

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

***Azidose-induzierte Effekte auf die Expression von proinflammatorischen Mediatoren
in NRKF-Zellen***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. dent.

vorgelegt

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

von Johanna Thomas

geboren am 4. Januar 1992 in Quedlinburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael Gekle
2. Prof. Dr. Dirk Vordermark
3. Prof. Dr. Christian Stock (Hannover)

14.06.2016

12.01.2017

Für Josephine

Referat

Tumorgewebe unterscheidet sich nicht nur histopathologisch von normalem Gewebe, sondern weist auch ein charakteristisches pathologisches Mikromilieu auf. Dieses ist u.a. durch Veränderungen der Mikrozirkulation, Hypoxie, Glucosemangel und Azidose gekennzeichnet. Es ist längst bekannt, dass dieses Tumormikromilieu weitreichenden Einfluss auf die Progression und Entwicklung von Krebsleiden hat. Auch Tumor-assoziierte Fibroblasten sind diesem Milieu ausgesetzt. Die in Tumoren und Tumor-assoziiertem Gewebe herrschende metabolische Azidose könnte einen Einfluss auf die Signaltransduktion und Genregulation in ubiquitär vorkommenden Fibroblasten besitzen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von metabolischer Azidose auf die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren (TNF α , COX-2, iNOS, MCP-1, Osteopontin) mit besonderer Berücksichtigung der involvierten Signalwege (MAP-Kinasen-Signalweg) in Fibroblasten der Ratte (NRKF) untersucht. Dazu wurden die Zellen im azidotischen Milieu inkubiert, anschließend ihre RNA isoliert und mittels Real Time-PCR die Genexpression genannter Mediatoren gemessen. Um die Beteiligung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 an der Azidose-induzierten Veränderung der Genexpression nachzuweisen, wurde zunächst deren Aktivitätsänderung bei Azidose mittels Western Blot nachgewiesen. Anschließend wurden die Kinasen spezifisch gehemmt, um eine mögliche Abhängigkeit der Azidose-induzierten Expressionsänderungen oben genannter Gene von ERK1/2 oder p38 festzustellen. Ein extrazellulärer pH-Wert von 6,6 führte in den NRKF-Zellen kurzfristig zu einem proinflammatorischen Effekt im Sinne der vermehrten Bildung von TNF α , COX und iNOS. Die Aktivität von ERK1/2 und p38 wurde durch eine extrazelluläre Azidose gesteigert. Langfristig nahm die Aktivität der MAP-Kinasen bei anhaltender Azidose wieder ab, genau wie der proinflammatorische Effekt auf die NRKF-Zellen. Die Expression von iNOS änderte sich nicht und die Expression von TNF α , COX-2, MCP-1 und Osteopontin wurde sogar vermindert, was auf einen immunsuppressiven Effekt einer langfristigen metabolischen Azidose hindeutet. Die Azidose-induzierten Expressionsänderungen waren zum Teil abhängig von p38 (TNF α , COX-2, iNOS), aber nicht von ERK1/2. Die Expression von MCP-1 und Osteopontin scheint unabhängig von beiden MAP-Kinasen zu sein. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass metabolische Azidose Einfluss auf verschiedene Transkriptionsprogramme von pathologisch relevanten Genen in Fibroblasten hat. Dieser wird z.T. über den MAP-Kinasen-Signalweg vermittelt. Dadurch kreieren die Tumor-assoziierten Fibroblasten ein parainflammatorisches Milieu, das auch Tumorzellen beeinflussen kann.

Thomas, Johanna: Azidose-induzierte Effekte auf die Expression von proinflammatorischen Mediatoren in NRKF-Zellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 63 Seiten, 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Vorwort.....	1
1.2	Tumormikromilieu.....	1
1.2.1	Blutversorgung und Hypoxie.....	3
1.2.2	Stoffwechsel und Azidose.....	3
1.2.3	Zusammenspiel mit Tumor-assoziierten Zellen.....	6
1.3	Die MAP-Kinasen.....	7
1.3.1	ERK1 und ERK2.....	8
1.3.2	p38-Familie.....	9
1.4	Tumornekrosefaktor α (TNF α).....	10
1.4.1	Biologische Bedeutung und Funktion.....	10
1.4.2	Struktur und Wirkmechanismus.....	11
1.5	Cyclooxygenase-2 (COX-2).....	12
1.5.1	Biologische Bedeutung und Funktion.....	12
1.5.2	Struktur und Wirkmechanismus.....	12
1.6	induzierbare NO-Synthase (iNOS).....	13
1.6.1	Biologische Bedeutung und Funktion.....	13
1.6.2	Struktur und Wirkmechanismus.....	13
1.7	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1).....	14
1.7.1	Biologische Bedeutung und Funktion.....	14
1.7.2	Struktur und Wirkmechanismus.....	15
1.8	Osteopontin.....	15
1.8.1	Biologische Bedeutung und Funktion.....	15
1.8.2	Struktur und Wirkmechanismus.....	15
1.9	„cyclic AMP response element-binding protein“ -CREB.....	16
1.9.1	Biologische Bedeutung und Funktion.....	16
1.9.2	Struktur und Wirkmechanismus.....	16
2	Zielstellung.....	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Chemikalien.....	18
3.2	Zellkultur.....	18
3.3	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	18

3.4	Verwendete Inhibitoren	19
3.5	RNA-Isolation.....	19
3.6	Realtime-Polymerase Kettenreaktion (qPCR).....	20
3.7	Protein-Isolation	22
3.8	Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
3.9	Westernblot.....	23
3.10	TNF α -ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	24
3.11	Bestimmung des Proteingehalts	25
3.12	Statistische Analyse.....	25
4	Ergebnisse.....	26
4.1	Aktivierung der MAP-Kinasen.....	26
4.2	Einfluss von Azidose auf die Genexpression	28
4.2.1	TNF α	28
4.2.2	COX-2.....	31
4.2.3	iNOS	34
4.2.4	MCP-1.....	37
4.2.5	Osteopontin.....	38
4.2.6	Transkriptionsfaktor CREB.....	40
5	Diskussion.....	42
5.1	Azidose aktiviert die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38.....	42
5.2	Azidose aktiviert inflammatorische Programme in Fibroblasten	43
5.2.1	Azidose erhöht die TNF α -Expression	43
5.2.2	Azidose erhöht die COX-2-Expression	44
5.2.3	Azidose erhöht die iNOS-Expression.....	45
5.2.4	Azidose vermindert die MCP-1-Expression.....	46
5.2.5	Azidose vermindert die Expression von Osteopontin	47
5.3	Azidose und CREB.....	47
6	Zusammenfassung	49
7	Literaturverzeichnis.....	51
8	Thesen	61
	Tabellenverzeichnis.....	62
	Abbildungsverzeichnis.....	63

Abkürzungsverzeichnis

α	Signifikanzniveau
ADP	Adenosindiphosphat
ATF	Aktivierungstranskriptionsfaktor-1
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
CAF	Krebs-assoziiertes Fibroblast
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCR	C-Chemokin Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP response element-binding protein
CREM	cAMP response element modulator
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked Immunosorbent Assay
Elk	ETS domain-containing protein
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extracellular-signal regulated kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FAP	Fibroblasten-aktivierendes Protein
gDNA	genomische DNA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
JAK	Januskinase
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogen-aktivierte Kinase
MCP	Monocyte chemotactic protein
MEK	Synonym für MAPK-Kinase

MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nNOS	neuronal NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NRKF	normal rat kidney fibroblasts
NSAR	nicht-steroidale Anti-Rheumatika
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PGH	Prostaglandin
pH _e	extrazellulärer pH-Wert
pH _i	intrazellulärer pH-Wert
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
sTNF	löslicher Tumornekrosefaktor
SYBR	Cyanin-Farbstoff zum Nachweis von DNA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
tmTNF	transmembraner Tumornekrosefaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tromethamin
UV-B	ultraviolette Strahlung B (280nm bis 315nm)

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Ein Tumor (lat. *tumor*, *-oris*, m. „Wucherung“, „Geschwulst“) bezeichnet nach seinem eigentlichen Wortursprung jede Gewebszunahme oder Schwellung, unabhängig von der Ursache. Im engeren Sinne versteht man darunter eine gutartige oder bösartige Neoplasie von Körpergewebe, entstanden durch eine Fehlregulation des Zellwachstums. Die umgangssprachliche Bezeichnung „Krebs“ stammt aus dem Altgriechischen und wurde bereits von Hippokrates oder Galenos verwendet, da sie die Gestalt der Tumoren mit dem Tier verglichen.

Heute zählen Tumorerkrankungen zu den häufigsten Todesursachen überhaupt. Laut Robert Koch Institut starben allein in Deutschland zwischen 2010 bis 2012 über 660 Tausend Menschen an einem Tumorleiden. Damit ist dies nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache.

Ein Tumor kann aus einer einzigen Zelle entstehen, in der das Genom durch eine Akkumulation von genetischen Veränderungen gekennzeichnet ist. Diese Veränderungen werden auf die nächste Krebszellgeneration übertragen, er stellt in diesem Sinne eine genetische Erkrankung dar (Löffler, Petrides, & Heinrich, 2007).

Ziele der Tumorforschung sind es zum einen die genetischen Veränderungen, die zur Entstehung einer Tumorzelle führen und zum anderen die molekularbiologischen Prozesse, die Wachstum, Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumoren beeinflussen, besser zu verstehen. Im Rahmen der personalisierten Medizin, welche die Tumorthherapie auf die individuellen Faktoren eines jeden Patienten abstimmen können soll, ist das Verständnis der molekularen Prozesse in der Entstehung und Entwicklung einer Tumorerkrankung umso bedeutender.

1.2 Tumormikromilieu

Tumoren bestehen zum einen aus charakteristischen Tumorzellen, die sich unabhängig von den Kontrollmechanismen für Wachstum und Zellteilung autonom vermehren und zum anderen aus umgebenden Tumor-assoziierten Stromazellen (Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen etc.) (Fukumura & Jain, 2007). Das Gewebe unterscheidet sich nicht nur histopathologisch und morphologisch (Abbildung 1) von Normalgewebe, sondern weist auch eine für Tumoren charakteristische Physiologie auf.

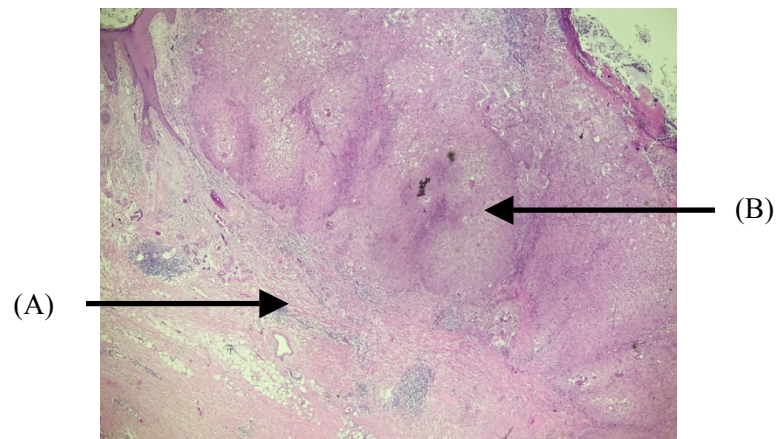


Abbildung 1 *Plattenepithelkarzinom der Haut*; Lichtmikroskopische Aufnahme in Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 20fache Vergrößerung (A) Normalgewebe (B) invasives Tumorgewebe charakterisiert durch vorwiegend unreife Zellen und atypische Mitosen; Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. P. Hermann-Trost, amedes MVZ für Pathologie und Zytodiagnostik Halle GmbH

Diese Tumorphysiologie beeinflusst Wachstum, Invasivität und Metastasierung, aber auch die Sensitivität des Tumors gegenüber therapeutischen Maßnahmen (Fukumura & Jain, 2007). Sie ist durch zahlreiche Faktoren gekennzeichnet.

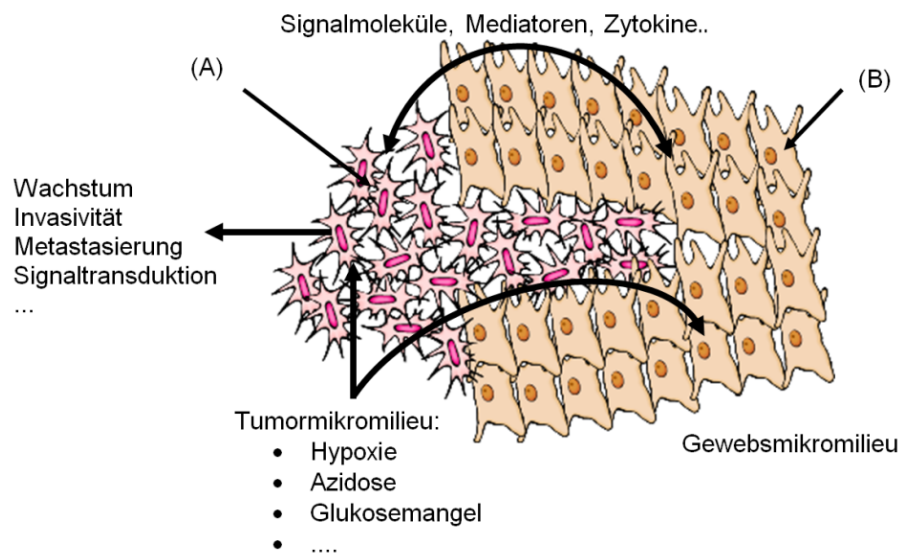


Abbildung 2 *Übersicht über die Kennzeichen des Tumormikromilieus*, Interaktion mit Tumor-assoziiertem Gewebe und Folgen für die Cancerogenese (A) Tumorzellen (B) Normalgewebe

Dazu gehören Defizite bei der Mikrozirkulation, der Versorgung mit Sauerstoff und anderen Substraten und der Entsorgung von Stoffwechselprodukten. Außerdem sind der lokale pH-Wert (Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung), der bioenergetische Status und der im Interstitium stattfindende Transport pathologisch verändert (Vaupel, Kallinowski, & Okunieff, 1989). Das entstehende Milieu wird als Tumormikromilieu

bezeichnet (Abbildung 2). Die sogenannte „Saat und Boden“-Hypothese („*seed and soil hypothesis*“) behauptet, dass nur dieses Tumormikromilieu einer Tumorzelle das Wachstum ermöglicht, auch wenn alle nötigen cancerösen Genveränderungen in der Tumorzelle bereits vorhanden sind (Paget, 1989).

1.2.1 Blutversorgung und Hypoxie

Da Tumorzellen durch genetische Mutationen von regulierenden Wachstumsprozessen entkoppelt sind, kommt es zum Teil zu einer raschen Vermehrung des Tumorgewebes. Die Neubildung der zur Versorgung erforderlichen Blutgefäße kann daher nicht immer in dieser Geschwindigkeit erfolgen. Als Folge davon treten Unregelmäßigkeiten in der Gefäßstruktur (unvollständige oder fehlende Endothelauskleidung, arterio-venöse Shunts, Verlust der Gefäßhierarchie) und bei der Blutzirkulation auf (Richtung und Geschwindigkeit des Blutflusses, hohe Gefäßpermeabilität, Mikro- und Makrothromben) (Vaupel et al., 1989). Durch die quantitativ und qualitativ eingeschränkte Blutversorgung kommt es zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff und anderen Substraten, wie z.B. Glucose. Der lokale Sauerstoffpartialdruck kann auf bis unter 5mmHg sinken. Dieser Sauerstoffmangel (Hypoxie) kann die Stoffwechselaktivität von Zellen bzw. Geweben einschränken oder sogar vollständig beenden. Die Tumorhypoxie ist stark mit der malignen Progression, dem Wachstum und der Therapieresistenz von Tumoren assoziiert (Hockel & Vaupel, 2001).

1.2.2 Stoffwechsel und Azidose

Da der vorhandene Sauerstoff nicht ausreicht, den Energiebedarf der Tumorzellen durch oxidative Phosphorylierung zu decken, weichen diese auf die anaerobe Glykolyse aus. Dabei entsteht Milchsäure als Endprodukt. Allerdings werden hier pro Glucosemolekül nur 2 ATP (Adenosintriphosphat) gebildet (bei aerober Glykolyse 36 ATP pro Molekül Glucose), die Energieausbeute ist also geringer (Gekle et al., 2010), was zu einem insgesamt erhöhten Glucoseverbrauch führt (Abbildung 3). Auch wenn genügend Sauerstoff vorhanden ist, haben Tumorzellen häufig die Eigenschaft Glucose zu Milchsäure umzusetzen. Dies ist als Warburg-Effekt bekannt. Der Vorteil, den die Tumorzellen bei ausreichender Sauerstoffversorgung aus diesem ineffizienten Weg der Energiegewinnung ziehen, ist nicht vollständig geklärt (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009). Einige Theorien besagen, dass sie dadurch Defekte ihrer Mitochondrienfunktion kompensieren, andere, dass die anaerobe Glykolyse mehr ATP generiert als die oxidative Phosphorylierung solange genügend Glucose zur Verfügung steht (Cairns, Harris, & Mak, 2011). Möglicherweise bietet die anaerobe Glykolyse einen biosynthetischen Vorteil für Tumorzellen, die den hohen Umsatz an

Kohlenstoff für weitere biosynthetische Signalwege nutzen können (Newsholme, Crabtree, & Ardawi, 1985; Vander Heiden et al., 2009).

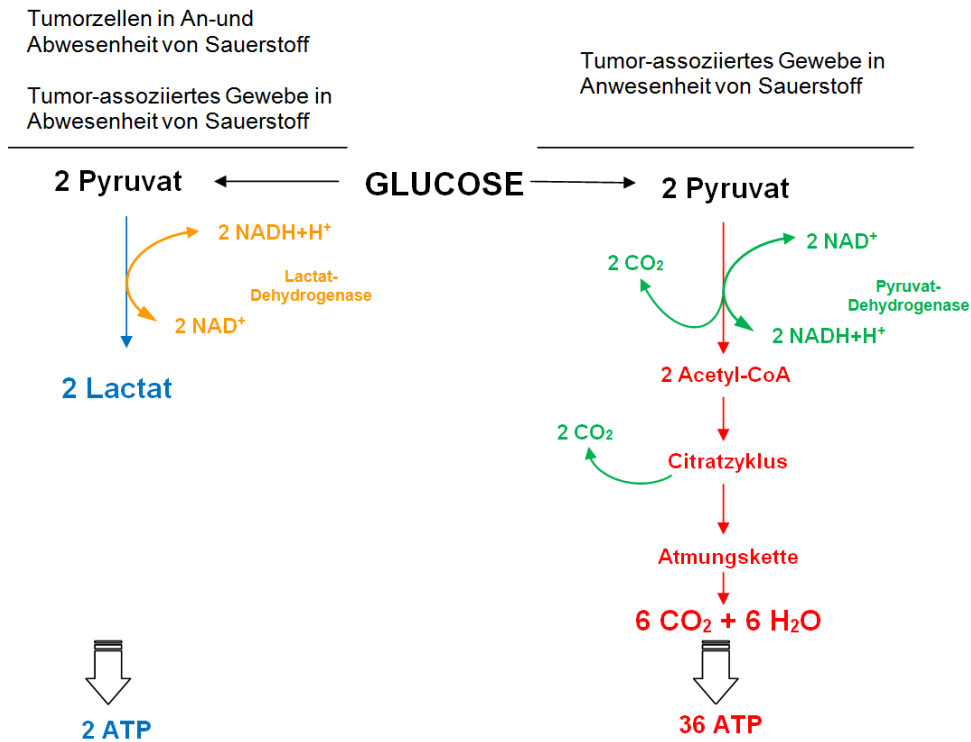


Abbildung 3 *Energiegewinnung aus Glucose in Tumorzellen und differenziertem Gewebe in An- und Abwesenheit von Sauerstoff; CoA (Coenzym A)*

Die gebildete Milchsäure dissoziiert in Lactat und Protonen, wird in den Extrazellulärraum transportiert (z. B. via Monocarboxylat-Transporter) und trägt somit zur Ansäuerung des Extrazellulärraums bei (Cairns et al. 2011; Kaelin & Thompson 2010). Zusätzlich können auch membrangebundene Carboanhydrasen durch Umwandlung von CO₂ zu Kohlensäure (Chiche, Ilc, Brahim-Horn, & Pouysségur, 2010), Na⁺/H⁺-Austauscher durch Protonentransport in den Extrazellulärraum (Fang, Gillies, & Gatenby, 2008) und Bikarbonat-Transporter zum Absinken des pH-Wertes im Interstitium beitragen. Diese pH-Regulationsmechanismen sind in Tumorzellen verstärkt aktiv (Izumi et al., 2003), um den intrazellulären pH-Wert trotz des hohen Milchsäureaufkommens konstant zu halten (Abbildung 4), was den Zellen einen kompetitiven Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen verschafft (M Stubbs, McSheehy, & Griffiths, 1999; Marion Stubbs, McSheehy, Griffiths, & Bashford, 2000). Der pH_i (intrazellulärer pH-Wert) ist in Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen zunächst also gleich (Gerweck, 1998).

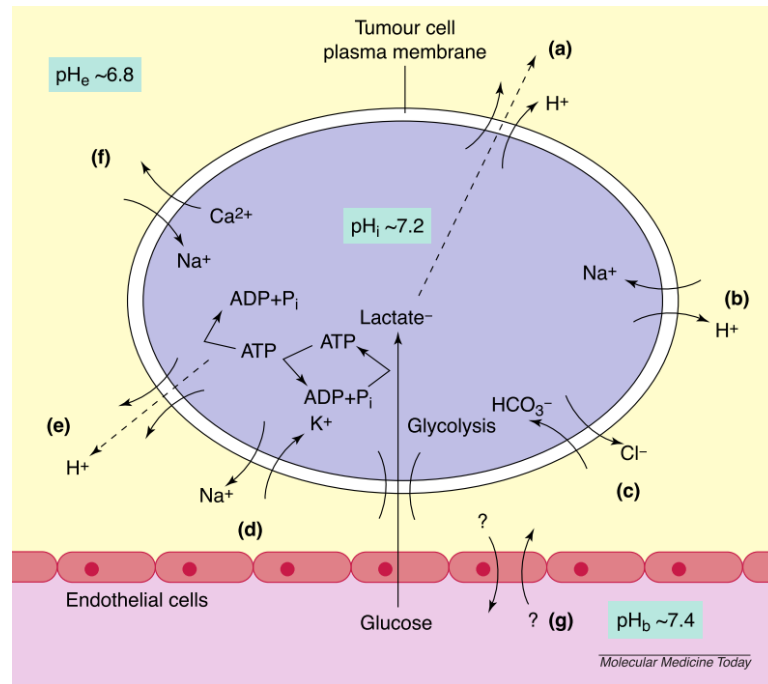


Abbildung 4 Mechanismen zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes in Tumorzellen; (a) Monocarboxylat-Transporter (b) Na^+/H^+ -Austauscher (c) $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Antiport (d) Na^+/K^+ -Austauscher (e) Protonenpumpe (f) Ca_2^+ -Ausstrom durch geringen Na^+ -Gradienten (g) möglicher Abtransport der Milchsäure in die Blutbahn; entnommen aus (Marion Stubbs et al., 2000)

Die aus den Tumorzellen exportierte Milchsäure kann nicht im gleichen Maße über die Blutgefäße abtransportiert werden, es kommt zur Ansäuerung des Gewebes (M Stubbs et al., 1999). Daher beträgt der extrazelluläre pH-Wert in den meisten Tumoren 6,6 bis 7,0. Allerdings unterliegt dieser Wert starken regionalen und zeitlichen Schwankungen innerhalb des Tumors (Tannock & Rotin, 1989). Womöglich erreichen die Tumorzellen gegenüber den Nicht-Tumorzellen einen selektiven Vorteil, indem sie an die saure Umgebung adaptieren können (Glitsch, 2011). Sie exprimieren die M2-Isoform der Pyruvat-Kinase, die für die Umstellung des zellulären Stoffwechsels auf Lactatproduktion trotz Anwesenheit von Sauerstoff notwendig ist (Christofk et al., 2008). Der niedrige pH_e (extrazellulärer pH-Wert) fördert die Tumordinvasivität (Marion Stubbs et al., 2000). Der unterschiedliche pH-Wert in Tumorgewebe im Gegensatz zu Normalgewebe hat weitreichende Konsequenzen für die Therapie von Tumorerkrankungen. Die meisten Medikamente müssen entweder über aktiven oder passiven Transport in die Zelle aufgenommen werden und unterliegen dort dem Zellstoffwechsel. Zum einen sind all diese Prozesse pH-sensitiv, zum anderen hat der pH-Wert auch einen direkten Einfluss darauf, zu welchem Anteil die Medikamente z.B. in ionisierter Form vorliegen (Marion Stubbs et al., 2000). Dies hat Konsequenzen für deren Wirkpotential. Im Tumorgewebe können leicht saure, lipidlösliche Medikamente frei durch die Zellmembran diffundieren und sich entsprechend dem pH-Gradienten in der Tumorzelle ansammeln. Dies kann zu deutlichen Unterschieden in der

Wirkstoffkonzentration (10fach oder mehr) zwischen Tumor und Nicht-Tumorzellen führen (Gerweck, 1998). Diese Eigenschaft kann sich beim Medikamentendesign zu Nutze gemacht werden. Andererseits kann die extrazelluläre Azidose auch zu Resistenzen der Tumorzellen gegenüber bestimmten Chemotherapeutika führen (Sauvant et al., 2008) und muss daher bei der Therapie berücksichtigt werden.

1.2.3 Zusammenspiel mit Tumor-assoziierten Zellen

Ein solider Tumor enthält neben den genetisch veränderten Tumorzellen auch die Zellen der direkten Umgebung. Diese Stromazellen sind dem Tumormikromilieu ebenfalls ausgesetzt und tragen zur Entwicklung des Tumors bei (Tlsty, 2008). Die lokal vorherrschende Azidose betrifft alle Zellen des Gewebes und kann in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene pathophysiologische Reaktionen auf das Mikromilieu hervorrufen. So stimuliert ein verminderter extrazellulärer pH-Wert die Produktion von IL-1 β (Interleukin-1) und inhibiert die Glykolyse in Monozyten (Dietl et al., 2010; Jancic et al., 2012). Auch Makrophagen reagieren auf das azidotische Milieu mit einer gesteigerten IL-1 β Produktion (Rajamäki et al., 2013). Neutrophile Granulozyten differenzieren sich durch die Azidose zu MHC-Klasse-II-präsentierenden Zellen. Zusätzlich erhöhen sie ihre Antigen-Bindungs- und Präsentationskapazität (Pliyev, Sumarokov, Buriachkovskaia, & Menshikov, 2011). Endothelzellen antworten auf eine saure Umgebung mit einer Entzündungsreaktion im Sinne einer gesteigerten Zytokinproduktion (Dong et al., 2013). Auch Thrombozyten reagieren pH_e-sensitiv. Saures Milieu hemmt u.a. die Adhäsion, Aggregation, ADP (Adenosindiphosphat)-Freisetzung und Thromboxan-Produktion der Blutplättchen und damit die Hämostase (Etulain et al., 2012).

Eine der Kernkomponenten eines soliden Tumors sind die sogenannten Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAF, *cancer associated fibroblasts*). Diese verändern ihre Morphologie und ihren Stoffwechsel und bilden so ein „reaktives Stroma“. Dies ähnelt dem Granulationsgewebe bei der Wundheilung, als Antwort auf das Tumorwachstum als „Wunde die nicht heilt“ (Cirri & Chiarugi, 2012). Die malignen Tumorzellen aktivieren die Fibroblasten über verschiedene Stimuli, wie z.B. FAP (Fibroblasten-Aktivierungs-Protein) oder Zytokine. Diese wiederum sezernieren Proteine der Extrazellulärmatrix (EZM) und können so einen „Nährboden“ für das Tumorwachstum bilden (Cirri & Chiarugi, 2012; Margareta M. Mueller & Fusenig, 2011). Denn die Struktur der EZM beeinflusst viele wichtige Zellfunktionen wie Proliferation und Progression der Tumorzellen (Discher, Janmey, & Wang, 2005; Georges & Janmey, 2005). Zusätzlich produzieren die Fibroblasten auch Mediatoren und Signalstoffe (z.B. Zytokine), die in den Tumorzellen Signalkaskaden für Wachstum und Proliferation auslösen können (Cirri & Chiarugi, 2012).

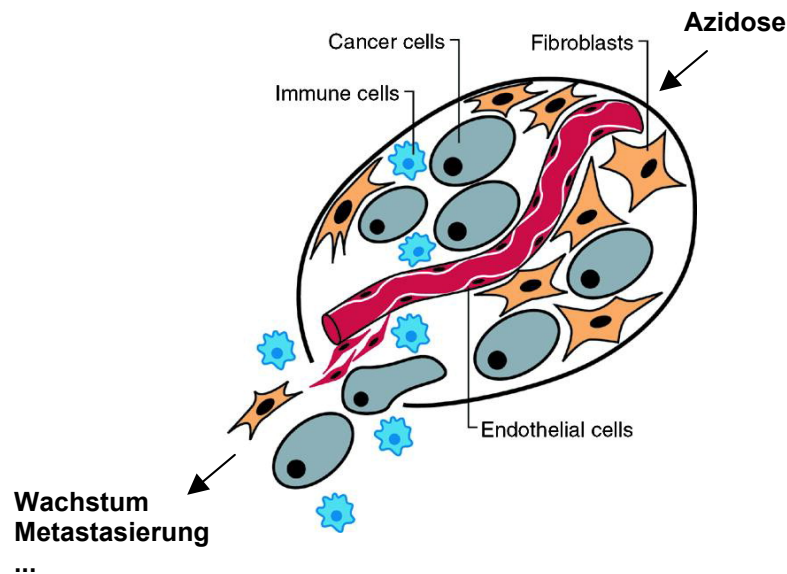


Abbildung 5 *Solider Tumor als Mischung aus verschiedenen Zelltypen*; komplexes Zusammenspiel aus Tumor- und Nicht-Tumorzellen bei der Entstehung eines lokalen Mikromilieus und dem Verlauf der Tumorerkrankung; entnommen aus (Hanahan & Weinberg, 2000)

Sowohl die lokale Azidose, als auch die Tumor-assoziierten Fibroblasts haben einen starken Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf von Tumorerkrankungen (Abbildung 5). Es ist daher von großer Bedeutung bei der Entwicklung von neuen, verbesserten Therapiemethoden, eine Tumorzelle nicht nur als Akkumulation genetischer Veränderungen zu betrachten, sondern sie im Kontext mit umgebenden Geweben und physiologischen Bedingungen zu sehen.

1.3 Die MAP-Kinasen

Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen sind Teil einer Signalkaskade, die von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert ist und in allen Eukaryonten vorhanden ist (Alberts et al., 2011). Sie sind an der Regulation von Genexpression, Proliferation, Differenzierung, Stressreaktionen und Entzündungsantworten der Zellen beteiligt (Thalhamer, McGrath, & Harnett, 2008). Eine Plasmamembran-gebundene GTPase (Ras) aktiviert das Signalmodul aus drei Komponenten, welche allesamt Serin/Threonin-Proteinkinasen sind. Auf diese Weise werden extrazelluläre Signale von der Zelloberfläche bis in den Zellkern und übertragen (Abbildung 6).

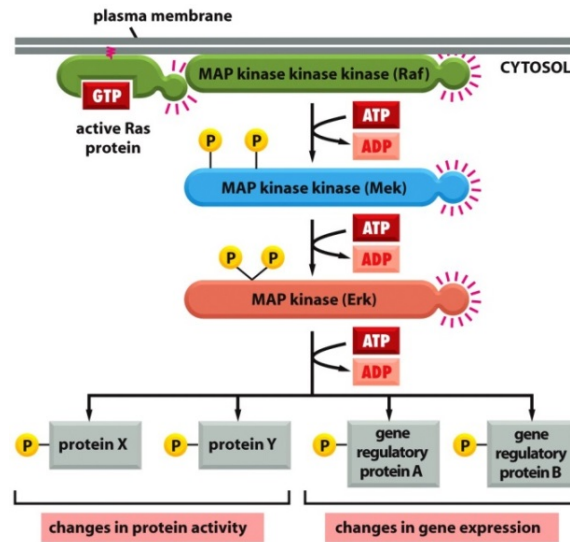


Abbildung 6 *Ras-MAP-Kinase-Signalkaskade*; schematische Darstellung der Signalkaskade: GTPase Ras aktiviert die MAPKKK, diese phosphoryliert die MAPKK, diese aktiviert die MAPK. Die aktivierte MAP-Kinase phosphoryliert zum einen weitere Proteinkinasen, zum anderen Transkriptionsfaktoren; entnommen aus (Alberts et al., 2002)

Man unterteilt die MAP-Kinasen in die *extracellular signal-regulated* Kinasen ERK, die c-Jun NH₂-terminalen Kinasen JNK und die p38 Familie. Die Zellen reagieren auf unterschiedliche extrazelluläre Stimuli mit der Aktivierung des jeweils für diesen Reiz spezifischen MAP-Kinasen-Signalweges und können so auf diverse Reize verschieden reagieren (Johnson & Lapadat, 2002). Da über ERK1 und ERK2 am meisten bekannt ist, werden in dieser Arbeit aus der ERK-Familie diese beiden Kinasen beleuchtet und die Bezeichnung ERK-Signalweg bezieht sich auf ERK1 und 2.

1.3.1 ERK1 und ERK2

ERK 1 und 2 werden in allen Geweben exprimiert und sind an der Regulation von Mitose, Meiose und wichtigen Stoffwechselfvorgängen in differenzierten Zellen beteiligt (Johnson & Lapadat, 2002). Aktiviert werden sie durch verschiedene extrazelluläre Stimuli, wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen über deren entsprechende Rezeptoren (z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren). Diese aktivieren das Ras-Protein, welches die MAPKK-Kinase Raf rekrutiert um über die MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 letztlich ERK1 und ERK2 zu aktivieren. Zu den Substraten der aktivierten ERK1/2 gehören Proteine sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma. Dazu gehören u.a. die Transkriptionsfaktoren CREB (*cAMP response element-binding protein*) und Elk-1 (*ETS domain-containing protein*), aber auch die Phospholipase A₂ und viele Proteinkinasen (Krauss, 2014). Mutationen, die Ras in ein aktiviertes Onkogen umwandeln, sind in humanen Tumoren häufig. Dies führt zu einer ständigen Überaktivierung von ERK, was mit einer erhöhten Proliferationsrate der Tumorzellen

einhergeht (Johnson & Lapadat, 2002). Die Hemmung von ERK1/2 ist damit ein mögliches Angriffsziel von Anti-Tumor-Medikamenten. Ein spezifischer Inhibitor von ERK1/2 ist U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1, 4-bis[2-aminophenylthio]butadiene) (Abbildung 7). Dieser hemmt die MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 (Synonym für MAPK-Kinase) hochspezifisch (Favata et al., 1998). Solche MEK-Inhibitoren werden derzeit klinisch als Therapeutikum in der Onkologie getestet (Schindler, Monahan, & Smith, 2007).

1.3.2 p38-Familie

Von den vier existierenden p38-Kinasen (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ) ist p38 α am besten erforscht und wird in den meisten Geweben exprimiert. Es reguliert die Expression vieler Zytokine, wird selbst u.a. durch inflammatorische Zytokine aktiviert und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort (Johnson & Lapadat, 2002). Eine große Zahl von Rezeptoren, wie z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Zytokinrezeptoren oder Wachstumsfaktorrezeptoren kann den p38-Signalweg aktivieren. Jeder Stimulus benutzt über den entsprechenden Rezeptor eine eigene MAPKK-Kinase für die Signaltransduktion. Am Ende der Kaskade steht die aktivierte p38-Kinase, zu deren Substraten Transkriptionsfaktoren und weitere Proteinkinasen gehören (Tabelle 1).

Tabelle 1 Die p38-Singalkaskade (Krauss, 2014)

Stimuli: Zytokine, UV-Strahlung, Osmotischer Stress, Hitzeschock, Wachstumsfaktoren..	
MAPKKK	MEKK4; TAO1, TAK1, ASK1, DLK
MAPKK	MKK3, MKK4, MKK6
MAPK	p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ
MAPK-Substrat	Transkriptionsfaktoren
	Proteinkinasen
	MK2, MNK1, MSK1
	PLA-2

Die p38-Kinase könnte ein vielversprechendes Angriffsziel für Medikamente in der Krebstherapie darstellen. Neben ihrer Rolle bei der Immunantwort ist sie auch an der Migration und Akkumulation von Leukozyten, sowie der Angiogenese beteiligt und unterstützt dabei die Pathogenese der Tumorerkrankung (Thalhamer et al., 2008). Die Inhibition von p38 ist daher ein Thema bei der Erforschung neuer Strategien in der Krebstherapie, der Inhibitor SB203580 (Abbildung 7) blockiert die ATP-Bindungsstelle von p38 α und β kompetitiv und hemmt somit

deren Aktivierung (Saklatvala, 2004). Obwohl Inhibitoren wie dieser einen anti-inflammatorischen Effekt in Tiermodellen zeigten, scheitern sie allerdings bisher in klinischen Studien (J. Zhang, Shen, & Lin, 2007).

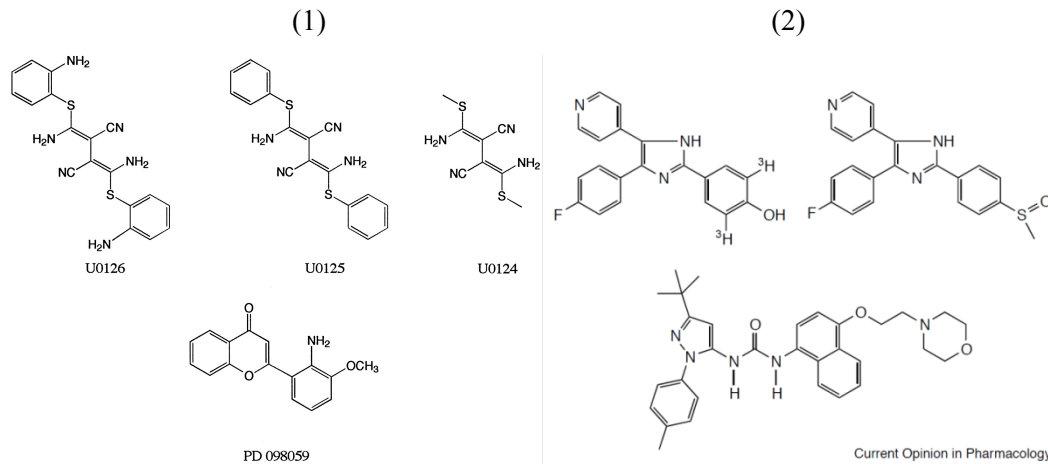


Abbildung 7 (1) Struktur synthetischer MEK-Inhibitoren; entnommen aus (Favata et al., 1998); (2) Beispiele für p38-Inhibitoren; entnommen aus (Saklatvala, 2004)

1.4 Tumornekrosefaktor α (TNF α)

1.4.1 Biologische Bedeutung und Funktion

Die Entzündung ist als Teil des unspezifischen Immunsystems oftmals eine der ersten Schutzmaßnahmen des menschlichen Körpers gegenüber Mikroorganismen (Bakterien, Viren), Fremdkörpern, aber auch beschädigtem oder fehlerhaftem körpereigenem Gewebe (Zelová & Hošek, 2013). Die dabei auftretenden lokalen Reaktionen wie z.B. vermehrte Durchblutung oder Einwanderung von Leukozyten lassen sich durch ein vielfältiges Wechselspiel zwischen Zellen und Mediatoren erklären (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2008). Ein wichtiger Bestandteil dessen ist das Zytokinnetzwerk, in dem TNF α als einer der wichtigsten Entzündungsmediatoren eine Schlüsselrolle spielt. Er ist an der vermehrten Durchblutung und an der Ödembildung im entzündlichen Gewebe beteiligt. Außerdem unterstützt TNF α die Einwanderung von Leukozyten in den Infektionsherd und reguliert die Blutkoagulation (Zelová & Hošek, 2013). Zusätzlich stimuliert er Endothelzellen und Makrophagen zur Chemokinproduktion und lockt somit weitere Zellen des Immunsystems in das Gebiet der Entzündung (Rassow et al., 2008). Die Entzündungsantwort des Immunsystems spielt bei vielen chronischen Erkrankungen, inklusive Krebs eine große Rolle. Über 25% aller Krebsarten sind mit einer chronischen Entzündung assoziiert (Balkwill & Mantovani, 2012). TNF α hat eine toxische Wirkung auf Tumorzellen. Diese Wirkung wurde (wie auch das Protein selbst) zuerst im Jahre 1957 von Carwell et. al beschrieben (Zelová & Hošek, 2013). Allerdings ist dies nur bei sehr hohen Dosen der Fall. Eine geringe Konzentration von TNF α scheint eine gegenteilige

Wirkung auf die Tumorprogression zu haben. In diesem Fall fördert TNF α die Proliferation, das Wachstum, die Invasivität, die Angiogenese, selbst die Metastasierung des Tumors (Szlosarek, Charles, & Balkwill, 2006).

1.4.2 Struktur und Wirkmechanismus

TNF α gehört zur TNF-Superfamilie, einer Proteinfamilie der Zytokine. Es wird in zwei verschiedenen Formen exprimiert: löslich (sTNF α) oder membrangebunden (tmTNF α) (Zhou, Mountz, & Kimberly, 2002). Makrophagen und T-Zellen (Thymus-Zellen) sind die Hauptproduzenten von TNF α , allerdings können viele andere Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, Adipozyten, Osteoblasten, Astrozyten uvm. ebenfalls TNF α exprimieren (Zelová & Hošek, 2013). Die Zellen produzieren dabei nie einen Vorrat des Zytokins, sondern extrazelluläre Reize stimulieren dessen *de novo Synthese*. Solche Reize sind u.a. bakterielle Antigene, Enterotoxine, Immunkomplexe und TNF α selbst über autokrine Mechanismen (Zelová & Hošek, 2013).

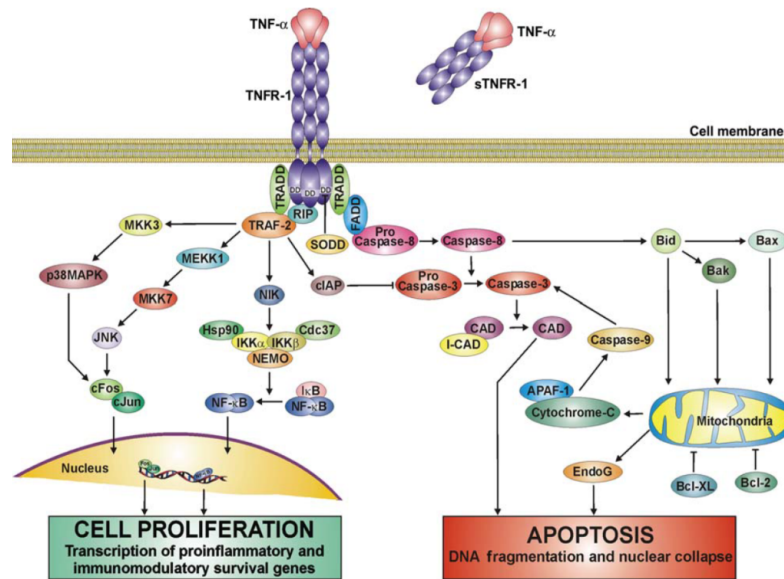


Abbildung 8 Signalkaskade von TNF α ; sowohl Zellproliferation, als auch Zelltod werden durch TNF α über den gleichen Rezeptor induziert; entnommen aus (van Horssen, Ten Hagen, & Eggermont, 2006)

Die Wirkung des Tumornekrosefaktors wird über zwei verschiedene Rezeptoren (TNFR ((Tumornekrosefaktor-Rezeptor)) 1 und TNFR2) vermittelt (Abbildung 8) (Rassow et al., 2008). TNFR1 befindet sich an der Oberfläche von fast allen humanen Zelltypen (außer Erythrozyten) und kann sowohl vom löslichen sTNF α , als auch von transmembranen tmTNF α aktiviert werden. TNFR2 findet man v.a. bei Immun- und Endothelzellen und er zeigt nur in Anwesenheit von tmTNF α seine volle Aktivität (Grell et al., 1995; Grell, Wajant, Zimmermann, & Scheurich, 1998). Die Bindung von TNF α an seinen Rezeptor führt in der

Zelle zu einer von zwei möglichen Reaktionen: Stimulierung des Zellüberlebens und Bildung inflammatorischer Mediatoren, oder Apoptose und Zelltod. Welchen Weg die Zelle einschlägt ist abhängig von der Signalstärke und den Adapterproteinen, die gemeinsam mit TNF α den Signalkomplex bilden (Duda, Nagy, Männel, & Eissner, 2005).

1.5 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

1.5.1 Biologische Bedeutung und Funktion

Die Cyclooxygenasen synthetisieren aus Arachidonsäure Prostaglandine, die zentralen Mediatoren der Entzündung im menschlichen Körper (Tsatsanis, Androulidaki, Venihaki, & Margioris, 2006). Zusammen mit weiteren Mediatoren (z.B. Bradykinin, Histamin) führen sie bei Gewebsschädigung (Entzündung) zu Vasodilatation, erhöhter Gefäßpermeabilität und Steigerung der Schmerzempfindlichkeit (Rassow et al., 2008). Eine gesteigerte COX-2-Expression fördert die Entzündung über die verstärkte Synthese von Prostaglandinen (Tsatsanis et al., 2006). Es scheint aber auch eine anti-inflammatorische Rolle zu spielen, denn in Makrophagen führt eine erhöhte COX-2-Synthese zur Bildung des Prostaglandins 15dPGJ2 (Mindrescu, Le, Wisniewski, & Vilcek, 2005), einem endogenen Aktivator von PPAR γ . PPAR γ ist ein stark anti-entzündlich wirksamer Transkriptionsfaktor (Tsatsanis et al., 2006). Neben der pro-inflammatorischen Wirkung scheint COX-2 auch bei der Pathogenese von Tumorerkrankungen eine Rolle zu spielen (Taketo, 1998a, 1998b). Tumorpromoter und Onkogene stimulieren die COX-2 und damit die Prostaglandinsynthese in verschiedenen Zelltypen. (Dubois et al., 1998; Levine, 1981) Diese Prostaglandine fördern möglicherweise die Tumorzellproliferation, die Angiogenese, vermindern die Immunantwort und verhindern den Zelltod (Simmons, Botting, & Hla, 2004). Unterstützt wird diese These durch epidemiologische Studien, in denen gezeigt wurde, dass bei Patienten die regelmäßig nicht-steroidale Anti-Rheumatika (NSAR, z.B. Aspirin) einnehmen, die Inzidenz verschiedener Tumorerkrankungen deutlich vermindert ist. NSAR sind Inhibitoren der Cyclooxygenase (Thun, Henley, & Patrono, 2002).

1.5.2 Struktur und Wirkmechanismus

Es existieren zwei gut charakterisierte Isoformen der Cyclooxygenase: COX-1 und COX-2, auch als PGH-Synthase (Prostaglandin H₂-Synthase) bezeichnet. COX-1 wird in fast allen Zellen kontinuierlich exprimiert, während COX-2 unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Allerdings nimmt die Expression bei Entzündung stark zu, ist also induzierbar (Rassow et al., 2008). COX besitzt zwei katalytische Zentren, die Peroxidase- und die Cyclooxygenase-Aktivität. In diesen wird ihr Substrat, die Arachidonsäure zunächst durch die Anlagerung von zwei Sauerstoffmolekülen zu Prostaglandin 2 und

anschließend durch die Peroxidase zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert. Enzyme, die für jeden Zelltyp spezifisch sind, modifizieren das PGH₂-Grundgerüst in Prostaglandine, Prostazyklin oder Thromboxan (Rassow et al., 2008). Die Expression von COX-2 kann durch zahlreiche Faktoren induziert werden. Dazu gehören die meisten pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 oder TNF α , aber auch bakterielles LPS (Lipopolysaccharid), Wachstumsfaktoren oder UV-B-Strahlung (ultraviolette Strahlung mit Wellenlängen zwischen 280nm und 315nm). Außerdem kann Stickstoffmonoxid die katalytische Aktivität von COX-2 direkt erhöhen (Tsatsanis et al., 2006).

1.6 induzierbare NO-Synthase (iNOS)

1.6.1 Biologische Bedeutung und Funktion

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein universelles Signalübertragungsmolekül (Rassow et al., 2008). Es ist in physiologische und pathophysiologische Prozesse im Herz-Kreislauf-, Nerven- und Immunsystem involviert. Auf der einen Seite wirkt es als Neurotransmitter, reguliert den Gefäßtonus und ist an der Immunantwort beteiligt, auf der anderen Seite ist NO ein freies Radikal, welches in pathologischen Prozessen (z.B. Entzündungen) als zytotoxisches Agens wirkt (Aktan, 2004). Die Produktion von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin wird im menschlichen Körper von der Enzymfamilie der NO-Synthasen katalysiert. Eine davon ist die iNOS (Alderton et al., 2001). Diese wird nicht ständig in den Zellen exprimiert, ihre Expression wird durch Stimuli wie immunmodulatorische Zytokine oder bakterielle Antigene in Zellen des Immunsystems (z.B. Monozyten, Makrophagen) induziert (Aktan, 2004). Stickstoffmonoxid, das von iNOS gebildet wird, hat antibakterielle, antivirale und antiparasitäre Effekte (Bogdan 2001; MacMicking et al. 1997). Andererseits scheint eine dauerhafte pathophysiologische Induktion der iNOS-Expression, wie sie z.B. bei einer chronischen Entzündung auftritt, an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie Asthma oder Arthritis beteiligt zu sein (Bogdan 2001; Kröncke et al. 1998). Auch die Progression zahlreicher Tumorarten wird durch eine andauernde iNOS-Aktivität beeinflusst. Tumor-assoziierte Zellen, wie Endothelzellen oder Fibroblasten exprimieren iNOS und bilden somit eine NO-Quelle für das Tumormikromilieu. Das gebildete Stickstoffmonoxid kann Wachstum, Invasivität, Angiogenese und Metastasierung des Tumors ebenso fördern wie vermindern (Lala & Chakraborty, 2001). Welchen dieser gegensätzlichen Effekte NO auf die Tumorprogression hat, ist Tumor-spezifisch und abhängig von dem lokal vorherrschenden Mikromilieu (Wink, Ridnour, Hussain, & Harris, 2008).

1.6.2 Struktur und Wirkmechanismus

In der NO-Synthasen-Familie werden drei Hauptisoformen unterschieden: nNOS (neuronale NO-Synthase), welche v.a. in Nervenzellen vorkommt, eNOS (endotheliale NO-Synthase),

welche man in Endothelzellen findet und iNOS, die in zahlreichen verschiedenen Zellen exprimiert wird. Während nNOS und eNOS ständig exprimiert werden, ist die Expression von iNOS induzierbar (Alderton et al., 2001). Zu den Stimulatoren der iNOS-Expression gehören bakterielle Antigene und Zytokine wie IL-6 oder TNF α . Generell scheint in den meisten Zellen der NF- κ B-Signalweg (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und/oder der JAK/STAT-Signalweg (*Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) eine zentrale Rolle bei der Regulation der iNOS-Expression zu spielen (Aktan, 2004; Kleinert, Pautz, Linker, & Schwarz, 2004). Die induzierbare NO-Synthase katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid ausgehend von L-Arginin. Dabei wird in zwei Schritten das L-Arginin zu L-Citrullin und NO oxidiert.

1.7 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)

1.7.1 Biologische Bedeutung und Funktion

Das Einwandern von Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten aus der Blutbahn in das Gewebe ist ein zentraler Schritt bei der Immunantwort und Entzündung im Gewebe. Angelockt werden diese Zellen durch inflammatorische Chemokine, die den Zytokinen strukturell sehr ähnlich sind und die für die Infiltration von Immunzellen in das entzündliche Gebiet verantwortlich sind. MCP-1 ist eines der wichtigsten Chemokine, das die Rekrutierung, Migration und Infiltration von Monozyten, Gedächtniszellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen steuert (Deshmane, Kremlev, Amini, & Sawaya, 2009). Proinflammatorische Mediatoren stimulieren die Freisetzung von MCP-1, woraufhin Monozyten entlang des Chemokin-Gradienten zum Ort hoher Chemokinkonzentrationen dirigiert werden (Callewaere, Banisadr, Rostène, & Parsadaniantz, 2007). Dieses Anlocken der Immunzellen zum Entzündungsherd wird als Chemotaxis bezeichnet. MCP-1 wird von zahlreichen Zelltypen sezerniert, darunter sind Endothelzellen, Fibroblasten, oder glatte Muskelzellen. Hauptproduzenten des Chemokins sind allerdings die Monozyten selbst, die sich somit gegenseitig anlocken und sich zahlreich im entzündlichen Gebiet ansammeln (Deshmane et al., 2009). MCP-1 ist an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen (z.B. Asthma, Arthritis) beteiligt (Deshmane et al., 2009). Darüber hinaus wird es von den meisten Tumorzelltypen exprimiert, was auf eine Tumor-fördernde Wirkung schließen lassen könnte (Conti & Rollins, 2004). Durch das Rekrutieren von Monozyten, welche an der Angiogenese von Tumoren beteiligt sind (Polverini, Cotran, Gimbrone, & Unanue, 1977), kann es indirekt das Tumorstadium positiv beeinflussen (Deshmane et al., 2009). Andererseits ist MCP-1 an der Immunantwort des Gewebes beteiligt und hat damit auch inhibierende Effekte auf die Tumorstadium (Conti & Rollins, 2004). Tatsächlich verstärkt es die zytostatische Aktivität der Makrophagen gegenüber Tumorzellen (Zachariae et al., 1990).

1.7.2 Struktur und Wirkmechanismus

MCP-1 gehört zu einer Familie mit vier Mitgliedern: MCP-1,-2,-3 und -4 (Deshmane et al., 2009). MCP-1 vermittelt seine Effekte durch die Bindung an den G-Protein gekoppelten CCR2-Rezeptor (C-Chemokinrezeptor). Dieser existiert in zwei Isoformen (CCR2A, CCR2B), wobei Monozyten und aktivierte Killerzellen v.a. CCR2B exprimieren (Deshmane et al., 2009). Die Bindung von MCP-1 an seinen Rezeptor aktiviert intrazelluläre Signalwege und induziert somit seine chemotaktische Wirkung. Der molekulare Signalweg ist nicht abschließend geklärt (Jimenez-Sainz, Fast, Mayor, & Aragay, 2003), allerdings scheinen die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 eine Rolle zu spielen (Arefieva, Kukhtina, Antonova, & Krasnikova, 2005).

1.8 Osteopontin

1.8.1 Biologische Bedeutung und Funktion

Osteopontin ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, das u. a. von Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts, des Reproduktionstrakts oder der Lunge sezerniert wird (Brown et al., 1992). Im Knochen wird Osteopontin von den Osteoblasten an der Mineralisationsfront und von den knochenresorbierenden Osteoklasten gebildet (Sodek, Ganss, & McKee, 2000). Makrophagen, Leukozyten und T-Lymphozyten sezernieren das Glykoprotein in den extrazellulären Raum von entzündlichem Gewebe (Rodrigues, Teixeira, Schmitt, Paulsson, & Lindmark-Månsson, 2007). Ebenso zahlreich wie die Bildungsorte sind die physiologischen Funktionen von Osteopontin. Es ist ein wichtiges Schlüsselprotein der Knochenmatrix und spielt eine zentrale Rolle u.a. im Immun- und Gefäßsystem (El-Tanani, 2008). Außerdem übernimmt es viele wichtige Aufgaben in der Zelle. Es ist an der Regulation von Zelladhäsion, Migration (Lund, Giachelli, & Scatena, 2009), Zytokinproduktion von Makrophagen und dem Zellüberleben beteiligt (Denhardt, Giachelli, & Rittling, 2001). Eine Überexprimierung von Osteopontin wurde in verschiedenen Krebstypen (Brustkrebs, Lungenkrebs, Melanome etc.) nachgewiesen (Rodrigues et al., 2007). Dort reguliert Osteopontin die Zelladhäsion, Chemotaxis, Invasion und Migration der Tumorzellen, schützt sie vor Apoptose und fördert deren Wachstumsfaktor-unabhängiges Zellwachstum und deren Vermehrung (El-Tanani, 2008). Daher könnte eine Hemmung der Osteopontin-Aktivität eine mögliche Strategie in der Krebstherapie darstellen (Rodrigues et al., 2007).

1.8.2 Struktur und Wirkmechanismus

Osteopontin enthält spezifische Rezeptor-bindende Motive, welche die Wechselwirkungen zwischen ihm und den Rezeptoren der Zielzelle vermitteln (Rodrigues et al., 2007). Dazu gehört z.B. ein Integrin-bindendes Motiv, welches die Zellanheftung vermittelt und auf ähnliche Weise in vielen Extrazellulärmatrixproteinen zu finden ist (Suzuki, 2005). Integrine sind eine Familie

aus heterodimeren Adhäsionsrezeptoren (El-Tanani, 2008). Die Bindung von Osteopontin induziert die Bildung und Aktivierung eines fokalen Adhäsionskomplexes aus Regulator- und Strukturproteinen, wie z.B. die fokale Adhäsionskinase (Rodrigues et al., 2007). Die Stimulation verschiedener Komponenten dieses Komplexes führt zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege in der Zelle, die zelluläre Eigenschaften wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Zellüberleben beeinflussen (Newham & Humphries, 1996).

1.9 „cyclic AMP response element-binding protein“ -CREB

1.9.1 Biologische Bedeutung und Funktion

Die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen ist abhängig von der Anwesenheit verschiedener Transkriptionsfaktoren. Extra- und intrazelluläre Signale führen zur Aktivierung dieser Faktoren und beeinflussen damit die Transkription der Zelle (Rassow et al., 2008). CREB ist ein Transkriptionsfaktor und bildet somit ein Endprodukt verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Er wird über Phosphorylierung durch zahlreiche Faktoren aktiviert. Dazu gehören u.a. die MAP-Kinasen und verschiedene Zytokine (Johannessen, Delghandi, & Moens, 2004). Als Transkriptionsfaktor spielt CREB eine wichtige Rolle bei den zentralen Zellfunktionen wie Proliferation, Wachstum und Überleben (Sakamoto & Frank, 2009). Allerdings zeigten Studien, dass CREB an der Entstehung, Progression und Metastasierung von Tumoren beteiligt ist, es gilt daher als Protoonkogen (Xiao, Li, Mitton, Ikeda, & Sakamoto, 2010). CREB wird in verschiedenen Tumoren überexprimiert und überaktiviert, dazu gehören u.a. Lungen- und Prostatakrebs (Sakamoto & Frank, 2009; Xiao et al., 2010). Die Inhibierung von CREB in verschiedenen Krebszelllinien führte zu einer verminderten Zellproliferation der Tumorzellen und induzierte deren Apoptose (Xiao et al., 2010). Daher stellt CREB ein mögliches Ziel für die Krebstherapie dar.

1.9.2 Struktur und Wirkmechanismus

Zur CREB-Proteinfamilie gehören neben CREB selbst noch CREM (*cAMP response element modulator*) und ATF-1 (*activating transcriptionfactor-1*). CREB und ATF-1 werden ubiquitär exprimiert, während CREM v.a. in neuroendokrinen Gewebe zu finden ist (Mayr & Montminy, 2001). CREB vermittelt die Aktivierung von cAMP-sensitiven Genen, indem es in seiner aktiven Form an das *cAMP-responsive Element* (CRE) bindet (Comb, Birnberg, Seasholtz, Herbert, & Goodman, 1986). Dies ist eine Nukleotid-Sequenz (TGACGTCA) im Promotorbereich der cAMP-sensitiven Gene, deren Transkription dadurch aktiviert bzw. verstärkt wird (Johannessen et al., 2004).

2 Zielstellung

Fibroblasten sind an der Entstehung und Entwicklung von Tumorerkrankungen beteiligt (CAF) (Cirri & Chiarugi, 2012; Kalluri & Zeisberg, 2006). Sie fördern das Tumorwachstum und ermöglichen über Remodellierung der extrazellulären Matrix und von Zellkontakten die Zellinvasion der Krebszellen (Naylor, Filer, & Buckley, 2013; Xing, Saidou, & Watabe, 2010). Außerdem steuern Fibroblasten das Bestehen von Entzündungen, indem sie Akkumulation, Überleben und Retention von Immunzellen im entzündlichen Gebiet, welches häufig mit Tumoren assoziiert wird (Balkwill & Mantovani, 2012), arrangieren (Juarez, Filer, & Buckley, 2012; Naylor et al., 2013). In dieser Arbeit wurde analysiert, inwieweit das azidotische Tumormikromilieu einen Einfluss auf die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren der Krebs-assoziierten Fibroblasten besitzt. Zu diesem Zweck wurde untersucht wie eine extrazelluläre Azidose

- I. die Genexpression von TNF α , COX-2, iNOS, MCP-1 und Osteopontin,
- II. die Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38,
- III. die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB

beeinflusst.

Außerdem wurde die Abhängigkeit der Änderungen der Genexpression von der Aktivität der MAP-Kinasen beleuchtet.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden –sofern nicht anders vermerkt- von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (München) oder Merck (Darmstadt).

3.2 Zellkultur

Für die Experimente wurden NRKF-Zellen (*normal rat kidney fibroblasts*; NRK-49F, DMSZ, Braunschweig) verwendet. Dabei handelt es sich um immortalisierte Fibroblasten aus der Niere einer Ratte. Die Zellen wuchsen in DMEM-Medium (Biowest) mit 10% FCS (fötales Kälberserum) und wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert. Einmal wöchentlich erfolgte eine Subkultivierung. Dazu wurden die Zellen zunächst mit EDTA-Lösung (0,2g/l) gewaschen und anschließend mit Trypsin (0,1g/l, Sigma-Aldrich, München) inkubiert, bis sie sich von der Zellkulturflasche lösten. Die Trypsinaktivität wurde mit serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen wurden für die Experimente in 6cm Petrischalen (Westernblot, RNA-Isolation) oder 10cm Petrischalen (ELISA) angesät. Jeweils 24h vor dem Experiment erfolgte ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium. Dies diente zum einen der Synchronisation des Zellwachstums, zum anderen der Vermeidung von Grundstimulationen durch Hormone.

3.3 Allgemeiner Versuchsaufbau

Im Anschluss an den Serumentzug erfolgte die Inkubation der Zellen für die angegebenen Zeiten (3h, 6h, 24h) mit Bikarbonat-gepufferten Ringerlösungen. Unter Kontrollbedingungen erhielten die Zellen HEPES-Ringerlösung mit einem pH-Wert von 7,4 (24mM NaHCO₃; 0,8mM Na₂HPO₄; 0,2mM NaH₂PO₄; 86,5mM NaCl; 5,4mM KCl; 1,2mM CaCl₂; 0,8mM MgCl₂; 20mM HEPES; 11mM Glukose; pH-Einstellung mit 1N NaOH) und einer Pufferkapazität von 5,9mM pro pH-Einheit, bei Azidose eine MES-Ringerlösung mit dem pH-Wert 6,6 (4,5mM NaHCO₃; 0,8mM Na₂HPO₄; 0,2mM NaH₂PO₄; 106mM NaCl; 5,4mM KCl; 1,2mM CaCl₂; 0,8mM MgCl₂; 20mM MES; 11mM Glukose; pH-Einstellung mit 1N NaOH) und einer Pufferkapazität von 3,9mM pro pH-Einheit. Bei 24h-Inkubationen erhielten die Zellen unter Kontrollbedingungen serumfreies DMEM Medium mit einem pH-Wert von 7,4. Für azidotische Bedingungen wurde in serumfreiem DMEM-Medium ein

pH-Wert von 6,6 mit 1N HCl eingestellt. Die Beigabe von Inhibitoren erfolgte während der Inkubationszeiten in den jeweiligen Ringerlösungen.

3.4 Verwendete Inhibitoren

Um die Beteiligung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 an der Azidose-induzierten Veränderung der Genexpression verschiedener Zytokine zu beurteilen, wurden diese mit spezifischen Inhibitoren gehemmt. Mit 10µM U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]-Butadien; Merck, Darmstadt) wurde die ERK1/2-Aktivierung durch Inhibition von MEK1/2 gehemmt. MEK1/2 ist eine MAP-Kinase-Kinase, die die Phosphorylierung von ERK1/2 steuert. Indem es ERK1/2 an ihrer N-terminalen Bindestelle bindet, kann es durch seine C-terminale katalytische Domäne ERK1/2 sowohl am Tyrosinrest Tyr204/187, als auch am Threoninrest Thr202/185, phosphorylieren. U0126 hemmt die Kinaseaktivität von MEK1/2 *in vivo* und *in vitro* und verhindert somit die weitere Signaltransduktion. Die Inhibition von p38 erfolgte durch 10µM SB203580 (4-[4-Fluorophenyl]-2-[4-methylsulfinylphenyl]-5-[4-pyridyl]1H-Imidazol; Calbiochem, Darmstadt). SB203580 hemmt die katalytische Aktivität von p38, indem es an die ATP-Bindestelle der MAP-Kinase bindet. Beide Hemmer sind hoch spezifisch (Angaben des Herstellers: U0126 IC50 von 72nM für MEK1 und 58nM für MEK2; SB203580 IC50 34nM). Die Inhibitoren sind in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, welches über Veränderungen des Zytoskeletts das Zellwachstum beeinflussen kann (Carvalho, Foulkes, & Mickey, 1989). Daher wurden bei allen Experimenten DMSO-behandelte Kontrollen mitgeführt.

3.5 RNA-Isolation

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1xPBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄) gewaschen und die Gesamt-RNA mit dem *InviTrap® Spin Tissue RNA Minikit* (Invitex, Berlin) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer *NanoVue* (VWR, Darmstadt) bestimmt. Nukleinsäuren (RNA, DNA) haben bei 260nm ein Absorptionsmaximum, während das von Proteinen bei 280nm liegt. Das Verhältnis der Absorptionsraten bei diesen Wellenlängen wurde als Maß für die Kontamination der RNA mit Proteinen verwendet. Lag der 260/280-Wert unterhalb von 2,0, wurde von einer Kontamination ausgegangen. Gleichmaßen wurde die Absorption bei 230nm gemessen, um Kontaminationen der RNA durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenole oder aromatische Verbindungen auszuschließen. Hier lag der zu erwartende 260/230-Wert bei ~2,0-2,2. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.6 Realtime-Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Nach Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgte ein Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) mittels Reverser Transkriptase (SuperScript II reverse transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, USA). Dazu wurde zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt. Die verdaute RNA wurde mit dem in Tabelle 2 aufgeführten Reaktionsmix inkubiert (Programm siehe Tabelle 3).

Tabelle 2 Übersicht über Bestandteile und Funktionen des Reaktionsmix zur Umschreibung in cDNA

Bestandteil	Konzentration	Funktion	V in μl
H ₂ O (Sigma)	-	-	30,94
5x first strand buffer	1x	Puffer	11,42
DTT (Dithiothreitol)	100 mM	Stabilisierung des DNA-Stranges	0,72
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	je 10 mM	Bausteine der DNA	2,86
RNase Out	40 U/ μl	Schutz vor RNase-Verdau	1,42
Random Primer	0,3 g/ μl	Umschreiben der RNA in	1,92
Reverse Transkriptase	200 U/ μl	cDNA aus dNTPs	0,72

Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase, um eventuelle Kontamination mit genomischer DNA in der Realtime-PCR auszuschließen.

Tabelle 3 Heizblock-Programm zum Umschreiben der RNA in cDNA

Zeit in min	Temperatur in °C
5	25
30	42
5	95
-	4°C

Anschließend erfolgte die Lagerung bei -20°C. Der Transkriptionsnachweis der untersuchten Gene erfolgte mittels RT-PCR. Dazu wurde das *SuperScript OneStep RT-PCR System* von Invitrogen (Paisley, UK) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Verfahren ermöglicht zusätzlich zur Vervielfältigung der Nukleinsäure nach dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion auch eine Quantifizierung der gewonnenen DNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen. Bei der Polymerasekettenreaktion wird die vorhandene DNA zu Beginn durch hohe Temperaturen (Tabelle 4) in einem Thermocycler (Bio-Rad, München) denaturiert, um die Wasserstoffbrückenbindungen, die beide Stränge miteinander verknüpfen, aufzusprengen. Anschließend lagern sich die verwendeten Primer bei für sie spezifischen

Temperaturen (Tabelle 5) an die Einzelstränge an (*primer annealing*). Während der Elongation bildet die DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Stang aus freien Nukleotiden. Dieser Zyklus wird wiederholt, wobei es zur exponentiellen Vermehrung der DNA kommt.

Tabelle 4 Übersicht über das qPCR-Programm

	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden
Denaturierung	95	20
Annealing	Tabelle 5	20
Elongation	72	20

Die qPCR bietet die Möglichkeit, diese DNA-Vermehrung quantitativ zu bestimmen, indem ein zunächst inaktiver Fluoreszenzfarbstoff SYBR (2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1*H*-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation; Bio-Rad, München) beigemischt wird. SYBR bindet doppelsträngige DNA, der daraus resultierende Komplex absorbiert blaues Licht und emittiert grünes Licht. Somit kann die Nukleinsäuremenge photometrisch bestimmt werden. Folgende Gene wurden untersucht:

Tabelle 5 Übersicht über die untersuchten Gene, die verwendeten Primer und Annealing Temperaturen

Gen	Primer (Sequenz von 5' zu 3')	Annealing Temperatur
TNF α	rTNFalpha226 sense CCACCACGCTCTTCTGTCTACTGAACT	60°C
	rTNFalpha226 anti CCATTGGCCAGGAGGGCGTT	
COX-2	rt COX-2 forw TACAAGCAGTGGCAAAGGCC	60°C
	rt COX-2 rev CAGTATTGAGGAGAACAGATGGG	
MCP-1	ratMCP-1#140 3 s CCCAGAAACCAGCCAACT	60°C
	ratMCP-1#140 3 a TGCTGCTGGTGATTCTCTTG	
iNOS	iNOS #1330 sense GCAGGTTGAGGATTACTTCTTCCA	66°C

	iNOS #1330 anti	
	GCCCTTTTTTGCTCCATAGGAAA	
Osteopontin	ratOsteopontin	
	CCTCTGAAGAAACGGATGACT	53°C
	ratOsteopontin	
	CTGGGCAACTGGGATGACCTT	
18S	sense Mm_18S_UP2	
	CTGAGAAACGGCTACCACATC	56°C
	anti Mm_18S_DP2	
	CCCAAGATCCAACACTACGAGC	

Als Bezugswert/Beladungskontrolle diente das nicht durch Azidose regulierte *housekeeping* Gen Rn 18S: $\Delta Cq = Cq(\text{Gen}) - Cq(18S)$. Um den Azidose-induzierten Effekt auf die Transkription der o.g. Gene zu bestimmen ($\Delta\Delta Cq$), wurden jeweils die Cq-Werte bei pH 6,6, auf die bei Cq-Werte der Zellen bei pH 7,4 (Kontrolle) bezogen: $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{pH } 7,4) - \Delta Cq(\text{pH } 6,6)$.

3.7 Protein-Isolation

Um über den Einfluss von Azidose auf Proteinebene eine Aussage treffen zu können, wurden aus den Zellen nach erfolgter Inkubation Proteinlysate für die SDS-PAGE hergestellt. Dazu wurden sie zunächst mit eiskaltem PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und anschließend mit Hilfe von Laemmli-puffer (0,5M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 10% β -Mercaptoethanol; 20% Glycerol; 0,01% Bromphenolblau) lysiert und bei 12500rpm für 15min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 5 min auf 90°C erhitzt, anschließend erfolgte die Lagerung bei -20°C.

3.8 Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wird genutzt, um Proteine nach ihren Molekulargewichten aufzutrennen. Dies geschieht, indem die durch Hitze denaturierten Polypeptide SDS binden, dadurch eine negative Ladung erhalten und zur Anode wandern. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht (ca. 1,4g SDS/g Protein), jedoch unabhängig von der Aminosäuresequenz ist, ist die Motilität der Protein-SDS-Komplexe allein abhängig von der Proteingröße. Die mit Laemmli-puffer hergestellten Proteinlysate wurden mit Minigelen aus 3%igem Sammelgel und 12%igem Trenngel aufgetrennt (Tabelle 6, Tabelle 7).

Tabelle 6 Zusammensetzung der Minigele

SDS- Page	3% Sammelgel	12% Trenngel
Wasser	1,54ml	1,88ml
0,5M Tris-HCl pH 6,8	625µl	-
1,5M Tris-HCl pH 8,8	-	1,563ml
Acrylamid/Bisacrylamid 26:0,7	288µl	-
Acrylamid/Bisacrylamid 29,3: 0,53	-	2,55ml
10% SDS (Natriumlaurylsulfat)	25µl	125µl
10% APS (Ammoniumpersulfat)	30µl	75µl
TEMED (Tetramethylethyldiamid)	20µl	20µl

Der für die Elektrophorese verwendete Laufpuffer enthielt 25mM Tris (Tromethamin), 3,5mM SDS und 192mM Glycin. Als Marker des Molekulargewichts wurde der peqGOLD Protein-Marker (peqlab, Erlangen) verwendet.

Tabelle 7 Elektrophoreseprogramm für die SDS Page

0,6h mit 11 mA pro Gel (Sammelgel)
1,5h mit 20 mA pro Gel (Trenngel)

3.9 Westernblot

Die aufgetrennten Proteine wurden durch das *Semi-dry Blotting-Verfahren* auf Nitrozellulose-Membranen (Protran; Whatman, Dassel) übertragen. Dabei wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt (Elektrotransfer), wodurch die Proteine zur Anode und somit aus dem Gel auf die Membran wandern. Dabei bleibt das Muster der Auftrennung erhalten. Der Blot erfolgte bei 2mA/cm² über 45min. Der Transferpuffer enthielt 25mM Tris, 20% Methanol und 192mM Glycin. Um den Transfer auf die Membran zu dokumentieren, wurde diese mit Ponceau-S-Lösung (30% TCA; 1,18M 5-Sulfosalicylsäure; 26mM Ponceau S) gefärbt, fotografiert und anschließend in TBS/Tween (20mM Tris; 140mM NaCl; 0,05% Tween 20) gewaschen/entfärbt. Unspezifische Bindungsstellen wurden abgesättigt, indem die Membran für 60min in Blocking-Lösung (5% fettfreies Magermilchpulver in TBS/Tween) geschwenkt wurde. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C oder für 2h bei Raumtemperatur in TBS/Tween mit 5% BSA (Serva, Heidelberg). Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS/Tween wurde die Membran für 2h bei Raumtemperatur mit einem HRP (Meerrettichperoxidase)-gekoppelten

Sekundärantikörper inkubiert. Die folgende Tabelle zeigt alle im Westernblot verwendeten Antikörper (Tabelle 8).

Tabelle 8 Im Westernblot verwendete Primär-und Sekundärantikörper mit eingesetzter Verdünnung

Antikörper	Verdünnung	Firma
Kaninchen anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-p44/42 (ERK1/2)	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-p38	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen phosphoCREB	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen CREB	1:1000	Cell Signaling
Anti-COX2/Cyclooxygenase 2 antibody	1:1000	abcam
Ziegen anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	1:1000	Cell Signaling
Ziegen anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	1:20000	Rockland

Detektiert wurde mit Hilfe des *SERVA-ECL* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)-oder dem *Immun-Star WesternC* (Biorad, Hercules, CA, USA)-System. Die Detektion beruht auf der Oxidation von Luminol durch HRP unter alkalischen Bedingungen. Die Chemolumineszenz wurde mit dem *ChemiDocXRS-System* (Biorad, Hercules, CA, USA) detektiert und mittels der *QuantityOne-Software* (Biorad, Hercules, CA, USA) semi-quantitativ ausgewertet. Um eine Membran mit unterschiedlichen Antikörpern zu inkubieren, wurde bereits gebundener Antikörper entfernt, indem die Membran für 15min bei 50°C in 20ml *Stripping Buffer* inkubiert wurde und danach 3 mal für 10min in TBS/Tween gewaschen wurde. Anschließend folgte erneut die sechzigminütige Inkubation in Blocking-Lösung und anschließend die Inkubation mit Primärantikörper entsprechend des oben beschriebenen Protokolls.

3.10 TNF α -ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Zusätzlich zum Westernblot wurde das *Sandwich ELISA-Verfahren* genutzt, um Veränderungen in der Proteinbiosynthese aufgrund Azidose-induzierter Effekte nachzuweisen. Dabei wird eine Mikrotiterplatte mit einem Bindungsantikörper inkubiert, der an das nachfolgend aufgetragene Protein bindet. Es folgt die Inkubation mit einem Detektionsantikörper, der an einer anderen Stelle an das zu untersuchende Protein bindet. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Der Detektionsantikörper ist an ein Reporterenzym gekoppelt, welches bei Zugabe des entsprechenden Substrates zu einer Verfärbung führt, welche über photometrische Messungen quantitativ bestimmt werden kann. Zur Durchführung des Experimentes wurden Zellen für 3h in Ringerlösung und 24h in DMEM-Medium bei pH 7,4 und pH 6,6 inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium vollständig (4ml) entnommen und mit Säulchen (Centrifuge Filter Units, AMicon Ultra-10K, Millipore, Ireland) aufkonzentriert, indem es

15min bei 3600g zentrifugiert wurde. Die Zellen wurden lysiert und für die Bestimmung des Proteingehalts verwendet. Das aufkonzentrierte Medium wurde für das *Rat TNF α -ELISA Development* Kit (PreprTech, Hamburg) nach Angaben des Herstellers genutzt. Abschließend wurde die Farbentwicklung mit einem Plattenleser (Infinite Tecan) bei 405nm und 650nm über 50min dokumentiert und mit Hilfe einer Eichkurve kalibriert (Konzentrationen in pg/ml: 37,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000). Zur Normierung der Werte wurde für jede Probe der Gesamtprotein-Wert bestimmt.

3.11 Bestimmung des Proteingehalts

Die Zellen wurden mit Lysepuffer (0,1% Triton X-100 in PBS; 37mg/l Natriumorthovanadat; Proteasen-Inhibitor-Cocktail) aufgeschlossen und mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 12.000rpm und 4°C wurde das Pellet verworfen und der Überstand für die Messung des Proteingehalts nach der BCA (Bicinchoninsäure)-Methode verwendet. Diese beruht darauf, dass in alkalischem Milieu zweiwertige Kupferionen durch Proteine quantitativ zu einwertigen Kupferionen reduziert werden (Biuret-Reaktion). Zwei Moleküle Bicinchoninsäure reagieren mit diesem Cu^+ zu einer Komplexverbindung violetter Farbe, dessen Absorptionsmaximum bei 562nm liegt und photometrisch ausgewertet werden kann. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific BCA Pierce Protein Assay). Zur Kalibrierung der Messwerte wurde ein Eichreihe von BSA (*bovine serum albumin*)-Lösungen verschiedener Konzentrationen (100, 300, 500, 700 $\mu\text{g/ml}$ BSA) erstellt. Die photometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Plattenlesers (Infinite Tecan).

3.12 Statistische Analyse

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Tabellen-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel und der Statistik-und Graphik-Software SigmaPlot. Die Verteilung der Messdaten ist als arithmetischer Mittelwert plus Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der Vergleich von zwei Gruppen und der Vergleich mit einem theoretischen Mittelwert erfolgte mittels *Student's-t-Test*, wobei Werte von $\alpha < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen und mit einem „*“ gekennzeichnet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierung der MAP-Kinasen

Um den Einfluss von Azidose auf die zellulären Signalwege zu beleuchten, wurde die Aktivität bzw. die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 untersucht. Abbildung 9 stellt die relative Phosphorylierung von ERK1/2 im Bezug sowohl auf das Gesamtprotein, als auch auf die Kontrolle (pH 7,4) im zeitlichen Verlauf dar.

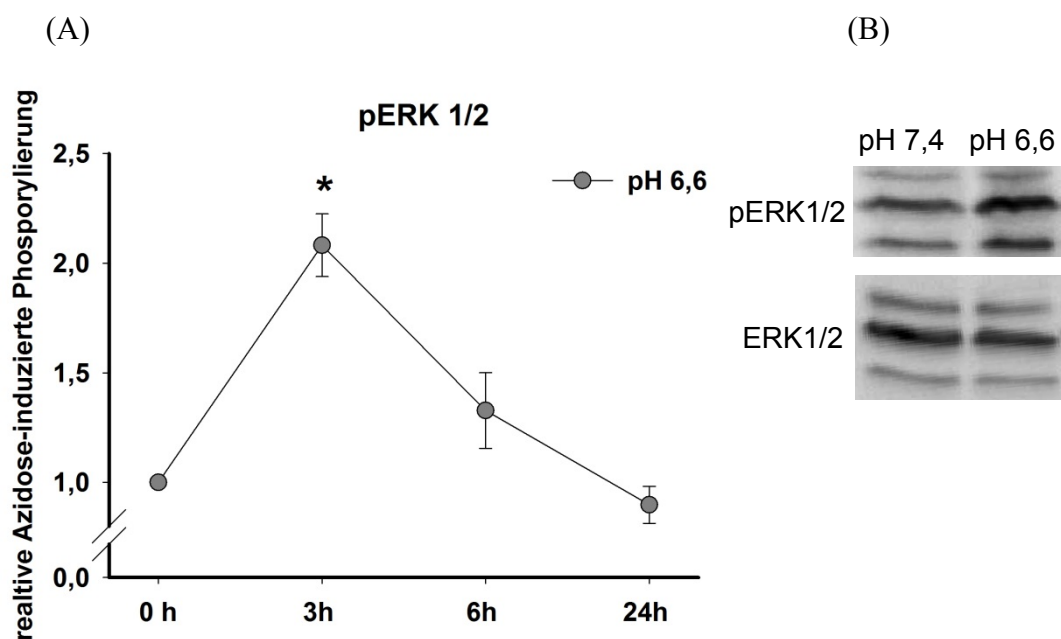


Abbildung 9 Zeitverlauf der Azidose-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2. (A) Semiquantitative Auswertung von Westernblots (n=4-5); Dargestellt ist die relative Phosphorylierung bezogen auf das Gesamtprotein, wobei die Kontrolle (pH 7,4) einem Wert von 1 entspricht. (B) Typischer Westernblot des gesamten und des phosphorylierten Proteins bei pH 7,4 und pH 6,6 nach 3h Inkubation.

Nach 3h im azidotischen Milieu kam es zu einer Verdopplung der ERK1/2-Phosphorylierung. Diese Steigerung war nach 6h und 24h nicht zu erkennen. Das Gesamtprotein blieb bei pH 6,6 unverändert. Der gleiche Zeitverlauf gilt für p38 (Abbildung 11). Auch hier zeigte sich nach 3h eine Verdopplung der p38-Phosphorylierung durch Azidose. Nach 6h und 24h zeigte sich keine gesteigerte Aktivität von p38.

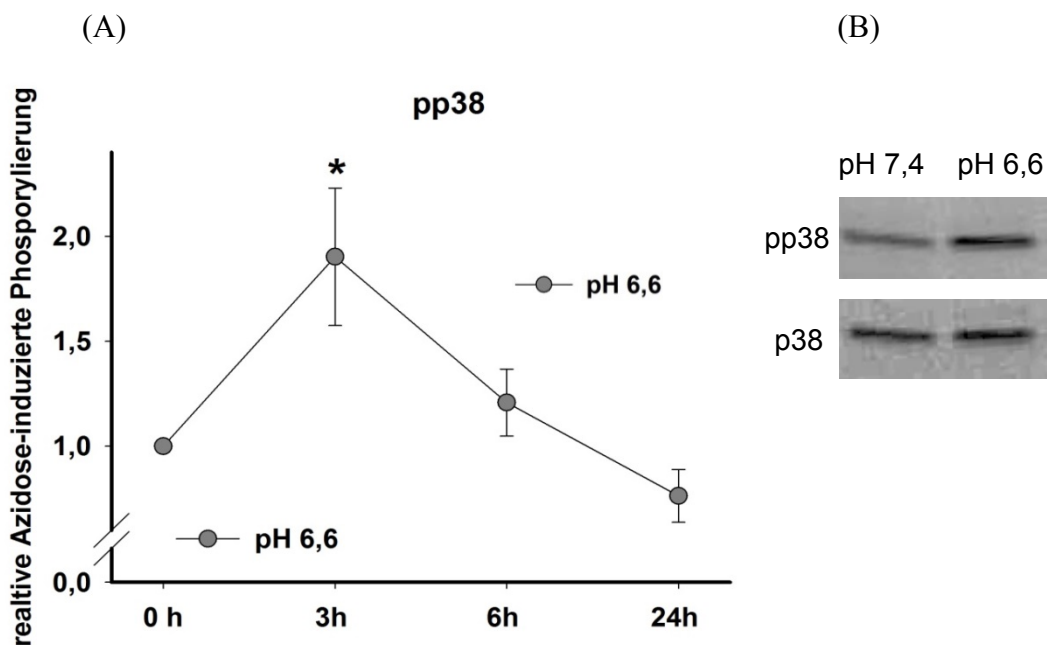


Abbildung 10 Zeitverlauf der Azidose-induzierten Phosphorylierung von p38. (A) Semiquantitative Auswertung von Westernblots (n=4-5); Dargestellt ist die relative Phosphorylierung bezogen auf das Gesamtprotein, wobei die Kontrolle (pH 7,4) einem Wert von 1 entspricht. (B) Typischer Westernblot des gesamten und des phosphorylierten Proteins bei pH 7,4 und pH 6,6 nach 3h Inkubation.

Azidose beeinflusst die Signaltransduktion in NRKF-Zellen nach 3h über die Steigerung der Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38. Daher wurde untersucht, ob Azidose auch die Genexpression in den NRKF-Zellen beeinflusst und ob dies durch die veränderte Signaltransduktion mit verursacht wird.

4.2 Einfluss von Azidose auf die Genexpression

Mittels Realtime-PCR wurde der Einfluss von Azidose auf die Expression von TNF α , COX-2, iNOS, MCP-1 und Osteopontin untersucht. Jedes dieser Gene besitzt proinflammatorische Effekte. Ermittelt wurden die auf 18S-rRNA (ribosomale RNA) normalisierten Cq-Werte von pH 7,4 vs. pH 6,6 ($\Delta\Delta Cq$ -Werte) gemeinsam mit der daraus resultierenden relativen Änderung der Genexpression. Um eine Aussage über die Beteiligung des MAP-Kinasen-Signalwegs an den Azidose-induzierten Effekten in der Genexpression oben genannter Gene treffen zu können, wurden diese mit spezifischen Inhibitoren gehemmt. Die ERK1/2-Aktivität wurde mittels U0126 inhibiert. U0126 hemmt die Kinaseaktivität von MEK1/2, eine MAPK-Kinase, die die Phosphorylierung von ERK1/2 steuert und verhindert somit die weitere Signaltransduktion. Die Inhibition von p38 erfolgte mittels SB203580, welches die katalytische Aktivität von p38 hemmt. Beide Inhibitoren wurden in DMSO gelöst (10 μ m), daher erfolgte stets eine Kontrolle ohne Inhibitoren mit DMSO (1:1000), um einen Eigeneffekt des DMSO auszuschließen. Die Eigeneffekte der Inhibitoren auf die Genexpression wurden zunächst unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) untersucht. Anschließend sollte ermittelt werden inwieweit der Azidose-induzierte Effekt auf die Genexpression der NRKF-Zellen von den MAP-Kinasen abhängt. Daher wurde auch bei pH 6,6 Inhibitoren-Versuche durchgeführt.

4.2.1 TNF α

Abbildung 11 zeigt den Zeitverlauf der Azidose-induzierten Genexpression von TNF α . Nach einer dreistündigen Inkubation bei pH 6,6 war eine signifikante Steigerung der TNF α -Transkription um das 3,98fache zu beobachten. Nach 6h war diese Steigerung der Genexpression nicht vorhanden, sondern verringert. Nach 24h bei pH 6,6 war im Trend ($\alpha=0,07$) ebenfalls eine leichte Abnahme der TNF α -Genexpression zu erkennen.

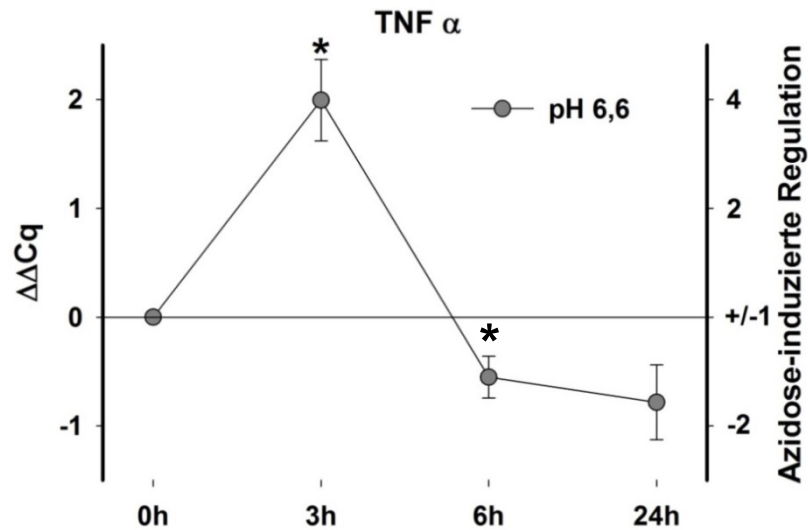


Abbildung 11 Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von $TNF \alpha$. Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 6,6 im Vergleich zu pH 7,4 nach 3h, 6h und 24h.

In Abbildung 12 ist der Eigeneffekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 auf die $TNF \alpha$ -Genexpression bei pH 7,4 dargestellt. Durch Hemmung der ERK1/2-Aktivierung durch U0126 zeigte sich eine signifikant verminderte $TNF \alpha$ -Transkription um das 3,7fache. Dies lässt auf eine ERK1/2-abhängige $TNF \alpha$ -Transkription unter physiologischen Bedingungen schließen. Die Hemmung der p38-Aktivität mittels SB203580 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die $TNF \alpha$ -Expression bei pH 7,4. Diese ist damit unabhängig von p38. Bei der gleichzeitigen Hemmung beider MAP-Kinasen (n=7-8) war keine additive Verminderung der $TNF \alpha$ -Genexpression zu verzeichnen.

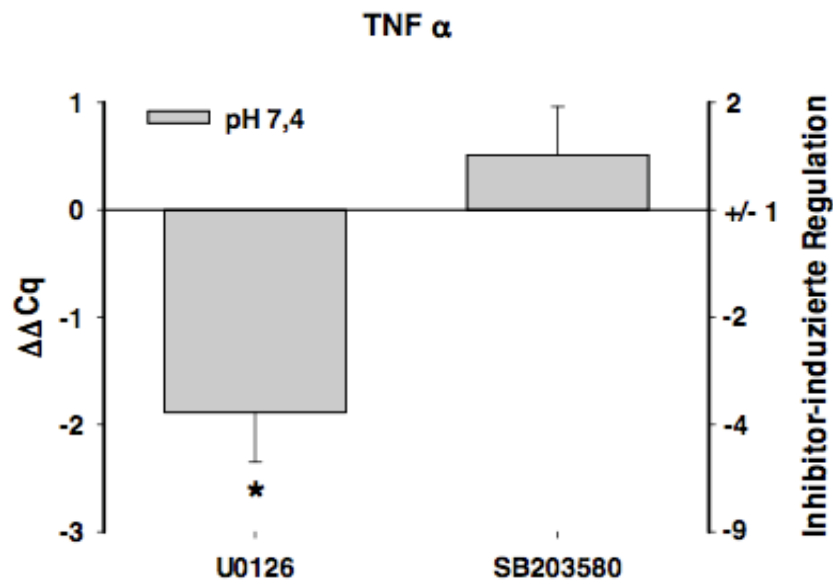


Abbildung 12 *TNF α -Genexpression bei pH 7,4 ist abhängig von ERK1/2.* Eigeneffekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 7,4, Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 7,4 nach 3h Inkubation mit Inhibitor im Vergleich zur Kontrolle (3h bei pH 7,4 mit DMSO, entspricht einem Wert von 0).

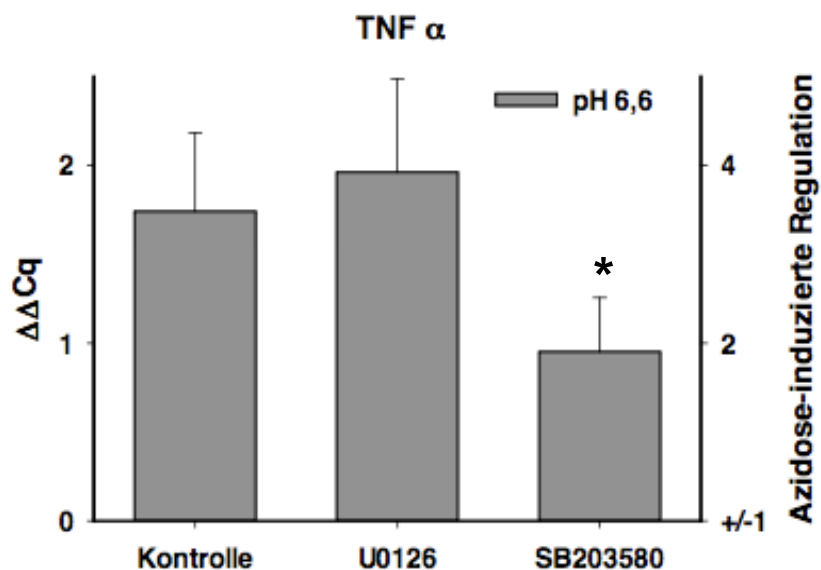


Abbildung 13 *TNF α -Genexpression bei Azidose unabhängig von ERK1/2 und abhängig von p38.* Effekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 6,6, Realtime-PCR (n=7-8) Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte nach 3h Inkubation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO oder dem entsprechenden Inhibitor).

Abbildung 13 zeigt die Azidose-induzierte Veränderung der TNF α -Genexpression mit und ohne den Einsatz von Inhibitoren. Der hier als „Kontrolle“ benannte Wert bezeichnet den Azidose-induzierten Effekt ohne Beigabe eines Inhibitors. Allerdings wurde hier DMSO als Lösungsmittel der Inhibitoren beigegeben, um einen eventuellen Eigeneffekt auszuschließen.

Das Ergebnis belief sich hierbei auf eine 3,35fache Erhöhung der TNF α -Genexpression. Bei Zugabe von U0126 unter azidotischen Bedingungen war eine signifikante Steigerung der TNF α -Transkription um das 3,9fache zu beobachten. Der Effekt unterschied sich nicht signifikant vom DMSO-Kontrollwert. Obwohl die TNF α -Transkription bei pH 7,4 eine gewisse ERK1/2-Abhängigkeit zeigte, schien dies bei Azidose also nicht der Fall zu sein. Die ERK1/2-Hemmung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Azidose-induzierte Steigerung der TNF α -Genexpression. Die Hemmung von p38 verminderte die Azidose-induzierte Steigerung der TNF α -Transkription signifikant. Diese blieb jedoch trotzdem noch deutlich (1,94fach) über dem basalen (pH 7,4) Niveau, sodass auf eine teilweise Beteiligung von p38 an der Azidose-induzierten Steigerung der TNF α -Transkription geschlossen werden kann. Um die Azidose-induzierte Steigerung der TNF α -Genexpression auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde ein TNF α -ELISA durchgeführt. Die Mengen an TNF α im Medium waren jedoch zu gering, um mit Hilfe dieses Verfahrens eindeutige Aussagen über Effekte auf die Biosynthese von TNF α treffen zu können.

Azidose steigert die Genexpression von TNF α . Diese ist bei pH 7,4 abhängig vom ERK1/2 Signalweg und unabhängig von p38. Die durch Azidose induzierte Steigerung ist abhängig von p38.

4.2.2 COX-2

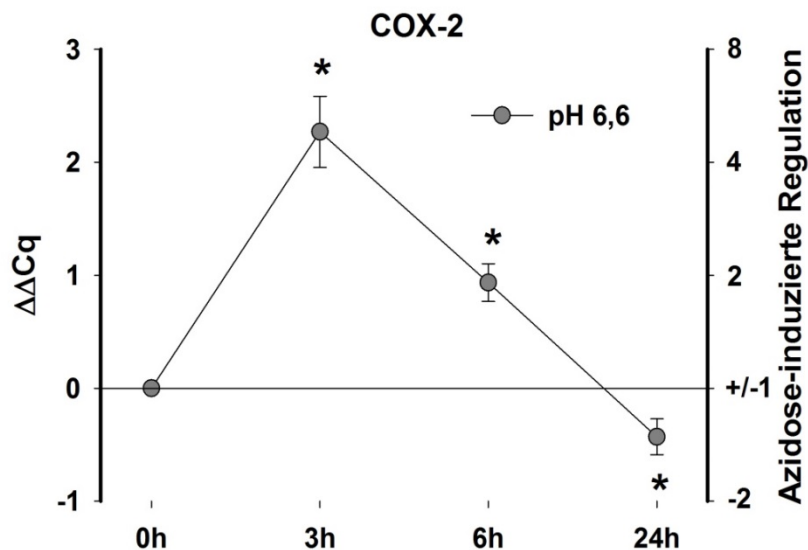


Abbildung 14 Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von COX-2. Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 6,6 im Vergleich zu pH 7,4 nach 3h, 6h und 24h.

Abbildung 14 zeigt den zeitlichen Verlauf der Azidose-induzierten Regulation der COX-2-Transkription. Nach einer 3stündigen Inkubation kam es zu einer signifikanten Steigerung der Transkription um das 4,83fache. Nach 6h war eine geringere Steigerung der

Transkription um das 1,91fache zu erkennen. Nach 24h Inkubation der Zellen bei pH 6,6 nahm die COX-2-Transkription ab (1,3fach). In Abbildung 15 ist der Eigeneffekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) dargestellt. Bei der Hemmung von ERK1/2 durch die Zugabe von U0126 zeigte sich keine signifikante Änderung der COX-2-Genexpression, sodass von einer ERK1/2-unabhängigen Transkription ausgegangen werden konnte. Die Hemmung von p38 durch die Zugabe von SB203580 brachte ebenfalls keine Veränderung der mRNA-Menge von COX-2. Daher wurde auch hier von einer p38-unabhängigen Genexpression unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) ausgegangen. Die Hemmung beider MAP-Kinasen gleichzeitig (n=7-8) verminderte die Menge an COX-2-mRNA signifikant (-2,3fach, $\alpha = 0,02$).

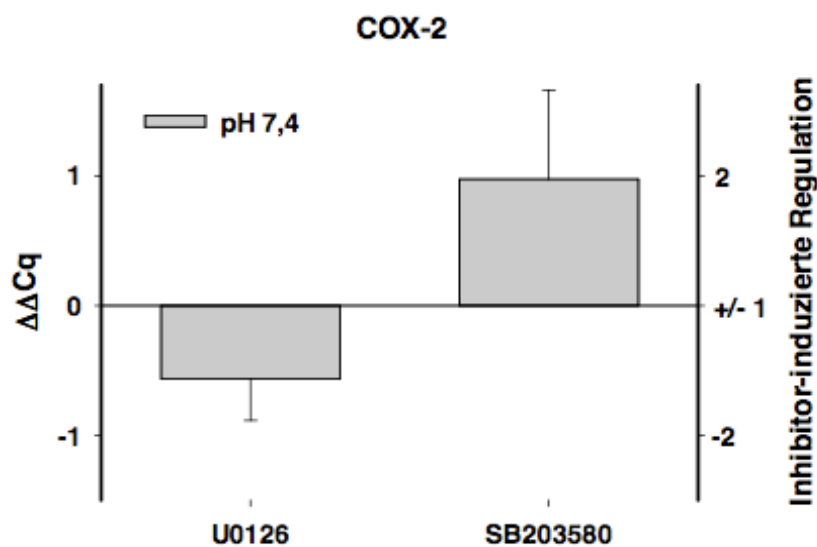


Abbildung 15 *COX-2-Genexpression bei pH 7,4 unabhängig von ERK1/2 und p38*. Eigeneffekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 7,4. Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 7,4 nach 3h Inkubation mit Inhibitor im Vergleich zur Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO, entspricht einem Wert von 0).

In Abbildung 16 sind die Effekte der Inhibitoren auf die Azidose-induzierte COX-2-Genexpression dargestellt. Die Kontrolle zeigte eine 4fache Steigerung der COX-2-Transkription bei pH 6,6 im Vergleich zu pH 7,4. Die ERK1/2-Hemmung mittels U0126 bei pH 6,6 beeinflusste die COX-2-Genexpression nicht signifikant. Diese blieb weiterhin deutlich gesteigert im Vergleich zu pH 7,4. Die unter Azidose gesteigerte mRNA-Menge an COX-2 ist somit nicht ERK1/2-induziert. Bei Zugabe von SB203580 und damit der Hemmung von p38 war kein signifikanter Azidose-induzierter Effekt auf die COX-2-Genexpression mehr zu beobachten. Die Menge an COX-2-mRNA war in Bezug auf die Kontrolle ohne Inhibitor bei pH 6,6 also deutlich geringer. Die Hemmung von p38 verminderte signifikant die Azidose-vermittelte Steigerung der COX-2-Genexpression, sodass auf einen p38-vermittelten Azidoseeffekt geschlossen wurde.

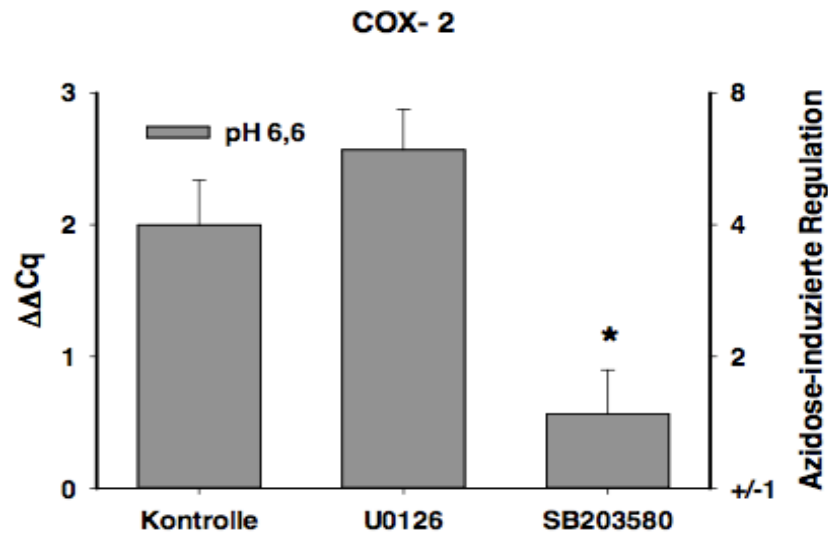


Abbildung 16 *COX-2-Genexpression bei Azidose unabhängig von ERK1/2 und abhängig von p38.* Effekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 6,6. Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte nach 3h Inkubation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO oder dem entsprechenden Inhibitor).

Um den Effekt von Azidose auf die COX-2-Expression auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden Westernblots durchgeführt.

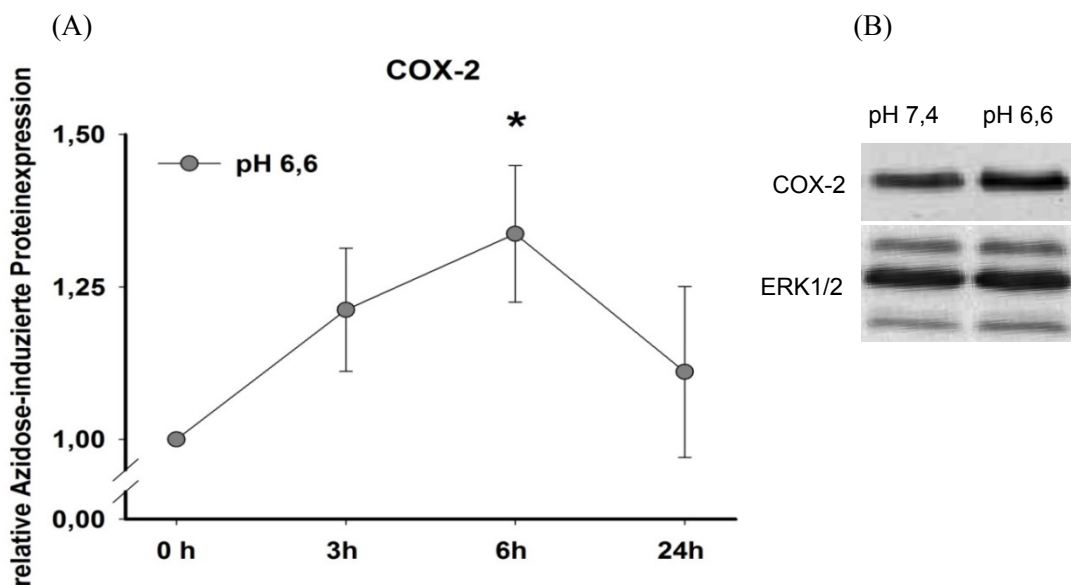


Abbildung 17 *Zeitverlauf der Azidose-induzierten Proteinexpression von COX-2.* (A) semiquantitative Auswertung von Westernblots (n=6-7); relative Proteinexpression bezogen auf ERK1/2 als Beladungskontrolle; pH 7,4 entspricht einem Wert von 1 (B) Typischer Westernblot des Gesamtproteins bei pH 7,4 und pH 6,6 nach 6h Inkubation (Gesamtprotein ERK1/2 als Beladungskontrolle).

Abbildung 17 zeigt den Zeitverlauf der Azidose-induzierten Proteinexpression von COX-2 in NRKF-Zellen. Bereits nach 3h Stunden war eine tendenzielle ($\alpha = 0,057$) Steigerung der COX-2-Expression zu erkennen (1,21fache). Dieser Effekt verstärkte sich. Nach 6h war eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression um das 1,34fache zu beobachten. Bei 24h unter

Azidose zeigte sich in Übereinstimmung mit der bereits wieder verminderten Menge an COX-2-mRNA keine gesteigerte COX-2-Expression. Um das „Gedächtnis“ des Effekts auch nach Abklingen der Azidose zu untersuchen, wurde bei den Zellen nach einer sechsstündigen Inkubation bei pH 6,6 ein Mediumwechsel auf pH 7,4 durchgeführt. Nach 3h wurde erneut die Proteinexpression im Westernblot bestimmt.

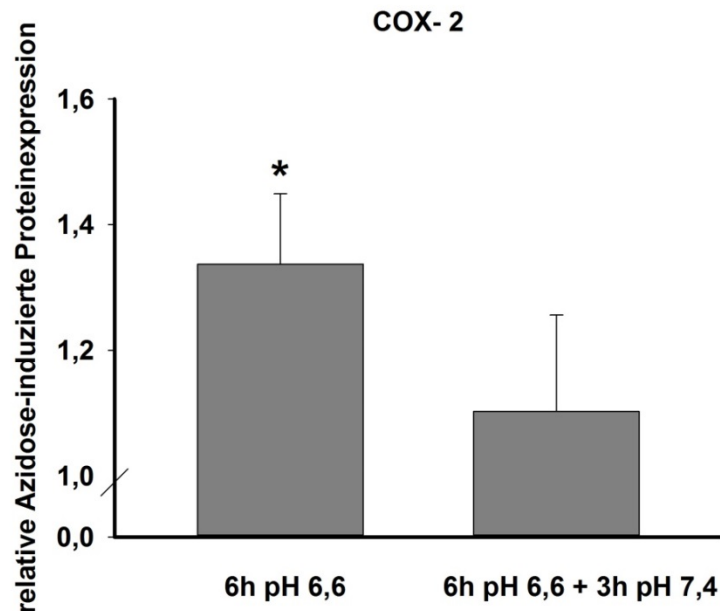


Abbildung 18 „Gedächtnis“ der relativen Steigerung der Proteinexpression von COX-2 nach Abklingen der Azidose. Dargestellt ist die Proteinexpression von COX-2 nach 6h bei pH 6,6 und nach 6h pH 6,6+3h pH 7,4 im Vergleich zu physiologischen Bedingungen (Kontrolle pH 7,4; entspricht einem Wert von 1); semiquantitative Auswertung von Westernblots (n=6-7).

Abbildung 18 zeigt, inwieweit der Azidose-induzierte Effekt auf die Proteinexpression von COX-2 auch nach der Rückkehr zu physiologischen Bedingungen bestehen blieb. Die durch Azidose induzierte signifikante Steigerung der COX-2-Expression (nach 6h bei pH 6,6) war nicht mehr zu beobachten, nachdem die Zellen nach einer sechsstündigen Azidose für 3h wieder bei pH 7,4 inkubiert wurden. Es besteht daher kein „Gedächtnis“ der NRKF-Zellen bezüglich des Azidoseeffekts auf die COX-2-Proteinexpression.

Die COX-2-Genexpression ist bei pH 7,4 unabhängig von den beiden MAP-Kinasen. Azidose führt zu einer p38-vermittelten Steigerung der Genexpression. Auch die Proteinexpression von COX-2 ist durch Azidose erhöht.

4.2.3 iNOS

Abbildung 19 zeigt den Zeitverlauf der iNOS-Genexpression bei Azidose. Diese war nach einer dreistündigen Inkubation der NRKF-Zellen bei pH 6,6 signifikant erhöht (2,17fach). Nach 6h bei Azidose zeigte sich noch die doppelte mRNA-Menge an iNOS im Vergleich zur Menge bei

pH 7,4. Nach 24h war kein Effekt zu sehen. In Abbildung 20 ist der Eigeneffekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 unter physiologischen Bedingungen auf die iNOS-Genexpression dargestellt. Da weder die Hemmung von ERK1/2 durch U0126, noch die Hemmung von p38 mittels SB203580 die Genexpression von iNOS signifikant beeinflussten, ist diese bei pH 7,4 unabhängig von den beiden MAP-Kinasen. Bei gleichzeitiger Zugabe beider Inhibitoren zeigte sich allerdings eine signifikant verminderte iNOS-Genexpression (-3fach; n=6, $\alpha=0,01$).

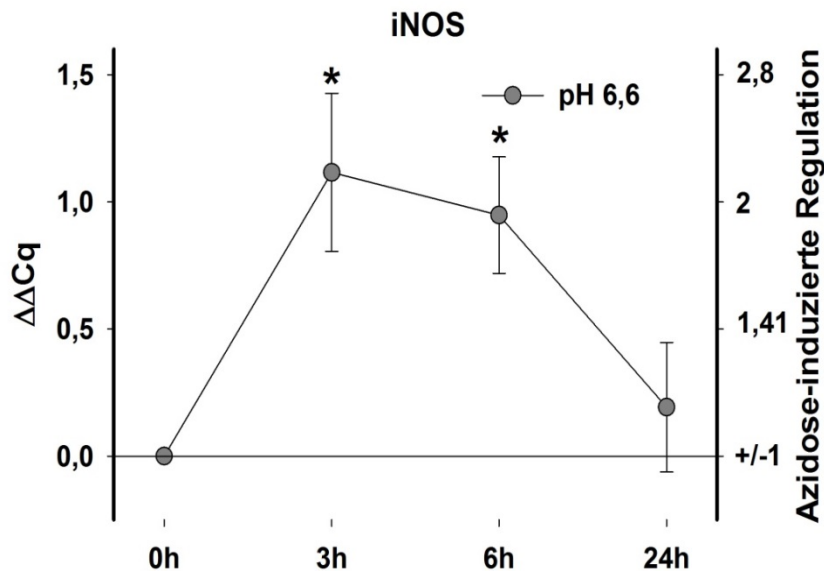


Abbildung 19 Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von iNOS. Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 6,6 im Vergleich zu pH 7,4 nach 3h, 6h und 24h.

Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) ist die iNOS-Genexpression unabhängig von den MAP-Kinasen ERK1/2 oder p38. Allerdings zeigte sich nach 3h Inkubation der NRKF-Zellen unter Azidose, dass sowohl die Aktivität der MAP-Kinasen, als auch die iNOS-Genexpression zunahm. Daher wurde untersucht, ob bei Azidose (pH 6,6) eine Abhängigkeit der beiden Effekte voneinander besteht. Dafür wurden die NRKF-Zellen für 3h bei pH 6,6 unter Zugabe der jeweiligen Inhibitoren U0126 und SB203580 für die Hemmung der MAP-Kinasen inkubiert. Abbildung 21 zeigt, dass sich die iNOS-Genexpression nach 3h bei Azidose verdoppelt hat. Die Hemmung der MAP-Kinase ERK1/2 durch U0126 bei Azidose veränderte die iNOS-Genexpression nicht. Durch Inhibition von p38 mittels SB203580 wurde die iNOS-Genexpression signifikant gehemmt. Die Verdopplung der iNOS-mRNA-Menge unter azidotischen Bedingungen ist folglich durch die MAP-Kinase p38 vermittelt.

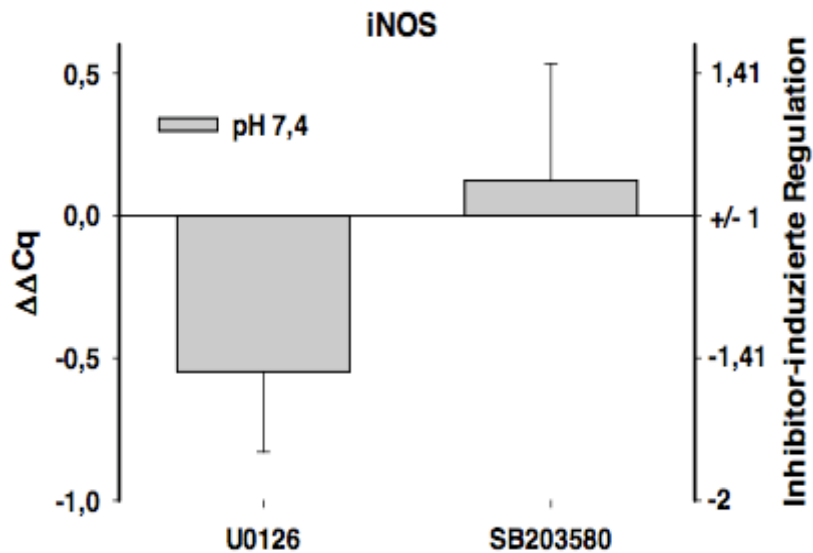


Abbildung 20 *iNOS*-Genexpression bei pH 7,4 ist unabhängig von *ERK1/2* und *p38*. Eigeneffekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 7,4. Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 7,4 nach 3h Inkubation im Vergleich zur Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO, entspricht einem Wert von 0).

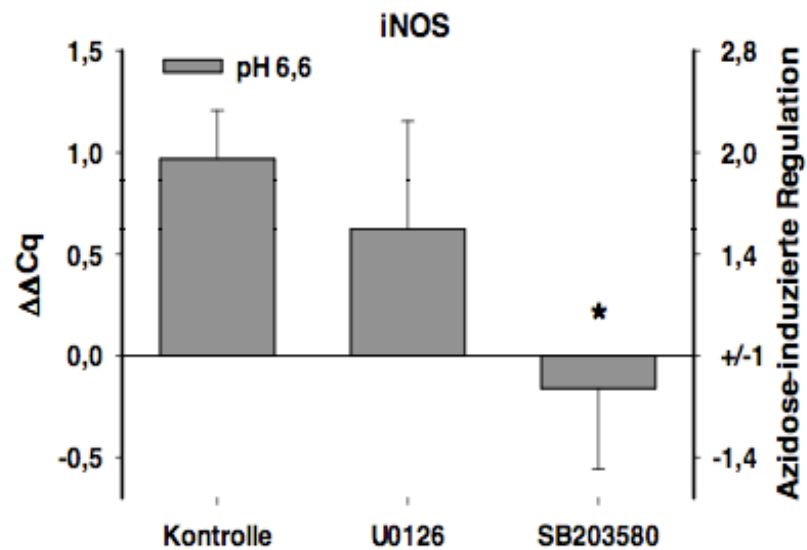


Abbildung 21 *iNOS*-Genexpression bei Azidose unabhängig von *ERK1/2* und abhängig von *p38*. Effekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 6,6. Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte nach 3h Inkubation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO oder dem entsprechenden Inhibitor).

Azidose führt zu einer kurzfristigen (3h) Erhöhung der *iNOS*-Genexpression. Dieser Effekt ist *p38*-vermittelt. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) ist die *iNOS*-Genexpression unabhängig von *ERK1/2* und *p38*.

4.2.4 MCP-1

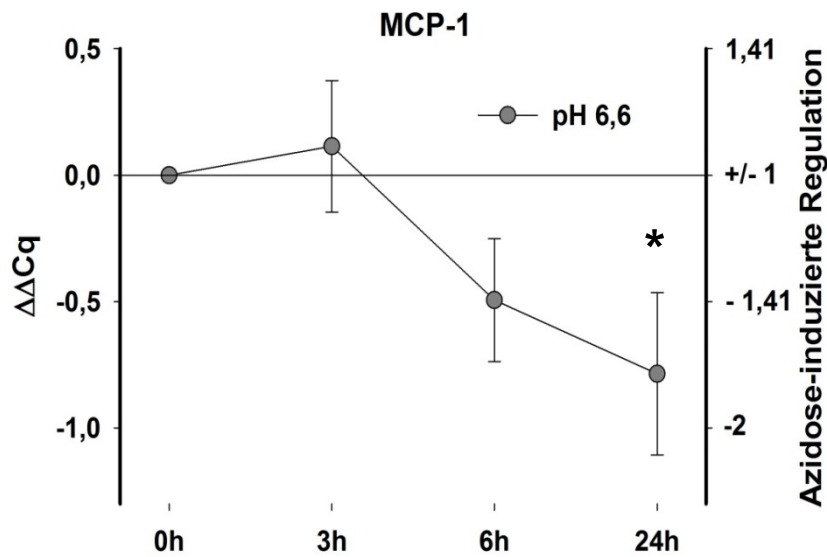


Abbildung 22 Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von MCP-1. Realtime-PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 6,6 im Vergleich zu pH 7,4 nach 3h, 6h und 24h.

In Abbildung 22 ist die Genexpression von MCP-1 bei Azidose in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Nach dreistündiger Inkubation der NRKF-Zellen bei pH 6,6 war keine Veränderung der MCP-1-Transkription zu beobachten. Nach 6h zeigte sie sich tendenziell ($\alpha=0,1$) vermindert. Nach 24h unter azidotischen Bedingungen war die Genexpression von MCP-1 signifikant verringert.

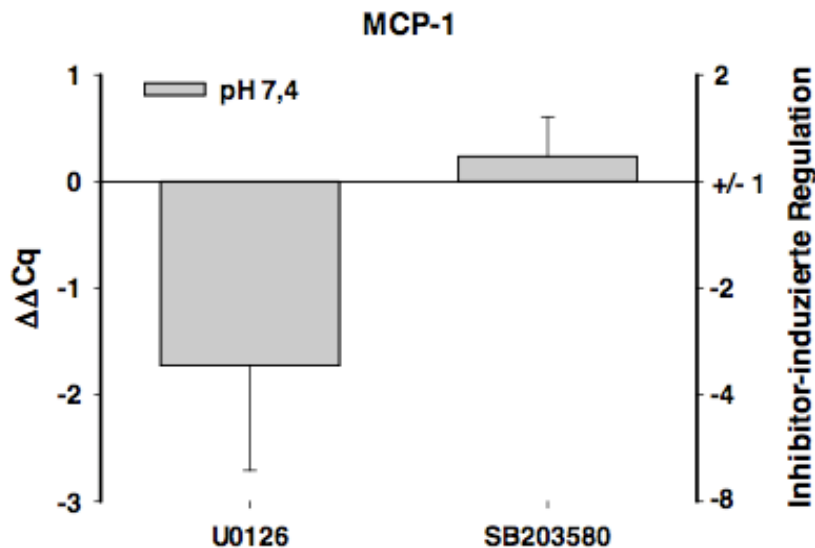


Abbildung 23 MCP-1-Genexpression bei pH 7,4 unabhängig von ERK1/2 und p38. Eigeneffekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 7,4. Realtime PCR (n=7-8); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 7,4 nach 3h Inkubation im Vergleich zur Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO, entspricht einem Wert von 0).

Die Abhängigkeit der MCP-1-Genexpression von den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 bei pH 7,4 ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Zugabe von U0126 verminderte tendenziell ($\alpha=0,07$) die Menge an MCP-1-mRNA, was auf eine Beteiligung von ERK1/2 an der basalen Genexpression von MCP-1 (bei pH 7,4) schließen lassen könnte. Die Hemmung von p38 mittels SB203580 führte zu keinem signifikanten Effekt auf die MCP-1-Transkription. Diese ist damit unabhängig von p38. Wurden beide MAP-Kinasen gleichzeitig inhibiert, zeigte sich eine signifikant verminderte MCP-1-Expression (-3fach, $n=6$, $\alpha=0,02$).

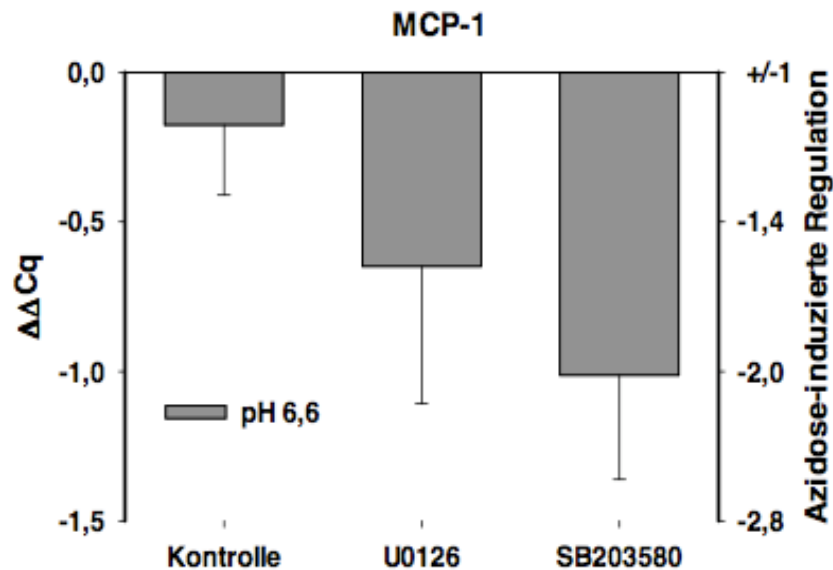


Abbildung 24 MCP-1-Genexpression bei Azidose hängt nicht von ERK1/2 oder p38 ab. Effekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 6,6. Realtime-PCR ($n=7-8$); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte nach 3h Inkubation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO oder dem entsprechenden Inhibitor).

Abbildung 24 stellt die Genexpression von MCP-1 bei Azidose unter Zugabe von Inhibitoren dar. Untersucht wurde die Abhängigkeit der Genexpression von den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38. Die Zugabe der Inhibitoren unter azidotischen Bedingungen hatte keinen Effekt auf die MCP-1-Genexpression. Die Hemmung von ERK1/2 mittels U0126 führte nicht zu einer signifikanten Änderung der Genexpression, ebenso die Hemmung von p38 mittels SB203580.

Die Genexpression von MCP-1 ist bei pH 7,4 tendenziell abhängig von der MAP-Kinase ERK1/2. Unter azidotischen Bedingungen ist dies nicht der Fall. Die Inkubation der NRKF-Zellen bei pH 6,6 führte nach 24h zu einer verminderten MCP-1-Genexpression.

4.2.5 Osteopontin

Abbildung 25 zeigt den Einfluss von Azidose auf die Osteopontin-Genexpression im zeitlichen Verlauf. Nach 3h und 6h Inkubation der NRKF-Zellen bei pH 6,6 war kein signifikanter Effekt

auf die Transkription von Osteopontin zu beobachten. Nach 24h unter azidotischen Konditionen verminderte sich die Osteopontin-Genexpression um das 1,7fache.

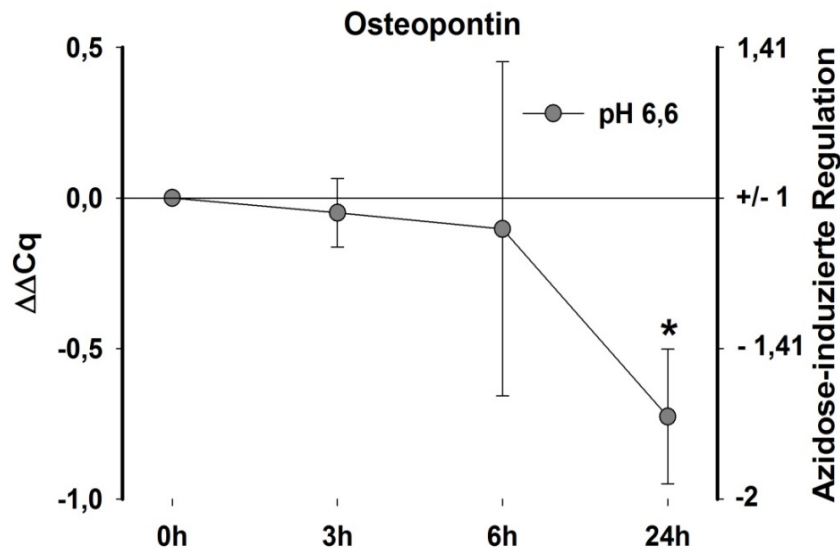


Abbildung 25 Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von Osteopontin. Realtime-PCR (n=4-5); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 6,6 im Vergleich zu pH 7,4 nach 3h, 6h und 24h.

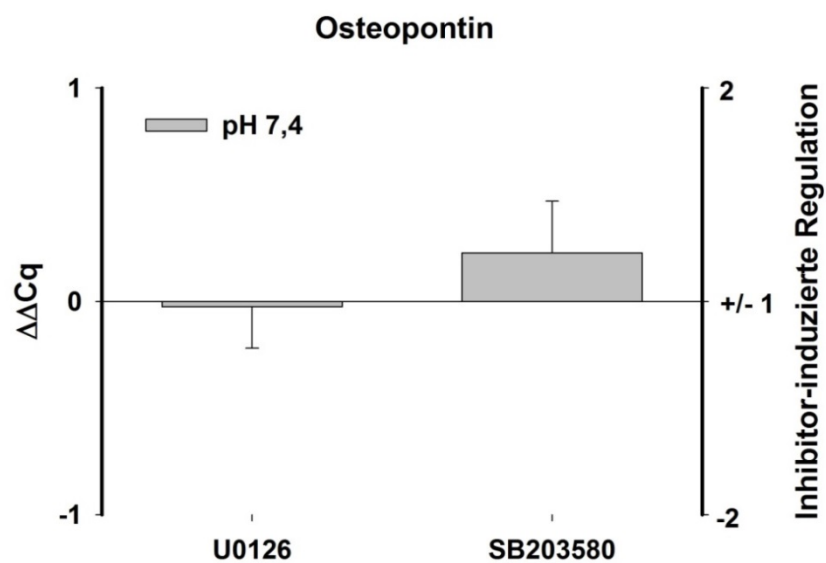


Abbildung 26 Osteopontin-Genexpression bei pH 7,4 ist unabhängig von ERK1/2 und p38. Eigeneffekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 7,4. Realtime-PCR (n=3); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte bei pH 7,4 nach 3h Inkubation im Vergleich zur Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO, entspricht einem Wert von 0).

Abbildung 26 zeigt die Unabhängigkeit der Osteopontin-Expression von den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 unter physiologischen Bedingungen. Weder die Inhibition von ERK1/2 noch von p38 bei pH 7,4 veränderte die Genexpression von Osteopontin signifikant. Die gleichzeitige

Hemmung beider MAP-Kinasen führte zu einer leichten Verminderung der Osteopontin-mRNA-Menge (-0,3fach, $n=5$, $\alpha=0,27$). Die Osteopontin-Genexpression in Abhängigkeit von ERK1/2 und p38 bei Azidose zeigt Abbildung 27. Nach dreistündiger Inkubation der Zellen bei pH 6,6 unter Zugabe von U0126 zur Hemmung von ERK1/2 war keine signifikant veränderte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor zu erkennen. Das Gleiche gilt für die Inhibition von p38 mittels SB203580.

Osteopontin ist unter physiologischen Bedingungen und azidotischen Bedingungen unabhängig von ERK1/2 und p38. Azidose führt nach 24h zu einer verminderten Osteopontin-Genexpression.

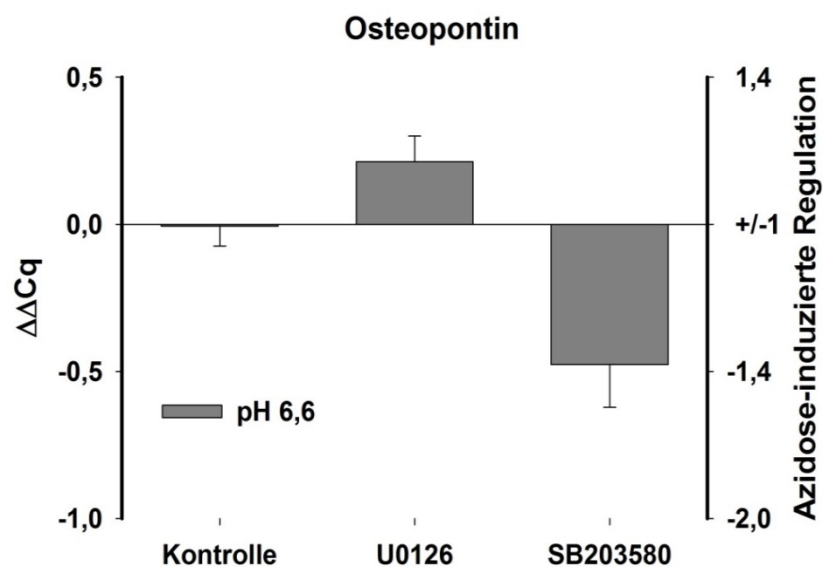


Abbildung 27 *Osteopontin-Genexpression bei Azidose ist unabhängig von ERK1/2 und p38.* Effekt der Inhibitoren U0126 und SB203580 bei pH 6,6. Realtime-PCR ($n=3$); Dargestellt sind die $\Delta\Delta Cq$ -Werte nach 3h Inkubation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (3h Inkubation bei pH 7,4 mit DMSO oder dem entsprechenden Inhibitor).

4.2.6 Transkriptionsfaktor CREB

Einiger der untersuchten Mediatoren zeigten sich von ERK1/2 und p38 unabhängig, daher wurde CREB als weiterer Signalweg beleuchtet. CREB ist als Protoonkogen an der Entstehung, Progression und Metastasierung von Tumoren beteiligt. (Xiao et al., 2010). Es wurde untersucht, ob ein azidotisches Milieu einen Effekt auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung von CREB hat. Abbildung 28 präsentiert die Azidose-induzierte Phosphorylierung von CREB im zeitlichen Verlauf. Nachdem die NRKF-Zellen 3h bei Azidose inkubiert wurden, kam es zu einer signifikanten Steigerung der CREB-Phosphorylierung (1,5fach). Dieser Effekt war nach einer 6stündigen Inkubation ebenfalls zu erkennen. Nach 24h zeigte sich kein Azidose-induzierter Effekt auf die Phosphorylierung von CREB mehr. Abbildung 29

veranschaulicht das Abklingen der durch Azidose induzierten Steigerung der CREB-Phosphorylierung nach Schwenden der Azidose. Dazu wurden die Zellen zunächst 6h bei pH 6,6 und anschließend für 3h in physiologischem Milieu (pH 7,4) inkubiert. Die Phosphorylierung von CREB war danach signifikant geringer, der Azidose-induzierte Effekt also bereits wieder abgeklungen.

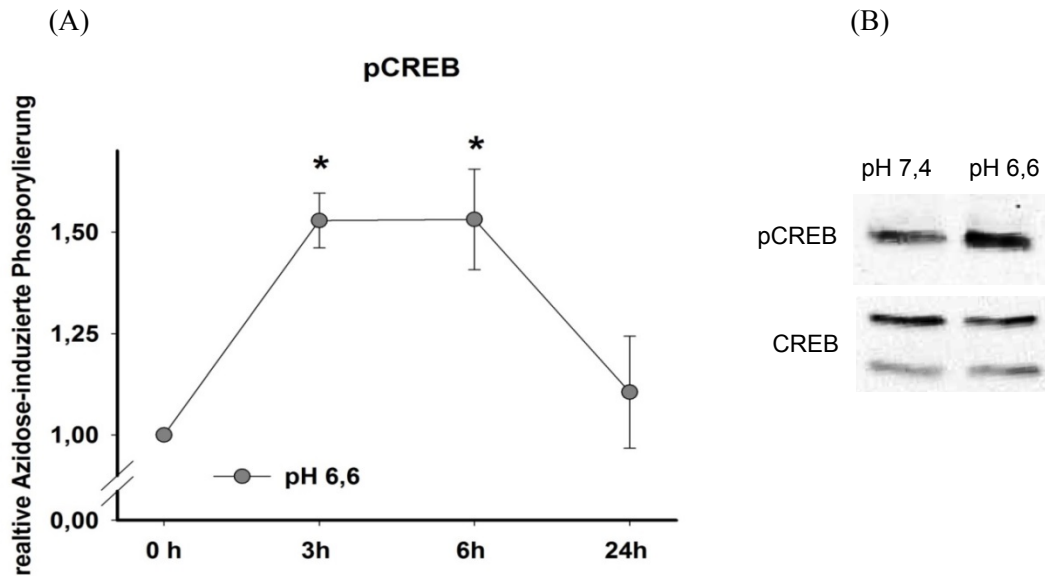


Abbildung 28 Zeitverlauf der Azidose-induzierten Phosphorylierung von CREB. (A) Semiquantitative Auswertung von Westernblots (n=4-5); Dargestellt ist die relative Phosphorylierung bezogen auf das Gesamtprotein, wobei die Kontrolle (pH 7,4) einem Wert von 1 entspricht. (B) Typischer Westernblot des gesamten und des phosphorylierten Proteins bei pH 7,4 und pH 6,6 nach 3h Inkubation.

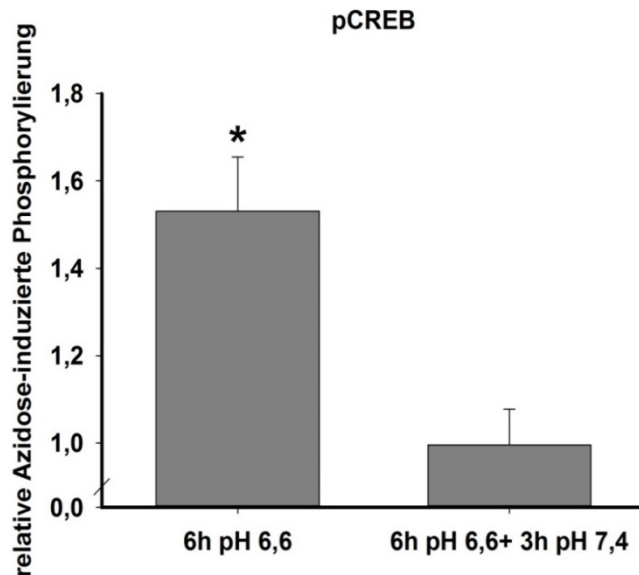


Abbildung 29 „Gedächtnis“ der relativen Steigerung der Phosphorylierung von CREB nach Abklingen der Azidose. Dargestellt ist die Phosphorylierung von CREB nach 6h bei pH 6,6 und nach 6h pH 6,6+ 3h pH 7,4 im Vergleich zu physiologischen Bedingungen (Kontrolle pH 7,4 entspricht einem Wert von 1); semiquantitative Auswertung von Westernblots (n=4-5).

5 Diskussion

5.1 Azidose aktiviert die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38

In den letzten Jahren der Krebsforschung wurde deutlich, dass die Mikroumgebung von Krebszellen einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung und Progression der Tumorerkrankung hat (Tlsty, 2008). Ein saures extrazelluläres Milieu, welches z.B. durch eine unzureichende Sauerstoffversorgung des Gewebes und den damit verbundenen Wechsel auf einen glykolytischen Stoffwechsel entsteht, ist ein wichtiger Parameter des lokalen Tumormikromilieus. Diesem Mikromilieu sind sowohl die Tumorzellen, als auch die Zellen der unmittelbaren Umgebung (Tumor-assoziierte Fibroblasten) ausgesetzt. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss eine extrazelluläre Azidose auf den MAP-Kinasen-Signalweg in Fibroblasten hat. Es wurde gezeigt, dass ein extrazellulärer pH-Wert von 6,6 in NRKF-Zellen eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 auslöst (Abbildung 9, Abbildung 10). Ein extrazellulärer pH Wert von 6,6 wurde im interstitiellen Gewebe sowohl bei entzündlichen Erkrankungen (Dong et al., 2013), als auch in soliden Tumoren (Vaupel et al., 1989) bereits gemessen und wurde deshalb für die vorliegenden Arbeit verwendet. Der MAP-Kinasen-Signalweg ist dafür bekannt, an der Zellantwort auf verschiedene Stressstimuli beteiligt zu sein (Cuenda & Rousseau, 2007). In zahlreichen Studien ist die MAP-Kinasen-Aktivierung unter pathologischen Bedingungen, (Entzündung, Ischämie, solide Tumoren) bereits beschrieben. So wird der MAP-Kinasen-Signalweg in den meisten Krebszellarten verstärkt aktiviert (Dhillon, Hagan, Rath, & Kolch, 2007), myocardiale Ischämie führt zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen in Kardiomyozyten (Armstrong, 2004) und beim Ischämie-Reperfusionssyndrom der Leber werden in verschiedenen Zellen des Immunsystems MAP-Kinasen verstärkt aktiviert (Abu-Amara et al., 2010). Darüber hinaus sind sie an der Pathogenese mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen wie Amyotrophe Lateralsklerose oder dem Parkinson-Syndrom (Kim & Choi, 2010) oder chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Thalhamer et al., 2008) beteiligt. In Fibroblasten wurde eine durch Azidose induzierte gesteigerte Aktivität von ERK1/2 und p38 vor dieser Arbeit nicht beschrieben. Allerdings wurde eine vermehrte MAP-Kinasen-Aktivität in Fibroblasten verursacht durch Hypoxie, einem anderen Parameter des pathologischen Tumormikromilieus, bereits nachgewiesen (Welsh, Peacock, MacLean, & Harnett, 2001). Navab et al. analysierten das Genexpressionsmuster der CAFs im Vergleich zu normalen Fibroblasten und identifizierten 46 Gene, die unterschiedlich exprimiert wurden. Dazu gehörten u.a. jene Gene, die für Proteine der MAP-Kinasen-Signalwege kodieren (Navab et al., 2011). Aktuelle Studien befassen sich mehr und mehr mit der Funktion der Tumor-assoziierten Fibroblasten, die dem

Tumormikromilieu ausgesetzt sind und eine wichtige Rolle bei der Tumorinitiation und Progression spielen (Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004).

5.2 Azidose aktiviert inflammatorische Programme in Fibroblasten

5.2.1 Azidose erhöht die TNF α -Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, wie extrazelluläre Azidose die Expression von TNF α , einem proinflammatorischen Zytokin, in Fibroblasten beeinflusst. Nach 3h bei pH 6,6 zeigte sich eine gesteigerte TNF α -Genexpression, nach 6h sank diese bis unterhalb des Kontrolllevels (Abbildung 11). Riemann et. al. untersuchten die Änderung der Proteinexpression von TNF α . Diese war nach 3h Azidose ebenfalls erhöht (Riemann et al., 2015). Ein wechselnder extrazellulärer pH-Wert, welcher in pathologischen Mikromilieus häufig zu finden ist, hat also direkten Einfluss auf die TNF α -Expression der Fibroblasten. Bei einer längerfristigen Azidose (24h) zeigten die Fibroblasten die Tendenz zu verminderter TNF α -Bildung, was möglicherweise einen immunsuppressiven Effekt verursachen könnte. Zusätzlich wurde untersucht inwieweit die Änderung der TNF α -Expression von den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 abhängig ist. Die basale TNF α -Expression ist unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) abhängig von der MAP-Kinase ERK1/2 (Abbildung 12). Die ERK1/2-Aktivität ist unter azidotischen Bedingungen erhöht. Dies ließe vermuten, dass verstärkt aktives ERK1/2 bei pH 6,6 die Ursache für die vermehrte TNF α -Expression bei pH 6,6 ist. Allerdings war dies nicht der Fall, denn auch wenn ERK1/2 durch U0126 in den Fibroblasten bei pH 6,6 gehemmt wurde, blieb die TNF α -Expression trotzdem erhöht und damit unabhängig von ERK1/2. Daher muss die vermehrte Bildung von TNF α unter azidotischen Bedingungen über einen anderen Signalweg vermittelt werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Abhängigkeit der TNF α -Expression von p38 untersucht. Die basale TNF α -Expression bei pH 7,4 ist p38-unabhängig. Unter azidotischen Bedingungen jedoch zeigte sich, dass eine Hemmung von p38 zu einer Minderung der durch Azidose-induzierten vermehrten TNF α -Expression führte. Damit scheint die Steigerung der TNF α -Bildung durch Azidose p38-abhängig (Abbildung 13). Dass der p38-Signalweg in Fibroblasten in die Expression proinflammatorischer Mediatoren involviert ist, wurde bereits gezeigt (Campo et al., 2013). Auch in anderen Zelltypen, wie Monozyten, Osteoklasten, Osteoblasten, Chondrozyten oder Leukozyten ist eine Beteiligung von p38 an der Regulation der TNF α -Expression nachgewiesen (Thalhamer et al., 2008).

Azidose als regulierender Faktor für die TNF α -Sekretion ist für verschiedene Gewebstypen zuvor untersucht worden. So zeigten Bellocq et al., dass Makrophagen bei einem pH von 7,0 verstärkt TNF α transkribieren und sezernieren (Bellocq et al., 1998; Jensen, Buresh, & Norton, 1990). Allerdings wiesen Dietl et al. nach, dass ein niedriger extrazellulärer pH-Wert von 6,6

die Sekretion von TNF α in Monozyten inhibiert (Dietl et al., 2010). Ähnliches wurde in anderen Studien auch für Makrophagen (Bidani, Wang, Saggi, & Heming, 1998; Douvdevani, Rapoport, Konforti, Zlotnik, & Chaimovitz, 1993) nachgewiesen. Insgesamt unterschieden sich die Inkubationsbedingungen und verwendeten Zelllinien in all diesen Studien zu stark von den experimentellen Konditionen dieser Arbeit, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

5.2.2 Azidose erhöht die COX-2-Expression

Neben TNF α wurde auch für das proinflammatorische Zytokin COX-2 untersucht, wie sich dessen Expression bei einem azidotischen extrazellulären pH-Wert von 6,6 in NRKF-Zellen verhält. Eine Inkubation von 3h bei pH 6,6 führte zu einer deutlich gesteigerten COX-2-Expression, auch nach 6h war diese erhöht. Die Inkubation der Zellen für 24h bei pH 6,6 führte zu einer verminderten Bildung von COX-2-mRNA (Abbildung 14). Auf Proteinebene konnte dieser Effekt ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 17). Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) stellte sich die COX-2-Expression unabhängig von den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 dar. Die jeweilige Hemmung der Kinasen hatte keinen Einfluss auf die Expression (Abbildung 15). Eine gleichzeitige Hemmung beider MAP-Kinasen verminderte die COX-2-Expression signifikant, was auch als eine Stressreaktion der Zellen auf die vollständige Inhibition dieses zentralen Signalweges gedeutet werden könnte. Der allgemeine Stoffwechsel der Zelle war jedoch nicht vermindert, da die Expression des konstitutiven Gens 18s, auf welches die Expressionswerte bezogen wurden, unverändert blieb. Es wurde untersucht, ob die Azidose-induzierte Steigerung der COX-2-Expression auf die erhöhte Aktivität der MAP-Kinasen bei pH 6,6 zurückzuführen ist. Dabei zeigte sich ein ähnlicher Effekt wie bei TNF α . Trotz der Inhibition von ERK1/2 blieb die Genexpression von COX-2 bei Azidose erhöht, sodass dieser Effekt über einen anderen Signalweg vermittelt werden muss. Die Zugabe von SB20350 einem Inhibitor für p38, führte zu einer signifikant niedrigeren Steigerung der COX-2-Genexpression. Diese scheint abhängig von p38 zu sein (Abbildung 16). Eine durch Azidose induzierte gesteigerte Genexpression von COX-2 wurde für verschiedene andere Zelltypen bereits nachgewiesen. Dong et al. untersuchten den Azidose-abhängigen GPR4-Rezeptor in Endothelzellen. Dieser ist bei saurem pH-Wert aktiv und steigert die Genexpression verschiedener proinflammatorischer Gene, u.a. von COX-2 (Dong et al., 2013). Tomura et al. untersuchten den Einfluss von Azidose auf Osteoblasten und fanden die COX-2-Expression ebenfalls erhöht (Tomura et al., 2008). Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass verschiedene Stimuli in Fibroblasten zu einer p38-abhängigen Steigerung der COX-2-Expression führen können. Beltrán et al. prüften den Einfluss von Angiotensin-II auf Fibroblasten der Aorta und entdeckten eine p38-vermittelte Erhöhung der COX-2-Transkription (Beltrán et al., 2009). In Myofibroblasten des Kolons wiesen Yoo et al. eine durch TNF α

gesteigerte COX-2-Expression nach. Allerdings verlief diese im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten NRKF-Zellen in Abhängigkeit von ERK1/2 (Yoo et al., 2012).

5.2.3 Azidose erhöht die iNOS-Expression

Ebenfalls in dieser Arbeit wurde der Azidose-induzierte Effekt auf die Genexpression von iNOS beleuchtet. Dabei zeigten sich ähnliche Effekte wie bei COX-2. Eine Inkubation für 3h und 6h im sauren Milieu (pH 6,6) führte in den NRKF-Zellen zu einer Steigerung der Genexpression von iNOS (Abbildung 19). Riemann et.al untersuchten außerdem die Bildung von Nitrat und Nitrit, um zusätzlich die Änderung der Proteinexpression von iNOS festzustellen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit war auch die Produktion von Nitrat und Nitrit nach 3h und 6h erhöht (Riemann et al., 2015). Nach einer längerfristigen Azidose (24h bei pH 6,6) sank die iNOS-Expression wieder auf ihr basales Level (Abbildung 19). Extrazelluläre Azidose induziert die iNOS-Genexpression in verschiedenen Zelltypen, z.B. in Mukosazellen des Darms (Pedoto et al., 2001) und Makrophagen (Baud, Bellocq, Philippe, & Fouqueray, 1997; Bellocq et al., 1998). Andererseits zeigten Yaqoob et.al, dass ein niedriger pH-Wert die NO-Produktion in proximalen Tubuszellen senkt (Yaqoob et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Tumorzellen erzielt. In Fibrosarkom-Zellen der Maus verminderte eine Azidose die NO-Produktion und rettete sie damit vor NO-induzierter Apoptose und Nekrose (Harhaji et al., 2006). Die Studie unserer Arbeitsgruppe war jedoch die erste, die den Einfluss von Azidose auf die iNOS-Genexpression von Fibroblasten untersuchte. Es ist bereits bekannt, dass unterschiedliche Stimuli die iNOS-Expression über den MAP-Kinasen Signalweg beeinflussen (G. Zhang, He, Xie, & Yu, 2012). Wie auch für TNF α und COX-2 wurde in dieser Arbeit die Abhängigkeit der Azidose-induzierten iNOS-Expressionssteigerung von ERK1/2 und p38 beleuchtet. Die basale iNOS-Genexpression bei pH 7,4 zeigte sich jeweils unabhängig von ERK1/2 oder von p38 (Abbildung 20). Die gleichzeitige Inhibition beider MAP-Kinasen verminderte die Expression von iNOS, was ähnlich dem Effekt auf COX-2 auf eine Stressantwort der Zelle deuten kann. Allerdings blieb auch hier die Expression des *housekeeping* Gens 18s unverändert. Die Azidose-induzierte Expressionssteigerung von iNOS zeigte ähnliche Abhängigkeiten von den MAP-Kinasen wie zuvor COX-2 und TNF α . Auch bei iNOS verlief diese p38-vermittelt und unabhängig von ERK1/2 (Abbildung 21). Die zentrale Rolle von p38 bei inflammatorischen Prozessen ist bereits gut untersucht. Sie stellt ein mögliches Angriffsziel für Medikamente sowohl in der Therapie von Tumor- als auch chronischen entzündlichen Erkrankungen dar (Saklatvala, 2004). Möglicherweise wird der wichtige Einfluss von p38 bei inflammatorischen Prozessen nicht nur von Tumorzellen, sondern zusätzlich auch von Fibroblasten vermittelt. Die MAP-Kinase p38 stabilisiert die mRNA von inflammatorischen Proteinen (Clark, Dean, & Saklatvala, 2003; Kracht & Saklatvala, 2002) und fördert deren Translation (Kumar, Boehm, & Lee, 2003). Dean et.al ermittelten dies im Detail

bereits für COX-2 (Dean, Brook, Clark, & Saklatvala, 1999). Gleichzeitig ist bekannt, dass die iNOS-Expression p38 vermittelt ist (Feng et al., 1999; Schindler et al., 2007). Daher lässt sich vermuten, dass p38 auch in Fibroblasten an der Regulation von Transkription und Translation von iNOS beteiligt ist.

5.2.4 Azidose vermindert die MCP-1-Expression

Das Chemokin MCP-1 wurde als weiterer proinflammatorischer Mediator in dieser Arbeit untersucht. Dessen basale Genexpression verlief tendenziell ERK1/2-vermittelt (Abbildung 23). Weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe bestätigten diesen Trend (Riemann et al., 2015). Unter azidotischen Bedingungen (pH 6,6) änderte sich die MCP-1-Genexpression nach einer Inkubation von 3h und 6h nicht, wobei nach 6h ein Trend zu einer verminderten Expression ($\alpha=0,1$, $n=7$) zu beobachten war. Nach einer längerfristigen Azidose von 24h war die MCP-1-Expression statistisch signifikant vermindert (Abbildung 22). Abermals wurde die Abhängigkeit der durch Azidose-induzierten Änderung der MCP-1-Expression von den MAP-Kinasen untersucht. In der vorliegenden Arbeit hatte eine Inhibition von ERK1/2 oder p38 keinen Einfluss auf die Expressionsänderung bei pH 6,6 (Abbildung 23). Fortführende Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass eine gleichzeitige Hemmung beider MAP-Kinasen die MCP-1-Genexpression bei pH 6,6 halbierte (A. Riemann et al., 2015), was zeigt, dass die Expression von MCP-1 in NRKF-Zellen bei pH 6,6 zumindest teilweise MAP-Kinasen vermittelt ist. Für andere Zelltypen ist die Abhängigkeit der MCP-1-Expression von den MAP-Kinasen bereits nachgewiesen (Rovin et al., 1999; Suda et al., 2001). ERK1/2 und p38 werden durch Azidose kurzfristig (3h) verstärkt aktiviert (Abbildung 9, Abbildung 10). Die MCP-1-Genexpression ist (teilweise) abhängig von der Aktivität der MAP-Kinasen, blieb jedoch nach 3h bei pH 6,6 unverändert. Dies lässt auf einen suppressiven Effekt von Azidose auf die MCP-1-Expression schließen. Dieser wird zunächst noch durch die verstärkte Aktivität der MAP-Kinasen maskiert, zeigt sich jedoch bereits teilweise nach 6h und v.a. nach 24h unter azidotischen Bedingungen, da hier die Aktivität der MAP-Kinasen wieder abnimmt (Abbildung 9, Abbildung 10) und sich die MCP-1-Genexpression vermindert darstellt (Abbildung 22). Insgesamt scheint die Suppression der MCP-1-Genexpression ein weiterer anti-inflammatorischer Langzeiteffekt der Azidose auf die NRKF-Zellen zu sein. MCP-1 ist ein Chemokin, das als Teil der Immunantwort aufgrund verschiedener Stimuli (z.B. LPS, TNF α) freigesetzt wird, um weitere Zellen des Immunsystems anzulocken (Deshmane et al., 2009). Wird es durch einen sauren extrazellulären pH-Wert vermindert freigesetzt, wandern möglicherweise weniger Monozyten in das entzündliche Gebiet ein. Fernandez et.al wiesen diesen Effekt bereits für Alveolarmakrophagen nach. Wurden diese einem sauren Milieu ausgesetzt, sank die LPS-induzierte MCP-1-Produktion der Zellen (Fernandez et al., 2013). Auch in Mesothelzellen wurde dies bereits beobachtet. Johno et. al. konnten zeigen, dass die

TNF α -induzierte MCP-1-Produktion in Mesothelzellen, die azidotischem Stress ausgesetzt waren, vermindert war (Johno et al., 2012). Die Studie unserer Arbeitsgruppe wies jedoch als Erste den alleinigen suppressiven Effekt von Azidose auf die MCP-1-Expression in Fibroblasten nach.

5.2.5 Azidose vermindert die Expression von Osteopontin

Abschließend wurde in der vorliegenden Arbeit die Azidose-induzierte Expression von Osteopontin untersucht. Dieses Glykoprotein ist als Zytokin an der Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt (Lund et al., 2009) und wird von Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Leukozyten) in den Extrazellulärraum von entzündlichem Gewebe sezerniert (Rodrigues et al., 2007). Die Inkubation der NRKF-Zellen im sauren Milieu hatte auf die Osteopontin-Expression ähnliche Effekte wie auf die Expression von MCP-1. Nach 3h und 6h zeigte sie sich unverändert, nach 24h vermindert (Abbildung 25). Die Expression von Osteopontin zeigte sich sowohl unter physiologischen, als auch unter azidotischen Bedingungen unabhängig von den MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 (Abbildung 26, Abbildung 27). Allerdings konnten Zhu et al. zeigen, dass in Tumorzellen Osteopontin Hypoxie-induziert vermehrt exprimiert wird. Dieser Effekt verläuft über den ras-Akt-Signalweg (Zhu et al., 2005), sodass es für zukünftige Arbeiten von Interesse wäre, ob die durch Azidose verminderte Osteopontinexpression möglicherweise ebenfalls durch diesen Signalweg vermittelt wird. Die Plasmakonzentration von Osteopontin ist bei diversen chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Morbus Crohn, aber auch Krebs (El-Tanani et al., 2006) erhöht. Eine längerfristige Azidose scheint durch eine Verminderung der Osteopontin-Expression in Fibroblasten einen anti-inflammatorischen Effekt zu vermitteln.

5.3 Azidose und CREB

Da sich einige der untersuchten proinflammatorischen Mediatoren unabhängig von den MAP-Kinasen zeigten, wurde in dieser Arbeit noch ein weiterer Signalweg beleuchtet. CREB bildet als Transkriptionsfaktor das Ziel verschiedener Signalwege, spielt eine wichtige Rolle bei zentralen Zellfunktionen wie Proliferation, Wachstum und Überleben (Sakamoto & Frank, 2009), wird in einigen Tumoren überexprimiert (Xiao et al., 2010) und gilt als Protoonkogen (Sakamoto & Frank, 2009). Extra- und intrazelluläre Signale führen über verschiedene Signalwege zur Aktivierung von CREB, u.a. einige Zytokine (Johannessen et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von extrazellulärer Azidose auf die Aktivität von CREB in Fibroblasten untersucht. Ein saures Milieu (pH 6,6) verstärkte kurzfristig (3h und 6h Inkubation) die Aktivität von CREB. Eine längerfristige Azidose (24h Inkubation) hatte keinen Einfluss auf die CREB-Phosphorylierung (Abbildung 28). Dies wurde von Nakamura et. al bereits für Perizyten (kontraktile Zellen des Bindegewebes) nachgewiesen (Nakamura et al.,

2012). In Fibroblasten könnte dieser Effekt via MAP-Kinasen vermittelt werden, denn diese sind als Stimulatoren von CREB bereits bekannt (Johannessen et al., 2004) und wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist deren Aktivität durch eine kurzfristige Azidose ebenfalls erhöht (Abbildung 9, Abbildung 10). Diese Aussage ist jedoch rein spekulativer Natur und muss durch weiterführende Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen MAP-Kinasen und CREB bei Azidose untersuchen, verifiziert werden. Inwieweit die Azidose-induzierten Expressionsänderungen der untersuchten Zytokine CREB-vermittelt sind, wäre ebenfalls von Interesse und ein möglicher Ansatzpunkt weiterer Arbeiten.

6 Zusammenfassung

Metabolische Azidose ist ein wichtiger Bestandteil des Tumormikromilieus, welchem sowohl Tumor-, als auch Tumor-assoziierte Zellen ausgesetzt sind. Sie kann in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene pathophysiologische Reaktionen hervorrufen (Dietl et al., 2010; Jancic et al., 2012; Rajamäki et al., 2013). Krebs-assoziierte Fibroblasten spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Tumorerkrankungen und fördern ein entzündliches Milieu, was mit vielen Tumoren vergesellschaftet ist (Balkwill & Mantovani, 2012; Cirri & Chiarugi, 2012; Juarez et al., 2012; Kalluri & Zeisberg, 2006). Sie produzieren Mediatoren und Signalstoffe (u.a. Zytokine), die in Tumorzellen Wachstum und Proliferation auslösen können (Cirri & Chiarugi, 2012). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der metabolischen Azidose auf Fibroblasten untersucht. Sie aktiviert kurzfristig (3h Inkubation) die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38, Signalmoleküle die auch durch Hypoxie (ebenfalls ein charakteristisches Merkmal des Tumormikromilieus) in Fibroblasten aktiviert werden (Cuenda & Rousseau, 2007). Insgesamt scheint eine kurzfristige Azidose die Entstehung eines entzündlichen Milieus zu begünstigen, da sie die Genexpression der proinflammatorischen Mediatoren TNF α , COX-2 und iNOS in den Fibroblasten verstärkt. Die gesteigerte TNF α , COX-2- und iNOS-Genexpression verlief dabei p38-vermittelt. Ein länger andauerndes azidotisches Milieu (24h) hat möglicherweise einen anti-inflammatorischen Effekt auf die Fibroblasten, da entweder keine Steigerung (iNOS) oder sogar eine Verminderung (TNF α , COX-2, MCP-1, Osteopontin) der Expression von proinflammatorischen Mediatoren zu beobachten war. Die untersuchten Mediatoren MCP-1 und Osteopontin zeigten sich von beiden MAP-Kinasen unabhängig. Signalwege, die an der Regulation der Azidose-induzierten Expressionsänderung dieser Mediatoren beteiligt sind, sowie mögliche Ziele des durch Azidose verstärkt aktivierten ERK1/2 sind für fortführende Untersuchungen von Interesse. Der Transkriptionsfaktor CREB wird in Fibroblasten durch Azidose ebenfalls verstärkt aktiviert, inwieweit dies jedoch MAP-Kinasen-vermittelt verläuft und ob CREB ein Teil der Signalkaskade ist, die zur Azidose-induzierten Genexpressionsänderung der genannten Proteine führt, ist ein möglicher Ansatzpunkt weiterer Forschungen. In Abbildung 30 sind die Einflüsse von Azidose auf NRKF-Zellen modellhaft dargestellt. Durch die metabolische Azidose kreieren die Tumor-assoziierten Fibroblasten ein parainflammatorisches Milieu, das Einfluss auf den Verlauf und die Entwicklung von Tumorerkrankungen nehmen könnte. Bei der Entwicklung von neuen und verbesserten Therapiemethoden ist es daher von entscheidender Bedeutung, eine Tumorzelle nicht nur als Akkumulation genetischer Veränderungen zu betrachten, sondern sie im Kontext mit ihren umgebenden Geweben und (patho)physiologischen Bedingungen zu sehen.

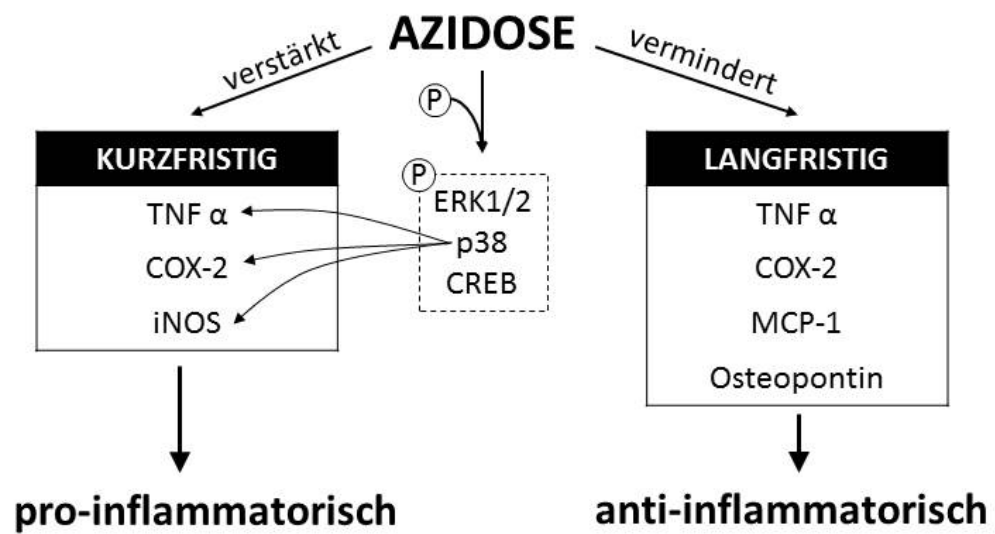


Abbildung 30 Modell für den Einfluss von metabolischer Azidose auf NRKF-Zellen; 1. Azidose induziert die Phosphorylierung (und damit Aktivierung) der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 und des Transkriptionsfaktors CREB; 2. Azidose induziert kurzfristig die Transkription (Genexpression) von TNF α , COX-2 und iNOS, wobei COX-2 und iNOS p38-vermittelt sind; 3. Azidose vermindert langfristig die Transkription von Osteopontin, MCP-1, TNF α und COX-2

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Amara, M., Yang, S. Y., Tapuria, N., Fuller, B., Davidson, B., & Seifalian, A. (2010). Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transplantation : Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, *16*(9), 1016–32. doi:10.1002/lt.22117
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, *75*(2004), 639–653. doi:10.1016/j.lfs.2003.10.042
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Signaling through Enzyme-Linked Cell-Surface Receptors. Garland Science. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26822/>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2011). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed.). Wiley-VCH.
- Alderton, W. K., Alderton, W. K., Cooper, C. E., Cooper, C. E., Knowles, R. G., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*, *357*, 593–615. doi:10.1042/0264-6021:3570593
- Arefieva, T. I., Kukhtina, N. B., Antonova, O. a., & Krasnikova, T. L. (2005). MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades. *Cytokine*, *31*, 439–446. doi:10.1016/j.cyto.2005.06.016
- Armstrong, S. C. (2004). Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, *61*(3), 427–36. doi:10.1016/j.cardiores.2003.09.031
- Balkwill, F. R., & Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology*, *22*(1), 33–40. doi:10.1016/j.semcancer.2011.12.005
- Baud, L., Bellocq, A., Philippe, C., & Fouqueray, B. (1997). [Low extracellular pH has a role in the induction of NO synthase type 2 in macrophages]. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, *181*(2), 247–58; discussion 259–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9235225>
- Bellocq, A., Suberville, S., Philippe, C., Bertrand, F., Perez, J., Fouqueray, B., ... Baud, L. (1998). Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(9), 5086–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9478960>
- Beltrán, A. E., Briones, A. M., García-Redondo, A. B., Rodríguez, C., Miguel, M., Alvarez, Y., ... Salaices, M. (2009). p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, *27*(1), 142–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145780>
- Bhowmick, N. a, Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression, *432*(November).
- Bidani, A., Wang, C. Z., Saggi, S. J., & Heming, T. A. (1998). Evidence for pH sensitivity of tumor necrosis factor-alpha release by alveolar macrophages. *Lung*, *176*(2), 111–21.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500296>

- Bogdan, C., & Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10), 907–16. doi:10.1038/ni1001-907
- Brown, L. F., Berse, B., Van de Water, L., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C. A., Manseau, E. J., ... Senger, D. R. (1992). Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Molecular Biology of the Cell*, 3(10), 1169–80. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=275680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, 11(2), 85–95. doi:10.1038/nrc2981
- Callewaere, C., Banisadr, G., Rostène, W., & Parsadaniantz, S. M. (2007). Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(3), 355–63. doi:10.1677/JME-06-0035
- Campo, G. M., Avenoso, A., D'Ascola, A., Prestipino, V., Scuruchi, M., Nastasi, G., ... Campo, S. (2013). 4-mer hyaluronan oligosaccharides stimulate inflammation response in synovial fibroblasts in part via TAK-1 and in part via p38-MAPK. *Current Medicinal Chemistry*, 20(9), 1162–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23298137>
- Carvalho, L., Foulkes, K., & Mickey, D. D. (1989). Effect of DMSO and DFMO on rat prostate tumor growth. *The Prostate*, 15(2), 123–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2508071>
- Chen, S., Chiu, L.-Y., Maa, M.-C., Wang, J.-S., Chien, C.-L., & Lin, W.-W. (2011). zVAD-induced autophagic cell death requires c-Src-dependent ERK and JNK activation and reactive oxygen species generation. *Autophagy*, 7(2), 217–28. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3039770&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chiche, J., Ilc, K., Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2010). Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Advances in Enzyme Regulation*, 50(1), 20–33. doi:10.1016/j.advenzreg.2009.10.005
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., ... Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184), 230–3. doi:10.1038/nature06734
- Cirri, P., & Chiarugi, P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: A diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31, 195–208. doi:10.1007/s10555-011-9340-x
- Clark, A. R., Dean, J. L. E., & Saklatvala, J. (2003). Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Letters*, 546(1), 37–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829234>
- Comb, M., Birnberg, N. C., Seasholtz, A., Herbert, E., & Goodman, H. M. (1986). A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature*, 323(6086), 353–6. doi:10.1038/323353a0
- Conti, I., & Rollins, B. J. (2004). CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer.

- Seminars in Cancer Biology*, 14(3), 149–54. doi:10.1016/j.semcancer.2003.10.009
- Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773, 1358–1375. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010
- Dean, J. L., Brook, M., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1), 264–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9867839>
- Denhardt, D. T., Giachelli, C. M., & Rittling, S. R. (2001). Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41, 723–49. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.723
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–326. doi:10.1089/jir.2008.0027
- Dhillon, a S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26, 3279–3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421
- Dietl, K., Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., Dorn, C., ... Kreutz, M. P. (2010). Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184, 1200–1209. doi:10.4049/jimmunol.0902584
- Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751), 1139–43. doi:10.1126/science.1116995
- Dong, L., Li, Z., Leffler, N. R., Asch, A. S., Chi, J. T., & Yang, L. V. (2013). Acidosis Activation of the Proton-Sensing GPR4 Receptor Stimulates Vascular Endothelial Cell Inflammatory Responses Revealed by Transcriptome Analysis. *PLoS ONE*, 8(4). doi:10.1371/journal.pone.0061991
- Douvdevani, A., Rapoport, J., Konforti, A., Zlotnik, M., & Chaimovitz, C. (1993). The effect of peritoneal dialysis fluid on the release of IL-1 beta and TNF alpha by macrophages/monocytes. *Peritoneal Dialysis International : Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 13(2), 112–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8494931>
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. a, Simon, L. S., Van De Putte, L. B., & Lipsky, P. E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12, 1063–1073. doi:9737710
- Duda, E., Nagy, T., Männel, D., & Eissner, G. (2005). *Biophysical Aspects of Transmembrane Signaling*. (S. Damjanovich, Ed.) (Vol. 8). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. doi:10.1007/b137722
- El-Tanani, M. K. (2008). Role of osteopontin in cellular signaling and metastatic phenotype. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13, 4276–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508510>

- El-Tanani, M. K., Campbell, F. C., Kurisetty, V., Jin, D., McCann, M., & Rudland, P. S. (2006). The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17(6), 463–74. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.09.010
- Etulain, J., Negrotto, S., Carestia, A., Pozner, R. G., Romaniuk, M. A., D'Atri, L. P., ... Schattner, M. (2012). Acidosis downregulates platelet haemostatic functions and promotes neutrophil proinflammatory responses mediated by platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, 107, 99–110. doi:10.1160/TH11-06-0443
- Fang, J. S., Gillies, R. D., & Gatenby, R. A. (2008). Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*, 18(5), 330–7. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.011
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., ... Trzaskos, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18623–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660836>
- Feng, G. J., Goodridge, H. S., Harnett, M. M., Wei, X. Q., Nikolaev, A. V, Higson, A. P., & Liew, F. Y. (1999). 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 macr. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(12), 6403–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10586030>
- Fernandez, S. F., Fung, C., Helinski, J. D., Alluri, R., Davidson, B. A., & Knight, P. R. (2013). Low ph environmental stress inhibits lps and lta-stimulated proinflammatory cytokine production in rat alveolar macrophages. *BioMed Research International*, 2013. doi:10.1155/2013/742184
- Fu, J., Shao, C.-J., Chen, F.-R., Ng, H.-K., & Chen, Z.-P. (2010). Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines. *Neuro-Oncology*, 12(4), 328–40. doi:10.1093/neuonc/nop005
- Fukumura, D., & Jain, R. K. (2007). Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 937–49. doi:10.1002/jcb.21187
- Gekle, M., Wischmeyer, E., Gründer, S., Petersen, M., Schwab, A., Markwardt, F., ... Marti, H. (2010). *Taschenlehrbuch Physiologie*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Georges, P. C., & Janmey, P. A. (2005). Cell type-specific response to growth on soft materials. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(4), 1547–53. doi:10.1152/jappphysiol.01121.2004
- Gerweck, L. E. (1998). Tumor pH: Implications for treatment and novel drug design. *Seminars in Radiation Oncology*, 8(3), 176–182. doi:10.1016/S1053-4296(98)80043-X
- Glitsch, M. (2011). Protons and Ca²⁺: ionic allies in tumor progression? *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(4), 252–65. doi:10.1152/physiol.00005.2011
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., ... Scheurich, P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83(5), 793–802. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521496>

- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., & Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(2), 570–575. doi:10.1073/pnas.95.2.570
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Harhaji, L., Popadic, D., Miljkovic, D., Cvetkovic, I., Isakovic, A., & Trajkovic, V. (2006). Acidosis affects tumor cell survival through modulation of nitric oxide release. *Free Radical Biology and Medicine*, *40*, 226–235. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.027
- Hockel, M., & Vaupel, P. (2001). Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, *93*(4), 266–276. doi:10.1093/jnci/93.4.266
- Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., ... Kohno, K. (2003). Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, *29*(6), 541–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585264>
- Jancic, C. C., Cabrini, M., Gabelloni, M. L., Rodríguez Rodrigues, C., Salamone, G., Trevani, A. S., & Geffner, J. (2012). Low extracellular pH stimulates the production of IL-1 β by human monocytes. *Cytokine*, *57*(2), 258–268. doi:10.1016/j.cyto.2011.11.013
- Jensen, J. C., Buresh, C., & Norton, J. A. (1990). Lactic acidosis increases tumor necrosis factor secretion and transcription in vitro. *The Journal of Surgical Research*, *49*(4), 350–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2214745>
- Jimenez-Sainz, M. C., Fast, B., Mayor, F., & Aragay, A. M. (2003). Signaling Pathways for Monocyte Chemoattractant Protein 1-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation, *64*(3), 773–782.
- Johannessen, M., Delghandi, M. P., & Moens, U. (2004). What turns CREB on? *Cellular Signalling*, *16*, 1211–1227. doi:10.1016/j.cellsig.2004.05.001
- Johno, H., Ogata, R., Nakajima, S., Hiramatsu, N., Kobayashi, T., Hara, H., & Kitamura, M. (2012). Acidic stress-ER stress axis for blunted activation of NF- κ B in mesothelial cells exposed to peritoneal dialysis fluid. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, *27*(11), 4053–60. doi:10.1093/ndt/gfs130
- Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5600), 1911–2. doi:10.1126/science.1072682
- Juarez, M., Filer, A., & Buckley, C. D. (2012). Fibroblasts as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and cancer. *Swiss Medical Weekly*, *142*(February), 1–9. doi:10.4414/smw.2012.13529
- Kaelin, W. G., & Thompson, C. B. (2010). Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature*, *465*(7298), 562–4. doi:10.1038/465562a
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *6*(May), 392–401. doi:10.1038/nrc1877
- Kim, E. K., & Choi, E.-J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1802*(4), 396–405. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009

- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., & Schwarz, P. M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*, *500*, 255–266. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.030
- Kracht, M., & Saklatvala, J. (2002). Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine*, *20*(3), 91–106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453467>
- Krauss, G. (2014). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation* (5th ed.). Wiley-VCH.
- Kröncke, K. D., Fehsel, K., & Kolb-Bachofen, V. (1998). Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, *113*, 147–156. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00648.x
- Kumar, S., Boehm, J., & Lee, J. C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *2*(9), 717–726. doi:10.1038/nrd1177
- Lala, P. K., & Chakraborty, C. (2001). Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *The Lancet Oncology*, *2*, 149–156. doi:10.1016/S1470-2045(00)00256-4
- Levine, L. (1981). Arachidonic acid transformation and tumor production. *Advances in Cancer Research*, *35*, 49–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7041540>
- Löffler, G., Petrides, P. E., & Heinrich, P. C. (2007). *Biochemie & Pathobiochemie* (8. Auflage). Heidelberg: Springer.
- Lund, S. A., Giachelli, C. M., & Scatena, M. (2009). The role of osteopontin in inflammatory processes. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *3*(3-4), 311–22. doi:10.1007/s12079-009-0068-0
- MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, *15*, 323–50. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.323
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *2*(August), 599–609. doi:10.1038/35085068
- Mindrescu, C., Le, J., Wisniewski, H.-G., & Vilcek, J. (2005). Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression by TSG-6 protein in macrophage cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *330*(3), 737–45. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.040
- Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2011). *Tumor-Associated Fibroblasts and their Matrix*. (M. M. Mueller & N. E. Fusenig, Eds.). Springer. doi:10.1007/978-94-007-0659-0
- Nakamura, K., Kamouchi, M., Arimura, K., Nishimura, A., Kuroda, J., Ishitsuka, K., ... Kitazono, T. (2012). Extracellular acidification activates cAMP responsive element binding protein via Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1-mediated Ca²⁺ oscillation in central nervous system pericytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(11), 2670–7. doi:10.1161/ATVBAHA.112.254946
- Navab, R., Strumpf, D., Bandarchi, B., Zhu, C., Pintilie, M., & Rohan, V. (2011). Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*, 7160–7165. doi:10.1073/pnas.1014506108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1014506108

- Naylor, a. J., Filer, a., & Buckley, C. D. (2013). The role of stromal cells in the persistence of chronic inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 171, 30–35. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04634.x
- Newham, P., & Humphries, M. J. (1996). Integrin adhesion receptors: structure, function and implications for biomedicine. *Molecular Medicine Today*, 2(7), 304–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8796911>
- Newsholme, E. A., Crabtree, B., & Ardawi, M. S. (1985). The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Bioscience Reports*, 5(5), 393–400. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896338>
- Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Reviews*, 8(2), 98–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2673568>
- Pedoto, a, Nandi, J., Oler, a, Camporesi, E. M., Hakim, T. S., & Levine, R. a. (2001). Role of nitric oxide in acidosis-induced intestinal injury in anesthetized rats. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 138, 270–276. doi:10.1067/mlc.2001.118176
- Pliyev, B. K., Sumarokov, A. B., Buriachkovskaia, L. I., & Menshikov, M. (2011). Extracellular acidosis promotes neutrophil transdifferentiation to MHC class II-expressing cells. *Cellular Immunology*, 271(2), 214–218. doi:10.1016/j.cellimm.2011.08.020
- Polverini, P. J., Cotran, P. S., Gimbrone, M. A., & Unanue, E. R. (1977). Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*, 269(5631), 804–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/927505>
- Rajamäki, K., Nordström, T., Nurmi, K., Åkerman, K. E. O., Kovanen, P. T., Öörni, K., & Eklund, K. K. (2013). Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13410–13419. doi:10.1074/jbc.M112.426254
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2008). *Duale Reihe Biochemie* (2nd ed.). Thieme Verlag.
- Riemann, A., Ihling, A., Thomas, J., Schneider, B., Thews, O., & Gekle, M. (2015). Acidic environment activates inflammatory programs in fibroblasts via a cAMP–MAPK pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853, 299–307. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.022
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., Schmitt, F. L., Paulsson, M., & Lindmark-Månsson, H. (2007). The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(6), 1087–97. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-1008
- Rovin, B. H., Wilmer, W. A., Danne, M., Dickerson, J. A., Dixon, C. L., & Lu, L. (1999). THE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE p38 IS NECESSARY FOR INTERLEUKIN-1 β -INDUCED MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1 EXPRESSION BY HUMAN MESANGIAL CELLS. *Cytokine*, 11(2), 118–126. doi:10.1006/cyto.1998.0409
- Sakamoto, K. M., & Frank, D. A. (2009). CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(8), 2583–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1137

- Saklatvala, J. (2004). The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(II), 372–377. doi:10.1016/j.coph.2004.03.009
- Sauvant, C., Nowak, M., Wirth, C., Schneider, B., Riemann, A., Gekle, M., & Thews, O. (2008). 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. *International Journal of Cancer*, 123(August), 2532–2542. doi:10.1002/ijc.23818
- Schindler, J. F., Monahan, J. B., & Smith, W. G. (2007). P38 Pathway Kinases As Anti-Inflammatory Drug Targets. *Journal of Dental Research*, 86, 800–811. doi:10.1177/154405910708600902
- Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 387–437. doi:10.1124/pr.56.3.3.387
- Sodek, J., Ganss, B., & McKee, M. D. (2000). Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 11(3), 279–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021631>
- Stubbs, M., McSheehy, P. M., & Griffiths, J. R. (1999). Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Advances in Enzyme Regulation*, 39(98), 13–30.
- Stubbs, M., McSheehy, P. M. J., Griffiths, J. R., & Bashford, C. L. (2000). Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular Medicine Today*, 6(January), 15–19. doi:10.1016/S1357-4310(99)01615-9
- Suda, T., Osajima, A., Tamura, M., Kato, H., Iwamoto, M., Ota, T., ... Nakashima, Y. (2001). Pressure-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 through activation of MAP kinase. *Kidney International*, 60(5), 1705–15. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00012.x
- Suzuki, K. (2005). [Osteopontin-gene, structure and biosynthesis]. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 63 Suppl 1, 608–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16279709>
- Szlosarek, P., Charles, K. A., & Balkwill, F. R. (2006). Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 42(6), 745–50. doi:10.1016/j.ejca.2006.01.012
- Taketo, M. M. (1998a). Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *Journal of the National Cancer Institute*, 90(20), 1529–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790545>
- Taketo, M. M. (1998b). Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *Journal of the National Cancer Institute*, 90(21), 1609–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811310>
- Tannock, I. F., & Rotin, D. (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Research*, 49(16), 4373–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2545340>
- Thalhamer, T., McGrath, M. a., & Harnett, M. M. (2008). MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology*, 47(January), 409–414. doi:10.1093/rheumatology/kem297

- Thun, M. J., Henley, S. J., & Patrono, C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(4), 252–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854387>
- Tlsty, T. (2008). Cancer: whispering sweet somethings. *Nature*, 453(May), 604–605. doi:10.1038/453604a
- Tomura, H., Wang, J.-Q., Liu, J.-P., Komachi, M., Damirin, A., Mogi, C., ... Okajima, F. (2008). Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in response to acidic pH through OGR1 in a human osteoblastic cell line. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 23(7), 1129–39. doi:10.1359/jbmr.080236
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., & Margioris, A. N. (2006). Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38, 1654–1661. doi:10.1016/j.biocel.2006.03.021
- van Horssen, R., Ten Hagen, T. L. M., & Eggermont, A. M. M. (2006). TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The Oncologist*, 11, 397–408. doi:10.1634/theoncologist.11-4-397
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–33. doi:10.1126/science.1160809
- Vaupel, P., Kallinowski, F., & Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Research*, 49(23), 6449–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2684393>
- Welsh, D. J., Peacock, A. J., MacLean, M., & Harnett, M. (2001). Chronic hypoxia induces constitutive p38 mitogen-activated protein kinase activity that correlates with enhanced cellular proliferation in fibroblasts from rat pulmonary but not systemic arteries. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(2), 282–9. doi:10.1164/ajrccm.164.2.2008054
- Wink, D. a., Ridnour, L. a., Hussain, S. P., & Harris, C. C. (2008). The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 19, 65–67. doi:10.1016/j.niox.2008.05.003
- Wong, C. H., Iskandar, K. B., Yadav, S. K., Hirpara, J. L., Loh, T., & Pervaiz, S. (2010). Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. *PloS One*, 5(4), e9996. doi:10.1371/journal.pone.0009996
- Xiao, X., Li, B. X., Mitton, B., Ikeda, A., & Sakamoto, K. M. (2010). Targeting CREB for cancer therapy: friend or foe. *Current Cancer Drug Targets*, 10, 384–391. doi:10.2174/156800910791208535
- Xing, F., Saidou, J., & Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 15, 166–79. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2905156&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Yaqoob, M., Edelstein, C. L., Wieder, E. D., Alkhunaizi, A. M., Gengaro, P. E., Nemenoff, R. A., & Schrier, R. W. (1996). Nitric oxide kinetics during hypoxia in proximal tubules: Effects of acidosis and glycine. *Kidney International*, *49*(5), 1314–1319. doi:10.1038/ki.1996.187
- Yoo, J., Rodriguez Perez, C. E., Nie, W., Edwards, R. A., Sinnott-Smith, J., & Rozengurt, E. (2012). TNF- α induces upregulation of EGFR expression and signaling in human colonic myofibroblasts. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *302*(8), G805–14. doi:10.1152/ajpgi.00522.2011
- Zachariae, C. O., Anderson, A. O., Thompson, H. L., Appella, E., Mantovani, A., Oppenheim, J. J., & Matsushima, K. (1990). Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *The Journal of Experimental Medicine*, *171*(6), 2177–82. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2187957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, *62*, 641–651. doi:10.1007/s00011-013-0633-0
- Zhang, G., He, J.-L., Xie, X.-Y., & Yu, C. (2012). LPS-induced iNOS expression in N9 microglial cells is suppressed by geniposide via ERK, p38 and nuclear factor- κ B signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, *30*(3), 561–8. doi:10.3892/ijmm.2012.1030
- Zhang, J., Shen, B., & Lin, A. (2007). Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*, *28*(6), 286–295. doi:10.1016/j.tips.2007.04.008
- Zhou, T., Mountz, J. D., & Kimberly, R. P. (2002). Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunologic Research*, *26*(1-3), 323–36. doi:10.1385/IR:26:1-3:323
- Zhu, Y., Denhardt, D. T., Cao, H., Sutphin, P. D., Koong, A. C., Giaccia, A. J., & Le, Q.-T. (2005). Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells via a Ras-activated enhancer. *Oncogene*, *24*(43), 6555–63. doi:10.1038/sj.onc.1208800

8 Thesen

1. Metabolische Azidose aktiviert die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 in Fibroblasten.
2. Metabolische Azidose verstärkt kurzfristig die Genexpression von TNF α , COX-2 und iNOS in Fibroblasten.
3. Metabolische Azidose induziert die Proteinexpression von COX-2 in Fibroblasten.
4. Metabolische Azidose vermindert langfristig die Genexpression von Osteopontin, MCP-1, TNF α und COX-2.
5. Die basale Genexpression bei physiologischem pH-Wert von TNF α ist abhängig von der MAP-Kinase ERK1/2.
6. Die Azidose-induzierte Änderung der Genexpression von COX-2 und iNOS ist abhängig von der MAP-Kinase p38.
7. Die Genexpression von Osteopontin und MCP-1 ist unter physiologischen und azidotischen Bedingungen unabhängig von ERK1/2 oder p38.
8. Metabolische Azidose aktiviert den Transkriptionsfaktor CREB in Fibroblasten.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Die p38-Singalkaskade (Krauss, 2014).....	9
Tabelle 2 Übersicht über Bestandteile und Funktionen des Reaktionsmix zur Umschreibung in cDNA.....	20
Tabelle 3 Heizblock-Programm zum Umschreiben der RNA in cDNA	20
Tabelle 4 Übersicht über das qPCR-Programm	21
Tabelle 5 Übersicht über die untersuchten Gene, die verwendeten Primer und Annealing Temperaturen.....	21
Tabelle 6 Zusammensetzung der Minigele	22
Tabelle 7 Elektrophoreseprogramm für die SDS Page	23
Tabelle 8 Im Westernblot verwendete Primär-und Sekundärantikörper mit eingesetzter Verdünnung.....	24

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	<i>Plattenepithelkarzinom der Haut</i>	2
Abbildung 2	<i>Übersicht über die Kennzeichen des Tumormikromilieus</i>	2
Abbildung 3	<i>Energiegewinnung aus Glucose in Tumorzellen und differenziertem Gewebe in An-und Abwesenheit von Sauerstoff</i>	4
Abbildung 4	<i>Mechanismen zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes in Tumorzellen</i>	5
Abbildung 5	<i>Solider Tumor als Mischung aus verschiedenen Zelltypen</i>	7
Abbildung 6	<i>Ras-MAP-Kinase-Signalweg</i>	8
Abbildung 7	<i>(1) Struktur synthetischer MEK-Inhibitoren (2) Beispiele für p38-Inhibitoren</i> ..	10
Abbildung 8	<i>Signalkaskade von TNF α</i>	11
Abbildung 9	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2</i>	27
Abbildung 10	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten Phosphorylierung von p38</i>	27
Abbildung 11	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von TNF α</i>	29
Abbildung 12	<i>TNF α-Genexpression bei pH 7,4 ist abhängig von ERK1/2</i>	30
Abbildung 13	<i>TNF α-Genexpression bei Azidose unabhängig von ERK1/2 und abhängig von p38</i>	30
Abbildung 14	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von COX-2</i>	31
Abbildung 15	<i>COX-2-Genexpression bei pH 7,4 unabhängig von ERK1/2 und p38</i>	32
Abbildung 16	<i>COX-2-Genexpression bei Azidose unabhängig von ERK1/2 und abhängig von p38</i>	33
Abbildung 17	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten Proteinexpression von COX-2</i>	33
Abbildung 18	<i>„Gedächtnis“ der relativen Steigerung der Proteinexpression von COX-2 nach Abklingen der Azidose</i>	34
Abbildung 19	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von iNOS</i>	35
Abbildung 20	<i>iNOS-Genexpression bei pH 7,4 ist unabhängig von ERK1/2 und p38</i>	36

Abbildung 21	<i>iNOS-Genexpression bei Azidose unabhängig von ERK1/2 und abhängig von p38.....</i>	36
Abbildung 22	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von MCP-1.....</i>	37
Abbildung 23	<i>MCP-1-Genexpression bei pH 7,4 unabhängig von ERK1/2 und p38.....</i>	37
Abbildung 24	<i>MCP-1-Genexpression bei Azidose hängt nicht von ERK1/2 oder p38 ab.....</i>	38
Abbildung 25	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten relativen Genexpression von Osteopontin.....</i>	39
Abbildung 26	<i>Osteopontin-Genexpression bei pH 7,4 ist unabhängig von ERK1/2 und p38..</i>	39
Abbildung 27	<i>Osteopontin-Genexpression bei Azidose ist unabhängig von ERK1/2 und p38..</i>	40
Abbildung 28	<i>Zeitverlauf der Azidose-induzierten Phosphorylierung von CREB.....</i>	41
Abbildung 29	<i>„Gedächtnis“ der relativen Steigerung der Phosphorylierung von CREB nach Abklingen der Azidose</i>	41
Abbildung 30	<i>Modell für den Einfluss von metabolischer Azidose auf NRKF-Zellen.....</i>	50

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Johanna Thomas
Geburtsdatum	4. Januar 1992
Geburtsort	Quedlinburg
Familienstand	ledig
Nationalität	Deutsch

Ausbildung

09/2003-07/2009	GutsMuths-Gymnasium Quedlinburg Allgemeine Hochschulreife
10/2009-03/2015	Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg Studium der Zahnmedizin akademischer Grad: Staatsexamen

Beruf

04/2015-09/2015	Gemeinschaftspraxis Dr. Gabriel/Dr. Wegner, Schönebeck Zahnärztin
seit 10/2015	Zahnarztpraxis Alexander Peschka, Ballenstedt Zahnärztin

Publikationen

Acidic environment activates inflammatory programs in fibroblasts via a cAMP-MAPK pathway.

A. Riemann, A. Ihling, **J. Thomas**, B. Schneider, O. Thews, M. Gekle

Biochim Biophys Acta. 2015 Feb; 1853(2):299-307.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die die Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht haben. Mein Dank geht an alle, die mich während meines Weges mit fachlichem und persönlichem Rat unterstützt haben, die mich immer wieder motivierten und mir zur Seite standen bis zum Schluss.

Danken möchte ich Prof. Dr. Michael Gekle für die Bereitstellung des Forschungsthemas und für die Betreuung der Arbeit als Doktorvater.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Anne Riemann, auf deren intensive Unterstützung ich mich stets verlassen konnte und die nie die Geduld mit mir verloren hat.

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), 13.04.2016

Johanna Thomas