und Leupeptin: 0,1 µM) enthielt, überschichtet. Die Zellen wurden mit Zellschabern geerntet und in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 5000 g wurde das Pellet in 30-60µl Tris-HCl-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte physikalisch durch mehrfache Tau-Gefrier-Zyklen in flüssigem Stickstoff und 37°C Wasserbad. Die so aufgeschlossenen Zellen wurden kurz anzentrifugiert und der Überstand wurde für die Proteinbestimmung verwendet.

3.2.4.9 Bestimmung des Proteingehalts

In dieser Arbeit wurde der Proteingehalt durch die BCA-Methode bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf der Biuret-Reaktion bei der Proteine mit zweiwertigen Kupferionen Komplexe bilden wodurch die Kupferionen reduziert werden. Die einwertigen Kupferionen bilden daraufhin mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, welcher bei 560 nm photometrisch gemessen werden kann.

Für die Proteinbestimmung wurden 10 µl der Proteinlysate in Doppelbestimmung mit 200 µl des Färbereagenz versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Färbereagenz bestand aus einem Teil Cu_2SO_4-Lösung und 50 Teilen Bicinchoninsäure und wurde stets frisch für den Versuch angesetzt. Zur Proteinbestimmung wurde parallel eine Eichreihe aus BSA (Rinderserumalbumin) in den Konzentrationen von 0, 200, 400, 600, 800 und 1000 µg/ml mitgeführt. Die Messung der Proben und der Eichkurve erfolgt bei 560 nm. Die Proteingehalte der Proben konnten durch lineare Regression anhand der Eichreihe bestimmt werden.

3.2.4.10 Western Blot

Die Methode des Western Blots dient der Analyse einzelner Proteine in einem Proteingemisch. Zuerst erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im SDS-Gel, anschließend werden die Proteine auf eine Membran überführt und somit für die Immunfärbung zugänglich gemacht. Mit Hilfe der Immunfärbung kann ein spezifisches Protein detektiert werden.

3.2.4.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht verwendet. Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) werden zum einen die Proteine denaturiert, zum anderen bilden sich SDS-Protein-Komplexe welche negativ geladen sind. Dadurch werden alle Proteine unabhängig von ihren räumlichen Strukturen und unterschiedlichen Ladungen im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Größenauftrennung erfolgt durch Polyacrylamid-Gele. Acrylamid und Bisacrylamid bilden durch Zugabe des Initiators APS und des Katalysators TEMED vernetzte Strukturen, wobei Acrylamid die Kettenlänge vorgibt, während Bisacrylamid diese Ketten vernetzt und somit die Porengröße bestimmt. Durch Variation der Acrylamid- und Bisacrylamid-Menge können Gele unterschiedlicher Porengröße erzeugt werden. Ein hoher Acrylamid- und Bisacrylamid-Anteil sorgt für eine dichte Struktur und eignet sich für die Auftrennung kleiner Proteine. In dieser Arbeit wurden 10%ige Polyacrylamidgele verwendet, da die untersuchten Proteine Molekulargewichte zwischen 35 und 120 kDa aufwiesen.

Zum Gießen der Gele wurde die Apparatur zusammengebaut und mit dem Trenngelansatz auf ca. 75% der Gesamtgröße des Gels befüllt. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde dieses mit dem Sammelgelansatz überschichtet. In das Sammelgel wurde vorsichtig ein Kunststoffkamm eingesetzt, welcher mit seinen Zinken die Aussparungen für das Auftragen des Proteingemischs erzeugt. Der Ansatz von Sammelgel und Trenngel basiert auf der diskontinuierlichen Gelelektrophorese, bei der trotz größerer Proteinmengen (10-50 µg) eine scharfe Auftrennung erfolgt. Im großporigen Sammelgel bildet sich die typische Lauffront und die Proteine konzentrieren sich an der Grenze zum Trenngel. Im kleinporigen Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht.

Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele in die Elektrophoreseeinrichtung eingespannt, welche mit 1xTank-Puffer befüllt wurde. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit Puffer gespült. Die Proben wurden auf einen Proteingehalt von 20-50 µg eingestellt und mit A. dest. auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden 5 µl 4xLämmli-Puffer pipettiert. Der Lämmli-Puffer enthält SDS

und β-Mercapthoethanol und trägt somit ebenfalls zur Denaturierung der Proteine bei. Zudem wurde der 20 µl Ansatz für fünf Minuten bei 95°C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Die Proben wurden nun in die Aussparungen (Taschen) des Sammelgels pipettiert. Ein Proteingrößenstandard (*prestained SDS molecular weight marker*, Sigma, 7,5 µl) wurde ebenfalls erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Ausbildung der Lauffront im Sammelgel wurde eine Spannung von ca. 80 V angelegt, erreichte die Lauffront den Übergang zum Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht und bis zum Ende der Elektrophorese beibehalten.

3.2.4.10.2 Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Das Übertragen der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran ist notwendig, um die nachfolgende Immunfärbung besser durchführen zu können. Die Proteine werden elektrophoretisch aus dem Gel auf die Membran übertragen und binden durch hydrophobe Wechselwirkungen an dieser. Für diese Arbeit wurde das Nass-Blot-Verfahren nach Towbin et al. (*133*) verwendet.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Trenngel vom Sammelgel separiert und vorsichtig in kaltem Towbin-Puffer geschwenkt. Zuvor wurde dem Puffer 20% Methanol zugesetzt und dieser Ansatz gekühlt. Das zugesetzte Methanol aktivierte die Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran. Die auf Gelgröße zugeschnittene Membran (Porengröße 0,2 µm) und die Whatman-Filterpapiere wurden ebenfalls in eiskaltem Towbin-Puffer getränkt. Der Zusammenbau des Blots erfolgte luftblasenfrei nach dem Sandwich-Blot-Prinzip dargestellt in Abb. 3-5.

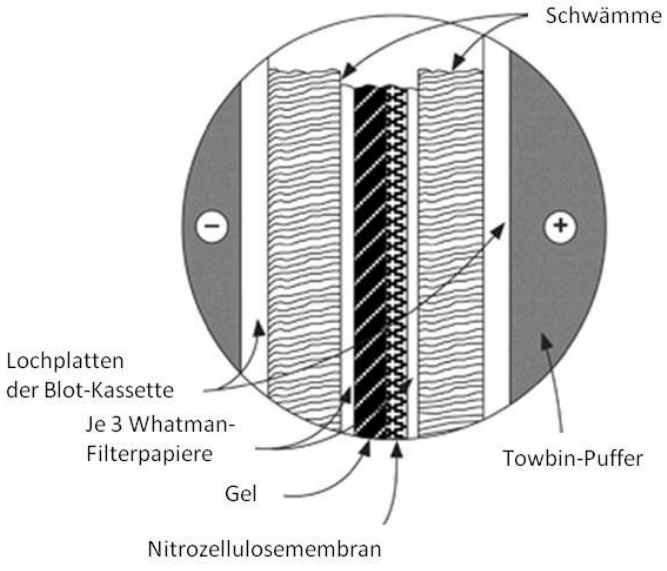


Abb. 3-5 Schema eines Sandwich-Blots, modifiziert nach Gallagher et al. (*134*)

Die elektrophoretische Übertragung der Proteine auf die Membran wurde bei 320 mA für zwei Stunden durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Die Ponceaurotfärbung ist eine reversible Proteinfärbung und dient der Kontrolle des Proteintransfers. Die in der Lösung enthaltene Trichloressigsäure fixiert zudem die Proteine auf der Membran. Die Membran wurde mit Leitungswasser entfärbt und für 30 Minuten mit einer Blockierlösung aus 5% FCS in TBST blockiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

Die so präparierte Membran wurde mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert, der mit seinem Antigen einen Komplex bildet. Mit Hilfe eines Enzym-markierten Sekundärantikörpers kann der Antigen-Antikörperkomplex detektiert werden.

Der Primärantikörper wurde in 0,1% BSA/TBST verdünnt (Tab. 3-11) und je nach Affinität für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4℃ inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss dreimal mit TBST gewaschen um nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper wurde je nach Spezifität des Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:1000-1:5000 in 0,1% BSA/TBST eingesetzt und für 30-60 Minuten auf der Membran bei Raumtemperatur belassen. In dieser Arbeit wurden Sekundärantikörper verwendet, welche mit der Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelt waren. Nach drei Waschschritten mit TBST erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz mit dem Enzymsubstrat ECL Plus Western Blotting Reagenz (ECL: *enhanced chemiluminescence*) nach Herstellerangaben. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, bei dieser Reaktion wird Licht emittiert. Dies Lichtsignale wurden mit dem bildgebenden System ChemiDoc XRS der Firma BioRad detektiert. Die Auswertung erfolgte densitometrisch.

Tab. 3-11 Verdünnung der Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung
ANT	1:500
GAPDH	1:3000
GRP75	1:1000
MCT1	1:2000
MCT4	1:2000
NHE1	1:1000
Phospho-Ser/Thr/Tyr	1 µg/ml

3.2.5 Funktionelle Untersuchungen

3.2.5.1 Bestimmung der Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität ist ein wichtiges Verfahren um die Zytotoxizität von Substanzen und das Wachstumsverhalten von Zellen zu untersuchen. Eine einfache und schnelle Methode ist die Zugabe des Farbstoffs Resazurin zur Zellkultur. Durch die Enzymaktivität metabolisch aktiver Zellen wird das blaue, nicht-fluoreszierende Resazurin zu dem rosafarbenen, fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert (Abb. 3-6). Es besteht eine direkte Korrelation zwischen Reduktion des Farbstoffs und der Vitalität von Zellen.

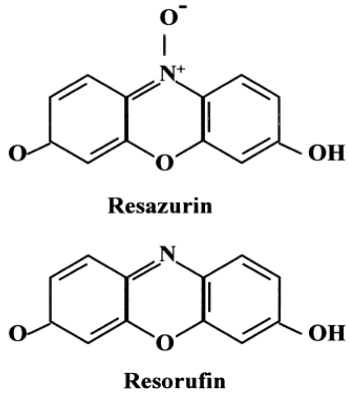


Abb. 3-6 Strukturformeln von Resazurin und dem fluoreszierenden Resorufin (*135*)

Die zu untersuchenden Zellkulturen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Für zytotoxische Untersuchungen wurden die Zellen 24h nach Aussaat mit den jeweiligen Substanzen für 48h bzw. 72h behandelt. Anschließend wurde die Resazurinlösung in einer Verdünnung von 1:10 zum Medium hinzugegeben und die Zellen ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm im Infinite® M200 der Firma Tecan.

3.2.5.2 Intrazelluläre pH-Messung

Zur Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) wurde 2`,7`-Bis(2-Carboxylethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein (BCECF) verwendet. BCECF ist ein Fluoreszenzindikator, welcher bei Anlagerung von Wasserstoffionen sein Exzitationsspektrum verändert. Um den pH_i in lebenden Zellen zu messen, muss der Farbstoff in die Zelle gelangen ohne die Membran zu schädigen. Dies geschieht bei BCECF durch seine Veresterung zu BCECF-

Acetoxymethylester (AM). BCECF-AM ist membrangängig und wird durch Esterasen in der Zelle zu BCECF hydrolysiert (Abb. 3-7). Die freien Carboxylgruppen von BCECF können Wasserstoffionen binden, was zu einer Verschiebung des Fluoreszenzspektrums führt. Es kommt zum pH-abhängigen Spektralshift des Farbstoffs. Durch Exzitation bei zwei Wellenlängen kann durch die Berechnung des Verhältnisses beider Wellenlängen zueinander die Fluoreszenz in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt werden. Die Exzitation erfolgte bei 490 nm und 440 nm, die Emission wurde bei 535 nm gemessen. Bei der Exzitationswellenlänge von 440 nm liegt der isobestische Punkt, hier ist die Fluoreszenz des BCECF unabhängig vom pH-Wert. Bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm steigt die Fluoreszenzintensität des BCECF mit zunehmenden pH-Wert an. Durch die Messungen bei 440 nm werden Fluoreszenzveränderungen erfasst, welche z.B. durch Auswärtstransporte von BCECF oder durch Ausbleichen des Farbstoffs entstehen. Durch Bildung des Quotienten 490/440 nm werden nur die pH-abhängigen Fluoreszenzwerte betrachtet, welche unabhängig von der BCECF-Konzentration sind.

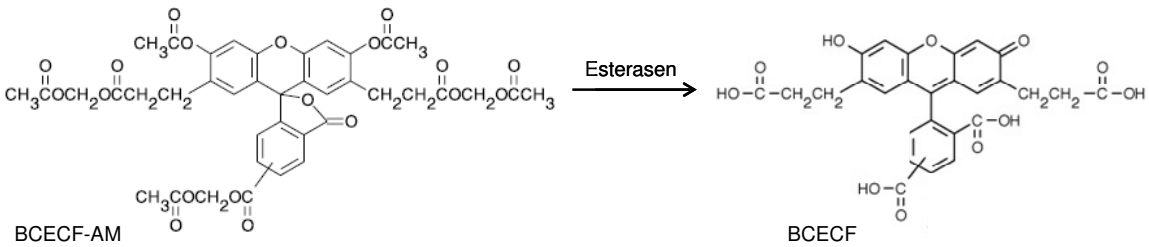


Abb. 3-7 Strukturformeln von BCECF-AM und BCECF (Quelle: invitrogen™)

Für die pH-Messung wurden Zellen in 24-well-Multiwellplatten ausgesät. War die gewünschte Konfluenz (90%) erreicht oder die Inkubationszeit mit Substanzen beendet, wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 1xPBS gewaschen. Die Stammlösung des BCECF-AM (1 mg/ml) wurde in PBS verdünnt und auf die Zellen mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml gegeben. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, mit 500 µl Na-HEPES-Puffer überschichtet und im Infinite®M200 vermessen.

Bei jeder Messung wurde parallel eine Eichkurve mitgeführt. Nach Inkubation mit BCECF wurden hierfür die Zellen mit PBS gewaschen und mit verschiedenen Kalium-HEPES-Puffer überschichtet. Die Kalium-HEPES-Puffer unterschieden sich in ihren pH-Werten und umfassten den Bereich von 6,4 bis 8. Zu den Zellen wurde anschließend der Ionophor Nigericin (2 µg/ml) gegeben. Nigericin katalysiert den Antiport von Kaliumionen und Wasserstoffionen, dadurch stellt sich ein Gleichgewicht der Ionen zwischen Pufferlösung und Zytoplasma ein. Durch die unterschiedlichen pH-Werte der Kalium-HEPES-Puffer bildeten

sich unterschiedliche pH_i in den Zellen aus. Die Fluoreszenzdaten dieser Messungen wurden zu Bildung einer Eichkurve benutzt, indem der Quotient 490/440 nm gegen den jeweiligen pH-Wert des Puffers aufgetragen wurde. Durch lineare Regression konnten die pH_i-Werte der zu analysierenden Zellen bestimmt werden.

3.2.5.2.1 Bestimmung der Transporter-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung der Monocarboxylattransporter und der Natrium-Protonenaustauscher kann durch die Messung des intrazellulären pH-Wertes durchgeführt werden. Die Monocarboxylattransporter transportieren im Symport Laktat und Protonen in der Stöchiometrie von 1:1. Wird Laktat in die Zelle aufgenommen, sinkt der pH_i durch die gleichzeitige Aufnahme eines Protons. Diese pH-Änderung kann durch die BCECF-Methode detektiert werden (*136*). Bei dieser Messung kann jedoch nicht zwischen den einzelnen Monocarboxylattransportern unterschieden werden.

Für die Aktivitätsmessung von Natrium-Protonenaustauschern, insbesondere NHE1, wird die Steigerung der Transporteraktivität nach Ansäuerung der Zelle ausgenutzt. Wird der intrazelluläre pH durch Zugabe verschiedener Stimuli (Propionsäure oder NH_4Cl) gesenkt, erhöht sich die Transporteraktivität, um den Ausgangszustand wieder herzustellen und der pH_i steigt wieder an. Diese Veränderungen können ebenfalls durch die BCECF-Methode gemessen werden.

Für die Aktivitätsbestimmung mittels BCECF wurden die Zellen wie bereits unter 3.2.5.2 beschrieben, behandelt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte zunächst bis sich ein konstanter pH_i eingestellt hatte. Änderten sich die Fluoreszenzdaten nicht mehr wesentlich, wurden die erforderlichen Lösungen maschinell durch den Infinite®M200 hinzugegeben und die Änderung des pH_i über die Zeit detektiert. Für die Bestimmung der MCT-Aktivität wurde eine 5 mM Laktatlösung hinzugegeben und die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 60 Sekunden gemessen. Die NHE-Aktivität wurde durch die Zugabe von 2 mM Propionsäure bestimmt. Hier wurde die Fluoreszenz über einen Zeitraum von mindestens 100 Sekunden nach Propionsäure-Zugabe gemessen.

Die Bestimmung der jeweiligen pH_i erfolgte durch Regressionsanalysen der mitgeführten Eichkurve.

3.2.6 Murines Gehirntumor-Modell

Das murine Gehirntumor-Modell wurde in dieser Arbeit verwendet, um den Einfluss von nichtsteroidalen Antiphlogistika auf das Wachstumsverhalten von Glioblastomzellen *in vivo* zu untersuchen. Für die Tumorerzeugung in C57BL/6 Mäusen wurden die murinen Glioblastomzellen GL261-GFP verwendet (siehe3.1.8.1.2).

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V) genehmigt (Aktenzeichen 7221.3-1.1-002/11).

3.2.6.1 Zellpräparation

Für die intrakranielle Inokulation in Mäuse wurden GL261-GFP-Zellen in T75 Zellkulturflaschen angezogen. Nach Trypsinierung der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt und auf $1x10^4$ Zellen/ µl mit sterilem PBS eingestellt. Während der operativen Eingriffe wurden die Zellen bis zu ihrer Verwendung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis aufbewahrt. Vor der Injektion wurde die Zellsuspension vorsichtig durchmischt.

3.2.6.2 Versuchstiere

Die *in-vivo*-Experimente wurden an weiblichen, drei Monate alten C57BL/6-Mäuse des Anbieters Charles River durchgeführt. Vor Beginn der tierexperimentellen Untersuchungen hatten die Tiere nach Ankunft in der Tierversuchseinrichtung eine Eingewöhnungszeit von mindestens sieben Tagen. Die Haltung erfolgte in Gruppen bis zu fünf Tieren pro Käfig. Die Tiere hatten jederzeit uneingeschränkten Zugang zu Leitungswasser und pelletiertem Trockenfutter. Ein regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Beleuchtungszeit von 12 Stunden wurde eingehalten.

3.2.6.3 Intrakranielle Inokulation von GL261-GFP-Zellen in C57BL/6-Mäuse

Die Tiere wurden vor Beginn der Eingriffe gewogen und mit einer Kombination aus Xylazin (Rompun) und Ketaminhydrochlorid (Ketanest) narkotisiert. Die Menge an Narkosemittel richtete sich nach dem Gewicht der Tiere (0,8 ml des Narkosegemisches/10 g Körpergewicht).

Zusammensetzung des Narkosegemisches:

0,12 ml Rompun (2%)

0,34 ml Ketanest (100 mg/ml)

1,62 ml 0,9% NaCl

Wenige Minuten nach intraperitonealer Verabreichung der Narkose zeigten die Tiere erste Anzeichen einer Sedierung. Nach vollständiger Relaxierung wurde die Narkosetiefe überprüft. Erst bei ausreichender Narkosetiefe wurden die Tiere unter Verwendung eines stereotaktischen Kopfhalters (Digital Lab Standard™ Stereotaxic, Stoelting Co., Chicago) fixiert. Die Fixierung erfolgte zum einen durch das Einspannen des Oberkiefers und zum anderen durch das Einführen von Halterungen in die Gehörgänge der Tiere. Die Tiere befanden sich nun in der sogenannten „flat skull position“. In dieser Position bildet die Schädeloberfläche in rostral-kaudaler Orientierung annähernd eine horizontale Ebene (Abb. 3-8). Diese Lage und die Fixierung der Tiere in der Halterung ist notwendig, um den Injektionsort präzise bestimmen zu können.

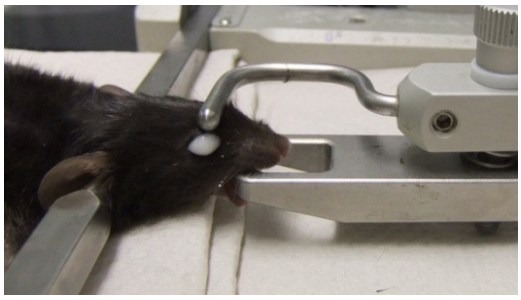


Abb. 3-8 Versuchstier in „flat skull position“

Im Anschluss wurde die Kopfhaut mit Ethanol desinfiziert und die Augen mit Augen- und Nasensalbe abgedeckt, um eine Austrocknung und Schädigung während der Narkose zu vermeiden. Die Kopfhaut wurde mit einem Skalpell in der Medianlinie auf einer Strecke von circa einem Zentimeter geöffnet. Das Periost wurde vorsichtig mit dem Skalpell entfernt. Vom Orientierungspunkt Bregma (Treffpunkt von der Sutura coronalis und der Sutura sagittalis) ausgehend wurde 1 mm anterior und 1,5 mm lateral die Inokulationsstelle festgelegt. Durch Drehen einer 23G Kanüle unter leichtem Druck konnte die Schädeldecke geöffnet werden (Abb. 3-9). Von der Zellsuspension wurde 1 µl in einer Hamilton Spritze aufgezogen und diese in die stereotaktische Halterung eingespannt (Abb. 3-10).

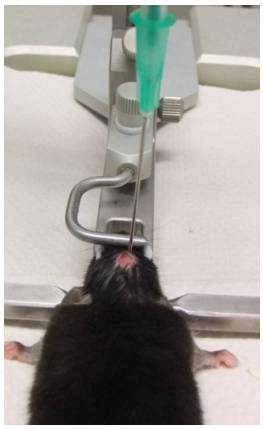


Abb. 3-9 Kraniotomie mittels Kanüle

Abb. 3-10 Vorbereitung zur Inokulation

Von der Schädeldecke ausgehend, wurde die Kanüle der Hamilton-Spritze 4mm tief in das Mäusegehirn eingebracht und langsam auf eine Tiefe von 3mm zurück gezogen. Somit ergab sich ein Hohlraum von 1mm Tiefe in denen die Zellen injiziert werden konnten. Die Injektion erfolgte langsam um ein Herausquellen der Zellsuspension zu vermeiden. Im Anschluss wurde die Kanüle langsam entfernt. Die Kopfhaut wurde mit sterilem Nahtmaterial verschlossen und die Naht zusätzlich mit Flüssigpflaster besprüht. Das Flüssigpflaster sollte verhindern, dass die Tiere gegenseitig an der Naht nagen. Die Tiere wurden in Käfige gelegt und bis zum Erwachen beobachtet. Da die Tiere durch die Narkose leicht auskühlen, wurden sie mit Papiertüchern gegen zu starkes Auskühlen geschützt. Die Tiere wurden täglich kontrolliert. Zeigten die Tiere Anzeichen von starken Schmerzen (Verhaltensstörungen, Gewichtsabnahme) wurden sie aus ethischen Gesichtspunkten vor Versuchsende getötet.

3.2.6.4 Verabreichung von nichtsteroidalen Antiphlogistika

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ibuprofen auf das Wachstum von Glioblastomzellen im Mausmodell untersucht. Die Verabreichung erfolgte täglich über eine Schlundsonde. Hierfür wurde die Substanz in Wasser gelöst, so dass eine Konzentration von 0,25 mg Ibuprofen in 30 µl Wasser erreicht wurde. Die Mäuse wurden gewogen und in Abhängigkeit vom Gewicht wurde die jeweilige Substanzmenge (25 mg Ibuprofen/ kg Körpergewicht) mit Hilfe einer leicht gebogenen Sonde den Tieren verabreicht.

3.2.6.5 Euthanasie und Organentnahme

Die Tiere wurden mit dem beschriebenen Narkosegemisch (siehe3.2.6.3) narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Im Anschluss wurde der Brustkorb geöffnet und aus dem linken Herzventrikel wurde Blut durch eine Spritze entnommen, welche Lithium-Heparinkugeln zur Gerinnungshemmung enthielt. Danach erfolgte die Entnahme von Milz, Niere, Gehirn, Dünndarm und Leber. Die Organe wurden in PBS gespült und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Organe bei -80°C gelagert. Das Blut wurde für fünf Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und das Plasma in neue Reaktionsgefäße überführt. Das Plasma und die zellulären Blutbestandteile wurden bei -20°C für weitere Untersuchungen gelagert.

3.2.6.6 Gefrierschnitte von Mäusegehirnen

Um bei den Tierversuchen das Wachstum der Tumoren zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe im Gehirn auswerten und vergleichen zu können, wurden horizontale Gehirnschnitte nach folgender Methode anfertigt: das Gehirn wurde mit der ventralen Seite auf den Probenhalter mit Tissue Tek fixiert. Das Messer des Kryotoms wurde dorsal angesetzt. Es erfolgten Schnitte von 20 µm Dicke bis zu einer Tiefe von 100 µm. Diese erreichte Position wird als Ebene 1 bezeichnet. In dieser Ebene wurden 60 bis 80 Schnitte in der Dicke von 6 µm angefertigt. Dann erfolgten vier Schnitte mit 50 µm Stärke um auf Ebene 2 zu gelangen. Diese Prozedur wiederholte sich bis zur Ebene 4. Die Schnittebenen sind in Abb. 3-11 schematisch dargestell. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

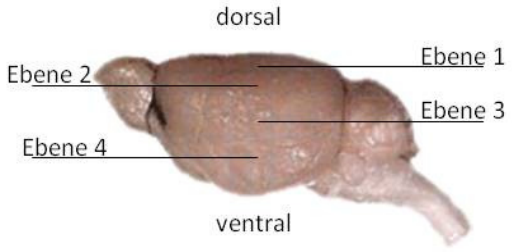


Abb. 3-11 Lage der Schnittebenen (Quelle: Comparative anatomy of the brain, psychology.wikia.com)

3.2.7 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Zur Bestimmung statistischer Unterschiede zweier Gruppen wurden der ungepaarte t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test (mRNA-Expressionsanalysen) verwendet. Als Signifikanzniveaus wurden $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) festgelegt. Die Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of variance) wurde gewählt, wenn mehr als zwei Gruppen mit einer abhängigen Variablen verglichen werden sollten. An die Varianzanalyse schloss sich ein Post-Hoc-Test (Bonferroni, Dunns) an. Als Signifikanzniveaus für diese Auswertung wurden $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##) und $p < 0,001$ (###) festgelegt.

Die statistische Auswertung und das Erstellen von Diagrammen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.01 (GraphPad, SanDiego, USA). Die Daten wurden vorrangig in Boxplots und Säulendiagrammen abgebildet. Die Antennen der Boxplots umfassen die Werte von fünf bis 95 Perzentile. In den Säulendiagrammen sind die Mittelwerte mit Standardfehler (Patientendaten, *in-vivo*-Versuche) oder Standardabweichung (*in-vitro*-Versuche) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Expression pH-regulatorischer Transporter in Patientenproben

4.1.1 Untersuchungen zur mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter

4.1.1.1 Vergleich der Expression in Glioblastomen (WHO Grad IV), Gehirntumoren WHO Grad I-III und gesundem Gehirngewebe

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Untersuchungen zu pH-regulatorischen Transportern (NHE1, NHE5, MCT1, MCT4, MCT5, NDCBE) in humanem Gewebe. Für die Expressionsanalysen wurden 35 Glioblastomproben, 21 Proben niedrig-gradiger Gehirntumoren (WHO Grad I-III) und acht postmortal entnommene Proben von gesundem menschlichem Gehirngewebe (Normalgewebe: Frontal-, Temporallappen) verglichen. Die mRNA-Expressionsdaten der Transporter wurden auf 18S rRNA normalisiert und mit der $\Delta\Delta C_T$-Methode ausgewertet (Abb. 4-1). Auf mRNA-Ebene war der Transporter NHE1 im Glioblastomgewebe mit einer mittleren relativen Expression von 4,75±3,43 (SEM) statistisch signifikant höher exprimiert als in nicht-malignen Gehirngewebe mit einer Expression von 0,33±0,13 (SEM). Gegenüber den Grad I-III-Tumoren mit einer mittleren Expression von 0,89 zeigte sich in den Glioblastomgewebe kein statistisch signifikanter Unterschied. Eine tendenzielle Abnahme der NHE1-Expression zwischen Tumoren mit WHO Grad I-III und dem nicht-malignem Gehirngewebe war jedoch zu erkennen (p=0,06). NHE5 war in Tumoren der Grade I-III und gesundem Gehirngewebe ähnlich stark exprimiert (mittlere relative Expression±SEM: 2,75±1,23 bzw. 2,80±0,88). Die mittlere relative Expression in den Glioblastomgeweben lag für den mRNA-Gehalt an NHE5 bei 15,66±11,99, durch die große Streuung der Expressionsdaten war das Ergebnis jedoch nicht statistisch signifikant. NDCBE zeigte keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression der Gewebeproben.

Die drei untersuchten Monocarboxylattransporter waren auf mRNA-Ebene in Glioblastomproben statistisch signifikant erhöht (relative mittlere Expression MCT1: 3,61±1,95; MCT4: 3,97±1,92; MCT5: 3,08±1,41) im Vergleich zum gesunden Gehirngewebe (MCT1: 0,09±0,03; MCT4: 0,38±0,08; MCT5: 0,12±0,04). MCT4 wies zudem Expressionsunterschiede zwischen Glioblastomen und Tumoren der Grade I-III auf. In den Glioblastomproben war MCT4 mit einer mittleren relativen Expression von 3,97±1,92 signifikant höher exprimiert als in Grad-I-III-Tumoren mit einer Expression von 1,12±0,48. Die Transporter MCT1 und MCT5 waren des Weiteren in den Grad-I-III-Tumoren mit einer

relativen mittlere Expression von 0,88±0,2 (MCT1) bzw. 1,57±0,35 (MCT5) gegenüber gesundem Gehirngewebe signifikant stärker exprimiert.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass auf mRNA-Ebene NHE1 in den untersuchten Tumorproben erhöht exprimiert wurde. Die mRNA-Expression der Monocarboxylattransporter war ebenfalls in den Tumorproben erhöht und zeigte zusätzlich bei MCT4 eine Abstufung zwischen Grad IV Tumoren und Tumoren der Grade I-III.

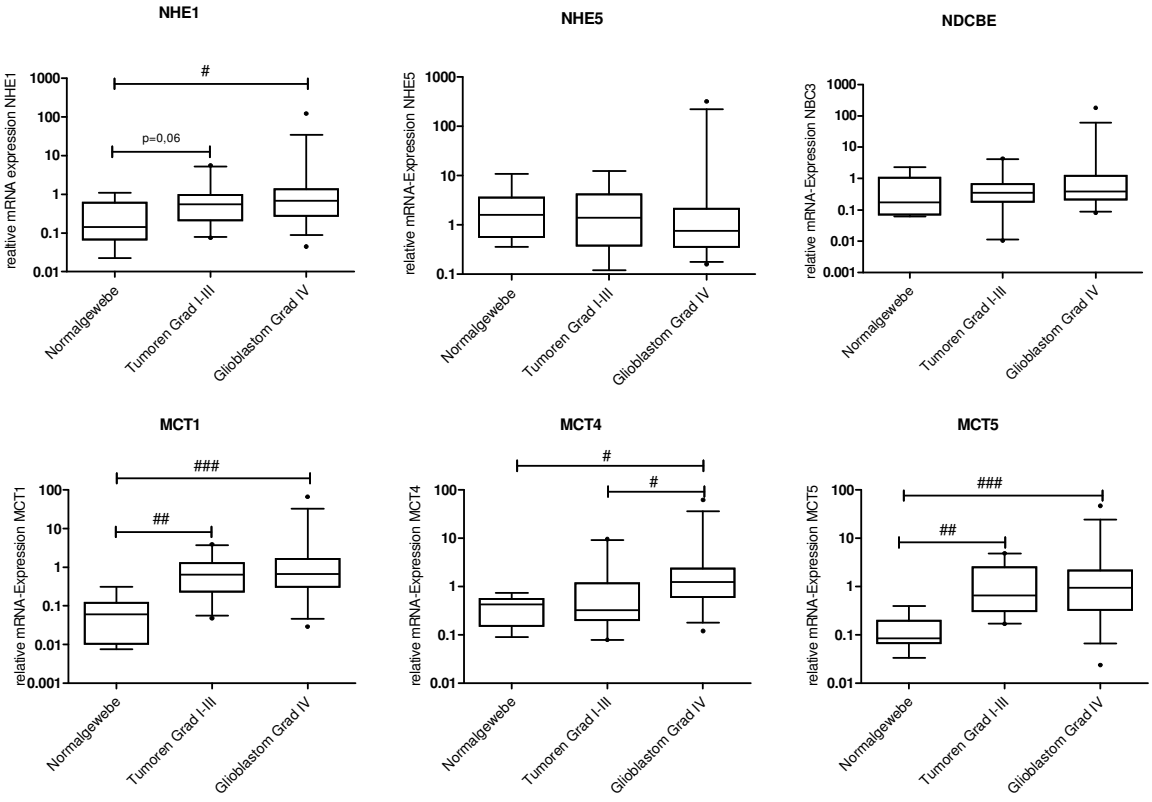


Abb. 4-1 mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter in humanem Glioblastomgewebe, Grad I-III Gehirntumoren und gesundem Gehirngewebe (Normalgewebe): Die Ermittlung des mRNA-Gehalts erfolgte mittels real-time PCR. Die Daten wurden auf 18S rRNA normalisiert und nach der ΔΔCT – Methode ausgewertet. Im Diagramm sind die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte dargestellt. Gehirntumoren Grad IV (Glioblastom): n= 35, Gehirntumore Grad I-III: n= 21, gesundes Gehirngewebe (Normalgewebe): n= 8, ANOVA mit Post-Hoc-Test Dunns, # < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001

4.1.1.2 Interindividuelle Expressionsunterschiede in den Glioblastomproben

In Studien wurde gezeigt, dass das Alter von Glioblastompatienten Einfluss auf die Inzidenz und Prognose hat. So weisen jüngere Patienten bessere Prognosen als ältere Patienten auf (7, 8). Ausgehend von diesen Resultaten wurde die mRNA-Expression in den 35 Glioblastomproben in Bezug auf Alter bei Diagnosestellung und Gesamtüberleben (GÜ) untersucht (Abb. 4-2). In Tab. 4-1 ist die Charakterisitik der Glioblastomproben aufgezeigt.

Tab. 4-1 Charakteristik der 35 Glioblastompatienten

Charakteristik		Patientenanzahl
Geschlecht	weiblich	11
	männlich	24
Medianes Alter	59 Jahre	
	≤ 59 Jahre	18
	> 59 Jahre	17
Altersspanne	28 – 79 Jahre	
Medianes Gesamtüberleben	509 Tage	
	≤ 509 Tage	17
	> 509 Tage	15

Das Medianalter der 35 Glioblastompatienten bei Diagnosestellung lag bei 59 Jahren. Patienten mit einem höheren Alter bei Diagnosestellung exprimierten die Transporter NHE5 und MCT5 mit mittleren relativen Expressionswerten von 29,52±22,88 (NHE5) und 5,21±2,74 (MCT5) stärker als Patienten mit einem Alter von weniger als 59 Jahren bei Diagnosestellung mit Expressionswerten von 0,73±0,19 bei NHE5 und 0,98±0,28 bei MCT5 (Abb. 4-2 A).

Das mediane Gesamtüberleben der 35 Patienten lag bei 509 Tagen. Patienten mit einem längeren Gesamtüberleben exprimierten die mRNA von NHE5 und MCT5 mit mittleren relativen Expressionwerten von 0,83± 0,22 (NHE5) und 1,03± 0,25 (MCT5) statistisch signifikant schwächer als Patienten mit einem kürzeren Gesamtüberleben (mittlere relative Expression NHE5: 29,51± 22,88 MCT5: 5,53± 2,9) (Abb. 4-2 B). Auch bei NHE1 war eine deutliche Abnahme der mRNA-Expression bei Patienten mit einem längeren Gesamtüberleben (relative mittlere Expression 0,67±0,14) im Vergleich zu Patienten mit kürzerem Gesamtüberleben (relative mittlere Expression 9,1±7,0) zu verzeichnen. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (p=0,054).

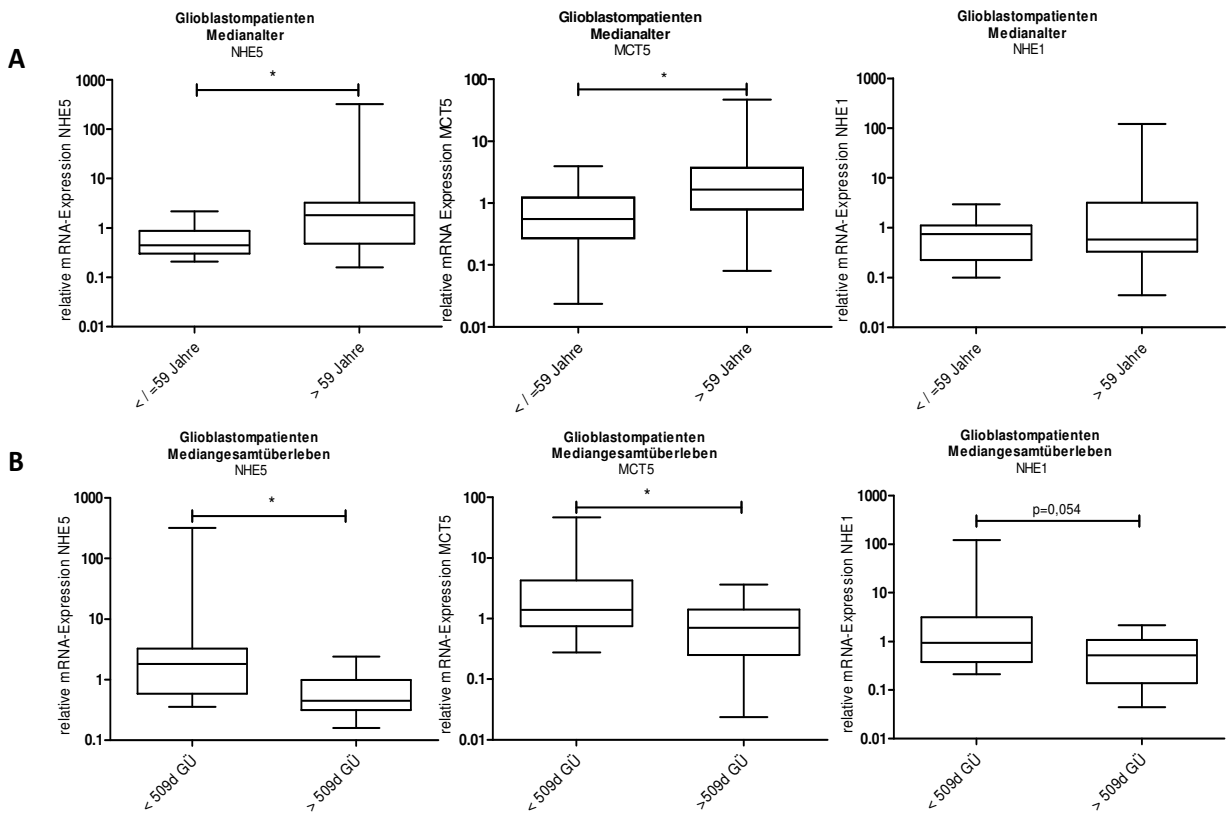


Abb. 4-2 mRNA-Expression in humanem Glioblastomgewebe in Abhängigkeit vom Alter bei Diagnosestellung und Gesamtüberleben: Dargestellt sind die Ergebnisse aus real-time PCR-Analysen mit signifikanten Unterschieden nach Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$

(A) Medianalter bei Diagnosestellung (59 Jahre): mindestens: n=13 (</= 59J), n=14 (> 59J)

(B) Mediangesamtüberleben (GÜ, 509d): mindestens: n= 14 (GÜ < 509d), n= 11 (GÜ > 509d)

4.1.2 Proteinexpression pH-regulatorischer Transporter

In den real-time PCR-Analysen wurde die Expression der Transporter NHE1, NDCBE, MCT1, MCT4 und MCT5 in humanen Glioblastompatienten nachgewiesen. Mit Hilfe von indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurde zudem die Proteinexpression ausgewählter Transporter im Glioblastomgewebe untersucht. Von verschiedenen Patientenproben wurden Gefrierschnitte angefertigt und mit den jeweiligen Antikörpern gegen NHE1, MCT1 bzw. MCT4 gefärbt. In der Abb. 4-3 sind beispielhaft Immunfluoreszenzaufnahmen von NHE1, MCT1 und MCT4 von Glioblastomgewebeschnitten dargestellt. Durch die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz konnte auch der Nachweis der Transporter auf Proteinebene in Glioblastomgewebe erbracht werden.

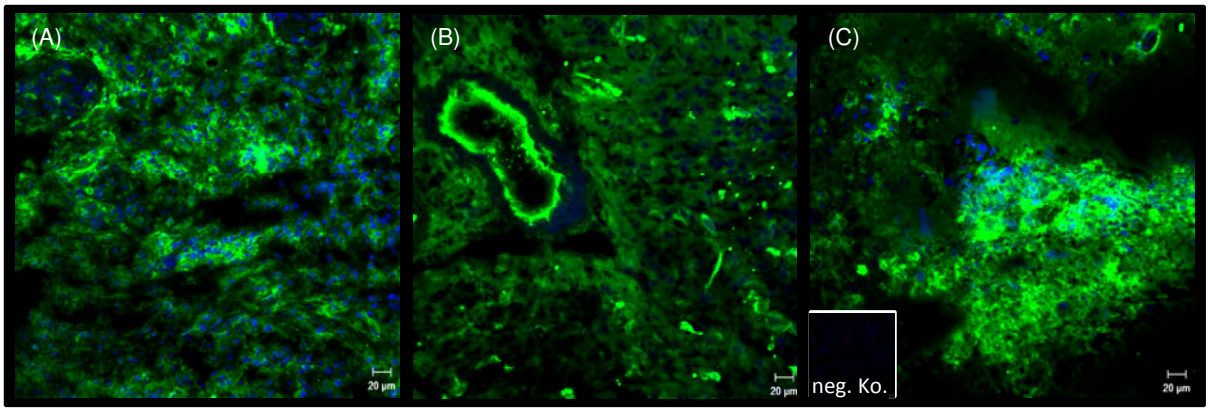


Abb. 4-3 Immunfluoreszenzfärbungen von NHE1, MCT1 und MCT4 von exemplarisch ausgewählten Glioblastompatienten: Dargestellt sind NHE1 (A), MCT1 (B) und MCT4 (C) in grün und die Zellkerne in blau.

In Arbeiten u.a. von Pellerin *et al.* (*137*) wurde die Lokalisation von MCT1 in Gefäßen und gefäßnahen Gebieten beschrieben, für MCT4 wurde vor allem eine sehr starke Expression in Astrozyten gefunden. Auch in der vorliegenden Arbeit deutete die Anfärbung spezifischer Strukturen durch den MCT1-Antikörper auf eine Lokalisation dieses Transportes sowohl in Tumorzellen als auch in Gefäßen und gefäßnahen Bereichen hin (Abb. 4-3 B)

4.2 *In-vitro*-Untersuchungen zu pH-regulatorischen Transportern

Durch die Expressionsanalysen von Patientenmaterial wurde gezeigt, dass ein Großteil der untersuchten Transporter in Glioblastomen im Vergleich mit gesundem Gehirngewebe und niedrig-gradigen Tumoren vermehrt exprimiert wird. Um Untersuchungen zur Regulation der Transporter durch verschiedene Substanzen und Aktivitätsmessungen der Transporter durchführen zu können, wurden die humanen Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG verwendet. In Abb. 4-4 sind beispielhaft Immunfluoreszenaufnahmen der Zelllinien LN18 und U87MG dargestellt und deuten auf eine hohe Expression der pH-regulatorischen Transporter NHE1 und MCT1 in den Zelllinien hin.

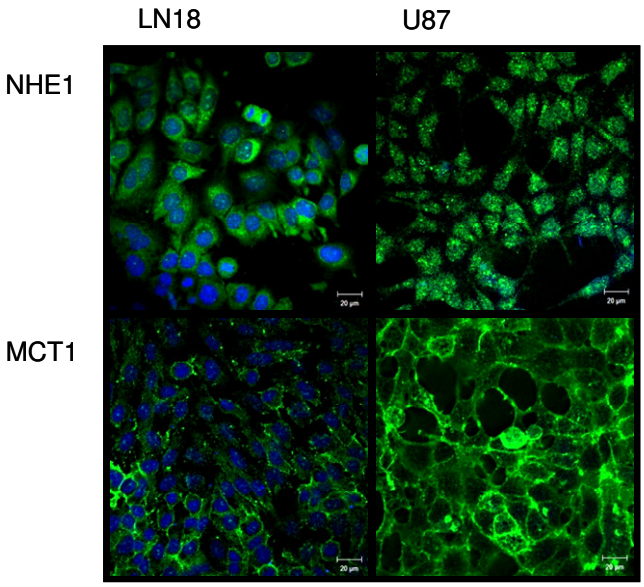


Abb. 4-4 Proteinexpression der pH-regulatorischen Transporter NHE1 und MCT1 in den Glioblastom-Zelllinien LN18 und U87MG: Die Zellen wurden fixiert und mit einem NHE1- bzw. MCT1-Antikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte über fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper. Der Zellkern ist in blau dargestellt (DAPI-Färbung).

4.2.1 Einfluss ausgewählter Zytostatika auf pH-regulatorische Transporter

Mittels real-time PCR-Analysen sollte überprüft werden, ob ausgewählte Zytostatika die mRNA-Expression der Transporter beeinflussen können. Als Zytostatika wurden Carmustin, Lomustin, Temozolomid, Teniposid und Vincristin verwendet, die in der Therapie von Glioblastomen und anderen Tumoren eingesetzt werden.

4.2.1.1 Einfluss von Zytostatika auf die mRNA-Expression der Transporter

Die Zellen wurden in 6-well-Multiwellplatten ausgesät und jeweils für 48h mit den ausgewählten Zytostatika (Kapitel 3.1.4) in definierten Konzentrationen inkubiert. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde nur eine der verwendeten Substanzkonzentrationen in den Diagrammen abgebildet, in den Tabellen Tab. 11-1 (LN18) und **Tab. 11-2** (U87MG) im Anhang sind die relativen mittleren Expressionswerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen aller Konzentrationen aufgelistet.

In den LN18-Zellen zeigten die Substanzen Carmustin, Teniposid und Vincristin statistisch signifikante Effekte auf die mRNA-Expression einzelner Transporter (Abb. 4-5) im Vergleich zu den Kontrollzellen, die ausschließlich mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt worden waren. Die NHE1-mRNA Expression wurde in LN18-Zellen durch keines der

Zytostatika beeinflusst. Carmustin (100 µM) verminderte statistisch signifikant die mRNA-Expression von MCT5 auf 48,3% (Abb. 4-5 F), in der Konzentration von 10 µM senkte Carmustin die Expression von NHE5 auf 46,4% (Tab. 11-1). Teniposid in der Konzentration von 10 µM reduzierte statistisch signifikant die mRNA-Expression von MCT5 (Abb. 4-5 F) auf 29,5% und von NDCBE auf 33,1% (Abb. 4-5 C), wobei auch die Konzentrationen von 1 µM und 100 µM Teniposid die NDCBE-mRNA-Expression signifikant senkte (Tab. 11-1). Im Gegensatz dazu erhöhte Teniposid in der geringsten Konzentration von 1 µM die mRNA-Expression von MCT4 um das 5,5fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Bei einer Konzentration von 10 µM zeigten sich keine Effekte, wohingegen 100 µM Teniposid zu einer Abnahme der mRNA-Expression von MCT4 auf 1% führte (Abb. 4-5E, Tab. 11-1). Vincristin verminderte die mRNA-Expression der Transporter NDCBE auf 43,4% (Abb. 4-5 C) und MCT5 auf 36,2% (Abb. 4-5F).

Im Gegensatz zu der Zelllinie LN18 zeigten bei der Zelllinie U87MG alle verwendeten Zytostatika statistisch signifikante Effekte auf die mRNA-Expression der untersuchten Transporter (Abb. 4-6, **Tab. 11-2**). Carmustin bewirkte hier eine 2fache (10 µM) bis 3,3fache (100 µM) Steigerung der mRNA-Expression von NHE1 (Abb. 4-6 A), zeigte aber keine Effekte auf die mRNA-Expression der anderen Transporter. Lomustin (100 µM) verringerte ausschließlich die mRNA-Expression des Transporters MCT5 auf circa 55% (Abb. 4-6). Teniposid reduzierte den mRNA-Gehalt von NHE5 auf mindestens 60% (Abb. 4-6 B) in allen eingesetzten Konzentrationen, wohingegen nur die Teniposid-Konzentration von 100 µM die mRNA-Expression von MCT1 auf die Hälfte verminderte (**Tab. 11-2**). Vincristin minderte in U87MG-Zellen die mRNA-Expression aller untersuchten Transporter mit Ausnahme von MCT4 um mindestens 37% (Abb. 4-6 E).

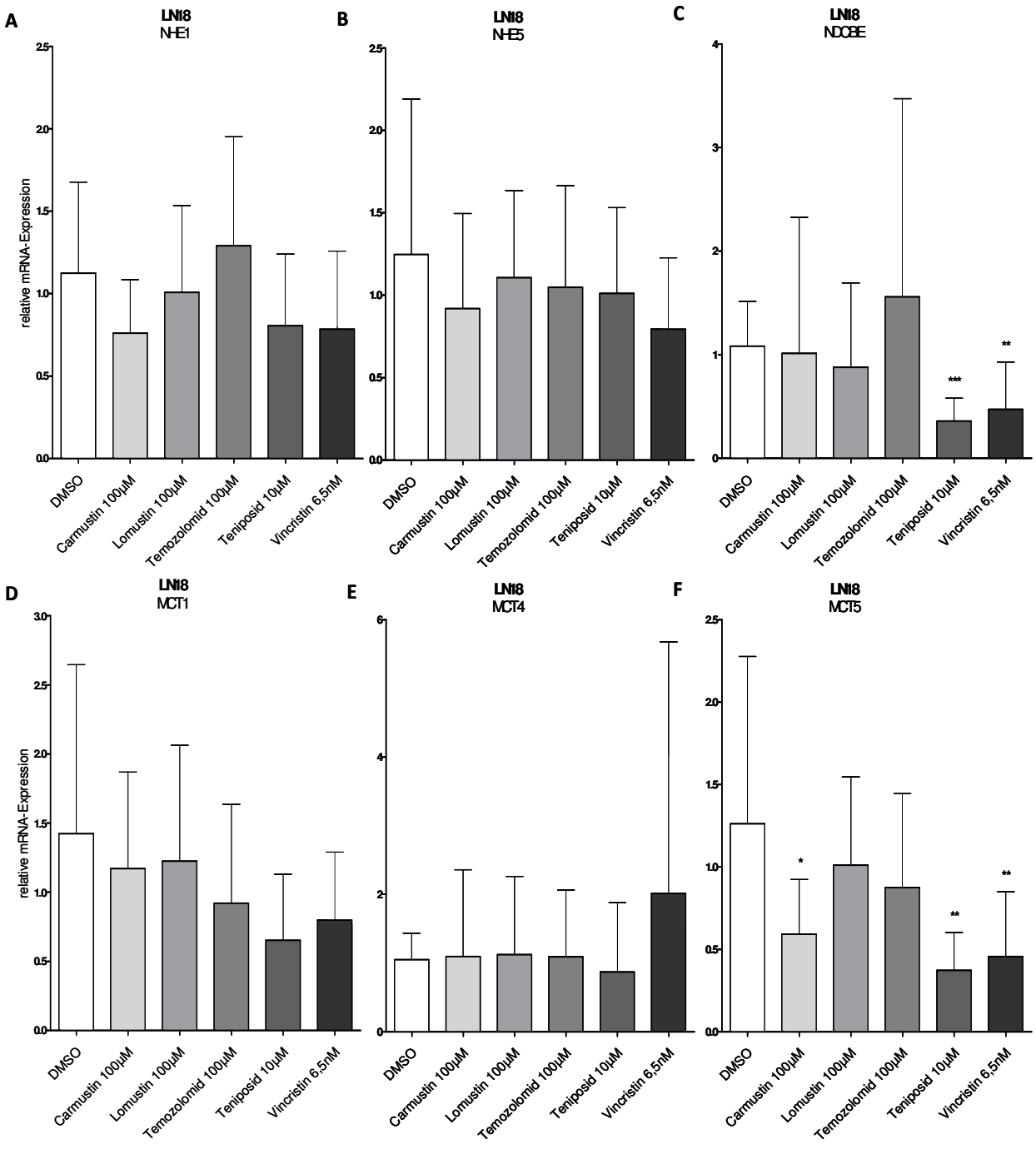


Abb. 4-5 Einfluss ausgewählter Zytostatika auf die mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter in LN18-Zellen: Die Zellen wurden für 48h mit den Zytostatika Carmustin (100 µM), Lomustin (100 µM), Temozolomid (100 µM), Teniposid (10 µM) und Vincristin (6,5 nM) inkubiert. Die mRNA-Expression der Transporter wurde mittels real-time PCR bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. A: NHE1, B: NHE5, C: NDCBE, D: MCT1, E: MCT4, F: MCT5 , Mittelwerte+SD, n= 9-12 bzw. n=3-6 (MCT4), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

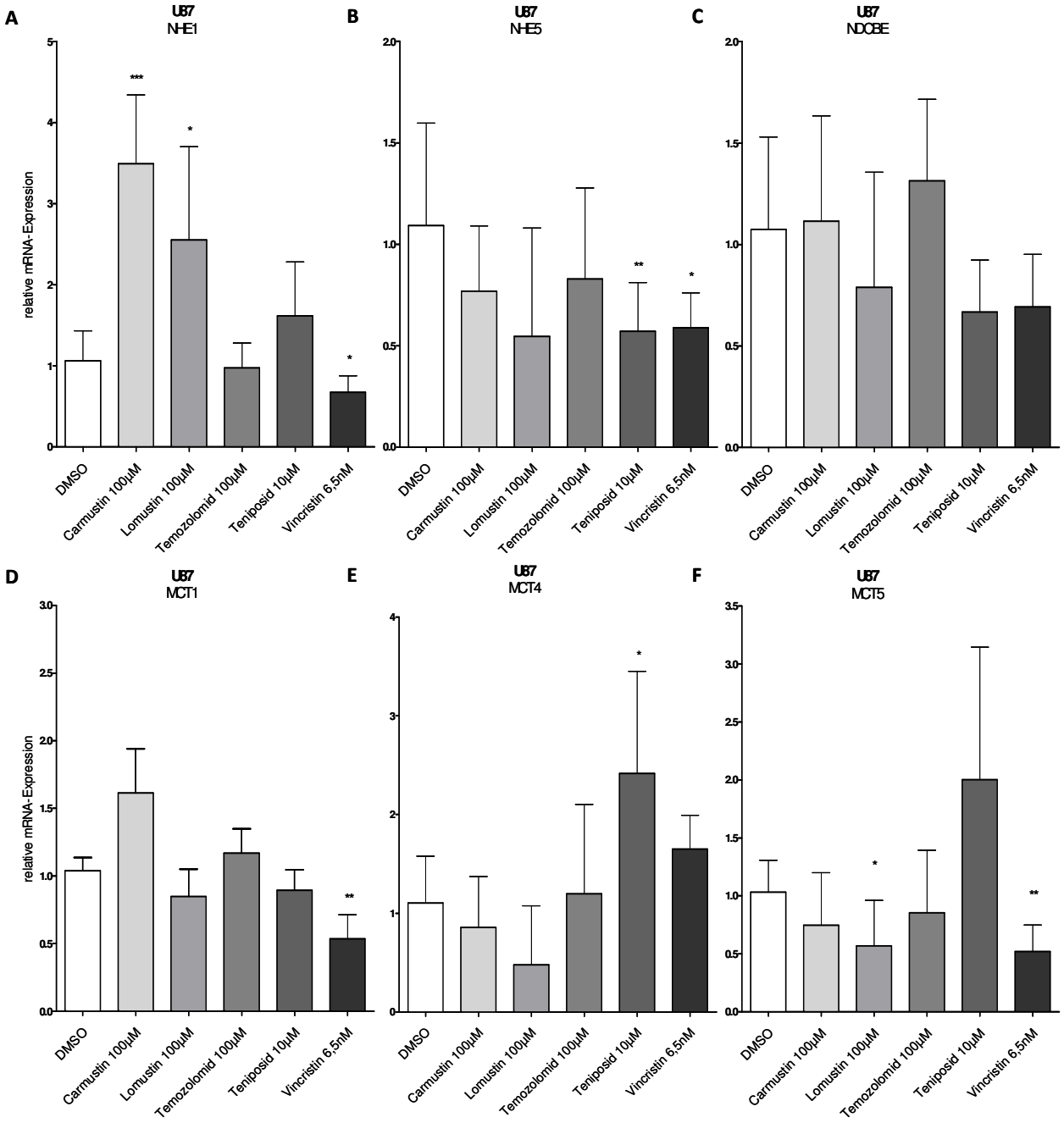


Abb. 4-6 Einfluss ausgewählter Zytostatika auf die mRNA-Expression der Transporter in U87MG Zellen: Die Zellen wurden für 48h mit den Zytostatika Carmustin (100 µM), Lomustin (100 µM), Temozolomid (100 µM), Teniposd (10 µM) und Vincristin (6,5 nM) inkubiert. Die mRNA-Expression der Transporter wurde mittels real-time PCR bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. A: NHE1, B: NHE5, C: NDCBE, D: MCT1, E: MCT4, F: MCT5, Mittelwerte+SD, n= 6-9 bzw. n=3-6 (MCT4), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2.1.2 Einfluss der Zytostatika auf die Viabilität von Glioblastomzellen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den ermittelten Veränderungen in der mRNA-Expression von pH-regulatorischen Transportern unter Zytostatikabehandlung und

der Viabilität der Glioblastomzellen nach Inkubation mit Zytostatika zu untersuchen, wurden Resazurin-Assays zur Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen jeweils mit den Zytostatika Carmustin, Lomustin, Temozolomid, Teniposid oder Vincristin für 48h und 72h inkubiert. In der Abb. 4-7 ist die Zellviabilität von LN18-Zellen (A) und U87MG-Zellen (B) dargestellt. Bei der Zelllinie LN18 führte Teniposid in der Konzentration von 100 µM zu einer drastischen Abnahme der Zellviabilität auf jeweils unter 4% nach 48h sowie nach 72h. Zusätzlich war nach 48h eine statistisch signifikante Reduzierung der Viabilität von LN18-Zellen durch 100 µM Lomustin um 49,7% und durch 10 µM Teniposid um 52,3% nachweisbar. Dieser viabilitätshemmende Effekt war nach 72h deutlich schwächer ausgeprägt und nicht mehr signifikant.

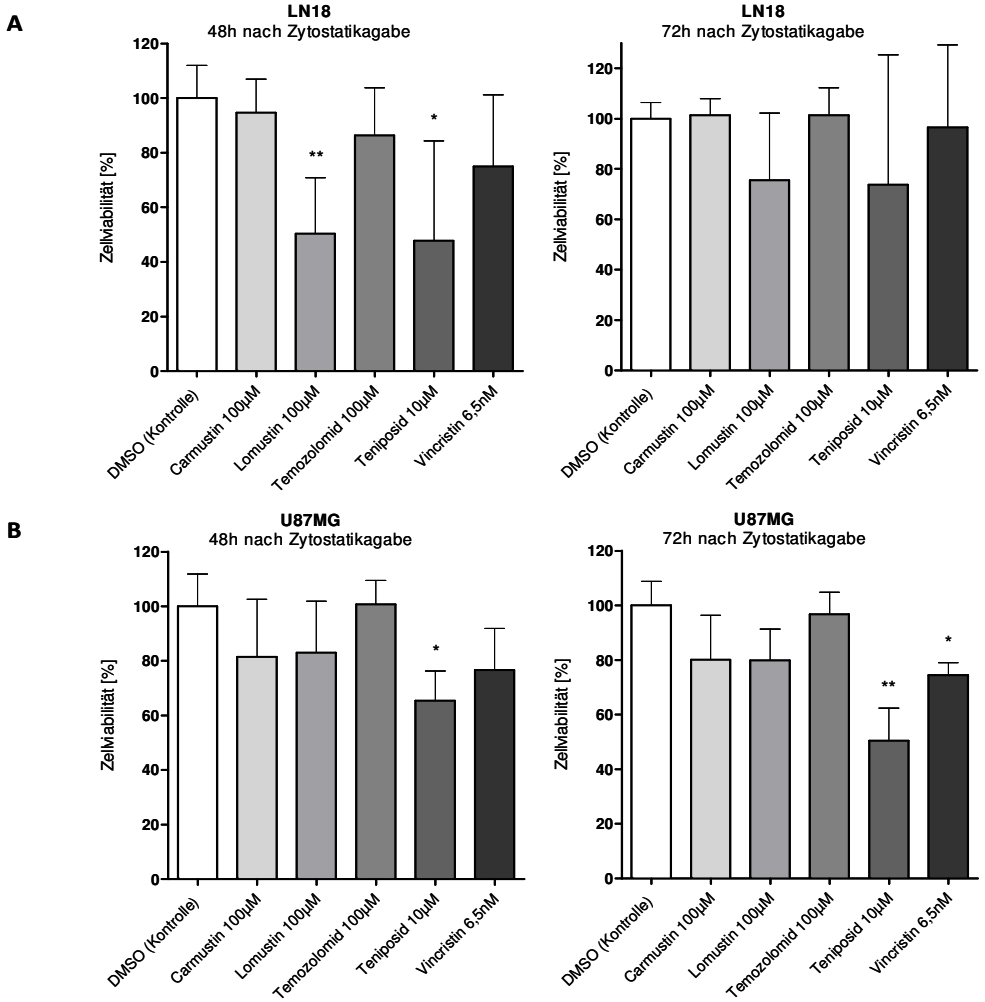


Abb. 4-7 Einfluss ausgewählter Zytostatika auf die Viabilität der Zelllinien LN18 und U87MG: Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen mit Carmustin (100 µM), Lomustin (100 µM), Temozolomid (100 µM), Teniposid (10 µM) und Vincristin (6,5 nM) oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Nach 48 bzw. 72 Stunden wurde die Zellviabilität mittels Resazurin-Assay bestimmt. Mittelwert±SD, n=3, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Die Zelllinie U87MG unterschied sich auch im Zellviabilitäts-Assay von den LN18-Zellen. Bei den U87MG-Zellen nahm die Zellviabilität nach der Gabe von 10 µM und 100 µM Teniposid (Abb. 4-7 B) sowohl nach 48h (um 28,1% und 43,3%) als auch nach 72h (um 44% und 53,3%) statistisch signifikant ab. Vincristin führte ebenfalls nach 72h zu einer signifikant verminderten Zellviabilität um 17,4% (6,5 nM) bzw. 37,8% (65 nM) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Der Effekt von Teniposid (100 µM) auf die U87MG-Zellen war verglichen mit den LN18-Zellen deutlich geringer ausgeprägt. Eine leicht reduzierte Zellviabilität war auch bei Inkubation der U87MG-Zellen mit Carmustin und Lomustin zu erkennen. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Temozolomid hatte bei beiden Zelllinien keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität.

4.2.1.3 Einfluss der Zytostatika auf die Proteinexpression ausgewählter Transporter

Um zu überprüfen, ob die unter 4.2.1.1 beobachteten Veränderungen der mRNA-Expression der pH-regulatorischen Transporter auch auf Proteinebene zu verzeichnen waren, wurden proteinanalytische Untersuchungen zur Transporterexpression in der Zelllinie U87MG durchgeführt. Die Zelllinie U87MG wurde verwendet, da auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den LN18-Zellen vermehrt signifikante Effekte nach Zytostatikabehandlung auftraten. Für diese Western-Blot-Analysen wurden die Zellen in 6-well-Multiwellplatten ausgesät und für 48h mit den jeweiligen Zytostatika inkubiert. Die Normalisierung der Expressionsdaten erfolgte auf GAPDH.

In der Abb. 4-8 sind die Ergebnisse der Proteinanalysen, sowie ein repräsentativer Blot (A) für den Nachweis von MCT1 und GAPDH dargestellt. Die mittlere Proteinexpression nach Inkubation mit 100 µM Teniposid stieg um 22% im Vergleich zur Kontrolle an, während eine ca. 40%ige-Abnahme der MCT1-Proteinexpression bei 1 µM und 10 µM Teniposid zu verzeichnen war. Durch Lomustin (100 µM) und Temozolomid (10 µM) wurde die mittlere Proteinexpression um 44% bzw. 33% verringert. Vincristin (65 nM) führte zur stärksten Abnahme der MCT1-Proteinexpression mit einer Reduktion von ca. 70% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Carmustin zeigte keinen Einfluss auf die MCT1-Proteinexpression.

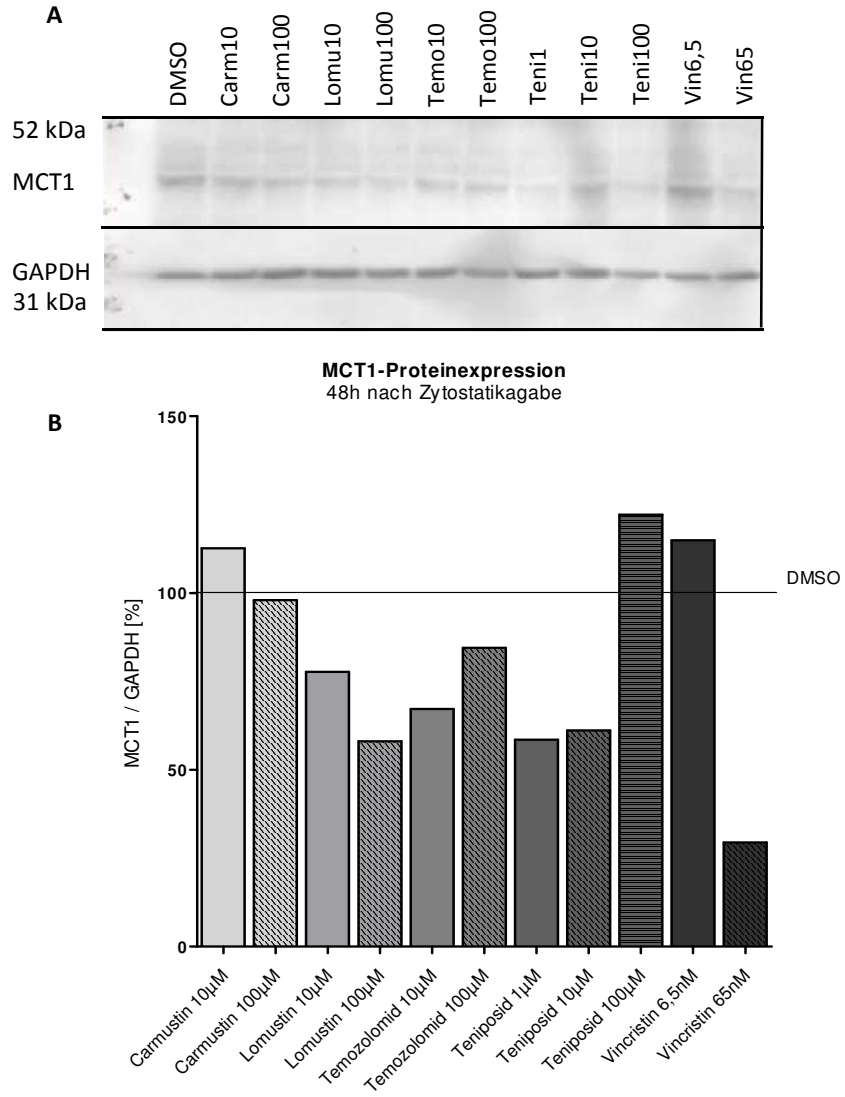


Abb. 4-8 Proteinexpression von MCT1 in U87MG Zellen: Die Zellen wurden 48h mit den Zytostatika Carmustin (Carm, 10 und 100 µM), Lomustin (Lomu, 10 und 100 µM), Temozolomid (Temo, 10 und 100 µM), Teniposid (Teni, 1, 10 und 100 µM) und Vincristin (Vin, 6,5 und 65 nM) sowie der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Die MCT1-Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert. (A) Darstellung repräsentativer Blots für MCT1 und GAPDH. (B) Densitometrische Auswertung und anschließende Normalisierung auf die GAPDH-Expression. Die MCT1-Expression nach DMSO-Behandlung der Zellen wurde auf 100% gesetzt und diente als Bezugsgröße für die Expression unter Zytostatika-Behandlung. n=2

In der Abb. 4-9 sind die Ergebnisse der Proteinanalysen sowie ein repräsentativer Blot (A) für den Nachweis von MCT4 und GAPDH abgebildet. Die mittlere Proteinexpression von MCT4 wurde durch alle ausgewählten Zytostatika gesenkt. Teniposid (100 µM) führte zur stärksten Abnahme der MCT4-Proteinexpression auf 25% und 20% verglichen mit den DMSO-behandelten Zellen.

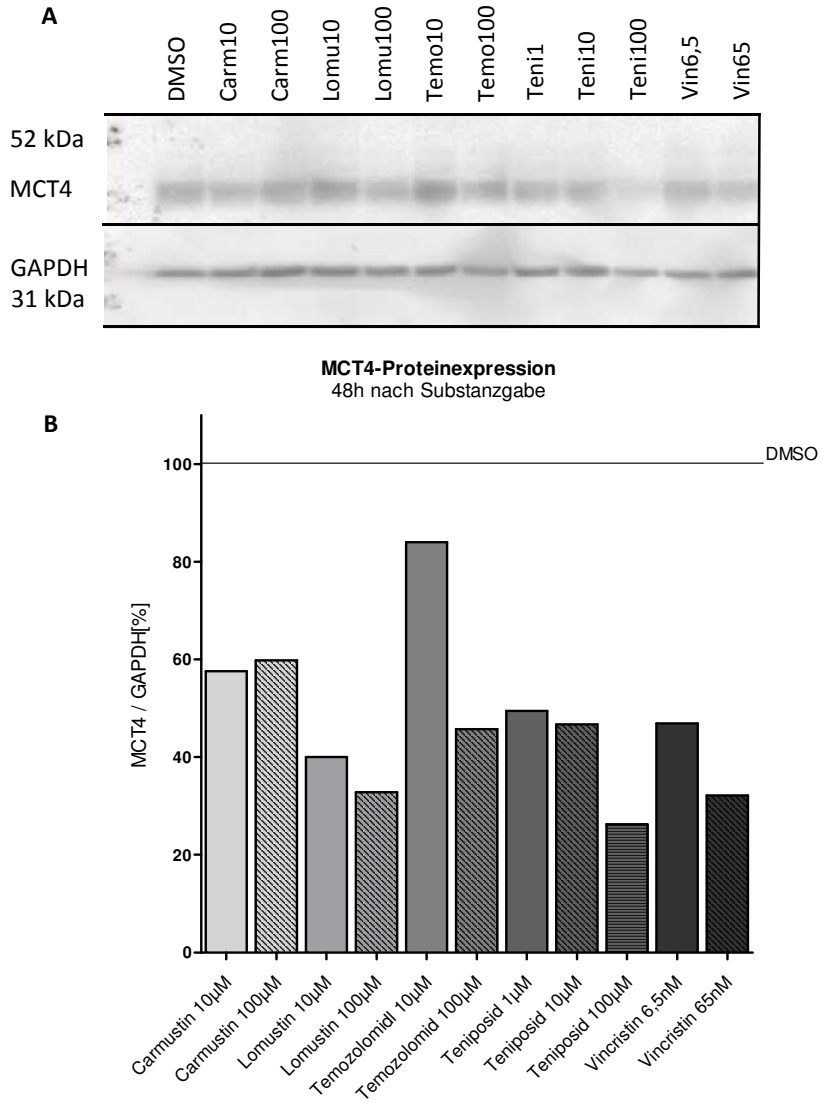


Abb. 4-9 Proteinexpression von MCT4 in U87-MG Zellen: Die Zellen wurden 48h mit den Zytostatika Carmustin (Carm, 10 und 100 µM), Lomustin (Lomu, 10 und 100 µM), Temozolomid (Temo, 10 und 100 µM), Teniposid (Teni, 1, 10 und 100 µM) und Vincristin (Vin, 6,5 und 65 nM) sowie der Kontrolle DMSO inkubiert. Die MCT4-Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert. (A) Darstellung repräsentativer Blots für MCT4 und GAPDH. (B) Densitometrische Auswertung und anschließende Normalisierung auf die GAPDH-Expression. Die MCT4-Expression nach DMSO-Behandlung wurde auf 100% gesetzt und diente als Bezugsgröße für die Expression unter Zytostatika-Behandlung. n=2

In der Abb. 4-10 sind die Ergebnisse der Proteinanalysen sowie ein repräsentativer Blot (A) für den Nachweis von NHE1 und GAPDH abgebildet. Bei der Proteinexpression von NHE1 waren zwei Banden nachweisbar. Neben der zu erwartenden Bande von ca. 90 kDa, die der NHE1-Isoform 1 entspricht (*138*), war noch eine zweite Bande bei ca. 52 kDa detektierbar. Laut Angaben des Antikörperherstellers (Abcam) kann die 52 kDa-Bande eine mögliche zweite Isoform von NHE1 darstellen (*139*). Zudem sind in der Datenbank Ensembl (*140*) für NHE1 insgesamt sieben Transkripte des SLC9A1-Gens angegeben (*140*). Dabei weist die

Transkriptvariante SLC9A1-201 ein Molekulargewicht von 53 kDa auf und könnte somit die in der vorliegenden Arbeit detektierte 52 kDa-Variante des NHE1 (NHE1-Variante 2) darstellen.

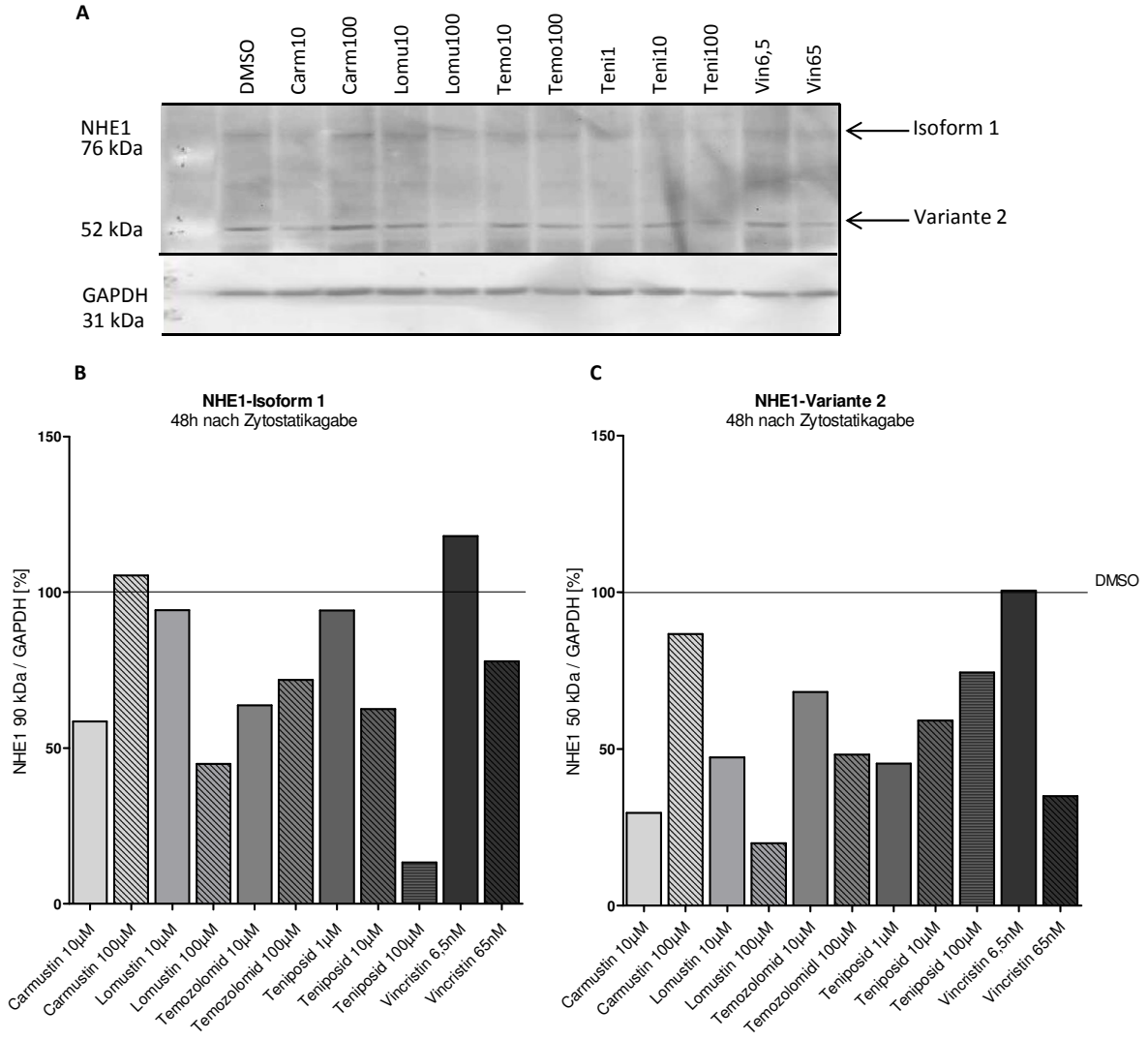


Abb. 4-10 Proteinexpression beider Varianten von NHE1 in U87-MG Zellen: Die Zellen wurden 48h mit den Zytostatika Carmustin (Carm, 10 und 100 µM), Lomustin (Lomu, 10 und 100 µM), Temozolomid (Temo, 10 und 100 µM), Teniposid (Teni, 1, 10 und 100 µM) und Vincristin (Vin, 6,5 und 65 nM), sowie der Kontrolle DMSO inkubiert. Die NHE1-Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert. (A) Darstellung repräsentativer Blots für beide NHE1-Varianten und GAPDH. (B, C) Densitometrische Auswertung und anschließende Normalisierung auf die GAPDH-Expression. Die NHE1-Expression der jeweiligen Variante nach DMSO-Behandlung wurde auf 100% gesetzt und diente als Bezugsgröße für die Expression unter Zytostatika-Behandlung. n=1

Alle untersuchten Zytostatika bewirkten eine Regulation der Expression der NHE1-Varianten, wobei eine zum Teil gegensätzliche Regulation der NHE1-Isoform 1 (90 kDa) und der NHE1-Variante 2 (52 kDa) zu verzeichnen war. Carmustin (10 µM), Lomustin (100 µM), Temozolomid (10 und 100 µM) und Vincristin (65 nM) hatten reduzierenden Einfluss auf die Proteinexpression beider Varianten, wobei die Variante 2 (52 kDa) stärker in ihrer

Expression vermindert wurde (um 70%-80% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle) als die Isoform 1 (um 23%-60% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle). Bei Teniposid war ein unterschiedlicher Effekt auf die Proteinexpression der beiden NHE1-Varianten zu erkennen. Während die Expression der Isoform 1 mit zunehmender Teniposid-Konzentration von 94% (1 µM) über 62% (10 µM) auf 13% (100 µM) sank, trat ein gegenläufiger Effekt bei der Variante 2 auf. Hier stieg die Expression der NHE1-Variante 2 von 45% (1 µM) über 59% (10 µM) auf 74% (100 µM) an.

4.2.2 Einfluss ausgewählter nichtsteroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) auf pH-regulatorische Transporter

Neben den Zytostatika wurden in dieser Arbeit auch nichtsteroidale Antiphlogistika (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) hinsichtlich ihrer Wirkung auf pH-regulatorische Transporter untersucht. Es wurden die Verbindungen Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin als COX-unselektive NSAIDs und die Substanzen Celecoxib, Lumiracoxib und Rofecoxib als COX2-selektive NSAIDs verwendet (siehe Abschnitt 3.1.4).

4.2.2.1 Einfluss der NSAIDs auf die mRNA-Expression ausgewählter Transporter

Die Zellen wurden in 6-well-Multiwellplatten ausgesät und für 48h mit den jeweiligen NSAIDs inkubiert. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde nur eine der verwendeten Substanzkonzentrationen in den Diagrammen abgebildet. In den Tabellen Tab. 11-3 (LN18) und Tab. 11-4 (U87MG) im Anhang sind die relativen mittleren Expressionswerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen aller Konzentrationen aufgelistet. In der Abb. 4-11 sind die Effekte der NSAIDs auf die mRNA-Expression der Transporter in LN18-Zellen dargestellt. Alle verwendeten NSAIDs zeigten unterschiedlich ausgeprägte und statistisch signifikante Auswirkungen auf die mRNA-Expression der pH-regulatorischen Transporter in LN18-Zellen im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (DMSO bzw. A. dest.). Diclofenac erhöhte die mRNA-Expression von NHE1 um mehr als das Doppelte der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abb. 4-11 A), verringerte jedoch die mRNA-Expression des Transporters NDCBE auf ca. 60% (Abb. 4-11 C). Indomethacin führte zu einer statistisch signifikanten Verminderung der mRNA-Expression von NDCBE und MCT4 auf jeweils ca. 28%. Celecoxib (50 µM) reduzierte ebenfalls sehr drastisch die mRNA-Expression von NDCBE auf 34%, während die mRNA-Expression der Transporter NHE5, MCT1 und MCT4 nur durch Celecoxib in der Konzentration von 100 µM auf 36% (NHE5), 68% (MCT1) und 5% (MCT4) abnahm. Lumiracoxib (100 µM) verminderte statistisch signifikant die mRNA-

Expression von NHE5 auf 60,8% und von NHE1 auf 63,6%. Die mRNA-Expression des Transporters NDCBE wurde durch 100 µM und 200 µM Lumiracoxib statistisch signifikant auf 55,4% und 41,4% gesenkt. Rofecoxib reduzierte ebenfalls die mRNA-Expression von NDCBE auf 53,2%, sowie von NHE1 auf 61,7% statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu wurde die MCT5-mRNA-Expression von Rofecoxib in der Konzentration von 500 µM statistisch signifikant erhöht (Tab. 11-3). Ibuprofen verringerte statistisch signifikant die mRNA-Expression von NHE1 auf bis zu 53%, von NHE5 auf bis zu 58%, von NDCBE auf bis zu 47% und von MCT1 auf 56% im Vergleich zur zugehörigen Lösungsmittelkontrolle (A.dest.).

In der Abb. 4-12 sind die Effekte der NSAIDs auf die mRNA-Expression der Transporter in U87MG-Zellen dargestellt. Bei den U87MG-Zellen wurde die mRNA-Expression von MCT5 (Abb. 4-12 F) durch keines der verwendeten NSAID statistisch signifikant beeinflusst. Wie auch in den LN18-Zellen erhöhte Diclofenac in den U87MG-Zellen ausschließlich die mRNA-Expression von NHE1 statistisch signifikant um das 3,5fache im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abb. 4-12 A). Im Gegensatz dazu wurde die mRNA-Expression von NHE5 auf ca. 40% (Abb. 4-12 B) durch Diclofenac statistisch signifikant reduziert. Indomethacin verringerte auch bei den U87MG-Zellen die mRNA-Expression von NDCBE (Abb. 4-12 C) und MCT4, jedoch mit einer deutlich schwächeren Abnahme der Expression auf 54% (NDCBE) und 36% (MCT4) verglichen mit den LN18-Zellen. Auch die Expression von NHE5 wurde bei den U87MG-Zellen durch Indomethacin auf ca. 51% vermindert. Celecoxib (50 µM) führte zu einer Verminderung der mRNA-Expression von NHE5 auf 55% ,von MCT1 auf 50% und von MCT4 auf ca. 60%. Dieser hemmende Effekt war in der Konzentration von 100 µM zusätzlich bei dem Transporter NDCBE statistisch signifikant ausgeprägt (Tab. 11-4). Lumiracoxib reduzierte nur die mRNA-Expression von NHE5 auf bis zu 45% und von MCT1 auf 40%. Durch Rofecoxib in den Konzentrationen von 200 µM bzw. 500 µM wurden ausschließlich die mRNA-Expressionen von MCT1 und MCT4 statistisch signifikant vermindert. Während die mRNA-Expression von MCT1 durch 200 µM Rofecoxib auf 35,8% gesenkt wurde und in der Konzentration von 500 µM nur auf 48%, erfolgte bei MCT4 durch 500 µM Rofecoxib (Tab. 11-4) eine größere Abnahme der Expression (auf 27%) als bei 200 µM (auf 36%). Im Vergleich zu den LN18-Zellen wurde die mRNA-Expression der pH-regulatorischen Transporter in den U87MG-Zellen durch Ibuprofen kaum beeinflusst. Bei MCT4 und NHE5 zeigte sich eher eine Erhöhung der Transporterexpression als die detektierte verminderte Regulation der mRNA-Expression in den LN18-Zellen. In der Konzentration von 500 µM Ibuprofen war die NHE5-mRNA-Expression statistisch signifikant auf 168% erhöht (Tab. 11-4).

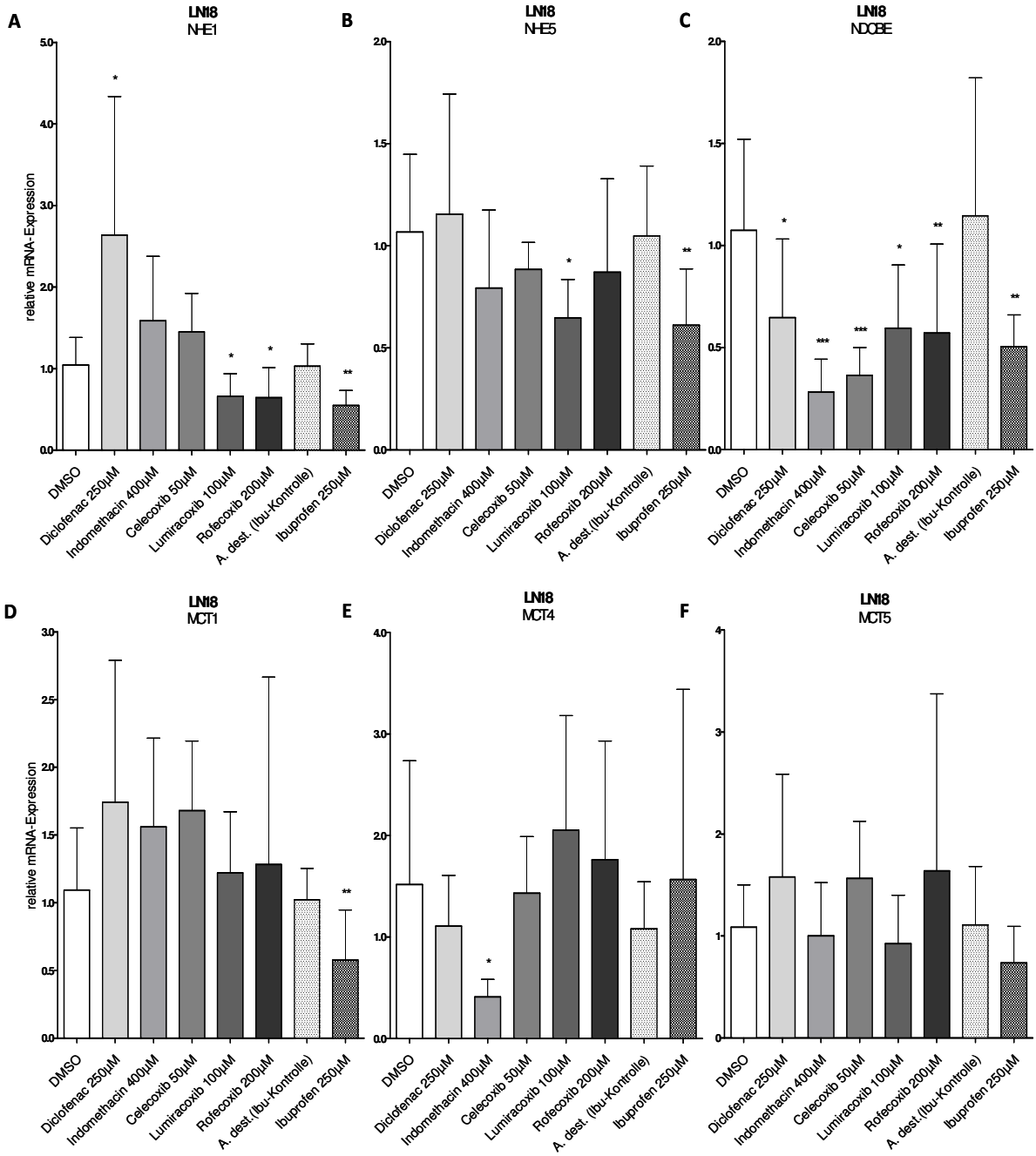


Abb. 4-11 Einfluss ausgewählter NSAIDs auf die mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter in LN18-Zellen: Nach Aussaat wurden die Zellen für 48h mit den COX-unselektiven NSAIDs Diclofenac (250 µM), Ibuprofen (250 µM) und Indomethacin (400 µM) sowie den COX2-selektiven NSAIDs Celecoxib (50 µM), Lumiracoxib (100 µM) und Rofecoxib (200 µM) inkubiert. Die mRNA-Expression der Transporter wurde mittels real-time PCR bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. Mittelwerte+SD, n=7-9, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

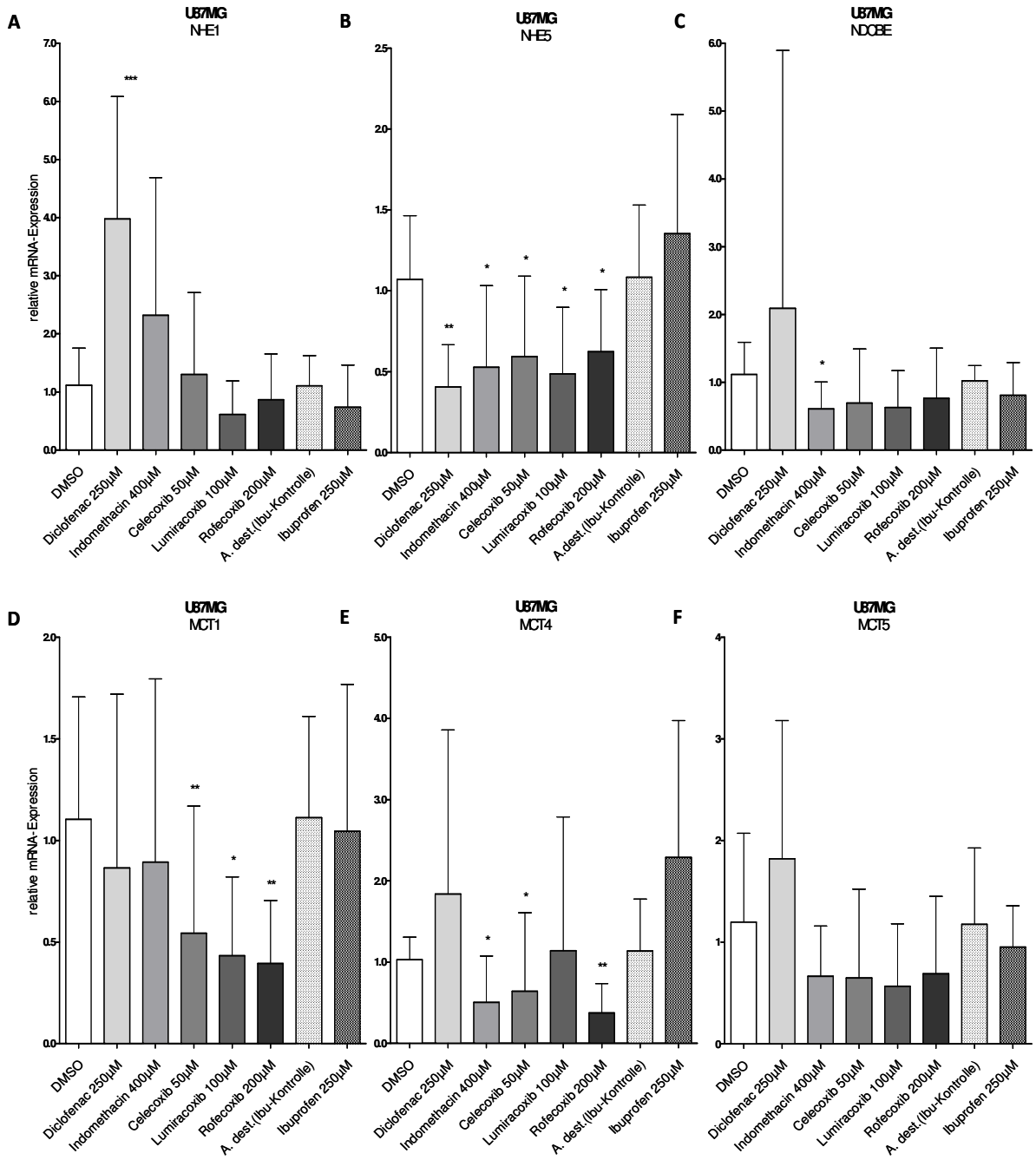


Abb. 4-12 Einfluss ausgewählter NSAIDs auf die mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter in U87MG Zellen: Nach Aussaat wurden die Zellen für 48h mit den COX-unselektiven NSAIDs Diclofenac (250 µM), Ibuprofen (250 µM) und Indomethacin (400 µM) sowie den COX2-selektiven NSAIDs Celecoxib (50 µM), Lumiracoxib (100 µM) und Rofecoxib (200 µM) inkubiert. Die mRNA-Expression der Transporter wurde mittels real-time PCR bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. Mittelwerte+SD, n=7-9, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2.2.2 Einfluss der NSAIDs auf die Viabilität von Glioblastomzellen

Um einen möglichen Zusammenhang von NSAID-vermittelten Effekten auf die mRNA-Expression und der potentiellen Zytotoxizität der Substanzen zu untersuchen, wurden

Resazurin-Assays zur Bestimmung der Zellviabilität nach Inkubation mit den ausgewählten NSAIDs durchgeführt. Die Zellen wurden mit Diclofenac, Indomethacin, Ibuprofen, Celecoxib, Lumiracoxib und Rofecoxib für 48h und 72h inkubiert. In der Abb. 4-13 ist die Zellviabilität von LN18-Zellen (A) und U87MG-Zellen (B) dargestellt. Bei der Zelllinie LN18 führte Celecoxib nur in einer Konzentration von 100 µM zu einer Verringerung der Zellviabilität auf 50% nach 48h sowie auf 40% nach 72h. Auch Diclofenac verminderte nur in der höheren Konzentration von 500 µM die Zellviabilität nach 72h statistisch signifikant auf 68%. Im Gegensatz dazu erhöhte Ibuprofen bereits in der Konzentration von 250 µM die Zellviabilität nach 48h statistisch signifikant auf 128% und nach 72h auf etwa 110% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Wasser).

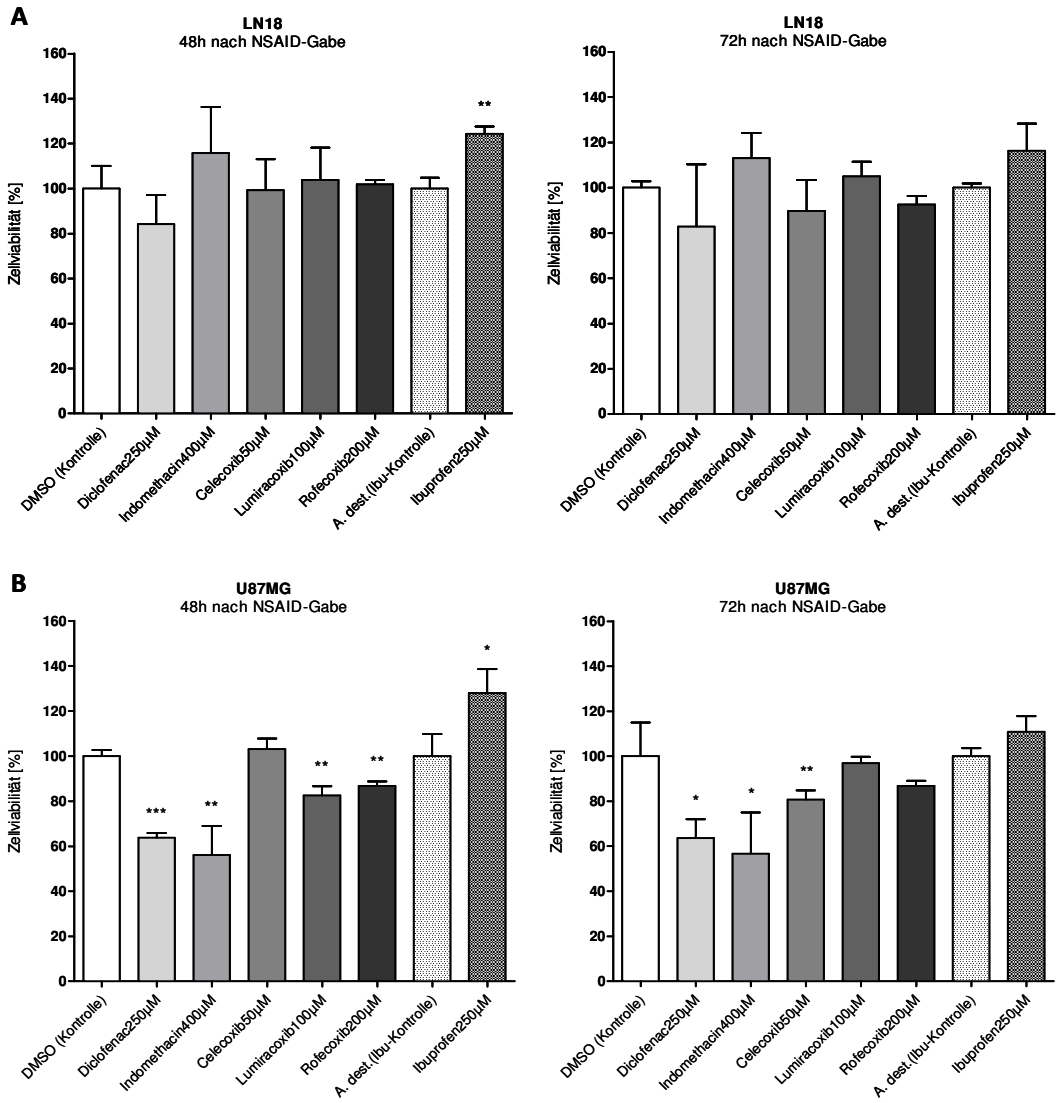


Abb. 4-13 Einfluss ausgewählter NSAIDs auf die Viabilität der Zelllinien LN18 und U87MG: Für die Bestimmung der Zellviabilität mittels Resazurin-Assays wurden die Zellen mit Diclofenac (250, 500 µM), Indomethacin (400, 800 µM), Ibuprofen (250, 500 µM),Celecoxib (50, 100 µM), Lumiracoxib (100, 200 µM) und Rofecoxib (200, 500 µM) sowie den Lösungsmittelkontrollen DMSO und A. dest. (Ibuprofen) für 48h und 72h inkubiert. Mittelwerte+SD, n=3, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Verglichen mit den LN18-Zellen reagierten die U87MG-Zellen (B) deutlich stärker auf die verabreichten NSAIDs. Nach 48h sank die Zellviabilität statistisch signifikant bei allen NSAIDs, mit Ausnahme von Celecoxib (50 µM) und Ibuprofen. Unter Ibuprofen (500 µM) wurde die Zellviabilität nach 48h auf 143% gesteigert, während die Zellviabilität unter Diclofenac auf 64%, unter Indomethacin auf 56%, unter Lumiracoxib auf 83% sowie unter Rofecoxib auf 87% sank. Nach 72h war bei Diclofenac, Indomethacin und Rofecoxib eine ähnliche Wirkung zu verzeichnen wie nach 48h, während sich die Effekte von Lumiracoxib und Rofecoxib abschwächten. Des Weiteren trat nun bei 50 µM Celecoxib eine statistisch signifikante Abnahme der Zellviabilität auf 80% auf.

4.2.2.3 Einfluss der NSAIDs auf die Proteinexpression ausgewählter Transporter

Um zu überprüfen, ob die unter 4.2.2.1 beobachteten Veränderungen der mRNA der pH-regulatorischen Transporter auch auf Proteinebene zu verzeichnen waren, wurden proteinanalytische Untersuchungen zur Transporterexpression in der Zelllinie U87MG durchgeführt. Für diese Western-Blot-Analysen wurden die Zellen in 6-well-Multiwellplatten ausgesät und für 48h mit dem jeweiligen NSAID inkubiert. Die Normalisierung der Expressionsdaten der pH-regulatorischen Transporter erfolgte auf GAPDH.

In der Abb. 4-14 sind die repräsentativen Blots (A) und die densitometrische Auswertung (B) für den Nachweis von MCT1 und GAPDH abgebildet. Celecoxib in der Konzentration von 100 µM reduzierte die MCT1-Proteinexpression um ca. 50%, wohingegen nach Inkubation mit 250 µM Diclofenac die Proteinexpression auf 188% anstieg. Auf Grund der großen Streuung waren die Effekte statistisch nicht signifikant. Die übrigen NSAIDs (Indomethacin, Ibuprofen, Lumiracoxib und Rofecoxib) zeigten in den eingesetzten Konzentrationen keine maßgeblichen Auswirkungen auf die MCT1-Proteinexpression.

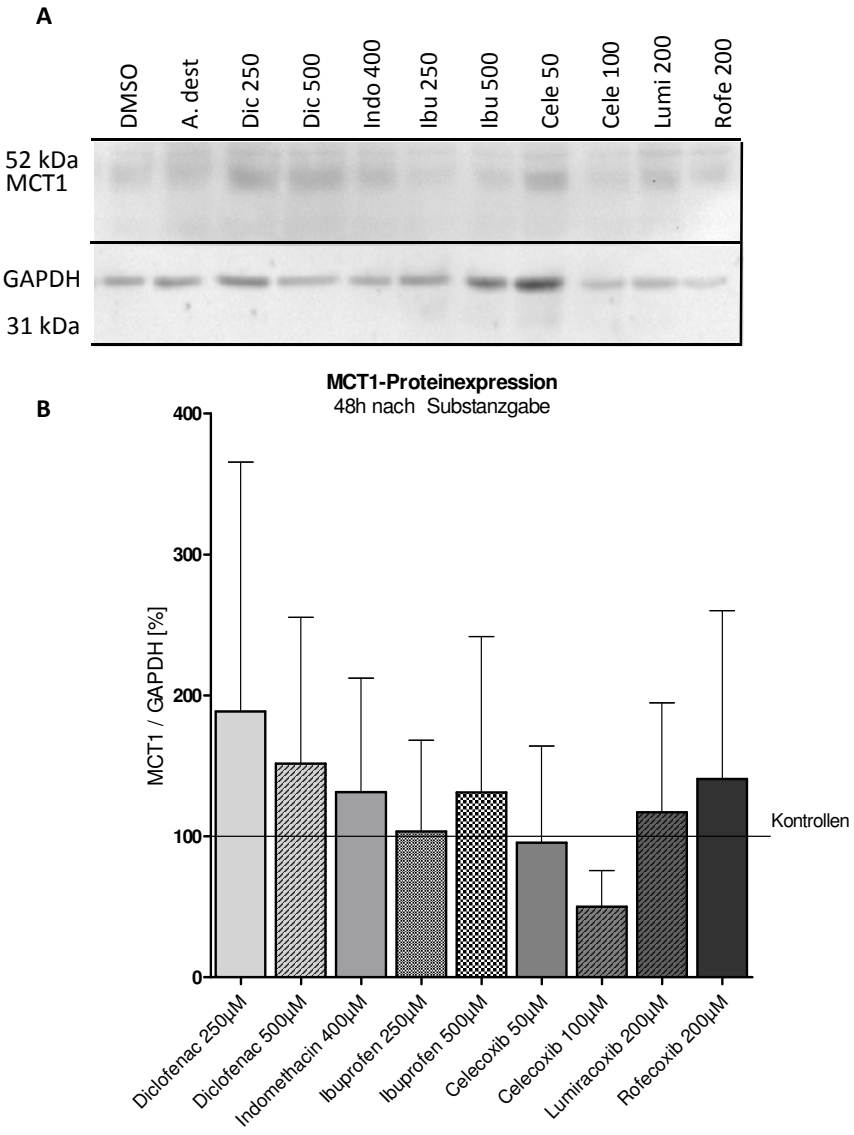


Abb. 4-14 Proteinexpression von MCT1 in U87MG-Zellen: Die Zellen wurden für 48h mit Diclofenac (Diclo, 250 und 500 µM), Ibuprofen (Ibu, 250 und 500 µM), Indomethacin (Indo, 400 µM), Celecoxib (Cele, 50 und 100 µM), Lumiracoxib (Lumi, 200 µM), Rofecoxib (Rofe, 200 µM) und den Lösungsmittelkontrollen DMSO bzw. A. dest. inkubiert. (A) Darstellung repräsentativer Blots für MCT1 und GAPDH. (B) Densitometrische Auswertung und Normalisierung auf die Expression von GAPDH. Die MCT1-Expression nach DMSO-Behandlung wurde auf 100**%** gesetzt und diente als Bezugsgröße für die Expression unter NSAID-Behandlung. Mittelwerte+SD, n=4

In der Abb. 4-15 sind repräsentative Blots (A) und die densitometrische Auswertung (B) für den Nachweis von MCT4 und GAPDH abgebildet. Im Gegensatz zur MCT1-Proteinexpression reduzierte Diclofenac die MCT4-Proteinexpression um mehr als 50% verglichen zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO). Ibuprofen führte hingegen zu einer leichten Steigerung der MCT4-Proteinexpression. Diese Effekte sind jedoch aufgrund der Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten statistisch nicht signifikant.

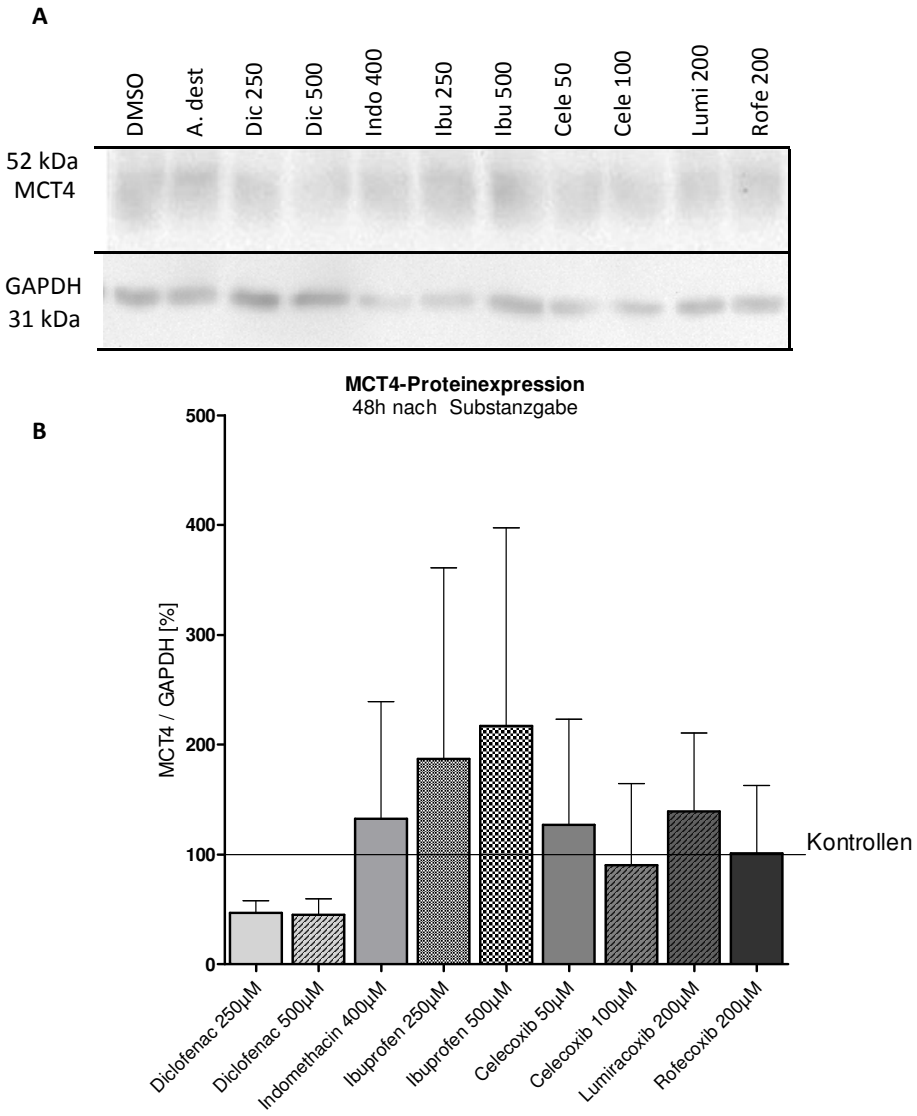


Abb. 4-15 Proteinexpression von MCT4 in U87MG-Zellen: Die Zellen wurden für 48h mit den NSAIDs Diclofenac (Diclo, 250 und 500 µM), Ibuprofen (Ibu, 250 und 500 µM), Indomethacin (Indo, 400 µM), Celecoxib (Cele, 50 und 100 µM), Lumiracoxib (Lumi, 200 µM), Rofecoxib (Rofe, 200 µM) und den Lösungsmittelkontrollen DMSO bzw. A. dest inkubiert. (A) Darstellung repräsentativer Blots für MCT4 und GAPDH. (B) Densitometrische Auswertung und Normalisierung auf die Expression von GAPDH. Die MCT4-Expression nach DMSO-Behandlung wurde auf 100% gesetzt und diente als Bezugsgröße für die Expression unter NSAID-Behandlung. Mittelwerte+SD, n=3

Wie auch bei der Proteinexpression von NHE1 unter Zytostatikagabe, wurde die NHE1-Expression nach Inkubation mit NSAID getrennt nach Isoform 1 (90 kDa) und Variante 2 (52 kDa) ausgewertet (Abb. 4-16). Die Proteinexpression der NHE1-Isoform 1 wurde durch 100 µM Celecoxib auf 35% im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) vermindert. Indomethacin, Ibuprofen (250 µM) und Lumiracoxib erhöhten die Proteinexpression der NHE1-Isoform 1 auf mindestens 186%. Auf Grund der großen Streuung innerhalb der Replikate waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz zur Isoform 1 wurde die

Proteinexpression der NHE1-Variante 2 durch alle NSAIDs in unterschiedlichem Ausmaß reduziert. Nach Inkubation mit Diclofenac, Indomethacin, Celecoxib und Rofecoxib war die Abnahme der NHE1-Variante 2 am deutlichsten ausgeprägt. Diclofenac (500 µM), Indomethacin (400 µM) und Rofecoxib (200 µM) verminderten die Proteinexpression statistisch signifikant auf jeweils ca. 30% bezogen auf die DMSO-Kontrolle. Während bei der Isoform 1 die Proteinexpression nur von 100 µM Celecoxib verringert wurde, führten bei der Variante 2 beide Konzentrationen (50 und 100 µM) zu einer statistisch signifikanten Reduzierung. Unter 50 µM Celecoxib war eine größere Abnahme der Expression auf 29,3% zu verzeichnen, die Proteinexpression bei 100 µM wurde nur auf 43,4% vermindert.

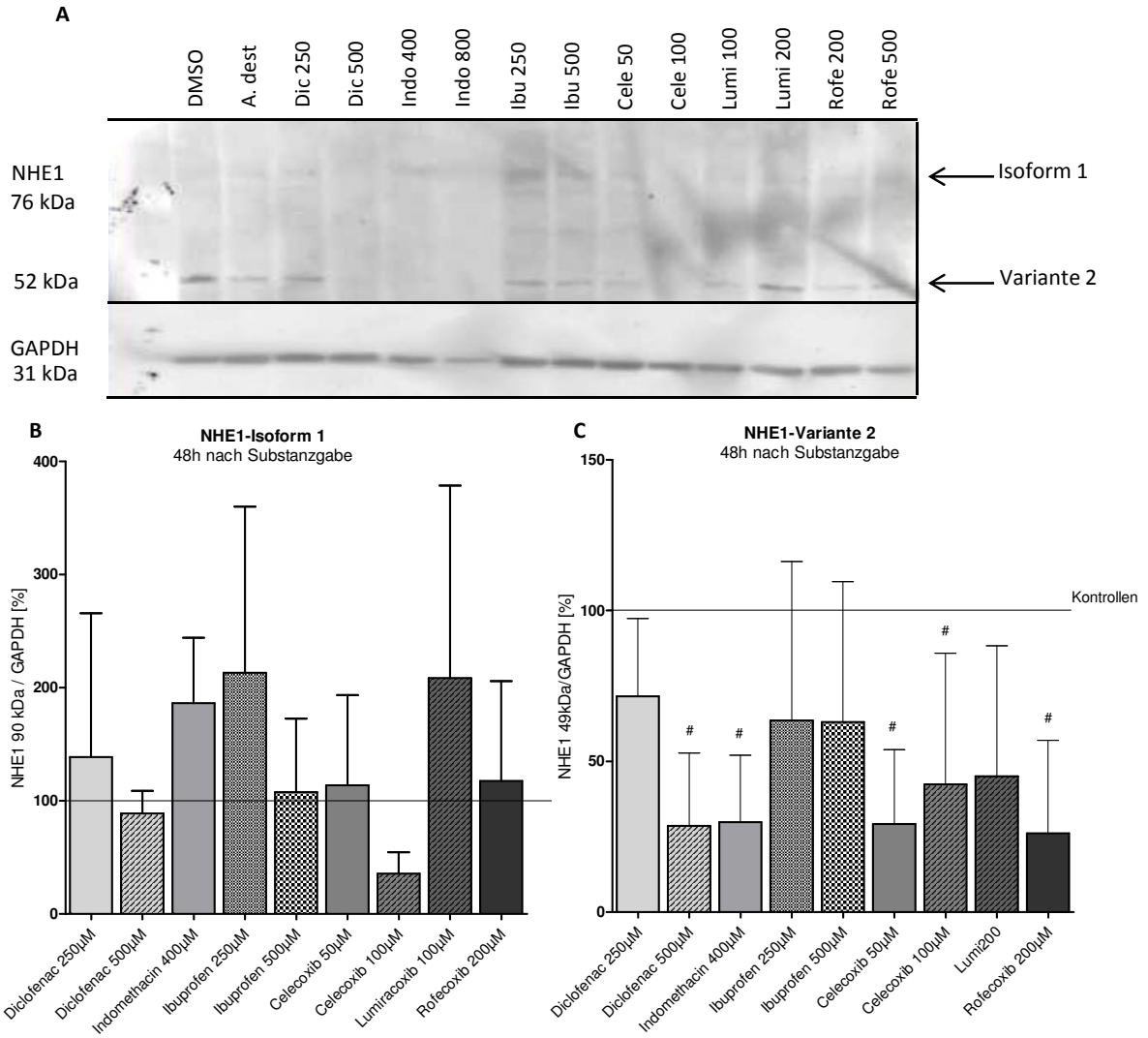


Abb. 4-16 Proteinexpression von NHE1 in U87MG-Zellen: Die Zellen wurden für 48h mit Diclofenac (Diclo, 250 und 500 µM), Ibuprofen (Ibu, 250 und 500 µM), Indomethacin (Indo, 400 µM), Celecoxib (Cele, 50 und 100 µM), Lumiracoxib (Lumi, 200 µM), Rofecoxib (Rofe, 200 µM) und den Kontrollen DMSO bzw. Aqua dest. inkubiert. (A) Darstellung repräsentativer Blots für beide NHE1-Varianten und GAPDH. (B) Densitometrische Auswertung und Normalisierung auf die Expression von GAPDH. Die NHE1-Expression nach DMSO-Behandlung wurde auf 100% gesetzt und diente als Bezugsgröße für die Expression unter NSAID-Behandlung. Mittelwerte+SD, n=4, ANOVA mit Post-Hoc-Test Bonferroni, # $p < 0,05$

4.2.3 Funktionelle Untersuchungen der pH-regulatorischen Transporter

Für die funktionellen und regulatorischen Untersuchungen wurden ausschließlich LN18-Zellen verwendet. Als Substanzen wurden nur diejenigen eingesetzt, die einen signifikanten Effekt auf mRNA-Ebene, Proteinebene sowie auf die Zellviabilität zeigten. Diclofenac, Celecoxib und Teniposid verringerten drastisch die Zellviabilität und hatten Einfluss auf die mRNA- und die Proteinexpression pH-regulatorischer Transporter. Zusätzlich wurde Ibuprofen ausgewählt, da diese Substanz überraschenderweise die Viabilität der Glioblastomzellen erhöhte. Durch die nachfolgenden Untersuchungen war es möglich Rückschlüsse zu ziehen, inwieweit die genannten Substanzen die Transporter in ihrer Aktivität und Lokalisation beeinflussten und welche Auswirkungen dies auf den intrazellulären pH-Wert von Glioblastomzellen hatte.

4.2.3.1 NHE1-Phosphorylierungsgrad

Die Untersuchungen zur Zellviabilität zeigten, dass Diclofenac, Celecoxib und Teniposid die Viabilität von Glioblastomzellen stark verminderten (siehe 4.2.1.2 und 4.2.2.2). Eine verminderte Zellviabilität kann u.a. durch apoptotische Prozesse hervorgerufen werden. Es ist bereits bekannt, dass ein alkalischer pH_i und eine erhöhte NHE1-Aktivität Tumorzellen vor Apoptose schützen können (*141*). Die NHE1-Aktivität kann durch Phosphorylierung gesteigert werden (*81*). Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungsgrad von NHE1 in behandelten Zellen durch eine Immunpräzipitation mit einem NHE1-Antikörper, anschließendem Immunoblot und Nachweis des NHE1-Phosphorylierungsgrades mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Serin, Threonin und Tyrosin bestimmt (Abb. 4-17, A). Die Daten der densitometrischen Auswertung wurden auf den Proteingehalt des gesamten NHE1 normalisiert und auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen (Abb. 4-17, B). Die Substanzen Diclofenac, Ibuprofen und Celecoxib führten zu keiner Veränderung des Phosphorylierungsgrades von NHE1 in LN18-Glioblastomzellen. Teniposid hingegen verminderte den Phosphorylierungsgrad von NHE1 um 30%, jedoch fiel diese Reduktion statistisch nicht signifikant aus.

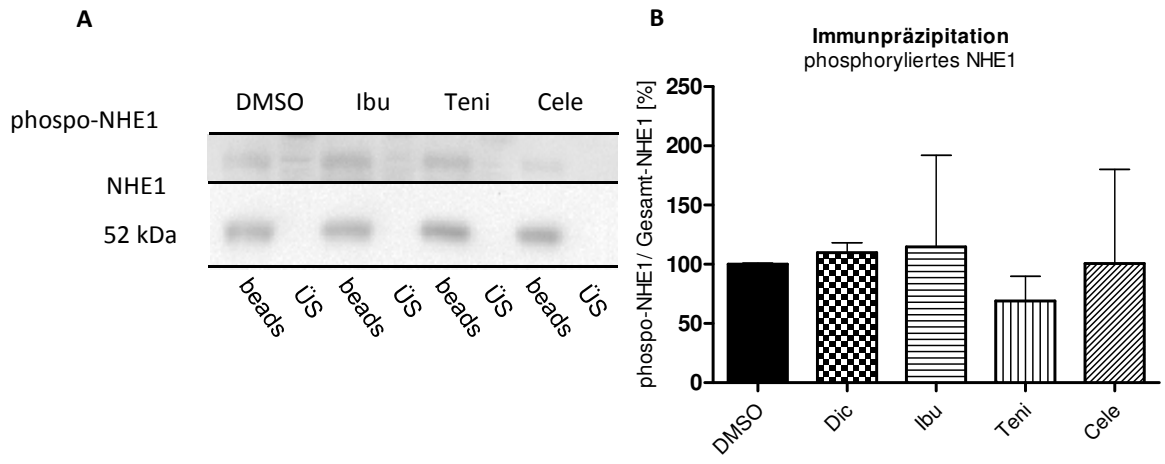


Abb. 4-17 Immunpräzipitation zur Ermittlung des Phosphorylierungsstatus von NHE1: Um den Einfluss von Diclofenac (Dic, 250 µM), Ibuprofen (Ibu, 250 µM), Teniposid (Teni, 10 µM) und Celecoxib (Cele, 50 µM) auf den Phosphorylierungsgrad von NHE1 in LN18-Zellen zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen mit einem NHE1-Antikörper durchgeführt. Die Detektion der Phosphorylierung erfolgte mit einem anti-phospho-Ser/Thr/Tyr-Antikörper und einem anti-NHE1-Antikörper. (A) Darstellung eines repräsentativen Blots für den Nachweis der Ser/Thr/Tyr-Phosphorylierung (phospho-NHE1) und NHE1. (B) Densitometrische Auswertung: Normalisierung des phosphorylierten NHE1 erfolgte auf den Gesamt-NHE1-Proteingehalt. Der Phosphorylierungsstatus nach DMSO-Behandlung wurde auf 100% gesetzt und diente als Bezugsgröße für die Substanz-vermittelten Effekte. Mittelwerte+SD, n=2 (Dic, Teni), n=3 (DMSO, Ibu, Cele), ÜS: Überstand, beads: aufgereinigtes Pellet

4.2.3.2 Untersuchungen zum intrazellulären pH-Wert (pH_i) von Glioblastomzellen

Die in dieser Arbeit untersuchten Transporter tragen entscheidend zur Regulation des pH_i bei. Werden sie durch die hier verwendeten Substanzen beeinflusst, kann sich das in einer Änderung des pH_i niederschlagen. Aus diesem Grund ist die Bestimmung des pH_i nach Behandlung der Zellen mit den Substanzen ein wichtiges Kriterium, um Rückschlüsse auf Veränderungen in der Aktivität pH-regulatorischer Transporter zu ziehen. Zur Bestimmung des pH_i wurde der pH-sensitive Farbstoff BCECF verwendet (Abschnitt 3.2.5.2).

Für jede pH-Messung wurde eine Eichreihe mitgeführt, bei der durch das Ionophor Nigericin der intrazelluläre pH der Zellen dem extrazellulären pH des zugegebenen Kalium-HEPES-Puffers angeglichen wurde. In der Abb. 4-18 ist beispielhaft eine Regressionskurve für die Erstellung der pH-Eichkurve abgebildet. Das Bestimmtheitsmaß der Eichkurven betrug für alle durchgeführten Messungen r^2=0,9.

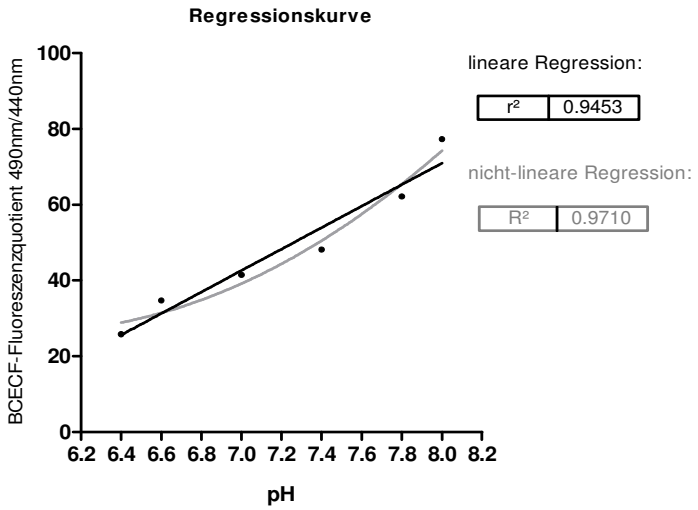


Abb. 4-18 Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) durch den Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM: Beispielhafte Darstellung einer Regressionsgerade zur Ermittlung einer pH-Eichkurve. Der Fluoreszenzquotient aus 490 und 440 nm wurde gegen den pH-Wert der Kalium-HEPES-Pufferlösungen aufgetragen. Mit Hilfe der erhaltenen Regressionsgleichung wurden die pH_i-Werte der Zellen bestimmt.

Vor Beginn der Substanzversuche wurde der basale pH_i der drei verwendeten Zelllinien LN18, U87MG und GL261 ermittelt. Die Glioblastomzelllinien zeigten einen leicht alkalischen pH_i mit Werten von 7,69 (LN18-Zellen), 7,68 (U87MG-Zellen) und 7,63 (GL261-Zellen) (Abb. 4-19).

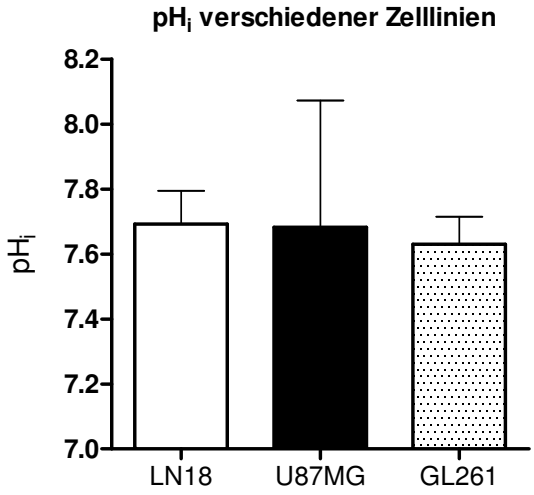


Abb. 4-19 Intrazelluläre pH-Werte (pH_i) verschiedener Glioblastomzelllinien: Abgebildet sind die pH_i-Werte der humanen Tumorzelllinien LN18 und U87MG sowie der murinen Tumorzelllinie GL261. Die pH_i-Bestimmung erfolgte durch die BCECF-Methode und linearer Regression anhand der mitgeführten Eichkurve. Mittelwerte+SEM, n= mindestens 3

4.2.3.2.1 Einfluss ausgewählter Substanzen auf den pH_i von LN18-Zellen

Nach Bestimmung des basalen pH_i wurde untersucht, ob eine Veränderung im pH_i von LN18-Zellen durch die Behandlung mit den ausgewählten NSAIDs (Diclofenac, Ibuprofen, Celecoxib) und den Zytostatika (Lomustin, Temozolomid, Teniposid) hervorgerufen wird. Die LN18-Zellen wurden für diese Messungen für 48h mit den Substanzen inkubiert. Eine statistisch signifikante Abnahme (Abb. 4-20) des pH_i um 0,57 pH-Einheiten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) lag nach Inkubation der Zellen mit 10 µM Teniposid vor. Alle weiteren verwendeten Zytostatika und die ausgewählten NSAIDs zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen des pH_i-Wertes. Da im Mittel kein Unterschied im pH_i zwischen den Lösungsmittelkontrollen A. dest (für Ibuprofen) und DMSO (für die übrigen Substanzen) bestand, wird zur besseren Übersichtlichkeit der folgenden Diagramme nur die Lösungsmittelkontrolle DMSO dargestellt.

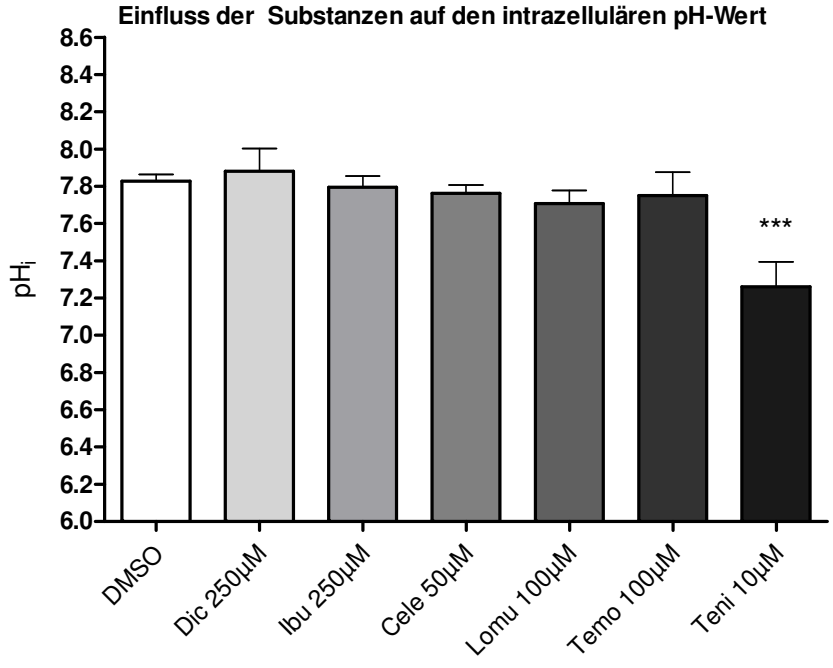


Abb. 4-20 Einfluss ausgewählter Substanzen auf den pH_i von LN18-Zellen: Für die pH_i-Messung wurden LN18-Zellen für 48h mit Diclofenac (Dic, 250 µM), Ibuprofen (Ibu, 250 µM), Celecoxib (Cele, 5 µM), Lomustin (Lomu, 100 µM), Temozolomid (Temo, 100 µM) und Teniposid (Teni, 10 µM), sowie der Lösungsmittelkontrolle DMSO, inkubiert. Die pH_i-Bestimmung erfolgte durch die BCECF-Methode und linearer Regression anhand der mitgeführten Eichkurve. Mittelwerte+SD, n=3, *** $p < 0,001$

4.2.3.2.2 Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Aktivität pH-regulatorischer Transporter

Durch nachfolgende Aktivitätsmessungen der Transporter wurde untersucht, ob ausgewählte Substanzen die Aktivität der pH-regulatorischen Transporter in LN18-Zellen beeinflussen und sich dadurch der pH_i verändert. Die Messung der Transporteraktivität erfolgte durch die Bestimmung des pH_i nach Zugabe verschiedener transporterspezifischer Stimuli und Hemmstoffe. Anhand der Inhibitoren wurde überprüft, inwieweit der eingetretene Effekt durch den zu untersuchenden Transporter vermittelt wurde. Es sei aber darauf hingewiesen, dass an der pH-Regulation eine Vielzahl von Mechanismen und Transporter mitwirken, die nicht im Rahmen dieser Arbeit betrachtet wurden.

4.2.3.2.2.1 Beeinflussung der MCT-Aktivität

Ein Maß für die Aktivität von Monocarboxylattransportern stellt der Transport von Laktat, eines der wichtigsten Substrate dieser Transporter, dar und wurde daher zur Messung der MCT-Transporteraktivität herangezogen. Die Messung der MCT-Aktivität erfolgte nach bereits erwähnter Vorschrift (Abschnitt 3.2.5.2.1). In der Abb. 4-21 ist die Abnahme des pH_i in Abhängigkeit von der extrazellulären Laktatkonzentration dargestellt.

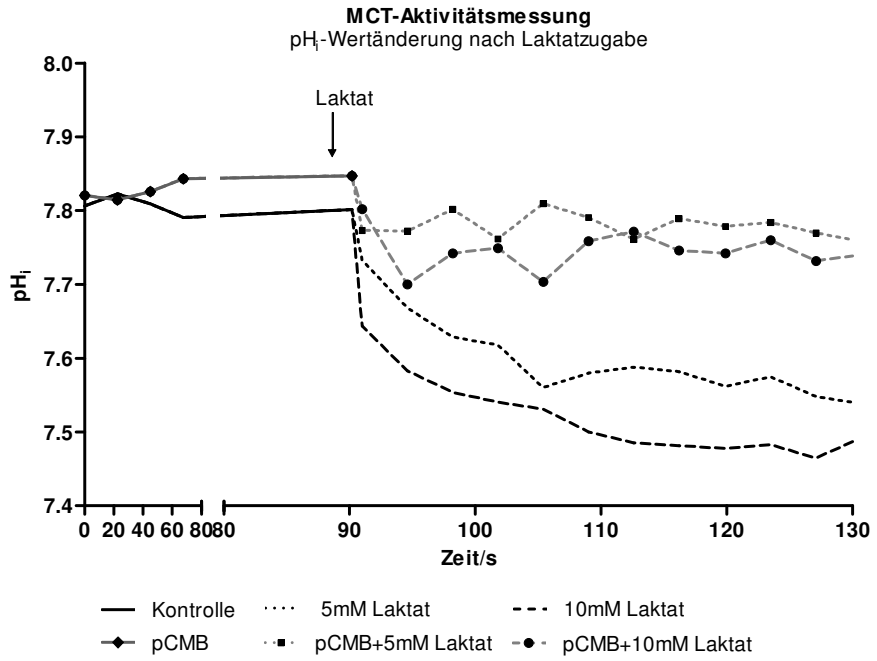


Abb. 4-21 Messung der MCT-Aktivität durch die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes: Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in LN18-Zellen zum konzentrationsabhängigen Laktattransport und dessen Hemmung durch den MCT-Inhibitor pCMB. Nach Erreichen eines konstanten pH_i wurden 5 mM bzw. 10 mM Laktat zu den Zellen hinzugegeben und für weitere 40s gemessen. Die pH_i-Bestimmung erfolgte durch die BCECF-Methode und linearer Regression anhand der mitgeführten Eichkurve.

Nach Zugabe von 5 mM Laktat wurde eine Abnahme des pH_i detektiert, die bei Zugabe einer 10 mM Laktatlösung noch deutlich ausgeprägter war. Die größte Veränderung im pH_i konnte bereits 10 Sekunden nach Laktatzugabe gemessen werden. Um die Spezifität des MCT-abhängigen Laktattransports zu prüfen, wurden die Zellen zusätzlich mit dem MCT-Inhibitor pCMB (100 µM) für 30 Minuten vorbehandelt. Durch die Vorinkubation mit dem MCT-Inhibitor wurde die Laktataufnahme vermindert und die Abnahme des pH_i nach Laktatzugabe fiel dementsprechend schwächer aus.

Um den Einfluss der NSAIDs und Zytostatika auf den MCT-abhängigen Laktattransport zu untersuchen, wurden die LN18-Zellen für 48h mit den Substanzen behandelt. Um zu prüfen, ob die beobachteten pH_i-Veränderungen nach Substanzgabe auf Grund der Beeinflussung der MCT-Aktivität durch die Substanzen ausgelöst werden, wurden zudem LN18-Zellen mit pCMB (100 µM) vorinkubiert und anschließend mit den Substanzen und pCMB für 48h weiter inkubiert. Durch die Vorinkubation mit pCMB sollte eine bestmögliche Hemmung der MCT-Transporter gewährleistet werden. Die Bestimmung der MCT-Aktivität erfolgte mit einer 5 mM Laktatlösung. Um die Diagramme übersichtlicher zu gestalten, wurden die Messwerte wie folgt aufgetragen: Der Basalwert des pH_i (basal) wurde zu Beginn der Messung nach Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignals bestimmt. Durch die maschinelle Zugabe von Laktat konnte sehr schnell die Änderung im Fluoreszenzsignal detektiert werden, diese Werte wurden zur Berechnungen des pH_i nach direkter Laktatzugabe verwendet und sind im Säulendiagramm unter „Laktat“ dargestellt. Um die maximale pH_i-Änderung zu erfassen, wurden die pH_i-Werte zehn Sekunden nach Laktatzugabe (nach 10s Laktat) berechnet. Die pH_i-Werte nach Vorinkubation mit dem MCT-Inhibitor pCMB (pCMB basal, pCMB Laktat, pCMB nach 10s Laktat) wurden auf die gleiche Weise bestimmt.

In der Abb. 4-22 ist der MCT-abhängige Laktattransport anhand der ermittelten pH_i-Werte nach Behandlung der LN18-Zellen mit Teniposid dargestellt. Teniposid wurde ausgewählt, da diese Substanz den pH_i statistisch signifikant senkte (Abb. 4-20). Auch nach Inkubation der Zellen mit Diclofenac und Ibuprofen wurde der MCT-abhängige Laktattransport untersucht. Die mit diesen NSAIDs behandelten Zellen reagierten im Transportversuch entsprechend der DMSO-Kontrolle und sind deshalb nicht grafisch dargestellt.

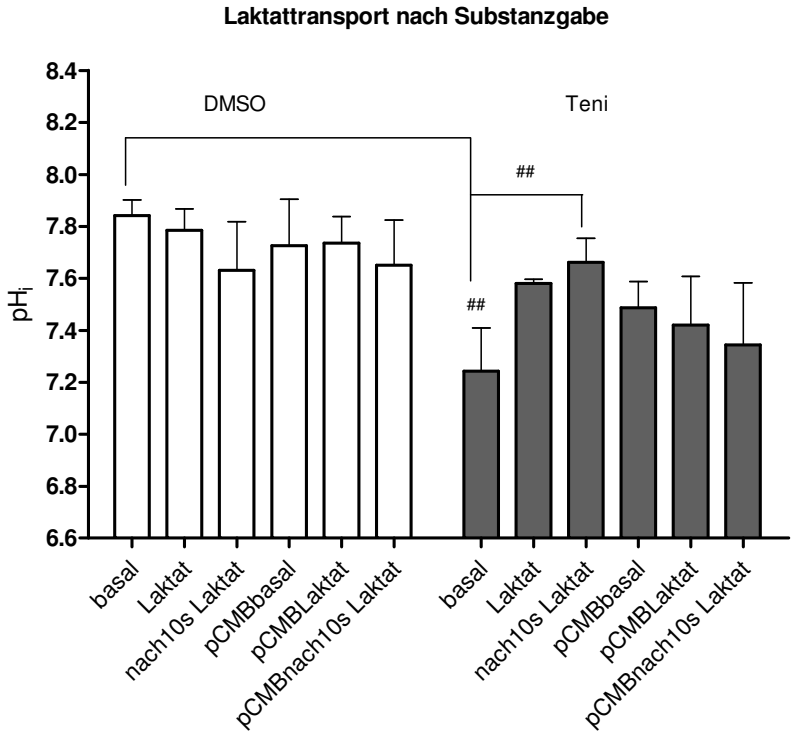


Abb. 4-22 Einfluss ausgewählter Substanzen auf den MCT-abhängigen Laktattransport: Um den Einfluss von Teniposid (Teni, 10 µM) auf den Laktattransport in LN18-Zellen darzustellen, wurde der pH_i unter Basalbedingungen (basal) und pCMB-Zugabe (pCMBbasal) mittels der BCECF-Methode bestimmt. Ebenfalls wurden die pH_i-Werte nach sofortiger Zugabe von 5 mM Laktat (Laktat bzw. pCMBLaktat) und 10s nach Transportbeginn (nach10sLaktat bzw. pCMBnach10sLaktat) ermittelt. Mittelwert+SEM, n=3 bzw. n=2 (Teni nach Laktatgabe), ANOVA mit Post-Hoc-Test Bonferroni: ## $p < 0,01$

Für Teniposid konnte auch mit dieser Messung gezeigt werden, dass es zu einer statistisch signifikanten Verminderung des pH_i (basal: 7,23) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO basal: 7,83) kam. Dieser Effekt war jedoch auch nach Vorinkubation mit dem MCT-Inhibitor pCMB messbar (DMSO: 7,73; Teniposid: 7,49), fiel aber mit einer Differenz von 0,24 pH-Einheiten zwischen dem pH_i der Kontrolle (DMSO) und Teniposid deutlich schwächer aus als ohne Inhibitor (Differenz DMSO und Teniposid pH_i basal: 0,6 pH-Einheiten).

Wie erwartet, sank der pH_i bei der DMSO-Kontrolle nach Laktatzugabe, bezogen auf den Basalwert. Im Gegensatz dazu stieg unter Teniposid der pH_i nach Laktatzugabe von 7,23 auf 7,57 statistisch signifikant an. Die mit Teniposid behandelten Zellen zeigten zudem interessanterweise eine pH_i-Erhöhung von 7,23 (pH_i Teniposid basal) auf 7,49 nach Vorinkubation mit dem MCT-Inhibitor pCMB. Des Weiteren fand unter Teniposid trotz Vorinkubation mit pCMB ein Laktattransport statt, der durch einen pH_i-Abfall nach Laktatzugabe gekennzeichnet war. Der pH_i–Abfall lag in der Größenordnung von 0,16 pH-Einheiten (Differenz zwischen Teni pCMB basal und Teni pCMB 10s nach Laktat).

4.2.3.2.2.2 Beeinflussung der NHE1-Aktivität

Die Aktivität des Transporters NHE1 wurde ebenfalls durch die Messung des pH_i ermittelt (Abschnitt 3.2.5.2.1.). In der Abb. 4-23 ist die NHE1-Aktivitätsmessung bei LN18-Zellen dargestellt. Die Veränderung des pH_i wurde in Abhängigkeit von der zugeführten Propionsäurekonzentration gemessen. Nach Zugabe von 2 mM Propionsäure wurde ein sofortiger Abfall des pH_i erzielt, gefolgt von einer raschen Erholung des pH_i. Bei einer Zugabe von 10 mM Propionsäure sank der pH_i-Wert deutlich stärker ab und stieg erst nach einem längeren Zeitintervall von ca. 30 Sekunden wieder an. Durch 30minütige Vorinkubation der Zellen mit dem NHE1-Inhibitor Cariporid (100 µM) sank der pH_i durch Zugabe von 2 mM Propionsäure ebenfalls ab, erholte sich aber im gemessenen Zeitraum von 60 Sekunden nach Säurezugabe im Gegensatz zur Behandlung ohne den Inhibitor nur geringfügig.

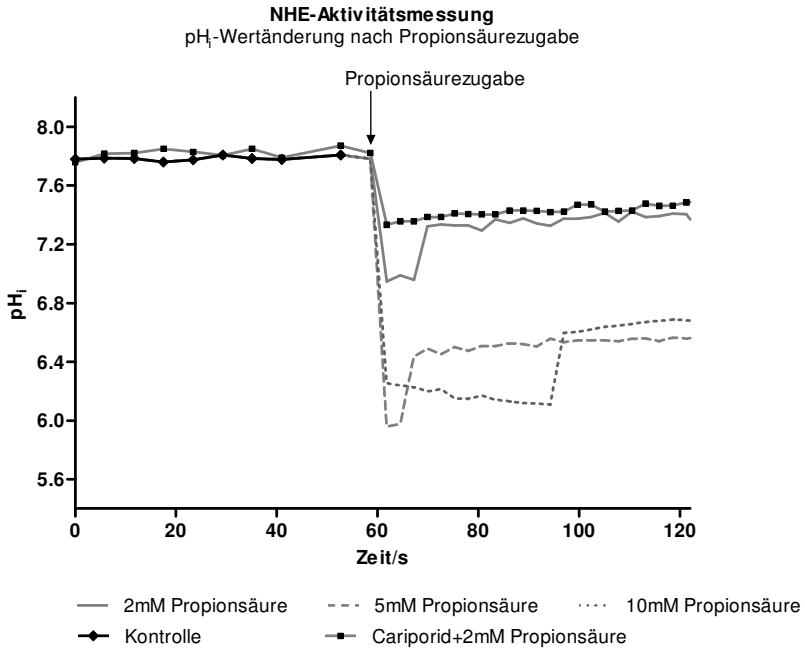


Abb. 4-23 Messung der NHE-Aktivität durch die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes: Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment in LN18-Zellen zur Bestimmung der NHE-Aktivität durch Zugabe von Propionsäure. Abhängig von der zugeführten Propionsäurekonzentration sank der pH_i und stieg aufgrund der NHE-Aktivität mit der Zeit wieder an. Durch 30minütige Vorinkubation mit dem NHE1-Inhibitor Cariporid (100 µM) wurde der Wiederanstieg des pH_i abgeschwächt. Die pH_i-Bestimmung erfolgte durch die BCECF-Methode und linearer Regression anhand der Eichkurve.

Um den Einfluss der NSAIDs und Zytostatika auf die NHE1-Transportaktivität zu untersuchen, wurden die LN18-Zellen für 48h mit den Substanzen behandelt. Um zu prüfen, ob die beobachteten pH_i-Veränderungen nach Substanzgabe durch Beeinflussung der NHE1-Aktivität hervorgerufen werden, wurden zudem LN18-Zellen mit dem NHE1-Inhibitor

Cariporid (100 µM) vorinkubiert und anschließend mit den Substanzen und dem Inhibitor für 48h weiter inkubiert. Durch die Vorinkubation mit Cariporid sollte eine bestmögliche Hemmung des NHE1-Transporters gewährleistet werden. Die Bestimmung der NHE1-Aktivität erfolgte mit 2 mM Propionsäure. Um die Diagramme übersichtlicher zu gestalten, wurden die Messwerte wie folgt aufgetragen: Der Basalwert des pH_i (basal) wurde zu Beginn der Messung nach Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignals bestimmt. Nach Zugabe von 2 mM Propionsäure wurde die Änderung im Fluoreszenzsignal detektiert, diese Werte wurden zur Berechnungen des pH_i nach direkter Propionsäurezugabe verwendet und sind im Säulendiagramm unter „Säure“ dargestellt. Um die Aktivität von NHE1 durch das nachfolgende Ansteigen des pH_i zu erfassen, wurden die pH_i-Werte 90 Sekunden nach Säurezugabe (Säure 90s) berechnet. Die pH_i-Werte nach Vorinkubation mit dem Inhibitor Cariporid (Cari-basal, Cari Säure, Cari Säure 90s) wurden auf die gleiche Weise bestimmt.

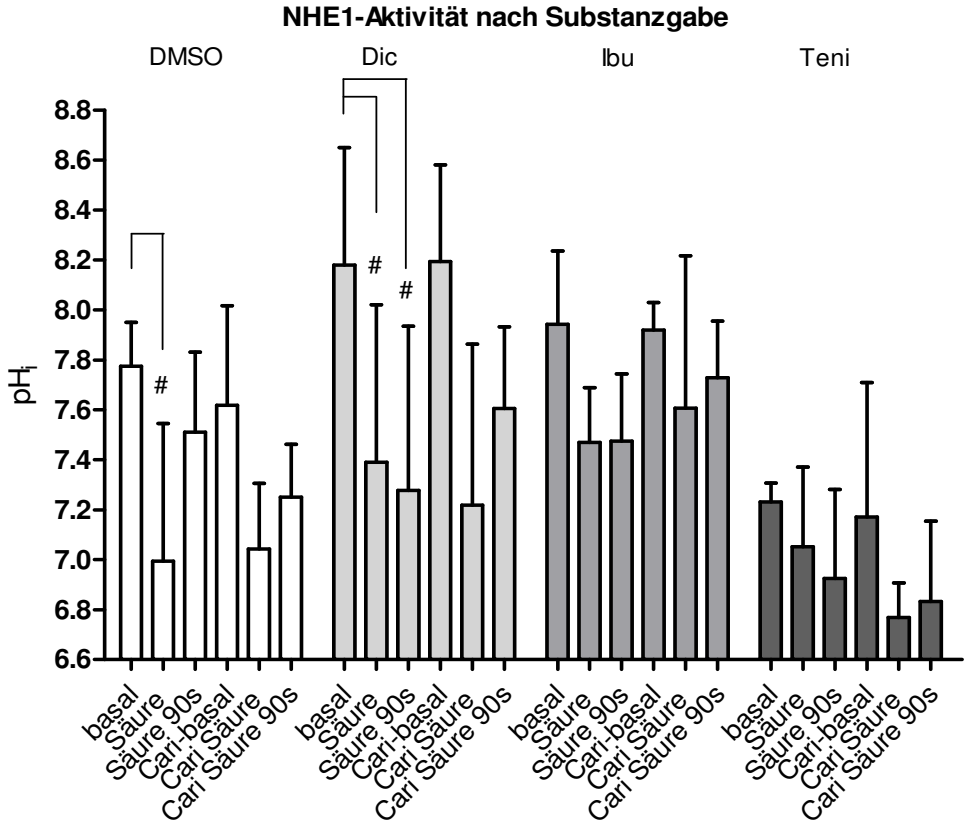


Abb. 4-24 Einfluss ausgewählter Substanzen auf die NHE1-Aktivität: Um den Einfluss von Diclofenac (Dic, 250 µM), Ibuprofen (Ibu, 250 µM) und Teniposid (Teni, 10 µM) auf die NHE1-Aktivität darzustellen, wurde der pH_i unter Basalbedingungen (basal) und Cariporid-Zugabe bestimmt (Cari-basal). Zudem wurden die Werte nach sofortiger Zugabe von 2 mM Propionsäure (Säure, Cari Säure) gemessen, sowie 90s nach Transportbeginn (Säure 90s, Cari Säure 90s). Mittelwerte+SD, n=2 (Dic: Cariporidwirkung), n=3 (DMSO: basal, Säure 90s; Dic, Ibu, Teni), n=4 (DMSO: cari-basal), n=5 (DMSO: Säure, Cari nach Säuregabe) ANOVA mit Post-Hoc-Test Bonferroni: # $p < 0,05$

In der Abb. 4-24 sind die Daten für die NHE-Aktivitätsmessung in LN18-Zellen nach Behandlung mit Diclofenac, Ibuprofen und Teniposid dargestellt. Nach Inkubation der Zellen mit Diclofenac wurde ein Anstieg des pH_i von 7,77 (DMSO) auf 8,18 gemessen, wohingegen Teniposid den pH_i im Vergleich zur Kontrolle DMSO um 0,5 pH-Einheiten senkte. Nach Zugabe von 2 mM Propionsäure fiel der pH_i bei der DMSO-Kontrolle sowie bei Diclofenac statistisch signifikant um jeweils 0,8 pH-Einheiten, ein Abfall des pH_i-Basalwertes nach Zugabe der Propionsäure wurde auch bei Ibuprofen festgestellt (pH_i basal: 7,94, pH_i nach Säurezugabe: 7,47). Bei der DMSO-Kontrolle stieg der pH_i 90 Sekunden nach Propionsäurezugabe durch die NHE1-Transporteraktivität wieder auf einen pH_i von 7,51 im Vergleich zu einem pH_i von 6,99 nach direkter Säurezugabe an. Im Gegensatz dazu sank der pH_i bei den mit Diclofenac inkubierten Zellen auch nach 90 Sekunden weiter auf einen Wert von 7,28 ab. Auch unter Teniposid kam es nach Säurezugabe zu einem stetigen pH_i-Abfall von einem Basalwert von 7,23 auf 7,05 unmittelbar nach Säurezugabe und schließlich auf einen pH_i von 6,92 90 Sekunden nach Gabe von Propionsäure. Unter Ibuprofen war 90 Sekunden nach Propionsäurezugabe weder ein Anstieg des pH_i noch ein weiteres Absinken zu verzeichnen (pH_i 90s nach Säurezugabe: 7,48). Durch die Vorinkubation mit Cariporid wurde der basale pH_i-Wert bei keiner der eingesetzten Substanzen maßgeblich geändert. Nach Zugabe von 2 mM Propionsäure wurde der pH_i der DMSO-Kontrolle von 7,62 (Cari-basal) auf 7,03 (Cari Säure) erniedrigt und stieg nach 90 Sekunden lediglich auf einen pH_i von 7,25 wieder an. Auch unter Ibuprofen und Teniposid war nach Vorinkubation mit Cariporid nur eine geringe Zunahme des pH_i um jeweils 0,11 pH-Einheiten 90 Sekunden nach Propionsäurezugabe zu erkennen, verglichen mit dem pH_i zum Zeitpunkt der Säurezugabe. Nur bei Diclofenac kam es zu einem Wiederanstieg des pH_i trotz Vorinkubation mit dem NHE-Inhibitor Cariporid (Cari Säure: 7,22, Cari Säure 90s: 7,61), was jedoch statistisch nicht signifikant war.

4.2.3.3 Lokalisation von NHE1 in subzellulären Organellen

Bei den Fluoreszenzaufnahmen zum Nachweis von NHE1 und MCT1 in den Zelllinien (Abb. 4-4) zeigten die Färbungen keine charakteristische Membranständigkeit von NHE1, sondern vielmehr eine Expression im gesamten Zytoplasma. Diese Ergebnisse und eine Studie von Javadov *et al.* (*142*) zur Lokalisation von NHE1 in Mitochondrien von Myokardgewebe waren ausschlaggebend für weitere Lokalisationsuntersuchungen in der humanen Glioblastomzelllinie LN18 .Des Weiteren wurde in der Arbeit von Steffan *et al.* 2009 (*88*) eine Translokation von Lysosomen durch Veränderungen im pH_i unter Beteiligung von NHE1 beschrieben. Aus diesen Gründen wurden Immunfluoreszenzfärbungen zur Kolokalisation von NHE1 in Lysosomen und Mitochondrien durchgeführt. Zudem wurde über

Mitochondrienanreicherung mit anschließender Western-Blot-Untersuchung die Expression von NHE1 in Mitochondrien der Glioblastomzelllinie LN18 untersucht.

4.2.3.3.1 Immunfluoreszenzaufnahmen zur NHE1-Lokalisation

In der Abb. 4-25 ist die Lokalisation von NHE1 in verschiedenen humanen Zelllinien dargestellt. Die Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG (Abb. 4-25 A, B) zeigten eine gleichmäßige NHE1-Färbung des Zytoplasmas. In der Zervixkarzinomzelllinie HeLa (Abb. 4-25 C) war zudem eine starke NHE1-Färbung innerhalb des Zellkerns zu erkennen. Bei der embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 war eine Akkumulation der NHE1-Fluoreszenz in Zellkernnähe zu beobachten (Abb. 4-25 D).

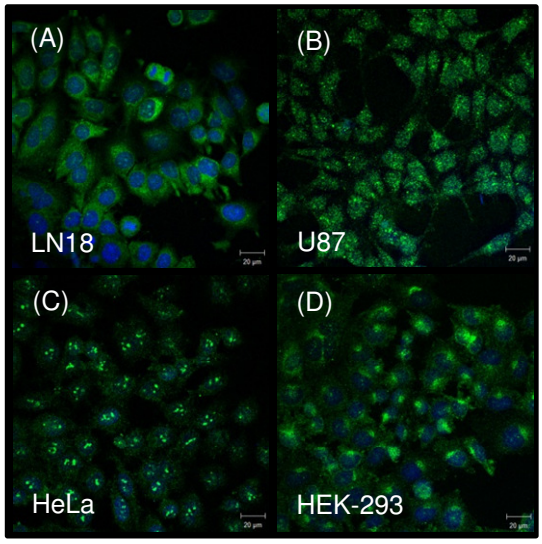


Abb. 4-25 Nachweis von NHE1 in verschiedenen Zelllinien: Humane Tumorzelllinien (A: LN18, B: U87MG, C: HeLa) und eine weitere Zelllinie (D: HEK-293) wurden mit einem NHE1-Antikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte über Alexa-488-markierte Sekundärantikörper (NHE1, grün). Als Kernfarbstoff diente DAPI (blau).

Um eine mögliche Lokalisation von NHE1 in Lysosomen nachzuweisen, wurden LN18-Zellen mit Antikörpern gegen NHE1 und dem Lysosomenmarker LAMP2 inkubiert. In der Abb. 4-26 A sind die Einzelfärbungen von NHE1 (Abb. 4-26 A1, grün) und von LAMP2 (Abb. 4-26 A2, rot) sowie die Überlagerung der Fluoreszenzsignale (Abb. 4-26 A3) dargestellt. Durch die Überlagerung der NHE1- und LAMP2-spezifischen Signale konnte anhand der resultierenden Gelbfärbung eine partielle Kolokalisation von NHE1 und LAMP2 detektiert werden. Dies deutet auf eine Lokalisation von NHE1 in Lysosomen hin.

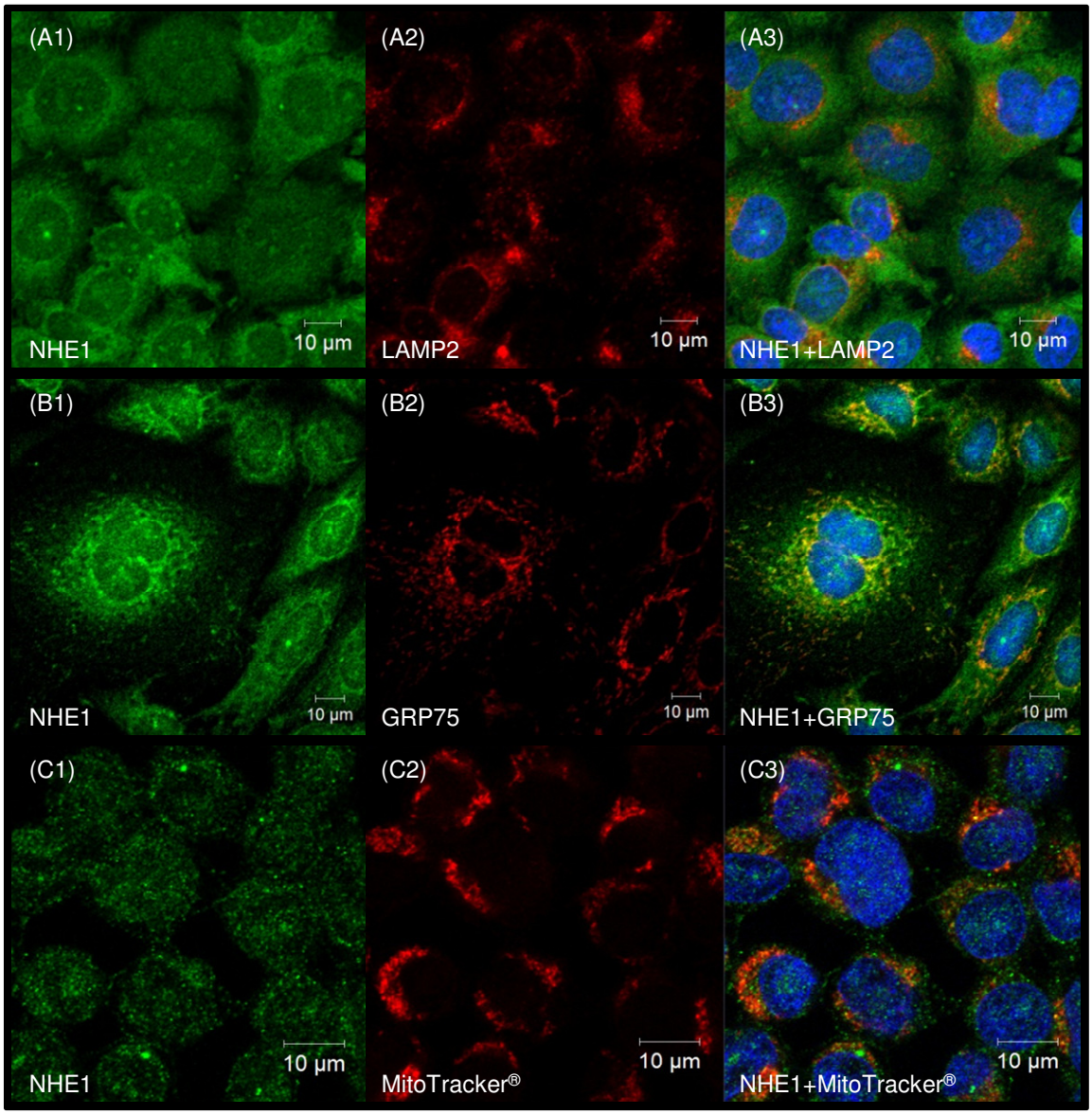


Abb. 4-26 Kolokalisation von NHE1 und dem Lysosomenmarker LAMP2 (A1-A3), NHE1 und dem Mitochondrienmarker GRP75 (B1-B3) sowie NHE1 und dem Mitochondrienfarbstoff MitoTracker® in LN18-Zellen: Zum Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden Alexa-488 (NHE1, grün) und Alexa-568 (LAMP2, GRP75 rot) fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper verwendet. Als Kernfarbstoff diente DAPI (blau). Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale ist in A3, B3 und C3 dargestellt und wird durch die gelb gefärbten Strukturen angezeigt.

Neben Lysosomen sollten auch Mitochondrien als subzelluläre Organellen hinsichtlich ihrer NHE1-Lokalisation untersucht werden. Aus diesem Grund wurden Kofärbungen mit NHE1 und GRP75 bzw. NHE1 und MitoTracker® durchgeführt. GRP75 (*143*) ist in Mitochondrien beschrieben und kann somit als Mitochondrienmarker eingesetzt werden.

In der Abb. 4-26 sind die Einzelfärbungen von NHE1 (Abb. 4-26 B1, C1 grün) und des Mitochondrienmarkers GRP75 (Abb. 4-26 B2, rot) sowie der Mitochondriennachweis mittels MitoTracker® (Abb. 4-26 C2, rot) dargestellt. Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale von

NHE1 mit GRP75 bzw. MitoTracker® (Abb. 4-26 B3 bzw. C3) zeigt die Anfärbung gleicher Strukturen anhand der Gelbfärbung. Eine partielle Kolokalisation von NHE1 und den Mitochondrienmarkern konnte somit nachgewiesen werden, was auf eine Lokalisation von NHE1 in Mitochondrien hindeutet.

4.2.3.3.2 Nachweis von NHE1 in Mitochondrien

Mit Hilfe des *Mitochondria Isolation Kit* der Firma Miltenyi Biotec konnten Mitochondrien aus LN18-Zellen angereichert (Abschnitt 3.2.4.6) und mittels Western Blot untersucht werden. In der Abb. 4-27 sind die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen dargestellt. Durch Verwendung von Antikörpern gegen ANT und GRP75 konnte im Eluat eine Anreicherung von Mitochondrien nachgewiesen werden. Die Proteine ANT (*144*) und GRP75 (*143*) sind in Mitochondrien beschrieben und können somit als Mitochondrienmarker eingesetzt werden. Zur Kontrolle wurde ebenfalls der Durchfluss aufgetragen, hier konnten keine Mitochondrien-spezifischen Banden durch ANT und GRP75 detektiert werden. Die 52 kDa-Isoform von NHE1 konnte im Eluat LN18 A und im Eluat LN18 B nachgewiesen werden, jedoch nicht im Durchfluss. Die 90 kDa große NHE1-Isoform1 konnte weder im Eluat noch im Durchfluss der LN18-Zellen detektiert werden.

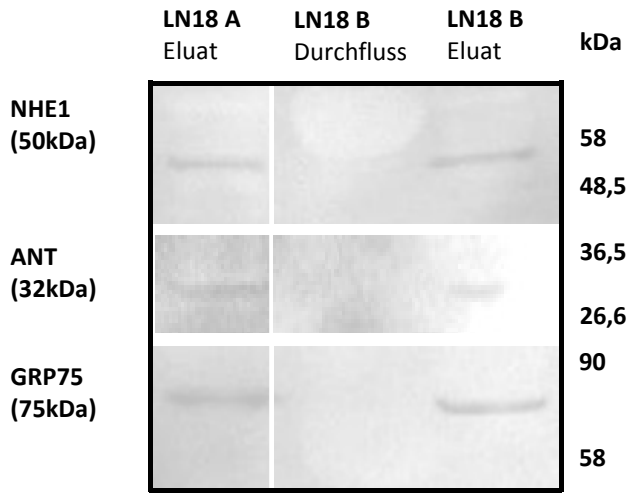


Abb. 4-27 Nachweis von NHE1 in Mitochondrienanreicherungen von LN18-Zellen: In unabhängigen Experimenten an LN18-Zellen wurde eine Mitochondrienanreicherung durch Antikörper-gekoppelte Magnetbeads durchgeführt. Die Mitochondrien sind in den Eluaten angereichert. Der Durchfluss wurde zur Kontrolle aufgefangen und ist beispielhaft für ein Experiment dargestellt. Zum Nachweis der Mitochondrien wurde das Eluat und der Durchfluss (Negativkontrolle) über SDS-Gele aufgetrennt und mittels Antikörpern gegen NHE1, GRP75 und ANT im Western Blot analysiert.

4.2.3.4 Zeitabhängige Veränderung der Transporterlokalisation nach NSAID-Gabe

Durch die zuvor beschriebenen Untersuchungen konnte die Lokalisation von NHE1 in Lysosomen und Mitochondrien gezeigt werden. Auch der Einfluss der NSAIDs Diclofenac, Ibuprofen und Celecoxib auf die Expression pH-regulatorischer Transporter in Glioblastomzellen konnte nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.2.1). In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die NSAIDs eine Veränderung der Transporterlokalisation in den Zellen vermitteln. Eine NSAID-vermittelte Lokalisationsänderung könnte u.a. die Abnahme der NHE1-Aktivität unter Diclofenac erklären (Abb. 4-24), welche nicht mit der erwarteten reduzierten NHE1-Phosphorylierung einher ging (Abb. 4-17). Auch Celecoxib zeigte keinen Einfluss auf die NHE1-Phosphorylierung (Abb. 4-17), verminderte aber tendenziell den pH_i von LN18-Zellen nach 72-stündiger Inkubation (Daten nicht gezeigt).

Um die Immunfluoreszenzaufnahmen der unterschiedlichen Zeitpunkte miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen nach der Inkubationsperiode fixiert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden anschließend zeitgleich unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die verändert wirkende Zellmorphologie in den Abb. 4-28, Abb. 4-29 und Abb. 4-30 wird durch die unterschiedliche Transporterlokalisation und durch die Kofärbung mit LAMP2 bzw. GRP75 begünstigt.

In der Abb. 4-28 ist die Kofärbung von NHE1 und LAMP2 in LN18-Zellen dargestellt. Die Zellen wiesen keine eindeutige membranständige, sondern eine über das gesamte Zytoplasma verteilte NHE1-Färbung (grün) auf. Nach 48h wurde sowohl bei der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abb. 4-28 A1-3) als auch bei den Substanzen Diclofenac (Abb. 4-28 B1-3) und Ibuprofen (Abb. 4-28 C1-3) eine Abnahme der Fluoreszenzintensität für NHE1 detektiert. Dieser Effekt trat bei Celecoxib (Abb. 4-28 D1-3) nicht auf, interessanterweise veränderte sich hier die Verteilung der NHE1-spezifischen Färbung. Während nach 12- und 24-stündiger Inkubation eine großflächige zytoplasmatische Färbung erkennbar war (Abb. 4-28 D1, D2), zeigte sich nach 48h eine erhöhte Fluoreszenzintensität in der Kern-Peripherie (Abb. 4-28 D3). Durch die Kofärbung der Zellen mit NHE1 (grün) und LAMP2 (rot) war eine partielle Kolokalisation anhand der Überlagerung der Fluoreszenzsignale und der damit verbundenen gelben Färbung zu erkennen. Des Weiteren traten unter Behandlung mit Ibuprofen und Celecoxib zusätzlich Veränderungen in der LAMP2-Färbung auf. Nach 48stündiger Inkubation mit Ibuprofen zeigte sich ein verstärktes Vorkommen der Lysosomen in der Zellperipherie (Abb. 4-28 C3), ein gegenteiliger Effekt war nach Celecoxibgabe zu sehen. Hier kam es nach 48h zu einer Akkumulation der Lysosomen in direkter Kernnähe (Abb. 4-28 D3), welche von NHE1-spezifischen Signalen umgeben waren.

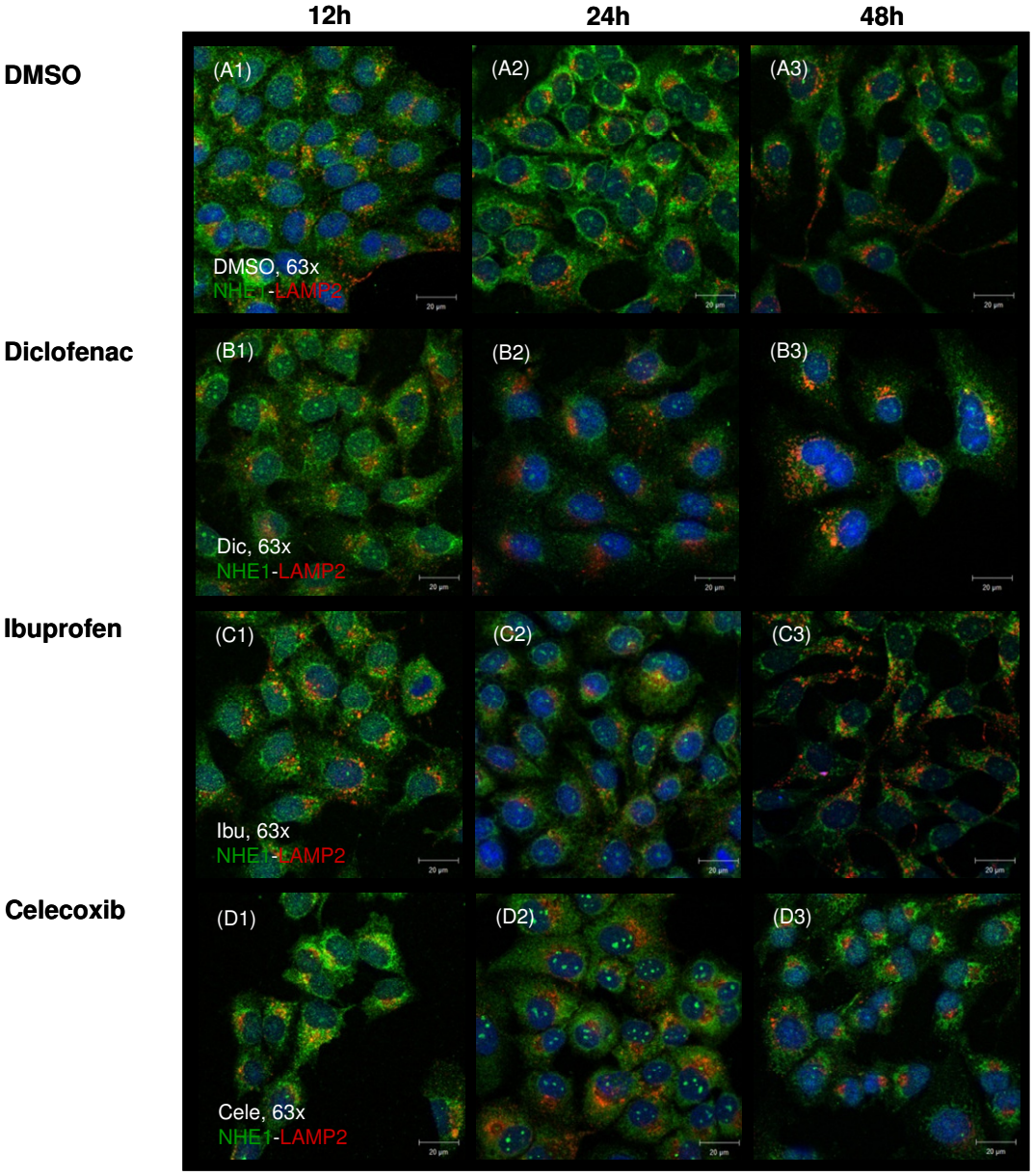


Abb. 4-28 Substanz- und zeitabhängige Lokalisation von NHE1 und LAMP2: LN18-Zellen wurden für 12h, 24h und 48h mit (A) DMSO, (B) Diclofenac (250 µM), (C) Ibuprofen (250 µM) und (D) Celecoxib (50 µM) inkubiert und im Anschluss mit Ethanol fixiert. Zum Nachweis von NHE1 und LAMP2 mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden Alexa-488 (NHE1, grün) und Alexa-568 (LAMP2, rot) fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper verwendet. Als Kernfarbstoff diente DAPI (blau).

In der Arbeit von Hussien et al. (*145*) konnte in Mammakarzinomzellen eine Lokalisation von MCT2 und MCT4 in Mitochondrien nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob diese Lokalisation von MCTs auch in Glioblastomzellen vorliegt, wurden Kofärbungen von LN18-Zellen mit MCT4 und dem Mitochondrienmarker GRP75 durchgeführt. Des Weiteren wurden die Zellen mit den NSAIDs Diclofenac, Ibuprofen und Celecoxib inkubiert, um einen möglichen Einfluss der Substanzen auf die MCT4-Lokalisation zu untersuchen. In Abb. 4-29 sind die Immunfluoreszenzfärbungen dargestellt. Durch die Kofärbung der Zellen mit MCT4

(grün) und GRP75 (rot) war eine partielle Kolokalisation anhand der Überlagerung der Fluoreszenzsignale und der damit verbundenen gelben Färbung zu erkennen. Die Fluoreszenzfärbung von MCT4 zeigte eine ausgeprägte zytoplasmatische Verteilung des Proteins. Eine Veränderung der MCT4-Lokalisation in Folge der NSAID-Gabe war nicht festzustellen. Nach 48stündiger Inkubation mit Celecoxib konnte eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität für GRP75 (Abb. 4-29 D3) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.

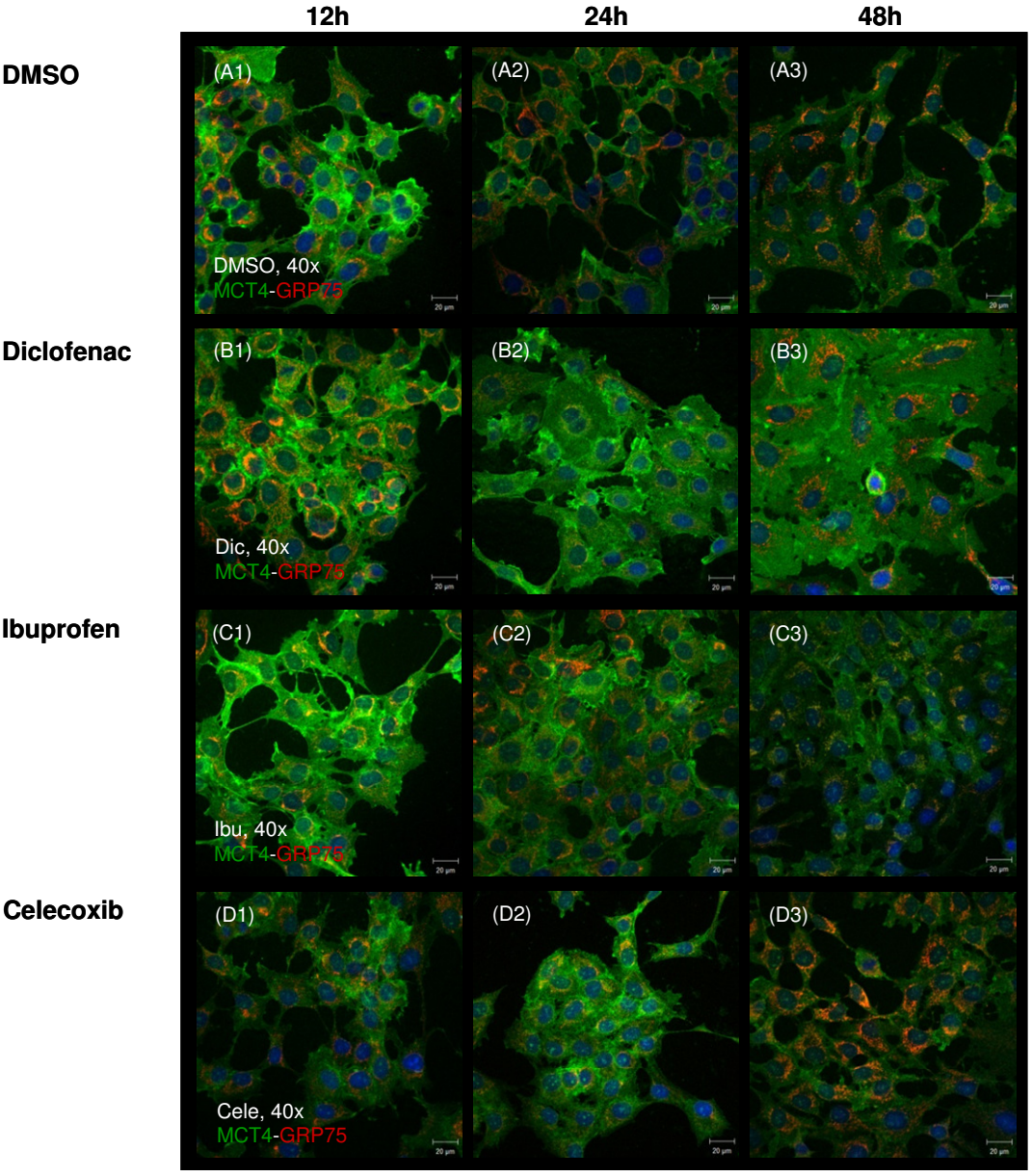


Abb. 4-29 Substanz- und zeitabhängige Lokalisation von MCT4 und GRP75: LN18-Zellen wurden für 12h, 24h und 48h mit (A) DMSO, (B) Diclofenac (250 µM), (C) Ibuprofen (250 µM) und (D) Celecoxib (50 µM) inkubiert. Zum Nachweis von MCT4 und GRP75 mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden Alexa-488 (MCT4, grün) und Alexa-568 (GRP75, rot) -markierte Sekundärantikörper verwendet. Als Kernfarbstoff diente DAPI (blau).

In der Abb. 4-30 ist die Immunfluoreszenzfärbung von MCT1 nach Behandlung von LN18-Zellen mit den NSAIDs Diclofenac, Ibuprofen und Celecoxib dargestellt. Eine NSAID-bedingte Veränderung der membranständigen MCT1-Lokalisation war nicht zu erkennen, jedoch nahm vor allem nach 24stündiger Behandlung der Zellen mit Diclofenac (Abb. 4-30 B2) die Fluoreszenzintensität der Membranfärbung im Vergleich zur Kontrolle zu (Abb. 4-30 A1-3). Dieser Effekt war nach 48h auch unter Ibuprofenbehandlung (Abb. 4-30 C3) erkennbar. Im Gegensatz dazu, konnte eine Abnahme der MCT1-Fluoreszenzintensität bei Celecoxib (Abb. 4-30 D2, D3) nach 24h und 48h festgestellt werden.

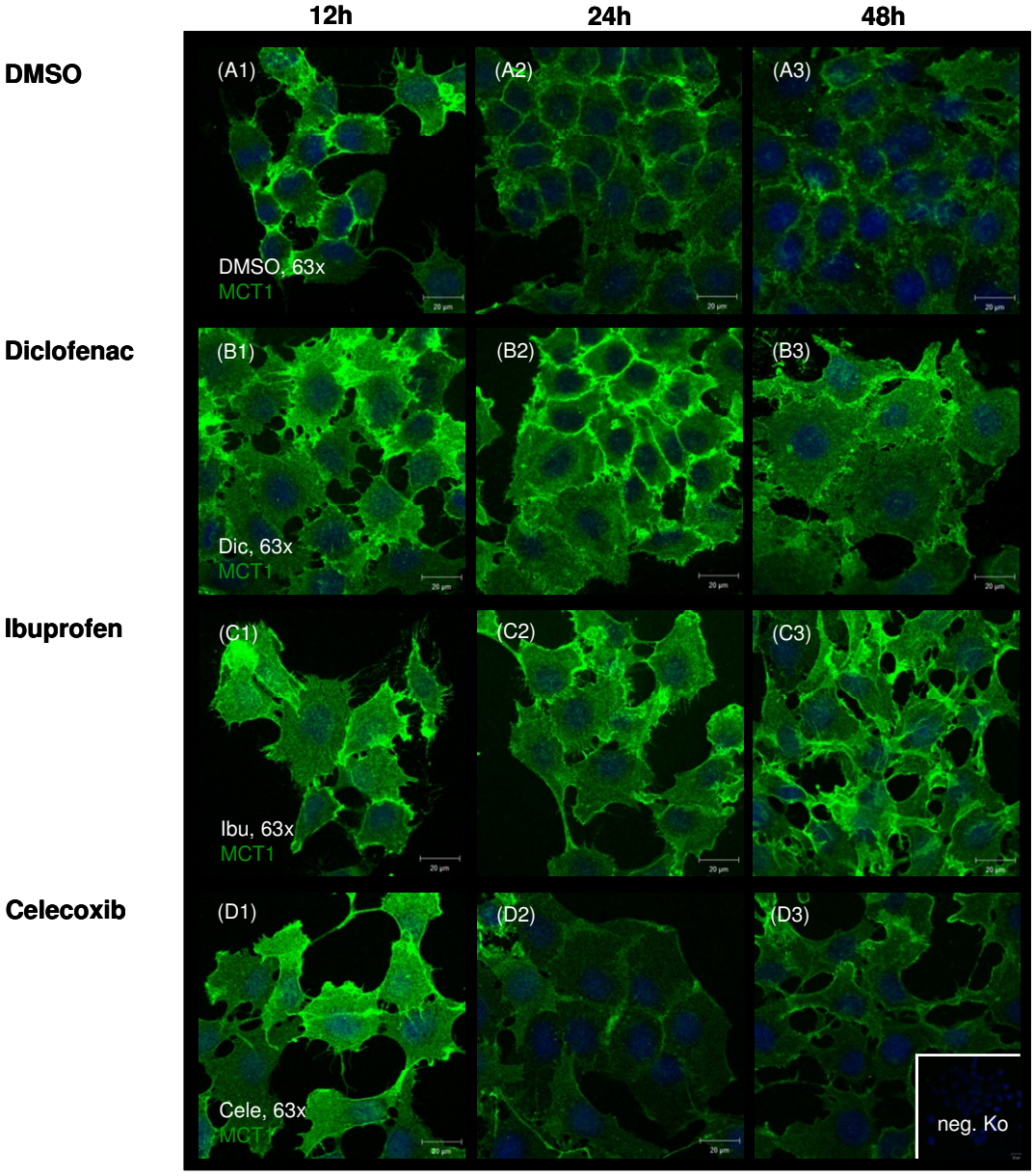


Abb. 4-30 Substanz- und zeitabhängige Lokalisation von MCT1: LN18-Zellen wurden für 12h, 24h und 48h mit (A) DMSO, (B) Diclofenac (250 µM), (C) Ibuprofen (250 µM) und (D) Celecoxib (50 µM) inkubiert. Zum Nachweis von MCT1 mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde ein Alexa-488-markierte Sekundärantikörper (grün) verwendet. Als Kernfarbstoff diente DAPI (blau).

Durch mitgeführte Negativkontrollen (Abb. 4-30 D3), die ausschließlich mit den Sekundärantikörpern inkubierte LN18-Zellen umfassten, konnten falsch-positive Signale durch unspezifische Bindungen der sekundären Antikörper an Zellbestandteile ausgeschlossen werden.

4.2.4 Generierung überexprimierender Zellen

In den Patientenproben wurde eine erhöhte Expression von MCT1 im Glioblastomgewebe gezeigt (Abschnitt 4.1.1). Zusätzlich konnten in den vorangegangenen Untersuchungen an LN18-Zellen eine Regulation der Expression und Funktion von pH-regulatorischen Transportern sowie Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes durch Zytostatika und NSAIDs gezeigt werden. Um die Bedeutung von MCT1 in einem Glioblastom-Zellmodell detailliert untersuchen zu können, wurden LN18-Zellen generiert, welche den Transporter MCT1 überexprimierten, und mit der Parentalzelllinie LN18 verglichen. Die genaue Vorgehensweise der Klonierung und Transfektion ist in Abschnitt 3.2.3 erläutert.

4.2.4.1 Identifizierung und Charakterisierung überexprimierender Klone

Nachdem die LN18-Zellen mit den entsprechenden Vektoren transfiziert wurden, erfolgte die Selektion resistenter Zellen mit Hygromycin B (siehe Abschnitt 3.2.3.8 und 3.2.3.9). Zur Identifizierung derjenigen Zellklone mit der höchsten Transporterexpression wurden die Zellen zusätzlich für 24h mit Butyrat (500 mM) inkubiert. Durch Butyrat kann die Expression der integrierten Plasmidgene begünstigt werden, indem die zelleigene DNA-Synthese durch Interaktion mit Histondeacetylasen gehemmt wird. Nach 24 Stunden Inkubation mit Butyrat wurde von den Zellen das Gesamtprotein isoliert und für die Western-Blot-Analyse verwendet. In der Abb. 4-31 ist ein repräsentativer Blot sowie die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung gezeigt. Die Zellklone sieben und acht wiesen eine um das 7,5fache (Klon 7) bzw. 9fache (Klon 8) erhöhte Proteinexpression von MCT1 im Vergleich zur mittleren MCT1-Expression der Kontrolltransfektanten auf.

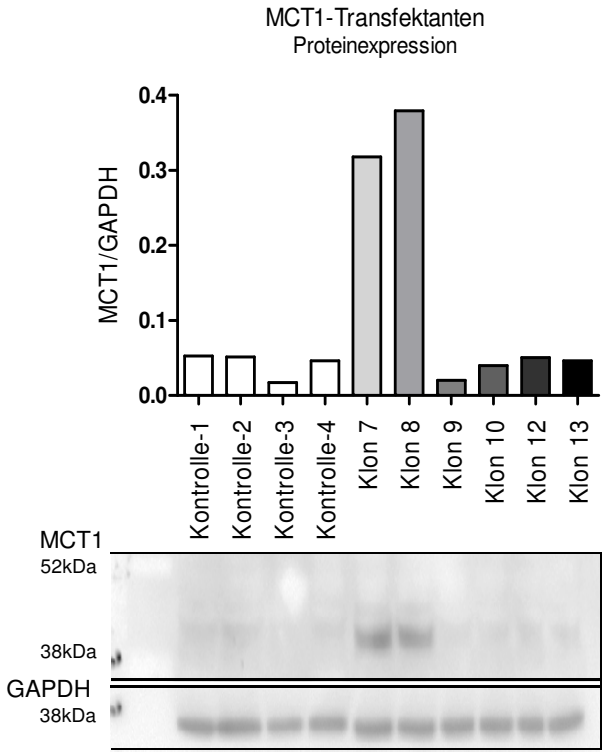


Abb. 4-31 Identifizierung MCT1-überexprimierender LN18-Zellen: Zur Identifizierung überexprimierender Klone wurden die transfizierten LN18-Zellen 24h mit 500 mM Butyrat stimuliert. Mit dem isolierten Gesamtprotein wurde ein Western-Blot durchgeführt und dieser densitometrisch ausgewertet. Die Expression von MCT1 wurde auf GAPDH normalisiert. Eine deutliche Überexpression im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten ist bei Klon 7 und Klon 8 zu erkennen.

Zur Bestimmung der Transporteraktivität wurden die MCT1-Transfektanten mit 5 mM Laktat inkubiert und die Veränderung der BCECF-Fluoreszenz bestimmt. In der Abb. 4-32 wurde der Fluoreszenzquotient 490/440nm gegen die Zeit aufgetragen. Dadurch konnte der Laktattransport der MCT1-Transfektanten mit dem Laktattransport von zwei Kontrolltransfektanten verglichen werden. Je niedriger der Fluoreszenzquotient war, umso mehr Laktat wurde durch die Aktivität von MCT1 transportiert, verbunden mit einem Abfall des pH_i. Die Transportuntersuchungen zeigten, dass die im Western Blot ausgewählten Klone sieben und acht im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten vermehrt Laktat transportierten. Da bei Klon acht im Western Blot eine stärkere Expression detektiert wurde als bei Klon sieben, wurden alle weiteren Versuche mit MCT1-überexprimierenden Zellen an Klon acht durchgeführt.

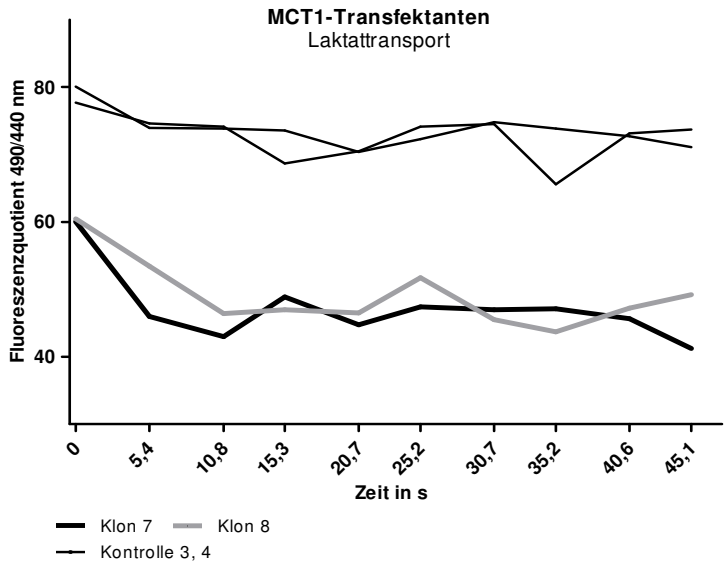


Abb. 4-32 Identifizierung MCT1 überexprimierender LN18-Zellen anhand ihres Laktattransports: Die Diagramme zeigen den Laktattransport ausgewählter Transfektanten im Vergleich zu Kontrolltransfektanten. Nach Zugabe von 5mM Laktat (erfolgte zum Zeitpunkt von 0s) wurde der Transport über die Änderung des BCECF-Fluoreszenzquotienten bestimmt. n=2

Durch indirekte Immunfluoreszenz (Abb. 4-33) konnte die Überexpression von MCT1 in dem ausgewählten Klon acht (Abb. 4-33 B) durch die intensive Fluoreszenzfärbung verglichen mit der Färbung des Kontrolltransfektanten (Abb. 4-33 A) ergänzend zu den Western-Blot-Analysen und Transportversuchen bestätigt werden. Der MCT1-überexprimierende Klon 8 (LN18-MCT1) wurde für alle anschließenden Untersuchungen verwendet.

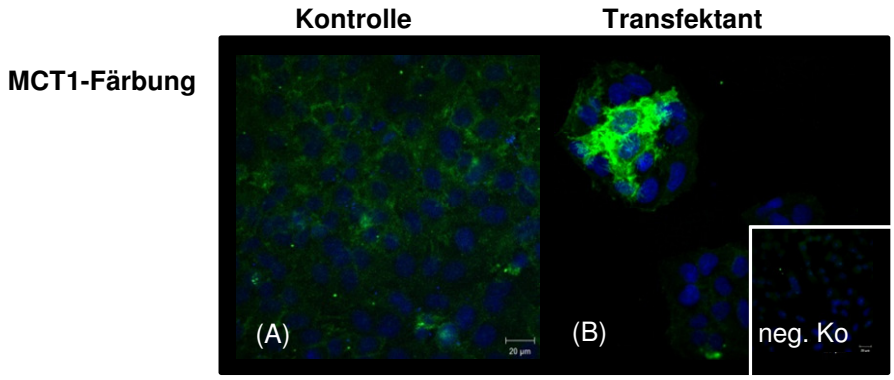


Abb. 4-33 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis MCT1-überexprimierender Zellen: In der Abbildung werden Färbungen der Kontrolltransfektanten (A) und der ausgewählten überexprimierenden Zellen (B) verglichen. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen MCT1 sowie mit einem Alexa-488-markierten Sekundärantikörper (grün). Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Die Negativkontrolle (neg. Ko) wurde alleinig mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

In den Immunfluoreszenzfärbungen von LN18-MCT1 war aufgefallen, dass diese überexprimierenden Zellen trotz hoher Konfluenz zu einer Inselbildung tendierten und keinen geschlossenen Zellrasen ausbildeten wie die Kontrollen. Durch Hämatoxylin-Eosin-Färbungen konnte dieses Wachstumsverhalten (Abb. 4-34) bestätigt werden, zudem wurde eine veränderte Morphologie der LN18-MCT1-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen sichtbar. Die Inselbildung (Abb. 4-35 B) sowie die langgestrecktere Form der LN18-MCT1-Zellen waren mikroskopisch deutlich zu erkennen.

(A) Kontrollen (B) LN18-MCT1

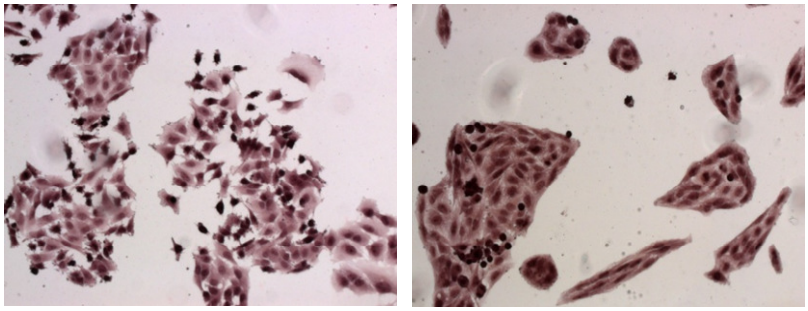


Abb. 4-36 Morphologische Unterschiede der überexprimierenden LN18-Zellen: Das Wachstumsverhalten und die Morphologie der überexprimierenden Zellen unterscheiden sich deutlich. In den Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der fixierten Zellen ist die Inselbildung der LN18-MCT1-Zellen in Abb. (B) erkennbar. Zudem zeigen die Abbildungen die langgestreckte Form der LN18-MCT1-Zellen im Vergleich zum kontroll-transfizierten Klon in Abb. (A).

Nachdem morphologische Unterschiede bei den überexprimierenden Zellen erkennbar waren, sollte das Wachstumsverhalten und das Ansprechen dieser Zellen auf Zytostatika sowie auf NSAIDs mittels Zellviabilitäts-Analysen untersucht werden. Für die Wachstumskinetik der Kontrollzellen sowie der LN18-MCT1-Zellen wurde die Viabilität nach 24h, 48h, 72h und 96h bestimmt (Abb. 4-37). Um die überexprimierenden Zellen vergleichen zu können, wurden die Viabilitätswerte auf die Messdaten der Kontrollzellen normalisiert. Es zeigte sich, dass die Zellviabilität der überexprimierenden Zellen in den ersten 48h geringer war als die Viabilität der Kontrollzellen. Nach 96h erreichten die MCT1-überexprimierenden Zellen eine ähnliche Zellviabilität wie die Kontrolle.

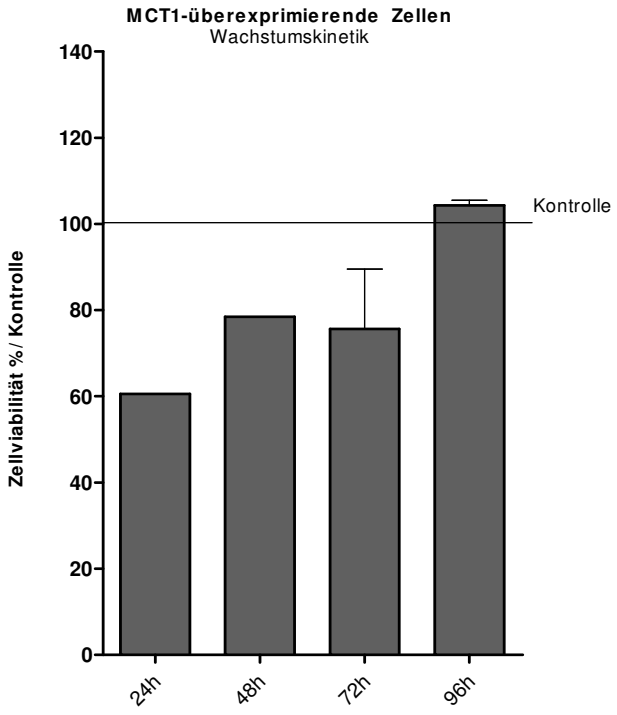


Abb. 4-37 Vergleich der Zellviabilität der MCT1-überexprimierenden LN18-Zellen: Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mittels des Resazurin-Assay 24h, 48h, 72h und 96h nach Aussaat der transfizierten Zellen. Mittelwert+SD, n=1 (24h, 48h MCT1), n=2 (96h MCT1), n=3 (Kontrolle, 72h MCT1)

Die Bestimmung der Zellviabilität unter Einfluss der Substanzen erfolgte 48h und 72h nach Zytostatika- bzw. NSAID-Gabe. Die Viabilität der überexprimierenden Zellen wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen weder durch Zytostatika (Abb. 4-38) noch durch NSAIDs (Abb. 4-39) beeinflusst. Die Substanzen Teniposid, Vincristin, Diclofenac, Indomethacin und Celecoxib verringerten die Viabilität von LN18-MCT1- und Kontrollzellen in gleichem Maße. Ibuprofen führte bei allen untersuchten Zellen zu einer gleichwertigen Steigerung der Zellviabilität.

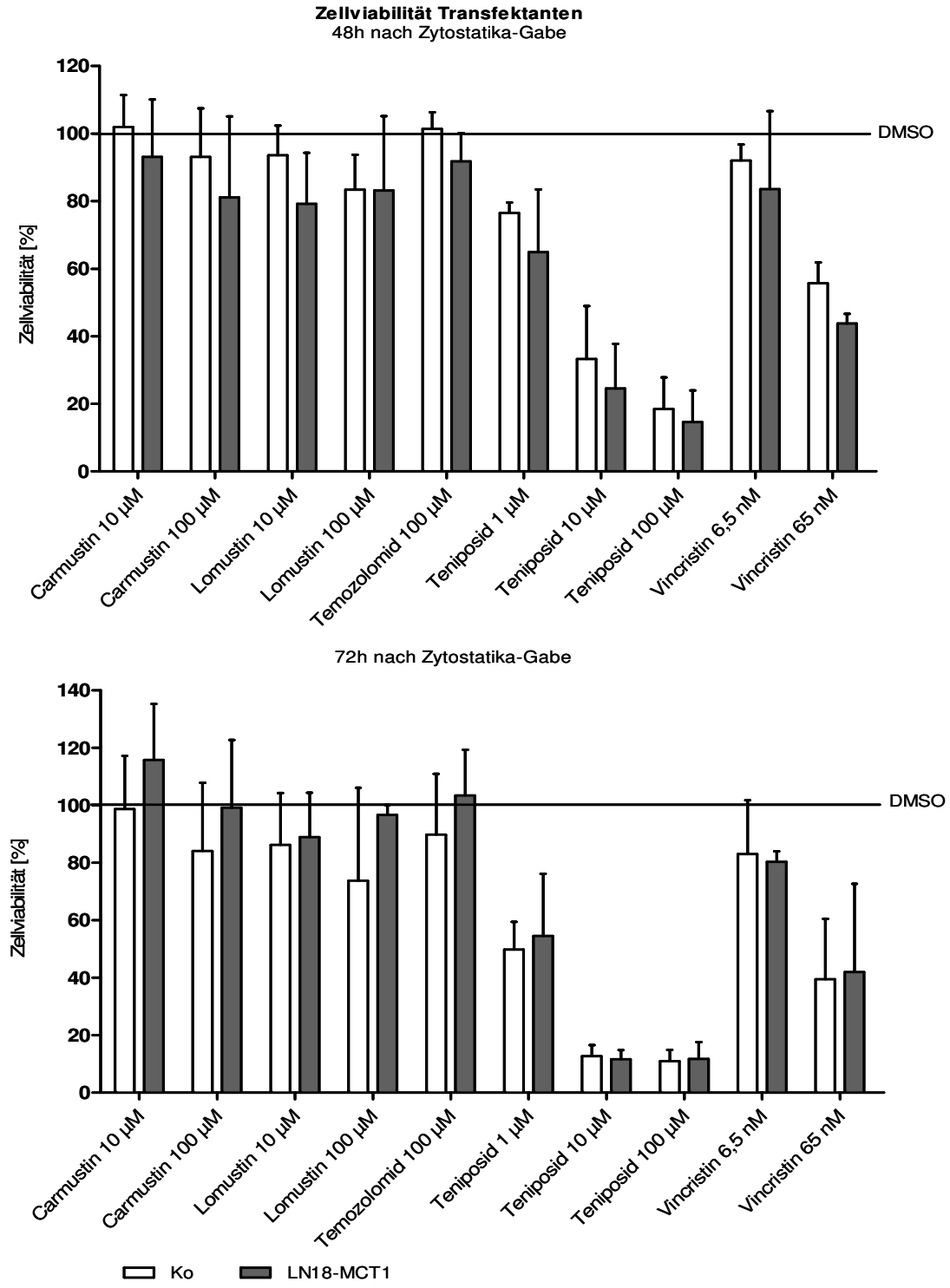


Abb. 4-38 Einfluss ausgewählter Zytostatika auf die Zellviabilität der LN18-MCT1-Zellen: Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen mit den Zytostatika Carmustin (10, 100 µM), Lomustin (10, 100 µM), Temozolomid (10, 100 µM), Teniposid (1, 10, 100 µM) und Vincristin (6,5; 65 nM) sowie der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Nach 48 (A) bzw. 72 (B) Stunden wurde die Zellviabilität mittels Resazurin-Assay bestimmt. Mittelwerte+SD, n=3, Ko: Kontrolltransfektant

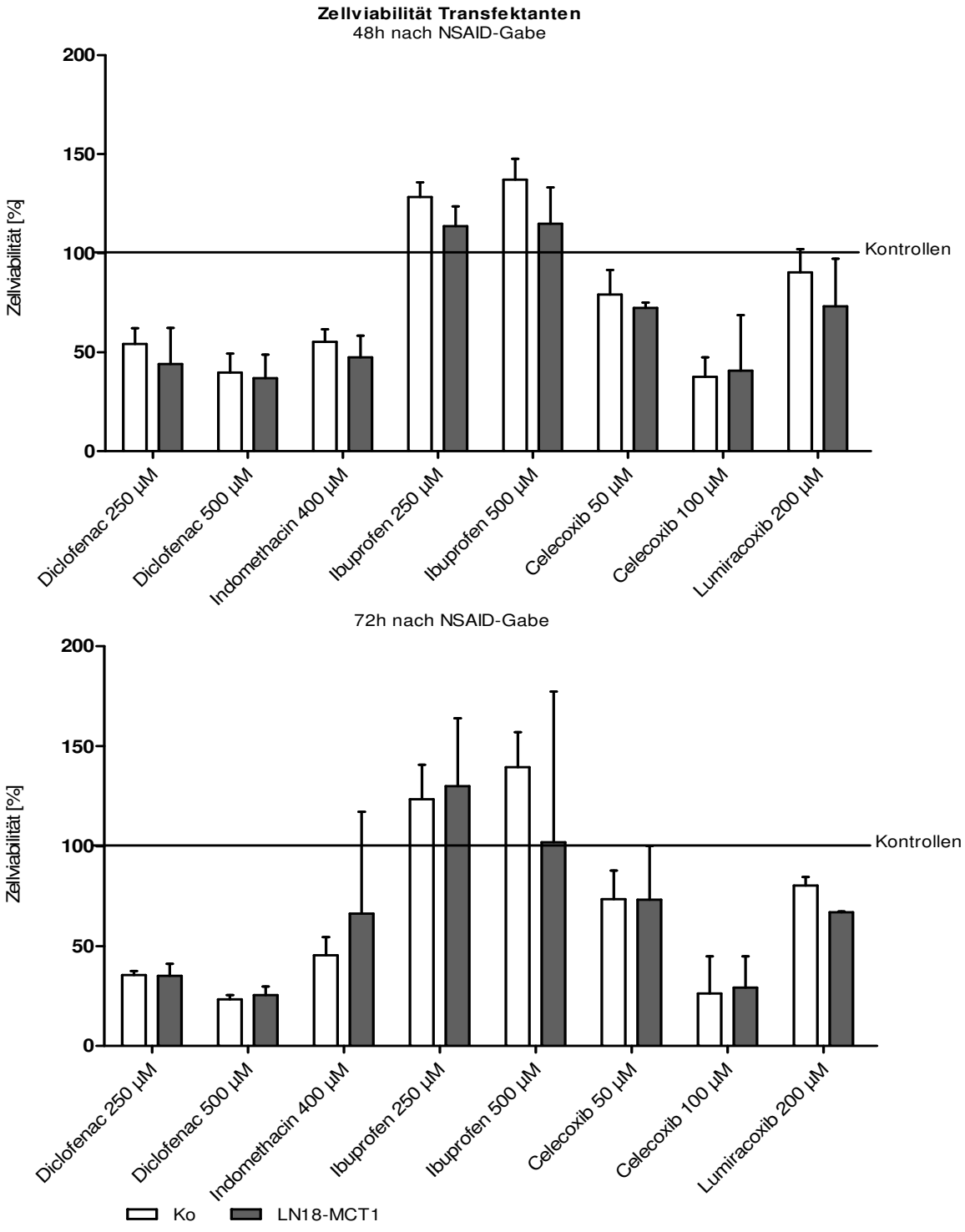


Abb. 4-39 Einfluss ausgewählter NSAIDs auf die Zellviabilität der LN18-MCT1-Zellen: Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden die LN18-Zellen mit den NSAIDs Diclofenac (250, 500 µM), Indomethacin (400 µM), Ibuprofen (250, 500 µM), Celecoxib (50, 100 µM) und Lumiracoxib (200 µM) sowie den Lösungsmittelkontrollen DMSO und A. dest (Ibuprofenkontrolle) inkubiert. Nach 48 (A) bzw. 72 (B) Stunden wurde die Zellviabilität mittels Resazurin-Assay bestimmt. Mittelwerte+SD, n=3, Ko: Kontrolltransfektant

4.2.4.2 Einfluss ausgewählter Substanzen auf den pH_i und die Aktivität der MCT1-überexprimierenden Zellen

Die Kontrollzellen und die LN18-MCT1-Zellen wurden mit Diclofenac (250 µM), Ibuprofen (250 µM) und Teniposid (10 µM) für 48h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung des pH_i (Abb. 4-40) um Rückschlüsse auf die Aktivität der pH-regulatorischen Transporter in den Zellen ziehen zu können. Der basale pH_i der Kontrollzellen (Parentalzelllinie LN18) und der MCT1-überexprimierenden Zellen unterschied sich nicht (pH_i im Mittel 7,8).

Wie auch die Parentalzelllinie LN18 zeigten die Zellen LN18-MCT1 eine pH_i-Zunahme unter Diclofenac (Abb. 4-40) und eine starke Abnahme des pH_i nach Teniposid-Gabe.

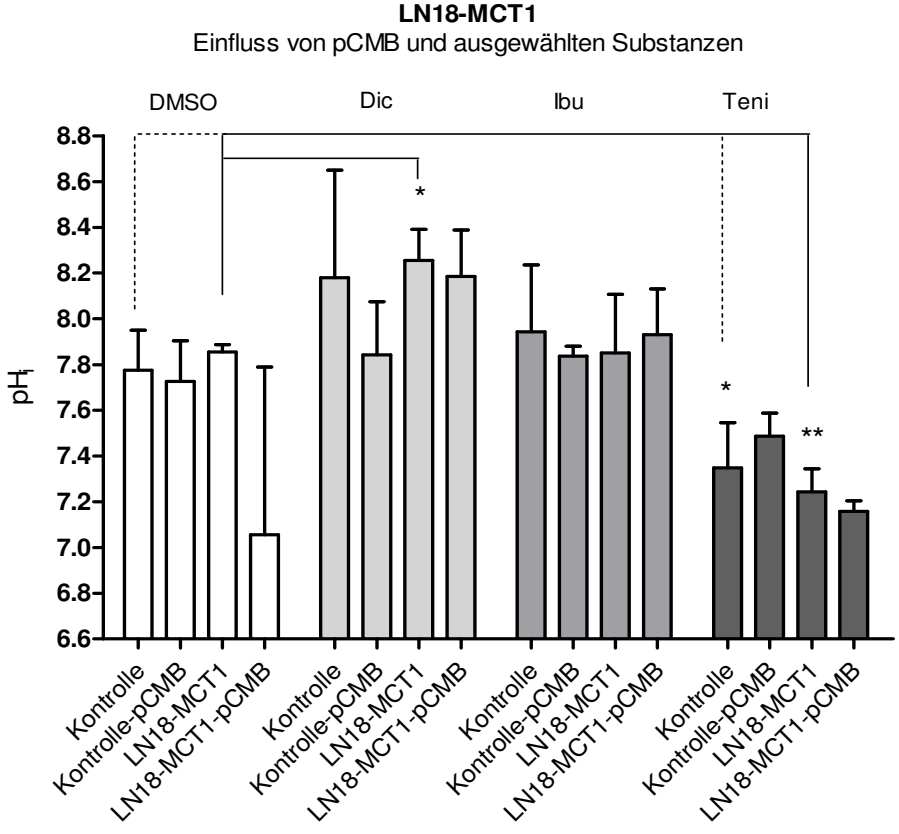


Abb. 4-40 Vergleich des pH_i der LN18-MCT1-Zellen nach Substanzgabe: Dargestellt sind die mittleren pH_i-Werte der Kontrollzellen (Kontrolle) und der MCT1-überexprimierenden Zellen (LN18-MCT1) 48h nach Gabe von Diclofenac (Dic, 250 µM), Ibuprofen (Ibu, 250 µM) und Teniposid (Teni, 10 µM) sowie der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Vergleichend sind die pH_i-Werte nach Vorinkubation mit dem MCT-Inhibitor pCMB (100 µM) in Kombination mit DMSO, Diclofenac, Ibuprofen oder Teniposid abgebildet. Die pH_i-Messung erfolgte durch die BCECF-Methode in Triplikaten. Mittelwerte+SD, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ungepaarter t-Test, n= mindestens 2)

Der pH_i-Abfall unter Teniposid von 7,83 (DMSO) auf 7,46 fiel bei den LN18-MCT1-Zellen mit 0,61 pH-Einheiten verglichen mit den Kontrollzellen (Abb. 4-40) etwas stärker aus

Des Weiteren erhöhte Diclofenac den pH_i der LN18-MCT1-Zellen statistisch signifikant um 0,4 pH-Einheiten im Vergleich zu dem Wert der DMSO-behandelten LN18-MCT1-Zellen. Durch die pCMB-Inkubation sank der basale pH_i der LN18-MCT1-Zellen (Abb. 4-40) im Vergleich zu den Kontrollzellen von einem mittleren pH_i von 7,86 auf 7,06. Die Behandlungen der LN18-MCT1-Zellen mit Diclofenac bzw. Ibuprofen und dem MCT-Inhibitor pCMB führten zu einem Anstieg des mittleren pH_i um ca. eine pH-Einheit im Vergleich zu den DMSO-behandelten LN18-MCT1-Zellen. Nach kombinierter Inkubation mit Teniposid und pCMB zeigten die LN18-MCT1-Zellen eine zusätzliche Verringerung des pH_i auf einen Wert von 7,16 verglichen mit der alleinigen Gabe von Teniposid (pH 7,46). Bei den Kontrollzellen trat kein zusätzlicher pH_i–Abfall nach Vorinkubation mit pCMB bei der Teniposidbehandlung auf.

4.2.4.2.1 Bestimmung der MCT-Aktivität der MCT1-überexprimierenden Zellen nach Substanzgabe

Die MCT1-Aktivität in den LN18-MCT1-Zellen nach Inkubation mit ausgewählten Substanzen wurde durch Zugabe von 5 mM Laktat und anschließender Messung des pH_i mittels der BCECF-Methode bestimmt. Die Zellen wurden für 48h mit den Substanzen Diclofenac (250 µM), Ibuprofen (250 µM) und Teniposid (10 µM) inkubiert, bei zusätzlicher Behandlung mit dem MCT-Inhibitor pCMB (100 µM) erfolgte eine Vorinkubation von 30 Minuten. Die Effekte von Diclofenac und Ibuprofen auf den Laktattransport der LN18-MCT1-Zellen entsprachen denjenigen der Parentalzelllinie (siehe Abschnitt 4.2.3.2.2.1) und sind deshalb grafisch nicht dargestellt. In Abb. 4-41 ist der Laktattransport der LN18-MCT1-Zellen nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO bzw. mit Teniposid vergleichend dargestellt. Die LN18-MCT1-Zellen wiesen unter Kontrollbedingungen (DMSO) einen verstärkten Laktattransport im Vergleich zur Parentalzelllinie (Abb. 4-22) auf, der sich in einem statistisch signifikanten Abfall des pH_i von 7,86 (basal) auf 7,62 (nach direkter Laktatzugabe) und schließlich auf 7,56 (10s nach Laktatzugabe) zeigte. Die Inkubation mit pCMB führte tendenziell zu einem Abfall des pH_i. Nach Inkubation mit Teniposid trat bei den LN18-MCT1-Zellen, wie bei der Parentalzelllinie (Abb. 4-22), ein Anstieg des pH_i nach Laktatzugabe auf. Dieser Effekt war jedoch nicht mehr statistisch signifikant ($p = 0,053$) und die Laktat-induzierte pH_i-Erhöhung fiel um 0,2 pH-Einheiten geringer aus als bei der Parentalzelllinie. Bei kombinierter Gabe von Teniposid und pCMB war ebenfalls ein Anstieg des pH_i nach Laktatzugabe messbar. Dieser signifikante Effekt ($p < 0,05$) war in der Parentalzelllinie nicht zu verzeichnen, hier nahm der pH_i bei pCMB-Inkubation und Laktatzugabe ab.

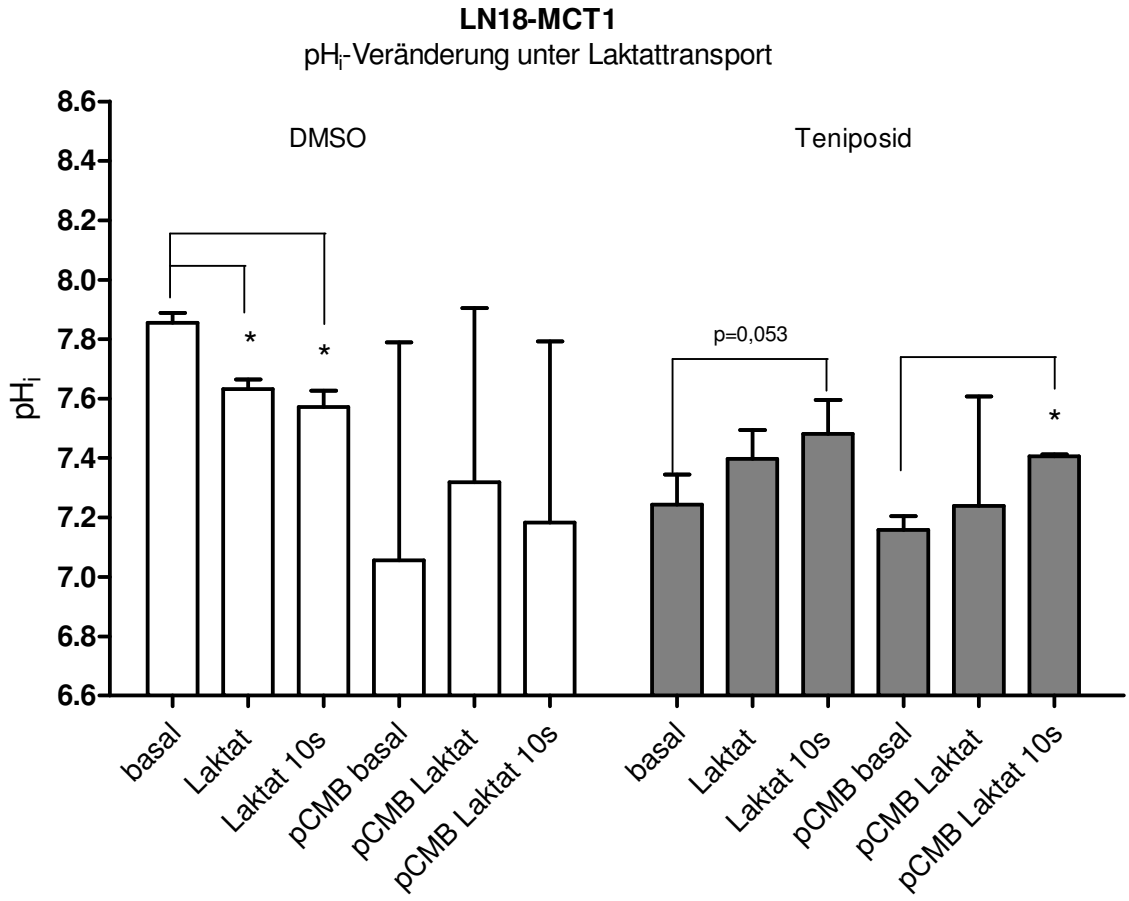


Abb. 4-41 Einfluss von Teniposid auf den Laktattransport der LN18-MCT1-Zellen: Die Abbildung zeigt den Laktattransport unter Kontrollbedingungen (DMSO) und unter Einfluss von Teniposid (10 µM). Die pH_i-Werte wurden unter Basalbedingungen (basal), nach Vorinkubation mit dem MCT-Inhibitor pCMB (100 µM, pCMB basal), nach sofortiger Zugabe von 5 mM Laktat (Laktat, pCMB Laktat) und 10s nach Laktatzugabe (Laktat 10s, pCMB Laktat 10s) mittels der BCECF-Methode bestimmt. Mittelwerte+SD,* $p < 0,05$ (ungepaarter t-Test), n=3 (n=2 pCMB-Vorinkubation und Behandlung mit Teni)

4.3 *In-vivo*-Untersuchungen zum Einfluss von NSAIDs auf das Wachstum von Glioblastomzellen

4.3.1 Etablierung eines murinen Gehirntumormodells

In dieser Arbeit wurde ein syngenes Mausmodell verwendet, bei dem murine GL261-Glioblastomzellen ins Frontalmark mit Hilfe einer stereotaktischen Halterung injiziert wurden. Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist in Abschnitt 3.2.6 zu finden.

Um den geeigneten Zeitpunkt für spätere Substanzgaben zu ermitteln, wurde zunächst die Kinetik des Tumorwachstums nach Injektion der Zellen in die Mäusegehirne bestimmt. Die Mäuse wurden 7, 10, 14, 20 und 33 Tage nach intrazerebraler Injektion der Zellen getötet

und das Gehirn für immunhistochemische Färbungen entnommen. Die Zeitspanne wurde in Anlehnung an die Publikation von Szatmari *et al.* (*146*) ausgewählt. Aus ethischen Gründen wurde der Tierversuch nach 33 Tagen beendet, da die Tiere pathologische Auffälligkeiten (Gewichtsverlust, Apathie) zeigten. Mit der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE-Färbung) konnte der Tumor vom gesunden Gewebe unterschieden werden. Die HE-Färbungen (Abb. 4-42) zeigten, dass sich bereits nach 10 Tagen ein mikroskopisch sichtbarer Tumor ausgebildet hatte, der rasch an Größe zunahm. An Tag 33 nahm der Tumor einen sehr großen Anteil des Gehirns ein, so dass in den dargestellten Vergrößerungen nur noch Ausschnitte des Tumorgewebes sichtbar waren.

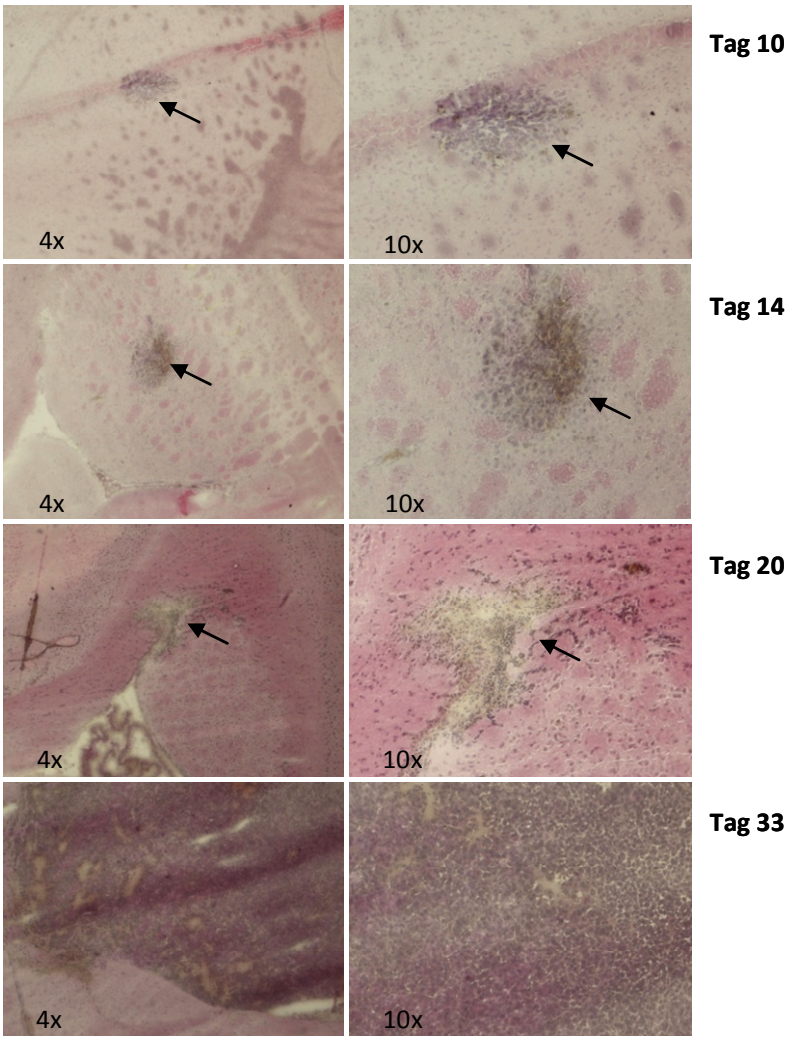


Abb. 4-42 Kinetik des Tumorwachstums der GL261-Zellen im Mausmodell: C57BL/6-Mäusen wurden $1x10^4$ GL261-Zellen stereotaktisch ins Frontalmark injiziert. Nach 7, 10, 14, 20 und 33 Tagen wurden die Tiere getötet. Von den entnommenen Gehirnen wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese für HE-Färbungen verwendet. In den Durchlichtaufnahmen ist exemplarisch der Verlauf der Tumorentwicklung ab Tag 10 dargestellt. Nach 33 Tagen hatte der Tumor ein sehr großes Ausmaß erreicht, so dass in der Vergrößerung nur ein Ausschnitt des Tumorgewebes erkennbar ist.

Nach Etablierung des murinen Gehirntumormodells sollte der Einfluss ausgewählter NSAIDs auf das Tumorwachstum untersucht werden. In den zuvor beschriebenen *in-vitro*-Untersuchungen wurden die verwendeten Zytostatika sowie die NSAIDs nur in den humanen Zelllinien LN18 und U87MG untersucht. Da im Glioblastommodell die murinen GL261-Zellen verwendet wurden, sollte zunächst die Viabilität der murinen GL261-Zellen nach Inkubation mit NSAIDs bestimmt werden. So konnte auch überprüft werden, ob die Substanzen auf murine Zellen die gleiche Wirkung haben (Abb. 4-43) wie auf humane Glioblastomzelllinien. Nach 48h Inkubation der GL261-Zellen war eine geringfügige, dennoch statistisch signifikante Steigerung der Viabilität bei 250 µM Diclofenac sowie bei 100 µM und 200 µM Lumiracoxib auf ca. 12% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO zu erkennen. Diese Effekte traten nach 72stündiger Inkubation nicht auf. Die signifikant erhöhte Viabilität nach Ibuprofengabe war in der murinen Zelllinie mit 132% nach 48h und 137% nach 72h noch stärker ausgeprägt als bei den humanen Zelllinien LN18 und U87MG. Eine reduzierte Viabilität der GL261-Zellen war nach Inkubation mit 50 µM bzw. 100 µM Celecoxib nachzuweisen.

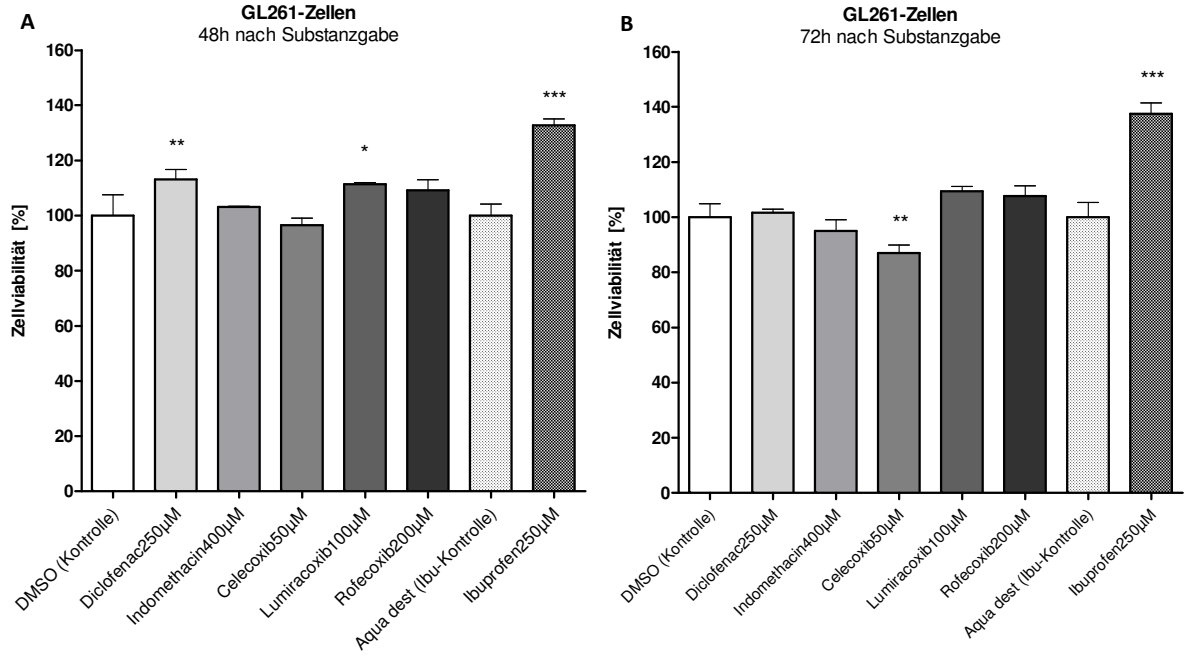


Abb. 4-43 Einfluss ausgewählter NSAIDs auf die Viabilität der GL261-Zellen: Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen mit den nicht-selektiven NSAIDs Diclofenac (250 µM), Indomethacin (400 µM) und Ibuprofen (250 µM) sowie den COX-2-selektiven NSAIDs Celecoxib (50 µM), Lumiracoxib (100 µM) und Rofecoxib (200 µM) und den Lösungsmittelkontrollen DMSO und A. dest (Ibuprofenkontrolle) inkubiert. Nach 48 bzw. 72 Stunden wurde die Zellviabilität fluorimetrisch mittels des Resazurin-Assays bestimmt. Mittelwerte+SD, n=3, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.2 Einfluss von Ibuprofen auf das Tumorwachstum *in vivo*

Da Ibuprofen bei allen Glioblastom-Zelllinien zu einer Erhöhung der Zellviabilität führte, jedoch in anderen Studien (*147, 148*) gezeigt werden konnte, dass dieses NSAID und seine Derivate antikanzerogene Wirkungen haben, wurde der Einfluss von Ibuprofen auf die Tumorprogression im murinen Glioblastommodell untersucht.

Mit der in Abb. 4-42 dargestellten Kinetik zum Tumorwachstum konnte der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem mikroskopisch noch kein bzw. nur sehr kleine Tumoren nachweisbar waren und an dem mit einer Substanzgabe begonnen werden sollte. Da nach 33 Tagen der Tumor ein sehr großes Volumen eingenommen hatte und die Tiere durch Apathie und Gewichtsverlust auffällig waren, wurde das Versuchsende auf 25 Tage nach Injektion der GL261-Zellen vorgezogen. Die Substanzgabe erfolgte für 18 Tage, so dass Tag 7 nach Injektion der Zellen als Beginn der Substanzgabe definiert wurde. In der Abb. 4-44 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

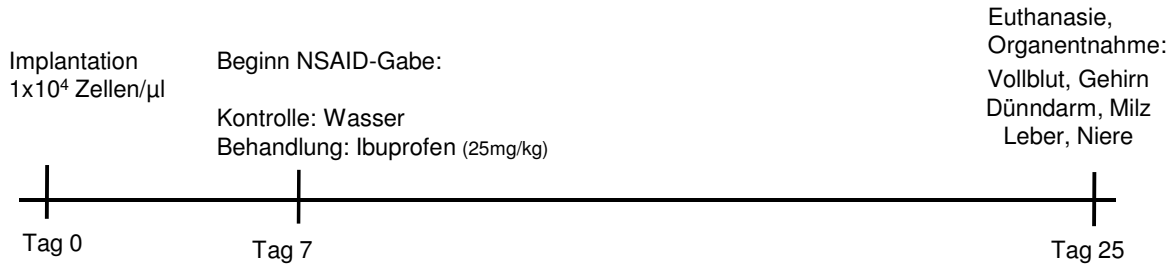


Abb. 4-44 Schematische Darstellung der tierexperimentellen Versuchsdurchführung: Am Tag 0 wurden C57BL/6-Mäusen $1x10^4$ GL261-Zellen/µl stereotaktisch ins Frontalmark injiziert. Ab dem 7. Tag nach Implantation der Zellen wurde den Mäusen täglich die Ibuprofenlösung durch eine Schlundsonde verabreicht. Die verabreichte Menge an Ibuprofenlösung richtete sich dabei nach dem Körpergewicht der Tiere (25 mg Ibuprofen/ kg). Die Kontrollgruppe wurde mit einer entsprechenden Menge Wasser behandelt. An Tag 25 nach Injektion der Zellen wurden die Tiere getötet.

Die Mäuse zeigten unter der Ibuprofenbehandlung keine Verhaltensauffälligkeiten. Die Gewichtskontrolle wurde als objektiver Parameter für den Gesundheitszustand der Tiere betrachtet. Das Körpergewicht aller Tiere blieb über den Versuchszeitraum konstant (Abb. 4-45).

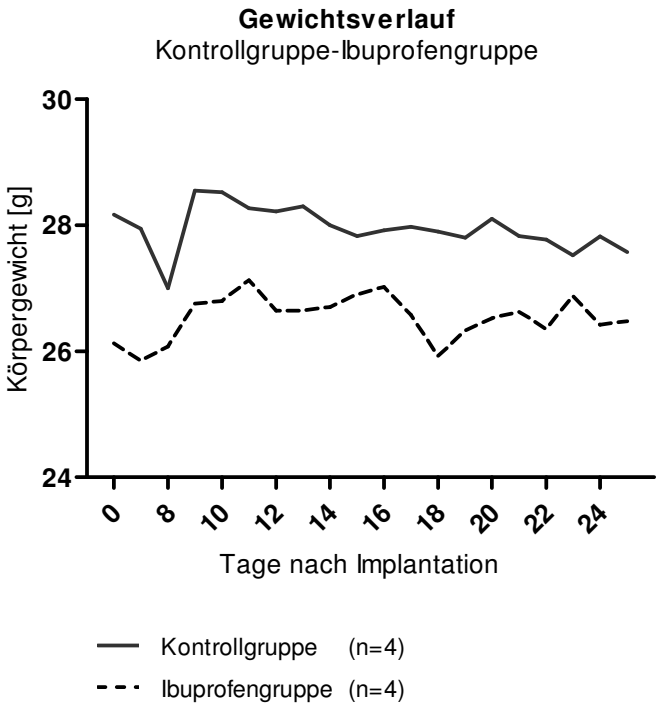


Abb. 4-45 Körpergewicht der Versuchstiere im Zeitverlauf: Im Diagramm sind die Gewichtsverläufe exemplarisch für je vier der Kontroll- bzw. Ibuprofen-behandelten Mäuse im Mittel über den Versuchszeitraum von 25 Tagen dargestellt.

Von den nach Versuchsende entnommenen Gehirnen wurden, wie in Abschnitt 3.2.6.6 beschrieben, 6 µm dicke Schnitte angefertigt und für die HE-Färbung sowie für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. In der Abb. 4-46 sind repräsentative HE-Färbungen von einem Kontrolltier und einem Ibuprofen-behandelten Tier gegenübergestellt. In der Ebene 1 war in der HE-Färbung kein Tumor nachweisbar. In den Ebenen 2-4 war der Tumor deutlich sichtbar, so dass teilweise in der gewählten Vergrößerung nur Ausschnitte des Tumors dargestellt werden konnten.

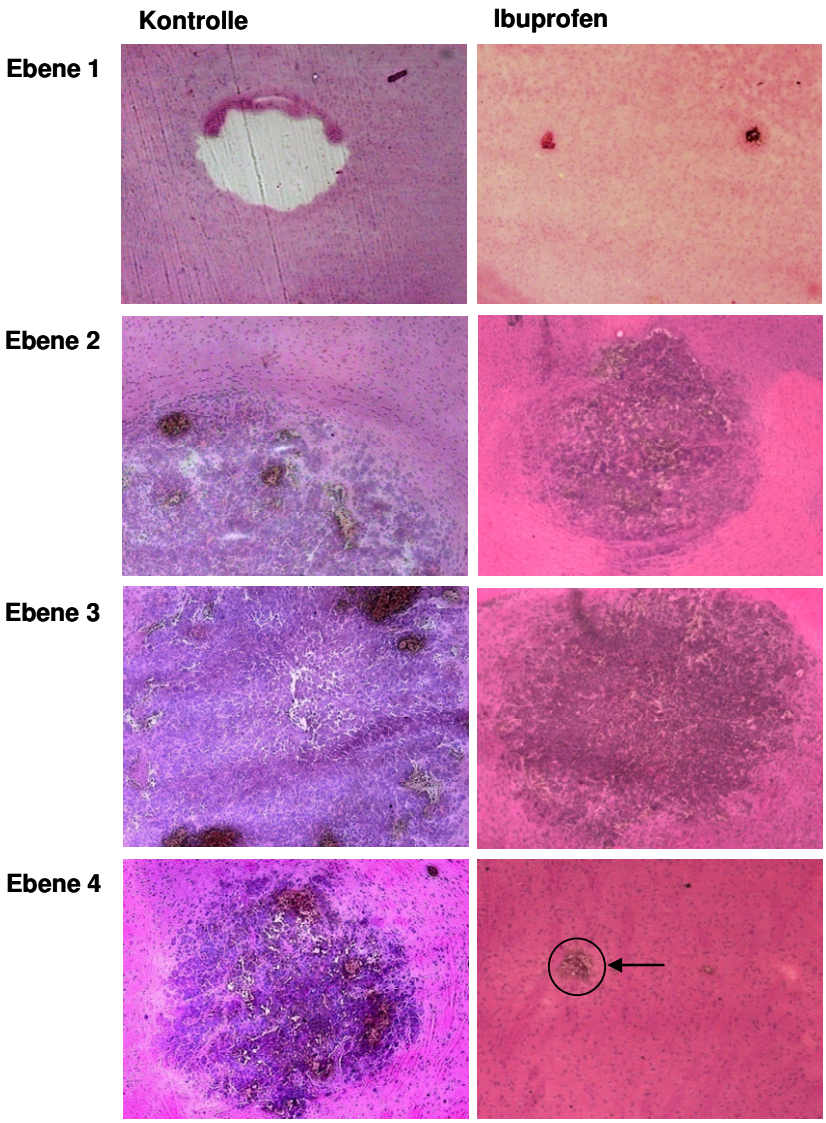


Abb. 4-46 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten muriner Gehirne: Von den entnommenen Mäusegehirnen wurden 6 µm dicke Gefrierschnitte in verschiedenen Schnittebenen des Gehirns angefertigt. Nach Färbung mit Hämatoxylin und Eosin wurden Durchlichtaufnahmen mit einem 10fachen Objektiv aufgenommen. Die Abbildungen zeigen repräsentativ ein Kontrolltier und ein Ibuprofen-behandeltes Tier. In Ebene 4 ist der Tumor des Ibuprofen-Tiers markiert.

Die digitalisierten Aufnahmen der murinen Gehirne wurden zur Bestimmung der Tumorgröße verwendet. Mit dem Programm ImageJ wurden sowohl die Fläche des Tumors als auch die Fläche des Gesamtschnittes bestimmt. Für jede Schnittebene wurden mindestens drei Präparate pro Tier ausgewertet. In der Abb. 4-47 sind repräsentative Aufnahmen der Schnittebene 3 aus den Versuchsreihen A und B gegenübergestellt. Der Tumor ist durch eine Umrandung gekennzeichnet. In Versuchsreihe A konnte bei einem Tier aus der Ibuprofen-behandelten Gruppe kein Tumor detektiert werden, in Versuchsreihe B war bei einem Kontrolltier und einem Ibuprofen-behandelten Tier kein Tumor erkennbar. Die Tiere ohne mikroskopisch nachweisbaren Tumor wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen.

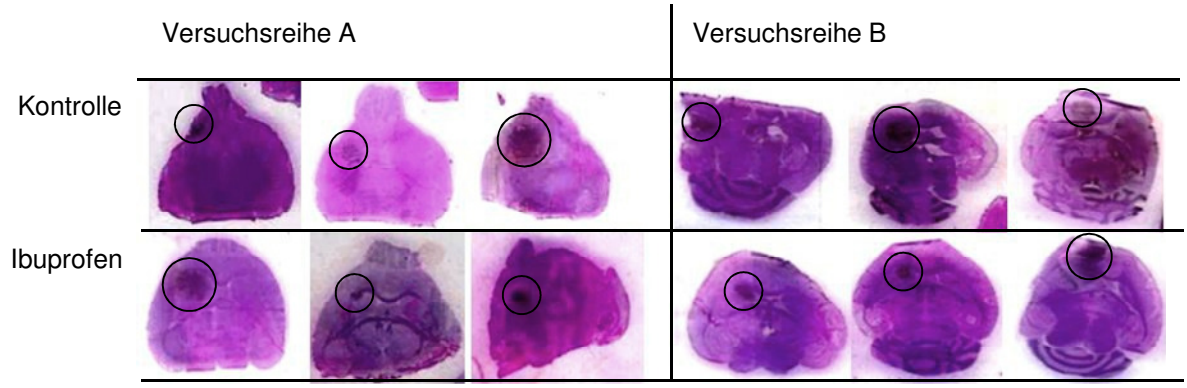


Abb. 4-47 Übersichtsdarstellung der Gehirntumoren bei Kontroll- und Ibuprofen-behandelten Tieren: Von den aus Versuchsreihe A und B entnommenen Gehirnen wurden Gefrierschnitte angefertigt. In der Abbildung sind die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Schnittebene 3 von Kontrolltieren und Ibuprofen-behandelten Tieren gegenübergestellt. Die Tumoren sind durch Umrandung gekennzeichnet. Zwei Ibuprofen-behandelte Tiere und ein Kontrolltier zeigten keine nachweisbare Tumorentwicklung (nicht-dargestellt), Kontrolltiere: n=7, Ibuprofen-behandelte Tiere: n=8.

Die statistische Auswertung der Tumorgrößen in Relation zur Gesamtfläche der Gehirnschnitte ergab eine statistisch signifikante Reduktion der Tumorgröße bei den Ibuprofen-behandelten Tieren. In der Abb. 4-48 sind die Schnittebenen 2-4 der Kontrolltiere und der Ibuprofen-behandelten Tiere gegenüber gestellt. In Schnittebene 2 und 3 war eine statistisch signifikante Reduktion der Tumorgrösse bei den Ibuprofen-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu erkennen (Abb. 4-48 A). Wurden alle Schnittebenen zusammengefasst (Abb. 4-48 B), war ebenfalls eine statistisch signifikant verminderte Tumorgröße in der Ibuprofen-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar.

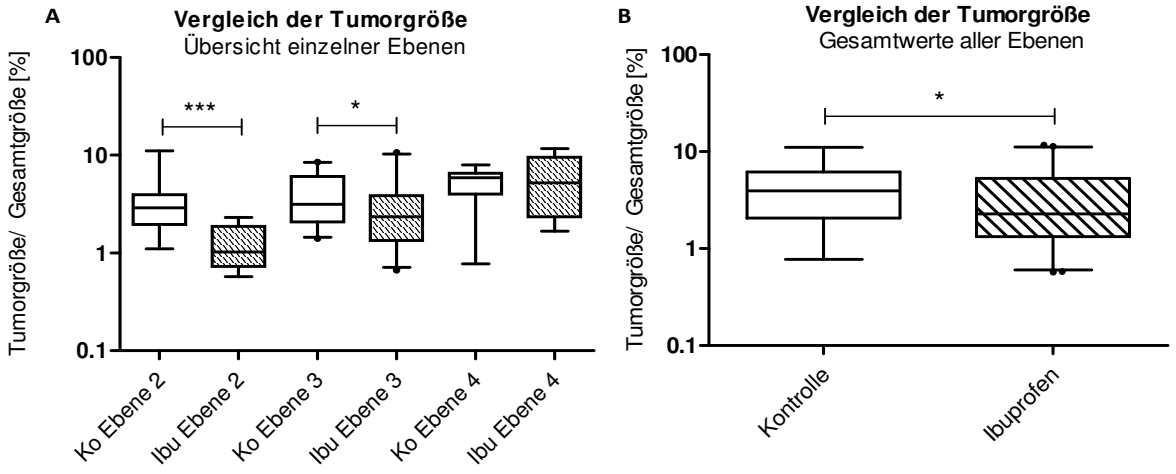


Abb. 4-48 Vergleich der Tumorgrößen von Kontroll- (Ko) und Ibuprofen-behandelten (Ibu) Mäusen: Im Diagramm (A) sind die Tumorgrößen der Schnittebenen 2-4 dargestellt. Im Diagramm (B) sind die Tumorgrößen der einzelnen Schnittebenen zusammengefasst. Mittelwerte+SEM, Kontrolltiere: n=6, Ibuprofen-behandelten Tiere: n=6, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

4.3.2.1 Expression pH-regulatorischer Transporter im murinen Glioblastommodell

Neben dem Tumorwachstum wurde auch die Expression der pH-regulatorischen Transporter (NHE1, MCT1 und MCT4) durch indirekte Immunfluoreszenz der Gefrierschnitte im murinen Glioblastommodell untersucht. In den folgenden Abbildungen sind repräsentativ jeweils eine Übersichtsaufnahme, eine Aufnahme mit einem 10fach-Objektiv und eine Aufnahme mit 40fachen Objektiv der Immunfluoreszenzfärbungen sowie eine Durchlichtaufnahme der HE-Färbung des Gehirntumors dargestellt. Sowohl in den Kontrolltieren als auch in den Ibuprofen-behandelten Tieren zeigten sich ähnliche Expressionsmuster der untersuchten pH-regulatorischen Transporter.

In der Abb. 4-49 sind die NHE1-Färbungen (grün) abgebildet. Es zeigte sich, dass NHE1 im Tumor wesentlich stärker exprimiert wird als im umliegenden Hirngewebe. Des Weiteren waren Unterschiede in der NHE1-spezifischen Färbung innerhalb des Tumors zu erkennen, wobei eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zum Tumorrand auffiel. In Abb. 4-49 D ist ein Ausschnitt des Tumorrands dargestellt. Verglichen mit dem Tumorzentrum waren am Tumorrand weniger NHE1-positive Zellen zu erkennen.

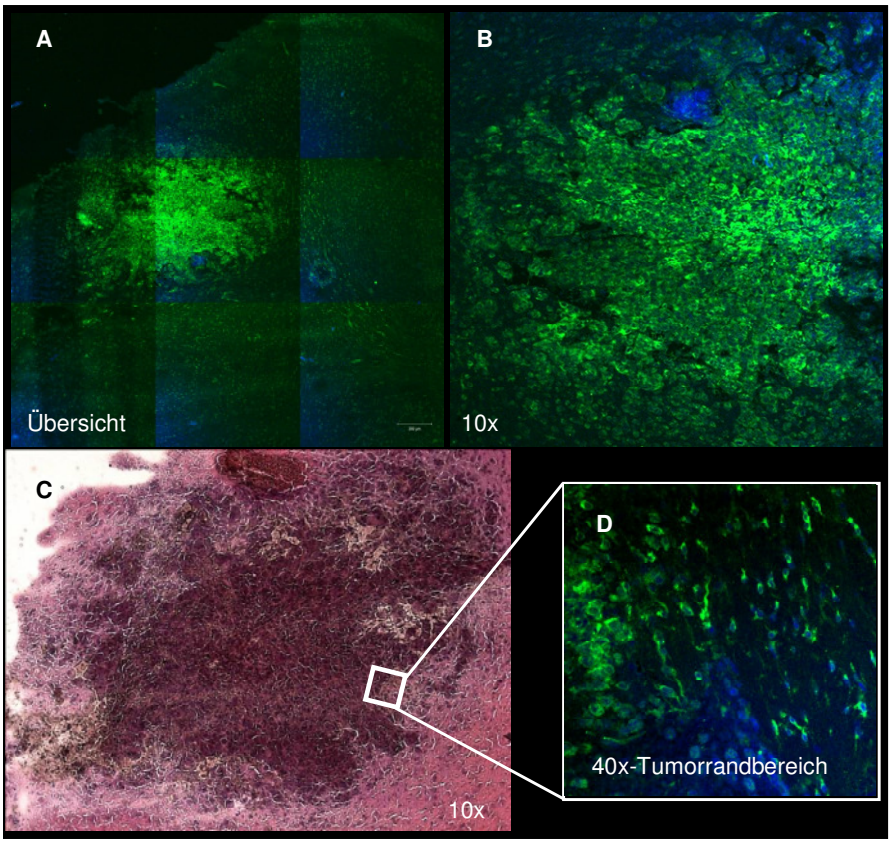


Abb. 4-49 Immunfluoreszenzfärbung von NHE1 in Gefrierschnitten muriner Gehirne: Die Abbildungen zeigen repräsentativ eine Übersichtsaufnahme (A), eine Aufnahme mit 10x-Objektiv (B) und eine Aufnahme mit 40x-Objektiv (D) der Immunfluoreszenzfärbungen sowie eine Durchlichtaufnahme der HE-Färbung (C). In den Immunfluoreszenzaufnahmen ist NHE1 grün und die Zellkerne sind blau dargestellt.

Auch die Immunfluoreszenzfärbungen von MCT4, dargestellt in Abb. 4-50, zeigten wie die NHE1-Färbungen eine erhöhte Fluoreszenzintensität im Tumorgewebe verglichen mit dem umliegenden Gehirngewebe, was auf eine vermehrte Expression von MCT4 im murinen Glioblastom hindeutet. Im Gegensatz zur NHE1-Färbung nimmt die MCT4-spezifische Fluoreszenz zum Tumorrand zu. In Abb. 4-50 D ist der Tumorrandbereich abgebildet, wobei eine deutliche Abgrenzung zwischen stark MCT4-positivem Tumor und schwach MCT4-positivem umliegenden Gehirngewebe zu erkennen ist.

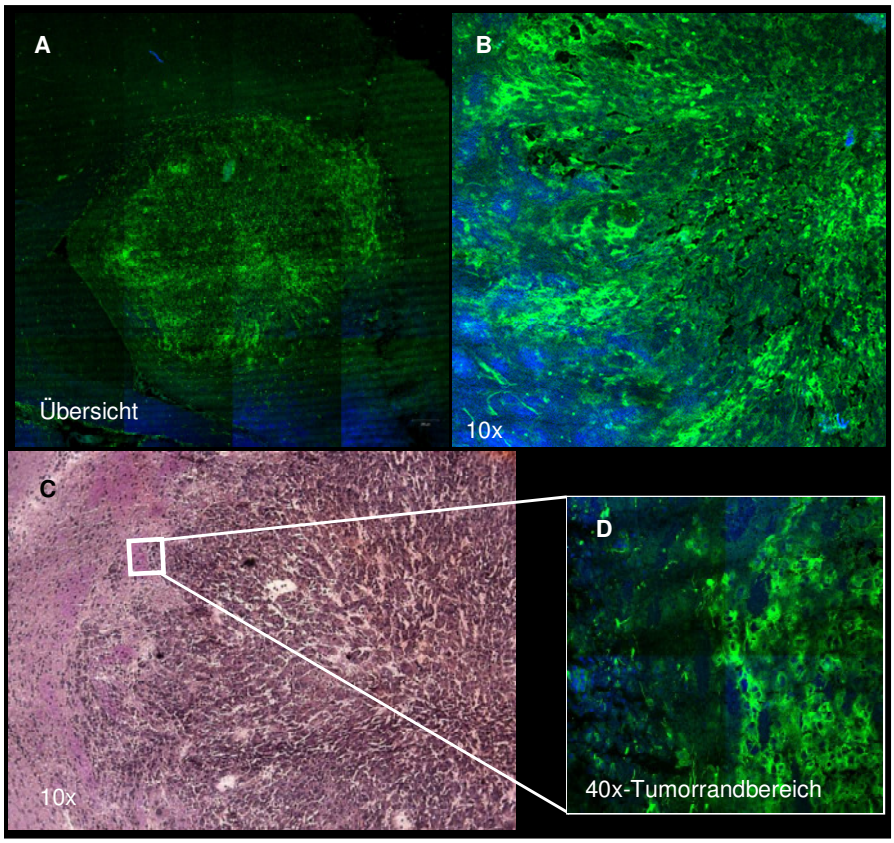


Abb. 4-50 Immunfluoreszenzfärbung von MCT4 in Gefrierschnitten muriner Gehirne: Die Abbildungen zeigen repräsentativ eine Übersichtsaufnahme (A), eine Aufnahme mit 10x-Objektiv (B) und eine Aufnahme mit 40x-Objektiv (C) der Immunfluoreszenzfärbungen sowie eine Durchlichtaufnahme der HE-Färbung (D). In den Immunfluoreszenzaufnahmen ist MCT4 grün und die Zellkerne sind blau dargestellt.

Die Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von MCT1 sind in Abb. 4-51 dargestellt und zeigen eine Immunfluoreszenzaufnahme in 10x Vergrößerung und die HE-Färbung desselben Tumors. Eine erhöhte Expression von MCT1 konnte im murinen Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden Gewebe nicht gezeigt werden. Es war jedoch eine Anfärbung gefäßähnlicher Strukturen durch den verwendeten MCT1-Antikörper in den Gefrierschnitten der murinen Gehirne erneut zu erkennen (Abb. 4-51 C, D), was die Ergebnisse der Immunfluoreszenzuntersuchungen an humanen Glioblastomproben (Abb. 4-3) bestätigt.

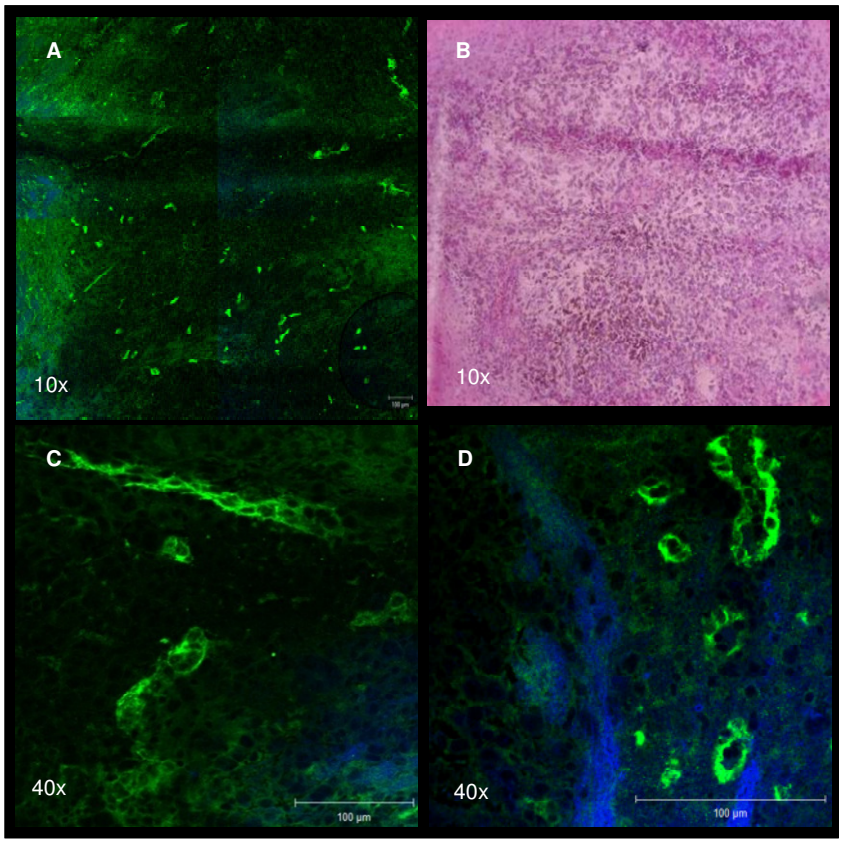


Abb. 4-51 Immunfluoreszenzfärbung von MCT1 in Gefrierschnitten muriner Gehirne: Die Abbildungen zeigen repräsentativ eine Aufnahme mit 10x-Objektiv (A) der Immunfluoreszenzfärbungen und eine Durchlichtaufnahme der HE-Färbung (B) desselben Tumors. Die zwei Aufnahmen mit 40x Objektiv (C, D) wurden von anderen Gefrierschnitten muriner Gehirne angefertigt. In den Immunfluoreszenzaufnahmen ist MCT1 grün und die Zellkerne sind blau dargestellt.

Die zugehörigen Negativkontrollen der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen sind in Abb. 4-52 dargestellt. Die für das murine Glioblastommodell verwendeten GL261-Zellen waren mit dem Grün-Fluoreszierenden-Protein (GFP) markiert. Eine Fluoreszenz der durch die GL261-GFP-Zellen induzierten Gehirntumore konnte nicht detektiert werden, was möglicherweise durch die Fixierung der Gefrierschnitte mit Aceton hervorgerufen wurde.

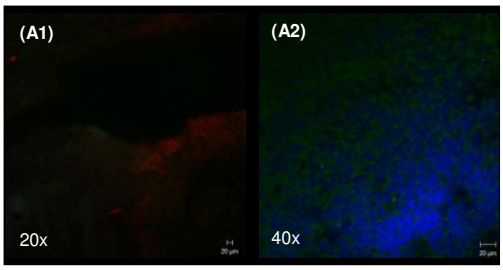


Abb. 4-52 Negativkontrollen der Immunfluoreszenzfärbungen: Die Gefrierschnitte wurden mit den Sekundärantikörpern anti-Alexa-568 und anti-Alexa-488 (A1) bzw. nur mit anti-Alexa-488 inkubiert (A2). Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt.

5 Diskussion

Die Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen intra- und extrazellulären pHs ist eine Voraussetzung für eine Vielzahl zellulärer Prozesse. In Tumoren ist das pH-Milieu gegenüber gesundem Gewebe stark verändert. Solide Tumoren weisen im Gegensatz zu gesundem Gewebe einen extrazellulären pH-Wert (pH_e) im sauren und einen intrazellulären pH-Wert (pH_i) im neutralen bis alkalischen Bereich auf (*149*). Diese Abweichungen im pH_e und pH_i treten bereits früh in der malignen Entwicklung von Tumorzellen auf.

Die veränderten pH-Bedingungen fördern die weitere Transformation der Tumorzellen und erhalten die neoplastischen Prozesse aufrecht (*49*). Beispielsweise spielt bei der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber bestimmten Arzneimitteln das saure extrazelluläre Milieu eine bedeutende Rolle, u.a. indem durch den niedrigen pH_e die Aktivität des Effluxtransporters P-Glykoprotein erhöht wird (*49*). Daneben begünstigt der im alkalischen Bereich liegende pH_i die Zellproliferation, die Migration sowie metabolische Vorgänge und vermindert die Apoptose (*51, 84, 149*).

Auch im Glioblastom, dem häufigsten und aggressivsten malignen Gehirntumor (WHO Grad IV) (*4*), konnte ein alkalisches intrazelluläres Milieu und ein saures extrazelluläres Milieu nachgewiesen werden (*5*). Da die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung eines Glioblastoms trotz kombinierter Behandlung aus Radio- und Chemotherapie sowie chirurgischer Entfernung des Tumors bei nur einem Jahr liegt (*3*), sind neue Ansätze bei der Therapie notwendig.

An der Regulation des pH_i und damit auch an der Aufrechterhaltung des sauren extrazellulären Milieus in soliden Tumoren sind zahlreiche pH-regulatorische Transporter beteiligt (*149*). Im Gehirn sind vor allem die Natrium-Protonenaustauscher NHE1 und NHE5, die Monocarboxylattransporter MCT1, MCT4 und MCT5 sowie der elektroneutrale Natriumabhängige Chlorid-Bicarbonat-Austauscher NDCBE an der pH-Regulation beteiligt. Über die Bedeutung dieser pH-regulatorischen Transporter für die Pathogenese und das Ansprechen des Glioblastoms auf Chemotherapeutika ist wenig bekannt. Eine pharmakologische Beeinflussung von pH-regulatorischen Transportern ist bisher kaum untersucht und könnte eine neue Angriffsfläche in der antineoplastischen Tumortherapie darstellen. So konnten Yamagata *et al. (150)* bereits 1996 zeigen, dass eine verminderte Alkalisierung des intrazellulären Milieus, vermittelt durch Inhibition von NHE1 und NDCBE, das Wachstum von Sarkomzellen *in vitro* und *in vivo* verringert (*150*).

Bisher ist nicht bekannt, inwiefern die in der Glioblastomtherapie verwendeten antitumoralen Substanzen die Expression und Aktivität pH-regulatorischer Transporter beeinflussen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Zytostatika Carmustin,

Lomustin, Temozolomid, Teniposid und Vincristin auf die Expression und Aktivität der ausgewählten pH-regulatorischen Transporter (NHE1, NHE5, MCT1, MCT4, MCT5, NDCBE) untersucht. Diese Zytostatika werden seit langem in der Therapie des Glioblastoms eingesetzt (*10*).

Die Verwendung nichtsteroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) kann einen neuen Ansatz in der Glioblastom-Behandlung darstellen. *In-vitro*- als auch *In-vivo-S*tudien zeigten eine antitumorale Wirksamkeit verschiedener NSAIDs auf unterschiedliche Tumorzellen (*38, 151-154*), einschließlich Gliomazellen (*27, 28, 34, 39*). Auf Grund dieser antitumoralen Wirkung waren Untersuchungen zum Einfluss von NSAIDs auf die Expression und Aktivität der pH-regulatorischen Transporter sowie auf die Viabilität von Glioblastomzellen ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

5.1 Expression pH-regulatorischer Transporter in humanen Glioblastomproben

Das Glioblastom ist ein aggressiv und infiltrierend wachsender Gehirntumor (*4*). Die veränderten pH-Bedingungen im Glioblastom und anderen soliden Tumoren begünstigen das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors (*49*). Eine mögliche Ursache für die Änderungen im pH-Milieu könnte eine veränderte Expression pH-regulatorischer Transporter sein. Zudem könnten diese Expressionsänderungen abhängig von der jeweiligen Tumormalignität unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Daher wurden zu Beginn dieser Arbeit Untersuchungen zur Expression der pH-regulatorischen Transporter in humanen Gliomproben unterschiedlicher Malignitätsgrade durchgeführt.

Es wurden 35 Glioblastomproben, 21 Gliomproben der Tumorgrade I-III und acht post mortem entnommene Gehirnproben (Frontal- und Temporallappen) von gesunden Spendern hinsichtlich der mRNA-Expression der pH-regulatorischen Transporter NHE1, NHE5, NDCBE, MCT1, MCT4 und MCT5 untersucht.

Alle Gliomproben wiesen unabhängig vom Tumorgrad eine erhöhte NHE1-mRNA-Expression im Vergleich zu nicht-tumorösem Gehirngewebe auf. Die bereits bei niedriggradigen Tumoren (Grad I-III) erhöhte NHE1-Expression unterstützt die Hypothese, dass eine NHE1-vermittelte Zunahme des pH_i ein frühes Ereignis in der malignen Entwicklung darstellt (*50*).

Im Glioblastom treten zusätzliche Veränderungen in zellulären Prozessen gegenüber niedriggradigeren Gliomen auf, wie einem erhöhten migratorischen Potential (*89*) und einem aggressiverem Wachstumsverhalten. An diesen Prozessen ist NHE1 nachweislich beteiligt

(*49, 71*). Eine erhöhte NHE1-Expression in den Grad IV-Tumoren verglichen mit den niedriggradigen Tumoren wäre aus diesen Gründen zu erwarten. Ein Unterschied in der mRNA-Expression von NHE1 zwischen Grad-IV- und Grad-I-III-Tumoren war jedoch nicht zu verzeichnen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die erhöhte Expression anderer pH-regulatorischer Transporter wie NDCBE oder die MCTs sein. Zudem könnte die NHE1-Aktivität, unabhängig von der RNA- oder Proteinexpression, durch posttranskriptionelle Modifikationen in den malignen Tumoren verändert sein (*80*).

In Oligonukleotid-Microarray-Analysen an drei gesunden Gehirngeweben und vier primären Glioblastomen zeigten Markert *et al. (155)*, dass die NHE1-Expression signifikant geringer in den Glioblastomproben ist. Die Ergebnisse von Markert *et al.* (*155*) sind somit widersprüchlich zu den in dieser Arbeit vorgestellten Daten zur NHE1-Expression in Glioblastomproben. Durch die höhere Anzahl an untersuchten Glioblastomproben (n=35) in der vorliegenden Arbeit können jedoch statistisch besser abgesicherte Daten erhoben werden. Es sollte aber berücksichtigt werden, dass die analysierten Proben in dieser Arbeit im Gegensatz zur Studie von Markert *et al*. (*155*) nicht nach primären und sekundären Glioblastomen unterteilt wurden, da lediglich zwei von den 35 untersuchten Patienten an einem sekundären Glioblastom erkrankt waren.

In verschiedenen Studien der Arbeitsgruppe um Ohgaki konnte gezeigt werden, dass das Alter von Glioblastompatienten Einfluss auf die Inzidenz und Prognose hat. So haben Patienten mit einem geringen Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bessere Prognosen hinsichtlich der Überlebenszeit (*6-8*). Basierend auf diesen Studien wurden die 35 Glioblastomproben zusätzlich auf Expressionsunterschiede hinsichtlich des Alters zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Median 59 Jahre) und des Gesamtüberlebens (Median 509 Tage) untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Alter der Patienten bei Diagnosestellung keinen Einfluss auf die NHE1-Expression aufweist. Eine signifikant verminderte NHE1-Expression zeigte sich jedoch bei Patienten mit einem Gesamtüberleben oberhalb des Medians von 509 Tagen.

Obwohl bei NHE5 keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen Gliomproben und nicht-tumorösen Gewebe vorlag, war ebenfalls eine reduzierte NHE5-Expression bei Patienten mit einem Gesamtüberleben über 509 Tagen zu verzeichnen. Des Weiteren lag eine verminderte NHE5-Expression in Glioblastomproben von Patienten mit einem geringeren Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (< 59 Jahren) vor. In der Arbeit von Ohgaki *et al. (6)* wurde bereits beschrieben, dass sich ein geringes Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung positiv auf die Überlebenszeit auswirkt (*6*). Somit könnte die verminderte NHE5-mRNA-Expression bei Patienten mit einer Überlebenszeit oberhalb des medianen Gesamtüberlebens von 509 Tagen auf einen erhöhten Anteil an jüngeren Patienten in dieser Gruppe zurückgeführt werden. Die Gruppe von Patienten mit einer

Überlebenszeit oberhalb des medianen Gesamtüberlebens von 509 Tagen umfasste 16 Glioblastompatienten. In dieser Gruppe waren zehn Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 59 Jahre. Die mittlere relative NHE5-mRNA-Expression dieser jüngeren Patienten unterschied sich jedoch nicht signifikant von der NHE5-Expression der sechs älteren Patienten. Die Vermutung, dass die verminderte NHE5-mRNA-Expression bei Patienten mit einer verlängerten Überlebenszeit auf einen erhöhten Anteil an jüngeren Patienten in dieser Gruppe zurückgeführt werden kann, wurde somit nicht bestätigt.

Im Glioblastom ist NHE1 an der pH-Regulation und der Alkalisierung des intrazellulären Milieus massgeblich beteiligt (*80*). In den durchgeführten Analysen wurde eine erhöhte NHE1-Expression in Glioblastomproben detektiert. Die zudem nachgewiesene vermehrte Expression der beiden Natrium-Protonenaustauscher NHE1 und NHE5 in Patienten mit einem Gesamtüberleben unterhalb des Medians von 509 Tagen spricht für die Beteiligung dieser Transporter an der Entwicklung eines hochmalignen Glioblastoms. Es ist bekannt, dass NHE1 bei der Migration, Proliferation und der Angiogenese eine Rolle spielt (*49*). Diese Prozesse begünstigen die Agressivität des Glioblastoms (*3, 4*) und wirken sich nachteilig auf das Gesamtüberleben des Patienten aus. NHE5 ist neben NHE1 im Gehirn die dominierende NHE-Isoform (*156*). Inwieweit NHE5 an pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist, ist derzeit noch unklar. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass NHE5 auch in Tumoren eine wichtige Funktion einnehmen könnte.

Weitere bedeutsame pH-regulatorische Transporter in Tumoren sind die Monocarboxylattransporter (MCT). In tumorösem Gewebe transportieren sie Laktat, das in Tumoren als wichtige Energiequelle dient (*115, 116*). Durch die Expression unterschiedlicher MCTs in hypoxischen und aeroben Arealen kann der gerichtete Transport von Laktat aus hypoxischen laktatproduzierenden Zellen zu aeroben laktatverbrauchenden Zellen gewährleistet werden (*116*). Die Arbeitsgruppe um Herholz (*157*) zeigte bereits 1992, dass in Gliomen vor allem eine erhöhte Laktatkonzentration in einiger Entfernung von Arealen mit sehr starker ^{18}F-2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glukose (FDG)-Aufnahme vorlag (*157*). Dies deutet darauf hin, dass in den glukosereichen Tumorarealen Laktat gebildet und in umliegende Gebiete transportiert wird. Des Weiteren wiesen Cheng *et al.* (*158*) in der Glioblastomzelllinie T89G eine unter Hypoxie gesteigerte Expression von MCT1 und MCT4 nach (*158*). Die vermehrte Expression von MCTs in hypoxischen laktatproduzierenden Bereichen des Glioms könnte dem Weitertransport des gebildeten Laktats in andere Tumorareale dienen und kann somit die oben genannte Beobachtung von Herholz *et al.* (*157*) erklären.

Bisher wurde in humanem Glioblastomgewebe und Glioblastomzelllinien die vermehrte Expression von MCT1 und MCT2 gezeigt, während in gesundem humanem Gehirngewebe

die Isoform MCT3 dominiert (*92*). Für MCT4 wurde bislang nur in anderen soliden Tumoren eine erhöhte Expression nachgewiesen (*94, 96*). Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zeigten erstmals, dass neben MCT1 auch MCT4 und MCT5 in humanen Glioblastomen im Vergleich zu nicht-malignen Gehirngewebe signifikant vermehrt exprimiert wird. Für MCT4 konnte zudem eine Zunahme der Expression auf mRNA-Ebene mit steigender Tumormalignität nachgewiesen werden (Gliome Grad I-III verglichen mit Glioblastomen Grad IV). Diese erhöhte Expression von Monocarboxylattransportern in hochgradig-malignen Glioblastomen könnte eine Erklärung für den „Hypermetabolismus“ dieser Tumoren sein. Ein höherer Glukosestoffwechsel in hochgradig-malignen Tumoren führt zu einer vermehrten Laktatbildung. Dieses Laktat wird aus hypoxischen Zellen mittels MCTs heraustransportiert und über weitere MCTs in aerobe Zellen aufgenommen (Abb. 1-9 „Laktatshuttle“ in Tumorzellen). In den aeroben Zellen dient Laktat als Energiesubstrat und wirkt sich positiv auf das Tumorwachstum aus (*115, 116*). Das so geförderte Tumorwachstum könnte sich wiederum negativ auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirken. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen konnte jedoch nur zwischen der erhöhten Expression von MCT5 und dem verkürztem Gesamtüberleben eine statistisch signifikante Beziehung gezeigt werden. Für die Transporter MCT1 und MCT4 zeigte sich ein solcher Zusammenhang nicht. Bei MCT5 lag zusätzlich eine positive Korrelation zwischen Patientenalter bei Diagnosestellung und der MCT5-Expression vor. So wiesen Patienten mit einem geringeren Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine verminderte MCT5-Expression im Vergleich zu älteren Patienten auf. Der Großteil der Patienten mit verlängertem Gesamtüberleben war jünger als 59 Jahre. Die mittlere MCT5-mRNA-Expression in der Patientengruppe mit einem längeren Gesamtüberleben unterschied sich jedoch nicht zwischen Patienten über 59 Jahre und Patienten unter 59 Jahren bei Diagnosestellung.

Dieses Ergebnis läßt vermuten, dass eine reduzierte Expression von MCT5 zur verbesserten Überlebensprognose beitragen könnte. Auf Grund der geringeren Expression von MCT5 könnte der Laktattransport vermindert sein und damit die Nährstoffversorgung von Laktat-verstoffwechselnden Tumorbereichen reduzieren. Des Weiteren könnte die Migration der Tumorzellen und die Infiltration in umliegendes Gewebe gestört werden. Diese Prozesse werden durch einen sauren pH_e begünstigt, der u.a. durch die MCTs aufgebaut wird (*60*). Durch eine verminderte Expression von MCT5 könnte die Ansäuerung des pH_e und damit das infiltrative Potential der Tumorzellen abgeschwächt werden. Zudem zeigten Izumi *et al. (109)*, dass bereits die Expression von MCT1 und MCT4 in Lungentumorzellen unabhängig vom transportierten Laktat mit einer erhöhten invasiven Aktivität assoziiert ist. Sowohl die reduzierte Nährstoffversorgung als auch das verminderte invasive Potential könnten zu weniger aggressiven Tumoren und einer verbesserten Überlebensprognose beitragen.

Die mRNA-Expression des Transporters NDCBE in humanem Glioblastomgewebe wurde mit dieser Arbeit erstmals gezeigt. Bisher wurde dieser Transporter hauptsächlich in Neuronen beschrieben (*120*). In der Arbeit von *Shrode et al.* (*159*) konnte NDCBE jedoch auch in C6-Rattenglioblastomzellen nachgewiesen werden. Der Gehalt an NDCBE-mRNA ist in den untersuchten humanen Gliomproben im Vergleich zu nicht-tumorösem Gewebe nicht signifikant erhöht.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte auch die Proteinexpression von MCT1, MCT4 und NHE1 in den humanen Glioblastomproben nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit Studien zur Proteinexpression von MCT1 in humanem Glioblastomgewebe (*114*) und von NHE1 (*80*) bzw. MCT4 (*158*) in humanen Glioblastomzelllinien.

Für MCT1 konnte durch verschiedene Untersuchungen an humanen Gehirnen und Nagergehirnen eine vermehrte Expression in gefäßbildenden Endothelzellen und Mikrogefäßen belegt werden. Diese Untersuchungen bezogen sich vorrangig auf gesundes Gehirngewebe (*114, 137, 160-163*). Die in der vorliegenden Arbeit angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen zeigten ebenfalls MCT1-positive Signale in Gefäßstrukturen von humanen Glioblastomproben. Auch in den Immunfluoreszenzfärbungen der murinen Gehirne und Gehirntumoren konnte eine Lokalisation von MCT1 in gefäßähnlichen Strukturen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von MCT1 in gefäßbildenden Endothelzellen und Mikrogefäßen auch in Glioblastomgewebe aufrecht erhalten wird. Um diese Ergebnisse abzusichern, sollten zusätzlich Kolokalisationsuntersuchungen von MCT1 mit Endothelzellmarkern durchgeführt werden. Im Gegensatz zu MCT1 ergaben die Immunfluoreszenzfärbungen von NHE1 und MCT4 eine vorrangige Expression der zwei Transporter in den Glioblastomzellen der untersuchten Patientengewebe.

Die statistisch signifikant erhöhte Expression von NHE1, MCT1, MCT4 und MCT5 in humanen Glioblastomen könnte auf eine Bedeutung dieser pH-regulatorischen Transporter bei pathophysiologischen Prozessen in Gehirntumoren hinweisen. So sind typische Merkmale von soliden Tumoren, einschließlich des Glioblastoms, wie eine unkontrollierte Proliferation, erhöhtes migratorisches Potential und eine gesteigerte Apoptoseresistenz (*3, 4*) mit der Expression und Aktivität von pH-regulatorischen Transportern assoziiert (*60, 67, 84, 109*). Durch die gesteigerte Expression von NHE1, MCT1, MCT4 und MCT5 in den Glioblastomen könnten die Transporter gute Zielmoleküle in der gerichteten Therapie darstellen. So zeigte die Arbeitsgruppe um Mathupala (*92*) bereits, dass durch eine gegen MCT1 gerichtete siRNA der Zelltod in der humanen Glioblastomzelllinie U87MG induziert werden kann (*92*). Ebenso hatte eine pharmakologische Hemmung von NHE1 und dem Natrium-Calcium-Austauscher NCX1.1 zytotoxische Effekte auf humane Glioblastomzellen (*164*).

5.2 *In-vitro*-Untersuchungen zu pH-regulatorischen Transportern

5.2.1 Einfluss von Zytostatika auf die Expression und Aktivität pH-regulatorischer Transporter

Die in dieser Arbeit untersuchten Zytostatika Carmustin, Lomustin, Temozolomid, Teniposid und Vincristin entfalten ihre antikanzerogene Wirkung auf unterschiedliche Weise. Während Carmustin, Lomustin und Temozolomid durch Einfügen von Alkylgruppen die RNA- und DNA-Synthese stören (*12*), hemmt Teniposid die Topoisomerase-II und induziert Strangbrüche (*18*). Vincristin interagiert mit dem Mikrotubulisystem der Zelle (*20*). Eine Beeinflussung von pH-regulatorischen Transportern durch die genannten Verbindungen ist bisher nicht untersucht und wurde daher in dieser Arbeit durch Expressionsanalysen und Aktivitätsuntersuchungen näher beleuchtet. Es konnte festgestellt werden, dass die Substanzen unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression der pH-regulatorischen Transporter haben. Die beobachteten Effekte unterschieden sich zudem zwischen den beiden hier untersuchten humanen Glioblastom-Zelllinien LN18 und U87MG.

Bei den alkylierenden Substanzen Carmustin, Lomustin und Temozolomid zeigten nur die Nitrosoharnstoffe Carmustin und Lomustin einen Einfluss auf die Zellviabilität. Während lediglich Lomustin bei den LN18-Zellen nach 48h zu einer statistisch signifikanten Verringerung der Viabilität führte, zeigte sich bei den U87MG-Zellen nach 48h und 72h nur eine geringe und nicht signifikant verminderte Viabilität unter beiden Nitrosoharnstoffen (100 µM). Die schwache zytotoxische Wirkung der Nitrosoharnstoffe auf die U87MG-Zellen deckt sich nicht mit den Daten von Winter *et. al. (165),* welcher für Carmustin EC_{50}-Werte von 310 µM in LN18-Zellen und von 55 µM in U87MG-Zellen zeigen konnte. Diese EC_{50}-Werte hätten für ein stärkeres Ansprechen der U87MG-Zellen auf Carmustin gesprochen (*165*).

Temozolomid (TMZ) als Standardtherapeutikum in neu-diagnostizierten Glioblastomen beeinflusste die Zellviabilität in beiden Glioblastomzelllinien nicht. Die maximale Serumkonzentration von Temozolomid liegt bei 75 µM (*166*). Die gewählte Temozolomid-Konzentration von 100 µM in den Zellkulturversuchen ist dadurch in etwa mit der *In-vivo*-Situation vergleichbar.

Auch in den mRNA- und Proteinexpressionsanalysen zeigten die Alkylantien kaum Effekte auf die pH-regulatorischen Transporter. Diese geringen Effekte lassen sich teilweise mit dem Wirkmechanismus der Alkylantien und den daraus resultierenden Resistenzmechanismen in Tumorzellen erklären. Beispielsweise methyliert TMZ vorrangig die Nukleinbase Guanin und induziert somit DNA-Strangbrüche. Die Methylierung von Guanin wird durch die

Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) aufgehoben und somit die zytotoxische Wirkung von TMZ vermindert (*167*). Die MGMT wird besonders in LN18-Zellen vermehrt exprimiert, so dass diese Zelllinie eine hohe Resistenz gegenüber TMZ aufweist (*168*). Eine Kreuzresistenz gegenüber anderen alkylierenden Verbindungen ist aufgrund der erhöhten MGMT-Expression ebenfalls nachgewiesen worden (*167, 168*) und kann die geringen Wirkungen von Carmustin und Lomustin in LN18-Zellen erklären. Bei den U87MG-Zellen liegt hingegen keine erhöhte Expression von MGMT vor (*167*), was einen stärkeren Effekt der Alkylantien vermuten ließ. Dennoch zeigten auch hier Carmustin, Lomustin und TMZ keine signifikanten Effekte auf die Zellviabilität. In Untersuchungen von Hermisson *et al.* (*167*) konnte ein EC_{50}-Wert von TMZ in U87MG-Zellen von 400 µM bestimmt werden. Verglichen mit den EC_{50}-Werten in anderen Glioblastomzelllinien, die zwischen 87 µM (LNT-229), 600 µM (LN18) und 1290 µM (LN-308) lagen (*167*), deutet dies ebenfalls auf eine Resistenz von U87MG-Zellen gegenüber TMZ hin, trotz fehlender Überexpression der MGMT.

Teniposid interagiert mit der Topoisomerase-II und stört somit die DNA-Synthese (*18*). Eine zytotoxische Wirkung von Teniposid in LN18- bzw. U87MG-Zellen wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen (*169, 170*). In der vorliegenden Arbeit zeigte Teniposid eine sehr starke Reduktion der LN18-Zellviabilität aber deutlich geringere Effekte auf die Viabilität von U87MG-Zellen. Dennoch reagierten die U87MG-Zellen im Vergleich zu den LN18-Zellen mit einer stärkeren Regulation der Transporter-Expression. In den LN18-Zellen verminderte Teniposid die MCT4- und MCT5-Expression, in den U87MG-Zellen hingegen die NHE5- und MCT1-Expression. In Übereinstimmung mit der weniger stark reduzierten Zellviabilität in den U87MG-Zellen, konnte eine statistisch signifikant erhöhte NHE1-Expression in den Zellen nachgewiesen werden. Eine erhöhte NHE1-Expression nach Teniposidgabe könnte die Apoptoseinduktion abschwächen (*171*) und sich somit positiv auf die Viabilität der U87MG-Zellen unter Teniposid auswirken. Eine weitere Erklärung für die geringere Sensibilität der U87MG-Zellen gegenüber Topoisomerase-II-Hemmern könnten Resistenzmechanismen wie eine verminderte Sensitivität der Topoisomerase gegenüber Inhibitoren u.a. durch Mutationen in der Interaktionsdomäne, aber auch eine geringere Expression der Topoisomerase-IIα sein (*171, 172*).

Bei den Untersuchungen zur Proteinexpression von NHE1 wurden durch den verwendeten Antikörper zwei Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht detektiert. Die 90 kDa-Bande gilt als spezifisch für NHE1 (*138*). Die 52 kDa-Bande könnte von einer NHE1-Splicevariante stammen. So ist in der Datenbank Ensembl (*140*) eine NHE1-Variante (SLC9A1-201) mit einem Molekulargewicht von ca. 53 kDa beschrieben. Dieser Splicevariante fehlen die ersten acht Transmembrandomänen (TMD, Sequenzvergleich siehe Anhang 11.3 und 11.4), so dass der Natrium-Protonen-Transport sowie der Einbau des

Transporters in die Zellmembran beeinträchtigt sein könnten (*63*). Interessanterweise wurde die Expression der beiden Isoformen durch Teniposid gegensätzlich beeinflusst. Während in steigenden Konzentrationen des Zytostatikums (1, 10, 100 µM) die Expression der NHE1-Isoform 1 (90 kDa) gesenkt wurde, zeigte die NHE1-Variante 2 (52 kDa) nur einen Abfall unter 1 µM Teniposid. Mit steigender Konzentration an Teniposid (10, 100 µM) näherte sich die Proteinexpression der NHE1-Variante 2 den Ausgangswerten der DMSO-behandelten Zellen wieder an. Bisher ist nicht bekannt, welche Funktion die NHE1-Variante 2 (52 kDa) einnehmen könnte. Um dies zu untersuchen, könnte die Variante 2 in einem Zellmodell überexprimiert und dann näher charakterisiert werden. Die verminderte Expression der NHE1-Isoform 1 nach Behandlung mit Teniposid könnte einen neuen Mechanismus in der zytotoxischen Wirkung der Substanz darstellen. An NHE1-überexprimierenden- oder NHE1-knockdown-Zellen könnte diese Vermutung detaillierter untersucht werden.

Im Gegensatz zu Teniposid beeinflusste Vincristin die Zellviabilität der LN18-Zellen kaum, während die Viabilität von U87MG-Zellen statistisch signifikant vermindert wurde. Diese Unterschiede setzten sich auch auf mRNA-Ebene fort. Vincristin senkte in den U87MG-Zellen die Expression aller untersuchten pH-regulatorischen Transporter mit Ausnahme von MCT4. In den LN18 Zellen wurde lediglich die Expression von NDCBE und MCT5 reduziert. Diese Ergebnisse weisen auf eine höhere Sensitivität der U87MG-Zellen gegenüber Vincristin hin. Die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien kann ihre Ursache in Resistenzmechanismen gegenüber Vinkaalkaloiden haben, die u.a. durch die Expression verschiedener Tubulinisoformen hervorgerufen wird (*19*). Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Auswirkung von Vincristin auf die Zellviabilität könnte in der Beeinflussung der Expression der pH-regulatorischen Transporter liegen. In den LN18-Zellen wurden die Transporter NHE1, MCT1 und MCT4 nur geringfügig durch Vincristin beeinflusst und könnten somit ihre antiapoptotischen Wirkungen, wie die Aufrechterhaltung des alkalischen pH_i und die Regulation des Zellvolumens, entfalten. In den U87MG-Zellen hingegen könnte den apoptosefördernden Effekten von Vincristin weniger entgegengewirkt werden, da die Expression vor allem von NHE1 und MCT1, zwei wesentlichen Regulatoren des pH_i, vermindert wurde.

Zusammenfassend kann für die Regulation der pH-Transporter durch Zytostatika festgestellt werden, dass die Alkylantien keine wesentlichen Auswirkungen auf die pH-regulatorischen Transporter haben. Die unter Teniposid und Vincristin beobachtete Abnahme der Expression von NHE1, MCT1 bzw. MCT4 könnte jedoch mit ihren Zellviabilitäts-hemmenden Effekten im Zusammenhang stehen. Dies könnte u.a. in weiterführenden Überexpressions- und Hemmversuchen geklärt werden.

Das Zytostatikum Teniposid wurde aufgrund der starken Hemmung der Zellviabilität und der signifikanten Effekte auf die Expression von NHE1, MCT1 und MCT4 für weitere funktionelle

Analysen in LN18-Zellen ausgewählt. So konnte mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden, dass Teniposid den Phosphorylierungsgrad von NHE1 um ca. 20% reduziert. Da die NHE1-Aktivität u.a. durch Phosphorylierungen an verschiedenen Serinen im C-terminalen Bereiche modifiziert werden kann (*71, 75*), spricht dieses Ergebnis für eine Abnahme der NHE1-Aktivität nach Behandlung von Glioblastomzellen mit Teniposid. Zusätzlich nahm der intrazelluläre pH-Wert unter Teniposid mit fast 0,6 pH-Einheiten im Vergleich zur Kontrolle drastisch ab, was ebenfalls auf eine verminderte NHE1-Aktivität hindeutet. Die Beeinflussung von NHE1 durch Teniposid wurde auch in der Aktivitätsbestimmung deutlich. Nach Inkubation der LN18-Zellen mit Teniposid konnte der Propionsäure-induzierten intrazellulären Ansäuerung nicht entgegen gewirkt werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass Teniposid sowohl die Expression als auch die Aktivität von NHE1 reduziert. Durch die verminderte NHE1-Aktivität könnte der pH_i gesenkt sein und apoptose-fördernde Mechanismen begünstigt werden, da eine erhöhte NHE1-Aktivität einen Schutz vor Apoptose darstellen kann (*72, 173, 174*). Die in den LN18-Zellen nachgewiesene stark verminderte Viabilität unter Teniposid könnte somit auf Apoptose beruhen. Um dies zu belegen, sind weitere Arbeiten erforderlich in denen die verschiedenen Regulationsmechanismen von NHE1 in Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung von Teniposid untersucht werden.

Nicht nur die NHE1-Aktivität wurde durch Teniposid beeinflusst, auch der MCT1-Transporter zeigte unter diesem Zytostatikum eine drastische Veränderung seiner Aktivität. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Substanzen bewirkte die Laktatzugabe bei den Teniposid-behandelten LN18-Zellen einen Anstieg des pH_i anstatt des erwarteten Abfalls. Dieses Ergebnis weist auf eine reduzierte Laktataufnahme z.B. durch eine verminderte MCT1-Aktivität hin. Auch die erniedrigte MCT1-mRNA-Expression unter Teniposid (10 µM) bekräftigt diese Vermutung.

Für die Interaktion von potentiellen MCT1-Substraten mit dem MCT1-Transporter sind vorrangig Hydroxyl- (*175*) sowie Monocarboxylgruppen (*176*) verantwortlich. Teniposid besitzt Hydroxylgruppen und könnte darüber direkt mit dem Transporter interagieren. Des Weiteren kann der Laktonring unter neutralen, schwach sauren und alkalischen Bedingungen zerfallen und es können sich Hydroxylcarbonsäure-Derivate von Teniposid bilden (*18*). Funktionelle Gruppen zur Interaktion mit MCT1 liegen somit in Teniposid vor. Einen weiteren Hinweis für die mögliche Wechselwirkung von Teniposid mit MCT1 stellen die Ergebnisse aus der Koinkubation mit dem bekannten MCT1-Inhibitor pCMB dar (*98, 177*). Bei Vorinkubation mit pCMB wurden die Effekte von Teniposid auf den pH_i sowie auf den Laktattransport deutlich abgeschwächt. Der basale pH_i fiel bei Vorinkubation mit pCMB weniger stark ab als unter alleiniger Gabe von Teniposid. Auch die Erhöhung des pH_i nach Laktatzugabe trat bei den mit pCMB vorinkubierten und im Anschluss mit Teniposid behandelten Zellen nicht auf. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass durch die

Interaktion von pCMB mit MCT1 die mögliche Wechselwirkung von Teniposid mit MCT1 vermindert wird, falls beide Substanzen um eine Bindungsstelle am MCT1 konkurrieren.

Teniposid könnte nicht nur einen Inhibitor von MCT1 darstellen, sondern auch ein Substrat sein. So ist bekannt, dass physiologische MCT1-Substrate mit hydrophoben Seitenketten wie α-Ketoisocaproat und Phenylpyruvat auch als kompetitive Inhibitoren fungieren, da durch die Seitenketten die Freisetzung des Substrats von MCT1 vermindert wird, woraus ein verlangsamter Transport resultiert (*100*). Diese Fragestellungen könnten mit Transportversuchen an den in dieser Arbeit generierten MCT1-überexprimierenden Zellen mit radioaktiv-markiertem Laktat unter alleiniger, aufeinanderfolgender und kombinierter Zugabe von pCMB und Teniposid untersucht werden.

Der beobachtete Anstieg des pH_i nach Zugabe von Laktat in Teniposid-behandelten Zellen war nicht zu erwarten und kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Durch welche Mechanismen Teniposid diese pH_i-Zunahme begünstigt, muss in weiteren Versuchen evaluiert werden. Die Beteiligung der anderen in dieser Arbeit untersuchten pH-regulatorischen Transporter an der Erhöhung des pH_i nach Gabe von Laktat ist eher unwahrscheinlich. Die Transporter NHE1, NHE5 und NDCBE würden bereits kurze Zeit nach dem Teniposid-induzierten pH_i-Abfall der beginnenden intrazellulären Ansäuerung entgegenwirken und nicht erst bei Zugabe von Laktat aktiv werden. Zudem ist sowohl die Aktivität als auch die Expression von NHE1 nach Teniposid-Behandlung vermindert. Die Beteiligung von MCT4 an dem pH_i-Anstieg nach Laktatzugabe ist ebenfalls fraglich. Auch MCT4 transportiert wie MCT1 Laktat im Symport mit Protonen (*98*). Die Zugabe von exogenem Laktat würde somit eher in einer Aufnahme von Laktat und Protonen und somit einem pH_i-Abfall, wie auch bei MCT1 erwartet, resultieren. Weitere Untersuchungen zur Transportaktivität von Monocarboxylattransportern unter Einfluss von Teniposid sind nötig, um die hier beschriebenen Hypothesen zu prüfen.

Zusammenfassend kann aus den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass von den untersuchten Zytostatika insbesondere Teniposid die Expression und Aktivität der pH-regulatorischen Transporter NHE1 und MCT1 beeinflusst.

5.2.2 Einfluss von NSAIDs auf die Expression und Aktivität pH-regulatorischer Transporter

Die präventive und anti-tumorale Wirkung von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) wird seit Jahrzehnten diskutiert. Bereits in den 1980iger Jahren wurden erfolgreich *In-vivo*-Versuche an Mäusen und Ratten mit NSAIDs zur Chemoprävention von Kolorektalkrebs durchgeführt (*178*). In humanen Studien an Patienten mit einer familiären adenomatösen

Polyposis (FAP) konnte eine Regression der Polypenanzahl durch NSAIDs beobachtet werden. Des Weiteren konnte durch regelmäßige Einnahme von NSAIDs das Risiko an einem Kolorektalkarzinom zu erkranken, vermindert werden (*179*). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden zahlreiche epidemiologische Studien durchgeführt, um den Zusammenhang von NSAID-Einnahme und Krebsrisiko zu prüfen. Es zeigte sich, dass die regelmäßige Einnahme von NSAIDs das Risiko reduzierte an einem Mamma-, Prostata-, Ösophagus-, Magen-, Kolon- oder Bronchialkarzinom zu erkranken (*42, 180, 181*). In der Studie von Scheurer *et al. (182)* konnte zudem festgestellt werden, dass auch das Risiko an einem Gliom zu erkranken durch die regelmäßige Einnahme von NSAIDs um 33% reduziert werden kann (*182*). Durch die Studie von Daugherty *et al.* (*183*) konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigt werden.

NSAIDs hemmen die Enzyme Cyclooxygenase 1 (COX1) bzw. COX2 (*21*). Eine vermehrte Expression der COX2 in Tumoren, einschließlich Glioblastomen, und die Beteiligung von Prostaglandinen an neoplastischen Vorgängen, wie der Angiogenese und Metastasierung, legten die Vermutung nahe, dass die antikanzerogene Wirkung der NSAIDs auf der COX-Hemmung beruht (*179, 184, 185*). In verschiedenen Arbeiten u.a. mit NSAID-Derivaten, welche die COX-Enzyme nicht hemmen, konnte dennoch eine antikanzerogene Wirkung erzielt werden (*41, 180, 186-190*). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die antitumorale Wirkung der NSAIDs nicht allein durch die COX-Inhibierung, sondern auch durch COX-unabhängige und substanzspezifische Effekte vermittelt wird.

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, inwiefern die COX-unselektiven NSAIDs Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin sowie die COX2-selektiven NSAIDs (Coxibe) Celecoxib, Lumiracoxib und Rofecoxib einen Einfluss auf die Zellviabilität und Funktion pH-regulatorischer Transporter in humanen Glioblastomzellen haben. Eine mögliche Beeinflussung der Transporter durch die NSAIDs könnte zum Verständnis der vielfältigen antitumoralen Wirkmechanismen dieser Substanzen beitragen und neue Therapieansätze in der Behandlung des Glioblastoms aufzeigen.

Wie auch bei der Behandlung der Glioblastomzellen mit den verschiedenen Zytostatika reagierten die verwendeten Zelllinien U87MG und LN18 sehr unterschiedlich auf die verabreichten NSAIDs. Während in LN18-Zellen nur Diclofenac und Celecoxib die Viabilität in hohen Dosen reduzierten, wurde bei den U87MG-Zellen durch alle Coxibe sowie durch Diclofenac und Indomethacin ein viabilitätsvermindernder Effekt erzielt. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Ibuprofen zu einer gesteigerten Viabilität beider Glioblastomzelllinien.

In der Literatur sind für die in dieser Arbeit verwendeten LN18- und U87MG-Zellen bislang nur Untersuchungen zu Ibuprofen, Indomethacin und Celecoxib beschrieben. So zeigten

Kang *et al*. (*191*), dass die anti-proliferativen Effekte von Celecoxib in U87MG-Zellen u.a. auf einem p53-abhängigen Zellzyklusarrest beruhen. Der Zellzyklusarrest war in U373MG-Zellen mit mutiertem p53 abgeschwächt und wurde auch durch Inhibierung des Wildtyp p53 in U87MG-Zellen erzielt (*191*). Auch LN18-Zellen weisen ein mutiertes p53 auf (*192*). Die Mutation im p53 könnte das verminderte Ansprechen von LN18-Zellen auf die NSAIDs im Vergleich zu den U87MG-Zellen erklären. Auch weitere COX-unabhängige Effekte der NSAIDs, welche durch Proteine vermittelt werden, die eventuell in unterschiedlicher Ausprägung in den jeweiligen Zelllinien vorliegen, könnten hier eine Rolle spielen.

Eine weitere Ursache für das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien auf die NSAIDs könnte in einer variierenden Expression der COX1 und COX2 liegen. Die COX1 wird sowohl in LN18 als auch in U87MG-Zellen exprimiert (*34*). Für die COX2 konnte in verschiedenen Arbeiten eine starke Expression in U87MG-Zellen nachgewiesen werden (*34, 193, 194*). Die Expression der COX2 in LN18-Zellen wird hingegen als vermindert (*34*) und zum Teil als nicht vorhanden beschrieben (*195*). Diese Expressionsunterschiede könnten auch zur Verminderung der COX-abhängigen Effekte der NSAIDs auf die LN18-Zellviabilität beitragen.

Auffällig war, dass die Coxibe Lumiracoxib und Rofecoxib, welche ausschließlich die U87MG-Viabilität signifikant verminderten, auch die mRNA-Expression von MCT1 und MCT4 in den U87MG-Zellen reduzierten, jedoch nicht in den LN18-Zellen. Die Abnahme der MCT1- und MCT4-Expression könnte die Zellviabilität durch Beeinflussung des intrazellulären Metabolismus und des pH_i vermindern. So zeigten Kumar *et al.* (*196*), dass Eingriffe in den Glukosestoffwechsel das Zellüberleben reduzieren und dies mit einer geringeren Expression des Glukosetransporters GLUT1 und des Monocarboxylattransporters MCT1 verknüpft ist. Eine mögliche Rolle von MCT4 an viabilitätshemmenden Effekten der NSAIDs zeigte sich zudem in der Tatsache, dass sowohl in den LN18-Zellen als auch in den U87MG-Zellen eine Reduktion der Zellviabilität durch Diclofenac und Celecoxib mit einer verminderten MCT4-mRNA-Expression einher ging.

Die Proteinexpression von MCT1 und MCT4 sowie die Laktattransportaktivität wurden von den verschiedenen NSAIDs nicht statistisch signifikant beeinflusst. Jedoch wurde die Laktattransportaktivität von MCT1 und MCT4 nur für die NSAIDs Diclofenac und Ibuprofen durchgeführt. Beide NSAIDs beeinflussten die Transportaktivität in LN18-Zellen nicht. In der Literatur hingegen sind hemmende Effekte von Ibuprofen und Diclofenac aber auch von Indomethacin auf Monocarboxylattransporter beschrieben (*197, 198*). Die MCT-Transporthemmung durch Diclofenac und Indomethacin wurde in der Fachliteratur für die MCT-Substrate Butyrat und Benzoesäure gezeigt (*198, 199*). In der vorliegenden Arbeit wurde nur der Transport von Laktat durch MCTs untersucht. Ein durch NSAIDs verminderter Transport von MCT-Substraten wie Butyrat, Propionat und Pyruvat (*101, 102*) könnte durch Beeinflussung des zellulären Metabolismus auch einen Einfluss auf die Zellviabilität,

unabhängig vom Laktattransport, haben. Mit den in dieser Arbeit generierten MCT1-überexprimierenden Zellen könnte der Einfluss von NSAIDs auf den Transport weiterer MCT-Substrate in LN18-Zellen überprüft werden.

Auf Grund ihrer Effekte auf die mRNA-Expression und Zellviabilität wurden die Substanzen Diclofenac, Ibuprofen und Celecoxib für weitere funktionelle Untersuchungen der pH-regulatorischen Transporter verwendet. Im Gegensatz zu Teniposid verminderten die NSAIDs Diclofenac, Ibuprofen und Celecoxib den Phosphorylierungsgrad von NHE1 nicht. Dennoch scheint Diclofenac die Aktivität von NHE1 zu modulieren. Die durch Propionsäure induzierte Ansäuerung der Zellen konnte unter Diclofenac nicht aufgehoben werden, was für eine verminderte NHE1-Aktivität unter Diclofenac-Inkubation spricht. Zur Überprüfung dieser These könnten Transportversuche mit ^{3}H-markierten Säuren und Diclofenac als Modulator der NHE1-Aktivität an NHE1-überexprimierenden LN18-Zellen durchgeführt werden.

Die NHE1-Aktivität kann unabhängig von der Phosphorylierung auch durch eine direkte Interaktion mit Proteinen wie 14-3-3, Calmodulin und Tescalin modifiziert werden (*71*). Für Diclofenac sind inhibitorische Effekte gegenüber Calmodulin beschrieben (*200, 201*). Dies bekräftigt die Hypothese, dass Diclofenac die NHE1-Aktivität senkt. Im Gegensatz zu Teniposid geschieht dies nicht über eine verminderte NHE1-Phosphorylierung sondern über eine Inhibition des Effektorproteins Calmodulin. Der unter Diclofenac leicht gestiegene pH_i könnte aber auch auf einer Aktivitätssteigerung anderer pH-regulatorischer Transporter beruhen, zu denen auch die Monocarboxylattransporter zählen. So zeigten Ananth *et al.* (*202*) die Stimulation des Na^+-abhängigen Monocarboxylattransporters SMCT1 durch Diclofenac, was einen Hinweis auf die stimulierende Wirkung dieses NSAID auf Laktat-transportierende Proteine gibt. Es zeigte sich aber bei den Transportversuchen, dass unter Diclofenac kein signifikant veränderter Transport von Laktat stattfand, jedoch ist eine Modulation von weiteren pH-regulatorischen Transportern durch dieses NSAID möglich. Ein Beispiel dafür sind die Chlorid-Bicarbonat-Austauscher. Aktivitätsuntersuchungen von Chlorid-Bicarbonat-Austauschern wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, jedoch verminderte Diclofenac die mRNA-Expression von NDCBE, einem Natriumabhängigen Chlorid-Bicarbonat-Austauscher. Dies könnte auf einen Zusammenhang von Bicarbonat-Austauschern und einer Alkalisierung des intrazellulären Milieus nach Behandlung der LN18-Glioblastomzellen mit Diclofenac hinweisen.

Celecoxib senkte die mRNA-Expression der Transporter NHE5, NDCBE, MCT1 und MCT4, während auf Proteinebene nur eine Abnahme der MCT1-Expression vorlag. Untersuchungen zum Einfluss von Celecoxib auf die Transportaktivität von NHE1, MCT1 und MCT4 wurden nicht durchgeführt. Es konnten jedoch Veränderungen in der Lokalisation von NHE1 nach Behandlung von LN18-Zellen mit Celecoxib mittels Immunfluoreszenz detektiert werden. So zeigte sich nach 48h eine perinukleäre Akkumulation der Lysosomen umsäumt von NHE1-

positiven Fluoreszenzsignalen, wohingegen unter Kontrollbedingungen (DMSO) sowohl eine perinukleäre als auch eine periphere Verteilung der Lysosomen vorlag. Wie bereits erwähnt, verminderte Celecoxib die Zellviabilität beider Glioblastom-Zelllinien sehr stark. Kang *et al. (191)* zeigten, dass Celecoxib in humanen Glioblastomzellen eine p53-abhängige Autophagozytose und einen Zellzyklusarrest induziert (*191*). Auch das Celecoxib-Derivat OSU-03012 löste in Glioblastomzellen Autophagozytose aus (*203*). Die Autophagozytose, als Antwort auf Nährstoffmangel und Stress, dient der Degradierung und dem Recycling von Proteinen sowie intrazellulären Organellen (*204*) und ist an physiologischen aber auch pathophysiologischen Vorgängen beteiligt (*205*). Die Rolle der Autophagozytose bei der Tumorentwicklung und bei der Wirkung von antitumoralen Substanzen ist noch weitgehend unbekannt. Ein Merkmal der Autophagozytose ist die Verschmelzung von Autophagosomen mit Lysosomen. Damit diese Fusion stattfinden kann, wandern die Autophagosomen entlang der Mikrotubuli zum Zentromer, wo sie auf die Lysosomen treffen (*206*). Die in der vorliegenden Arbeit detektierte Akkumulation der Lysosomen bzw. LAMP2-positiven Strukturen in direkter Kernnähe könnte auf die Fusion dieser Organellen am Zentromer hinweisen. Die Autophagozytose könnte somit einen Wirkmechanismus von Celecoxib in LN18-Zellen darstellen. Eine weitere Unterscheidung zwischen Autophagolysosomen und Lysosomen zum Beispiel durch Anfärbung von LC3 (light chain 3) wurde nicht durchgeführt, so dass die LAMP2-positiven Signale sowohl von Lysosomen als auch von Autophagolysosomen stammen könnten (*207, 208*). Eine Autophagozytose nach Behandlung der Zellen mit Celecoxib könnte durch den Nachweis von LC3 mittels Immunfluoreszenz und durch die Detektion von vermehrt abgebautem Sequestosom 1 (SQSTM1), einem Substrat der Autophagsomen (*209*), belegt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Akkumulation von NHE1 um die LAMP2-positiven Organellen könnte zudem auf die Interaktion von NHE1 mit Aktin-bindenden Proteinen zurückgeführt werden. So konnte durch Denker *et al.* (*86*) gezeigt werden, dass NHE1 durch direkte Bindung an den Ezrin-Radixin-Moesin-Komplex (ERM-Komplex) eine Rolle in der Organisation von Aktinfilamenten spielt. Die Wanderung der Autophagosomen zum Zentromer könnte somit durch eine NHE1-bedingte Umstrukturierung des Zytoskeletts begünstigt werden. Zudem ist bekannt, dass die NHE1-Aktivität für die Translokation von Lysosomen notwendig ist (*88*). Die Tatsache, dass es unter Celecoxib-Gabe zu einer veränderten Lokalisation von NHE1 und LAMP2-positiven Organellen in Richtung der Kern-Peripherie kam, könnte somit auf eine Beteiligung von NHE1 an der Translokation dieser Organellen hindeuten. Jedoch kann die Bindung des ERM-Komplexes an NHE1 durch Aktivierung des Akt-Signalweges auch das Zellüberleben fördern (*173*) und somit den Zelltod vermindern, was jedoch im Widerspruch zur beobachteten Reduktion der Zellviabilität von LN18-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib stehen würde.

Ibuprofen förderte im Gegensatz zu den anderen Substanzen die Viabilität der Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG. Dennoch traten auch Unterschiede in den mRNA-Expressionsanalysen der beiden Zelllinien nach Behandlung mit Ibuprofen auf. Während in den LN18-Zellen der mRNA-Gehalt der meisten Transporter (NHE1, NHE5, NDCBE, MCT1) erniedrigt wurde, beeinflusste Ibuprofen die Expression dieser Transporter in den U87MG-Zellen nicht signifikant. Trotz einer verminderten mRNA-Expression von NHE1, NHE5, NDCBE und MCT1 in den LN18-Zellen, führte Ibuprofen nicht zu einer Änderung des pH_i. Die Proteinexpression und die Aktivität der Transporter MCT1, MCT4 und NHE1 wurden durch Ibuprofen nicht beeinflusst. Dies könnte die Begründung für den konstanten pH_i der Zellen nach Behandlung mit Ibuprofen, trotz reduzierter Transporter-mRNA-Expression sein.

Die Viabilitätssteigerung der beiden humanen Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG sowie der murinen Glioblastomzelllinie GL261 durch 250 und 500 µM Ibuprofen war unerwartet und deckte sich nicht mit bereits publizierten Daten zur Wirksamkeit von Ibuprofen in Tumorzellen (*39, 151, 153, 210*). Im Vergleich mit der Literatur wird jedoch deutlich, dass in den meisten *In-vitro*-Studien zur antikanzerogenen Wirkung von Ibuprofen mindestens eine Konzentration von 1 mM Ibuprofen eingesetzt wurde, um zytotoxische Effekte zu erzielen (*39, 151, 153, 210*). Lediglich in der Arbeit von Andrews *et al.* (*211*) konnte mit dem MTT-basierten Viabilitätsassay eine minimal wirksame Dosis von 500 µM Ibuprofen in verschiedenen Zelllinien detektiert werden. Des Weiteren erfolgte die Bestimmung des antikanzerogenen Potentials von Ibuprofen in den meisten Studien durch Untersuchungen zur Zellproliferation und zum Zellzyklus (*39, 151, 153, 212*). So konnte festgestellt werden, dass Ibuprofen einen Zellzyklusarrest in der G_0/G_1-Phase in Prostatakarzinomzellen (*151*) und in Kolonkarzinomzellen (*212, 213*) induziert. In der Arbeit von Aryankalayil *et al.* (81) konnte zudem gezeigt werden, dass in Prostatakarzinomzellen eine Runterregulation von Genen für den Zellzyklus und die Zellproliferation mit 1 mM jedoch nicht durch 0,1 mM Ibuprofen erzielt werden kann. Moreno *et al.* (*210*) ermittelten für die Zervixkarzinomzelllinie HeLa für Ibuprofen eine LD_{50} von 6,2 mM, für humane Leukämiezellen lag dieser Wert hingegen bei 1,14 mM. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Ausprägung der antikanzerogenen Wirkung von Ibuprofen sehr stark vom jeweiligen Zelltyp abhängig ist. Zum anderen wird deutlich, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von Ibuprofen möglicherweise für eine Zellviabilitätsverminderung in Glioblastomzellen nicht ausreichend waren.

Für erneute *In-vitro*-Versuche mit Ibuprofen an Glioblastomzelllinien sollten daher zusätzlich Konzentrationen von 1 bis 5 mM eingesetzt werden. Zudem wäre es von Vorteil parallel zur Zellviabilität auch die Proliferation und die Progression des Zellzyklus zu bestimmen. Die Verwendung von 1 mM Ibuprofen in Zellversuchen sollte jedoch kritisch betrachtet werden, da eine Plasmakonzentration von 1 mM Ibuprofen nur bei Einnahme der maximalen Dosis

von 3200 mg pro Tag im Menschen erreicht wird (*151, 214*). Nebenwirkungen von Ibuprofen wie renale (*215*) und gastrointestinale (*216*) Schäden sind abhängig von der Dosis und der Einnahmedauer. Die Gabe einer so hohen Dosis Ibuprofen über einen für die Therapie notwendigen Zeitraum kann somit mit schweren Nebenwirkungen einhergehen.

5.2.3 Subzelluläre Lokalisation von NHE1 in humanen Glioblastomzellen

NHE1 wird in der Literatur als zellmembranständiger Transporter beschrieben (*63*). Durch den Einbau in die Zellmembran kann NHE1 seine Funktion als Regulator des intrazellulären pHs entfalten, indem Protonen im Antiport mit Natriumionen aus der Zelle heraustransportiert werden (*71*). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in verschiedenen Immunfluoreszenzaufnahmen keine eindeutige Membranständigkeit, sondern auch NHE1-positive Signale im Zytosol detektiert. Daher wurden Experimente zur Lokalisation von NHE1 in intrazellulären Organellen durchgeführt.

Durch Javadov *et al.* (*142*) konnte eine Lokalisation von NHE1 in myokardialen Mitochondrien der Ratte gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Lokalisation von NHE1 in Mitochondrien von humanen Glioblastomzellen durch Immunfluoreszenzfärbungen und Immunoblots untersucht. Zum Nachweis von Mitochondrien wurden Antikörper gegen GRP75 und ANT (adenine nucleotide translocator) sowie der Lebendfarbstoff MitoTracker® verwendet, der als selektiver Farbstoff aktiver Mitochondrien gilt. ANT wird in der inneren mitochondrialen Membran exprimiert (*144*). GRP75 gehört zur Familie der Hitzeschock-Proteine 70 (hsp70) und ist in den Mitochondrien u.a. für die Translokation von Proteinen verantwortlich. GRP75 interagiert aber auch mit metabolischen Enzymen und mitochondrialen Strukturproteinen (84, 85). In der Überlagerung der Fluoreszenzfärbungen von NHE1 und dem MitoTracker® war eine partielle Kolokalisation anhand der Gelbfärbung zu erkennen. Diese Kolokalisation war auch bei den Immunfluoreszenzfärbungen von NHE1 und GRP75 nachweisbar. Die Kolokalisation von NHE1 mit GRP75 bzw. mit dem MitoTracker® weisen somit auf eine mitochondriale Lokalisation von NHE1 in Glioblastomzellen hin. Neben einer mitochondrialen Lokalisation von GRP75, wird ein Vorkommen von GRP75 auch im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Zytosol beschrieben (86). NHE1 ist ein Glykoprotein, welches im ER und im Golgi-Apparat N- und O-glykosyliert wird (*217*). Durch die Kolokalisation von NHE1 mit GRP75 kann somit nicht ausschließlich eine mitochondriale Lokalisation sondern auch die Anwesenheit von NHE1 im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden.

Eine weitere Methode zum Nachweis einer mitochondrialen Lokalisation von NHE1 stellte die Anreicherung von Mitochondrien mittels des *Mitochondria Isolation Kit* der Firma Miltenyi

Biotec dar. In Immunoblot-Analysen der aufkonzentrierten Mitochondrien konnte NHE1 nachgewiesen werden. Zur Bestätigung der Mitochondrien-Anreicherung wurden die Antikörper gegen ANT und GRP75 eingesetzt. Sowohl GRP75 als auch ANT konnten in den NHE1-positiven mitochondrialen Isolaten detektiert werden. Jedoch sollte auch bei dieser Methode beachtet werden, dass eine absolut reine Isolation von Mitochondrien nicht gewährleistet werden kann. Verunreinigungen mit anderen zellulären Organellen und besonders mit dem ER sind möglich. Trotz dieser Einschränkungen sprechen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen und der Mitochondrienanreicherung für eine zumindest partielle Lokalisation von NHE1 in den Mitochondrien humaner Glioblastomzellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen könnten die mitochondriale Lokalisation von NHE1 zusätzlich absichern.

Neben der mitochondrialen Lokalisation von NHE1 konnte durch weitere Immunfluoreszenzfärbungen auch eine Kolokalisation von NHE1 mit LAMP2 detektiert werden. LAMP2 ist neben LAMP1 ein wesentlicher Bestandteil der lysosomalen Membran (*218*). Bisher sind in der Literatur keine Natrium-Protonenaustauscher in Lysosomen bzw. in der lysosomalen Membran beschrieben. Es ist aber bekannt, dass an der Translokation von Lysosomen neben intakten Mikrotubuli auch NHE1 beteiligt ist (*88*). Jedoch wurde durch die Arbeitsgruppe von Steffan *et al.* (*88*) nur gezeigt, dass die Aktivität als Protonenaustauscher für die Translokation der Lysosomen verantwortlich ist. Durch die von Denker *et al.* (*86*) beschriebenen Interaktionen von NHE1 mit dem ERM-Komplex ist es aber auch vorstellbar, dass NHE1-vermittelt eine Umstrukturierung des Zytoskeletts in direkter Nähe der Lysosomen begünstigt wird. Da lysosomale Membranbestandteile ebenfalls im ER gebildet werden (*218*), könnte die detektierte Kolokalisation von NHE1 und LAMP2 auch Bereiche des ERs betreffen. Um eine Lokalisation von NHE1 in Lysosomen zu bestätigen, sollten weitere Untersuchungen wie Lysosomenanreicherungen und Nachweise mittels Elektronenmikroskopie folgen.

5.2.4 Nachweis unterschiedlich großer NHE1-Varianten

In den Western-Blot-Analysen zur Beeinflussung von NHE1 durch Zytostatika und NSAIDs wurde neben der zu erwartenden Bande von 90 kDa eine zusätzliche Bande bei 52 kDa nachgewiesen. Für alle Proteinanalysen (Immunpräzipitation, Immunoblot, Immunfluoreszenz) von NHE1 wurde der Antikörper der Firma Abcam verwendet. Laut Herstellerangaben kann die detektierte Bande bei 52 kDa eine mögliche Isoform von NHE1 (NHE1-Variante 2) darstellen (*139*). In allen Immunoblot-Untersuchungen dieser Arbeit konnte die 52 kDa Bande detektiert werden, deren Signalintensität meist stärker war, als die

Intensität des NHE1-Signals bei 90 kDa (*138*). In der Immunpräzipitation zur Bestimmung des NHE1-Phosphorylierungsgrades und im Immunoblot nach Anreicherung der Mitochondrien war lediglich die NHE1-Variante 2 (52 kDa) nachweisbar. Zudem zeigte sich in den Immunfluoreszenzfärbungen neben der membranständigen auch eine zytosolische NHE1-Färbung mit teilweise stark angefärbten punktuellen Strukturen.

In der Literatur ist bislang keine 52-kDa-Variante von NHE1 beschrieben, jedoch wird in der Datenbank UniProt (*219*) eine NHE1-Isoform 2 mit einer Größe von 61 kDa als Isoform-Variante nach alternativem Splicen angegeben (*219*). Das alternative Splicen ist ein wichtiger Mechanismus zur Gewährleistung der molekularen Variabilität und findet bei einer Vielzahl humaner Gene statt (*220*). Der bei UniProt angegebenen Splicevariante NHE1-Isoform 2 (61 kDa) fehlen die Aminosäuren 555-815. Dieser Bereich umfasst jedoch die zytoplasmatische Domäne mit den Phosphorylierungsstellen und den Bindungsstellen für die Effektorproteine (*73*). Somit würde eine NHE1-Variante entstehen, deren Aktivität nicht mehr reguliert werden könnte. Des Weiteren konnte durch Nørholm *et al.* (92) gezeigt werden, dass Mutationen der Aminosäure 754 in der C-terminalen Domäne zu einem reduzierten Einbau von NHE1 in die Plasmamembran führen. Dies könnte die beobachtete zytoplasmatische NHE1-Färbung in den Glioblastomzellen erklären, was durch Mutationsanalysen untersucht werden könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunpräzipitation ein unterschiedlicher Phosphorylierungsgrad der NHE1-Variante 2 (52 kDa) in Abhängigkeit von der Substanzgabe gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die detektierte 52-kDa-Variante von NHE1 kein Analogon der in UniProt beschriebenen 61-kDa-Isoform ist, welche keine Phosphorylierungsstellen mehr besitzt.

Die Datenbank Ensembl (*140*) beschreibt für NHE1 insgesamt sieben Transkripte des SLC9A1-Gens (*140*). Die Splicevariante SLC9A1-201 wird mit einem Molekulargewicht von 53 kDa angegeben, somit könnte es sich bei der in der vorliegenden Arbeit detektierten 52 kDa-Variante des NHE1 um die Splicevariante SLC9A1-201 handeln. Dieser Splicevariante fehlen Bereiche des Exon 1, des Exon 12 sowie die komplette Sequenz des Exon 2 (Sequenzvergleiche siehe Anhang 11.3 und 11.4). In der translatierten Proteinsequenz fehlen daher die Transmembrandomänen (TMD) eins bis acht, somit ist ein Ionentransport nicht mehr möglich, welcher im Bereich der TMD vier und fünf bzw. sechs und sieben stattfindet (*63*). Die Expression von NHE1-Splicevarianten wurde bereits in einigen Publikationen beschrieben. So wiesen Moulin *et al.* (*221*) in endokrinen Zellen des Pankreas und in der Nebenniere von Menschen und Ratten eine 65 kDa große NHE1-Splicevariante nach, welche den C-terminalen Bereich noch enthielt. Diese verkürzte Splicevariante ist nicht zellmembranständig sondern in sekretorischen Vesikeln lokalisiert (*221*). In weiteren Veröffentlichungen wurden verschiedene Splicevarianten des NHE1 u.a. im murinen Gehirn und der Lunge gefunden sowie im Myokard von Kaninchen (*222, 223*).

Zerbini *et al. (224)* konnten in humanen Erythrozyten ebenfalls eine NHE1-Splicevariante mit intaktem C-Terminus detektieren, welche zudem eine Transportaktivität aufwies. Eine weitere 52 kDa große Splicevariante von NHE1, welche vorrangig in humanen Glioblastomzellen exprimiert wird, ist somit vorstellbar. Um zu prüfen, ob es sich in den Glioblastomzellen um die NHE1-Splicevariante SLC9A1-201 handelt, könnten auf Proteinebene eine MALDI-TOF-Analyse und auf Genomebene MikroArray-Analysen mit speziellen Exon-Arrays oder mit Tilling-Arrays erfolgen (*225*).

Die unterschiedliche Lokalisation der NHE1-positiven Signale in den Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG im Vergleich zu den Zervixkarzinomzellen HeLa und den humanen embryonalen Nierenzellen HEK-293 kann auf gewebespezifische Unterschiede in der Expression und in der Lokalisation von NHE1 und dessen Splicevarianten hinweisen. Die mögliche Lokalisation der kurzen Splicevariante (52 kDa NHE1-Variante 2) vor allem in Mitochondrien humaner Glioblastomzellen kann darauf hindeuten, dass diese Variante an Prozessen beteiligt ist, welche die mitochondrial-vermittelte Apoptose in Glioblastomen regulieren. Falls es sich bei der NHE1-Variante 2 um die beschriebene Splicevariante SLC9A1-201 handelt, stellt sich die Frage, inwieweit diese Variante an zellulären Prozessen beteiligt ist. Diese Splicevariante besitzt nur vier der eigentlich zwölf TMD von NHE1 und weist wahrscheinlich keine Transportaktivität auf. Durch eine Klonierung und Überexpression der NHE1-Splicevarianten könnte analysiert werden, ob die zugehörigen Proteine in zellulären Vorgängen involviert sind.

Durch Inkubation der Glioblastomzellen mit den ausgewählten Substanzen änderte sich die Proteinexpression der NHE1-Variante 2 (52 kDa) zum Teil gegensätzlich zur NHE1-Isoform 1 (90 kDa). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die jeweilige Substanz die Bildung einer bestimmten Splicevariante begünstigt. So zeigte sich unter Teniposid eine Abnahme der NHE1-Isoform 1 parallel zur Zunahme der NHE1-Variante 2. Bei den NSAIDs Diclofenac, Indomethacin, Celecoxib und Rofecoxib wurde die NHE1-Isoform 1 nicht wesentlich beeinflusst, während die Proteinexpression der Variante 2 (52 kDa) vermindert wurde.

Besonders bei Tumoren und neurodegenerativen Erkrankungen treten Störungen im alternativen Splicen auf. Der Vorgang des alternativen Splicens wird u.a. durch regulatorische Splice-Faktoren aber auch gewebsspezifische Faktoren gesteuert (*220*). In Glioblastomen konnte beispielsweise eine vermehrte Expression von regulatorischen Splice-Faktoren gefunden werden, welche die Bildung einer Splicevariante der Pyruvatkinase begünstigen und dadurch die Umstellung des Metabolismus auf aerobe Glykolyse fördern (*226, 227*). Generell weisen Tumorzellen einen erhöhten Gehalt an verschiedenen Splice-Komponenten auf (*220*). Durch das alternative Splicen können Isoformen verschiedener Proteine entstehen, die einen Zellzyklusarrest und Apoptoseprozesse verhindern und an der

Chemoresistenz beteiligt sind (*220*). Verschiedene Medikamente wie Antibiotika, Tumortherapeutika aber auch NSAIDs (Indoprofen) beeinflussen die Wirkung auf Splicevorgänge verschiedener Gene (*220, 228*).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Topoisomerase-II-Inhibitor Teniposid die Zellviabilität von Glioblastomzellen vermindert und den pH_i drastisch absenkt. Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von NHE1 erhöht und die Proteinexpression der NHE1-Isoform 1 vermindert während die Proteinexpression der NHE1-Variante 2 (52 kDa) verstärkt wurde. Diese Ergebnisse zusammengefasst, sprechen dafür, dass Teniposid ein Regulator von Splice-Vorgängen sein könnte, welche möglicherweise die Bildung der NHE1-Variante 2 begünstigen. Da keine funktionellen Untersuchungen der NHE1-Variante 2 (52 kDa) durchgeführt wurden, können bisher keine Aussagen über deren Bedeutung bei zellulären Prozessen wie der pH-Regulation getroffen werden. So könnte aber die verkürzte NHE1-Variante 2 eine erniedrigte Transportaktivität haben, entweder durch verminderten Einbau in die Zellmembran und/oder durch das Fehlen C-terminaler regulatorischer Bereiche. Durch die verminderte NHE1-Aktivität könnte die intrazelluläre Ansäuerung und weitere Apoptose-fördernde Prozesse unterstützt und damit die zytotoxische Wirkung von Teniposid erhöht werden. Dies würde zudem erklären, warum in den Teniposid-behandelten Zellen der intrazellulären Ansäuerung nach Propionsäurezugabe nicht entgegen gewirkt wurde. Detailliertere Untersuchungen zur Expression, Lokalisation und Funktion der verkürzten NHE1-Variante sind notwendig und könnten Hinweise auf neue molekulare Zielstrukturen beim Glioblastom geben.

5.3 *In-vivo*-Untersuchungen zum Einfluss von Ibuprofen auf das Wachstum von Glioblastomzellen

Bei der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten gegen Tumoren geben Ergebnisse aus *In–vitro*-Experimenten erste Hinweise auf potentiell wirksame Behandlungsstrategien. Mit Hilfe der Zellkultur können die Wirkungen von Chemotherapeutika und anderen Therapieoptionen auf zelluläre Prozesse detailliert untersucht werden. Ein großes Problem von *In-vitro*-Untersuchungen an Tumorzellen ist, dass Prozesse, welche die Entstehung, Progression und Aufrechterhaltung eines Tumors fördern, auch von der Interaktion des malignen Gewebes mit dem restlichen Organismus abhängig sind. So sind Untersuchungen zur Angiogenese, Invasion und Metastasierung sowie zum extrazellulären Milieu *in vitro* nur bedingt durchführbar. Auch die Abwehr des Tumors durch das Immunsystem des Organismus kann durch *In-vitro*-Versuche kaum erfasst werden. All diese Tumorinteraktionen können in geeigneten *In-vivo*-Modellen betrachtet werden. Somit stellen

Tiermodelle eine wichtige Option zur weiteren Charakterisierung neuer Behandlungsstrategien dar (*229*).

Für *In-vivo*-Untersuchungen an Glioblastomen können entweder xenogene oder syngene Modelle verwendet werden. In xenogenen Modellen werden u.a. die humanen Zelllinien U87MG oder U251 in immundefiziente Mäuse subkutan oder intrakraniell implantiert. Im syngenen Mausmodell wird die murine Glioblastomzelllinie GL261 in immunkompetente C57BL/6-Mäuse inokuliert. Die sich aus den implantierten humanen oder murinen Tumorzellen entwickelnden Glioblastome zeigen histopathologische Übereinstimmungen mit humanen Glioblastomen (*129, 230*).

In dieser Arbeit wurde das syngene intrakranielle Mausmodell in immunkompetenten Tieren angewendet, so dass die Interaktionen mit dem Immunsystem und dem umliegenden Parenchym das Tumorwachstum in den Mäusen beeinflussen konnten. Dieses Tiermodell entspricht somit dem Tumorwachstum in einem ansonsten gesunden menschlichen Organismus. Der sich aus den injizierten GL261-Zellen entwickelnde Tumor zeigt ein rasches und aggressives Wachstumsverhalten (*231*). Die intrakranielle Implantation von $1x10^4$-$1x10^5$ Zellen führt bereits nach 25-31 Tagen zu einer Mortalitätsrate von 100% (*231, 232*). In dieser Arbeit wurden zur Implantation $1x10^4$ GL261-GFP-Zellen verwendet. Der daraus resultierende Tumor nahm nach 33 Tagen einen Großteil des Gehirnvolumens ein. Die Tiere waren apathisch und wurden aus ethischen Gründen getötet. Das zeitabhängige Tumorwachstum wurde anhand von HE-Färbungen der murinen Gehirnschnitte untersucht und es zeigte sich, dass nach sieben Tagen noch kein Gehirntumor mikroskopisch sichtbar war. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Cha *et al. (233)* proliferierten die Tumorzellen in der zweiten Woche nach Implantation verstärkt, so dass ab Tag 10 ein Gehirntumor mikroskopisch erkennbar war, der im weiteren Zeitverlauf rasch an Größe zunahm. Typische Merkmale eines Grad IV Glioms wie Nekrosen, Einblutungen und Infiltration des umliegenden Gewebes wurden durch HE-Färbungen im GL261-Glioblastom-Modell nachgewiesen und bestätigen die Beobachtungen von Zagzag *et al. (234)* und Candolfi *et al.* (*230*).

Mit dem in dieser Arbeit etablierten GL261-GFP-Glioblastom-Modell wurden erste Studien zur *In-vivo*-Wirksamkeit von NSAIDs auf Glioblastomzellen durchgeführt. Als NSAID wurde die COX-unselektive Verbindung Ibuprofen ausgewählt. Ibuprofen zählt zu den am häufigsten eingesetzten analgetisch, antipyretisch und antiinflammatorisch wirkenden Medikamenten. Im Vergleich zu allen anderen NSAIDs wird Ibuprofen das geringste Risiko für schwere gastrointestinale Nebenwirkungen zugeschrieben (*33, 235*). In diversen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass Ibuprofen und seine Derivate antikanzerogene Effekte auf Prostata- (*151*), Mamma- (*236, 237*) und Kolonkarzinomzellen (*153, 238*) ausüben (*213*). Zudem wurden chemopräventive Effekte bei Brustkrebs (*181*),

Prostata- (*239*), Kolorektal- (*21, 179, 240*) und Blasenkrebs (*241*) in epidemiologischen Studien beschrieben.

Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen NSAID-Einnahme und einem reduzierten Risiko an einem Glioblastom zu erkranken, lieferten kontroverse Ergebnisse. Während in den Studien von Sivak-Sears *et al.* (*242*) und Scheurer *et al.* (*182*) ein inverser Zusammenhang von NSAID-Einnahme und Erkrankung an einem Glioblastom gezeigt wurde, konnte in der Arbeit von Daugherty *et al.* (*183*) keine derartige Assoziation festgestellt werden. *In-vivo*-Untersuchungen an Mäuse- und Rattenmodellen belegen übereinstimmend die wachstumshemmende Wirkung verschiedener NSAIDs auf Glioblastome. So vermindert Aspirin das Glioblastom-Wachstum in Rattenmodellen (*243, 244*). Bereits 1988 wurde von Farrel *et al*. (*30*) in dem C6-Ratten-Glioblastommodell eine Verringerung der Tumorgröße nach Behandlung mit Ibuprofen gezeigt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *In-vitro*-Untersuchungen an humanen und murinen Glioblastomzellen sprachen jedoch gegen eine antitumorale Wirkung, da eine Zunahme der Zellviabilität unter Ibuprofen beobachtet wurde. Daher wurden tierexperimentelle Analysen zur Wirkung von Ibuprofen an einem Glioblastom-Mausmodell durchgeführt. In dieser Arbeit konnte nun erstmals im murinen GL261-Glioblastom-Modell eine Verringerung der Tumorgröße durch die Behandlung mit Ibuprofen nachgewiesen werden. Einen antitumoralen Effekt von NSAIDs auf das Tumorwachstum im GL261-Mausmodell wurde in Arbeiten von Chirasani *et al.* (*245*) sowie Virrey *et al*. (*246*) auch durch die Behandlung mit Diclofenac bzw. mit dem Celecoxib-Derivat 2,5-Dimethylcelecoxib erzielt.

Wie bereits erläutert, zeigte Ibuprofen in den *In-vitro*-Untersuchungen eine viabilitätsfördernde Wirkung sowohl bei den humanen Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG als auch bei der murinen Glioblastomzelllinie GL261-GFP, bei welcher der Effekt sogar noch stärker ausgeprägt war. Dieser Widerspruch zu den *In-vivo*-Ergebnissen könnte auf systemische Wirkungen von Ibuprofen im Mausmodell beruhen. Während in der Zellkultur die Glioblastomzellen isoliert und aus dem Gewebeverband herausgelöst betrachtet wurden, spielt in den Tierversuchen auch die Interaktion von Tumorzellen mit dem umgebenden Parenchym eine wesentliche Rolle beim Ansprechen auf Pharmaka. Unerlässlich für die Tumorentwicklung und –progression ist dabei die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese). Glioblastome zählen zu den am stärksten vaskularisierten Tumoren und weisen eine höhere Gefäßdichte als niedrig-gradigere Gehirntumoren sowie eine verstärkte Endothelzellproliferation auf (*247, 248*). Untersuchungen an murinen Modellen für Kolorektalkarzinome (*153*) und Ovarialkarzinome (*249*) zeigen, dass die Behandlung der Tiere mit Ibuprofen zu einer verringerten Tumorgröße einhergehend mit einer reduzierten Dichte an Mikrogefäßen führt. Diese anti-angiogene Wirkung kann zum einen auf COX-abhängigen Mechanismen beruhen, da Prostaglandine die Angiogenese fördern, aber zum

anderen auch auf COX-unabhängigen Effekten wie einer Regulation von Transkriptionsfaktoren. In vielen soliden Tumoren kommt es zur Ausbildung hypoxischer Regionen. In diesen Regionen werden die Transkriptionsfaktoren HIF1α und HIF2α verstärkt exprimiert, die u.a. angiogenetische Prozesse fördern und den Metabolismus der Tumorzelle an die veränderten Bedingungen anpassen (*250*). In Prostatakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass Ibuprofen sowohl die Expression von HIF1α als auch von HIF2α reduziert und dadurch u.a. auch die Expression von VEGF und GLUT1 vermindert wird. VEGF fördert die Bildung von Gefäßen und GLUT1 ist für die vermehrte Glukoseaufnahme in hypoxischen Zellen relevant (*250*). Von diesen Erkenntnissen ableitend, ist eine Hemmung der Angiogenese durch Ibuprofen im Glioblastom-Mausmodell sowie eine reduzierte Anpassungsfähigkeit der Tumorzellen an hypoxische Bedingungen durch die Ibuprofen-Behandlung vorstellbar. Diese Eingriffe in die Tumorhomöostase könnten die Ursache für die verminderte Glioblastomgröße *in vivo* nach Behandlung mit Ibuprofen sein.

6 Zusammenfassung

Glioblastome gehören zu den aggressivsten und tödlichsten Gehirntumoren. Trotz intensiver Forschung an neuen Therapieoptionen liegt die mittlere Überlebenszeit nach wie vor bei nur 12 bis 15 Monaten. Wie andere solide Tumoren weist das Glioblastom Abweichungen im extra- (pH_e) und intrazellulären (pH_i) pH im Vergleich zu gesundem Gewebe auf. In Tumoren liegt der pH_i im alkalischen Bereich und das extrazelluläre Milieu ist saurer. Diese pH-Unterschiede begünstigen die Tumorentstehung und -progression und sind an der Ausprägung typischer Merkmale von Glioblastomen wie der hohen Infiltrierungsrate, der unkontrollierten Proliferation und den Resistenzmechanismen beteiligt. Die Aufrechterhaltung des pH_i wird u.a. durch pH-regulatorische Transporter wie den Natrium-Protonenaustauschern (NHE), den Monocarboxylattransportern (MCT) und dem Natriumabhängigen Chlorid-Bicarbonat-Austauscher (NDCBE) gewährleistet. Diese Transporter sind wichtige Regulatoren des pH_i in gesunden, wie auch in malignen Zellen und werden in vielen Tumoren verstärkt exprimiert und/oder weisen eine erhöhte Aktivität auf.

Ziel dieser Arbeit war es daher, in humanen Gliomproben die Expression der Transporter NHE1, NHE5, MCT1, MCT4, MCT5 und NDCBE zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Regulation dieser Transporter durch antitumorale Substanzen (Zytostatika, NSAIDs) in den humanen Glioblastomzelllinien LN18 und U87MG betrachtet werden, um ihre Bedeutung für die Zellproliferation zu evaluieren.

Auf mRNA-Ebene konnte eine erhöhte Expression von NHE1, MCT1, MCT4 und MCT5 in humanem Glioblastomgewebe im Vergleich zu nicht-malignem Gehirngewebe nachgewiesen werden. Der Transporter MCT4 zeigten zudem einen Anstieg im mRNA-Gehalt der Grad-IV-Glioblastome verglichen mit Hirntumoren der Grade I-III.

Für NHE1, NHE5 und MCT5 wurden des Weiteren interindividuelle Expressionsunterschiede detektiert. Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein Alter oberhalb des Medians aufwiesen, zeigten eine erhöhte Expression von NHE5 und MCT5. Zudem lag eine erhöhte NHE1-, NHE5- und MCT5-Expression bei denjenigen Patienten vor, deren Überlebenszeit kürzer als die mediane Gesamtüberlebenszeit war.

Als antitumorale Wirkstoffe zur Beeinflussung der Transporterexpression sowie der Transporteraktivität *in vitro* wurden verschiedene Zytostatika und auch nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) als neue Therapieoption betrachtet. Als einziges Zytostatikum zeigte Teniposid sowohl Effekte auf die Expression der pH-regulatorischen Transporter als auch auf die Transportaktivität von NHE1 und MCT1. Zudem führte Teniposid zu einer verminderten Phosphorylierung von NHE1, was die reduzierte Transportaktivität erklären könnte. Die Proteinexpression der möglicherweise durch alternatives Splicen entstandenen

52 kDa großen NHE1-Variante 2 wurde durch Teniposid begünstigt. Diese NHE1-Variante zeigte zudem eine vermehrte mitochondriale Lokalisation. Des Weiteren konnte in Transportstudien mit Laktat eine Beeinflussung der MCT1-Aktivität durch Teniposid beobachtet werden. Ob eine direkte Interaktion von Teniposid mit MCT1 vorliegt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Durch Teniposid wurde zudem der pH_i erniedrigt und die Zellviabilität gesenkt. Inwiefern die Modulationen von NHE1 und MCT1 mit der antitumoralen Wirkung von Teniposid in Zusammenhang stehen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Das NSAID Diclofenac reduzierte ebenfalls die Zellviabilität und verminderte die NHE1-Transportaktivität unabhängig von der NHE1-Phosphorylierung. Unter Celecoxib kam es zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation von NHE1- sowie LAMP2-positiven Signalen. Die Akkumulation dieser Strukturen in Kernnähe und die reduzierte Zellviabilität könnten auf Autophagozytose unter Celecoxib hinweisen und sollten detaillierter untersucht werden.

Trotz bekannter anti-tumoraler Wirkung von Ibuprofen in verschiedenen *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien, erhöhte dieses NSAID interessanterweise die Zellviabilität der Glioblastomzellen. Die Transporterexpression und -aktivität blieb jedoch unbeeinflusst. Auf Grund dieser Befunde wurde zur weiteren Untersuchung von Ibuprofen ein intrakranielles Maus-Glioblastommodell unter Verwendung der murinen Glioblastomzellen GL261-GFP am Institut für Pharmakologie etabliert. In diesem *In-vivo*-Glioblastommodell konnte ein vermindertes Tumorwachstum bei den Ibuprofen-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Die Diskrepanz der *In-vitro*- und *In-vivo*-Daten könnte u.a. auf die in der Literatur beschriebene anti-angiogenetischen Wirkung von Ibuprofen zurückgeführt werden und zeigt die Wichtigkeit von tierexperimentellen Untersuchungen bei der Aufklärung von Medikamentenwirkungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erste Hinweise, dass pH-regulatorischen Transporter wie NHEs und MCTs in humanen Glioblastomen eine Bedeutung bei der Tumorprogression und beim Ansprechen auf antitumorale Substanzen haben können. Diese Hypothese muss jedoch durch weitere Analysen bestätigt werden.

Die durch Teniposid und den NSAIDs modulierte Transporterexpression und –aktivität könnte eine Bedeutung für die antitumorale Wirksamkeit der Substanzen haben und sollte in weiterführenden Untersuchungen näher betrachtet werden. Eine detaillierte Aufklärung dieser Mechanismen kann neue Erkenntnisse über die Interaktionen von bekannten Substanzen mit neuen Zielstrukturen liefern.

7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

_____

Nicole Basler

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. H. K. Kroemer für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit die Arbeit am Institut für Allgemeine Pharmakologie anzufertigen.

Ein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. S. Bien-Möller für die Betreuung im Labor und für die Zeit, die sie in die Arbeit investiert hat.

Ein Weiterer besonderer Dank richtet sich an Herrn Claudius Friedel, Assistenzarzt in der Klinik für Neurochirurgie, für die Betreuung und Unterstützung bei den Tierversuchen. In diesen Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Greifswald für die Bereitstellung der Patientenproben bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. H. Meyer zu Schwabedissen und bei Herrn Dr. M. Grube möchte ich mich für die wertvollen Ratschläge und Anregungen bedanken.

Ein großes Dankeschön möchte ich an K. Böttcher, T. Sonnenberger und B. Uecker sowie an das gesamte Laborteam der Allgemeinen Pharmakologie und der Klinischen Pharmakologie für die freundliche Atmosphäre und die Unterstützung bei der Laborarbeit richten.

Bei Herrn Dr. M. Synowitz und I. Haupt (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) möchte ich mich für die freundliche Betreuung am Max-Delbrück-Zentrum und den vielen Tipps und Tricks beim Arbeiten mit dem Mausmodell und den GL261-Zellen bedanken.

Für das fleißige Pipettieren von unzähligen Assays möchte ich mich bei meiner Praktikantin S. Lenz sowie meinen HiWis L. Christmann und R. Diesner bedanken.

Einen großen Dank möchte ich an Prof. Rettig und allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Universitätsmedizin Greifswald richten, ohne deren Hilfe und Verständnis das Abschließen meiner Doktorarbeit begleitend zu meinen neuen Aufgaben in der Physiologie nicht so gut zu handhaben gewesen wären.

Meinen Freunden möchte ich für den großen Rückhalt und die stetige Aufmunterung danken.

Ein besonders großes Dankeschön möchte ich an meine Familie richten, die immer für mich da ist und an meinem Freund, ohne den ich das alles niemals geschafft hätte.

Zum Schluß ein kleiner Dank auch an mich, dass ich nicht aufgegeben habe.

9 Publikationen

Poster/Abstracts

The effects of non steroidal anti inflammatory drugs on pH-dependent transporter in glioma cells

Nicole Basler, Sandra Bien, Claudius Friedel, Henry W. S. Schröder, Heyo K. Kroemer

*51. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (*DGPT*)/ Mainz*

Influence of cytostatic agents on pH-regulating transporter in glioma cells.

Nicole Basler, Sandra Bien, Claudius Friedel, Henry W. S. Schröder, Heyo K. Kroemer

35. Tagung der European Society for Medical Oncology (ESMO)/ Mailand

Influence of NSAIDs on cell viability and expression of pH-dependent transporter in glioma cells

Nicole Basler, Sandra Bien, Henriette Meyer zu Schwabedissen, Henry W. S. Schröder, Heyo K. Kroemer, Claudius Friedel

6. Brain Tumor Tagung/Berlin

10 Literaturverzeichnis

1. "Zentrum für Krebsregisterdaten, Krebs in Deutschland 2007/2008".
2. D. N. Louis *et al.*, *Acta Neuropathol* **114**, 97 (Aug, 2007).
3. D. N. Louis, *Annu Rev Pathol* **1**, 97 (2006).
4. F. B. Furnari *et al.*, *Genes Dev* **21**, 2683 (Nov 1, 2007).
5. M. Hegde, J. Roscoe, P. Cala, F. Gorin, *J Pharmacol Exp Ther* **310**, 67 (Jul, 2004).
6. H. Ohgaki, P. Kleihues, *Acta Neuropathol* **109**, 93 (Jan, 2005).
7. H. Ohgaki *et al.*, *Cancer Res* **64**, 6892 (Oct 1, 2004).
8. H. Ohgaki, P. Kleihues, *Am J Pathol* **170**, 1445 (May, 2007).
9. A. A. Brandes *et al.*, *Crit Rev Oncol Hematol* **67**, 139 (Aug, 2008).
10. M. S. Ahluwalia, D. M. Peereboom, in *Diagnosis and Treatment* G. H. Barnett, Ed. (Humana Press, 2007).
11. R. B. Weiss, B. F. Issell, *Cancer Treat Rev* **9**, 313 (Dec, 1982).
12. F. Drablos *et al.*, *DNA Repair (Amst)* **3**, 1389 (Nov 2, 2004).
13. G. V. Koukourakis *et al.*, *Molecules* **14**, 1561 (2009).
14. H. S. Friedman, T. Kerby, H. Calvert, *Clin Cancer Res* **6**, 2585 (Jul, 2000).
15. R. Nishikawa, *Neurol Med Chir (Tokyo)* **50**, 713.
16. J. Dinnes, C. Cave, S. Huang, R. Milne, *Br J Cancer* **86**, 501 (Feb 12, 2002).
17. R. Stupp *et al.*, *N Engl J Med* **352**, 987 (Mar 10, 2005).
18. J. J. Holthuis, *Pharm Weekbl Sci* **10**, 101 (Jun 17, 1988).
19. C. E. Gidding, S. J. Kellie, W. A. Kamps, S. S. de Graaf, *Crit Rev Oncol Hematol* **29**, 267 (Feb, 1999).
20. A. Moore, R. Pinkerton, *Pediatr Blood Cancer* **53**, 1180 (Dec 15, 2009).
21. C. M. Ulrich, J. Bigler, J. D. Potter, *Nature Reviews Cancer* **6**, 130 (2006).
22. S. Grosch, T. J. Maier, S. Schiffmann, G. Geisslinger, *J Natl Cancer Inst* **98**, 736 (Jun 7, 2006).
23. L. Parente, M. Perretti, *Biochem Pharmacol* **65**, 153 (Jan 15, 2003).
24. K. B. Kang *et al.*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**, 888 (Mar 1, 2007).
25. M. Ishibashi *et al.*, *Exp Cell Res* **302**, 244 (Jan 15, 2005).
26. P. New, *Cancer Control* **11**, 152 (May-Jun, 2004).
27. N. Nathoo, G. H. Barnett, M. Golubic, *J Clin Pathol* **57**, 6 (Jan, 2004).
28. A. Bernardi, M. C. Jacques-Silva, A. Delgado-Canedo, G. Lenz, A. M. Battastini, *Eur J Pharmacol* **532**, 214 (Feb 27, 2006).
29. T. Shono, P. J. Tofilon, J. M. Bruner, O. Owolabi, F. F. Lang, *Cancer Res* **61**, 4375 (Jun 1, 2001).
30. C. L. Farrell, J. Megyesi, R. F. Del Maestro, *J Neurosurg* **68**, 925 (Jun, 1988).
31. P. Giglio, V. Levin, *Am J Ther* **11**, 141 (Mar-Apr, 2004).
32. www.drugbank.ca.
33. E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2008), vol. 9. Auflage.
34. A. Kardosh, M. Blumenthal, W. J. Wang, T. C. Chen, A. H. Schonthal, *Cancer Biol Ther* **3**, 55 (Jan, 2004).
35. F. Stockhammer *et al.*, *J Neurooncol* **100**, 407 (Dec).
36. T. Walbert *et al.*, *J Neurooncol* **102**, 273 (Apr).
37. S. Bingham, P. J. Beswick, D. E. Blum, N. M. Gray, I. P. Chessell, *Semin Cell Dev Biol* **17**, 544 (Oct, 2006).
38. D. J. de Groot, E. G. de Vries, H. J. Groen, S. de Jong, *Crit Rev Oncol Hematol* **61**, 52 (Jan, 2007).
39. D. Casper *et al.*, *J Neurooncol* **46**, 215 (2000).

40. A. H. Schonthal, *Neurosurg Focus* **20**, E21 (2006).
41. I. Tegeder, J. Pfeilschifter, G. Geisslinger, *FASEB J* **15**, 2057 (Oct, 2001).
42. S. Zha, V. Yegnasubramanian, W. G. Nelson, W. B. Isaacs, A. M. De Marzo, *Cancer Lett* **215**, 1 (Nov 8, 2004).
43. H. E. Ives, F. C. Rector, Jr., *J Clin Invest* **73**, 285 (Feb, 1984).
44. I. H. Madshus, *Biochem J* **250**, 1 (Feb 15, 1988).
45. B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. (2002).
46. M. Obara, M. Szeliga, J. Albrecht, *Neurochem Int* **52**, 905 (May, 2008).
47. M. Chesler, *Physiol Rev* **83**, 1183 (Oct, 2003).
48. M. Stubbs, R. L. Veech, J. R. Griffiths, *Adv Enzyme Regul* **35**, 101 (1995).
49. S. Harguindey, G. Orive, J. Luis Pedraz, A. Paradiso, S. J. Reshkin, *Biochim Biophys Acta* **1756**, 1 (Sep 25, 2005).
50. S. J. Reshkin *et al.*, *FASEB J* **14**, 2185 (Nov, 2000).
51. R. Schreiber, *J Membr Biol* **205**, 129 (Jun, 2005).
52. E. L. DiGiammarino *et al.*, *Nat Struct Biol* **9**, 12 (Jan, 2002).
53. S. Altairac, S. Zeggai, P. Perani, Y. Courtois, A. Torriglia, *Cell Death Differ* **10**, 548 (May, 2003).
54. M. A. Barry, A. Eastman, *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 782 (Jul 31, 1992).
55. M. A. Barry, J. E. Reynolds, A. Eastman, *Cancer Res* **53**, 2349 (May 15, 1993).
56. F. Lang *et al.*, *Pflugers Arch* **440**, 902 (Oct, 2000).
57. M. S. Segal, E. Beem, *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1196 (Oct, 2001).
58. L. E. Gerweck, K. Seetharaman, *Cancer Res* **56**, 1194 (Mar 15, 1996).
59. S. Simon, D. Roy, M. Schindler, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1128 (Feb 1, 1994).
60. S. K. Parks, J. Chiche, J. Pouyssegur, *J Cell Physiol* **226**, 299 (Feb).
61. C. Sauvant *et al.*, *Int J Cancer* **123**, 2532 (Dec 1, 2008).
62. H. Izumi *et al.*, *Cancer Treat Rev* **29**, 541 (Dec, 2003).
63. E. R. Slepkov, J. K. Rainey, B. D. Sykes, L. Fliegel, *Biochem J* **401**, 623 (Feb 1, 2007).
64. J. Orlowski, S. Grinstein, *J Biol Chem* **272**, 22373 (Sep 5, 1997).
65. C. D. Garciarena *et al.*, *J Appl Physiol* **105**, 1706 (Dec, 2008).
66. J. Orlowski, S. Grinstein, *Pflugers Arch* **447**, 549 (Feb, 2004).
67. M. E. Malo, L. Fliegel, *Can J Physiol Pharmacol* **84**, 1081 (Nov, 2006).
68. B. Masereel, L. Pochet, D. Laeckmann, *Eur J Med Chem* **38**, 547 (Jun, 2003).
69. L. Counillon, J. Pouyssegur, *J Biol Chem* **275**, 1 (Jan 7, 2000).
70. D. Lagadic-Gossmann, L. Huc, V. Lecureur, *Cell Death Differ* **11**, 953 (Sep, 2004).
71. L. Fliegel, *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 33 (Jan, 2005).
72. J. R. Schelling, B. G. Abu Jawdeh, *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F625 (Sep, 2008).
73. M. Landau, K. Herz, E. Padan, N. Ben-Tal, *J Biol Chem* **282**, 37854 (Dec 28, 2007).
74. J. R. Casey, S. Grinstein, J. Orlowski, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 50 (Jan).
75. M. Baumgartner, H. Patel, D. L. Barber, *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C844 (Oct, 2004).
76. S. Lehoux, J. Abe, J. A. Florian, B. C. Berk, *J Biol Chem* **276**, 15794 (May 11, 2001).
77. S. Wakabayashi, B. Bertrand, T. Ikeda, J. Pouyssegur, M. Shigekawa, *J Biol Chem* **269**, 13710 (May 6, 1994).
78. E. Takahashi *et al.*, *J Biol Chem* **274**, 20206 (Jul 16, 1999).
79. T. Tominaga, D. L. Barber, *Mol Biol Cell* **9**, 2287 (Aug, 1998).
80. L. A. McLean, J. Roscoe, N. K. Jorgensen, F. A. Gorin, P. M. Cala, *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C676 (Apr, 2000).
81. M. E. Malo, L. Li, L. Fliegel, *J Biol Chem* **282**, 6292 (Mar 2, 2007).
82. I. N. Rich, D. Worthington-White, O. A. Garden, P. Musk, *Blood* **95**, 1427 (Feb 15, 2000).
83. L. K. Putney, D. L. Barber, *J Biol Chem* **278**, 44645 (Nov 7, 2003).
84. C. Stock, A. Schwab, *Pflugers Arch* **458**, 981 (Sep, 2009).
85. C. Stock *et al.*, *Cell Physiol Biochem* **20**, 679 (2007).
86. S. P. Denker, D. C. Huang, J. Orlowski, H. Furthmayr, D. L. Barber, *Mol Cell* **6**, 1425 (Dec, 2000).

87. J. J. Steffan, B. C. Williams, T. Welbourne, J. A. Cardelli, *Journal of Cell Science* **123**, 1151 (2010).
88. J. J. Steffan, J. L. Snider, O. Skalli, T. Welbourne, J. A. Cardelli, *Traffic* **10**, 737 (2009).
89. C. Stock *et al.*, *Eur J Cell Biol* **87**, 591 (Sep, 2008).
90. N. R. Baird *et al.*, *J Biol Chem* **274**, 4377 (Feb 12, 1999).
91. S. Attaphitaya, K. Nehrke, J. E. Melvin, *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1146 (Oct, 2001).
92. S. P. Mathupala, P. Parajuli, A. E. Sloan, *Neurosurgery* **55**, 1410 (Dec, 2004).
93. J. Fang *et al.*, *Mol Pharmacol* **70**, 2108 (Dec, 2006).
94. C. Pinheiro *et al.*, *Virchows Arch* **452**, 139 (Feb, 2008).
95. A. T. de Oliveira *et al.*, *J Bioenerg Biomembr*, (Jan 27, 2012).
96. N. Pertega-Gomes *et al.*, *BMC Cancer* **11**, 312.
97. C. Pinheiro *et al.*, *J Biomed Biotechnol* **2010**, 427694.
98. M. E. Morris, M. A. Felmlee, *AAPS J* **10**, 311 (Jun, 2008).
99. A. P. Halestrap, N. T. Price, *Biochem J* **343 Pt 2**, 281 (Oct 15, 1999).
100. A. P. Halestrap, *IUBMB Life* **64**, 1 (Jan, 2012).
101. D. Meredith, H. C. Christian, *Xenobiotica* **38**, 1072 (Jul, 2008).
102. B. E. Enerson, L. R. Drewes, *J Pharm Sci* **92**, 1531 (Aug, 2003).
103. A. P. Halestrap, D. Meredith, *Pflugers Arch* **447**, 619 (Feb, 2004).
104. A. P. Halestrap, M. C. Wilson, *IUBMB Life* **64**, 109 (Feb, 2012).
105. M. S. Ullah, A. J. Davies, A. P. Halestrap, *J Biol Chem* **281**, 9030 (Apr 7, 2006).
106. F. Maekawa, K. Minehira, K. Kadomatsu, L. Pellerin, *J Neurochem* **107**, 789 (Nov, 2008).
107. P. Kirk *et al.*, *EMBO J* **19**, 3896 (Aug 1, 2000).
108. M. C. Wilson, D. Meredith, A. P. Halestrap, *J Biol Chem* **277**, 3666 (Feb 1, 2002).
109. H. Izumi *et al.*, *Cancer Sci* **102**, 1007 (May).
110. S. M. Gallagher, J. J. Castorino, D. Wang, N. J. Philp, *Cancer Res* **67**, 4182 (May 1, 2007).
111. N. Draoui, O. Feron, *Dis Model Mech* **4**, 727 (Nov).
112. L. B. Gladden, *J Physiol* **558**, 5 (Jul 1, 2004).
113. K. M. Kennedy, M. W. Dewhirst, *Future Oncol* **6**, 127 (Jan).
114. M. K. Froberg *et al.*, *Neuroreport* **12**, 761 (Mar 26, 2001).
115. O. Feron, *Radiother Oncol* **92**, 329 (Sep, 2009).
116. G. L. Semenza, *J Clin Invest* **118**, 3835 (Dec, 2008).
117. M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, *Science* **324**, 1029 (May 22, 2009).
118. R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, C. B. Thompson, *Cell Metab* **7**, 11 (Jan, 2008).
119. M. F. Romero, *JOP* **2**, 182 (Jul, 2001).
120. L. M. Chen *et al.*, *Neuroscience* **153**, 162 (Apr 22, 2008).
121. Grichtchenko, II *et al.*, *J Biol Chem* **276**, 8358 (Mar 16, 2001).
122. L. M. Chen, G. G. Haddad, W. F. Boron, *Brain Res* **1238**, 85 (Oct 31, 2008).
123. A. Sinning *et al.*, *J Neurosci* **31**, 7300 (May 18).
124. H. J. Lee, H. J. Park, S. Lee, Y. H. Kim, I. Choi, *Brain Res* **1377**, 13 (Mar 4).
125. M. D. Parker, P. Bouyer, C. M. Daly, W. F. Boron, *Physiol Genomics* **34**, 265 (Aug 15, 2008).
126. J. Schlessinger, *Curr Opin Genet Dev* **4**, 25 (Feb, 1994).
127. W. F. Boron, L. Chen, M. D. Parker, *J Exp Biol* **212**, 1697 (Jun, 2009).
128. A. C. Diserens *et al.*, *Acta Neuropathol* **53**, 21 (1981).
129. V. L. Jacobs, P. A. Valdes, W. F. Hickey, J. A. De Leo, *Asn Neuro* **3**, 171 (2011).
130. G. Shaw, S. Morse, M. Ararat, F. L. Graham, *FASEB J* **16**, 869 (Jun, 2002).
131. W. F. Scherer, J. T. Syverton, G. O. Gey, *J Exp Med* **97**, 695 (May, 1953).
132. K. J. Livak, T. D. Schmittgen, *Methods* **25**, 402 (2001).
133. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *Biotechnology* **24**, 145 (1992).
134. S. Gallagher, S. E. Winston, S. A. Fuller, J. G. Hurrell, *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 10**, Unit 10 8 (May, 2004).
135. J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur J Biochem* **267**, 5421 (Sep, 2000).
136. L. Carpenter, A. P. Halestrap, *Biochem J* **304 (Pt 3)**, 751 (Dec 15, 1994).

137. L. Pellerin, A. P. Halestrap, K. Pierre, *Journal of Neuroscience Research* **79**, 55 (2005).
138. R. S. Haworth, O. Frohlich, L. Fliegel, *Biochem J* **289 (Pt 3)**, 637 (Feb 1, 1993).
139. Abcam, in *http://www.abcam.com/Sodium-Hydrogen-Exchanger-1-antibody-ab67314.html (accessed 2010)*.
140. P. Flicek *et al.*, *Nucleic Acids Res* **40**, D84 (Jan, 2012).
141. A. L. Grenier *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C883 (Oct, 2008).
142. S. Javadov *et al.*, *Basic Res Cardiol* **106**, 99 (Jan, 2011).
143. S. C. Kaul, C. C. Deocaris, R. Wadhwa, *Exp Gerontol* **42**, 263 (Apr, 2007).
144. C. Chinopoulos, *FEBS Lett* **585**, 1255 (May 6, 2011).
145. R. Hussien, G. A. Brooks, *Physiol Genomics* **43**, 255 (Mar 16, 2011).
146. T. Szatmari *et al.*, *Cancer Science* **97**, 546 (2006).
147. G. Xie *et al.*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **337**, 876 (2011).
148. I. V. Lebedeva *et al.*, *PLoS ONE* **6**, e24285 (2011).
149. S. Harguindey, J. L. Arranz, M. L. Wahl, G. Orive, S. J. Reshkin, *Anticancer Res* **29**, 2127 (Jun, 2009).
150. M. Yamagata, I. F. Tannock, *Br J Cancer* **73**, 1328 (Jun, 1996).
151. J. Andrews, D. Djakiew, S. Krygier, P. Andrews, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **50**, 277 (2002).
152. G. N. Levy, *FASEB J* **11**, 234 (Mar, 1997).
153. M. Yao *et al.*, *Clin Cancer Res* **11**, 1618 (Feb 15, 2005).
154. L. F. Zerbini *et al.*, *PLoS ONE* **6**, e24285 (2011).
155. J. M. Markert *et al.*, *Physiol Genomics* **5**, 21 (Feb 7, 2001).
156. G. H. Diering, F. Mills, S. X. Bamji, M. Numata, *Mol Biol Cell* **22**, 2246 (Jul 1).
157. K. Herholz *et al.*, *Ann Neurol* **31**, 319 (Mar, 1992).
158. C. Cheng *et al.*, *Cell Oncol (Dordr)* **35**, 217 (Jun, 2012).
159. L. D. Shrode, R. W. Putnam, *Glia* **12**, 196 (Nov, 1994).
160. O. Chiry *et al.*, *Brain Res* **1070**, 65 (Jan 27, 2006).
161. D. Z. Gerhart, B. E. Enerson, O. Y. Zhdankina, R. L. Leino, L. R. Drewes, *Am J Physiol* **273**, E207 (Jul, 1997).
162. E. M. Koehler-Stec, I. A. Simpson, S. J. Vannucci, K. T. Landschulz, W. H. Landschulz, *Am J Physiol* **275**, E516 (Sep, 1998).
163. K. Pierre, L. Pellerin, *J Neurochem* **94**, 1 (Jul, 2005).
164. W. Harley *et al.*, *Brain Research* **1363**, 159 (2010).
165. S. Winter, M. Weller, *Eur J Pharmacol* **398**, 177 (Jun 16, 2000).
166. A. Sankar, D. G. Thomas, J. L. Darling, *Anticancer Drugs* **10**, 179 (Feb, 1999).
167. M. Hermisson *et al.*, *J Neurochem* **96**, 766 (Feb, 2006).
168. C. Happold *et al.*, *J Neurochem*, (May 7, 2012).
169. M. Trepel *et al.*, *J Neurooncol* **39**, 19 (Aug, 1998).
170. Y. Cui *et al.*, *Brain Res* **1469**, 1 (Aug 21, 2012).
171. K. R. Hande, *Update on Cancer Therapeutics* **3**, 13 (2008).
172. H. Sevim, J. F. Parkinson, K. L. McDonald, *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 1705 (Nov, 2011).
173. K. L. Wu *et al.*, *J Biol Chem* **279**, 26280 (Jun 18, 2004).
174. S. J. Reshkin *et al.*, *Clin Cancer Res* **9**, 2366 (Jun, 2003).
175. S. D. Guile *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 2260 (Apr 15, 2006).
176. S. Cheeti, B. K. Warrier, C. H. Lee, *Int J Pharm* **325**, 48 (Nov 15, 2006).
177. Q. Wang *et al.*, *Mol Pharm* **3**, 675 (Nov-Dec, 2006).
178. F. M. Giardiello, G. J. Offerhaus, R. N. DuBois, *Eur J Cancer* **31A**, 1071 (Jul-Aug, 1995).
179. J. R. Brown, R. N. DuBois, *J Clin Oncol* **23**, 2840 (Apr 20, 2005).
180. J. A. Baron, R. S. Sandler, *Annu Rev Med* **51**, 511 (2000).
181. R. E. Harris, *Inflammopharmacology* **17**, 55 (Apr, 2009).
182. M. E. Scheurer *et al.*, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 1277 (May, 2008).
183. S. E. Daugherty *et al.*, *Cancer Prev Res (Phila)* **4**, 2027 (Dec, 2011).

184. J. L. Masferrer *et al.*, *Cancer Res* **60**, 1306 (Mar 1, 2000).
185. J. B. Meric *et al.*, *Crit Rev Oncol Hematol* **59**, 51 (Jul, 2006).
186. N. Babbar, N. A. Ignatenko, R. A. Casero, Jr., E. W. Gerner, *J Biol Chem* **278**, 47762 (Nov 28, 2003).
187. J. T. Lim *et al.*, *Biochem Pharmacol* **58**, 1097 (Oct 1, 1999).
188. A. H. Schonthal, T. C. Chen, F. M. Hofman, S. G. Louie, N. A. Petasis, *Expert Opin Investig Drugs* **17**, 197 (Feb, 2008).
189. A. Kardosh *et al.*, *Cancer Biol Ther* **4**, 571 (May, 2005).
190. K. Schror, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **25**, 473 (Aug).
191. K. B. Kang, C. Zhu, S. K. Yong, Q. Gao, M. C. Wong, *Mol Cancer* **8**, 66 (2009).
192. E. G. Van Meir *et al.*, *Cancer Res* **54**, 649 (Feb 1, 1994).
193. S. Taniura, H. Kamitani, T. Watanabe, T. E. Eling, *Neurol Med Chir (Tokyo)* **48**, 500 (2008).
194. T. Joki *et al.*, *Cancer Res* **60**, 4926 (Sep 1, 2000).
195. A. Roller *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 600 (Jun 16, 1999).
196. A. Kumar, S. Kant, S. M. Singh, *Chem Biol Interact* **199**, 29 (Jul 30).
197. I. Tamai *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **214**, 482 (Sep 14, 1995).
198. J. S. Choi, M. J. Jin, H. K. Han, *J Pharm Pharmacol* **57**, 1185 (Sep, 2005).
199. P. Goncalves, J. R. Araujo, M. J. Pinho, F. Martel, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**, 325 (Apr, 2009).
200. J. R. Perez Vallina, L. Menendez Antolin, B. Cantabrana, M. Sanchez, A. Hidalgo, *Gen Pharmacol* **30**, 25 (Jan, 1998).
201. B. Cantabrana, J. R. Perez Vallina, L. Menendez, A. Hidalgo, *Life Sci* **57**, 1333 (1995).
202. S. Ananth *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **394**, 75 (Mar 26).
203. M. A. Park *et al.*, *Mol Pharmacol* **73**, 1168 (Apr, 2008).
204. Y. Kondo, S. Kondo, *Autophagy* **2**, 85 (Apr-Jun, 2006).
205. Y. Kondo, T. Kanzawa, R. Sawaya, S. Kondo, *Nat Rev Cancer* **5**, 726 (Sep, 2005).
206. I. Monastyrska, E. Rieter, D. J. Klionsky, F. Reggiori, *Biol Rev Camb Philos Soc* **84**, 431 (Aug, 2009).
207. L. Jahreiss, F. M. Menzies, D. C. Rubinsztein, *Traffic* **9**, 574 (Apr, 2008).
208. R. Ruivo, C. Anne, C. Sagne, B. Gasnier, *Biochim Biophys Acta* **1793**, 636 (Apr, 2009).
209. L. Galluzzi *et al.*, *Cell Death Differ* **19**, 107 (Jan, 2012).
210. M. Manrique-Moreno *et al.*, *Biochim Biophys Acta* **1808**, 2656 (Nov, 2011).
211. P. Andrews, X. Zhao, J. Allen, F. Li, M. Chang, *Cancer Chemother Pharmacol* **61**, 203 (Feb, 2008).
212. A. Janssen *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 698 (Jan 25, 2008).
213. A. Janssen *et al.*, *Eur J Pharmacol* **540**, 24 (Jul 1, 2006).
214. M. John-Aryankalayil *et al.*, *Mol Cancer Ther* **8**, 261 (Jan, 2009).
215. J. F. Mann, M. Goerig, K. Brune, F. C. Luft, *Clin Nephrol* **39**, 1 (Jan, 1993).
216. I. Bjarnason, *J R Soc Med* **100 Suppl 48**, 11 (2007).
217. L. Counillon, J. Pouyssegur, R. A. Reithmeier, *Biochemistry* **33**, 10463 (Aug 30, 1994).
218. P. Saftig, J. Klumperman, *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 623 (Sep, 2009).
219. www.uniprot.org, *The UniProt Consortium ,Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt), Nucleic Acids Res. 40: D71-D75 (2012).*
220. E. Zaharieva, J. K. Chipman, M. Soller, *Toxicology* **296**, 1 (Jun 14, 2012).
221. P. Moulin *et al.*, *J Mol Endocrinol* **38**, 409 (Mar, 2007).
222. J. R. Dyck, G. D. Lopaschuk, L. Fliegel, *FEBS Lett* **310**, 255 (Oct 5, 1992).
223. S. M. Bell *et al.*, *Am J Physiol* **276**, C788 (Apr, 1999).
224. G. Zerbini, A. Maestroni, D. Breviario, R. Mangili, G. Casari, *Diabetes* **52**, 1511 (Jun, 2003).
225. G. Hermey, *Der Experimentator-Neurowissenschaften*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2011).
226. C. J. David, M. Chen, M. Assanah, P. Canoll, J. L. Manley, *Nature* **463**, 364 (Jan 21, 2010).
227. C. V. Clower *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1894 (Feb 2, 2010).

228. S. Solier *et al.*, *Mol Cancer Res* **2**, 53 (Jan, 2004).
229. E. I. Fomchenko, E. C. Holland, *Clin Cancer Res* **12**, 5288 (Sep 15, 2006).
230. M. Candolfi *et al.*, *J Neurooncol* **85**, 133 (Nov, 2007).
231. T. Szatmari *et al.*, *Cancer Sci* **97**, 546 (Jun, 2006).
232. G. E. Plautz, J. E. Touhalisky, S. Shu, *Cell Immunol* **178**, 101 (Jun 15, 1997).
233. S. Cha *et al.*, *Magn Reson Med* **49**, 848 (May, 2003).
234. D. Zagzag, D. C. Miller, L. Chiriboga, H. Yee, E. W. Newcomb, *Brain Pathol* **13**, 34 (Jan, 2003).
235. K. D. Rainsford, *Inflammopharmacology* **17**, 275 (Dec, 2009).
236. Y. Sun *et al.*, *Breast Cancer Res* **14**, R20 (Jan 31, 2012).
237. R. E. Harris *et al.*, *Cancer Res* **63**, 6096 (Sep 15, 2003).
238. G. Xie *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther* **337**, 876 (Jun, 2011).
239. S. M. Mahmud *et al.*, *PLoS ONE* **6**, e16412 (2011).
240. A. E. Coghill *et al.*, *Gut* **60**, 491 (Apr, 2011).
241. D. Baris *et al.*, *Int J Cancer*, (Apr 14, 2012).
242. N. R. Sivak-Sears, J. A. Schwartzbaum, R. Miike, M. Moghadassi, M. Wrensch, *Am J Epidemiol* **159**, 1131 (Jun 15, 2004).
243. A. T. Aas, T. I. Tonnessen, A. Brun, L. G. Salford, *J Neurooncol* **24**, 171 (1995).
244. O. Arrieta *et al.*, *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, 681 (Nov, 2001).
245. S. R. Chirasani *et al.*, *Int J Cancer*, (Jul 3, 2012).
246. J. J. Virrey *et al.*, *Mol Cancer Ther* **9**, 631 (Mar, 2010).
247. K. H. Plate, W. Risau, *Glia* **15**, 339 (Nov, 1995).
248. M. Onishi, T. Ichikawa, K. Kurozumi, I. Date, *Brain Tumor Pathol* **28**, 13 (Feb, 2011).
249. W. Li, R. J. Xu, Z. Y. Lin, G. C. Zhuo, H. H. Zhang, *Med Oncol* **26**, 170 (2009).
250. S. T. Palayoor, P. J. Tofilon, C. N. Coleman, *Clin Cancer Res* **9**, 3150 (Aug 1, 2003).

11 Anhang

11.1 Tabellarische Übersicht der mRNA-Expression pH-regulatorischen Transporter unter Zytostatikaeinfluss in LN18- und U87MG-Zellen

Tab. 11-1 Einfluss ausgewählter Zytostatika auf die mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter in LN18-Zellen: Die Zellen wurden für 48h mit den Zytostatika Carmustin (10, 100 µM), Lomustin (10, 100 µM), Temozolomid (10, 100 µM), Teniposid (1, 10, 100 µM) und Vincristin (6,5, 65 nM) sowie der Lösungsmittelkontrollen DMSO inkubiert. Die mRNA-Expression der Transporter wurde mittels real-time PCR bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. Mittelwerte+SD, n= 9-12 bzw. n=3-6 (MCT4), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

	NHE1	**NHE5**	**NDCBE**	**MCT1**	**MCT4**	**MCT5**
DMSO	1,12±0,54	1,25±0,94	1,08±0,43	1,43±1,22	1,05±0,39	1,26±1,02
Carmustin 10 µM	1,38±2,32	**0,58±0,21***	0,99±1,12	0,90±0,94	**0,29±0,27***	0,61±0,49
Carmustin 100 µM	0,76±0,31	0,92±0,58	1,01±1,31	1,17±0,70	1,09±1,27	**0,59±0,33***
Lomustin 10 µM	1,16±0,66	1,01±0,61	1,37±1,29	1,68±1,65	1,01±1,21	0,90±0,71
Lomustin 100 µM	1,01±0,53	1,11±0,53	0,88±0,82	1,23±0,84	1,12±1,14	1,01±0,54
Temozolomid 10 µM	1,66±2,40	1,85±2,90	1,68±1,57	1,59±1,54	3,96±5,60	1,34±1,96
Temozolomid 100 µM	1,29±0,65	1,05±0,62	1,56±1,91	0,92±0,72	1,09±0,97	0,87±0,57
Teniposid 1 µM	1,11±0,81	1,82±1,21	**0,52±0,17****	1,07±0,44	5,76±3,21	0,61±0,50
Teniposid 10 µM	0,81±0,44	1,01±0,52	**0,36±0,22*****	0,65±0,48	0,87±1,01	**0,37±0,23****
Teniposid 100 µM	1,16±0,58	1,71±1,49	**0,61±0,45***	1,74±1,36	0,01±0,002	1,06±0,56
Vincristin 6,5 nM	0,77±0,46	0,79±0,43	**0,47±0,46****	0,80±0,49	2,01±3,66	**0,46±0,39****
Vincristin 65 nM	1,17±0,96	2,37±1,98	0,85±0,61	1,39±0,74	3,89±4,04	0,70±0,46

Tab. 11-2 Einfluss ausgewählter Zytostatika auf die mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter in U87MG-Zellen: Die Zellen wurden für 48h mit den Zytostatika Carmustin (10, 100 µM), Lomustin (10, 100 µM), Temozolomid (10, 100 µM), Teniposid (1, 10, 100 µM) und Vincristin (6,5, 65 nM) sowie der Lösungsmittelkontrollen DMSO inkubiert. Die mRNA-Expression der Transporter wurde mittels real-time PCR bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. Mittelwerte+SD, n= 9-12 bzw. n=3-6 (MCT4), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

	NHE1	**NHE5**	**NDCBE**	**MCT1**	**MCT4**	**MCT5**
DMSO	1,06±0,37	1,09±0,50	1,07±0,46	1,04±0,29	1,10±0,48	1,03±0,28
Carmustin 10 µM	**2,09±1,05***	1,38±0,55	1,31±0,38	1,24±0,92	2,62±1,96	1,29±1,08
Carmustin 100 µM	**3,49±0,85*****	0,77±0,32	1,12±0,52	1,62±0,98	0,86±0,52	0,75±0,45
Lomustin 10 µM	2,63±3,50	1,06±0,89	1,05±0,66	1,63±2,50	1,34±0,93	0,75±0,46
Lomustin 100 µM	**2,55±1,15***	**0,55±0,53****	0,79±0,57	0,85±0,60	0,48±0,60	**0,57±0,39***
Temozolomid 10 µM	1,01±0,63	0,67±0,33	1,27±0,66	0,72±0,26*	1,79±2,18	**0,57±0,28***
Temozolomid 100 µM	0,98±0,30	0,83±0,45	1,32±0,40	1,17±0,54	1,20±0,90	0,86±0,54
Teniposid 1 µM	1,61±0,74	**0,58±0,24****	0,68±0,28	0,79±0,32	1,59±0,54	**0,68±0,22***
Teniposid 10 µM	1,61±0,67	**0,57±0,24***	0,67±0,26	0,89±0,46	**2,42±1,04***	2,00±1,14
Teniposid 100 µM	**2,38±1,23****	**0,65±0,30***	**0,68±0,58***	**0,52±0,52****	2,18±1,52	1,51±1,16
Vincristin 6,5 nM	0,67±0,21	**0,59±0,17***	0,69±0,26	**0,54±0,18****	1,65±0,35	**0,52±0,23****
Vincristin 65 nM	**0,46±0,16*****	**0,46±0,17****	**0,58±0,18****	**0,52±0,24****	1,41±0,93	**0,42±0,29*****

11.2 Tabellarische Übersicht der mRNA-Expression pH-regulatorischen Transporter unter NSAID-Einfluss in LN18- und U87MG-Zellen

Tab. 11-3 Einfluss ausgewählter NSAIDs auf die mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter in LN18-Zellen Nach Aussaat wurden die Zellen für 48h mit den COX-unselektiven NSAIDs Diclofenac (250, 500 µM), Ibuprofen (250, 500 µM) und Indomethacin (400, 800 µM) sowie den COX2-selektiven NSAIDs Celecoxib (50, 100 µM), Lumiracoxib (100, 200 µM) und Rofecoxib (200, 500µM) sowie den Lösungsmittelkontrollen DMSO und A. dest (Ibuprofen) inkubiert. Die mRNA-Expression der Transporter wurde mittels real-time PCR bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. Mittelwerte+SD, n=7-9, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

	NHE1	**NHE5**	**NDCBE**	**MCT1**	**MCT4**	**MCT5**
DMSO	1,05±0,34	1,09±0,46	1,08±0,45	1,09±0,46	1,52±1,22	1,09±0,42
Diclofenac 250 µM	**2,64±1,70****	1,74±1,05	**0,65±0,39***	1,74±1,05	1,11±0,50	1,58±1,01
Diclofenac 500 µM	**2,24±1,47****	1,12±0,38	**0,72±0,31***	1,12±0,38	**0,41±0,38***	1,22±0,68
Indomethacin 400 µM	1,59±0,79	1,56±0,65	**0,28±0,16*****	1,56±0,65	**0,41±0,17***	1,00±0,52
Indomethacin 800 µM	1,51±1,17	**1,36±0,47***	**0,20±0,07*****	1,36±0,47	**0,24±0,15***	0,65±0,37
Celecoxib 50 µM	1,45±0,47	1,68±0,51	**0,36±0,14*****	1,68±0,51*	1,43±0,56	1,57±0,56
Celecoxib 100 µM	2,81±3,94	**0,74±0,26*****	**0,06±0,03*****	**0,74±0,26***	**0,23±0,10****	1,30±1,05
Lumiracoxib 100 µM	**0,66±0,28***	**1,22±0,45***	**0,60±0,31***	1,22±0,45	2,05±1,13	0,93±0,48
Lumiracoxib 200 µM	1,18±0,88	1,58±0,89	**0,45±0,2*****	1,58±0,89	2,54±1,96	1,20±0,59
Rofecoxib 200 µM	**0,65±0,37***	1,28±1,38	**0,57±0,44****	1,28±1,38	1,76±1,17	1,64±1,74
Rofecoxib 500 µM	1,28±0,61	1,48±0,36	0,79±0,49	1,48±0,36	1,95±1,09	**2,08±0,65****
A. dest.	1,03±0,27	1,02±0,23	1,15±0,68	1,02±0,23	1,08±0,46	1,11±0,57
Ibuprofen 250 µM	**0,55±0,18****	0,58±0,37	**0,50±0,16****	**0,58±0,37****	1,57±1,87	0,74±0,36
Ibuprofen 500 µM	**0,67±0,20****	0,81±0,30	**0,64±0,34***	0,81±0,30	1,97±1,22	1,07±0,54

Tab. 11-4 Einfluss ausgewählter NSAIDs auf die mRNA-Expression pH-regulatorischer Transporter in U87MG-Zellen Nach Aussaat wurden die Zellen für 48h mit den COX-unselektiven NSAIDs Diclofenac (250, 500 µM), Ibuprofen (250, 500 µM) und Indomethacin (400, 800 µM) sowie den COX2-selektiven NSAIDs Celecoxib (50, 100 µM), Lumiracoxib (100, 200 µM) und Rofecoxib (200, 500µM) sowie den Lösungsmittelkontrollen DMSO und A. dest (Ibuprofen) inkubiert. Die mRNA-Expression der Transporter wurde mittels real-time PCR bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. Mittelwerte+SD, n=7-9, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

	NHE1	**NHE5**	**NDCBE**	**MCT1**	**MCT4**	**MCT5**
DMSO	1,12±0,64	1,07±0,40	1,11±0,48	1,10±0,60	1,03±0,27	1,20±0,88
Diclofenac 250 µM	**3,98±2,11*****	**0,41±0,26****	2,09±3,81	0,86±0,86	1,84±2,02	1,82±1,36
Diclofenac 500 µM	0,99±0,81	**0,42±0,45***	0,69±0,51	0,67±0,90	**0,35±0,34****	1,36±1,29
Indomethacin 400 µM	2,32±,37	**0,53±0,51***	**0,61±0,40***	0,89±0,90	**0,50±0,57***	0,67±0,49
Indomethacin 800 µM	1,51±1,32	**0,60±0,57***	0,65±0,42	1,17±1,21	**0,37±0,33****	1,68±1,38
Celecoxib 50 µM	1,30±1,41	**0,59±0,50***	0,69±0,80	**0,54±0,63****	**0,64±0,97***	0,65±0,87
Celecoxib 100 µM	0,97±0,62	**0,16±0,12*****	**0,12±0,09*****	**0,43±0,36*****	**0,11±0,15*****	1,01±1,10
Lumiracoxib 100 µM	0,61±0,58	**0,49±0,41***	0,63±0,55	0,43±0,39*	1,14±1,65	0,57±0,62
Lumiracoxib 200 µM	1,29±1,35	**0,53±0,45***	0,91±0,76	0,86±0,94	0,65±0,56	1,05±0,88
Rofecoxib 200 µM	0,86±0,79	**0,62±0,39***	0,76±0,74	**0,39±0,31****	**0,37±0,36****	0,69±0,76
Rofecoxib 500 µM	**0,58±0,33***	0,70±0,60	1,57±1,63	**0,53±0,47***	**0,18±0,14*****	0,90±0,68
A. dest.	1,10±0,53	1,08±0,45	1,02±0,22	1,11±0,50	1,14±0,64	1,18±0,75
Ibuprofen 250 µM	0,73±0,73	1,35±0,74	0,81±0,49	1,05±0,50	2,29±1,69	0,95±0,41
Ibuprofen 500 µM	1,03±0,61	**1,82±0,92***	1,41±1,22	1,27±0,77	3,27±	1,70±1,71

11.3 Nukleotidsequenzvergleich der NHE1-Transkripte

Dargestellt ist der Vergleich der cDNA-Nukleotidsequenzen der NHE1-Transkripte SLC9A1-001 (Isoform 1) und SLC9A1-201 (Variante 2). Die Sequenzen und die Angabe über die Lage und Größe der Exons wurden der Datenbank Ensembl entnommen (*140*). Das Startcodon und das Stoppcodon der NHE1-Sequenz sowie die ersten drei und die letzten drei Nukleotide des jeweiligen Exons sind hervorgehoben. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW durchgeführt.

```
                     Start Exon1
NHE1-001           1 CGGCGCGCCTGGACCCCTGCCCCTCTCTGGGTGGAGAAGCTCCCGGCCGC   50
NHE1-201           1 --------------------------------------------------    0

NHE1-001          51 TTCCCGGTTTCACTCCTTCTCAGCCTGGGCTCCCAGCCCCCTCTCTCCTT  100
NHE1-201           1 --------------------------------------------------    0

NHE1-001         101 TTCCTGGACTGGCTCTCACCCCCTTCGGTCCCCTTCCTTTAGCTCAGGCT  150
NHE1-201           1 --------------------------------------------------    0

NHE1-001         151 CCCTACCCCTTCCTTTAGCCCACAGCCCAGAGTCCCAGCTCCTCAGTCAC  200
NHE1-201           1 --------------------------------------------------    0

NHE1-001         201 TTTCCTCAGCCAAAGGTCCCAGCCTTCCTTCTTCCTTTCCTTTGCACTAT  250
NHE1-201           1 --------------------------------------------------    0

NHE1-001         251 CCCTATCCTGCCCCTTCCTCTATCCCTAGGGCTCAGTTTCCCACATCCGT  300
NHE1-201           1 --------------------------------------------------    0

NHE1-001         301 CCTCCCCCTTCCCAGGCCCGGAGTTCCAGACCTTTTGGTCTCCTTTCGTG  350
NHE1-201           1 --------------------------------------------------    0

NHE1-001         351 GTCGTTCCTGGGTCCTTGCCCCCTTTCCCCACTTTGGAGTTCCAGATTGC  400
NHE1-201           1 --------------------------------------------------    0

NHE1-001         401 AAACCCAGCCTCCCTCCACCCCCAGAAAATTGCTTCCATGGAAATGCCTC  450
                                             ||||||||||||||||||||||
NHE1-201           1 ----------------------------ATTGCTTCCATGGAAATGCCTC   22

NHE1-001         451 TCTAAAACATGAACTTTTCCTAGAGACTACGCCAGTCTCTCTTCCCACTT  500
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          23 TCTAAAACATGAACTTTTCCTAGAGACTACGCCAGTCTCTCTTCCCACTT   72

NHE1-001         501 GCTGACCCTTTGCTACCTATGTGCCCGGTTTTACTCTCATTTGGGTAAGG  550
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          73 GCTGACCCTTTGCTACCTATGTGCCCGGTTTTACTCTCATTTGGGTAAGG  122

                                         Startcodon
NHE1-001         551 TCGAGGCTGGCTCTGGAAGCAGCACCATGGTTCTGCGGTCTGGCATCTGT  600
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         123 TCGAGGCTGGCTCTGGAAGCAGCACCATGGTTCTGCGGTCTGGCATCTGT  172

NHE1-001         601 GGCCTCTCTCCACATCGGATCTTCCCTTCCTTACTCGTGGTGGTTGCTTT  650
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         173 GGCCTCTCTCCACATCGGATCTTCCCTTCCTTACTCGTGGTGGTTGCTTT  222
```

```
NHE1-001        651 GGTGGGGCTGCTGCCTGTTCTCAGGAGCCATGGCCTCCAGCTCAGCCCAA  700
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        223 GGTGGGGCTGCTGCCTGTTCTCAGGAGCCATGGCCTCCAGCTCAGCCCAA  272

NHE1-001        701 CTGCCAGCACCATTCGAAGCTCAGAGCCACCACGAGAACGCTCGATTGGG  750
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        273 CTGCCAGCACCATTCGAAGCTCAGAGCCACCACGAGAACGCTCGATTGGG  322

NHE1-001        751 GATGTCACCACCGCTCCACCGGAGGTCACCCCAGAGAGCCGCCCTGTTAA  800
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        323 GATGTCACCACCGCTCCACCGGAGGTCACCCCAGAGAGCCGCCCTGTTAA  372

NHE1-001        801 TCATTCCGTCACTGATCATGGCATGAAGCCGCGCAAGGCCTTTCCAGTCC  850
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        373 TCATTCCGTCACTGATCATGGCATGAAGCCGCGCAAGGCCTTTCCAGTCC  422

NHE1-001        851 TGGGCATCGACTACACACACGTGCGCACCCCCTTCGAGATCTCCCTCTGG  900
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        423 TGGGCATCGACTACACACACGTGCGCACCCCCTTCGAGATCTCCCTCTGG  472

                                      Ende Exon1|Start Exon2
NHE1-001        901 ATCCTTCTGGCCTGCCTCATGAAGATAGGTTTCCATGTGATCCCCACTAT  950
                    ||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        473 ATCCTTCTGGCCTGCCTCATGAAGATA----------------------  499

NHE1-001        951 CTCAAGCATCGTCCCGGAGAGCTGCCTGCTGATCGTGGTGGGGCTGCTGG 1000
NHE1-201        500 ----------------------------------------------------  499

NHE1-001       1001 TGGGGGGCCTGATCAAGGGTGTAGGCGAGACACCCCCCTTCCTGCAGTCC 1050
NHE1-201        500 ----------------------------------------------------  499

NHE1-001       1051 GACGTCTTCTTCCTCTTCCTGCTGCCGCCCATCATCCTGGATGCGGGCTA 1100
NHE1-201        500 ----------------------------------------------------  499

NHE1-001       1101 CTTCCTGCCACTGCGGCAGTTCACAGAAAACCTGGGCACCATCCTGATCT 1150
NHE1-201        500 ----------------------------------------------------  499

NHE1-001       1151 TTGCCGTGGTGGGCACGCTGTGGAACGCCTTCTTCCTGGGCGGCCTCATG 1200
NHE1-201        500 ----------------------------------------------------  499

NHE1-001       1201 TACGCCGTGTGCCTGGTGGGCGGTGAGCAGATCAACAACATCGGCCTCCT 1250
NHE1-201        500 ----------------------------------------------------  499

NHE1-001       1251 GGACAACCTGCTCTTCGGCAGCATCATCTCGGCCGTGGACCCCGTGGCGG 1300
NHE1-201        500 ----------------------------------------------------  499

NHE1-001       1301 TTCTGGCTGTCTTTGAGGAAATTCACATCAATGAGCTGCTGCACATCCTT1350
NHE1-201        500 ----------------------------------------------------  499

                                                 Ende Exon2|Start Exon3
NHE1-001       1351 GTTTTTGGGGAGTCCTTGCTCAATGACGCCGTCACTGTGGTCCTGTATCA 1400
                                                           ||||||||||||
NHE1-201        500 -----------------------------------------GGTCCTGTATCA  511

NHE1-001       1401 CCTCTTTGAGGAGTTTGCCAACTACGAACACGTGGGCATCGTGGACATCT 1450
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        512 CCTCTTTGAGGAGTTTGCCAACTACGAACACGTGGGCATCGTGGACATCT  561

NHE1-001       1451 TCCTCGGCTTCCTGAGCTTCTTCGTGGTGGCCCTGGGCGGGGTGCTTGTG 1500
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        562 TCCTCGGCTTCCTGAGCTTCTTCGTGGTGGCCCTGGGCGGGGTGCTTGTG  611

NHE1-001       1501 GGCGTGGTCTACGGGGTCATCGCAGCCTTCACCTCCCGATTTACCTCCCA 1550
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        612 GGCGTGGTCTACGGGGTCATCGCAGCCTTCACCTCCCGATTTACCTCCCA  661
```

```
NHE1-001        1551 CATCCGGGTCATCGAGCCGCTCTTCGTCTTCCTCTACAGCTACATGGCCT 1600
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         662 CATCCGGGTCATCGAGCCGCTCTTCGTCTTCCTCTACAGCTACATGGCCT  711

                                                    Ende Exon3|Start Exon4
NHE1-001        1601 ACTTGTCAGCCGAGCTCTTCCACCTGTCAGGCATCATGGCGCT|CATAGCC 1650
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         712 ACTTGTCAGCCGAGCTCTTCCACCTGTCAGGCATCATGGCGCT|CATAGCC  761

NHE1-001        1651 TCAGGAGTGGTGATGCGCCCCTATGTGGAGGCCAACATCTCCCACAAGTC 1700
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         762 TCAGGAGTGGTGATGCGCCCCTATGTGGAGGCCAACATCTCCCACAAGTC 811

NHE1-001        1701 CCACACCACCATCAAATACTTCCTGAAGATGTGGAGCAGCGTCAGCGAGA 1750
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         812 CCACACCACCATCAAATACTTCCTGAAGATGTGGAGCAGCGTCAGCGAGA  861

NHE1-001        1751 CCCTCATCTTCATCTTCCTCGGCGTCTCCACGGTGGCCGGCTCCCACCAC 1800
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         862 CCCTCATCTTCATCTTCCTCGGCGTCTCCACGGTGGCCGGCTCCCACCAC  911

NHE1-001        1801 TGGAACTGGACCTTCGTCATCAGCACCCTGCTCTTCTGCCTCATCGCCCG 1850
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         912 TGGAACTGGACCTTCGTCATCAGCACCCTGCTCTTCTGCCTCATCGCCCG  961

                   Ende Exon4|Start Exon5
NHE1-001        1851 CGTGCTGGGGGT|GCTGGGCCTGACCTGGTTCATCAACAAGTTCCGTATCG 1900
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201         962 CGTGCTGGGGGT|GCTGGGCCTGACCTGGTTCATCAACAAGTTCCGTATCG 1011

NHE1-001        1901 TGAAGCTGACCCCCAAGGACCAGTTCATCATCGCCTATGGGGGCCTGCGA 1950
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1012 TGAAGCTGACCCCCAAGGACCAGTTCATCATCGCCTATGGGGGCCTGCGA 1061

NHE1-001        1951 GGGGCCATCGCCTTCTCTCTGGGCTACCTCCTGGACAAGAAGCACTTCCC 2000
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1062 GGGGCCATCGCCTTCTCTCTGGGCTACCTCCTGGACAAGAAGCACTTCCC 1111

NHE1-001        2001 CATGTGTGACCTGTTCCTCACTGCCATCATCACTGTCATCTTCTTCACCG 2050
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1112 CATGTGTGACCTGTTCCTCACTGCCATCATCACTGTCATCTTCTTCACCG 1161

                    Ende Exon5|Start Exon6
NHE1-001        2051 TCTTTGTGCAGGGC|ATGACCATTCGGCCCCTGGTAGACCTGTTGGCTGTG 2100
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1162 TCTTTGTGCAGGGC|ATGACCATTCGGCCCCTGGTAGACCTGTTGGCTGTG 1211

                                                          Ende Exon6
NHE1-001        2101 AAGAAAAAGCAAGAGACGAAGCGCTCCATCAACGAAGAGATCCACACACA 2150
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1212 AAGAAAAAGCAAGAGACGAAGCGCTCCATCAACGAAGAGATCCACACACA 1261

                      |Start Exon7
NHE1-001        2151 GTTC|CTGGACCACCTTCTGACAGGCATCGAAGACATCTGTGGCCACTACG 2200
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1262 GTTC|CTGGACCACCTTCTGACAGGCATCGAAGACATCTGTGGCCACTACG 1311

                                Ende Exon7|Start Exon8
NHE1-001        2201 GTCACCACCACTGGAAGGACAAGCT|CAACCGGTTTAATAAGAAATATGTG 2250
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1312 GTCACCACCACTGGAAGGACAAGCT|CAACCGGTTTAATAAGAAATATGTG 1361

NHE1-001        2251 AAGAAGTGTCTGATAGCTGGCGAGCGCTCCAAGGAGCCCCAGCTCATTGC 2300
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1362 AAGAAGTGTCTGATAGCTGGCGAGCGCTCCAAGGAGCCCCAGCTCATTGC 1411
```

```
NHE1-001        2301 CTTCTACCACAAGATGGAGATGAAGCAGGCCATCGAGCTGGTGGAGAGCG 2350
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1412 CTTCTACCACAAGATGGAGATGAAGCAGGCCATCGAGCTGGTGGAGAGCG 1461

                                                        Ende Exon8|Start Exon9
NHE1-001        2351 GGGGCATGGGCAAGATCCCCTCTGCCGTCTCCACCGTCTCCATGCAGAAC 2400
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1462 GGGGCATGGGCAAGATCCCCTCTGCCGTCTCCACCGTCTCCATGCAGAAC 1511

NHE1-001        2401 ATCCACCCCAAGTCCCTGCCTTCCGAGCGCATCCTGCCAGCACTGTCCAA 2450
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1512 ATCCACCCCAAGTCCCTGCCTTCCGAGCGCATCCTGCCAGCACTGTCCAA 1561

NHE1-001        2451 GGACAAGGAGGAGGAGATCCGCAAAATCCTGAGGAACAACTTGCAGAAGA 2500
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1562 GGACAAGGAGGAGGAGATCCGCAAAATCCTGAGGAACAACTTGCAGAAGA 1611

                      Ende Exon9|Start Exon10
NHE1-001        2501 CCAGGCAGCGGCTGCGGTCCTACAACAGACACACGCTGGTGGCAGACCCC 2550
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1612 CCAGGCAGCGGCTGCGGTCCTACAACAGACACACGCTGGTGGCAGACCCC 1661

NHE1-001        2551 TACGAGGAAGCCTGGAACCAGATGCTGCTCCGGAGGCAGAAGGCCCGGCA 2600
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1662 TACGAGGAAGCCTGGAACCAGATGCTGCTCCGGAGGCAGAAGGCCCGGCA 1711

                       Ende Exon10|Start Exon11
NHE1-001        2601 GCTGGAGCAGAAGATCAACAACTACCTGACGGTGCCAGCCCACAAGCTGG 2650
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1712 GCTGGAGCAGAAGATCAACAACTACCTGACGGTGCCAGCCCACAAGCTGG 1761

                                                 Ende Exon11|Start Exon12
NHE1-001        2651 ACTCACCCACCATGTCTCGGGCCCGCATCGGCTCAGACCCACTGGCCTAT 2700
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1762 ACTCACCCACCATGTCTCGGGCCCGCATCGGCTCAGACCCACTGGCCTAT 1811

NHE1-001        2701 GAGCCGAAGGAGGACCTGCCTGTCATCACCATCGACCCGGCTTCCCCGCA 2750
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1812 GAGCCGAAGGAGGACCTGCCTGTCATCACCATCGACCCGGCTTCCCCGCA 1861

NHE1-001        2751 GTCACCCGAGTCTGTGGACCTGGTGAATGAAGAGCTGAAGGGCAAAGTCT 2800
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1862 GTCACCCGAGTCTGTGGACCTGGTGAATGAAGAGCTGAAGGGCAAAGTCT 1911

NHE1-001        2801 TAGGGTTGAGCCGGGATCCTGCAAAGGTGGCTGAGGAGGACGAGGACGAC 2850
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1912 TAGGGTTGAGCCGGGATCCTGCAAAGGTGGCTGAGGAGGACGAGGACGAC 1961

NHE1-001        2851 GATGGGGGCATCATGATGCGGAGCAAGGAGACTTCGTCCCCAGGAACCGA 2900
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        1962 GATGGGGGCATCATGATGCGGAGCAAGGAGACTTCGTCCCCAGGAACCGA   2011

NHE1-001        2901 CGATGTCTTCACCCCCGCGCCCAGTGACAGCCCCAGCTCCCAGAGGATAC   2950
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        2012 CGATGTCTTCACCCCCGCGCCCAGTGACAGCCCCAGCTCCCAGAGGATAC   2061

NHE1-001        2951 AGCGCTGCCTCAGTGACCCAGGCCCACACCCTGAGCCTGGGGAGGGAGAA   3000
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        2062 AGCGCTGCCTCAGTGACCCAGGCCCACACCCTGAGCCTGGGGAGGGAGAA   2111

                                          Stoppcodon
NHE1-001        3001 CCGTTCTTCCCCAAGGGGCAGTAACACCAGGGCCAGCAGGCAGCGCCTGT   3050
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        2112 CCGTTCTTCCCCAAGGGGCAGTAACACCAGGGCCAGCAGGCAGCGCCTGT   2161
```

```
NHE1-001        3051 CCCCTCACAGACTCTTCCACCAGAGCAGGGGCTGCTGGGGGCTCCCCTTG   3100
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        2162 CCCCTCACAGACTCTTCCACCAGAGCAGGGGCTGCTGGGGGCTCCCCTTG   2211

NHE1-001        3101 CCCTTCCTGACCCGGATTGGCCCTGCCCCTCCCCCTACCGCATGGCAGCT   3150
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        2212 CCCTTCCTGACCCGGATTGGCCCTGCCCCTCCCCCTACCGCATGGCAGCT   2261

NHE1-001        3151 GGGCCCACAGCCCCCACCCCAGCACAGCTCCTCCCCTGCCGCCTCCCGGG   3200
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        2262 GGGCCCACAGCCCCCACCCCAGCACAGCTCCTCCCCTGCCGCCTCCCGGG   2311

NHE1-001        3201 AAGCATCCTCCCCACCAGAGCTGCCTCCCCAATCCATTTGGCAGAACTGC   3250
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201        2312 AAGCATCCTCCCCACCAGAGCTGCCTCCCCAATCCATTTGGCAG------   2355

NHE1-001        3251 TGGGGCTGGTGAGGCCGGCCCTGCCCCTCCCTAGATCCAGGCTTCTCCCG   3300
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3301 GACCTGGACTAGGGCCTCGGAGGCTCCTCCCTCTGCCTCATCCTCCTCCT   3350
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3351 CATTCAGACCAATCTTAGTTTCTAACCAAAGAGTCTCTGGCTCAGCTGTG   3400
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3401 GTCCCACCCAGGAAGGGAGGGAGCTGAGGCCTCCCTTGAGTAGGCCCTGC   3450
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3451 TTTATCAGGGGACAAACCAGGGGTACCAGGCACATGGCTGGGGGAGGGAC   3500
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3501 TGCTGACCCACCAAGGTCTCACACTCCTCCTGCCAGCTCTGTCACCCTGG   3550
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3551 CCACCACCCAACCTGTCCTTACTCAGAGCTGCGGGCTGAGGGCATCTCTG   3600
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3601 AGTGTCTCTGCCTGGAGCAGGGGTGGTTTCTACGGTGACAGTGACGTGAC   3650
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3651 TCAGAGCTTTTCGAACTGTGCTCCCACGGGGACCACTGGGCCCCTCAGGG   3700
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3701 GAAGCTGCTAGGGGAAGGACTGGCCGTGGCTCCAGAATGTGCTGCCTTTT   3750
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3751 TAAGTTTTGTTTGTTCACACTCCTATATATGATTGTTTGCACAGAGGGCG   3800
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3801 CTCCTGTTTTTAAAACATTTTGAAAACCCCTGGCTGAACAGTGCTCTGCC   3850
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3851 TCTAACTCCCTCCTCACACTCCAGAATTACCCTTCCTCATCTGTGCCTGT   3900
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3901 CTGTCCAACCCCTCCCCCACGTCTCTCTGCCTGCTGGGCTCTTAACTGTT   3950
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        3951 GCTCGAAGACTGTGACATCAGAAGTAACTCCCACTCCTAATCAAGAGTCT   4000
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4001 CTCCAGCCTCACAGATGCTGGCCTCTTGGCACCTGCCTAGCTCTTGGGCC   4050
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355
```

```
NHE1-001        4051 TGACCTCCAGTCCTGCTGGCCTGCTCTTACTTCCCCCACCCTGGGTTTGG   4100
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4101 CCCCTGGAACCTTTCCCTTGTGTGTACCACACCCTGCCTGCTGTGGAGCC   4150
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4151 CATTGTGGAGGCGGTGGGGGGGAGAAGGCCTCCCCTGAGGATCCCCTGTC   4200

NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4201 CCCTGGGGCTGGTGGATTGGGCAGAATCCTGGGCCCCCAGAGACCTTTGC   4250
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4251 CCACACACACTCCTTCCCCTTGTCCCTGGGGCACTCCCCCAGGATTGTGC   4300
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4301 AATAGTCAGAGTGTCCCTTTTTGCAGGGGACTGGGCCATGGGTCCTCGGC   4350
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4351 CCATCTGTCCATCCTCCTCTCCATGCAAGTGCTGTTTGGGCAGGAGTCAC   4400
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4401 CATGCAAGGGTGACATCGACAACCACGTACCAAGCCACCGCAGCTGCTGC   4450
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355

NHE1-001        4451 CACTCTGCTGCCTGTACAGAAGAAACTGAATCTTTTTCATATTCTAATAA   4500
NHE1-201        2356 -------------------------------------------------   2355
                     Stopp Exon12
NHE1-001        4501 ATCAATGTGAGTTTTT   4516
NHE1-201        2356 ----------------   2355
```

11.4 Proteinsequenzvergleich der NHE1-Transkripte

Dargestellt ist der Vergleich der Proteinsequenzen der NHE1-Transkripte SLC9A1-001 (Isoform 1) und SLC9A1-201 (Variante 2). Die Sequenzen wurden der Datenbank Ensembl entnommen (*140*). Die Lage und Größe der Transmembrandomänen (TMD) bezieht sich auf die Angaben der Datenbank Uniprot (*219*). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW durchgeführt.

```
                                  TMD 1
NHE1-100           1 MVLRSGICGLSPHRIFPSLLVVVALVGLLPVLRSHGLQLSPTASTIRSSE    50
NHE1-201           1 -------------------------------------------------     0

NHE1-100          51 PPRERSIGDVTTAPPEVTPESRPVNHSVTDHGMKPRKAFPVLGIDYTHVR    100
NHE1-201           1 -------------------------------------------------     0

                        TMD 2                     TMD 3
NHE1-100         101 TPFEISLWILLACLMKIGFHVIPTISSIVPESCLLIVVGLLVGGLIKGVG    150
NHE1-201           1 -------------------------------------------------     0

                       TMD 4                                  TMD 5
NHE1-100         151 ETPPFLQSDVFFLFLLPPIILDAGYFLPLRQFTENLGTILIFAVVGTLWN    200
NHE1-201           1 -------------------------------------------------     0
                                              TMD 6
NHE1-100         201 AFFLGGLMYAVCLVGGEQINNIGLLDNLLFGSIISAVDPVAVLAVFEEIH    250
NHE1-201           1 -------------------------------------------------     0
```

```
                          TMD 7                                                TMD 8
NHE1-100          251 INELLHILVFGESLLNDAVTVVLYHLFEEFANYEHVGIVDIFLGFLSFFV    300
NHE1-201            1 ----------------------------------------------------      0

                                                                TMD 9
NHE1-100          301 VALGGVLVGVVYGVIAAFTSRFTSHIRVIEPLFVFLYSYMAYLSAELFHL    350
                                                                ||||||||||
NHE1-201            1 ------------------------------------MAYLSAELFHL     11

NHE1-100          351 SGIMALIASGVVMRPYVEANISHKSHTTIKYFLKMWSSVSETLIFIFLGV    400
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201           12 SGIMALIASGVVMRPYVEANISHKSHTTIKYFLKMWSSVSETLIFIFLGV     61

                              TMD 10
NHE1-100          401 STVAGSHHWNWTFVISTLLFCLIARVLGVLGLTWFINKFRIVKLTPKDQF    450
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201           62 STVAGSHHWNWTFVISTLLFCLIARVLGVLGLTWFINKFRIVKLTPKDQF    111

                   TMD 11                                TMD 12
NHE1-100          451 IIAYGGLRGAIAFSLGYLLDKKHFPMCDLFLTAIITVIFFTVFVQGMTIR    500
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          112 IIAYGGLRGAIAFSLGYLLDKKHFPMCDLFLTAIITVIFFTVFVQGMTIR    161

NHE1-100          501 PLVDLLAVKKKQETKRSINEEIHTQFLDHLLTGIEDICGHYGHHHWKDKL    550
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          162 PLVDLLAVKKKQETKRSINEEIHTQFLDHLLTGIEDICGHYGHHHWKDKL    211

NHE1-100          551 NRFNKKYVKKCLIAGERSKEPQLIAFYHKMEMKQAIELVESGGMGKIPSA    600
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          212 NRFNKKYVKKCLIAGERSKEPQLIAFYHKMEMKQAIELVESGGMGKIPSA    261

NHE1-100          601 VSTVSMQNIHPKSLPSERILPALSKDKEEEIRKILRNNLQKTRQRLRSYN    650
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          262 VSTVSMQNIHPKSLPSERILPALSKDKEEEIRKILRNNLQKTRQRLRSYN    311

NHE1-100          651 RHTLVADPYEEAWNQMLLRRQKARQLEQKINNYLTVPAHKLDSPTMSRAR    700
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          312 RHTLVADPYEEAWNQMLLRRQKARQLEQKINNYLTVPAHKLDSPTMSRAR    361

NHE1-100          701 IGSDPLAYEPKEDLPVITIDPASPQSPESVDLVNEELKGKVLGLSRDPAK    750
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          362 IGSDPLAYEPKEDLPVITIDPASPQSPESVDLVNEELKGKVLGLSRDPAK    411

NHE1-100          751 VAEEDEDDDGGIMMRSKETSSPGTDDVFTPAPSDSPSSQRIQRCLSDPGP    800
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NHE1-201          412 VAEEDEDDDGGIMMRSKETSSPGTDDVFTPAPSDSPSSQRIQRCLSDPGP    461

NHE1-100          801 HPEPGEGEPFFPKGQ    815
                      |||||||||||||||
NHE1-201          462 HPEPGEGEPFFPKGQ    476
```