

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Gekle)

**Expression von Entzündungsmarkern und Aktivierung von
Signalwegen in Monozyten und Makrophagen durch eine
extrazelluläre Azidose**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Hanna Wußling
geboren am 03.12.1990 in Nordhausen

Betreuer: Prof. Dr. med. O. Thews

Gutachter/Gutachterin: 1. Prof. Dr. O. Thews
2. Prof. Dr. A. Görlach
3. Prof. Dr. Hostkorte

16.02.2016

26.08.2016

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, die mich immer
unterstützt und gefördert hat.

Referat

Wird ein Gewebe unzureichend mit Blut versorgt, entsteht aufgrund des Sauerstoffmangels eine extrazelluläre Azidose. Dies geschieht in inflammatorischem Gewebe, aber auch, aufgrund der insuffizienten Angiogenese, in Tumoren. Studien zeigten, dass es einen Zusammenhang zwischen dem extrazellulären pH-Wert und der Tumorgenese und –progression gibt. Sowohl in Tumoren als auch in Entzündungen sind Immunzellen, wie Monozyten und Makrophagen, dem erniedrigten pH-Wert ausgesetzt. Es stellt sich daher die Frage, ob der azidotische pH-Wert Monozyten und Makrophagen funktionell in der Bildung inflammatorischer Mediatoren beeinflusst.

Um die Auswirkung der extrazellulären Azidose auf die Genexpression und die Signaltransduktion zu untersuchen, wurden immortalisierte Mono Mac 6 und THP-1-Monozyten und murine RAW264.7- sowie mittels PMA differenzierte THP-1-Makrophagen einem pH von 6,6 ausgesetzt. Die Expression von COX-2, IL-1 β , IL-6, iNOS, MCP1, Osteopontin und TNF- α wurde mittels quantitativer PCR untersucht. Über Western-Blot erfolgte die Analyse der Phosphorylierung wichtiger zellulärer Signalkaskaden p38- und ERK1/2-MAP-Kinasen sowie des Transkriptionsfaktors CREB.

Es zeigte sich, dass die Wirkung auf die Genexpression durch einen niedrigen pH-Wert abhängig vom Differenzierungsgrad der jeweiligen Zellen war. In Monozyten fand sich eine Azidose-induzierte Herunterregulierung der Zytokin-Genexpression. In Makrophagen kam es zu einer Hochregulation von COX-2, iNOS und IL-1 β .

In allen untersuchten Zelllinien führte die Azidose zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Phosphorylierung der p38-MAPK, wohingegen die Auswirkungen auf ERK1/2 uneinheitlich waren. Der Transkriptionsfaktor CREB wurde nur in RAW264.7-Makrophagen verstärkt phosphoryliert.

Zusammenfassend ergab die vorliegende Arbeit, dass eine extrazelluläre Azidose in Monozyten und Makrophagen die Bildung inflammatorischer Mediatoren beeinflusst und so die Immunantwort modulieren kann.

1. Einleitung.....	1
1.1. Das metabolische Mikromilieu bei pathologischen Veränderungen.....	1
1.1.1 Das Mikromilieu bei Entzündungen.....	1
1.1.2 Das Tumormikromilieu.....	2
1.2 Die Mitogenaktivierte Proteinkinase Kaskade (MAPK).....	3
1.2.1 ERK.....	4
1.2.2 p38.....	5
1.2.3 CREB.....	5
1.3 Die unspezifische Abwehr.....	6
1.3.1 Monozyten und Makrophagen.....	6
1.3.2 Zytokine.....	7
1.4 Wechselwirkung des extrazellulären Milieus mit verschiedenen Zellen des Gewebes .	14
1.4.1 Funktionelle Beeinflussung von Gewebezellen durch die extrazelluläre Azidose .	15
1.4.2 Beeinflussung der Genexpression durch extrazelluläre Azidose	17
1.5 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Verwendete Geräte und Materialien.....	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Sterile Einmalartikel.....	19
2.1.3 Chemikalien.....	19
2.1.4 Verwendete Pufferlösungen	21
2.2 Zellkultur.....	21
2.2.1 Mono Mac 6 (MM6) Monozyten	22
2.2.2 THP-1 - Monozyten.....	22
2.2.3 Differenzierung der THP-1 Monozyten zu Makrophagen	23
2.2.4 RAW264.7-Makrophagen	24
2.2.5 Mediumwechsel und Passagieren.....	24
2.3 Allgemeiner Versuchsaufbau	25
2.3.1 Messung der Phagozytoseaktivität von THP-1-Zellen.....	25
2.3.2 Protein-Isolation	25
2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.3.4 Western-Blot	27
2.3.5 RNA-Isolation und Probenvorbereitung für PCR	28
2.3.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
2.3.7 Primeretablierung	30
2.3.8 Statistische Auswertung	33
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Differenzierung der THP-1 Zellen von Monozyten zu Makrophagen	34
3.2 Primeretablierung	34
3.3 Genexpression in Abhängigkeit vom extrazellulären pH.....	36
3.3.1 Mono Mac 6-Zellen.....	36
3.3.2 Undifferenzierte THP-1-Zellen	36
3.3.3 PMA-differenzierte THP-1-Zellen	37
3.3.4 RAW264.7-Zellen	37
3.4 Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch extrazelluläre Azidose.....	39
3.4.1 Mono Mac 6-Zellen.....	40
3.4.2 Undifferenzierte THP-1-Zellen	41

3.4.3	PMA-differenzierte THP-1-Zellen	43
3.4.4	RAW264.7-Zellen	45
4	Diskussion	48
4.1	Pathophysiologische Veränderungen im azidotischen Mikromilieu	48
4.1.1	Pathophysiologische Veränderungen im ischämischen Gewebe	48
4.1.2	Pathophysiologische Veränderungen im entzündeten Gewebe	49
4.1.3	Pathophysiologische Veränderungen im Tumorgewebe	50
4.2	Material und Methode	52
4.2.1	Verwendete Zelllinien	52
4.2.2	Messmethodik	54
4.3	Diskussion der Ergebnisse	56
4.3.1	Expression von inflammatorischen Mediatoren bei extrazellulärer Azidose	56
4.3.2	Signalwege bei Azidose	59
4.4	Weitergehende Fragestellungen	61
4.4.1	pH-Sensor der Monozyten/Makrophagen	61
4.5	Übertragbarkeit der Zellkultur-Ergebnisse auf die <i>in vivo</i> -Situation	62
4.6	Schlussfolgerungen	63
4.7	Ausblick	63
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
7	Thesen	77

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
AP-1	activator protein
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COX 2	Cyclooxygenase-2
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FCS	Fetal Calf Serum, Fetales Kälberserum
GPCR	G protein-gekoppelter Rezeptor,
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
Hu	human
ICE	IL-1 β -converting Enzym
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase,
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MM6	Mono Mac 6
Mu	murin
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OGR1	Ovarial-Ca.-G-protein-gekoppelter Rezeptor 1
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reaktive O ₂ -Spezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Mikromilieu bei pathologischen Veränderungen

Der Transport und der Umsatz energiereicher Substrate werden als Energiestoffwechsel oder Metabolismus bezeichnet. Hierbei entsteht Adenosintriphosphat (ATP). Läuft die Glykolyse vollständig ab, entstehen aus einem Molekül Glukose zwei Moleküle ATP. Je nach Verfügbarkeit von Sauerstoff unterscheidet man zwischen aeroben und anaeroben Stoffwechsel. Unter aeroben Bedingungen können aus dem gleichzeitig entstehenden Pyruvat insgesamt 34 Moleküle ATP gewonnen werden. Bei O₂-Mangel hingegen ist die Energieausbeute aus Glukose jedoch gering, was zu einem stark erhöhten Glukoseumsatz unter anaeroben Bedingungen führt. Dies wird durch den sogenannten Pasteur-Effekt beschrieben, der aussagt, dass sich der Glukosemetabolismus umgekehrt zum O₂-Angebot an die Zellen verhält. Bei einem niedrigen Sauerstoffangebot wird mehr Glukose verbraucht als bei ausreichender O₂-Versorgung. Zellen ohne Mitochondrien oder solche in Geweben, die nicht mit Sauerstoff versorgt sind, zeigen keinen Pasteur-Effekt. Kommt es in einem Gewebe zu einer ineffizienten Blutversorgung, führt dies zu einem Mangel an Sauerstoff (Hypoxie), sodass die Energiegewinnung überwiegend über die Glykolyse erfolgt, wodurch permanent Milchsäure produziert wird. Im entzündeten Gewebe führen darüber hinaus Zersetzungsprozesse von interstitieller Matrix aufgrund ihres hohen Gehalts an sauren Aminosäuren zu einer Verschiebung des pH-Werts zu niedrigeren Werten. In schnell wachsenden Tumorgeweben ist zusätzlich der Warburg-Effekt bekannt, bei dem Tumorzellen auch trotz ausreichender O₂-Versorgung glykolytischen Stoffwechsel betreiben [1].

Diese Darstellung zeigt, dass unter pathophysiologischen Bedingungen das metabolische Mikromilieu und insbesondere der extrazelluläre pH-Wert deutlich von den Normalbedingungen abweichen können.

1.1.1 Das Mikromilieu bei Entzündungen

Eine Entzündungsreaktion ist die Immunantwort des Organismus auf fehlregulierte Körperzellen oder auf endogene oder exogene Noxen mit dem Ziel, den physiologischen Zustand des Gewebes wiederherzustellen, indem die Noxe abgeschwächt oder beseitigt wird. Durch Rekrutierung verschiedener Zellen reagiert das Gewebe auf den Schädigungsgrund. In der akuten Phase infiltrieren Granulozyten, während ein chronisches Geschehen von Makrophagen und Lymphozyten dominiert wird. Wirkt eine Noxe auf das Gewebe, werden Mediatorstoffe wie Histamin oder Serotonin ausgeschüttet. Diese wirken dilatativ auf Gefäße und führen zu einer Permeabilitätssteigerung. In Folge dessen können Immunzellen ins Gewebe immigrieren. Durch Freisetzung von Zytokinen, wie beispielsweise MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), werden Immunzellen zusätzlich über Chemotaxis rekrutiert [2]. Eine anhaltende Zunahme der

Immunzellen führt zu einer Schädigung des Gewebes und zum Abbau körpereigener Gewebematrix. Da diese zu einem großen Anteil aus sauren Aminosäuren (Glutamin und Aspartat) bestehen, verschiebt sich bei deren Abbau der pH-Wert des Gewebes ins saure Milieu. Außerdem kann es in entzündeten Geweben zu einer Schädigung der Mikrozirkulation kommen, wodurch die O₂-Versorgung des Gewebes eingeschränkt wird. Die anaerobe Glykolyse führt zu vermehrter Laktatentstehung, die in einem niedrigeren pH resultiert [3].

1.1.2 Das Tumormikromilieu

Das Tumormikromilieu zeichnet sich durch bestimmte Eigenschaften aus, die sich stark vom physiologischen Gewebe unterscheiden. Die Ursache für zahlreiche Abweichungen gegenüber Normalgeweben liegt in einer abnormen, insuffizienten Vaskularisierung, die zu einer Störung der Mikrozirkulation führt [4]. Die Verteilung des Blutstroms und der hiermit verbundenen physiologischen Parameter zeichnet sich durch eine ausgeprägte zeitliche und räumliche Heterogenität aus [4]. Durch das schnelle Wachstum kommt es aufgrund einer insuffizienten Angiogenese in Tumoren zur Hypoxie, die eine charakteristische Eigenschaft vieler humaner Malignome ist [5].

Durch den O₂-Mangel in Tumoren verändert sich der Stoffwechsel grundlegend und es wird der glykolytische Metabolismus gefördert, sodass vermehrt Laktat anfällt, was zu einer deutlichen Senkung des pH-Werts führt [3]. Hierfür kommt es, Hypoxie-vermittelt, zu einer Aktivierung des Hypoxia-Inducible Factor (HIF), der direkt die Expression verschiedener, für den Stoffwechsel relevanter Proteine beeinflusst, wie z. B. den GLUT-1-Transporter [6]. Aber auch durch Aktivierung von Ca²⁺-abhängigen intrazellulären Second-Messenger-Systemen wird über einen Anstieg freier O₂-Radikale (ROS) die Genexpression beeinflusst und die Aktivität glykolytischer Enzyme gesteigert [7]. Hierbei wird dieser Effekt nicht nur durch die Tumorzellen selbst, sondern auch durch andere Zellen im Tumorgewebe (z. B. Tumor-assoziierte Fibroblasten) verursacht. ROS können zusätzlich die Entzündung im Tumorgewebe fördern und hierdurch zu einer verstärkten Absenkung des pH-Werts führen [8].

Neben dieser durchaus physiologischen Anpassung an Sauerstoffmangel verfügen Tumorzellen über eine metabolische Besonderheit. Auch unter Bedingungen einer ausreichenden O₂-Versorgung betreiben Tumorzellen glykolytischen Stoffwechsel, ein Phänomen, das als Warburg-Effekt bezeichnet wird. Auch hierbei entsteht in erheblichem Umfang Milchsäure, wobei die H⁺-Ionen unter anderem mit Hilfe der in Tumorzellen vorhandenen Carboanhydrase in den Extrazellularraum transportiert werden. Dies ist zwar energetisch ungünstiger, doch durch eine 20–30-fach erhöhte Glukoseaufnahme in die Tumorzelle wird der Energiebedarf gedeckt und das entstandene Laktat kann metabolisiert bzw. als Kohlenstoffkörper für den Bau-

stoffwechsel des schnell wachsenden Gewebes verwendet werden [9]. Hierdurch entsteht im Tumorgewebe eine ausgeprägte extrazelluläre Azidose, z.T. mit pH-Werten bis zu 5,5 [10]. Aus physiologischer Sicht ist festzustellen, dass in Tumoren die Versorgung mit O₂, die Entsorgung von Stoffwechselendprodukten und auch der pH-Wert stark vom gesunden Gewebe abweicht. Das Tumormikromilieu hat einen großen Einfluss auf den Prozess der Tumorgenese und -progression [11].

Erst in den 90er Jahren wurde deutlich, dass es einen Zusammenhang zwischen dem extrazellulären pH-Wert und der Tumorentstehung gibt. Das Tumorgewebe mit einem durchschnittlichen pH-Wert von 5,5–7,0 ist für gewöhnlich saurer als gesundes Gewebe, welches ungefähr bei 7,2 liegt [10]. Das Wachstumsoptimum ist bei Tumorzellen in einen saureren Bereich verschoben. Die Zellen können auch bei Werten unter 6,0 proliferieren. Darüber hinaus konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die extrazelluläre Azidose das biologische Verhalten von Tumorzellen beeinflusst. So führte eine Absenkung des extrazellulären pH-Werts auf 6,6 zu einer Aktivierung verschiedener Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) sowie des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element-binding protein) in verschiedenen Tumorzelllinien [12; 13]. Außerdem zeigen Tumorzellen, die einem azidotischen Milieu ausgesetzt waren, eine deutlich stärkere Metastasierungstendenz [14].

1.2 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade (MAPK)

Über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase werden u.a. extrazelluläre mit intrazellulären Vorgängen verbunden und fundamentale Funktionen der Zellen gesteuert. Die MAP-Kinase wird durch Phosphorylierung mit Hilfe einer Mitogen-aktivierenden Proteinkinase-Kinase (MAPKK) aktiviert. Diese wiederum wird durch eine MAPKKK phosphoryliert. Das Grundmotiv der Phosphorylierung der MAP-Kinasen im ERK-, JNK- und p38-Signalweg ist die zweifache Phosphorylierung an einem Threonin- und Tyrosinrest (TGY-Motiv) in der Aktivierungsregion [15]. Bis heute wurden 6 MAPK in Säugetieren gefunden. Dazu gehören extrazellulär ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK1/2/3 und p38 $\alpha/\beta/\gamma$ [16]. Eine Fehlregulierung des MAPK-Wegs spielt in der Tumorgenese eine wichtige Rolle. Im Folgenden werden die einzelnen Signalwege genauer betrachtet. Die MAP-Kinasen reagieren zusätzlich auf intrazelluläre Stimuli wie oxidativen Stress oder Signale aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dies deutet darauf hin, dass dieser Signalweg eine kritische Rolle im pathophysiologischen Geschehen verschiedener Erkrankungen, wie z. B. Diabetes mellitus, Tumorerkrankungen oder Chorea Huntington einnimmt [17; 18]. Immer mehr wissenschaftliche Arbeiten führen zu der Annahme, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie z. B. der β -adrenerge Rezeptor (AR), auch die MAP-Kinase und speziell die ERK1/2-Kinase beeinflussen und regulieren [18].

Viele MAP-Kinase-Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei Stresssignalen. Es ist festzustellen, dass zahlreiche Vorgänge notwendig sind, um diese Signale zu verarbeiten und weiterzuleiten. Krebszellen sind verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt. Dazu zählen unter anderem Hypoxie, Entzündungsmediatoren, reaktive O₂-Spezies, metabolischer Stress und eine Dysregulation der Energiegewinnung [19]. Zusätzlich wird die Tumorzelle im Rahmen der Behandlung durch Chemotherapie oder Bestrahlung geschädigt. Neben einer direkten Beeinflussung der MAPK-Signalwege durch Chemo- oder Radiotherapie, können externe Einflüsse das intrazelluläre Milieu verändern und so auch auf den Ablauf der Signalkaskaden wirken. So konnte gezeigt werden, dass eine Senkung des intrazellulären pH-Werts zu einer verstärkten Phosphorylierung und so zu einer vermehrten Aktivität der MAP-Kinase in Kardiomyozyten führt [20]. Es zeigt sich die Stellung der MAP-Kinase im Tumorgewebe maßgeblich in der Beeinflussung von DNA-Veränderungen und Apoptoseregulation. Mit Hilfe der MAPK werden verschiedenste zelluläre Prozesse wie Genexpression, Mitose, Differenzierung, Metabolismus, Motilität und Apoptose reguliert. Da durch die aktivierten MAP-Kinasen proinflammatorische Zytokine wie iNOS und COX-2 freigesetzt werden, spielen sie im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle und sind demnach ein interessantes Ziel für die Pharmakotherapie [21]. Zu den Zielstrukturen der MAP-Kinasen zählen Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, CREB und p53, Phospholipasen A-D, Zytoskelettproteine und MAPK-aktivierte Proteinkinasen.

1.2.1 ERK

ERK1/2 regulieren die Proliferation, Motilität und Differenzierung von Zellen. Sie werden über Phosphorylierung durch MEK1 und MEK2 aktiviert, welche durch Raf gesteuert werden. Eine Vielzahl an extrazellulären Signalen führt zur Aktivierung des ERK-Signalwegs. Am stärksten wird er durch Wachstumsfaktoren reguliert. Hier spielen Ras GTPasen, Raf-, MEK- und ERK-Kinasen eine wichtige Rolle [22]. ERK besitzt zwei fast homologe Isoformen (ERK1/2), welche durch die spezifische Kinase MEK über Phosphorylierung von bestimmten Tyrosin- und Threoninresten aktiviert werden [16]. ERK kann durch das Entfernen von zwei Phosphatgruppen inaktiviert werden [23]. Bei einem Drittel der menschlichen Tumorerkrankungen ist der ERK-Pfad verändert, was dessen Stellung in der Tumorgenese und -progression belegt [19]. Viele Komponenten dieses Signalwegs sind mit der Zellproliferation verbunden. Störungen der ERK1/2-Aktivierung können an allen Punkten der Signalkaskade stattfinden. Durch Heterodimerisierung kann die ERK-Aktivität gesteigert werden und so durch eine erhöhte Proliferation zur Entartung von Gewebe führen [24]. Im Tumorgewebe sind bestimmte Feedback-Inhibitoren des ERK-Signalwegs dysreguliert. Nachgeschaltete Effekte der Signalkaskade, wie die Angiogenese, Zellmigration oder Invasivität spielen in der Tumorgenese aufgrund des veränderten Signalwegs eine entscheidende Rolle [16]. Die meisten tumorassoziierten Läsionen, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs führen, finden direkt am Anfang der Kaskade statt.

Dies kann durch eine Überexpression der Tyrosinkinase-Rezeptoren, aktivierende Mutationen dieser Rezeptoren oder die autokrine und parakrine Sekretion von aktivierenden Liganden geschehen [19]. Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 kann durch U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene) geblockt werden. Es handelt sich um einen potenten und spezifischen Inhibitor von AP-1, einem aktivierenden Transkriptionsfaktor (activator protein) [25].

1.2.2 p38

Die Isoformen von p38 werden durch Zytokine und durch bestimmte Stresseinwirkungen auf die Zelle, wie UV-Bestrahlung oder Hypoxie aktiviert. Die p38-Kinasen spielen bei Entzündungsprozessen und der Immunantwort eine Rolle, da sie die Translation von IL-1, IL-6 und TNF- α beeinflussen [19].

Es gibt vier verschiedene Isoformen von p38 in Säugetieren (α , β , γ , δ). α und β sind bis heute am besten untersucht und charakterisiert [15]. p38 spielt eine wichtige Rolle in entscheidenden Signalwegen. Indem die Chromatinstruktur beeinflusst wird und verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, reguliert es die Transkription. Experimente haben gezeigt, dass p38 die Funktion eines Tumorsuppressors übernehmen kann [16]. Diese suppressiven Effekte werden durch unterschiedliche Wege vermittelt. Sowohl bei der Aktivierung des Tumorsuppressors p53 als auch in der p53-induzierten Apoptose spielt p38 eine entscheidende Rolle. So stellt eine verminderte Kaskadenaktivität einen fördernden Einfluss auf die Tumorgenese dar. In hepatozellulären Karzinomen wurde eine verminderte Aktivität des p38-Signalwegs beschrieben [19]. Auch bei Entzündungsgeschehen spielt p38 eine große Rolle. Die Aktivierung dieses Signalweges ist wichtig für Immunantworten, wie z. B. der LPS-induzierten Interleukin-Produktion oder der IL-12 mediierten Zellantwort. Die Signalkaskade führt zu einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α oder IL-6. Außerdem werden durch p38 die Cyclooxygenase 2 und die induzierbare Stickstoffmonooxidsynthase aktiviert [16].

1.2.3 CREB

Das cAMP responsive element binding Protein (CREB) wird ubiquitär exprimiert. Allerdings findet sich im Hirngewebe eine besonders starke Expression [26]. Durch Phosphorylierung von CREB wird die zelluläre Genexpression reguliert, wobei mitogene Stresssignale für die Aktivierung von CREB eine wichtige Rolle spielen [27]. Zahlreiche Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter (z. B. Adrenalin, Glukagon) können die CREB-Proteine über sekundäre Botenstoffe wie beispielsweise cAMP oder Ca²⁺ stimulieren [28]. Über Phosphorylierung des Serinrests 133 von CREB wird eine Aktivierung vermittelt. An diesem Vorgang sind verschiedene

Proteinkinasen beteiligt [29]. Neben seiner Rolle als cAMP-abhängiger Aktivator spielt CREB auch eine wichtige Rolle bei der stressinduzierten und Wachstumsfaktor-abhängigen Genexpression. Zahlreiche Mechanismen wie Genamplifikationen, Chromosomentranslokationen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder viraler Onkogene, wie humane Papillomviren, Epstein-Barr-Viren oder Herpesviren [30] können zu einer konstitutiven CREB-Aktivierung führen und so die Tumorgenese bzw. -progression unterstützen. CREB-Aktivierung kann zu unkontrollierter Proliferation, unlimitedem Zellüberleben und Apoptoseresistenz beitragen und durch Veränderung der Zelldifferenzierung, Neovaskularisation und Inflammation zur Onkogenese und Tumorprogression führen [31]. In Studien wurde gezeigt, dass Patienten, die an einer AML erkrankten, signifikant höhere CREB-Spiegel aufwiesen, als gesunde Probanden [31].

1.3 Die unspezifische Abwehr

Das Immunsystem (lat. immunis - frei, unberührt) des Menschen hat die Aufgabe, die Integrität des Organismus zu schützen. Durch exogene Faktoren wie z. B. Viren, Bakterien oder Protozoen und endogen durch maligne entartete Zellen kann diese Integrität gefährdet werden. Deshalb ist die Fähigkeit, körperfremde, maligne entartete oder durch Infektionen veränderte körpereigene Strukturen zu erkennen, eine wesentliche Voraussetzung für den effektiven Schutz des Organismus. Gleichzeitig muss aber gewährleistet sein, dass gesundes Gewebe von der Immunreaktion ausgespart wird. Grundsätzlich wird zwischen einem spezifischen Immunsystem, das sich gegen einzelne Antigene richtet, und einer unspezifischen Abwehr unterschieden, die ein sehr breit gefächertes Spektrum an Zielstrukturen aufweist. Die beiden Systeme sind funktionell eng miteinander verbunden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nur mit Zellen und Zytokinen des unspezifischen Abwehrsystems.

1.3.1 Monozyten und Makrophagen

Immunzellen sind Zellen, die im Rahmen von Entzündungen im Körper eine zentrale Rolle spielen. Sie sind Teil des zellulären Immunsystems und für Abwehrreaktionen des Körpers zuständig. Hierzu gehören unter anderem Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten sowie Plasmazellen, wobei die Lymphozyten und Plasmazellen der spezifischen Abwehr zuzurechnen sind.

Monozyten sind 12–20 µm große Leukozyten mit einem großen, unsegmentierten und meist gelappten Kern. Über mehrere Zwischenstufen entstehen sie aus myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Aufgrund ihrer Chemokinrezeptoren kann man Monozyten in zwei Hauptgruppen unterteilen. Monozyten, die eine hohe Expressionsrate des Oberflächenmarkers CD14 aufweisen, leben nur kurz und werden aktiv in das Entzündungsgewebe rekrutiert. Es

wird davon ausgegangen, dass diese (auch „inflammatorische Monozyten“ genannt) zu den dendritischen Zellen differenzieren, um dort die Immunantwort zu unterstützen. Die zweite Population exprimiert CD16 in hohem Maße und wird vor allem im entzündungsfreien Gewebe gefunden. Die „residenten Monozyten“ haben eine höhere Überlebenszeit und entwickeln sich nach aktuellem Wissensstand zu den jeweiligen Gewebsmakrophagen [32]. Im Blut zirkulierende Monozyten können während einer Infektion die Gefäßbahn verlassen (Zirkulationshalbwertszeit ca. 72 Stunden) und durch Chemotaxis in das Gewebe migrieren, um dort für Wochen bis Monate als Gewebsmakrophagen zu verbleiben.

Die einkernigen **Makrophagen** sind ca. 20 µm groß und können sich amöboid bewegen. Makrophagen sind über den ganzen Körper verteilt und weisen eine hohe strukturelle und funktionelle Heterogenität auf. Makrophagen spielen eine große Rolle bei der Erkennung und Eliminierung von Bakterien, Viren und Pilzen. Die Mikroorganismen werden erkannt und phagozytiert. Durch Opsonierung, also durch Kenntlichmachen der zu phagozytierenden Partikel, und durch von Makrophagen erkannte Oberflächenstrukturen kann eine sehr effektive Phagozytose stattfinden [33].

Monozyten und Makrophagen gehören zu den Zellen des Immunsystems, die sekretorisch sehr aktiv sind. Als Antwort auf bestimmte Signale wird eine Vielfalt an biologisch aktiven Substanzen freigesetzt, mit deren Hilfe Monozyten und Makrophagen immunologische Vorgänge gezielt modulieren können. Während einer akuten Entzündung übernehmen Monozyten/Makrophagen mit der Freisetzung von pro- oder anti-inflammatorischen Substanzen und der Beeinflussung der lymphozytären Entzündungsantwort eine zentrale Aufgabe.

1.3.2 Zytokine

Als Zytokine (von altgriechisch “κύτος“ - Gefäß/ Höhlung und “kinos“ - Bewegung) werden Proteine bezeichnet, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren. Die Familie der Zytokine lässt sich in drei Untergruppen teilen. Dazu gehören die Wachstumsfaktoren, deren Wirkung den gesamten Organismus betreffen, die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Hämatopoetine) und die Zytokine des Immunsystems. Zytokine wirken über hochaffine Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Signale werden in das Zytoplasma oder den Kern weitergeleitet und beeinflussen so den Metabolismus oder die Transkription der Zelle. Fast alle Zellen des Organismus produzieren Zytokine, welche die Interaktionen der verschiedenen Zellen innerhalb eines Gewebes koordinieren. Aber auch maligne entartete Zellen (Tumorzellen) produzieren Zytokine und beeinflussen hierüber das Tumorstadium, die Invasivität sowie das maligne Verhalten des Tumors [34].

Zahlreiche Zytokine werden von Immunzellen produziert und regulieren die Interaktion der verschiedenen beteiligten Zellpopulationen (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, NK-Zellen etc.) und steuern so den Ablauf des Entzündungsgeschehens. Unter diesen Zytokinen nehmen die Interleukine (IL) eine zentrale Funktion ein, jedoch spielen zahlreiche andere Botenstoffe für den koordinierten Ablauf der Abwehr ebenfalls eine wichtige Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde ein Spektrum verschiedener Zytokine, die von Monozyten bzw. Makrophagen gebildet werden, untersucht: Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrose-Faktor α (TNF- α), Osteopontin und Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1). Darüber hinaus wurden auch zwei Enzyme untersucht, die eine Schlüsselstellung bei der Bildung von weiteren relevanten Immunmodulatoren einnehmen: Cyclooxygenase 2 (COX-2), das für die Bildung der Prostaglandine entscheidend ist, und die induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) reguliert. NO nimmt als Zytokin insofern eine Sonderstellung ein, da es nicht über einen membranständigen Rezeptor wirkt, sondern die Zellmembran frei durchdringen kann und intrazellulär die lösliche Guanylatzyklase beeinflusst, wodurch (cGMP-vermittelt) Second-Messenger-Kaskaden angestoßen werden. NO hat darüber hinaus als reaktive Stickstoffspezies einen direkten zytotoxischen Effekt auf Zielzellen.

a. Interleukin-1 β

Drei klassische Mitglieder gehören zur Familie der Interleukine-1: IL-1 α , IL-1 β und der Interleukin-1-Rezeptorantagonist IL-1Ra. Jedes Mitglied wird als Vorläuferprotein synthetisiert. Diese haben für IL-1 α und IL-1 β ein Molekulargewicht von 31 kDa. Während IL-1 α direkt aktiv ist, entfaltet IL-1 β erst durch Spaltung zu einem 17 kDa schweren Protein seine volle biologische Aktivität [35]. Dies geschieht mit Hilfe des IL-1 β -converting Enzyms (ICE). Es wird davon ausgegangen, dass die Proteine von einem gemeinsamen Vorläufergen abstammen, welches über 350 Millionen Jahre alt ist [36]. Die Mitglieder der Interleukin-1 Familie unterscheiden sich zwar in der Homologie der Aminosäuresequenz, eine wichtige Gemeinsamkeit stellt allerdings die beta-Faltblattstruktur dar [36]. Die Gene für Interleukin-1 α und - β und für den Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) sind innerhalb von 450 kbp auf dem langen Arm von Chromosom 2 lokalisiert [36]. Die sezernierten Vorläuferproteine bestehen aus 269 Aminosäuren [37]. Sie werden nicht wie andere Zytokine mittels Signalpeptiden über das endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat sezerniert, sondern direkt aktiv von Monozyten (leaderless secretory protein) [38].

Das seit Anfang der 80er Jahre [35] zunehmend erforschte Interleukin-1 β ist ein proinflammatorisches „Alarmzytokin“, welches hauptsächlich von myeloiden Zellen exprimiert wird.

Rekombinantes IL-1 induziert Fieber, fördert in den Hepatozyten die Synthese des Akute-Phase-Proteins CRP sowie des GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor), führt zur gesteigerten Freisetzung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) in Monozyten und Makrophagen, hemmt die Sekretion von Magensäure [39] und verstärkt die Antwort von T-Lymphozyten auf Antigene und Mitogene [35]. Durch ein lokales Zytokinnetzwerk, zu dem IL-2, TNF- α , IFN- γ , und IL-6 gehören [39], wird eine Entzündung initiiert und die Infiltration inflammatorischer Zellen durch vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle von Leukozyten verstärkt. Aufgrund dieser Eigenschaften spielt es bei Vorgängen im Tumorgewebe eine wichtige Rolle. Auf glatte Muskelzellen und Keratinozyten wirkt IL-1 proliferativ und an Endothelzellen fördert es die Expression von Adhäsionsmolekülen wie Integrinen und Cadherinen. In Mausmodellen zur Untersuchung der Metastasierung führte die Gabe eines Interleukin-1-Antagonisten (Anakira) zu einer geringeren Tumorgenese, da durch die verminderte Wirkung von Interleukin-1 die Proliferation und Adhäsion abnahm [40]. IL-1 wirkt aber unter Umständen auch stimulierend auf die Tumorgenese, indem es beispielsweise durch eine Hemmung der Magensäuresekretion eine vermehrte Besiedlung mit *Helicobacter pylori* möglich macht, was die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung erhöht [41]. Auch spielt es eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, da es zu einer erhöhten Sekretion von VEGF führt [34].

b. Interleukin-6

Das humane Interleukin-6 (IL-6) ist ein 184 Aminosäuren langes Polypeptid, von dem es im menschlichen Körper fünf Unterformen gibt, die sich durch ihre molekulare Masse und posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung unterscheiden. Stimulierte Monozyten, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten sind die Hauptproduzenten von IL-6. Auch in Keratinozyten und Zellen des Mesangiums konnte eine Sekretion nachgewiesen werden [42]. Das Zytokin weist eine hohe Pleiotropie auf, was bedeutet, dass es verschiedene und teilweise gegensätzliche Aufgaben erfüllt. So wirkt IL-6 auf das Immunsystem und auf die Hämatopoese und spielt eine große Rolle bei Akute-Phase-Reaktionen (z. B. Induktion von Fieber). Eine wichtige Funktion ist auch die Stimulation der Differenzierung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen. Die Freisetzung von IL-6 führt zu einer erhöhten IL-2-Produktion und zu einer vermehrten Expression von IL-2-Rezeptoren. Dies induziert ein Wachstum der T-Zellen und die Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen [42]. Interleukin ist der Hauptwachstumsfaktor für myeloide Zellen [43] und hat daher auch eine Bedeutung bei der Entwicklung eines Multiplen Myeloms oder von Lymphomen [44]. Bei malignen Tumoren, entzündlichen und rheumatoiden Erkrankungen, wie systemischem Lupus erythematoses [42], kann man eine erhöhte IL-6-Bildung feststellen, was mit einer verkürzten Überlebenszeit und einer hohen Proliferationsrate einhergeht [34].

c. *TNF- α*

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein Hauptmediator akuter Entzündungsreaktionen. Die TNF-Zytokin-Superfamilie besteht aus 19 Mitgliedern. Diese Liganden regulieren physiologische Funktionen wie die Immunantwort, Hämatopoese und Morphogenese, indem sie die Abtötung durch Entzündung geschädigter Zellen bewirken. TNF- α hat ein Molekulargewicht von 17 kDa und besteht aus 157 Aminosäuren. Es wird auf Chromosom 6 kodiert und hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert. In niedrigeren Konzentrationen wird es auch von anderen Zellen, wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Tumorzellen freigesetzt. Es wird als membrangebundene Vorstufe synthetisiert und durch das TNF-converting-Enzym TACE gespalten [45]. TNF- α aktiviert Monozyten und neutrophile Granulozyten über die Sekretion von MCP-1, um sie zum Infektionsherd zu rekrutieren. Er reguliert unter anderem die Endothelzelladhäsion, um den Zugang von Leukozyten ins Gewebe zu erleichtern [46; 47]. Durch TNF- α wird die Sekretion von Proteasen induziert, was Einfluss auf die Invasivität der Tumorzellen haben kann [34]. Der TNF-1-Rezeptor (TNF-R1) führt zur Aktivierung einer Interleukin-1 β -converting-Enzym (ICE)-ähnlichen Protease, mit dem Ziel, die Apoptose zu verstärken [48]. Die Mitglieder der TNF-Familie werden aber auch mit Prozessen der Tumorgenese (über Stimulierung der Fibroblastendifferenzierung), der Transplantatabstoßung, dem Knochenmetabolismus, Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis oder einem septischen Schock [49] in Verbindung gebracht. TNF- α stimuliert die Produktion anderer Chemokine, wie beispielsweise MCP-1, durch Endothelzellen und Makrophagen [34] und ist an der Induktion von Matrixmetalloprotease-9 im Ovarial-Ca. beteiligt [34]. In höheren Dosen löst es über die vermehrte Expression von IL-6 Fieber aus.

TNF- α ist ein multifaktorielles Zytokin mit einer Schlüsselrolle bei der Regulation von Apoptose und Zellüberleben. Die Bindung von TNF- α an TNF-1- und -2-Rezeptoren aktiviert verschiedene Signalwege, über welche die Funktionen des hochpotenten Zytokins ausgeführt werden [45]. Durch TNF- α können Blutgefäße zerstört, andererseits aber auch angiogenetische Faktoren induziert werden, was jeweils Einfluss auf das Tumorwachstum haben kann. In Tumoren führt eine hohe lokale TNF- α -Konzentration selektiv zur Zerstörung von Gefäßen und somit zum Untergang des Gewebes. Wird es allerdings chronisch exprimiert, wirkt TNF- α als Tumorpromotor, der für den Gewebeumbau und das Tumorwachstum zuständig ist. In Tumoren wie dem Ovarial-Ca., Mamma-Ca. oder Leukämien wird häufig ein erhöhter TNF- α -Spiegel, meist in Verbindung mit IL-1 β und IL-6, nachgewiesen [34]. Im Mamma-Ca. sind die infiltrierten Makrophagen die Hauptquelle für TNF- α und können hierüber in die Angiogenese des Tumors eingreifen [34].

d. Osteopontin

Osteopontin (OPN) wird auch als Secreted-phosphoprotein-1 (Spp1) bezeichnet und gehört zu den sauren Glykophosphoproteinen. Es ist Mitglied der sogenannten SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein)-Familie, welche auf Chromosom 4 kodiert wird [50]. Das humane Osteopontin ist stark negativ geladen und besteht aus 314 Aminosäuren [51]. Es gibt drei Unterformen. Durch Splicen entstehen aus dem langen OPN-a die Varianten OPN-b und OPN-c. Alle Formen sind posttranslationalen Modifikationen ausgesetzt. So wird beispielsweise Serin und Threonin phosphoryliert und Tyrosin sulfatiert. Aufgrund dieser zellspezifischen Modifikationen, schwankt das Molekulargewicht zwischen 41 und 74 kDa [51]. Die posttranslationalen Veränderungen spiegeln sich auch in der Wirkung des Zytokins wieder. Al-Shami et al. konnten zeigen, dass eine Dephosphorylierung von Osteopontin die Fähigkeit, Zellen des Chorion-Ca. zur Migration zu stimulieren, reduzierte. Eine starke Phosphorylierung von Serin und Threonin führte zur verstärkten Migrationsfähigkeit von Tumorzellen [52].

Osteopontin wurde erstmals als ein wichtiges Sialoprotein im Knochen identifiziert, aber auch in verschiedenen anderen Geweben nachgewiesen. So ist es z. B. in Nieren, Gefäßen, glatter Muskulatur und im Gehirn zu finden [51]. Sialoproteine werden von Osteoblasten und -klasten gebildet. Ihre Aufgabe ist noch nicht endgültig geklärt. Sie dienen als Adhäsionsmoleküle, welche die Bindung von Zellen an die Extrazellulärmatrix ermöglichen [53]. Spp1 wird unter anderem von Endothelzellen, aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen und Leukozyten sezerniert und befindet sich an Orten der Entzündung im Extrazellularraum. Hier übernimmt es eine Vielzahl an physiologischen Aufgaben und interagiert mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren wie CD44 und Integrinen (β_1 , β_3 , β_5) auf Abwehrzellen. Diese Rezeptoren aktivieren direkt oder indirekt zelluläre Signalwege, wie den Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Akt-Signalweg und den Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Signalweg [51; 52]. Die Bindung an den CD44-Rezeptor bewirkt eine Zelladhäsion und die Zellmigration. Indirekt beeinflusst Osteopontin die Aktivität von Wachstumsfaktoren, wie z. B. dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) [54]. Sowohl die Interaktion zwischen Osteopontin und den Immunzellen im Mikromilieu als auch das migrationsfördernde Potenzial spielt eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung und -progression. Die gezielte Hemmung dieser Rezeptorinteraktion mit Osteopontin steht im Interesse der Tumorthherapie. So konnten Bräuerle et al. zeigen, dass in MDA-MB-231 (Mamma-Ca.)-Zellen durch die gezielte Hemmung von Osteopontin mit Hilfe eines Antikörpers die Proliferation, Koloniebildung und Migration gesenkt werden [55]. In verschiedenen Tumoren, wie Mamma- und Bronchial-Ca., wurde eine erhöhte Expression von Osteopontin festgestellt. Diverse Studien haben gezeigt, dass Tumorzellen selbst Osteopontin synthetisieren können. Deshalb ist die Messung des Zytokinspiegels im Blut des Patienten eine

wichtige Prognoseinformation [56]. Osteopontin hat die Aufgabe, durch Chemotaxis Makrophagen ins Tumorgewebe zu locken. Dennoch hat es eine inhibitorische Wirkung auf die Makrophagen, indem es durch Inhibition der iNOS die Stickstoffmonooxidsynthese herunterreguliert. Daraus folgt ein antiapoptotischer Effekt auf die Tumorzellen.

e. MCP-1

Chemokine stellen eine Untergruppe der Zytokine dar und gehören zu einer großen Familie von Entzündungs- und Immunabwehrmediatoren. Ihre wichtigste Funktion ist hierbei die chemotaktische Rekrutierung von Abwehrzellen. Innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte wurden über 50 verschiedene Chemokine und 20 Rezeptoren entdeckt [57]. Funktionell kann man sie in homöostatische und inflammatorische Chemokine einteilen. Homöostatische Chemokine werden konstitutiv exprimiert und kontrollieren die Leukozytennavigation zur Immunüberwachung. Die Mehrzahl der inflammatorischen Chemokine wird durch Infektionen oder Inflammationen induziert freigesetzt, um beispielsweise die Differenzierung von Lymphozyten zu regulieren [57]. Die Beteiligung von Chemokinen und deren Rezeptoren in der Tumorgenese ist bekannt [58].

Chemokine werden je nach ihrem Rezeptor in verschiedene Gruppen eingeteilt. So gibt es CXC, CC, C und CX3C-Familien, jeweils abhängig von der Position ihrer verbliebenden Cystein-Reste [58]. Im Tumorgewebe liegt eine abnormale Chemokinrezeptorexpression vor, was eine Migration von Zellen bewirkt, die unter physiologischen Bedingungen stationär wären [57]. Chemokine führen rezeptortragende Tumorzellen zu Orten der Metastasierung [57]. Es ist bekannt, dass maligne Zellen eine höhere Dichte an Chemokinrezeptoren aufweisen, als gleichartige gesunde Zellen. In einer Studie zu Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) in hohem Maße auf Tumorzellen exprimiert wurde, während er in nicht-tumorösen Zellen kaum vorkam. Antikörper gegen diesen Rezeptor konnten bei Mäusen eine Metastasierung verhindern [57].

Das Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) erhält seinen Namen aufgrund der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten und gehört zur Familie der CC-Chemokine. Es ist ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 14 kDa und wird im Gefäßendothel, von glatten Muskelzellen, Monozyten und Fibroblasten als Reaktion auf eine Entzündung durch Stimuli, wie IL-1 β und TNF- α , sezerniert [2; 59]. Durch Bindung an seinen Rezeptor CCR2 werden Monozyten, Makrophagen sowie CD4- und CD8-T-Lymphozyten an den Ort der Inflammation rekrutiert. Außerdem kommt es zur Exozytose von Granula aus NK-Zellen und Freisetzung von Histamin aus basophilen Granulozyten [2].

f. Cyclooxygenase 2

Das Transmembranenzym Cyclooxygenase wird im endoplasmatischen Retikulum von fast allen lebenden Zellen exprimiert und wird auch als Prostaglandin-H-Synthase oder in der Kurzform COX bezeichnet. Seit 1988 ist bekannt, dass es die Schlüsselrolle in der Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure einnimmt [60]. Es gibt zwei Isoformen dieses Enzyms. Die Cyclooxygenase-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert und besitzt homöostatische Funktionen wie die Thrombozytenaggregation und die Zytrotektion. COX-1 ist für die Synthese von Thromboxan A₂ zuständig, was für die Quervernetzung der Thrombozyten essentiell ist. Außerdem ist es für die Prostaglandin I₂ (PGI₂)- und PGE₂-Synthese verantwortlich. Im Gegensatz dazu wird die Cyclooxygenase-2 (COX-2) einerseits konstitutiv in der Niere und im Uterus exprimiert, wo sie für die Prostaglandinsynthese zuständig ist. Andererseits kann die Expression aber auch als Reaktion auf pathologische Prozesse, wie Entzündung oder Tumoren induziert werden.

Die durch Tumoren induzierte Angiogenese wird durch die erhöhte Expression von proangiogenetischen Faktoren und gleichzeitig einer verminderten Freisetzung antiangiogenetischer Faktoren bedingt. Die Expressionsrate der proangiogenetischen Faktoren COX-2 und VEGF (vascular endothelial growth factor) korreliert stark mit der Entstehung neuer Mikrogefäße im Tumor [61]. Dort, wo vermehrt COX-2 freigesetzt wird, entstehen viele neue Gefäße. Diese Tatsache macht deutlich, dass die COX-2-Expression einen großen Einfluss auf die Prognose des Tumorgeschehens hat [61]. COX-2 wird hauptsächlich durch Inflammation und Zytokine, wie IL-1, IL-2 und TNF- α , induziert. Aber auch Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren [62] führen zu einer Induktion, während die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 die Expression hemmen [60]. Es ist bekannt, dass intestinale Epithelzellen, die eine der COX-Isoformen überexprimieren, verstärkt an Proteinen der Extrazellulärmatrix adhären und eine verminderte Apoptoseaktivität aufweisen [62], sodass sie über TGF-Rezeptoren und E-Cadherin eine wichtige Rolle in der Tumourprogression spielen können. TGF- β moduliert die Angiogenese und Migration, indem es die Proliferation von Endothelzellen reguliert. Des Weiteren beeinflusst es die extrazelluläre Matrix und die Synthese von Adhäsionsmolekülen [61]. TGF-Rezeptoren wirken über die Bindung ihrer Liganden antiproliferativ, sodass eine gesteigerte COX-2-Expression zu einer Wachstumshemmung führen sollte. Im Tumorgewebe wirkt es allerdings nicht mehr als Suppressor, sondern fördert aufgrund des fehlenden Zellzyklusarrests die Progression. Aus Studien ist bekannt, dass die Expression von TGF- β im Tumorgewebe zu einer erhöhten COX-2-Synthese führt [63].

g. iNOS

NO ist zunächst ein Signalmolekül des Kreislauf-Systems, das zu einer Vasodilatation arterieller Gefäße führt. Jedoch ist NO auch am Entzündungsgeschehen beteiligt, sowohl in seiner vasodilatierenden Wirkung als auch als zytotoxische N_2 -Spezies [64], wobei NO direkt die DNA oxidieren und zusätzlich über die Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen mutagen wirken kann.

Die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) wurde zuerst aus Makrophagen der Maus nach Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) isoliert [65]. Die NOS katalysiert die Synthese von Nitroxid (NO) aus L-Arginin. Von der NO-Synthase sind drei verschiedene Isoformen bekannt. So gibt es die induzierbare NOS (iNOS); die aus dem Makrophagen stammt, die neuronale NOS (nNOS) und die endotheliale NOS (eNOS) [66]. Etliche Zelltypen des Immunsystems sind nach Induktion zur Expression von iNOS befähigt. Dazu gehören die Kupfer'schen Sternzellen, Mikrogliazellen und Mesangiumzellen, aber auch Hepatozyten, Fibroblasten und Endothelzellen.

Wird die iNOS durch externe Stimuli induziert, produziert sie kalziumabhängig große Mengen an NO. Diese Stimulation erfolgt über den Toll-Like-Rezeptor (TLR) 4 und mit Hilfe des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Neben LPS gehören zu den Induktoren der iNOS hauptsächlich Zytokine, wie das Interferon γ , TNF- α und verschiedene Interleukine. Aber auch Pathogene, wie HIV-Proteine, Hitzeschockproteine oder eine Hypoxie können die Expression der iNOS induzieren. In gynäkologischen Tumoren konnte ein erhöhter Spiegel der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase nachgewiesen werden [34].

1.4 Wechselwirkung des extrazellulären Milieus mit verschiedenen Zellen des Gewebes

Durch O_2 -Mangel und den verstärkten glykolytischen Stoffwechsel kommt es sowohl in Tumoren als auch in entzündetem Gewebe zu einer deutlichen extrazellulären Azidose. Diese Veränderung des metabolischen Milieus wirkt sich jedoch auf alle Zellen des Gewebeverbandes aus. So umfasst beispielsweise ein solide wachsender Tumor neben den eigentlichen entarteten Tumorzellen Fibroblasten, die für die Bildung von Matrixproteinen zuständig, aber auch an der Zytokinbildung beteiligt sind. Solche Fibroblasten finden sich auch in jedem entzündeten Gewebe. Sowohl bei der Entzündung als auch in Tumoren finden sich darüber hinaus verschiedene Abwehrzellen.

1.4.1 Funktionelle Beeinflussung von Gewebezellen durch die extrazelluläre Azidose

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl Zellen aus Normalgeweben als auch Tumorzellen durch eine extrazelluläre Azidose beeinflusst werden, wobei hier unterschiedliche Signalwege aktiviert werden.

a. Tumorzellen

Da sich in vielen experimentellen und humanen Tumoren eine ausgeprägte Azidose mit pH-Werten bis unter 6,0 nachweisen lässt, wurden *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit Tumorzellen durch den erniedrigten pH-Wert funktionell beeinflusst werden. Riemann et al. konnten in umfangreichen Analysen zeigen, dass es in Prostata-Ca.-Zellen bei einem extrazellulären pH von 6,6 zu einer Aktivierung der MAP-Kinase p38 und ERK1/2 kam [12], wobei diese Aktivierung sehr schnell innerhalb weniger Minuten einsetzte. Für die p38-Phosphorylierung zeigte sich, dass diese Aktivierung offensichtlich ein grundlegender Mechanismus in Tumoren ist, da sie auch in fünf anderen Tumorzelllinien einheitlich nachweisbar war. Die Aktivierung von ERK1/2 hingegen ließ sich nur in der Hälfte der untersuchten Zelllinien nachweisen, was für einen Zelllinien-spezifischen Effekt spricht. Riemann et al. konnten auch zeigen, dass offensichtlich die Azidose-induzierte Bildung reaktiver O₂-Spezies (ROS) ursächlich an der MAPK-Aktivierung beteiligt ist [12]. Da es in diesen Untersuchungen durch die extrazelluläre Azidose auch zu einer intrazellulären Ansäuerung kam [12], müssen jedoch auch Aktivierungswege über den pH_i in Erwägung gezogen werden [67].

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Azidose-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen weitreichende funktionelle Auswirkungen sowohl auf das maligne Verhalten als auch auf die Therapieresistenz hat. So kam es durch die Azidose zu einer erhöhten Tumorzellmotilität und zu einer gesteigerten Fernmetastasierung im *in vivo*-Modell [14]. In Tumorkulturen, die funktionell das p-Glykoprotein exprimierten (ein aktiver Medikamententransporter, der für die Entstehung eines Multi-Drug-resistenten Phänotyps verantwortlich ist), zeigte sich, dass durch die Azidose die Transportaktivität erhöht und so die Chemoresistenz gesteigert wurde [68]. Auch hierbei spielte die Aktivierung der MAP-Kinasen eine maßgebliche Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung sowohl *in vitro* [68] als auch *in vivo* [69]. In klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Azidose die Radio- und Chemosensitivität von Tumoren beeinflusst, die metastatische Streuung fördern kann, aber auch die Häufigkeit von Mutationen beeinflusst (für eine Übersicht siehe [70]).

b. Fibroblasten

Da Fibroblasten sowohl in entzündeten Geweben als auch in Tumoren einer extrazellulären Azidose ausgesetzt sind, wurden auch Untersuchungen zum Einfluss der Azidose auf diese Zellpopulation unternommen. Es zeigte sich, dass auch in Fibroblasten der erniedrigte pH-Wert zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 führte, zumindest über einen Zeitraum von bis zu drei Stunden [12]. Auch hier ließ sich die gesteigerte Phosphorylierung bereits wenige Minuten nach dem Wechsel in ein saures Milieu nachweisen. Ebenso wie in den untersuchten Tumorzellen kam es innerhalb weniger Minuten nach dem Wechsel des extrazellulären pH zu einer Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. In diesen Experimenten konnte auch gezeigt werden, dass die Expression verschiedener Chemokine/Proteine in den Fibroblasten durch die Azidose gesteigert wurde [12]. So kam es zu einer transienten Zunahme von TNF- α (3 h) und einer länger-anhaltenden Steigerung (6 h) der COX-2- und iNOS-Expression. Jedoch war diese Expressionsänderung nur zum Teil auf die Aktivierung der MAP-Kinasen zurückzuführen.

c. Immunzellen

Die Absenkung des pH-Werts im Mikromilieu hat auf das Immunsystem einschneidende negative Effekte. So nimmt die zytotoxische Aktivität der NK-Killerzellen aufgrund eines niedrigeren pH-Werts ab. Redegeld et al. [71] konnten zeigen, dass bei einem sauren pH unter 7,0 die durch extrazelluläres ATP vermittelte Lyse von Tumorzellen stark reduziert wurde. Da hierbei das ATP in seiner anionischen Form (ATP^{4-}) die zytotoxische Aktivität besitzt, scheint die Azidose (aber auch andere Kationen, z. B. Mg^{2+}) diese zytotoxische Wirksamkeit einzuschränken [71]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass durch Tumor-Azidose die funktionelle Aktivität von zytotoxischen T-Zellen signifikant eingeschränkt wurde und diese Zellen in einen anergen Zustand versetzt wurden [72]. Durch Pufferung der extrazellulären Protonen konnte die Aktivität wieder hergestellt werden.

Jancic et al. [73] konnten zeigen, dass ein niedriger extrazellulärer pH-Wert die Aktivierung von Neutrophilen und die Reifung von dendritischen Zellen bewirkt. Ein Umgebungs-pH von 6,5 stimuliert selektiv die Produktion und Sekretion von IL-1 β durch humane Monozyten [73]. Im Gegensatz hierzu führte dies bei Makrophagen nicht zu einer verstärkten Expression und Sekretion [73]. Es ist bekannt, dass eine hohe extrazelluläre Protonen-Konzentration über Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und den ERK-Signalweg zu einer Aktivierung von Neutrophilen führt [73]. Owen et al. zeigten, dass der niedrige extrazelluläre pH-Wert zur Produktion von Plättchenaktivierendem Faktor (PAF) führt, was eine starke immunologische Reaktion bedeutet. Patienten mit einer Anaphylaxie haben deutlich erhöhte Werte des PAF [74]. Da zu den

Wechselwirkungen zwischen Monozyten oder Makrophagen und dem extra- und intrazellulären pH-Werten bisher nicht genügend Daten vorliegen, stellt sich hier die Frage, inwiefern Monozyten und Makrophagen in Tumoren oder im entzündeten Gewebe durch eine extrazelluläre Azidose funktionell beeinflusst werden.

1.4.2 Beeinflussung der Genexpression durch extrazelluläre Azidose

Die Bildung genkodierter Produkte, wie Proteine oder RNA-Moleküle, bezeichnet man als Genexpression. Der Prozess der Genexpression hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Durch das Expressionsmuster wird der Phänotyp der Zelle beeinflusst. Monozyten und Makrophagen gehören zu den eukaryotischen Zellen. Deshalb kann die Genexpression auf Ebene der DNA moduliert werden. Die Erstellung einer RNA-Kopie von DNA nennt man Transkription. Die Übersetzung der Basensequenz der RNA in die Aminosäuresequenz eines Polypeptids wird als Translation bezeichnet. So entsteht aus DNA über RNA ein Protein.

Wird die Genexpression beeinflusst, findet dies meist auf Ebene der Transkription statt. Eine Beeinflussung erfolgt durch verschiedene Faktoren, wie Hormone, das Zellzyklusstadium, in dem sich die Zelle befindet, und dem Grad der Differenzierung. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Zellen, welche im sauren Milieu kultiviert wurden, höhere Expressionen einer Vielzahl von Genen aufweisen. Fukamachi et al. [75] fanden über 700 Gene, die eine doppelt so hohe Genexpression bei einem pH-Wert von 6,7 im Vergleich zu alkalischen pH-Werten von 7,5 aufweisen. Untersuchungen von Proben aus Bronchial-, Colon-, Magen-, Leber-, und Nieren-Ca. zeigten im Vergleich zum physiologischen Gewebe eine verdreifachte Expression unter anderem von Interleukin-32, der TNF-Superfamilie und dem Fibroblasten-growth-factor 7 [75].

Es liegen wenige Daten über den Einfluss der extrazellulären Azidose auf die Genexpression von Makrophagen vor. Park et al. [76] konnten zeigen, dass die Inkubation im saurem Medium in Makrophagen zu einer erhöhten Expression von Stabilin-1 führt. Es handelt sich hierbei um einen Rezeptor, der für die Beseitigung von körperfremden und unerwünschten körpereigenen Proteinen zuständig ist. Hierzu gehören unter anderem modifizierte Lipoproteine und advanced glycation endproducts (AGE). Des Weiteren ist Stabilin-1 ein Regulator für die Clearance von sauren und cysteinreichen Proteinen. Es konnte auch gezeigt werden, dass Stabilin-1 als Rezeptor an der Phagozytose beteiligt ist [76].

1.5 Zielsetzung

Im gesunden Gewebe ist der extrazelluläre pH-Wert streng reguliert und kontrolliert und liegt in den meisten Geweben zwischen 6,9 und 7,2. Unter verschiedenen pathologischen Bedingungen

kommt es zu einer Ansäuerung, z. B. aufgrund eines glykolytischen Stoffwechsels. So ist sowohl in entzündeten Geweben als auch in soliden Tumoren der extrazelluläre pH deutlich azidotisch (bis unter pH 6,0) und unterscheidet sich somit von den physiologischen Bedingungen. Der niedrige pH-Wert hat deutliche Auswirkungen auf die Zellen des Gewebes bei der Regulation von Apoptose und Zellüberleben, der Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die zu funktionellen Beeinflussungen führen oder der Genexpression. Die Wirkung der Gewebe-Azidose wurde bisher eingehend für Tumorzellen und Fibroblasten untersucht, jedoch sind die Daten zur funktionellen Beeinflussung von Monozyten und Gewebemakrophagen, die sich ebenfalls regelmäßig in entzündeten Geweben, aber auch in solide wachsenden Tumoren finden, durch eine extrazelluläre Azidose bisher noch uneinheitlich.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, in Zellkulturuntersuchungen die Wirkung eines azidotischen pH-Werts (pH 6,6), wie er beispielsweise in vielen Tumoren vorliegt, auf die Genexpression von Monozyten und Makrophagen zu untersuchen. Hierbei wurde die Expression wichtiger Zytokine (COX-2, IL-1 β , IL-6, iNOS, MCP1, Osteopontin und TNF- α) auf RNA-Ebene analysiert. Um Einblick in die beteiligten Signalwege zu erhalten, folgte eine Analyse der MAP-Kinase-Wege p38 und ERK1/2 sowie der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB in diesen Zellen bei extrazellulärer Azidose.

Die Untersuchungen sollten einen ersten Hinweis geben, ob ein azidotisches Mikromilieu im Gewebe (bei Entzündungen oder in solide wachsenden Tumoren) die Funktion von Monozyten oder Makrophagen (und damit das Abwehrgeschehen) beeinflusst. Hierbei war von besonderem Interesse, ob die Azidose eher zu einer Stimulation oder einer Hemmung dieser Abwehrzellen führt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

Beckmann CS-15R Centrifuge	
C1000 Touch	GMI (Ramsay; USA)
Brutschrank	Thermo Scientific (Waltham; USA)
CASY® Cell Counter + Analyser	OMNI Life Science (Bremen; Deutschland)
Durchflusszytometer (LSRFortessa)	BD Biosciences (San Jose; USA)
Elektrophorese (Consort E835)	Firma A. Hartenstein (Würzburg; Deutschland)
Gel-Dokumentationssystem Chemi Doc™ XRS	Biorad (Hercules; USA)
Mikroskop Nikon TMS	Nikon (Tokio; Japan)
Photometer Nano Vue	GE Healthcare (Buckinghamshire; Großbritannien)
Reinraumbank	Heraeus Instruments (Hanau; Deutschland)
Ultraschallbad	Branson (Dietzenbach; Deutschland)
UNO-Thermoblock	Biometra (Göttingen; Deutschland)
Wasserbad (GFL 1083)	GFL (Burgwedel; Deutschland)
Thermal Cycler CFX 96 Real Time System	Biorad (Hercules; USA)
UV-Transilluminator	UVP Biodoc-it (Upland; USA)

2.1.2 Sterile Einmalartikel

Falconröhrchen (10 ml)	BD (Heidelberg; Deutschland)
Petrischalen	BD (Heidelberg; Deutschland)
Spritzen	Greiner Bio One (Frickenhausen; Deutschland)
Kanülen (0,6 x 30 mm)	Braun (Melsungen; Deutschland)
Zellkulturflaschen (25ml)	BD (Heidelberg; Deutschland)
Zellschaber	BD (Heidelberg; Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

5x first strand buffer	Invitrogen (Carlsbad; USA)
Acrylamid/Bisacrylamid	amresco (Solon; USA)
Agarose (Pegl _{lab})Antisense Primer	peqLab (Erlangen; Deutschland)
APS	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)

Aqua Sigma	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Natriumtetraborat	Merck (Darmstadt; Deutschland)
Bromphenolbla	Serva (Heidelberg; Deutschland)
BSA	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
CaCl ₂	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
CASYton- Lösung	OLS OMNI Life Science (Bremen, Deutschland)
DMEM	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
DNA-Leiter-Mix (peqGOLD DNA-Ladder Mix)	peqLab (Erlangen; Deutschland)
DNase	BioLabs (Ipswich; Großbritannien)
dNTP	peqLab (Erlangen; Deutschland)
DTT	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Ethanol 70 %	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg; Deutschland)
FCS	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Glukose	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Glycerol	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Glycin	CarlRoth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
H ₂ O ₂	Universitätsapotheke, UK-Halle
KCl	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Ladepuffer	peqLab (Erlangen; Deutschland)
MES	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Milchpulver	AppliChem (Gatersleben, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Serva (Heidelberg; Deutschland)
NaCl	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
NaH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt; Deutschland)
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
PBS	citifluor (London, Großbritannien)
PeqGold Proteinmarker IV	peqLab (Erlangen; Deutschland)
PMA	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Phagocytosis Assay Kit	Cayman Chemical (Ann Arbor; USA)
Ponceaurot	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)

Random Primer	Invitrogen (Carlsbad; USA)
Restore-Western-Blot-Stripping-Puffer	Thermo Scientific, Waltham; MA; USA
Reverse Transkriptase (SuperScript II)	Invitrogen (Carlsbad; USA)
RnaseOut	Invitrogen (Carlsbad; USA)
RPMI Medium	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
SDS (sodium dodecylsulfate)	biomol (Hamburg; Deutschland)
Sense Primer	Invitrogen (Carlsbad; USA)
SuperMix (Platinum SYBR Green)	Invitrogen (Carlsbad; USA)
TAE-Puffer	AppliChem (Gatersleben, Deutschland)
TBS	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
TEMED	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
TRIS	Serva (Heidelberg; Deutschland)
Tris-HCl	CarlRoth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)

2.1.4 Verwendete Pufferlösungen

HEPES Puffer (pH 7,4):	24 mM NaHCO ₃ ; 0,8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,2 mM NaH ₂ PO ₄ ; 86,5 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,2 mM CaCl ₂ ; 0,8 mM MgCl ₂ ; 20 mM (4,76 g/l) HPES; 11 mM (2,18 g/l) Glukose
Laemmli-Puffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 10 % β -Mercaptoethanol; 20 % Glycerol; 0,01 % Bromphenolblau
MES-Puffer (pH 6,6):	(4,5 mM (0,38 g/l); NaHCO ₃ ; 0,8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,2 mM NaH ₂ PO ₄ ; 106 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,2 mM CaCl ₂ ; 0,8 mM MgCl ₂ ; 20 mM (3,91 g/l) MES; 11 mM (2,18 g/l) Glukose
TAE Puffer (pH 8,0):	40 mM Tris; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA
TBE Puffer (pH 8,0):	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA
TBS Puffer	50 mM Tris; 150 mM NaCl
Transferpuffer:	20 % MeOH; 25 mM Tris; 192 mM Glycin

2.2 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit den Zellkulturen fanden unter einer Reinraumbank statt. Nach jedem Durchführungsschritt wurde der gesamte Arbeitsplatz mit 70 % Ethanol desinfiziert. Außerdem wurden ausschließlich sterile Materialien verwendet und durchgehend Einweghandschuhe ge-

tragen. So konnten Kontaminierungen vermieden werden. Für die Experimente wurden die folgenden Zelllinien verwendet. Diese wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.1 Mono Mac 6 (MM6) Monozyten

Die Monozyten eines 64 Jahre alten, an akuter myeloischer Leukämie (AML FAB M5) erkrankten, Patienten, wurden 1985 isoliert. Sie tragen die t(9;11)(p22;q23) Mutation. Die Zelllinie wird heute durch das Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland (Katalog-Nr. ACC-124) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in RPMI-Medium kultiviert, dem zusätzlich 10 % FCS (fetales Kälberserum) zugefügt wurde. RPMI-1640 ist ein Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten, aber auch für andere humane und tierische Zelltypen. Anhand der Farbe des Mediums lässt sich die Kultur beurteilen, wobei eine gelbe Farbe auf eine fortgeschrittene Verstoffwechslung der Mediumbestandteile und eine hieraus resultierende Ansäuerung hindeutet. Morphologisch sind die MM6-Zellen runde und multiforme Zellen, die in Suspension vorliegen (Abb. 1). Ihre Verdopplungsrate liegt bei etwa 60 Stunden. Die Zellen sind CD3- und CD19-negativ sowie CD13- und CD15-positiv. Etwa 1-5 % sind Riesenzellen [77]. Da Mono Mac 6-Zellen Eigenschaften aufweisen, die mit Monozyten im Blut übereinstimmen, stellen sie ein geeignetes Modell für die Monozytenversuche dar. So verfügen sie über den für Monozyten typischen Oberflächenmarker CD14, produzieren Zytokine und sind zur Phagozytose befähigt [78].

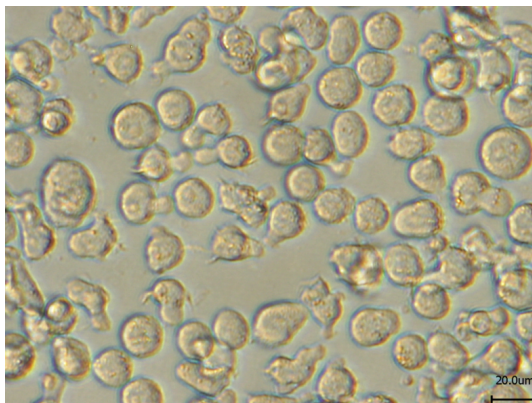


Abb. 1: Mono Mac 6-Zellen.

2.2.2 THP-1 - Monozyten

Diese Zellen wurden aus dem Blut eines 1-jährigen, an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Jungen isoliert. Auch diese Zelllinie befindet sich in der Gewebekbank des Leibniz Instituts DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Katalog-Nr. ACC-16). Die Zellen liegen in Suspension (Abb. 2) vor und sind zur Differenzierung zu Makrophagen befähigt [79]. Ihre Verdopplungszeit beträgt 35 bis 50 Stunden [80]. Die monozytären Ei-

genschaften der THP-1-Zelllinie werden unter anderem durch die Oberflächenmarker CD4 (+) und CD15 (+) charakterisiert. Des Weiteren weisen die Zellen folgende Oberflächenmarker auf: CD3 (-), CD13 (+), CD19 (-), CD34 (-), cyCD68 (+).

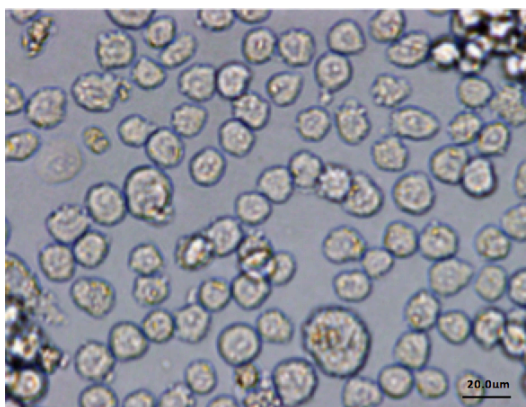


Abb. 2: THP-1 undifferenziert – Monozyten.

2.2.3 Differenzierung der THP-1-Monozyten zu Makrophagen

THP-1-Monozyten lassen sich in Kultur mit Hilfe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenzieren. Hierzu wurde das von Park et al. [79] vorgeschlagene Protokoll verwendet. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen undifferenzierter THP-Zellen, da mit einer exakten Anzahl gearbeitet werden muss. Hierfür wurden 50 μl Zellsuspension in 10 ml isoosmolarer, isotoner CASYton-Lösung 1:200 verdünnt. Für die Differenzierung wurden 1×10^6 Zellen (in 60 mm Petrischalen, Konzentration 1×10^6 Zellen/ml) mit 5 ng PMA/ml inkubiert, was einer PMA-Konzentration von 8,1 nM entsprach. 1 μl PMA wurde in 1000 μl Aqua Sigma gelöst. Nach 48 h erfolgte eine erneute Zellzählung und die mikroskopische Untersuchung, um die Differenzierung und Vitalität einzuschätzen [79]. Die differenzierten THP-1-Zellen weisen Eigenschaften von Makrophagen auf. So sind sie zur Phagozytose befähigt, können Antigene präsentieren und sind mobil. Auf dem Boden der Petrischalen sind sie adhärent und zeigen multiple Zellausläufer (Abb. 3).

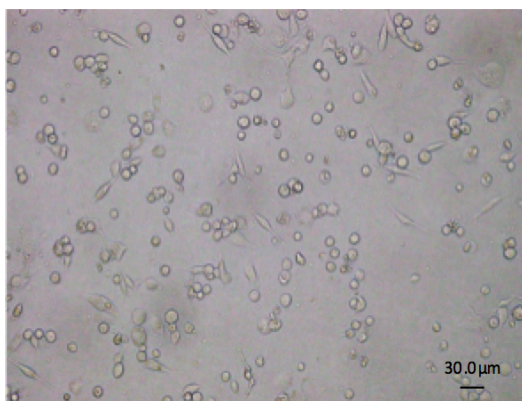


Abb. 3: Durch Inkubation mit PMA für 48 h differenzierte THP-1-Makrophagen.

2.2.4 RAW264.7-Makrophagen

Die murinen Makrophagen RAW264.7 wurden ursprünglich durch Infektion mit dem Abelson Leukämievirus in Mäusen induziert [81]. Heute ist die Zelllinie über die Gewebebank LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland (Katalog-Nr. ATCC TIB-71) erhältlich. Die Zellen sind adhärent und liegen als Monolayer vor (Abb. 4). Sie werden in DMEM-Medium mit 10 % zugesetztem FCS und 25 mM Glukose kultiviert. Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) wurde Ende der fünfziger Jahre zur Kultivierung von Polyoma-Viren in primären und sekundären Mauszellen entwickelt. Die Standardrezeptur enthält 1000 mg/l Glukose, für die Kultivierung der RAW264.7-Zellen wird jedoch ein Medium mit höherer Glukosekonzentration empfohlen. RAW264.7 gehören aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften zu den Makrophagen. Sie sind zur Phagozytose befähigt, produzieren Lysozym und sind in der Lage, Erythrozyten Antikörper-vermittelt zu lysieren [82].

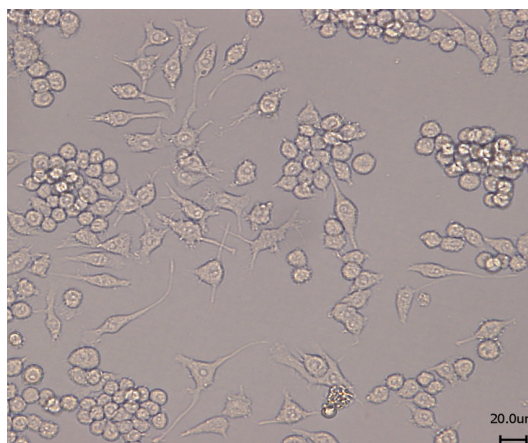


Abb. 4: RAW264.7-Makrophagen.

2.2.5 Mediumwechsel und Passagieren

Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien wurde das Medium ein- bis zweimal wöchentlich gewechselt, sodass optimale Bedingungen bestanden. Die in Suspension vorliegenden Zelllinien MM6 und THP-1 wurden dafür in 10 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 5 ml frischem Medium resuspendiert und anschließend wieder in Petrischalen mit 60 mm Durchmesser überführt. Für den Mediumwechsel bei den adhärennten RAW264.7-Zellen wurde das verbrauchte DMEM-Medium abgesaugt und 5 ml frisches Medium hinzugegeben.

Zur Subkultivierung der Zelllinien (auch Splitten genannt) wurde von den suspensierten Zellen 1 ml abgenommen und in eine frische Petrischale mit 4 ml RPMI überführt, sodass die Zellen ausreichend Medium und Platz für die Teilung haben. Bei den murinen Makrophagen wurde das Medium abgesaugt und das Zellmonolayer mit einem sterilen Zellschaber gelöst. Mit

10 ml sterilem PBS wurden die Zellen voneinander gelöst und 1 ml davon in eine neue Petrischale mit frischem DMEM gegeben. Der Zustand der Zellen wurde regelmäßig unter dem Mikroskop beurteilt, um die Zellbesiedlung und Differenzierung grob einzuschätzen.

2.3 Allgemeiner Versuchsaufbau

Vor den eigentlichen Untersuchungen wurden die Zellen zunächst für 24 h in FCS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen in gepufferten Ringerlösungen für drei Stunden im Brutschrank. Zellen, die als Kontrolle dienten, wurden in HEPES-Ringerlösung mit einem pH-Wert von 7,4 inkubiert. Für Untersuchungen unter azidotischen Bedingungen wurde eine MES-gepufferte Ringerlösung mit einem pH-Wert von 6,6 verwendet. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind unter 2.1.3 aufgelistet. Nach der 3-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen dreimal mit kaltem (4°C) PBS gespült und standen dann für die verschiedenen Schritte der Probenaufbereitung zur Verfügung.

2.3.1 Messung der Phagozytoseaktivität von THP-1-Zellen

Die Phagozytoseaktivität wurde bei undifferenzierten bzw. PMA-differenzierten THP-1-Zellen mit Hilfe von Latex-Partikeln untersucht, die mit FITC-markierten IgG-Kaninchen-Antikörpern überzogen sind (Phagocytosis Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Diese Antikörper können sich über den Fc-Rezeptor an Makrophagen binden und so phagozytiert werden. Die anschließend in der Zelle nachweisbare Fluoreszenzintensität kann als Maß für die Phagozytoseaktivität gewertet werden.

Für die Versuche wurden 5×10^5 Zellen/ml in 24-well Platten kultiviert und für 24 h ohne FCS ruhiggestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit den markierten Latex-Partikeln entsprechend des Protokolls des Herstellers. Danach wurden die Zellen mechanisch abgelöst, gewaschen und in einem Durchflusszytometer die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen bestimmt.

2.3.2 Protein-Isolation

Die gewaschenen Zellen wurden für 5 Minuten mit 500 µl Laemmlipuffer inkubiert. β -Mercaptoethanol wirkt als Reduktionsmittel zur Erhöhung der Stabilität von Proteinen und als Schutz vor der unerwünschten Oxidation von Cysteinresten. Anschließend wurde das Lysat durch mehrfaches Aufziehen mit einer Spritze durch eine Kanüle von 0,55 mm Durchmesser geschert. Dies führt zu einer mechanischen Zerkleinerung von z. B. genomischer DNA. Nach einem 1-minütigen Ultraschallbad und einer 15-minütigen Zentrifugation bei 16000 g wurden 200 µl Überstand abgenommen und für 5 Minuten auf 90 °C im Wasserbad erhitzt. Die Lysate

wurden bei -20 °C aufbewahrt und anschließend für die Durchführung eines Western-Blots genutzt.

2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufzutrennen, wurde die SDS-PAGE genutzt. Polyacrylamid ist ein Acrylamid-Polymer, welches als Trägermaterial fungiert. Die Porengröße des Gels wird durch den prozentualen Anteil des Acrylamids bestimmt. Vom SDS, einem anionischen Detergenz, werden zwei Aufgaben übernommen. Die Proteine werden denaturiert und die Komplexbildung mit SDS führt zusätzlich zu einer negativen Ladung. Daraus folgt, dass die Auftrennung der Proteine unabhängig von deren Eigenladung erfolgt. Somit bestimmt ausschließlich die relative Molekülmasse der Proteine die Laufgeschwindigkeit, mit der die Proteine durch das elektrische Feld zur Anode wandern.

Bei der genutzten Methode erfolgt eine Zweiteilung des Gels. Im Sammelgel (Tab. 1) werden die Proben zunächst fokussiert, um dann im Trenngel (Tab. 1) entsprechend ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt zu werden. Das Sammelgel lief bei 11 mA für 36 min und das Trenngel für etwa 90 min bei 20 mA. Für die Elektrophorese wurde ein Laufpuffer mit 25 M Tris, 3,5 mM SDS und 192 mM Glycin verwendet. Der PeqGold Proteinmarker IV (Peqlab, Erlangen), diente hierbei als Marker für das Molekulargewicht der Proteine. Es wurden jeweils 8 µl Marker und 25 µl Probe verwendet.

Tab. 1: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für Western-Blot.

SDS-PAGE	3 %Sammelgel	12 % Trenngel
Wasser / H ₂ O	1,54 ml	1,88 ml
0,5 M Tris-HCl pH6,8	625 µl	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1,563 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 26:0,7	288 µl	-
Acrylamid/Bisacrylamid 29,3:0,53	-	2,55 ml
10 % SDS	25 µl	125 µl
10 % APS	30 µl	75 µl
TEMED	10 µl	20 µl

2.3.4 Western-Blot

Durch das Blotting werden Moleküle, in diesem Fall Proteine, aus dem Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um sie anschließend sichtbar und auswertbar zu machen. Auf die glänzende, also bindende Seite der Nitrozellulosemembran wurde ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Hierauf wurde erneut Nitrozellulose mit der bindenden Seite nach oben geschichtet. Das die Proteine tragende Gel wurde aufgelegt und mit getränkten Filterpapieren bedeckt. Durch das Anlegen eines Stroms (2 mA/cm^2 für 50 min) wandern die Proteine erneut zur Anode und werden vom Trenngel auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Um eine komplette Übertragung zu gewährleisten sind Luftblasen unbedingt zu vermeiden. Nach dem Transfer erfolgte die Färbung mit Ponceau (30 % Ponceau-S; 30 % Trichloressigsäure; 30 % Sulfosalicylsäure) für 1–3 min. Hierdurch konnte die Beladung der Membranen kontrolliert und zur Dokumentation eine Aufnahme gemacht werden. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS/Tween wurde für eine Stunde "geblockt". Die hierfür verwendete Blocking-Lösung enthielt neben Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) 0,1 % Tween 20 und 5 % Milchpulver und sorgte dafür, dass vor der Markierung mit Antikörpern unspezifische Bindungsstellen gesättigt wurden. Anschließend wurde erneut gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen die phosphorylierte Form des jeweiligen Signalproteins (ERK1/2, p38, CREB) über Nacht bei 4°C in verdünnter Antikörperlösung (TBS mit 0,1 % Tween 20 und 5 % bovinem Serumalbumin BSA). Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tab. 2 wiedergegeben. Nachdem erneut mit TBS/Tween gewaschen wurde, erfolgte der Nachweis des gebundenen Primärantikörpers über die Inkubation mit Sekundärantikörpern, die gegen den Primärantikörper gerichtet waren (Ziege-anti-Kaninchen; Tab. 2), für 120 min bei Raumtemperatur. Als Zweitantikörper für ERK wurde der anti-Kaninchen HRP-gekoppelte Antikörper von Rockland genutzt, während sowohl für p38 als auch für CREB anti-Kaninchen HRP-gekoppelte Zweitantikörper der Firma Cell Signaling genutzt wurden (Tab. 2). 1 ml hinzugefügtes H_2O_2 (30 %) führte zu einer Peroxidase-katalysierten Oxidation mit einer Farbreaktion. Diese Färbung wurde mit Hilfe des Gel-Dokumentationssystems Chemi DocTM XRS System erfasst. Danach erfolgte eine Entfernung der Primärantikörper durch den Restore-Western-Blot-Stripping-Puffer und eine erneute Inkubation mit Primärantikörper, diesmal gegen das nicht-phosphorylierte Gesamtprotein. Für das „Strippen“ wurde die Membran für 10 min in 1 x TBS gewaschen, um anschließend für 15 min bei 50°C im Wasserbad geschüttelt zu werden. Nach dreimaligem anschließenden Waschen für 10 min erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper und eine erneute Detektion und Dokumentation.

2.3.5 RNA-Isolation und Probenvorbereitung für PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient dem Nachweis spezifischer RNA-Nukleinsäuresequenzen. Um genspezifische RNA nachzuweisen, muss diese in eine zur RNA komplementäre DNA, auch cDNA genannt, umgeschrieben werden.

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kit Invitex nach Angaben des Herstellers (Hayward; USA). Zur RNA-Isolation wurden die lysierten und bei -80 °C gelagerten Zellen zentrifugiert und 500 µl des Überstandes in ein 2 ml Receiver Tube gegeben. Nach Zugabe von 330 µl 96–100 %-igen Ethanol und Übertragung auf ein RTA SpinFilterTube wurde der durch erneute Zentrifugation bei 10500 rpm entstandene Durchfluss verworfen. Dreimalig wurde mittels Hinzugeben eines Waschpuffers und anschließender Zentrifugation gespült. Es folgte der Übertrag in ein RNase freies ElutionsTube und das Hinzugeben von 30 µl Elution Puffers der Firma Invitex.

Tab. 2: Verwendete Antikörper für Western-Blot-Analysen.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
anti-phosphoERK	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
anti-ERK	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
anti-phospho-p38	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
anti-p38	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
anti-phospho-CREB	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
anti-CREB	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	Ziege	1:1000	Cell Signaling
anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	Ziege	1:20000	Rockland

Anschließend konnte die Konzentration photometrisch bestimmt und eventuelle Kontaminationen, wie z. B. restliche Proteine, frühzeitig detektiert werden. Die Konzentration der Gesamt-RNA wird in µg/ml angegeben und muss exakt bestimmt werden, da diese die Grundlage für die einzusetzenden Chemikalienmengen ist. Das Prinzip der photometrischen Messung basiert auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, in Abhängigkeit von ihrer Konzentration Licht mit der Wellenlänge 260 nm zu absorbieren. Die Extinktion, also die gemessene Abschwächung des Lichts, lässt so Rückschlüsse auf die Konzentration der Nukleinsäuren zu. Proteine, Aromaten und Salze absorbieren das Licht bei anderen Wellenlängen, sodass man über den Quotient der Extinktion bei den verschiedenen Wellenlängen eine eventuelle Verunreinigung detektieren

kann. Für die photometrische Messung wurde erst ein Leerwert aus 2 μl Aqua Sigma verwendet. Anschließend wurden jeweils 2 μl Probe gemessen.

Es musste sichergestellt werden, dass die extrahierte Gesamt-RNA frei von genomischer DNA war. Deshalb wurden die extrahierten RNA-Proben nach entsprechendem DNase-Verdau als Ausgangsmaterial in eine PCR eingesetzt. Für den doppelten Ansatz (Messwiederholung) wurden jeweils 2 μg RNA mit Aqua Sigma zu einem Endvolumen von 16 μl verdünnt. Durch Zugabe von jeweils 2 μl 10x Reaktionspuffer und 2 μl DNase I erfolgte nach einer 10-minütigen Inkubation bei Zimmertemperatur der DNase-Verdau für 10 min bei 75 °C.

Tab. 3: Reaktionsmix für die Reverse Transkription (+RT = Reaktionsmix mit zugesetzter Reverser Transkriptase, also umgeschriebene RNA; –RT = Reaktionsmix ohne zugesetzte Reverse Transkriptase; Negativkontrolle)

Reaktionsmix	+RT	–RT
H ₂ O (Sigma)	30,94	14,66
5x first strand buffer	11,42	4,58
DTT (100mM) (Sigma)	0,72	0,28
DNTP (je 10 mM)	2,86	1,14
RNAseOut (40U/ μl)	1,42	0,58
Random Primer (1:10; 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1,92	0,76
Reverse Transkriptase (200 U/ μl)	0,72	-

Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche RNA in DNA umschreibt. Das Umschreiben geschieht mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern. Die so entstandene cDNA (komplementäre DNA) wird in der sich anschließenden PCR amplifiziert und weiter zur Untersuchung der Genexpression genutzt. Für die reverse Transkriptase wurden zum Ansatz des DNase-Verdau jeweils 8 μl Aqua Sigma gegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 28 μl ergab. Um eine entsprechende Negativkontrolle (–RT) zu erhalten, wurde der Ansatz in zwei Teile aufgeteilt (8 μl für –RT und 22 μl für +RT). Durch Zugabe des jeweilige Reaktionsmix (Tab. 3) konnte die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurden die Proben zunächst für 5 min bei 25 °C inkubiert, es folgte eine 30-minütige Erwärmung auf 42 °C und anschließend wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt.

2.3.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit Hilfe der PCR können aus einem DNA-Molekül (Amplikon) exponentiell viele Duplikat-Moleküle hergestellt werden, um so die Expression nachzuweisen und analysieren zu können. Enzyme, welche die DNA-Synthese aus Desoxyribonukleotiden an einer DNA-Matrize katalysieren, werden DNA-Polymerasen genannt. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Replikation von DNA. Da die DNA-Polymerase eine Hydroxygruppe als Startpunkt für den Beginn der Verknüpfungsreaktion benötigt, ist der Einsatz von Primern notwendig. Unter einem Primer versteht man in der Molekularbiologie ein Oligonukleotid, welches als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme dient. Primer können sowohl aus DNA als auch aus RNA bestehen.

Tab. 4: PCR-Programm für Test-Gradienten-PCRRT-PCR.

PCR-Amplifikation	Finale Elongation
37 Zyklen mit 94°C für 0,5 min Gradient (62, 63, 64, 65, 66 °C) für 0,5 min 72 °C für 0,5 min	72 °C für 5 min

Eine PCR besteht aus verschiedenen Arbeitsschritten. Zuerst wird der Doppelstrang auf 94°C erhitzt (Tab. 4), sodass sich die beiden Stränge voneinander lösen (Denaturierung). Während der Annealing-Phase findet bei 37-65°C die Bindung des Primers an die DNA-Matrize statt. Durch die enzymatische Aktivität der hitzestabilen Taq-Polymerase werden bei 72°C aus Nukleotidbausteinen (dTNPs) komplementäre DNA-Abschnitte synthetisiert (Elongation, Tab. 4). Für die Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) wurden jeweils 2 µl cDNA-Template und 10,5 µl Mastermix (Zusammensetzung für 10,5 µl: 6,25 µl 2x SuperMix; 3,25 µl H₂O; 0,5 µl Sense Primer (10 pmol/µl); 0,5 µl Antisense Primer (10 pmol/µl)) in einem 3fach Ansatz bestimmt. Es wurde für jede Probe eine Negativkontrolle mitgeführt, diese enthielt statt der Reversen Transkriptase RNase-freies Wasser. Die RT-PCRs wurden mit dem Biorad C1000 Touch Thermal Cycler CFX 96 Real Time System durchgeführt.

2.3.7 Primeretablierung

Für die humanen Gene MCP-1, IL-6, Osteopontin und IL-1 β wurden die entsprechenden Primer für diese Arbeit etabliert. Dafür wurde die maximale Temperatur, bei der die Bindung des Primers an die entsprechende DNA-Sequenz noch fehlerfrei stattfindet, ermittelt (Annealing-Temperatur). Diese Temperatur ist für den Erfolg der Polymerase-Ketten-Reaktion von entscheidender Bedeutung, da zu niedrige Temperaturen zu lockeren Bindungen führen, die unspe-

zifisch sind und so unerwünschte Produkte erzeugen. Auch eine zu hohe Temperatur ist zu vermeiden, da so keinerlei Bindung möglich ist und es zu keinem Produkt kommt.

Bei gleichbleibender Primerkonzentration wurde der optimale Temperaturverlauf mittels Gradienten-PCR ermittelt. Hierfür wurden die Temperaturen von 54 °C bis 66 °C jeweils in 1°C-Schritten bei mit einer Zeitdauer von 0,5 min getestet. Nach der RT-PCR wurden die cDNA-Produkte mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese getrennt. Anhand des Bandenmusters konnte die optimale Temperatur für den jeweiligen Primer gefunden werden. Für die DNA-Produkte der verschiedenen untersuchten Gene ergaben sich spezifische Größen zwischen 54 und 347 bp (Tab. 5). Für die elektrophoretische Auftrennung der Produkte wurden zwei unterschiedliche Gele verwendet (Tab. 5). Agarose-Gele eignen sich besonders für die Trennung großer Produkte, wohingegen TBE-Gele für kleine Produkte zum Einsatz kommen.

Für die Herstellung der Agarosegele wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der aufzutrennenden DNA-Fragmentgröße. Die leicht abgekühlte Agaroselösung wurde in abgedichtete Gelschiffchen mit Probenkamm gegossen. Nach dem Aushärten des Gels erfolgte die Auftragung der aufzutrennenden DNA-Proben inklusive Gelladepuffer. Zu 10 µl Probe und dem DNA-Marker wurde 6 x Ladepuffer, 5 µl DNA-Marker (von 100 bis 10000 bp) hinzugegeben. Es folgte die Gelelektrophorese bei 80 V für 1,5 Stunden. Im Anschluss daran wurde das Gel mit 7 µl Ethidiumbromid (10 %) in H₂O für 30 min gefärbt. Danach wurde zweimal für jeweils 30 min mit H₂O gewaschen und detektiert. Ethidiumbromidmoleküle interkalieren mit der DNA und lagern sich zwischen den Basenpaaren an. Hierdurch wird das Absorptionsspektrum von Ethidiumbromid verändert. Durch Anregung mit ultraviolettem Licht durch den UV-Transilluminator wurde seine Fluoreszenz verstärkt, was dazu führt, dass DNA- bzw. RNA-Fragmente hell leuchten, während das übrige Gel dunkel bleibt. Die Lichtintensität ist proportional zur vorliegenden Menge der Nukleinsäuren.

TBE-Gele bestehen aus TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), Natriumborat und EDTA-Puffer. Aus 6 ml 1x TBE (2 ml Acrylamid für DNA-Gele und 100 µl TEMED (als Polymerisationskatalysator) wird das TBE-Gel hergestellt und anschließend in vorbereitete Gelplatten gegossen. 10 µl der cDNA und 2 µl DNA-Marker (10–300bp, peqGOLD Ultra low range DNA-Ladder I, Peqlab) wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt und auf das TBE-Gel aufgetragen und bei 120V für 50 min laufen gelassen. Die Färbung und Detektion erfolgte analog. Bei den analysierten Primern wurde die höchste Temperatur, bei der nur eine Bande im Gel nachzuweisen war, für die RT-PCR als Annealing-Temperatur genutzt.

Alle bereits vorhandenen und neu-etablierten Primer wurden auch mittels PCR und anschließender Auftrennung durch Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Spezifität und allgemein der Expression des Zielgens in den untersuchten Zelllinien analysiert. Dabei zeigte sich, dass humane iNOS nur in den differenzierten THP-1-Zellen exprimiert wurde und das murine IL-6 nicht in den untersuchten RAW264.7 exprimiert wurde.

Tab. 5: Produktgröße in der PCR der verschiedenen untersuchten Gene sowie Angabe des verwendeten Gels für den Nachweis des Produkts und verwendete Annealing-Temperatur (hu= human; mu= murin).

Gen	Produktgröße (bp)	Gel	Annealing-Temperatur (°C)
hu Osteopontin (SPP1)	347	Agarosegel	54 (siehe 3.2)
hu COX-2	242	Agarosegel	58
hu iNOS/NOS2	158	Agarosegel	57
hu IL-6	334	Agarosegel	63 (siehe 3.2)
hu IL-1 β	163	Agarosegel	57 (siehe 3.2)
mu MCP-1/CCL2	249	Agarosegel	62
mu COX-2	185	Agarosegel	58
mu TNF α	181	Agarosegel	63
mu iNOS/NOS2	299	Agarosegel	66
mu IL-1 β	256	Agarosegel	56
mu IL-6	166	TBE-Gel	66
hu MCP-1/CCL2	100	TBE-Gel	64 (siehe 3.2)
hu TNF- α	54	TBE-Gel	58
mu Osteopontin (SPP1)	106	TBE-Gel	57

2.3.8 Statistische Auswertung

Zur Datenauswertung wurden die Messwerte zunächst im Tabellen-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel erfasst und analysiert. Die Beschreibung der Verteilungen der Messwerte erfolgte jeweils durch Angabe des Mittelwerts und des Standardfehlers (SEM). Der Vergleich von Messgrößen zwischen zwei Gruppen erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests für unverbundene Stichproben. Alle Tests wurden auf dem Signifikanzniveau $\alpha=5\%$ durchgeführt. Eine α -Adjustierung wurde nicht vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Differenzierung der THP-1-Zellen von Monozyten zu Makrophagen

Die Differenzierung der THP-1-Zellen mit Hilfe von PMA wurde fotodokumentarisch und durch das Messen der Phagozytoseaktivität kontrolliert. Die undifferenzierten THP-1-Monozyten weisen einen runden Zellkörper ohne nennenswerte Ausläufer auf (Abb. 5A). Nach Inkubation der Zellen für 48 h mit 5 ng PMA/ml änderte sich die Zellmorphologie grundsätzlich. Die Zellkörper wurden spindelförmig und es bildeten sich ausgeprägte Zellausläufer (Abb. 5B). Die Zellen waren weiterhin adhärent, was als Vitalitätskriterium gewertet wurde.

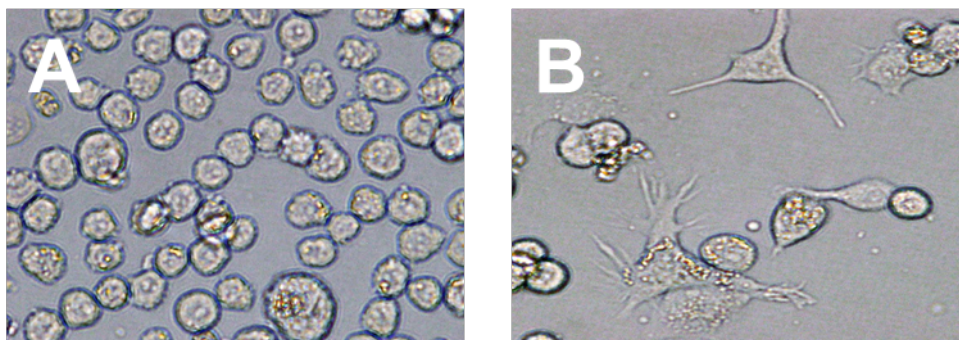


Abb. 5: Phasenkontrast-Mikroskopie von (A) undifferenzierten THP-1-Zellen und (B) THP-1-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 5 ng PMA/ml.

Als funktioneller Indikator der Differenzierung diente die Fähigkeit der Zellen zur Phagozytose. Hierfür wurden die Zellen mit Latex-Partikeln inkubiert, die mit FITC-markierten IgG-Antikörpern überzogen waren. Es zeigte sich, dass die mit PMA behandelten THP-1-Zellen eine um 50 % signifikant höhere Phagozytoseaktivität aufwiesen als undifferenzierte THP-1-Zellen (Abb. 6). Dies ist als klarer Indikator der Differenzierung zu einem phagozytären Phänotypen zu werten.

3.2 Primeretablierung

Für die humanen Gene MCP-1, IL-6, Osteopontin und IL-1 β wurde eine Primeretablierung durchgeführt um die optimale Annealing-Temperatur zu ermitteln und unspezifische PCR-Produkte auszuschließen. Abb. 7 zeigt ein Beispiel der Gelelektrophorese für humanes TNF- α . Die erwartete Größe des PCR-Produkts lag bei 54 Basenpaaren (bp). Tab. 6 stellt die Annealing-Temperaturen für die einzelnen Gene. Die definierten Temperaturen wurden für die Durchführung der qPCR genutzt.

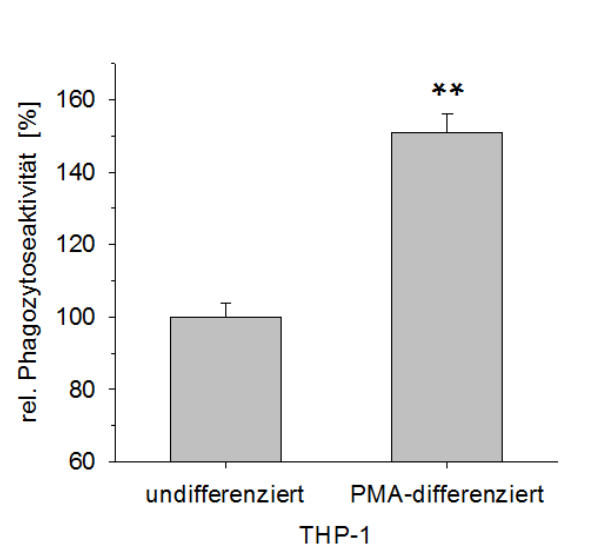


Abb. 6: Relative Phagozytose-Aktivität von undifferenzierten THP-1-Zellen und THP-1-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 5 ng PMA/ml. n=5; (**) p<0,01.

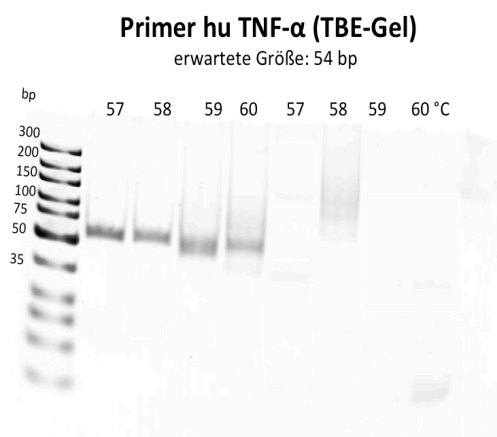


Abb. 7: Beispiel für die Primeretablierung für humanes TNF- α . Hierfür wurde die Temperatur der Annealing-Phase von 57°C bis 60°C variiert und die entstandenen Produkte elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 6: Identifizierte Annealing-Temperaturen der verschiedenen untersuchten Gene.

Spezies	Gen	Annealing-Temperatur [°C]
Mensch	hu IL-1 β	57
Mensch	hu IL-6	63
Mensch	hu MCP-1/CCL2	64
Mensch	hu Osteopontin (SPP1)	54

3.3 Genexpression in Abhängigkeit vom extrazellulären pH

Mit den identifizierten Annealing-Temperaturen wurde anschließend mittels qPCR der Einfluss der extrazellulären Azidose auf die Expression der untersuchten Gene in den verschiedenen Zelllinien bestimmt. Hierfür wurden die pH-induzierten Expressionsänderungen aus dem Vergleich der ΔCt -Werte der qPCR bei pH 6,6 und pH 7,4 ermittelt ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Da sich bei jedem PCR-Zyklus die Menge der Kopien verdoppelt, lässt sich aus dem Wert $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ der Unterschied der Expression unter den beiden pH-Bedingungen abschätzen. Aus diesem Grund sind in den folgenden Abbildungen sowohl die gemessenen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte als auch die Vervielfachung der Expression des jeweiligen Gens, die durch die Azidose erzeugt wurde, angegeben.

3.3.1 Mono Mac 6-Zellen

In den monozytären Mono Mac 6-Zellen kommt es durch die Azidose zu einer generellen Herunterregulierung der Expression. Die Zytokine COX-2, Interleukin-1 β , Interleukin-6, MCP und SPP1 wurden alle im sauren pH-Bereich vermindert exprimiert (Abb. 8). Am stärksten zeigte sich dies bei Interleukin-6. Durch Azidose wird ca. 30-fach weniger IL-6 in Mono Mac 6-Zellen exprimiert. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) war in der Mono Mac 6-Zelllinie nicht nachweisbar, sodass eine Änderung durch die extrazelluläre Azidose nicht beurteilbar war.

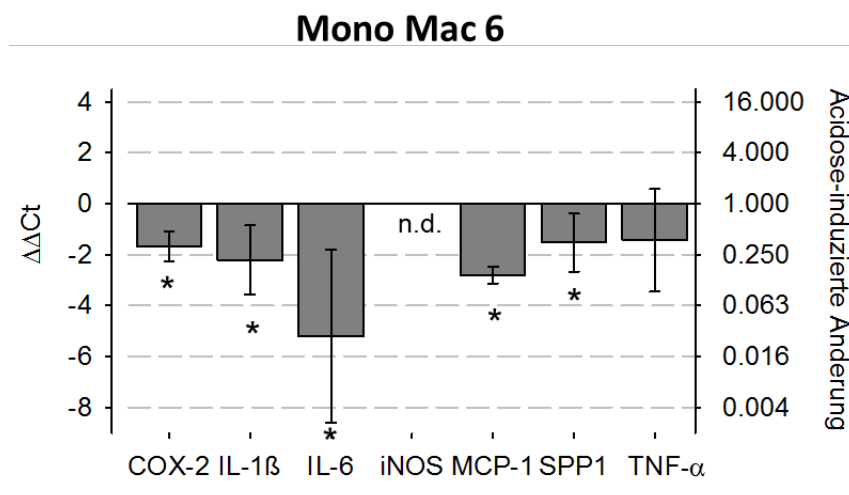


Abb. 8: Änderung der mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren durch Inkubation von Mono Mac 6-Zellen bei pH 6,6 im Vergleich zur Expression bei pH 7,4. n=6; (*) $p < 0,05$; n.d.=nicht nachweisbar.

3.3.2 Undifferenzierte THP-1-Zellen

Auch bei den undifferenzierten, monozytären THP-1-Zellen fand sich überwiegend die Tendenz, dass die untersuchten Gene bei Azidose eher herunterreguliert werden. Nach Inkubation bei pH 6,6 wurden COX-2, MCP-1 und TNF- α signifikant schwächer exprimiert, wobei die

Expression etwa um den Faktor 4 geringer war als unter Kontrollbedingungen bei pH 7,4 (Abb. 9). Auch für Interleukin-6 und SPP1 konnte eine verminderte Expression festgestellt werden. Allerdings waren diese Änderungen nicht statistisch signifikant. Interleukin-1 β sowie iNOS zeigten praktisch keine Änderung der Expression nach Inkubation in azidotischem Medium.

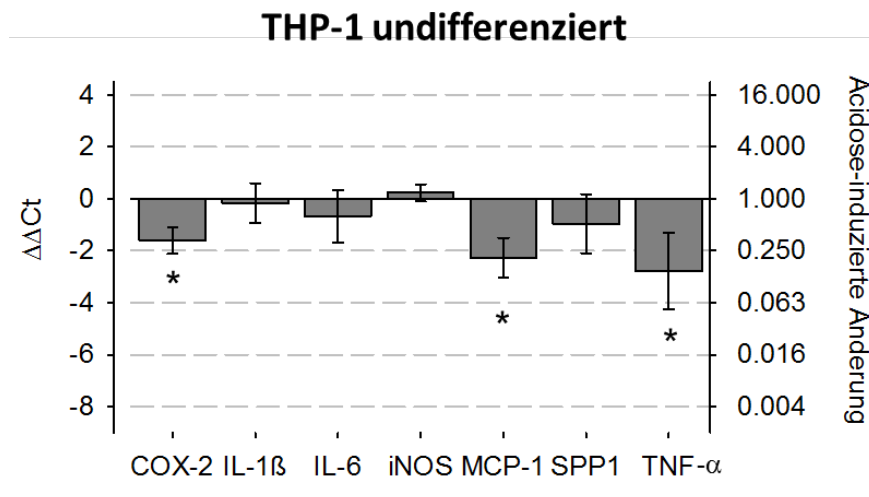


Abb. 9: Änderung der mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren durch Inkubation von undifferenzierten THP-1-Zellen bei pH 6,6 im Vergleich zur Expression bei pH 7,4. n=5; (*) p<0,05.

3.3.3 PMA-differenzierte THP-1-Zellen

Auch bei den Makrophagen wurde die Genexpression bei niedrigem pH untersucht. Die mittels PMA differenzierten THP-1-Zellen zeigten annähernd keine Änderung der Expression durch Azidose (Abb. 10). Lediglich für SPP1 und TNF- α fand sich eine geringfügige, jedoch in keinem Fall statistisch signifikante Zunahme der Expression.

3.3.4 RAW264.7-Zellen

Die murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 zeigte nach Inkubation bei einem azidotischen pH sowohl eine Hoch- als auch Runterregulierung von Genen. Eine signifikante Expressionssteigerung war für die Zytokine COX-2, Interleukin-1 β und iNOS nachweisbar (Abb. 11), wobei bei pH 6,6 die Expression etwa 4-fach höher war als unter Kontrollbedingungen. Die Expression von MCP-1 war hingegen bei niedrigem pH deutlich auf ein Viertel der Kontrolle vermindert. Die Expression von SPP1 und TNF- α wurde in dieser Zelllinie nur marginal beeinflusst.

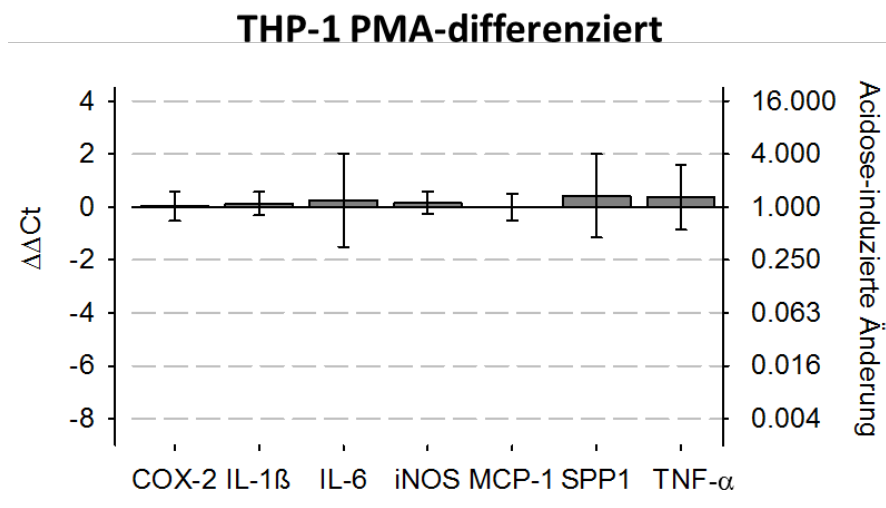


Abb. 10: Änderung der mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren durch Inkubation von PMA-differenzierten THP-1-Zellen bei pH 6,6 im Vergleich zur Expression bei pH 7,4. n=5.

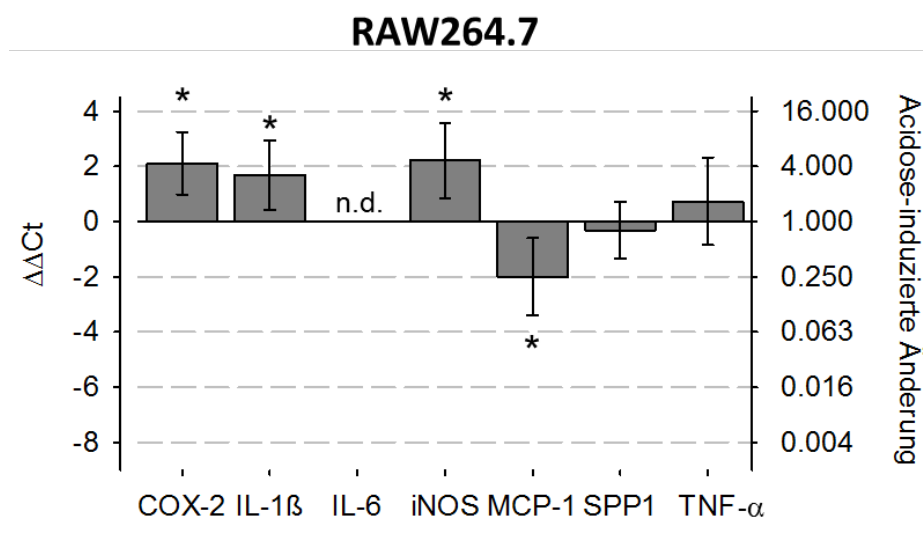


Abb. 11: Änderung der mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren durch Inkubation von RAW264.7-Makrophagen bei pH 6,6 im Vergleich zur Expression bei pH 7,4. n=6; (*) p<0,05; n.d.=nicht nachweisbar.

Zusammenfassend zeigte sich, dass auf mRNA-Ebene ein extrazellulär saures Milieu zu zelllinienspezifischen Änderungen der Expression führte. In den monozytären Zelllinien (Mono Mac 6, undifferenzierte THP-1) überwog eine Abnahme der Genexpression durch einen niedrigen pH-Wert. In den eher differenzierten Makrophagen-Zelllinien (RAW264.7, PMA-

differenzierte THP-1) zeigte sich tendenziell eine gesteigerte Expression der untersuchten Gene. Lediglich MCP-1 wurde in beiden monozytären als auch in murinen RAW246.7 Zellen durch den Einfluss von Azidose signifikant vermindert exprimiert. iNOS wurde zumindest in der Makrophagen-Linie RAW264.7 deutlich durch Azidose hochreguliert, was als Zeichen einer Aktivierung interpretiert werden kann. Da dieses Enzym in den monozytären Mono Mac 6-Zellen nicht nachzuweisen war, lässt sich eine generelle Tendenz der Expressionsbeeinflussung der iNOS nicht sicher beurteilen.

3.4 Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch extrazelluläre Azidose

Mittels Western-Blot wurde anschließend die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege (p38- und ERK1/2-MAP-Kinase, CREB) durch Azidose in den unterschiedlichen Zelllinien analysiert. Hierbei wurde sowohl die Änderung der Gesamtmenge des jeweiligen Signalmoleküls (unabhängig vom Phosphorylierungsgrad) als auch die Menge des phosphorylierten Proteins bestimmt. Abb. 12 zeigt Beispiel-Western-Blots der Protein-Expression bzw. der Phosphorylierung. Als Maß für die Aktivierung eines Signalwegs diente das Verhältnis der phosphorylierten Signalmoleküle zur Gesamtmenge.

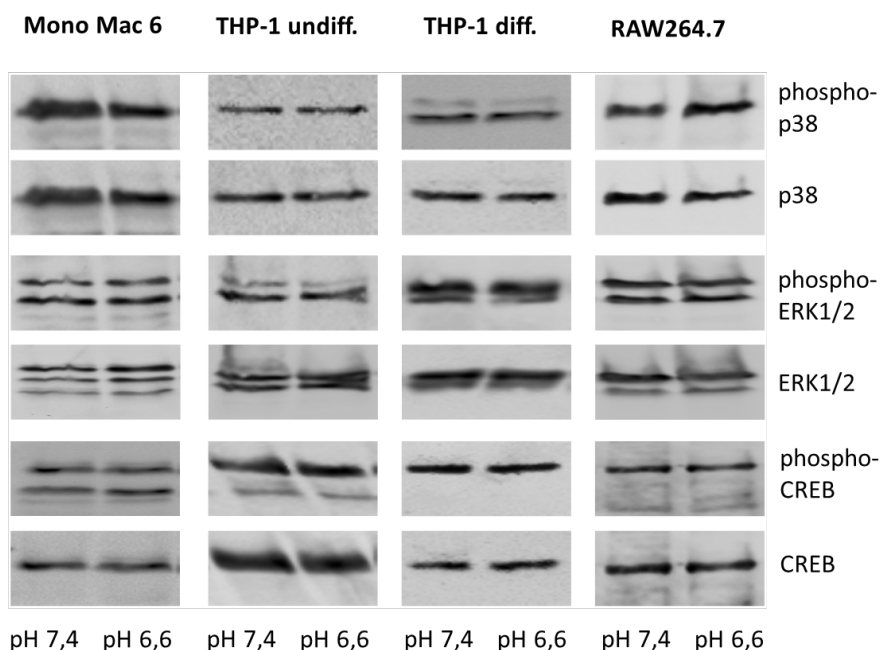


Abb. 12: Beispiele von Western-Blots von p38, ERK1/2 und CREB als Gesamtprotein und in seiner jeweils phosphorylierten Form unter azidotischen und Kontrollbedingungen in den untersuchten Zelllinien.

3.4.1 Mono Mac 6-Zellen

Die monozytären Mono Mac 6-Zellen zeigten bezüglich der MAP-Kinase ERK1/2 unter azidotischen Bedingungen eine Hochregulation der Gesamtmenge des Proteins um etwa 30 % (Abb. 13A), wobei jedoch die Menge des phosphorylierten Proteins in etwa konstant blieb, sodass das Verhältnis des phosphorylierten zum Gesamt-ERK1/2 tendenziell abnahm im Vergleich zu Kontrollbedingungen bei pH 7,4. Diese Änderungen waren aber nicht statistisch signifikant. Die MAP-Kinase p38 zeigte hingegen eine (statistisch ebenfalls nicht signifikante) Zunahme der Phosphorylierung (Abb. 13B), was für eine Aktivierung dieses Signalwegs durch die Azidose sprechen könnte. Ebenso war in den Mono Mac 6-Zellen die Expression sowohl des Gesamt-CREB als auch des phosphorylierten CREB erhöht (Abb. 13C), wobei auch hier das Verhältnis von pCREB zu Gesamt-CREB im Vergleich zu pH 7,4 leicht zunahm.

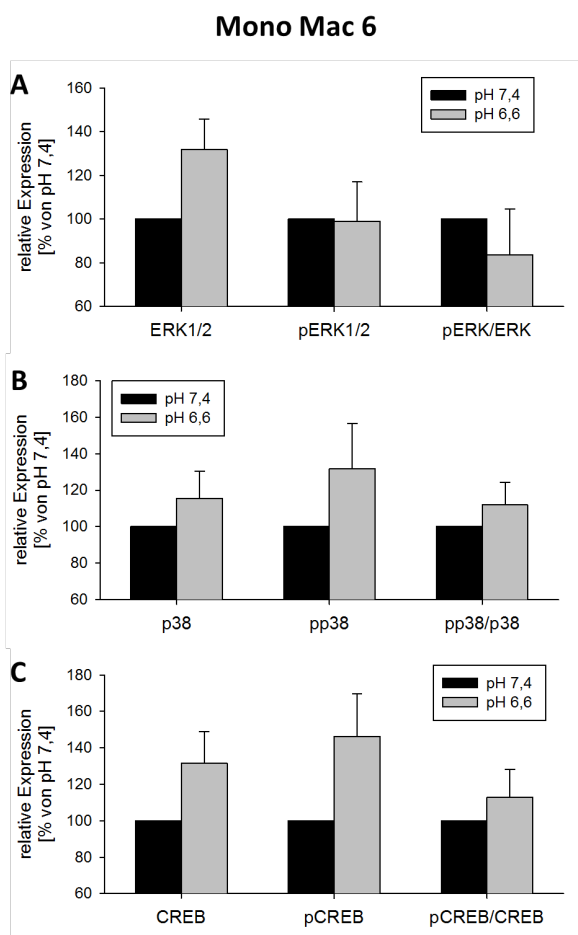


Abb. 13: Relative Expression der Signalmoleküle (A) ERK1/2, (B) p38 und (C) CREB in Mono Mac 6-Zellen unter azidotischen (pH 6,6) und Kontrollbedingungen (pH 7,4). Angegeben sind jeweils die Expressionen von Gesamt-ERK1/2, -p38 und -CREB sowie die Expression des phosphorylierten Proteins (pERK1/2, pp38, pCREB), außerdem das Verhältnis des phosphorylierten Signalmoleküls zur Gesamtmenge. Alle Angaben sind jeweils auf die Werte bei pH 7,4 normiert. n=6.

Abb. 14 fasst noch einmal zusammen, wie sich die Aktivierung der drei Signalwege nach Inkubation bei saurem pH ändert. Für ERK1/2 nimmt hierbei die Aktivierung eher ab, wohingegen die p38- und CREB-Signalwege tendenziell geringfügig aktiviert werden.

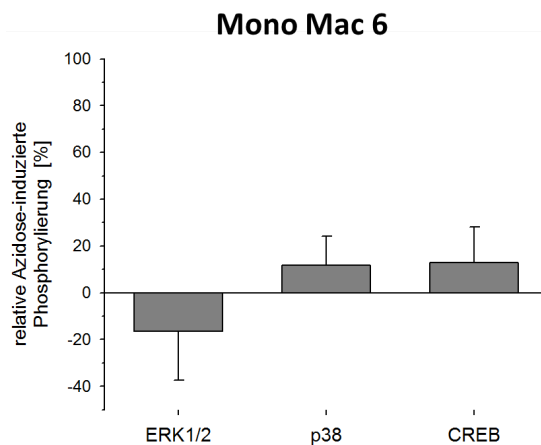


Abb. 14: Änderung der Phosphorylierung von ERK1/2, p38 und CREB durch Inkubation bei pH 6,6 in Mono Mac 6-Zellen. n=6.

3.4.2 Undifferenzierte THP-1-Zellen

Bei den undifferenzierten THP-1-Zellen führt die Azidose zu keiner nennenswerten Änderung der Gesamtmenge der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 (Abb. 15A+B). Jedoch für beide Signalmoleküle nahm die Phosphorylierung deutlich zu. Aufgrund der relativ großen Variabilität der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen war diese Zunahme jedoch nicht statistisch signifikant. Trotzdem zeigte sich, dass das Verhältnis von phosphoryliertem zu Gesamtprotein sowohl für ERK1/2 als auch für p38 zunahm. Bezüglich des Signalmoleküls CREB kam es zu einer Zunahme der Gesamtmenge und nur einer geringen Steigerung der Phosphorylierung (Abb. 15C), sodass sich das Verhältnis dieser beiden Größen sogar leicht verringerte.

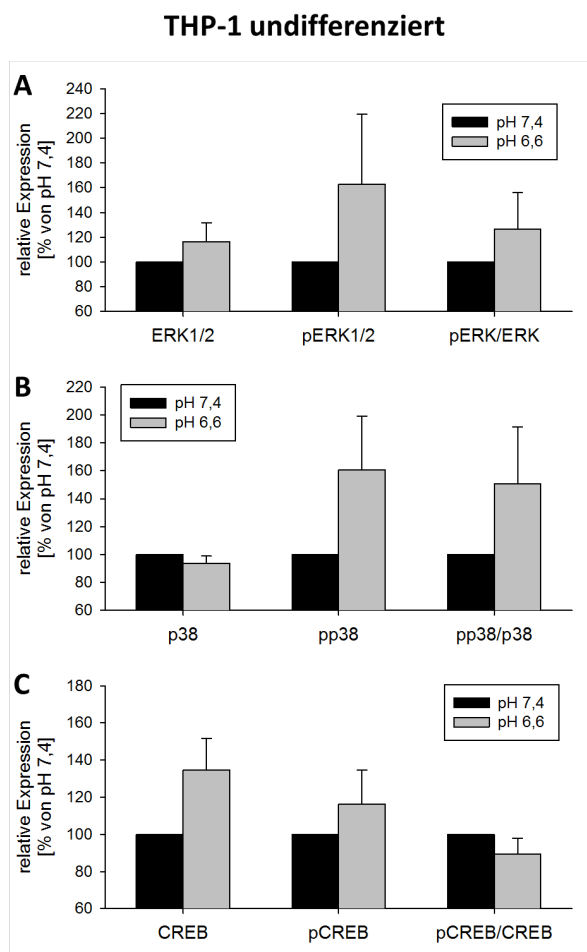


Abb. 15: Relative Expression der Signalmoleküle (A) ERK1/2, (B) p38 und (C) CREB in undifferenzierten THP-1-Zellen unter azidotischen (pH 6,6) und Kontrollbedingungen (pH 7,4). Angegeben sind jeweils die Expressionen von Gesamt-ERK1/2, -p38 und -CREB sowie die Expression des phosphorylierten Proteins (pERK1/2, pp38, pCREB), außerdem das Verhältnis des phosphorylierten Signalmoleküls zur Gesamtmenge. Alle Angaben sind jeweils auf die Werte bei pH 7,4 normiert. n=7.

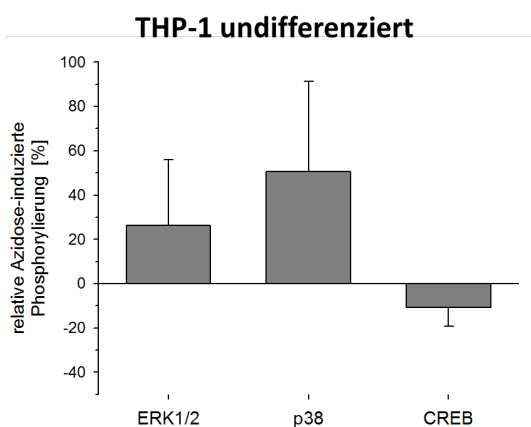


Abb. 16: Änderung der Phosphorylierung von ERK1/2, p38 und CREB durch Inkubation bei pH 6,6 in undifferenzierten THP-1-Zellen. n=7.

Die Zusammenfassung der Resultate in Abb. 16 verdeutlicht, dass es in der undifferenzierten THP-1-Zelllinie durch die Azidose zu einer Zunahme der p38-Phosphorylierung um ca. 50 % kam und auch ERK1/2 tendenziell aktiviert wurde. Diese beiden Signalwege scheinen in dieser Zelllinie aktiviert zu werden.

3.4.3 PMA-differenzierte THP-1-Zellen

In den mit PMA zu einem phagozytären Phänotyp differenzierten THP-1-Zellen fällt in erster Linie die markante Zunahme sowohl des Gesamt-p38 um 88 % als auch des phosphorylierten p38 um 175 % auf (Abb. 17B). Hier muss einschränkend festgestellt werden, dass in diesen Versuchen die Streuung der Messwerte zwischen den Messwiederholungen außerordentlich hoch war. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse auch nicht statistisch signifikant. Das Verhältnis von phosphoryliertem zu Gesamt-p38 zeigte hierbei auch nur eine geringe Zunahme um 25 %. Bei ERK1/2 zeigte sich sowohl eine Zunahme des Gesamtproteins als auch eine etwas schwächere Steigerung des phosphorylierten Proteins (Abb. 17A), sodass sich praktisch keine Änderung des Quotienten als Indikator der Aktivierung dieses Signalwegs ergab. CREB schließlich zeigte eine nicht signifikante Zunahme des Gesamtproteins (Abb. 17C), jedoch keine Änderung des phosphorylierten Proteins.

Abb. 18 fasst diese Ergebnisse nochmals zusammen. In den PMA-differenzierten THP-1-Zellen kam es höchstens tendenziell zu einer leichten Aktivierung der MAP-Kinasewege ERK1/2 und p38 und zu einer geringfügigen Hemmung des CREB-Wegs. Offensichtlich hat in dieser Zelllinie die Azidose nur einen untergeordneten Effekt auf die Aktivierung der untersuchten Signalkaskaden.

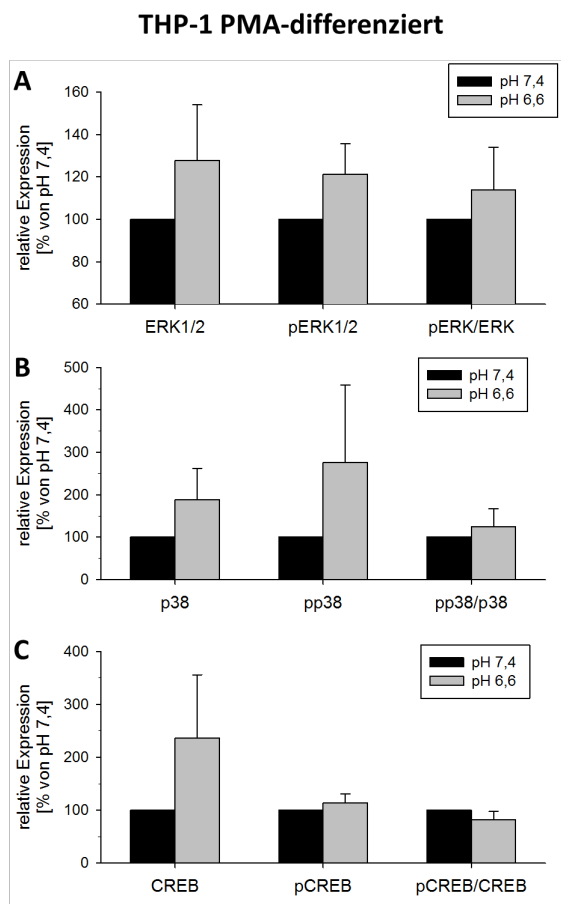


Abb. 17: Relative Expression der Signalmoleküle (A) ERK1/2, (B) p38 und (C) CREB in PMA-differenzierten THP-1-Zellen unter azidotischen (pH 6,6) und Kontrollbedingungen (pH 7,4). Angegeben sind jeweils die Expressionen von Gesamt-ERK1/2, -p38 und -CREB sowie die Expression des phosphorylierten Proteins (pERK1/2, pp38, pCREB), außerdem das Verhältnis des phosphorylierten Signalmoleküls zur Gesamtmenge. Alle Angaben sind jeweils auf die Werte bei pH 7,4 normiert. n=5-6.

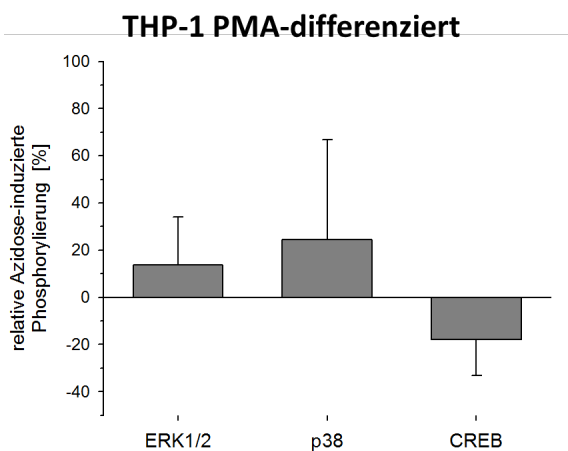


Abb. 18: Änderung der Phosphorylierung von ERK1/2, p38 und CREB durch Inkubation bei pH 6,6 in PMA-differenzierten THP-1-Zellen. n=5-6.

3.4.4 RAW264.7-Zellen

Die murine Makrophagen-Zelllinie zeigte nach Inkubation eine deutliche Phosphorylierung der MAP-Kinase p38, wohingegen ERK1/2 annähernd unverändert blieb (Abb. 19).

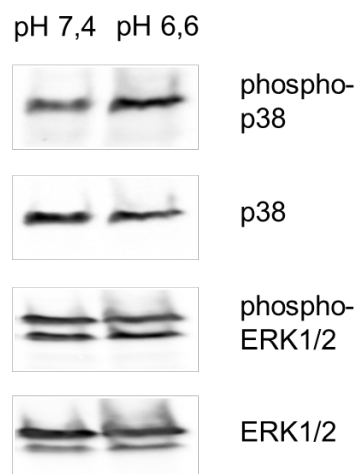


Abb. 19: Western-Blot-Beispiele der Gesamt-Expression bzw. der Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 nach Inkubation bei pH 7,4 und pH 6,6.

Im Mittel zeigte sich bei den RAW264.7-Zellen, dass die Inkubation bei pH 6.6 zu einer statistisch nicht signifikanten Zunahme der Gesamtexpression von ERK1/2 um etwa 40 % führte, die Phosphorylierung sich aber nur geringfügig änderte (Abb. 20A). Bei p38 änderte sich unter azidotischen Bedingungen die Gesamtexpression nur wenig, jedoch kam es zu einer statistisch signifikanten Steigerung der p38-Phosphorylierung um etwa 40 % (Abb. 20B). Eine stark vermehrte Phosphorylierung fand sich auch beim Transkriptionsfaktor CREB, bei dem die Zunahme der Phosphorylierung sogar etwa 100 % betrug, jedoch aufgrund der hohen Variabilität zwischen den einzelnen Versuchen nicht statistisch signifikant war (Abb. 20C).

Abb. 21 fasst für die RAW264.7-Makrophagen nochmals den Effekt einer Inkubation bei pH 6.6 auf die Aktivierung der untersuchten Signalwege zusammen. Sowohl für p38 als auch für CREB kam es zu einer deutlichen Aktivierung, wohingegen der ERK1/2-Signalweg annähernd unverändert blieb.

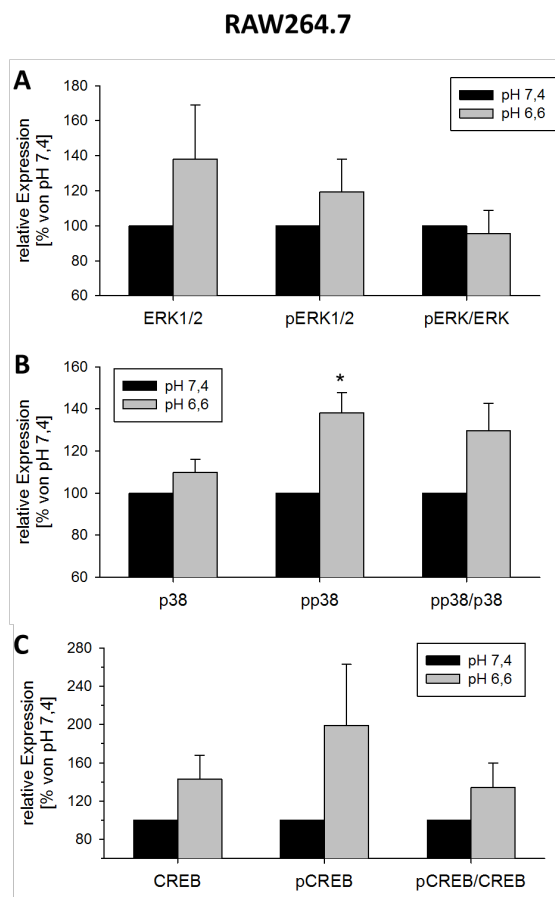


Abb. 20: Relative Expression der Signalmoleküle **(A)** ERK1/2, **(B)** p38 und **(C)** CREB in RAW264.7-Makrophagen unter azidotischen (pH 6,6) und Kontrollbedingungen (pH 7,4). Angegeben sind jeweils die Expressionen von Gesamt-ERK1/2, -p38 und -CREB sowie die Expression des phosphorylierten Proteins (pERK1/2, pp38, pCREB), außerdem das Verhältnis des phosphorylierten Signalmoleküls zur Gesamtmenge. Alle Angaben sind jeweils auf die Werte bei pH 7,4 normiert. n=6; (*) p<0,05.

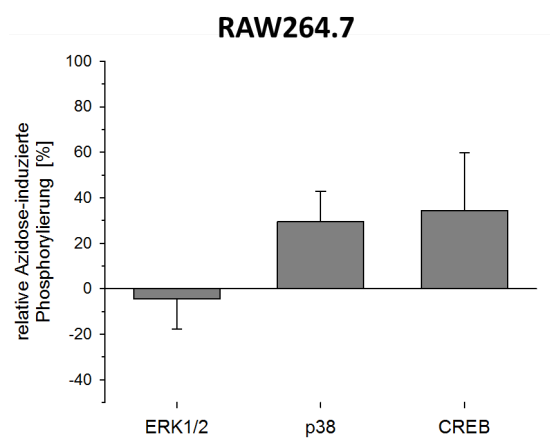


Abb. 21: Änderung der Phosphorylierung von ERK1/2, p38 und CREB durch Inkubation bei pH 6,6 in RAW264.7-Makrophagen. n=6.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Phosphorylierung und damit die Aktivität der Signalwege durch Azidose in den verschiedenen Zelllinien beeinflusst werden. Die MAP-Kinase p38 zeigte hierbei die deutlichste Änderung und wurde in allen Zelllinien vermehrt phosphoryliert. Diese Aktivierung war aber unabhängig davon, ob die Zellen eher einen monozytären Phänotyp aufwiesen oder Makrophagen-ähnlich waren. Die MAP-Kinase ERK1/2 zeigte tendenziell in THP-1-Zellen (undifferenziert und PMA-differenziert) eine leichte Aktivierung, in den beiden anderen Zelllinien wurde ERK1/2 nicht oder sogar negativ beeinflusst. Auch hier bestand kein Zusammenhang mit dem Differenzierungsstatus der Zellen. Der Transkriptionsfaktor CREB wurde in RAW264.7- und Mono Mac 6-Zellen aktiviert, jedoch bestanden in den Messungen große interindividuelle Unterschiede, was zu einer starken Streuung der Messwerte führte. In THP-1-Zellen kam es tendenziell zu einer Verminderung der Phosphorylierung von CREB. Auch für die Azidose-induzierte CREB-Phosphorylierung bestand kein Zusammenhang mit der Differenzierung der Zelle.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss einer extrazellulären Azidose auf die Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren in monozytären Zellen und Makrophagen. Außerdem sollten einige, an der Regulation beteiligten Signalwege analysiert werden. Eine Azidose mit pH-Werten zwischen 6 und 7 tritt bei zahlreichen pathophysiologischen Vorgängen auf.

4.1 Pathophysiologische Veränderungen im azidotischen Mikromilieu

Bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4 liegt in den meisten Zellen ein etwas niedrigerer intrazellulärer pH-Wert zwischen 7,0 bis 7,2 vor. Durch diverse kationische, z. B. Na^+/H^+ -Austauscher, und anionische Membrantransporter, wie beispielsweise $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, wird die Konstanzhaltung des intrazellulären pH gewährleistet. In verschiedenen pathologischen Umgebungen kommt allerdings schon extrazellulär ein erniedrigter pH-Wert vor. Eine extrazelluläre Azidose mit pH-Werten bis unter 5,5 findet sich unter anderem im entzündeten, ischämischen Gewebe und im Tumorgewebe.

4.1.1 Pathophysiologische Veränderungen im ischämischen Gewebe

Wird Gewebe über einen bestimmten Zeitraum nicht suffizient mit Blut versorgt, spricht man von einer Ischämie. Aufgrund der mangelnden Blutzufuhr kommt es initial zu einer unzureichenden O_2 -Versorgung des Gewebes [5]. Um die Energieversorgung sicherzustellen, kommt es, sofern ausreichend Glukose vorhanden ist, zu einem glykolytischen Stoffwechsel, bei dem neben Laktat auch Protonen entstehen, die zu einer Ansäuerung des Extrazellularraums führen. Bleibt die Ischämie längere Zeit bestehen, kommt es, bedingt durch den ATP-Mangel, zu einer Funktionseinschränkung der aktiven Ionen-Pumpen, was letzten Endes zu einem nekrotischen Zelltod mit Freisetzung biologischer Makromoleküle aus dem Zellinneren führen kann. Aber auch, wenn nach einer Ischämiephase die Durchblutung wieder einsetzt und der O_2 -Mangel behoben wird, kann es zu einer weiteren Schädigung des Gewebes und damit zur Aktivierung einer Abwehrreaktion durch die Bildung von reaktiven O_2 -Spezies (ROS) [12] kommen (Ischämie-Reperfusionsschaden). Die freigesetzten Radikale führen darüber hinaus, über intrazelluläre Second-Messenger-Systeme zu einer vermehrten Genexpression von proinflammatorischen Faktoren. Diese Vorgänge führen zur Aktivierung des Immunsystems im ischämischen Gewebe. Neben einer unzureichenden O_2 - und Nährstoffversorgung kommt es im ischämischen Gewebe aber auch zu einer Akkumulation von Stoffwechselprodukten, da die Entsorgung ebenfalls gestört ist. Sowohl CO_2 als auch andere saure Metaboliten (z. B. Laktat) reichern sich an und führen zu einer Absenkung des pH-Werts, also zu einer Gewebs-Azidose [46]. Bei akuten Is-

chämien bewirkt dies kurzfristig Nekrosen, während eine chronische Unterversorgung zu degenerativen Veränderungen, wie Fibrosierung und Verfettung des Gewebes, führt.

4.1.2 Pathophysiologische Veränderungen im entzündeten Gewebe

Pathobiologisch stellt die Entzündung einen Adaptationsprozess des Organismus an mechanische, physikalische oder chemische Noxen dar, um die dadurch entstehenden Schäden möglichst zu minimieren. Die stattfindenden Prozesse stellen eine komplexe Reaktion unter Beteiligung von Blutgefäßen, Immunzellen, Zytokinen und strukturellen Bestandteilen des Bindegewebes dar. Ätiologisch teilt man die Entzündung nach thermischer, mechanischer, chemischer, immunologischer und mikrobieller Pathogenese ein und differenziert zwischen perakuten, akuten, subakuten und chronischen Prozessen und je nach Örtlichkeit zwischen lokalen und systemischen. Diverse exsudative Entzündungsreaktionen, welche für die klassischen klinischen Zeichen einer Entzündung (Rubor, Calor, Dolor, Tumor und Functio Laesa) verantwortlich sind, sind seit langem beschrieben. Eine Rötung und Schwellung des entzündeten Gewebes wird durch vorliegende Mikrozirkulationsveränderungen verursacht. Nach einer Phase der Hypozirkulation kommt es nach einigen Minuten zur reaktiven Zirkulationssteigerung, welche von einer Konstriktion der Venolen gefolgt wird, um die systemische Ausbreitung der Noxe zu minimieren. Des Weiteren findet sich im entzündeten Gewebe eine Permeabilitätssteigerung, die zu einer vermehrten Exsudation führt. Hierdurch wird eine Verdünnung, eine Fixierung durch gerinnendes Fibrin und eine Abschwächung der Noxe durch rekrutierte humorale Abwehrstoffe gewährleistet. Die gesteigerte Permeabilität wird unter anderem durch Prostaglandine, Histamin und Interleukine verursacht. Chemokine bewirken eine Leukozytenmigration, um eine lokale und suffiziente Abwehrreaktion zu erreichen [57]. Ein anhaltendes Einströmen der Immunzellen führt zu einer Schädigung des Gewebes und zum Abbau körpereigener Matrix. Da diese zu einem großen Anteil aus sauren Aminosäuren (Glutamin und Aspartat) bestehen, verschiebt sich bei deren Abbau der pH-Wert des Gewebes ins saure Milieu. Zu der Entzündung tragen Endothelzellen, Thrombozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sowie Lymphozyten [83] und Plasmazellen bei. Während Endothelzellen für eine selektive Permeabilität für Lymphozyten und Granulozyten sorgen, sind Thrombozyten, neben ihrer Funktion als zelluläre Komponente des Hämostasesystems, die Bildungsstätte für Kinine und Prostaglandine. Neutrophile Granulozyten weisen eine phagozytotische Funktion auf [84] und setzen chemotaktische Substanzen frei. Eosinophile Granulozyten reagieren mit Hilfe spezifischer Rezeptoren auf IgG, IgA und Komplementfaktoren und sezernieren diverse zytotoxische Metaboliten [85].

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des azidotischen Milieus für funktionelle Eigenschaften von Monozyten und Makrophagen untersucht. Aufgrund ihrer Chemokinrezeptoren

kann man Monozyten in zwei Hauptgruppen unterteilen. Monozyten, die eine starke Expression des Oberflächenmarkers CD14 zeigen, weisen eine kurze Lebenszeit auf und werden aktiv in das Entzündungsgewebe rekrutiert. Es wird davon ausgegangen, dass diese (auch „inflammatorische Monozyten“ genannt) zu dendritischen Zellen differenzieren, um dort die Immunantwort zu unterstützen. Im Gegensatz dazu stehen die CD16-positiven Monozyten, die sich besonders im entzündungsfreien Gewebe finden. Mit einer Halbwertszeit von ca. 72 Stunden können Monozyten während einer Infektion durch Chemotaxis in das Gewebe migrieren, um dort für Wochen bis Monate als Gewebsmakrophagen zu verbleiben.

Makrophagen sind Zellen der chronischen Entzündung. Frühestens 48 Stunden nach Entzündungsbeginn migrieren Monozyten ins Gewebe und differenzieren zu Makrophagen. Diese Entzündungszellen sind nicht nur für die Phagozytose zuständig [33], sondern sezernieren auch chemotaktische Faktoren, Hydrolasen und lysosomale Enzyme. Des Weiteren produzieren sie Interleukin-1 als Lymphozytenregulator und Wachstumsfaktoren für Fibroblasten.

Monozyten und Makrophagen gehören zu den Zellen des Immunsystems, die sekretorisch am aktivsten sind. Als Antwort auf bestimmte Signale wird eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen freigesetzt, mit deren Hilfe Monozyten und Makrophagen immunologische Vorgänge gezielt beeinflussen können. Im Rahmen einer akuten Entzündung übernehmen Monozyten und Makrophagen mit der Freisetzung von pro- oder anti-inflammatorischen Substanzen und der Beeinflussung der lymphozytären Entzündungsantwort eine zentrale Aufgabe.

Zusammenfassend spielen sowohl Monozyten als auch Makrophagen eine essenzielle Rolle bei der Erkennung von körperfremden Material, wie Bakterien oder Viren, bei der Produktion proinflammatorischer Chemokine und Zytokine und bei der Phagozytose körperfremden Materials.

4.1.3 Pathophysiologische Veränderungen im Tumorgewebe

Das Tumormikromilieu zeichnet sich durch bestimmte Eigenschaften aus, die sich stark von physiologischem Gewebe unterscheiden. Ursache für zahlreiche Abweichungen gegenüber dem Normalgewebe ist ein insuffizientes Gefäßsystem, das zu einer Störung der Mikrozirkulation führt und oben genannte Prozesse eines chronischen O₂-Mangels verursacht. Die Beeinflussung des Blutstroms und so der hiermit verbundenen physiologischen Parameter zeichnet sich durch eine ausgeprägte zeitliche und räumliche Heterogenität aus. Durch schnelles Wachstum kommt es aufgrund einer insuffizienten Angiogenese in Tumoren zur Hypoxie, die eine charakteristische Eigenschaft vieler humaner Malignome ist [5]. Wie bereits beschrieben, stellt Glukose im physiologischen Gewebe die Hauptenergiequelle für die Zellen dar. Durch den O₂-Mangel in

Tumoren wird der glykolytische Stoffwechsel gefördert, sodass vermehrt Milchsäure anfällt, was letzten Endes zu einer Senkung des pH-Werts führt [46]. Daneben ist seit langem bekannt, dass Tumoren auch bei ausreichender O₂-Versorgung Glykolyse betreiben, ein Phänomen, das als Warburg-Effekt bezeichnet wird [1; 9].

Das Tumorgewebe besteht neben Tumorzellen auch aus Fibroblasten, die für die Produktion der extrazellulären Matrix zuständig sind [86], den die Gefäßformation beeinflussenden Endothelzellen [86], und aus Immunzellen, wie Makrophagen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten [87-90].

Hier stellen besonders die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) eine wichtige Komponente dar. Die Verbindung zwischen Inflammation und der Tumorgenese oder –progression wird unter anderem durch TAM bewirkt. Die Makrophagen produzieren EGF (epidermal growth factor), was zur Migration der Tumorzellen führt, und VEGF, um die Angiogenese zu fördern [91]. Tumorzellen ihrerseits sezernieren Chemokine und können so zur Rekrutierung der Makrophagen ins Tumormikromilieu führen [88]. Wie bereits erwähnt, lassen sich Makrophagen in sogenannte M1- und M2-Makrophagen einteilen [92]. Untersuchungen zeigten, dass TAM eher den M2-Makrophagen zuzuordnen sind. Sie initiieren durch Produktion diverser Enzyme (Serinproteasen, Matrixmetalloproteasen [93]) die Störung der Basalmembran, die Migration von Tumorzellen und schlussendlich deren Zugang ins Gefäßsystem [88; 94]. Durch Sekretion des proinflammatorischen TNF- α wird über Aktivierung des NF- κ B sowohl die Tumorgenese als auch die Metastasierung vorangetrieben [95]. Taddei et al. zeigten zusätzlich, dass TAM zur Angiogenese befähigt sind, was die gesteigerte O₂- und Nährstoffversorgung gewährleistet [88]. Des Weiteren zeigten Bingle et al., dass eine hohe Zahl an TAM mit einer schlechten Prognose besonders bei Cervix-, Blasen- und Mamma-Ca. korreliert [96].

Das Tumorgewebe besteht aus verschiedenen Arealen. Unter anderem werden hierzu sogenannte Tumorzellnester, das peritumorale Stroma und neben perivaskulären Regionen auch die hypoxischen Gebiete gezählt [86]. Je nach Tumoreal differieren die spezifischen Eigenschaften der TAM [86]. Tumoreale mit verminderter Sauerstoffversorgung weisen eine hohe Anzahl an TAM auf. Durch aufgrund der Hypoxie stattfindende Chemokinsekretion der Tumorzellen werden Makrophagen rekrutiert [97]. Zu den „Stressfaktoren“, die auf das Tumorgewebe einwirken, zählen neben der Hypoxie auch eine Hypoglykämie aufgrund niedriger Glukoselevel. Auch diese führt zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion was dementsprechend über eine verstärkte Proliferation zur besseren Nährstoffversorgung führt [91]. Neben den beschriebenen Einflüssen führen auch erhöhte Laktatwerte zur verehrten VEGF-Sekretion im Tumorgewebe [91].

Es zeigt sich also deutlich, dass das metabolische Mikromilieu eine entscheidende Rolle für TAM und deren Sekretionsverhalten spielen kann. Da sich das Tumormilieu neben einer Hypoxie und hohen Laktatkonzentrationen auch klassischerweise stark durch einen niedrigeren pH auszeichnet, stellte sich die Frage, inwieweit eine extrazelluläre Azidose das Verhalten von Makrophagen im Tumorgewebe beeinflusst.

4.2 Material und Methode

4.2.1 Verwendete Zelllinien

Die Untersuchungen wurden sowohl an monozytären Zelllinien als auch an Makrophagen durchgeführt. Monozyten als nicht-aktivierte Zellen zirkulieren mit dem Blutstrom durch den Organismus. Sie besitzen hierbei die Fähigkeit die Blutbahn bei Bedarf zu verlassen und zu Makrophagen aktiviert zu werden. Da im Rahmen einer ausgeprägten Gewebsazidose auch das Blut in Kontakt mit dem erniedrigten pH kommt, wurde der Effekt der Azidose auch auf diese nicht-aktivierten Zellen untersucht. Als Modell für monozytäre Zelllinien wurden die humanen Mono Mac 6 und die THP-1-Zellen verwendet, beides Zelllinien, die schon umfangreich für experimentelle Untersuchungen genutzt wurden [98; 99]. Als Makrophagenmodell dienten die PMA-differenzierten Makrophagen sowie die murine RAW264.7-Zelllinie.

a. Mono Mac 6 (MM6) - Monozyten

Diese humane Monozyten-Zelllinie ist ein gängiges Monozytenmodell. Sie weist, wie bereits beschrieben, Eigenschaften auf, die mit denen von Monozyten im Blut übereinstimmen. Die Mono Mac 6 gelten als klassisches Zellmodell für reife Monozyten [100]. Sie produzieren als wichtigsten Marker die monozytäre nicht spezifische Esterase [100]. Hierbei handelt es sich um eine Carboxylesterase, welche für Monozyten einer myeloid-leukämischen Zelllinie typisch ist [101]. Des Weiteren exprimieren MM6 monozytäre Antigene, die charakteristisch für reife Monozyten sind. Hierzu zählen unter anderen M42, Leu M3 und UCHMI [100]. Da MM6-Zellen IL-1 β , IL-6, IL-8, und TNF- α [102] sowie COX-2 [103] produzieren, zeichneten sie sich besonders als Monozytenmodell für die vorliegende Arbeit aus. Zusätzlich sezernieren sie diverse Gene, die am ERK1/2 Signalweg beteiligt sind [104]. Klassische Eigenschaften für reife Monozyten sind die antikörpervermittelte Zytotoxizität, die Fähigkeit zur Phagozytose [104] und die Expression des Antigens My4 [100]. Da MM6 in RPMI-Medium gut kultivierbar sind und eine Verdopplungszeit von 50 Stunden haben [100], eignen sie sich auch aus labortechnischen Gründen gut als Monozytenmodell.

b. THP-1-Monozyten

Humane THP-1-Zellen gelten als klassisches Modell für unreife Monozyten und werden regelmäßig für Untersuchungen verschiedener Signalwege, Medikamententransporte oder zur Differenzierung genutzt. Darüber hinaus sind THP-1-Zellen relativ einfach zu kultivieren und können mittels PMA zu Makrophagen differenzieren. Auch gibt es keine Hinweise, dass diese Zellen infektiöse Kontaminationen oder einen viralen Befall aufweisen [99]. Dies macht die Zelllinie zu einem relativ sicheren Untersuchungsmodell mit geringen Risiken. Ein weiterer Vorteil liegt in der Stabilität der Zelllinie bei häufiger Passagierung. Die Monozyten können durchschnittlich drei Monate in Suspension erhalten werden, ohne dass sich die Zelleigenschaften ändern und es lassen sich so relativ konstante Untersuchungsbedingungen schaffen. Die Zelllinie ist in ihren Eigenschaften sehr konstant. Es wird eine geringe Variabilität gefunden, was eine Vergleichbarkeit der einzelnen Untersuchungen und eine gute Wiederholbarkeit bewirkt [99]. Sun et al. zeigten, dass die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β , und der ERK 1/2-Signalweg in monozytären THP-1-Zellen beeinflusst werden kann [105], was die Zellen zu einem geeigneten Monozytenmodell für diese Arbeit qualifiziert. Auch die nachgewiesene TNF- α -Sekretion der THP-1-Monozyten [106] ist eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung dieser Zelllinie. Da THP-1-Monozyten zu Makrophagen differenziert werden können, bietet sich eine interessante Untersuchungsmöglichkeit der Zelleigenschaften in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad [79]. Je nachdem, in welcher Suspension die monozytären THP-1-Zellen inkubiert wurden, entwickeln sich die jeweiligen Makrophagenarten. Inkubiert man die Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) und INF- γ , so erhält man M1-Makrophagen. Im Gegensatz dazu erhält man M2-Makrophagen nach Inkubation mit PMA, wie es in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, um die für Tumoren charakteristischen M2-TAM zu erhalten [98].

c. THP-1 Differenzierung zu Makrophagen

Mit Hilfe der PMA-Inkubation erfolgte die Differenzierung der monozytären THP-1-Zellen zu M2-Makrophagen. Phagozytosemessungen zeigten, dass die differenzierten Zellen makrophagentypische Eigenschaften aufwiesen. Untersuchungen der Genexpression der PMA-behandelten Zellen ergaben eine extrem geringe und unspezifische Expression der Zytokine. Es ist zu untersuchen, ob die Differenzierung Einfluss auf alle makrophagentypischen Eigenschaften hatte. So ist die Phagozytoseeigenschaft charakteristisch für Makrophagen, eine Genexpression klassischer Zytokine konnte allerdings nicht gezeigt werden. Park et al. zeigten, dass die Inkubation mit 5 ng/ml PMA nicht zu einer Überexpression bestimmter Gene, wie z. B. TNF- α , MCP-1 oder IL-1 β , führte [107]. Dagegen bewirkte eine Inkubation mit höheren Konzentrationen

nen eine deutliche Hochregulierung der Genexpression [79]. Diese Studie zeigte auch deutliche Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten THP-1-Zellen [79]. Im Gegensatz zu den monozytären Zellen ließen sich die mit PMA inkubierten Kontrollen durch LPS zur vermehrten Genexpression stimulieren [79]. Differenzierte THP-1-Zellen produzieren die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β [107] und IL-8 [108]. Park et al. zeigten, dass durch Hemmung von p38 zum einen die IL-6-Produktion kontrolliert wurde, zum anderen aber auch durch Hemmung des ERK1/2-Signalwegs die Sekretion proinflammatorischer Zytokine herunterreguliert wurde [107]. Diese Beeinflussungsmöglichkeit der differenzierten THP-1-Zellen qualifizierte die Zelllinie als ein geeignetes Makrophagenmodell.

d. RAW264.7-Makrophagen

Die murinen Makrophagen RAW264.7 wurden aus dem Aszites einer tumorösen Maus extrahiert und stellen ein klassisches Modell für reife Makrophagen dar. Raschke et al. beschrieben bereits 1978 die Makrophagen-pathognomonischen Eigenschaften der untersuchten Zellen [81]. Sie sind zur Phagozytose befähigt, produzieren Lysozym und sind fähig zur Antikörpervermittelten Lyse von Erythrozyten [81]. Die Zellen werden durch LPS aktiviert und verfügen über diverse Rezeptoren für Immunglobuline und Komplementfaktoren [81]. Im Vergleich zu anderen untersuchten Makrophagenzelllinien, wie beispielsweise die RAW 309Cr.1 oder WR 19M, produzieren RAW264.7 die höchste Menge an Lysozym und weisen die höchste Phagozytoserate des Homoglykans Zymosan auf [81]. Werden die Zellen mit LPS stimuliert, produzieren diese kalziumabhängig iNOS, eine wichtige Eigenschaft funktionell aktiver Makrophagen. Die beschriebenen makrophagentypischen Eigenschaften, wie Phagozytose [109], antikörpervermittelte Zellyse und die Produktion verschiedener Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β , IL-6 [110] und COX-2 [111], machten die RAW264.7 zu einem zellbiologisch geeigneten Makrophagenmodell. Su et al. untersuchten die Phosphorylierung der MAPK der RAW264.7-Makrophagen bei Inkubation mit Glukose und TGF- β 1 [112]. Die Möglichkeit der Phosphorylierungsbeeinflussung und deren Untersuchung waren für die vorliegende Arbeit von Nutzen.

4.2.2 Messmethodik

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren in den einzelnen Zelltypen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer PCR bestimmt. Die real time PCR oder auch quantitative qPCR beruht auf demselben Prinzip wie die herkömmliche PCR bei der durch spezifische Primer vorher festgelegte Nukleotidsequenzen vervielfältigt werden. Vorteil der qPCR ist die zusätzliche Möglichkeit der Quantifizierung der gewonnenen DNA mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung. Betrachtet man die Methode der qPCR kritisch, so

ergeben sich neben dem Vorteil der direkt möglichen Quantifizierung weitere Vorzüge. Vorteilhaft sind die große Menge und das weite Spektrum an detektierten Nukleinsäuresequenzen. Die qPCR wird nicht nur in der molekularen Diagnostik, sondern auch im medizinischen Bereich und in der Agrarwirtschaft genutzt. Die hohe Geschwindigkeit, eine große Sensitivität und Spezifität machen die qPCR zu einer häufig genutzten und etablierten Methode zum Nachweis der Genexpression[113].

Es bestehen aber auch einige Nachteile für die Verwendung der PCR. Wird bei der Probenentnahme unsauber gearbeitet und gelingt es nicht, die RNA zu isolieren, ist es im weiteren Ablauf nicht möglich, geringgradig exprimierte Nukleinsäuresequenzen nachzuweisen. Während des Extraktionsvorgangs ist jegliche Verunreinigung zu vermeiden, da die Masse der erhaltenen RNA maßgeblich von einem keimfreien Arbeiten abhängt und so die Ergebnisse der qPCR beeinflusst. Außerdem muss festgehalten werden, dass mit dieser Methode nur die Expression auf RNA-Ebene und nicht als Protein untersucht wird. Da bekannt ist, dass auch posttranskriptional und posttranslational die Expression über unterschiedliche Vorgänge von der Zelle reguliert werden kann, müssen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekte auf die RNA-Expression sich nicht zwangsläufig in gleichartigen Änderungen der Proteinexpression widerspiegeln. Weiterführende Untersuchungen müssen überprüfen, ob mRNA- und Proteinmessungen zu gleichen Resultaten führen. Um die Wirkung der Azidose auch auf die Expression der untersuchten Zytokine zu untersuchen, könnten zusätzlich ELISA durchgeführt werden, um die Konzentration der sezernierten Proteine zu ermitteln.

Für die Untersuchung der Signalwege wurden die entsprechenden Proteine in ihrer phosphorylierten Form bzw. als Gesamtprotein mittels Western-Blot nachgewiesen. Hierbei werden die Proteine durch eine Elektrophorese getrennt, durch Antikörper detektiert und quantifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode für die Untersuchung der Beeinflussung von ERK1/2, p38 und MAPK während Azidose-Inkubation verwendet.

Neben der Expression von Zytokinen besitzen Makrophagen auch wichtige funktionelle Eigenschaften, wie z. B. Phagozytose, aktive Migration, antikörpervermittelte Zellyse oder die Bildung reaktiver O_2^- - bzw. N_2^- -Spezies. Als funktioneller Indikator der Differenzierung der monozytären THP-1-Zellen zu Makrophagen wurde die Fähigkeit der Zellen zur Phagozytose gewertet. Es zeigte sich, dass die mit PMA behandelten THP-1-Zellen eine um 50 % signifikant höhere Phagozytoseaktivität aufwiesen als undifferenzierte THP-1-Zellen, was als klarer Indikator der Differenzierung zu einem phagozytären Phänotypen zu werten ist.

Auch diese funktionellen Eigenschaften von Makrophagen können durch eine extrazelluläre Azidose beeinflusst werden, was jedoch außerhalb des Fokus der aktuellen Untersuchung

liegt. Zukünftige Untersuchungen sollten jedoch den Einfluss der Azidose auf Phagozytose, Migration oder Radikalbildung untersuchen. Auch hier wäre von Interesse, ob die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten pH-abhängigen Signalwege für die Beeinflussung funktioneller Eigenschaften von Bedeutung sind.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Expression von inflammatorischen Mediatoren bei extrazellulärer Azidose

Der zentrale Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Frage, ob eine extrazelluläre Azidose, wie sie in verschiedenen pathophysiologischen Situationen auftritt, die Expression inflammatorischer Botenstoffe beeinflusst und somit modulierend in den Entzündungsprozess eingreift.

Die Auswirkung der Azidose wurde hierzu auf Monozyten und Makrophagen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Wirkungen auf die Genexpression durch einen niedrigen pH-Wert abhängig vom Differenzierungsgrad der jeweiligen Zellen sind. So zeichnen sich Monozyten (Mono Mac 6 und undifferenzierte THP-1) in erster Linie durch eine azidosebedingte Herunterregulierung der Zytokin-Genexpression aus. Makrophagen (in erster Linie RAW264.7-Makrophagen) zeigen ein deutlich anderes Verhalten, wobei die Expression für verschiedene Zytokine (COX-2, IL-1 β , IL-6) durch den niedrigen pH-Wert signifikant gesteigert wurde.

a. Monozyten

Untersuchungen der Genexpression von MM6 und monozytären THP-1-Zellen in Abhängigkeit der Inkubation im sauren Milieu zeigten eine signifikante Herunterregulierung von COX-2 und MCP-1. COX-2 spielt bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle. Die in Tumoren induzierte Angiogenese wird durch die erhöhte Expression von proangiogenetischen Faktoren und gleichzeitig einer verminderten Freisetzung antiangiogenetischer Faktoren bedingt. Die Expression der proangiogenetischen Faktoren COX-2 und VEGF korreliert stark mit der Entstehung neuer Mikrogefäße im Tumor [61]. Eine verminderte Expression in Monozyten nach Azidose-Inkubation kann somit die Angiogenese vermindern, was im Tumor einen wachstumshemmenden Effekt haben könnte. Das chemotaktische MCP-1 ist für die Metastasierung und Migration der Tumorzellen mitverantwortlich [57; 114]. Wird dies in Monozyten bei niedrigen extrazellulären pH-Werten vermindert exprimiert, wird durch Azidose-Inkubation die Möglichkeit der Chemotaxis reduziert, was der Metastasierung entgegenwirken könnte.

Auch IL-1 β , IL-6, SPP1 und TNF- α wurden nach Azidose-Inkubation in Monozyten vermindert exprimiert. Dies traf sowohl auf die monozytären THP-1-Zellen als auch für die MM6-Zelllinie zu. IL-1 β führt zu einer gesteigerten Freisetzung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) in

Monozyten und Makrophagen und verstärkt die Antwort von T-Lymphozyten auf Antigene und Mitogene [35]. IL-1 β führt zur vermehrten Produktion von IL-2, TNF- α , IFN- γ und IL-6 und führt so zur Entzündungsinitiierung [39]. Letzten Endes kann TNF- α eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen. Studien zeigten, dass der TNF- α Serumspiegel mit der Progression eines Prostata-Ca. und einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert [115]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass im Tumormikromilieu sezerniertes TNF- α Signalwege aktivieren kann, die eine Tumorprogression fördern [115]. Durch TNF- α wird die Sekretion von Proteasen induziert, was Einfluss auf die Invasivität der Tumorzellen haben kann [34]. Eine verminderte Expression in Monozyten könnte sich also in diesem Fall hemmend auf die Tumorprogression auswirken.

b. Makrophagen

RAW264.7

Im Gegensatz dazu stehen die Makrophagen. Die murinen RAW264.7 zeigten einen signifikanten Anstieg der Expression von COX-2, iNOS und IL-1 β unter Azidose-Einwirkung. Die bereits beschriebenen Eigenschaften der Cyclooxygenase zeigen die Möglichkeit einer vermehrten Angiogenese durch Azidose in differenzierten Makrophagen auf. Dort, wo vermehrt COX-2 freigesetzt wird, entstehen vermehrt neue Gefäße [61; 116]. Diese Tatsache macht deutlich, dass die COX-2-Expression einen großen Einfluss auf die Prognose des Tumorgeschehens haben kann [61; 117; 118].

Da iNOS sowohl über seine vasodilatierende Wirkung als auch als zytotoxische N₂-Spezies [64] am Entzündungsgeschehen beteiligt ist, wirkt eine vermehrte Expression durch Azidose proinflammatorisch. Zusätzlich wirkt iNOS über die Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen mutagen [34; 119]. Die gesteigerte Freisetzung durch Azidose kann also eine Tumorpheriferation fördern.

IL-1 β führt, wie bereits beschrieben, zur gesteigerten T-Zell-Antwort auf Antigene und Mitogene [35]. Aufgrund der Entzündungsinitiierung spielt IL-1 β bei Vorgängen im Tumorge-webe eine wichtige Rolle. Rodríguez-Berriguete et al. [115] zeigten, dass Prostatakarzinompati-enten mit einem hohen IL-1 β -Spiegel eine bessere Prognose aufweisen. Diese Ergebnisse ma-chen deutlich, dass das saure Mikromilieu des Tumorgewebes die Immunantwort verstärken kann, indem die Expression von proinflammatorischen Zytokinen durch Azidose gesteigert wird.

Andererseits zeigen verschiedene Studien [34; 45; 120], dass erhöhte Level von Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise IL-1 β , die Tumorgenese vorantreiben können. So wirkt IL-1 β unter Umständen stimulierend auf die Angiogenese, indem es zu einer verstärkten Sekretion von VEGF führt [34]. Dies unterstützt die suffiziente Blutversorgung und dementsprechend die Oxygenierung des Tumorgewebes, wodurch ein schnelleres Wachstum ermöglicht wird.

In RAW264.7-Makrophagen wurde MCP-1 nach Azidose-Inkubation stark herunterreguliert. Es wird davon ausgegangen, dass MCP-1 die Migration der Tumorzellen unterstützt [57; 114]. Chemokine führen rezeptortragende Tumorzellen zu Orten der Metastasierung. Maligne Zellen weisen eine höhere Dichte an Chemokinrezeptoren auf, was eine Metastasierung fördern könnte. Beachtet man den tumorgenesefördernden Effekt von MCP-1, könnte sich die verminderte Expression durch eine Azidose positiv auf die Tumorkontrolle auswirken.

Die Expression von SPP1 und TNF- α wurde in dieser Zelllinie nur marginal beeinflusst. Wird TNF- α dauerhaft verstärkt exprimiert, kann es als Tumorpromotor wirken, der für den Gewebeumbau und das Tumorstadium zuständig ist [34]. In Tumoren, wie dem Ovarial-Ca., Mamma-Ca. oder Leukämien, wird häufig ein erhöhter TNF- α -Spiegel nachgewiesen [121; 34]. Im Mamma-Ca. sind die infiltrierenden Makrophagen die Hauptquelle für TNF- α und können hierüber in die Angiogenese des Tumors eingreifen [34].

Differenzierte THP-1-Zellen

Die differenzierten THP-1-Zellen zeigten annähernd keine Änderung der Zytokin-Expression durch eine Azidose. Es ist zu diskutieren, ob sich die differenzierten THP-1-Zellen für die Untersuchung der azidosebeeinflussten Genexpression bei Makrophagen eignen. Typische Makrophageneigenschaften, wie z. B. die Phagozytosefähigkeit, sind zwar gegeben, es scheint aber, dass eine Genexpression durch den artifiziellen Differenzierungsprozess beeinflusst wurde. Für die Aktivierung der monozytären THP-1-Zellen zu Makrophagen wurden die Zellen längere Zeit mit PMA stimuliert. Dies kann bereits zu einer veränderten Expression von Zytokinen führen [107], sodass eventuell eine weitere Beeinflussung durch die Azidose nicht mehr möglich ist.

c. Fibroblasten

Riemann et al. führten Untersuchungen zur Beeinflussung der Genexpression durch Azidose bei Fibroblasten durch [122]. IL-1 β und IL-6 konnten unter azidotischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Bei einem pH-Wert von 6,6 wurde TNF- α , iNOS und COX-2 vermehrt exprimiert. Im Gegensatz dazu steht die verminderte Expression von MCP-1 nach Azidose-

Inkubation. Zusammenfassend lässt sich eine vermehrte Expression inflammatorisch aktiver Zytokine durch eine extrazelluläre Azidose feststellen. Die Wirkung einer extrazellulären Azidose auf die Genexpression in Fibroblasten ist mit der Beeinflussung der Expression in Makrophagen durch Azidose zu vergleichen.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, kann sich indirekt über die Zytokinexpression eine Beeinflussung der Tumorprogression durch die extrazelluläre Azidose ergeben. Jedoch kann sich nach den vorliegenden Daten sowohl ein tumorhemmender als auch eine tumorfördernder Effekt ergeben. So könnte einerseits die Immunantwort auf einen Tumor durch vermehrte Expression von IL-1 β gesteigert und so die Tumorprogression eingeschränkt werden. Andererseits kann das Tumorwachstum durch die vermehrte Expression von tumorgenese-fördernden Zytokinen, wie TNF- α oder COX-2, verstärkt werden.

Vergleicht man die Beeinflussung der Genexpression durch Azidose bei Monozyten und Makrophagen mit der von Fibroblasten, so sind fundamentale Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien zu verzeichnen. Während Monozyten eher mit einer verminderten Expression inflammatorischer Marker reagieren, wird in Makrophagen (RAW264.7-Zelllinie) eine vermehrte Expression von COX-2, IL-1 β und iNOS festgestellt. Fibroblasten reagieren auf einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert ähnlich wie die Makrophagen mit einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine, genauer TNF- α , iNOS und COX-2 [122]. Es stellt sich die Frage, ob die Wirkung der Azidose auf mRNA-Ebene vom Differenzierungsgrad der Zelllinie abhängt.

Aktuell kann der resultierende Effekt einer extrazellulären Azidose auf das Tumorwachstum nicht vorhergesagt werden. Es sind weitere Untersuchungen von Tumorzellen, Makrophagen und Fibroblasten in Co-Kultur oder unter *in vivo*-Bedingungen notwendig.

4.3.2 Signalwege bei Azidose

Im Tumorgewebe spielen die ERK1/2- und p38-abhängigen Signalkaskaden auf verschiedene Weise eine wichtige Rolle. Frühere Untersuchungen in einer Vielzahl von Tumorzelllinien und Normalgewebezellen haben gezeigt, dass eine Azidose verschiedene intrazelluläre Signalwege (p38- und ERK1/2-MAP-Kinasen, CREB) beeinflusst. Es stellte sich daher die Frage, ob diese Signalkaskaden auch in Monozyten und Makrophagen aktiviert werden, wobei als Maß der Aktivierung die Phosphorylierung der Moleküle benutzt wurde.

a. Monozyten

In den monozytären MM6-Zellen wurde ERK1/2 tendenziell weniger aktiviert, wohingegen p38

und CREB geringfügig stärker phosphoryliert wurden. Auch in den undifferenzierten THP-1-Zellen nahm die Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 nach Azidose-Inkubation zu.

b. Makrophagen

RAW264.7

Bei den murinen RAW264.7 kam es sowohl für p38 als auch für CREB zu einer deutlich Aktivierung, wohingegen der ERK1/2-Signalweg annähernd unverändert blieb. Riemann et al. fanden ähnliche Ergebnisse in Untersuchungen zum Einfluss einer extrazellulären Azidose auf Prostatakarzinomzellen und gesunde Gewebefibroblasten [12; 122]. In Tumorzellen führte eine Azidose zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 [68]. Untersuchte Fibroblasten zeigten bei einem pH-Wert von 6,6 eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 [122].

Differenzierte THP-1

In den PMA-differenzierten THP-1-Zellen kam es tendenziell zu einer leichten Aktivierung der MAP-Kinase-Wege ERK1/2 und p38 und zu einer geringfügigen Hemmung des CREB-Wegs. Offensichtlich hat in dieser Zelllinie die Azidose nur einen untergeordneten Effekt auf die Aktivierung der untersuchten Signalkaskaden. Aber wie bei den Zytokinen muss für diese Zelllinie diskutiert werden, ob die länger dauernde Vorbehandlung mit PMA für die Differenzierung zu Makrophagen bereits zu einer nachhaltigen Aktivierung der verschiedenen MAP-Kinase-Wege geführt hat [107], sodass eine weitergehende Änderung der Phosphorylierung durch die Azidose nicht mehr möglich war.

Es ist bekannt, dass p38 die Expression von Proteinen der inflammatorischen Antwort unterstützen kann. So stabilisiert p38 beispielsweise die mRNA von COX-2 [123]. Feng et al. untersuchten LPS-aktivierte Makrophagen und zeigten, dass p38 fördernd auf die Expression von iNOS und TNF- α wirkt. Die Aktivierung der ERK-Kaskade führte dagegen zu einer verminderten Aktivität der genannten Zytokine [124].

Nach Abschluss der vorliegenden Arbeit wurden weitergehende Untersuchungen zur Rolle der p38-MAP-Kinase für die Änderung der Zytokin-Expression in RAW264.7-Makrophagen durchgeführt. Hierzu wurde in den Zellen mit dem Inhibitor SB203580 der p38-Signalweg gehemmt und der Einfluss auf die Expression von COX-2, IL-1 β , iNOS und MCP-1 untersucht. Es zeigte sich, dass im physiologischen Milieu (pH 7,4) die p38-Blockierung zu einer signifikant verminderten IL-1 β -Expression führte. Die COX-2-Expression blieb durch die p38-Inhibition weitestgehend unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu steht MCP-1, welches durch die

Hemmung mehr als doppelt so stark exprimiert wurde und iNOS, deren Expression sich bei Inhibition von p38 geringfügig steigerte. Diese Ergebnisse zeigen, dass p38 in die Kontrolle der Genexpression der genannten Zytokine involviert ist. Wiederholte man die Untersuchungen im sauren Milieu (pH 6.6), zeigten sich folgende Ergebnisse. Während die Expression von COX-2, IL-1 β und iNOS im sauren Milieu gesteigert wurde, führte die Blockierung von p38 zu einer deutlich verminderten Expression der genannten Zytokine. Vergleicht man das Expressionsmuster unter Azidose-Bedingungen mit p38-Inhibition, so zeigt sich, dass diese Werte den Kontrollmessungen bei physiologischem pH-Wert ähneln. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass offensichtlich die Azidose-induzierte Steigerung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen durch die Aktivierung des p38-Signalwegs verursacht wird.

4.4 Weitergehende Fragestellungen

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass der extrazelluläre pH-Wert die Zytokin-Expression von Monozyten und Makrophagen sowie die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege deutlich beeinflusst. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich aber zwangsläufig weitergehende Fragen, die in der aktuellen Arbeit nicht beantwortet werden konnten, aber Inhalt weitergehender Experimente sein müssen.

4.4.1 pH-Sensor der Monozyten/Makrophagen

Wie gezeigt, reagieren sowohl Monozyten als auch Makrophagen auf eine Änderung des extrazellulären pH-Werts. Es stellt sich daher die Frage, über welchen Mechanismus die Änderung der Protonenkonzentration eine Aktivitätsänderung der Zellen hervorruft. Hierzu können unterschiedliche Mechanismen beitragen.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (englisch: G protein-coupled receptors, GPCRs) sind zellmembrangebundene Rezeptoren von denen weit mehr als 1000 verschiedene Mitglieder bekannt sind. Neben der Signaltransduktion der Sinneswahrnehmung spielen sie eine bedeutende Rolle bei inflammatorischen Prozessen, der Zelldifferenzierung und -proliferation. Eine neue Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bei denen eine Änderung des extrazellulären pH-Werts das G-Protein aktiviert, spielt eine wichtige Rolle in der pH-Homöostase [125]. Gleichzeitig kann die Expression dieser Rezeptoren durch proinflammatorische Zytokine verstärkt werden [125]. So führt beispielweise TNF- α in Myeloidzellen zur Hochregulierung des Ovarial-Ca.-G-protein-gekoppelten Rezeptors (OGR1) [125]. Dieser Rezeptor erfasst den extrazellulären pH-Wert und aktiviert cAMP als Second Messenger [126]. Ob diese Rezeptoren für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind, müssen zukünftige Arbeiten zeigen.

Auch pH-sensitive Ionen-Kanäle spielen eine große Rolle bei der Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Azidose. 27 Kanäle gehören zur Familie der pH-sensitiven Ionen-Kanäle. Auch Monozyten und Makrophagen exprimieren pH-sensitive Ionen-Kanäle (TRPM2, TRPM4, und TRPV1). Die Aktivierung dieser Kanäle führt in Makrophagen sowohl zu pro- als auch antiinflammatorischen Reaktionen [127]. Werden TRPM2 geöffnet erzielen sie eine vermehrte Expression von TNF- α , IL-6, IL-8, und IL-10 [128]. TRPM8 und TRPV6 sind neben dem malignen Melanom auch im Prostata-Ca. stark exprimiert und können in der Tumorprogression eine Rolle spielen [127].

Schließlich ist bekannt, dass auch reaktive Sauerstoffradikale (ROS) am Reaktionsweg zwischen extrazellulärer Azidose und Zellaktivierung beteiligt sein können. Riemann et al. zeigten, dass in Tumorzellen eine extrazelluläre Azidose zur gesteigerten ROS-Bildung führt, was wiederum in einer verstärkten Phosphorylierung von MAP-Kinasen resultiert [12]. Auch der p38-Signalweg kann durch Sauerstoffradikale aktiviert werden [12]. Die Radikale können dementsprechend als intrazelluläre Signalmoleküle fungieren [129].

4.5 Übertragbarkeit der Zellkultur-Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation

Schließlich stellt sich die Frage, ob sich die in der vorliegenden Arbeit in der Zellkultur gewonnenen Resultate auf die *in vivo*-Situation und damit auf die klinische Situation (z. B. in der Onkologie) übertragen lässt. Die beschriebenen Untersuchungen wurden an immortalisierten Zelllinien durchgeführt, zwei mit einem leukämischen Hintergrund (Mono Mac 6, THP-1) und eine durch Virusinfektion gewonnene Makrophagenlinie (RAW264.7). Es ist daher zu untersuchen, ob die an diesen Laborzelllinien gewonnenen Resultate mit primären Monozyten bzw. Makrophagen vergleichbar sind.

Maurya et al. untersuchten die immortalisierten RAW264.7 und verglichen diese Makrophagen mit primären Peritonealmakrophagen (TGEM) [130], welche aus der Peritoneallavage während einer systemischen Inflammation gewonnen wurden [131]. Durch Norris et al. wurde gezeigt, dass sich RAW264.7 in ihren Grundeigenschaften den primären Makrophagen stark ähneln [131]. So ist die basale COX-2-Sekretion zwischen immortalisierten und primären Makrophagen identisch [131]. Werden die murinen Makrophagen der RAW264.7-Zelllinie allerdings mittels LPS stimuliert, so zeigen sich in der Zytokin-Sekretion zwischen den Zelllinien deutliche Unterschiede. RAW264.7-Zellen weisen nach Stimulation eine deutlich höhere TNF- α Sekretion als die primären TGEM auf [130]. Des Weiteren fanden sich deutliche Unterschiede im Cholesterinstoffwechsel [130]. Die beschriebenen Unterschiede machen deutlich, dass sich die immortalisierten Makrophagen zwar für Untersuchungen der basalen Zytokinsekretion eignen, aber eventuell nicht ausreichend für Analysen der stimulusinduzierten Zytokinsekretion sind.

Eine Wiederholung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente an primären Makrophagen erscheint daher angebracht.

4.6 Schlussfolgerungen

Eine moderate extrazelluläre Azidose mit einem pH-Wert von 6,6 ist unter verschiedenen pathologischen Bedingungen zu finden. Hierzu zählen z. B. die Entzündung, die Ischämie mit Hypoxie oder das Tumorgewebe mit seinem pathologischen Mikromilieu. Die vorliegenden Untersuchungen belegen eindeutig, dass die azidotische Umgebung das Expressionsverhalten von Monozyten und Makrophagen beeinflusst und somit modulierenden Einfluss auf eine Immunantwort haben kann.

Der Effekt der Azidose unterscheidet sich zwischen verschiedenen Zelltypen. Die unterschiedliche Beeinflussung der Genexpression der einzelnen Zelllinien zeigt Abb. 22. In Monozyten führt eine extrazelluläre Azidose zur verminderten Expression verschiedener Entzündungsmediatoren. Man kann daher den Einfluss eines niedrigen pH-Werts als antiinflammatorisch betrachten. In Makrophagen kommt es durch den erniedrigten pH-Wert zu deutlich anderen Effekten. So nimmt die Expression von COX-2, IL-1 β und iNOS bei pH 6,6 zu. Dies führt eher zu einer proinflammatorischen Antwort durch die Azidose. In allen Zelllinien nimmt die Expression des chemotaktischen Zytokins MCP-1 bei Azidose stark ab. Dies könnte zur Folge haben, dass die Rekrutierung zusätzlicher Abwehrzellen unter diesen Milieubedingungen eingeschränkt ist. Besonders im Tumorgewebe können darüber hinaus Zytokine einen onkogenen Effekt aufweisen. Die verstärkte Expression verschiedener Zytokine könnte somit tumorfördernd wirken und die Tumorseignung steigern.

4.7 Ausblick

Um die Wirkung einer extrazellulären Azidose auf Immunzellen genauer zu verstehen, sind weiterführende Untersuchungen und Analysen notwendig. Da als Beispiele der immunologisch aktiven Zellen lediglich Monozyten und Makrophagen genutzt wurden, sind vervollständigende Experimente beispielsweise an T-Zellen oder NK-Zellen erforderlich. Die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse können mittels Untersuchungen von Tiertumoren *in vivo* erweitert und verglichen werden. Die einzelnen Gene wurden, wie bereits beschrieben, auf RNA-Ebene analysiert. Um die Wirkung und den Einfluss des niedrigen pH-Werts auf die Zelle im Einzelnen und die Vorgänge im Tumorgewebe im Allgemeinen zu verdeutlichen, sollten Untersuchungen auf Proteinebene, beispielsweise mittels ELISA durchgeführt werden.

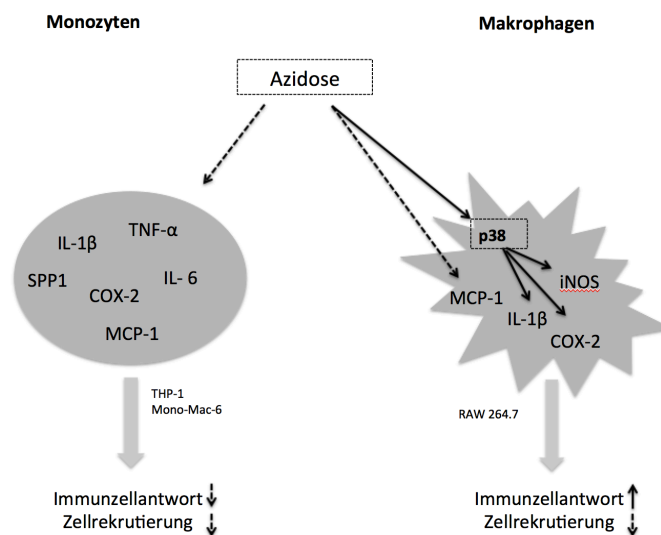


Abb. 22: Einfluss der extrazellulären Azidose auf die Expression von Entzündungsmediatoren und den p38-MAP-Kinase-Signalweg in Monozyten (THP-1/Mono Mac 6-Zellen) sowie Makrophagen (RAW264.7-Zellen). Gestrichelte Pfeile zeigen eine Verminderung der Expression oder Hemmung, durchgezogene Pfeile symbolisieren eine Expressionssteigerung oder Induktion durch die extrazelluläre Azidose.

5 Zusammenfassung

Verschiedene Gewebe bzw. pathologische Zustände zeichnen sich durch eine verminderte Sauerstoffversorgung und eine extrazelluläre Azidose aus. Sowohl in entzündetem Gewebe als auch in solide wachsenden Tumoren kann der pH-Wert deutlich bis unter 6 absinken. Aufgrund des schnellen Tumorwachstums und der insuffizienten Angiogenese kommt es zu einer Ischämie, die letzten Endes zu einer Hypoxie führt. Die niedrigen Sauerstoffpartialdrücke im Gewebe führen dazu, dass die Energiegewinnung überwiegend über die Glykolyse erfolgt. Dadurch wird permanent Milchsäure produziert. Im entzündeten Gewebe führen darüber hinaus Zersetzungsprozesse der interstitiellen Matrix aufgrund ihres hohen Gehalts an sauren Aminosäuren zu einer Verschiebung des pH-Werts zu niedrigeren Werten.

Monozyten und Makrophagen gehören zu den Zellen des Immunsystems. Als Antwort auf bestimmte Signale wird eine Vielfalt biologisch aktiver Substanzen freigesetzt. Mit deren Hilfe können die Zellen immunologische Vorgänge gezielt beeinflussen und koordinieren. Monozyten und Makrophagen sind Komponenten des physiologischen Entzündungsprozesses, sie sind aber auch Bestandteil des Tumorgewebes und daher dort den azidotischen Mikromilieubedingungen ausgesetzt. Es stellte sich daher die Frage, ob der erniedrigte pH-Wert in Entzündungen oder Tumoren die Funktion von Monozyten und Makrophagen beeinflusst.

Die Untersuchungen wurden an vier verschiedenen immortalisierten Zelllinien *in vitro* durchgeführt, wobei zwei Zelllinien Monozytencharakter hatten (Mono Mac 6 und THP-1-Zellen). Die beiden anderen Zellmodelle (murine RAW264.7- und PMA-differenzierte THP-1-Makrophagen) zeigen funktionelle Makrophageneigenschaften. Als Parameter zur Beurteilung der Zellfunktion diente die Messung der Expression inflammatorischer Mediatoren. Hierzu wurde mittels qPCR die Expression von COX-2, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , SPP1 und iNOS bestimmt. Um Einblick in die zugrundeliegenden Regulationsvorgänge zu erhalten, erfolgte darüber hinaus die Analyse von drei Signalwegen, p38- und ERK1/2-MAP-Kinasen sowie CREB, bei Ansäuerung des extrazellulären Mediums.

Die Messungen ergaben, dass die Wirkung auf die Genexpression durch einen niedrigen pH-Wert abhängig vom Differenzierungsgrad der jeweiligen Zellen ist. In Monozyten nahm die Expression fast aller Zytokine signifikant ab. In erster Linie COX-2 und MCP-1 wurden um den Faktor 4 schwächer exprimiert. Makrophagen zeigten dagegen ein anderes Verhalten. In RAW264.7-Makrophagen erhöhte sich die Expression der Zytokine COX-2, IL-1 β und iNOS signifikant um das vierfache. Lediglich MCP-1 wurde ebenfalls herunterreguliert. In THP-1-Zellen, die durch Inkubation mit PMA zu Makrophagen differenziert wurden, ließ sich keine

Änderung der Zytokinexpression durch Azidose nachweisen. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass durch die Vorbehandlung mit PMA bereits eine deutliche Änderung der Expression induziert wurde, sodass die extrazelluläre Azidose keinen zusätzlichen Effekt mehr haben konnte.

Für die Analyse der Beeinflussung der Signalwege durch die Azidose wurde mittels Western-Blot die Menge an Gesamt-p38, -ERK1/2 und -CREB bestimmt sowie der Gehalt der phosphorylierten Moleküle. Die vorliegenden Experimente ergaben, dass in den monozytären Mono Mac 6-Zellen p38 und CREB geringfügig stärker, ERK1/2 hingegen etwas schwächer phosphoryliert wurden. In den undifferenzierten THP-1-Zellen (Monozyten) nahm die Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 nach Azidose-Inkubation zu. In beiden Makrophagen-Zelllinien (RAW264.7, differenzierte THP-1-Zellen) kam es zu einer verstärkten Phosphorylierung von p38. Bezüglich ERK1/2 und CREB ergaben sich uneinheitliche Effekte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine extrazelluläre Azidose die Funktion von Monozyten und Makrophagen beeinflusst. Die Effekte sind aber offensichtlich vom Differenzierungsgrad abhängig. Hierbei werden immunmodulatorische Mediatoren sowohl vermindert als auch verstärkt exprimiert. Azidose kann daher einen immunsuppressiven Einfluss haben (in erster Linie in Monozyten). Sie kann aber auch die Mediatorexpression steigern und hierdurch die Immunantwort fördern (Makrophagen). Da Zytokine und andere inflammatorische Mediatoren in Tumoren auch die Proliferation und das Migrationsverhalten von Tumorzellen beeinflussen können, muss diskutiert werden, ob die Beeinflussung der sekretorischen Leistung der Monozyten und Makrophagen einen Einfluss auf die Tumorprogression und die –prognose haben kann.

6 Literaturverzeichnis

- [1] O. Warburg, Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klin. Wochenschr.* 4 (1925) 534–36.
- [2] G.C. Hildebrandt, U. Duffner, K.M. Olkiewicz, L. Corrion, N.E. Willmarth, D.L. Williams, et al., A critical role for CCR2/MCP-1 interactions in the development of idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 103 (2004) 2417–26.
- [3] D.J. Kominsky, E.L. Campbell, S.P. Colgan, Metabolic Shifts in Immunity and Inflammation. (2015). doi:10.4049/jimmunol.0903002.
- [4] P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 49 (1989) 6449–65.
- [5] M. Höckel, P. Vaupel, Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (2001) 266–76.
- [6] V. Mucaj, J.E.S. Shay, M.C. Simon, Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism. *Int. J. Hematol.* 95 (2012) 464–70.
- [7] A. Costa, A. Scholer-Dahirel, F. Mechta-Grigoriou, The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 25 (2014) 23–32.
- [8] Y. Wu, S. Antony, J.L. Meitzler, J.H. Doroshov, Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. *Cancer Lett.* 345 (2014) 164–73.
- [9] M. Vander Heiden, L. Cantley, C. Thompson, Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. *Science.* 324 (2009) 1029–33.
- [10] I.F. Tannock, D. Rotin, Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploration. *Cancer Res.* 49 (1989) 4373–84.
- [11] L. Huang, A.L. Mellor, Metabolic control of tumour progression and antitumour immunity. *Curr. Opin. Oncol.* 26 (2014) 92–99.
- [12] A. Riemann, B. Schneider, A. Ihling, M. Nowak, C. Sauvart, O. Thews, et al., Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells. *PLoS One.* 6 (2011) doi:10.1371/journal.pone.0022445
- [13] R.J. Davis, Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 103 (2000) 239–52.
- [14] A. Riemann, B. Schneider, D. Gündel, C. Stock, O. Thews, M. Gekle, Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells. *Pflugers Arch.* 466 (2014) 2127–38.
- [15] T. Zarubin, J. Han, Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15 (2005) 11–18.

- [16] M. Krishna, H. Narang, The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3525–44.
- [17] N.J. Darling, S.J. Cook, The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843 (2014) 2150–63.
- [18] L.M. Luttrell, F.L. Roudabush, E.W. Choy, W.E. Miller, M.E. Field, K.L. Pierce, et al., Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 2449–54.
- [19] A.S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch, Acidosis-induced p38 MAPK activation and its implication in regulation of cardiac contractility. *Oncogene.* (2007) 3279–90.
- [20] M. Zheng, R. Hou, R.-P. Xiao, Acidosis-induced p38 MAPK activation and its implication in regulation of cardiac contractility. *Acta Pharmacol. Sin.* 25 (2004) 1299–305.
- [21] J.F. Schindler, J.B. Monahan, W.G. Smith, p38 Pathway Kinases as Anti-inflammatory Drug Targets. *J. Dent. Res.* 86 (2007) 800–811.
- [22] C. Andreadi, C. Noble, B. Patel, H. Jin, M.M. Aguilar Hernandez, K. Balmanno, et al., Regulation of MEK/ERK pathway output by subcellular localization of B-Raf. *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2012) 67–72.
- [23] S. Marchetti, C. Gimond, J. Chambard, T. Touboul, J. Pouysse, G. Page, Extracellular Signal-Regulated Kinases Phosphorylate Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 3 / DUSP6 at Serines 159 and 197 , Two Sites Critical for Its Proteasomal Degradation. *MCB* 25 (2005) 854–64.
- [24] H. Lavoie, M. Therrien, Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (2015) 281–298.
- [25] M.F. Favata, K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W.S. Feeser, et al., Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18623–32.
- [26] B. Frengueili, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz, A.J. Silva, Deficient Long-Term Memory in Mice with a Targeted Mutation of the CAMP-Responsive Element-Binding. *Cell.* 79 (1994) 59–68.
- [27] B.M. Mayr, G. Canettieri, M.R. Montminy, Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10936–41.
- [28] A.J. Shaywitz, M.E. Greenberg, CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 821–61.
- [29] K. Du, CREB Is a Regulatory Target for the Protein Kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32377–79.

- [30] H. Wu, T. Li, M. Zeng, T. Peng, Herpes simplex virus type 1 infection activates the Epstein-Barr virus replicative cycle via a CREB-dependent mechanism. *Cell. Microbiol.* 14 (2012) 546–59.
- [31] S.-W. Chong, Y.-J. Jiang, Off limits--integrins holding boundaries in somitogenesis. *Trends Cell Biol.* 15 (2005) 453–57.
- [32] F. Geissmann, S. Jung, D.R. Littman, Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19 (2003) 71–82.
- [33] A. Aderem, D.M. Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 593–623.
- [34] F. Balkwill, A. Mantovani, Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet.* 357 (2001) 539–45.
- [35] C.A. Dinarello, The interleukin-1 family- 10 years of discovery. *FASEB J.* 8 (1994) 1314–25.
- [36] S.J. Busfield, C. A. Comrack, G. Yu, T.W. Chickering, J.S. Smutko, H. Zhou, et al., Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics.* 66 (2000) 213–16.
- [37] P.E. Auron, A.C. Webb, L.J. Rosenwasser, S.F. Muccit, A. Rich, S.M. Wolff, et al., Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Immunology* 81 (1984) 7907–11.
- [38] A. Rubartelli, F. Cozzolinol, M. Talio, R. Sitia, A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* 9 (1990) 1503–10.
- [39] A. Oliveira, R.J. Dinis-Oliveira, A. Nogueira, F. Gonçalves, P. Silva, C. Vieira, et al., Interleukin-1 β genotype and circulating levels in cancer patients: Metastatic status and pain perception. *Clin. Biochem.* (2014) 5–9.
- [40] C.A. Dinarello, An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Mol. Med.* 20 Suppl 1 (2014) 43–58.
- [41] E.M. El-Omar, M. Carrington, W.H. Chow, K.E. McColl, J.H. Bream, H. A.Young, et al., Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 404 (2000) 398–402.
- [42] D.-L. Su, Z.-M. Lu, M.-N. Shen, X. Li, L.-Y. Sun, Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) doi: 10.1155/2012/347141
- [43] G.J. Tricot, New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* 76 Suppl 1 (2002) 334–36.
- [44] T. Kishimoto, Blood, The Biology of Interleukin-6. *J. Am. Soc. Hematol.* 74 (1989) 1–10.

- [45] R. van Horssen, T.L.M. Ten Hagen, A.M.M. Eggermont, TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*. 11 (2006) 397–408.
- [46] J. Navrátilová, T. Hankeová, P. Beneš, J. Šmarda, Acidic pH of tumor microenvironment enhances cytotoxicity of the disulfiram/Cu²⁺ complex to breast and colon cancer cells. *Chemotherapy*. 59 (2013) 112–20.
- [47] H. Körner, J.D. Sedgwick, Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. *Immunol. Cell Biol.* 74 (1996) 465–72.
- [48] G. Kiinstle, M. Leist, S. Uhlig, L. Revesz, R. Feifel, A. Mackenzie, et al., ICE-protease inhibitors block murine liver injury and apoptosis caused by CD95 or by TNF- α . *Immunol. Lett.* 55 (2009) 5–10.
- [49] B.B. Aggarwal, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 745–56.
- [50] T. Bäuerle, H. Adwan, F. Kiessling, H. Hilbig, F.P. Armbruster, M.R. Berger, Characterization of a rat model with site-specific bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells and its application to the effects of an antibody against bone sialoprotein. *Int. J. Cancer*. 115 (2005) 177–86.
- [51] P.H. Anborgh, J.C. Mutrie, A.B. Tuck, A.F. Chambers, Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumour microenvironment. *J. Cell. Mol. Med.* 14 (2010) 2037–44.
- [52] R. Al-Shami, E.S. Sorensen, B. Ek-Rylander, G. Andersson, D.D. Carson, M.C. Farach-Carson, Phosphorylated osteopontin promotes migration of human choriocarcinoma cells via a p70 S6 kinase-dependent pathway. *J. Cell. Biochem.* 94 (2005) 1218–33.
- [53] L.W. Fisher, O.W. McBride, J.D. Termine, E.A. Young, Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2347–51.
- [54] H. Rangaswami, A. Bulbule, G.C. Kundu, Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 16 (2006) 79–87.
- [55] T. Bäuerle, J. Peterschmitt, H. Hilbig, F. Kiessling, F.P. Armbruster, M.R. Berger, Treatment of bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells with an antibody against bone sialoprotein. *Int. J. Oncol.* 28 (2006) 573–83.
- [56] L.R. Rodrigues, J. A. Teixeira, F.L. Schmitt, M. Paulsson, H. Lindmark-Månsson, The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16 (2007) 1087–97.
- [57] M. O’Hayre, C.L. Salanga, T.M. Handel, S.J. Allen, Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem. J.* 409 (2008) 635–49.
- [58] A.S. Payne, L.A. Cornelius, The Role of Chemokines in Melanoma Tumor Growth and Metastasis. *J. Invest. Dermatol.* 13 (2002) 915–22.

- [59] Y.J. Shyy, L.L. Wickham, J.P. Hagan, H.J. Hsieh, Y.L. Hu, S.H. Telian, et al., Human monocyte colony-stimulating factor stimulates the gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 and increases the adhesion of monocytes to endothelial monolayers. *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 1745–51.
- [60] J.R. Vane, Y.S. Bakhle, R.M. Botting, Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38 (1998) 97–120.
- [61] E. Foslien, Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 31 (2001) 325–48.
- [62] M. Tsujii, R.N. DuBois, Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 83 (1995) 493–501.
- [63] L. Fang, H.-M. Chang, J.-C. Cheng, P.C.K. Leung, Y.-P. Sun, TGF- β 1 induces COX-2 expression and PGE2 production in human granulosa cells through Smad signaling pathways. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2014) doi: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-4100>
- [64] R. Bruckdorfer, The basics about nitric oxide. *Mol. Aspects Med.* 26 (2005) 3–31.
- [65] W.P. Schoor, A. John, Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*. *Dis. Aquat. Organ.* 19 (1994) 153–55.
- [66] A. Papapetropoulos, R.D. Rudic, W.C. Sessa, Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 43 (1999) 509–20.
- [67] M. Zheng, C. Reynolds, S.-H. Jo, R. Wersto, Q. Han, R.-P. Xiao, Intracellular acidosis-activated p38 MAPK signaling and its essential role in cardiomyocyte hypoxic injury. *FASEB J.* 19 (2005) 109–11.
- [68] C. Sauvant, M. Nowak, C. Wirth, B. Schneider, A. Riemann, M. Gekle, et al., Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. *Int. J. Cancer.* 123 (2008) 2532–42.
- [69] O. Thews, W. Dillenburg, M. Fellner, H.-G. Buchholz, N. Bausbacher, M. Schreckenberger, et al., Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: in vivo imaging with ⁶⁸Ga-labelled PET tracer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 37 (2010) 1935–42.
- [70] S. Peppicelli, F. Bianchini, L. Calorini, Extracellular acidity, a “reappreciated” trait of tumor environment driving malignancy: perspectives in diagnosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 33 (2014) 823–32.
- [71] F. Redegeld, A. Filippini, M. Sitkovsky, Comparative studies of the cytotoxic t-lymphocyte-mediated cytotoxicity and the extracellular ATP-induced cell lysis. *J. Immunol.* 147 (1991) 3638–45.
- [72] A. Calcinotto, P. Filipazzi, M. Grioni, M. Iero, A. De Milito, A. Ricupito, et al., Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res.* 72 (2012) 2746–56.

- [73] C.C. Jancic, M. Cabrini, M.L. Gabelloni, C. Rodríguez Rodrigues, G. Salamone, A.S. Trevani, et al., Low extracellular pH stimulates the production of IL-1 β by human monocytes. *Cytokine*. 57 (2012) 258–68.
- [74] T.-A. Imaizumi, D.M. Stafforini, Y. Yamada, T. McIntyre, Platelet-activating factor : a mediator for clinicians. *J. Intern. Med.* 238 (1995) 5–20.
- [75] T. Fukamachi, S. Ikeda, H. Saito, M. Tagawa, H. Kobayashi, Expression of acidosis-dependent genes in human cancer nests. *Mol. Clin. Oncol.* 2 (2014) 1160–66.
- [76] S.-Y. Park, D.-J. Bae, M.-J. Kim, M.L. Piao, I.-S. Kim, Extracellular low pH modulates phosphatidylserine-dependent phagocytosis in macrophages by increasing stabilin-1 expression. *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 11261–71.
- [77] http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-124.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192 , aufgerufen am 16.11.2015
- [78] H.W. Ziegler-Heitbrock, W. Schraut, P. Wendelgaß, M. Ströbel, T. Sternsdorf, C. Weber, Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J. Leukoc. Biol.* 55 (1994) 73–80.
- [79] E.K. Park, H.S. Jung, H.I. Yang, M.C. Yoo, C. Kim, K.S. Kim, Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.* 56 (2007) 45–50.
- [80] [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-16.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-16.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192) ; aufgerufen am 16.11.2015
- [81] W.C. Raschke, S. Baird, P. Ralph, I. Nakoinz, Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 15 (1978) 261–67.
- [82] http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-71.aspx?geo_country=it#generalinformation; aufgerufen am 29.01.2015
- [83] J. Agier, M. Efenberger, E. Brzezińska-Błaszczyk, Review paper Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent. Eur. J. Immunol.* 2 (2015) 225–35.
- [84] R. Hasan, L. Rink, H. Haase, Chelation of Free Zn²⁺ Impairs Chemotaxis, Phagocytosis, Oxidative Burst, Degranulation, and Cytokine Production by Neutrophil Granulocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* (2015). doi:10.1007/s12011-015-0515-0.
- [85] C. Berek, Eosinophils: important players in humoral immunity, *Clin. Exp. Immunol.* (2015). doi:10.1111/cei.12695.
- [86] E. Van Overmeire, D. Laoui, J. Keirse, J.A. Van Ginderachter, A. Sarukhan, Mechanisms Driving Macrophage Diversity and Specialization in Distinct Tumor Microenvironments and Parallelisms with Other Tissues. *Front. Immunol.* 5 (2014) doi: 10.3389/fimmu.2014.00127
- [87] V. Catalano, A. Turdo, S. Di Franco, F. Dieli, M. Todaro, G. Stassi, Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Semin. Cancer Biol.* 23 (2013) 522–32.

- [88] M.L. Taddei, E. Giannoni, G. Comito, P. Chiarugi, Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out. *Cancer Lett.* 341 (2013) 80–96.
- [89] J.W. Pollard, Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 71–78.
- [90] G.L. Semenza, The Hypoxic Tumor Microenvironment: A Driving Force for Breast Cancer Progression. *Biochim. Biophys. Acta.* (2015). doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.036.
- [91] J.S. Lewis, R.J. Landers, J.C.E. Underwood, A. L. Harris, C.E. Lewis, Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J. Pathol.* 192 (2000) 150–58.
- [92] N.Y. den Breems, R. Eftimie, The re-polarisation of M2 and M1 macrophages and its role on cancer outcomes. *J. Theor. Biol.* (2015) doi: 10.1016/j.jtbi.2015.10.034
- [93] M. Egeblad, Z. Werb, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 161–74.
- [94] B.-Z. Qian, H. Zhang, J. Li, T. He, E.-J. Yeo, D.Y.H. Soong, et al., FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. *J. Exp. Med.* 212 (2015) 1433–48.
- [95] Y. Wu, J. Deng, P.G. Rychahou, S. Qiu, B.M. Evers, B.P. Zhou, Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell.* 15 (2009) 416–28.
- [96] L. Bingle, N.J. Brown, C.E. Lewis, The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196 (2002) 254–65.
- [97] S. Labiano, A. Palazon, I. Melero, Immune response regulation in the tumor microenvironment by hypoxia. *Semin. Oncol.* 42 (2015) 378–86.
- [98] Z. Qin, The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis.* 221 (2012) 2–11.
- [99] W. Chanput, J.J. Mes, H.J. Wichers, THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* 23 (2014) doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002
- [100] H.W. Ziegler-Heitbrock, E. Thiel, A. Fütterer, V. Herzog, A. Wirtz, G. Riethmüller, Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer.* 41 (1988) 456–61.
- [101] J. Yourno, P. Burkart, W. Mastropaolo, F. Lizzi, A. Tartaglia, Monocyte nonspecific esterase. Enzymologic characterization of a neutral serine esterase associated with myeloid cells. *J. Histochem. Cytochem.* 34 (1986) 727–733.

- [102] M. Zaitseva, T. Romantseva, K. Blinova, J. Beren, L. Sirota, D. Drane, et al., Use of human MonoMac6 cells for development of in vitro assay predictive of adjuvant safety in vivo. *Vaccine*. 30 (2012) 4859–65.
- [103] T.P. Hofer, E. Bitterle, I. Beck-Speier, K.L. Maier, M. Frankenberger, J. Heyder, et al., Diesel exhaust particles increase LPS-stimulated COX-2 expression and PGE2 production in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 856–64.
- [104] J. Lee, J. Hwang, H.-S. Kim, S. Kim, Y.H. Kim, S.-Y. Park, et al., A comparison of gene expression profiles between primary human AML cells and AML cell line. *Genes Genet. Syst.* 83 (2008) 339–45.
- [105] R. Sun, Y. Zhang, S. Ma, H. Qi, M. Wang, J. Duan, et al., Down-regulation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling is involved in rapamycin suppression of TLR2-induced inflammatory response in monocytic THP-1 cells. *Microbiol. Immunol.* 59 (2015) 614–22.
- [106] A.W. O’Sullivan, J.H. Wang, H.P. Redmond, The Role of P38 MAPK and PKC in BLP Induced TNF- α Release, Apoptosis, and NF κ B Activation in THP-1 Monocyte Cells. *J. Surg. Res.* 151 (2009) 138–44.
- [107] J.J. Park, H.J. Moon, J.H. Park, T.H. Kwon, Y. Park, J.H. Kim, Induction of proinflammatory cytokine production in intervertebral disc cells by macrophage-like THP-1 cells requires mitogen-activated protein kinase activity. *J. Neurosurg. Spine* (2015) doi:10.3171/2015.3.SPINE14729
- [108] N. Couleau, J. Falla, A. Beillerot, E. Battaglia, M. D’Innocenzo, S. Plançon, et al., Effects of Endocrine Disruptor Compounds, Alone or in Combination, on Human Macrophage-Like THP-1 Cell Response. *PLoS One*. 10 (2015) e0131428. doi:10.1371/journal.pone.0131428.
- [109] P. Ralph, I. Nakoinz, Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J. Immunol.* 119 (1977) 950–54.
- [110] N. Pennanen, S. Lapinjoki, A. Palander, A. Urtti, J. Monkkonen, Macrophage-like RAW 264 cell line and time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) as tools in screening drug effects on cytokine secretion. *Int. J. Immunopharmacol.* 17 (1995) 475–80.
- [111] H.G. Kim, Y.R. Kim, J.H. Park, T. Khanal, J.H. Choi, M.T. Do, et al., Endosulfan induces COX-2 expression via NADPH oxidase and the ROS, MAPK, and Akt pathways. *Arch. Toxicol.* 89 (2014) 2039–50.
- [112] N. Su, Y. Li, J. Wang, J. Fan, X. Li, W. Peng, et al., Role of MAPK signal pathways in differentiation process of M2 macrophages induced by high-ambient glucose and TGF- β 1. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 9893 (2014) 396-401.
- [113] S. A. Bustin, V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, et al., The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–22.

- [114] A. Zlotnik, Chemokines and cancer. *Int. J. Cancer*. 119 (2006) 2026–29.
- [115] G. Rodríguez-Berriguete, B. Sánchez-Espiridión, J.R. Cansino, G. Olmedilla, P. Martínez-Onsurbe, M. Sánchez-Chapado, et al., Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF- α signaling pathways in prostate cancer. *Cytokine*. 64 (2013) 555–63.
- [116] M.D. Salvado, A. Alfranca, J.Z. Haeggström, J.M. Redondo, Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2. *Trends Mol. Med*. 18 (2012) 233–43.
- [117] H. Sano, Y. Kawahito, R.L. Wilder, A. Hashiramoto, S. Mukai, K. Asai, et al., Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in Human Colorectal Cancer Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 55 (1995) 3785–89.
- [118] S.M. Grabosch, O.M. Shariff, J.L. Wulff, C.W. Helm, Non-steroidal anti-inflammatory agents to induce regression and prevent the progression of cervical intraepithelial neoplasia., *Cochrane Database Syst. Rev*. 4 (2014)
doi: 10.1002/14651858.CD004121.pub3
- [119] E. Dabbeche-Bouricha, N. Hadiji-Abbes, R. Abdelmaksoud-Damak, N. Alaya, W. Ayadi, S. Charfi, et al., Quantitative measurement of iNOS expression in melanoma, nasopharyngeal, colorectal, and breast tumors of Tunisian patients: comparative study and clinical significance. *Tumor Biol*. (2015). doi:10.1007/s13277-015-4303-4.
- [120] E. Voronov, Y. Carmi, R.N. Apte, The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front. Physiol*. 5 (2014) doi: 10.3389/fphys.2014.00114
- [121] F. Burke, M. Relf, R. Negus, F. Balkwill, A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine*. 8 (1996) 578–85.
- [122] A. Riemann, A. Ihling, J. Thomas, B. Schneider, O. Thews, M. Gekle, Acidic environment activates inflammatory programs in fibroblasts via a cAMP–MAPK pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*. 1853 (2015) 299–307.
- [123] A. Cuenda, S. Rousseau, p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1773 (2007) 1358–75.
- [124] G.J. Feng, H.S. Goodridge, M.M. Harnett, X.Q. Wei, A. V Nikolaev, A.P. Higson, et al., Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 Production by targeting ERK MAP Kinase. *J. Immunol*. 163 (1999) 6403–12.
- [125] C. de Vallière, Y. Wang, J.J. Eloranta, S. Vidal, I. Clay, M.R. Spalinger, et al., G Protein-coupled pH-sensing Receptor OGR1 Is a Regulator of Intestinal Inflammation. *Inflamm. Bowel Dis*. 21 (2015) 1. doi:10.1097/MIB.0000000000000375.
- [126] F. Okajima, Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cell. Signal*. 25 (2013) 2263–71.

- [127] M. Adrian T. Billeter, MD, PhD,* Jason L. Hellmann, PhD,† Aruni Bhatnagar, PhD,† and Hiram C. Polk, Jr, Transient Receptor Potential Ion Channels Powerful Regulators of Cell Function. *Ann. Surg.* 259 (2014) 229–35.
- [128] J. Wehrhahn, R. Kraft, C. Harteneck, S. Hauschildt, Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 184 (2010) 2386–93.
- [129] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84.
- [130] M.R. Maurya, S. Gupta, X. Li, E. Fahy, A.R. Dinasarapu, M. Sud, et al., Analysis of inflammatory and lipid metabolic networks across RAW264.7 and thioglycolate-elicited macrophages. *J. Lipid Res.* 54 (2013) 2525–42.
- [131] P.C. Norris, D. Reichart, D.S. Dumlao, C.K. Glass, E.A. Dennis, Specificity of eicosanoid production depends on the TLR-4-stimulated macrophage phenotype. *J. Leukoc. Biol.* 90 (2011) 563–74.

7 Thesen

- I. Sowohl im Rahmen einer Entzündung als auch in solide wachsenden Tumoren findet sich ein erniedrigter pH-Wert, was auf eine unzureichende O₂-Versorgung durch glykolytischen Stoffwechsel sowie diverse Abbauvorgänge zurückzuführen ist.
- II. Monozyten und Makrophagen sind Komponenten des physiologischen Entzündungsprozesses, sie sind aber auch Bestandteil des Tumorgewebes und daher den dortigen azidotischen Mikromilieubedingungen ausgesetzt.
- III. Zytokine spielen eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und der Differenzierung.
- IV. Die von Immunzellen produzierten Zytokine können die Tumorgenese sowohl fördern als auch hemmen indem sie die Genexpression, die Proliferation oder das Migrationsverhalten der Tumorzellen beeinflussen.
- V. Mittels PMA lassen sich monozytäre THP-1-Zellen zu Makrophagen differenzieren, welche makrophagentypische Eigenschaften, wie z. B. die Phagozytosefähigkeit, aufweisen.
- VI. Die Expression inflammatorischer Mediatoren (COX-2, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , und iNOS) in Monozyten und Makrophagen wird durch den extrazellulären pH-Wert beeinflusst.
- VII. Die Auswirkung einer extrazellulären Azidose auf die Genexpression ist vom jeweiligen Differenzierungsgrad der Zelllinie abhängig.
- VIII. Monozyten zeichnen sich durch eine generelle azidosebedingte Herunterregulierung der Zytokin-Expression aus.
- IX. Makrophagen zeigen bei extrazellulärer Azidose eine Expressionssteigerung von COX-2, IL-1 β und iNOS, wohingegen MCP-1 herunterreguliert wird.
- X. Die Phosphorylierung und damit die Aktivität der MAP-Kinase wird durch Azidose beeinflusst, wobei p38 in allen Zelllinien, unabhängig vom Differenzierungsgrad, verstärkt phosphoryliert wird.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Hanna Wußling
Geburtsdatum	03.12.1990 in Nordhausen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Anschrift	Friesenstraße 21 06112 Halle Saale

Ausbildung

10/2009 bis 11/2015	Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
11/2015	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (mündliche Prüfung) -sehr gut-
06/2015 bis 10/2015	Praktisches Jahr Innere Medizin, Bergmannstrost; Halle
03/2015 bis 06/2015	Praktisches Jahr Neurologie, Martha-Maria-Krankenhaus; Halle
01/2015 bis 03/2015	Praktisches Jahr Gefäß- und Thoraxchirurgie; Südtiroler Sanitätsbetrieb; Bozen (Italien)
11/2014 bis 01/2015	Praktisches Jahr Unfall- und Allgemein Chirurgie, Bergmannstrost; Halle
10/2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (schriftliche Prüfung) -gut-
09/2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung -gut-
2002 bis 2009	Wilhelm von Humboldt Gymnasium Nordhausen Abitur (Ø 1,4)

9 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und alle wörtlichen oder sinngemäß übernommenen Textstellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe nur diesen einen Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht und keinen Antrag an einer anderen Universität oder Hochschule gestellt.

Halle (Saale), den 16.12.2015

Hanna Wußling

10 Publikationen und Auszeichnungen

Anne Riemann, Hanna Wußling, Harald Loppnow, Hang Fu, Sarah Reime, Oliver Thews: Acidosis differently modulates the inflammatory program in monocytes and macrophages.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1862 (2016), 72–81

Anne Riemann, Hanna Wußling, Bettina Schneider, Oliver Thews: Extracellular acidosis affects expression of pro-inflammatory mediators and signal transduction in monocyte- and macrophage-like cells.

Poster auf der 93. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Mainz, 2014

Acta Physiologica 210 (Suppl. 695): 102 (2014)

Hanna Wußling: Extrazelluläre Azidose moduliert die Genexpression in monozytären Immunzellen abhängig von deren Differenzierung.

Preis für die beste Vortragspräsentation beim 2. Doktorandenkongress der Medizinischen Fakultät Halle-Wittenberg, 2013

11 Danksagung

Ich danke all denen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und diese auf unterschiedlichste Art und Weise ermöglicht haben. Ein großer Dank gilt dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, neben meinem Betreuer Prof. Dr. med. O. Thews besonders Frau Dr. rer. nat. A. Riemann und Frau B. Schneider. Meinem Freund danke ich für sorgfältiges Fehlerlesen, meiner Schwester für die moralische Unterstützung und meinen Eltern für ihr Vertrauen.