

**Einfluss von extrazellulärer Azidose und Azidose-induzierter Signalwege auf
die Mitochondrienaktivität von Tumorzellen und Normalzellfibroblasten**

Dissertation

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

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

von Carmen Lucia Degitz

Betreuer: Prof. Dr. med. O. Thews

Gutachter*innen:

Prof. Dr. Dirk Vordermark, Halle (Saale)

Prof. Dr. Agnes Görlach, München

Datum der Verteidigung: 29.02.2024

Referat

In soliden Tumoren herrschen besondere extrazelluläre Bedingungen. Dieses metabolische Mikromilieu umgibt die Tumor- und Stromazellen und ist unter anderem durch eine Azidose von bis zu einem $\text{pH} < 6,0$ gekennzeichnet. Die extrazelluläre Azidose führt zu einer Aktivierung pro-onkogener Signalwege. Inwiefern die extrazelluläre Azidose die Aktivität der Mitochondrien von Tumor- und Stromazellen beeinflusst und ob durch Azidose aktivierte Signalwege beteiligt sind, war Fragestellung dieser Arbeit.

Es wurde der Sauerstoffverbrauch von drei Tumorzelllinien (H358-, AT-1- und MCF-7-Zellen) und von Normalzellfibroblasten (NRKF-Zellen) nach dreistündiger Inkubation in $\text{pH} 7,4$ und $\text{pH} 6,6$ gepuffertem Medium gemessen. Zusätzlich erfolgte die Messung bei Inhibition der p38-, ERK1/2-, PI3K-, mTOR- und PKC-Signalwege bzw. calciumabhängiger Signaltransduktion. Die Aktivität der Signalwege bei Azidose wurde mittels Western Blot überprüft. Um den Wirkungsort der Signalwege zu lokalisieren, wurde eine Isolation der Proteinfractionen des mitochondrialen und zytosolischen Kompartiment durchgeführt. Als weitere Indikator der Aktivität der Mitochondrien wurde das mitochondriale Membranpotential mittels des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 gemessen.

Es zeigte sich, dass Tumorzellen im Vergleich zu den Normalzellen einen erhöhten Sauerstoffverbrauch haben. Zudem stieg der mitochondriale Sauerstoffverbrauch der H358- und AT-1-Zellen bei Azidose. Diese Steigerung war in Teilen vom PI3K- und ERK1/2-Signalweg abhängig. Phospho-Akt und phospho-ERK1/2 akkumulierten unter Azidose an den Mitochondrien der Tumorzellen. Das mitochondriale Membranpotential der Tumorzellen war unter Azidose ebenfalls erhöht und auch diese Hyperpolarisation war teilweise vom ERK1/2-Signalweg abhängig, nicht jedoch von PI3K.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass extrazelluläre Azidose in H358- und AT-1-Zellen zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs und des mitochondrialen Membranpotentials führt. Die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs hängt dabei vom ERK1/2- und PI3K-Signalweg ab, die Hyperpolarisation nur vom ERK1/2-Signalweg. Beide Signalwege scheinen ihre Wirkung direkt an den Mitochondrien zu entfalten.

Carmen Lucia Degitz, Einfluss von extrazellulärer Azidose und Azidose-induzierter Signalwege auf die Mitochondrienaktivität von Tumorzellen und Normalzellfibroblasten
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 81 Seiten, 2023

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Solide maligne Tumore	1
1.2 Mitochondrien	6
1.2.1 Die Atmungskette	7
1.2.2 Das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$	9
1.3 Relevante Signalwege	10
1.3.1 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade	10
1.3.2 PI3K	13
1.3.3 Proteinkinase C	15
1.3.4 Calcium	15
2 Fragestellung der Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Verwendete Geräte und Materialien	18
3.1.1 Zelllinien	18
3.1.2 Geräte	18
3.1.3 Materialien	19
3.1.4 Computerprogramme	19
3.1.5 Chemikalien	19
3.1.6 Verwendete Puffer/Lösungen:	22
3.1.7 Kits	23
3.2 Zellkultur	23
3.2.1 Zelllinien	23
3.2.2 Mediumwechsel und Passagieren	25
3.2.3 Herstellen des pH-Mediums	25
3.3 Allgemeiner Versuchsaufbau	26

3.4	Sauerstoffverbrauchsmessung	26
3.5	Verwendete Inhibitoren und Aktivatoren	30
3.6	ERK1/2-Aktivitätsmessung	30
3.6.1	Proteinisolation	30
3.6.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	31
3.6.3	Western Blot	32
3.7	Mitochondrien-Isolation	32
3.8	BCA-Assay	33
3.9	Messung des mitochondrialen Membranpotential $\Delta\Psi$ (MMP)	34
3.10	Statistik	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Sauerstoffverbrauchsmessung	35
4.1.1	Messungen unter Kontrollbedingungen	35
4.1.2	Einfluss der Azidose	36
4.1.3	Einfluss der Inhibition von p38	39
4.1.4	Einfluss der Inhibition von ERK1/2	42
4.1.5	Einfluss der Aktivierung von ERK1/2	44
4.1.6	Einfluss der Inhibition von PI3K	46
4.1.7	Einfluss der Inhibition von mTor	48
4.1.8	Einfluss der Inhibition der PKC und von calciumfreiem Medium	49
4.2	ERK1/2-Aktivierung	50
4.2.1	Azidose	50
4.2.2	Einfluss der ERK1/2-Aktivatoren PMA und EGF	51
4.3	Mitochondrienisolation	52
4.3.1	Verhalten von ERK1/2	53
4.3.2	Verhalten von Akt	54
4.4	Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$	54

4.4.1	Einfluss von Azidose.....	54
4.4.2	Einfluss der Inhibition von ERK1/2	55
4.4.3	Einfluss der Inhibition von PI3K.....	56
4.4.4	Einfluss der Inhibition von mTOR	56
5	Diskussion.....	58
5.1	Material und Methoden	58
5.1.1	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	58
5.1.2	Wahl der Zelllinien	58
5.1.3	Messung des Sauerstoffverbrauchs	58
5.2	Diskussion der Ergebnisse	60
5.2.1	Erhöhter Sauerstoffbedarf von Tumorzellen.....	60
5.2.2	Bedeutung der untersuchten Signalwege für den Sauerstoffverbrauch bei neutralem pH.....	61
5.2.3	Einfluss der Azidose auf den Sauerstoffverbrauch von Tumorzellen	63
5.2.4	Einfluss der Signalwege unter Azidose	64
5.2.5	Anlagerung von pAkt und pERK1/2 an die Mitochondrien.....	66
5.2.6	Einfluss von Azidose auf das $\Delta\Psi_m$	67
5.2.7	Einfluss von ERK1/2 und PI3K auf das $\Delta\Psi_m$	68
5.3	Stärken und Schwächen der Arbeit	69
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	70
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	75
8	Thesen.....	81
	Erklärungen.....	VIII
	Publikationen	IX
	Danksagung.....	X

Abkürzungsverzeichnis

AA	Antimycin A
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK1/2	Extracellular-signal-regulated-Kinase 1 und 2
FAD/FADH2	Flavinadenindinukleotid
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	Fetales Kälber Serum (Fetal Calf Serum)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HRE	Hypoxie-responsive Elemente
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Kon.	Kontrolle
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)
MEK	Kinasen, die zu einer Phosphorylierung (Aktivierung) der MAP-Kinasen ERK1/2 führen
MEM	Minimum Essential Medium
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

MMP	Mitochondriales Membranpotential
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (mammalian Target of Rapamycin)
MW	Mittelwert
n.b.	nicht bestimmt
n.m.	nicht messbar
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NRKF	normal rat kidney fibroblast
OCR	Oxygen Consumption Rate (Sauerstoffverbrauchsrate)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pAkt	phosphoryliertes Akt
PBS	Phosphatgepufferte Salzsäurelösung
PDK-1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1
PEP	Phosphoenolpyruvat
pERK1/2	phosphorylierte Extracellular-signal-regulated-Kinase 1 und 2
pH _e	extrazellulärer pH-Wert
pH _i	intrazellulärer pH-Wert
P _i	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphorinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat
R	Rotenon
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
ROS	Reaktive Oxygen Spezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAW	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TNF- α	Tumornekrosefaktor α
tRNA	Transfer-RNA
VDAC	Spannungsabhängiger Anionenkanal (voltage dependent anion channel)
z.B.	zum Beispiel
ΔP	Protonen bewegende Kraft
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential

1 Einleitung

1.1 Solide maligne Tumore

Krebserkrankungen sind ein breites Feld von Erkrankungen, die in sämtlichen Organsystemen auftreten können. Sie definieren sich durch entartete Zellen, die unkontrolliert wachsen und ihre organspezifische Funktion verloren haben. Sie können Organgrenzen überschreiten, zerstörend in Gewebe einwachsen und sich in entfernten Organen verbreiten. Solide maligne Tumore bilden primär einen Zellverband und stehen den nicht solide wachsenden tumoralen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems gegenüber. Die Krebszellen solider Tumore stehen im engen Kontakt mit dem umgebenden normalen Wirtsgewebe. Dieses Gewebe besteht aus Bindegewebszellen, Blutgefäßen, Zellen des Immunsystems und der extrazellulären Matrix. Zwischen diesen Zellen erfolgt eine Kommunikation über Signalmoleküle. Zusammengefasst wird dies als Tumormikromilieu bezeichnet [1].

Das metabolische Tumormikromilieu

Das Tumorgewebe setzt sich neben den eigentlichen Tumorzellen aus nicht tumorösen Zellen des umgebenden Normalgewebes zusammen. Die Normalzellen umfassen Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen oder NK-Zellen, sowie Fibroblasten und Zellen der Blutgefäße. Im Extrazellularraum des Tumors herrscht ein metabolisches Mikromilieu, das sich von dem im normalen Gewebe z.T. deutlich unterscheidet und manchmal eher dem von chronischen Entzündungen ähnelt. Diese metabolischen Faktoren können die Expression von Signalmolekülen zwischen den Zellen im Tumorgewebe beeinflussen, wobei die bei chronischen Entzündungen vorherrschenden Signalmoleküle auch in soliden Tumoren vermehrt vorzufinden sind. Sie können das Tumorwachstum durch Hemmung der Apoptose und Unterstützung der Zellproliferation verstärken. Zudem fördern sie die Angiogenese und den Gewebeumbau [2]. Somit beeinflusst das metabolische Milieu im Tumorgewebe maßgeblich die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung solider Tumoren. Im Folgenden werden drei Charakteristika des metabolischen Mikromilieus solider Tumoren im Detail besprochen: Sauerstoffmangel (Hypoxie), glykolytischer Stoffwechsel trotz ausreichender O₂-Versorgung („Warburg Effekt“) und die extrazelluläre Azidose.

a Hypoxie

Tumorhypoxie definiert sich durch Areale, welche einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck aufweisen ($<10 \text{ mmHg O}_2$) [3]. Diese Areale entstehen durch eine hohe Teilungsrate der Tumorzellen und folglich einem hohen Sauerstoffverbrauch, welcher über Signalmoleküle die Neoangiogenese anregt. Da die Gefäßneubildung häufig nicht schnell genug vonstattengeht, kommt es zu einer Minderversorgung, die hypoxische Areale entstehen lässt. Die Hypoxie löst wiederum eine insuffiziente und meist ungeordnete Neoangiogenese aus. Die in Tumoren neu gebildeten Blutgefäße sind oftmals atypisch und weisen zahlreiche morphologische und funktionelle Besonderheiten auf (z.B. erhöhte Permeabilität des Endothels, Fehlen von glatter Gefäßmuskulatur, stark gewundener Verlauf, blinde Endigungen) [4]. Auch zeigt sich eine zeitliche und räumliche Heterogenität des Blutflusses im Tumor [4]. Dies wiederum führt zu einer gestörten Mikrozirkulation und einer inadäquaten Sauerstoffversorgung. Somit verstärkt sich die Hypoxie weiter [5].

Der O_2 -Mangel hat verschiedene Auswirkungen auf die Tumorzelle. Zum einen kommt es zur Aktivierung von HIF-1 α und HIF-1 β . Der Komplex aus HIF-1 α und β aktiviert über die „Hypoxie-responsive Elemente“ (HREs) die Translation verschiedener Proteine. Hierdurch werden beispielsweise Enzyme der Glykolyse vermehrt gebildet. Auch der GLUT1-Transporter, über den Glukose in die Zelle aufgenommen wird, wird verstärkt exprimiert. HIF nimmt zudem direkt Einfluss auf die Translation der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 (PDK1) und steigert so ihre Aktivität. PDK1 hemmt die Pyruvat-Dehydrogenase, die Pyruvat zu Acetyl-CoA umwandelt. Das ist der entscheidende Schritt, durch welchen Pyruvat dem Citratzyklus zugeführt wird. Folglich gelangt weniger Glukose in den Citratzyklus und im Enderfolg in die oxidative Phosphorylierung. Hypoxie und HIF fördert somit auf Translationsebene einen Wechsel des Stoffwechsel vom Citratzyklus und der oxidativer Phosphorylierung hin zur Glykolyse [6].

b Der „Warburg Effekt“

Die meisten Zellen nutzen zur Energiegewinnung bei ausreichender Sauerstoffversorgung die oxidative Phosphorylierung von ATP. Dabei werden 36 ATP pro Molekül Glukose gebildet. Nur bei unzureichender Sauerstoffversorgung wechseln sie zum anaeroben Stoffwechselweg, der Glykolyse, welcher wesentlich weniger ATP bildet, nur 2 ATP pro Molekül Glukose ("Pasteur-Effekt ") [7]. Daher steigt der Glukoseverbrauch bei sinkendem Sauerstoffangebot und umgekehrt. Aber bereits seit etwa 100 Jahren ist bekannt, dass Tumorzellen auch bei ausreichender O_2 -Versorgung Glykolyse (aerobe Glykolyse)

betreiben. Dieses Phänomen wird als Warburg Effekt (nach dem Erstbeschreiber Otto Warburg) bezeichnet [8].

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Umstellung des Stoffwechsels hin zur aeroben Glykolyse aus Mitochondrien-Defekten herrührt, welche in der Krebsbildung entstanden sind oder diese begünstigen [9]. Dafür gibt es jedoch kaum Belege und die These gilt als widerlegt [10]. Aktuell wird angenommen, dass Mutationen, die die Aktivierung von K-ras, c-MYC und PI3-Kinase oder die Inaktivierung von p38 begünstigen, als Driver-Mutationen für die gesteigerte Glykolyse verantwortlich sind und nicht Mutationen mitochondrialer Proteine [8].

Betrachtet man ausschließlich die ATP-Gewinnung, erscheint die aerobe Glykolyse ein ineffektiver Weg zu sein, was lange als Begründung dafür galt, dass Normalzellen diesen selten gehen [8, 9, 11]. Womöglich wird die aerobe Glykolyse aber auch von Normalzellen betrieben, nämlich in Zeiten der Proliferation, beispielsweise in der Embryogenese oder der Wundheilung [12, 13]. Betrachtet man Einzeller, ist deren Proliferation von dem Nährstoffangebot in ihrer Umgebung abhängig. In Hungerperioden betreiben Einzeller oxidative Phosphorylierung, um ein Maximum an Energie für die Sicherung des Überlebens zu erzeugen. Sind genügend Nährstoffe vorhanden, so betreiben sie jedoch Fermentation (vergleichbar mit der aeroben Glykolyse in Mehrzellern) und beginnen zu proliferieren. Es stellt sich daher die Frage, warum Tumorzellen bei ausreichender O₂-Versorgung einen Wechsel des Stoffwechsels zur Glykolyse vornehmen. Ein Engpass von Nährstoffen als Auslöser für die aerobe Phosphorylierung, wie in einzelligen Organismen, ist in Tumorzellen eher nicht zu erwarten. Zwar sind oft niedrige Glucose-Konzentrationen in Tumoren nachzuweisen, dies ist aber eher dem Pasteur-Effekt als dem Nährstoffangebot geschuldet [14]. In einem mehrzelligen Organismus stehen der einzelnen Zelle über die Blutversorgung meist ausreichend Nährstoffe zur Verfügung. Um eine unkontrollierte Proliferation vorzubeugen, ist daher die Nährstoffaufnahme in Säugetierzellen abhängig vom Wachstumsfaktor. Tumorzellen setzen sich über diesen Regulationsschritt hinweg, sind Wachstumsfaktor unabhängig und können nicht reguliert Nährstoffe aufnehmen.

Für einen schnell proliferierenden Tumor ist aber die ATP-Bildung nicht der einzige bestimmende Prozess für die Zellteilung. Um zu verstehen, weshalb in proliferierenden Zellen der Warburg Effekt eine relevante Rolle spielt, müssen die metabolischen Voraussetzungen für die Zellteilung betrachtet werden. Zur Proliferation wird Biomasse benötigt, also unter anderem Aminosäuren, Lipide und Nukleotide (Abb. 1). Zum anderen wird freie Energie für die endogenen Reaktionen verbraucht, die Nährstoffe wie Glukose

und Glutamin zu Biomasse umwandeln. Für den Metabolismus von Biomasse, beispielsweise für den Fettsäure-Zyklus, sind Acetyl-CoA und NADPH von Nöten. Um diese Moleküle zu gewinnen, ist die aerobe Glykolyse ein wichtiger Weg. Acetyl-CoA wird über die Zuführung von Pyruvat in den Citratzyklus synthetisiert. Bei der Glykolyse werden pro Glukose-Molekül 2 NADPH durch die Reduktion von NADP bei der Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Biphosphoglyerat frei. Glutamin wird über die Glutaminolyse dem Citratzyklus zugeführt, wobei Stickstoff für die Synthese von Aminosäuren gewonnen wird. Außerdem werden Zwischenprodukte der Glykolyse wie Glukose-6-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat oder Glycerinaldehyd-3-phosphat für die Synthese von Aminosäuren sowie von Nukleinsäuren benötigt. Hieraus wird ersichtlich, dass die Glykolyse und Glutaminolyse wahrscheinlich nicht primär für die ATP-Gewinnung relevant sind, sondern für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten, Glykolyse-Zwischenprodukten und Acetyl-CoA. Für gute Proliferationsvoraussetzung muss mehr Glukose der Glykolyse zugeführt werden als der oxidativen Phosphorylierung, da ATP in geringeren Mengen benötigt wird als die oben genannten Moleküle. Diese Hypothese stützt zum einen die Beobachtung, dass Signalwege zur Regulation der Zellproliferation und zur Steuerung des Metabolismus im Sinne des Anabolismus teilweise identisch sind. Außerdem fördern Treibermutationen der Tumorentstehung eher den Metabolismus von Nährstoffen zu Biomasse als die effektive ATP-Produktion [8].

Dennoch ist genügend ATP für eine Zelle überlebenswichtig. Sinkt das ATP/ADP-Verhältnis, so gehen sie in Apoptose, Zellzyklusarrest oder Katabolismus. Um einen ATP-Engpass vorzubeugen, gibt es Puffer-Systeme wie die Adenylatkinase, welche die Reaktion von 2 ADP in 1 ATP unterstützt. Somit hat die Zelle noch zusätzliche Wege ATP zu bilden. Es konnte auch gezeigt werden, dass sich Zellen in Tumoren bezüglich ihres Metabolismus teils stark unterscheiden, wobei einige bevorzugt die oxidative Phosphorylierung betreiben andere hingegen Glykolyse [15]. Tumoren betreiben demnach sowohl aeroben Glykolyse als auch oxidative Phosphorylierung [8]. Neue Erkenntnisse zeigen zudem, dass bei Tumorzellen unter Normoxie der Großteil des ATPs aus den Mitochondrien kommt.

Auch wenn der ATP-Bedarf der Zelle bei Glykolyse sichergestellt ist, bleibt noch die Frage nach dem Verbleib des entstehenden Laktats. Dies scheint wie eine Verschwendung, da 3 Kohlenstoffmoleküle aus der Zelle eliminiert werden, die andernfalls zur Synthese von Makromolekülen oder ATP verwendet werden könnten. Das Laktat muss aber aus der Zelle eliminiert werden, um den intrazellulären pH stabil zu halten. Somit gehen wichtige

Kohlenstoffmoleküle als Abfallprodukte verloren. Trotzdem wird die Bildung von Laktat in proliferierenden Zellen aktiviert.

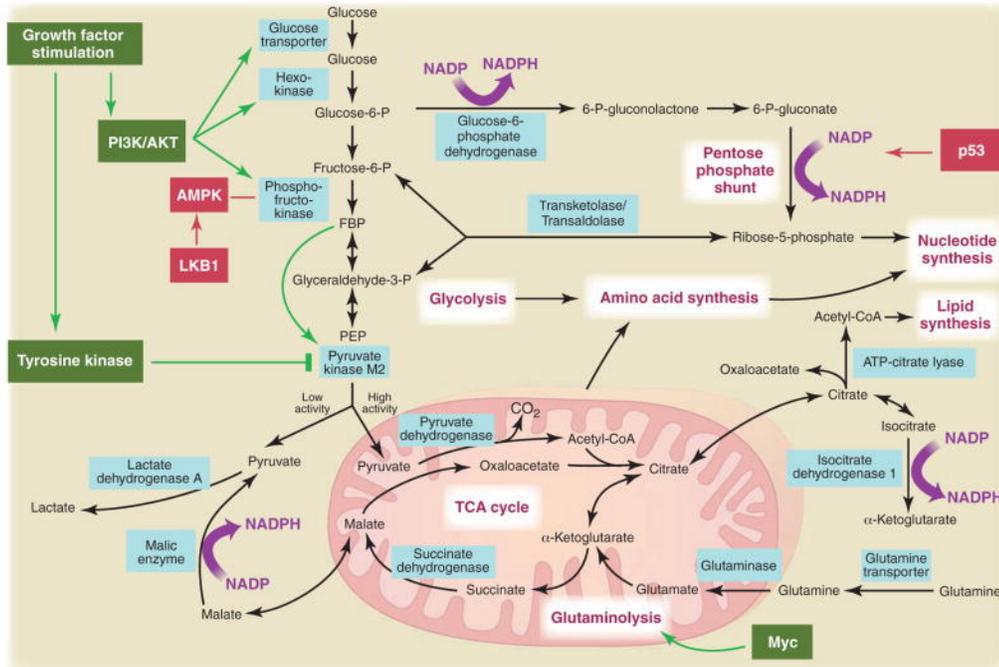


Abb. 1 Schematische Abbildung über die Verbindung zwischen Glykolyse, der oxidativen Phosphorylierung, dem Pentose-Phosphat-Weg, dem Citratzyklus, der Aminosäure-, Nucleotidsäure- und Fettsäuresynthese in proliferierenden Zellen. Wichtige Schrittmacherezyme (blau hinterlegt) der einzelnen Stoffwechselwege können über Signalwege (grün: aktivierend; rot: inhibierend), die wichtig in der Tumorgenese sind (Myc, p53, PI3K/AKT, AMPK), sowie durch Wachstumsfaktor beeinflusst werden. Aus [8], Nachgedruckt mit der Erlaubnis von AAAS

c Extrazelluläre Azidose

Sowohl der Sauerstoffmangel, der zur anaeroben Glykolyse führen kann, als auch der Warburg-Effekt fördern im Tumorgewebe die Bildung von Milchsäure, die zu einer Ansäuerung des Tumors (Gewebeazidose) beiträgt. In vielen soliden Tumoren liegt eine extrazelluläre Azidose mit pH-Werten bis 5,5 vor [16]. Die im Stoffwechsel anfallende Milchsäure führt zunächst zu einer intrazellulären Ansäuerung. Protonen und Laktat werden dann aber aus den Zellen transportiert, um dem Abfall des intrazellulären pH-Werts entgegenzuwirken. Dieser Transport erfolgt durch aktive Prozesse. Relevant sind beispielweise der Na^+/H^+ -Antiporter (z. B. NHE-1), Na^+ -unabhängige Anionen-Austauscher, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher und H^+/Laktat -Symporter. Dadurch verlagert sich die Azidose von intrazellulär nach extrazellulär [17, 18]. Eine extrazelluläre CO_2 -Umwandlung zu Kohlensäure, katalysiert z.B. durch die Carboanhydrase IX (CAIX), ist ein zusätzlicher Prozess, der zur Senkung des extrazellulären pH-Werts in Tumoren führt [19]. Da in

Tumoren eine schlechte Gefäßversorgung und insuffiziente Lymphdrainage herrscht, können die überschüssigen Protonen ungenügend aus dem Gewebe entfernt werden. So wie der Sauerstoffpartialdruck kann auch der pH-Wert innerhalb eines Tumors lokal stark schwanken. Es können extrazelluläre pH-Werte (pH_e) von $pH < 6$ bis 7,6 erreicht werden, wobei in Normalgeweben der pH_e zwischen $pH 7,0$ und $7,4$ liegt. [16, 17] Der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) schwankt hingegen wesentlich geringer, was auf effektive Transportmechanismen von Protonen aus den Tumorzellen ins Interstitium hindeutet. Tumorzellen weisen intrazellulär oftmals sogar einen etwas höheren pH_i ($>7,4$) als Normalzellen auf ($pH_i \sim 7,2$) [20]. Der niedrige extrazelluläre pH entsteht durch die besonderen metabolischen Voraussetzungen des Tumorgewebes, führt aber selbst auch zu einer Anpassung des Metabolismus. So betreiben beispielsweise Zellen unter azidotischen Bedingungen vermindert Glutathion-Synthase und den Pentosephosphatweg, bei dem NADPH entsteht. Dadurch werden Zellen sensibler gegenüber reaktiven O_2 -Spezies (ROS), da diese weniger gut abgebaut werden können [21]. Zudem steigert der niedrige pH_e selbst die ROS-Produktion, indem beispielsweise die aerobe Glykolyse oder der ATP-Verbrauch gehemmt wird [22]. Hierbei ist der Ursprung der ROS am ehesten die oxidative Phosphorylierung. ROS können die Expression glykolytischer Enzyme fördern und wirken proinflammatorisch, wodurch der pH-Wert weiter abgesenkt werden kann [2, 23]. Das saure Milieu fördert zudem Tumorgenese und -proliferation [24]. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass ein saurer pH-Wert zur Metastasierung von Tumoren beiträgt [25]. Überdies bewirkt die Azidose in unterschiedlichen Tumorzelllinien die Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, die für ihre Prokanzerogenität bekannt sind. Zu ihnen gehören unter anderem die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 und Transkriptionsfaktoren wie CREB. Auch andere wichtige Signalwege wie der PI3K/Akt-Signalweg, die PKC und JNK sind stärker aktiviert [22, 26].

Zusammenfassend ist das metabolische Tumormikromilieu charakterisiert durch Hypoxie, Azidose und einem hohen extrazellulären Laktatgehalt. Das Tumormikromilieu und der Stoffwechsel der Tumorzellen stehen somit im engen Wechselspiel zueinander. Die Mitochondrien als Schauplatz der oxidativen Phosphorylierung nehmen dabei eine zentrale Rolle ein.

1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind (in klassischer Sichtweise) maternal vererbte Organelle, die ursprünglich aus symbiotischen Bakterien stammen und sich gemeinsam mit ihrem Wirt entwickelt haben. Sie haben ein eigenes Genom von circa 16000 Basenpaaren, welches

tRNAs, rRNAs und relevante Proteine der Zellatmung kodiert. Der Großteil der mitochondrialen Proteine wird aber von nukleärer DNA kodiert. Mitochondrien sind für die Energieversorgung zuständig und kontrollieren das Reduktions-Oxidations-Gleichgewicht in den Zellen. Sie sind verantwortlich für die Regeneration von antioxidativen Schutzmechanismen, die Regulation des zytosolischen Calciumspiegels und können Apoptose einleiten [27]. Mitochondrien sind keine fixen Gebilde, sondern unterliegen einem ständigen dynamischen Umbau von Fusion und Spaltung. So verändern Mitochondrien ihre Form, Anzahl und Größe stetig. Hierdurch können beschädigte Mitochondrien aussortiert und die Energieproduktion auf den Bedarf der Zelle angepasst werden [28]. Für die Energieproduktion ist vor allem die zelluläre Atmung über die Atmungskette entscheidend.

1.2.1 Die Atmungskette

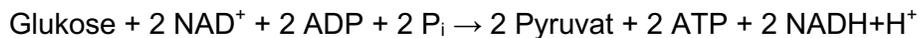
Das Konzept der Atmungskette wurde 1925 von Warburg entdeckt und seither ausgiebig untersucht und weiterentwickelt [29]. In der Atmungskette laufen verschiedene Stoffwechselwege der Zelle zusammen. Aus dem Citratzyklus und dem Abbau von Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten generiert die Zelle NADH/H^+ und FADH^+ . Diese Reduktionsäquivalente dienen als vorübergehender intrazellulärer Energiespeicher. In der Atmungskette wird aus ihnen der universelle Energieträger ATP generiert. Dafür wird die freiwerdende Energie der Redoxreaktion genutzt, die durch die Oxidierung der Reduktionsäquivalenten entsteht. Die bei dieser Reaktion freiwerdenden Elektronen treiben die Redoxreaktionen in den Enzymkomplexen an und werden über eine Elektronentransportkette über die innere Mitochondrienmembran in die Mitochondrienmatrix geleitet. Dort werden sie schlussendlich für die Reaktion von O_2 zu Wasser verwendet. Die entstehende Energie wird genutzt, um einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen. Beim Rückfluss der Protonen in die Mitochondrienmatrix findet die ATP-Synthese statt. Der letzte Schritt wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet [30].

Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen (Abb. 2). Komplex I ist die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase. NADH/H^+ wird zu NAD^+ oxidiert. Es entstehen zwei Protonen und zwei Elektronen, die auf Ubichinon übertragen werden. Durch die dabei freiwerdende Energie werden vier Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Komplex II ist die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase. Auch hier werden wieder zwei Protonen und zwei Elektronen auf Ubichinon übertragen, jedoch ist der Redox-Partner nicht NADH/H^+ sondern FADH_2 , welches zu FAD^+ wird. Bei diesem Schritt werden keine Protonen in den Intermembranraum transportiert. Komplex II enthält das Enzym Succinatdehydrogenase, welches die

IV werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Somit ist die Innenseite der inneren Mitochondrienmembran negativ und die Außenseite positiv geladen. Der hierdurch entstehende Protonengradient treibt die ATP-Synthase (Komplex V) an. Die aus der Reduktion von NADH entstandenen Elektronen (rot-gestrichelte Linie) fließen über Komplex I, Coenzym Q (nicht dargestellt), Komplex II, Cytochrom c (nicht dargestellt) und Komplex IV, wobei H₂O entsteht [31].

In der Gesamtbilanz bedeutet das, dass pro NADH/H⁺ 10 Protonen in den Intermembranraum gepumpt werden und daraus circa 2,5 Moleküle ATP generiert werden können. Durch FADH₂ werden 6 Protonen in den Intermembranraum gepumpt, was 1,5 Moleküle ATP entstehen lässt. Gleichzeitig wird durch diesen Prozess molekularer Sauerstoff verbraucht [31]. Über die Glykolyse, oxidative Decarboxylierung und den Citratzyklus können so aus 1 mol Glukose 32 mol ATP entstehen, indem der Atmungskette alle in den vorherigen Reaktionsschritten entstandenen Redoxäquivalente zugeführt werden:

I. Glykolyse



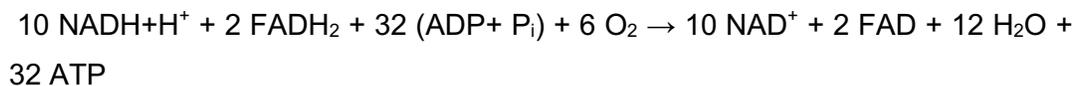
II. Oxidative Decarboxylierung



III. Citratzyklus



IV. Atmungskette



Die treibende Kraft der ATP-Synthese ist das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ über der inneren Mitochondrienmembran. Eine Veränderung des $\Delta\Psi_m$ lässt also Rückschlüsse auf den Energiestoffwechselstatus in der Atmungskette einer Zelle zu.

1.2.2 Das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$

Das mitochondriale Membranpotential gilt als Indikator für den funktionellen Status der mitochondrialen Atmungskette einer Zelle. Veränderungen im Membranpotential haben Auswirkungen auf den Zellzyklus. So kann eine niedrige ATP-Produktion und ein niedriges Membranpotential zu einer Arretierung des Zellzyklus führen. Andererseits hat aber der Zellzyklus auch Auswirkungen auf das Potential. So ist eine Erhöhung des Membranpotentials in der G₁ und S-Phase zu beobachten, was vermutlich auf den erhöhte ATP-Bedarf der Zelle in der Zellteilung hinzuweisen scheint [28]. Des Weiteren kann eine

Depolarisierung des $\Delta\Psi_m$ Autophagie einleiten und die Fusion mit anderen Mitochondrien erschweren [28]. Eine lang anhaltende Depolarisation führt unweigerlich zum Untergang des Mitochondriums [28]. Nicht nur das Überleben der Zelle, sondern auch die weitere Differenzierung wird vom mitochondrialen Membranpotential beeinflusst. Es scheint einen Zusammenhang zwischen $\Delta\Psi_m$ und dem Zelldifferenzierungsstatus zu geben. So zeigen Tumorstammzellen ein erhöhtes mitochondriales Membranpotential [32]. Im Rahmen der Zelldifferenzierung sind sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme von $\Delta\Psi_m$ beschrieben [32]. Eine eindeutige Richtung der Veränderung des Membranpotentials ist jedoch nicht erkennbar. Bezüglich der Kanzerogenität gibt es hierfür jedoch eindeutige Hinweise. Es scheint einen Zusammenhang zwischen einer Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials und der Fähigkeit Tumoren zu bilden zu geben. So haben Versuche mit Stammzellen gezeigt, dass Zellen mit einem erhöhtem $\Delta\Psi_m$ eher dazu neigen Tumoren zu bilden, anstatt zu differenzieren [33]. Außerdem ist bekannt, dass einige Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen ein höheres mitochondriales Membranpotential besitzen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die durch den Warburg Effekt erhöhte Glykolyse mit der Atmungskette um ADP und P_i konkurriert. Dadurch kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Ruhe $\Delta\Psi_m$, da der Protonengradient weniger schnell durch die ATP-Synthase abgebaut wird [34]. Doch auch unter Tumorzellen gibt es eine Veränderung des Potentials in beide Richtungen. Weniger differenzierte Tumorzellen neigen eher zu einem erniedrigtem Potential als besser differenzierte [35]. Untersuchungen zeigten zudem, dass Mitochondrien mit Hyperpolarisation seltener Apoptose eingehen und somit eine Tumorprogression begünstigt [36].

1.3 Relevante Signalwege

Die Transduktion eines extrazellulären Signals zu den Organellen innerhalb der Zelle erfolgt über diverse Signalwege. Veränderung des metabolischen Mikromilieus werden so an die einzelnen Organellen der Zelle, unter anderem die Mitochondrien, kommuniziert. Hierdurch kann die Zelle beispielsweise ihren Metabolismus an die äußeren Bedingungen anpassen. Einige Signalwege sind eng mit der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum verknüpft, womöglich unter anderem durch Einflussnahme auf die Mitochondrien.

1.3.1 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade

Die MAP-Kinase Kaskaden sind zentrale zelluläre Signalwege, die in allen eukaryotischen Zellen eine Rolle spielen und sowohl auf intrazelluläre als auch auf extrazelluläre Stimuli reagieren können. Über sie werden unter anderem Zellstress, Zelldifferenzierung,

Proliferation und Apoptose reguliert beziehungsweise induziert. Die Signalwege bestehen aus drei bis fünf kaskadenartig organisierten Proteinkinasen: der Mitogen-aktivierende Proteinkinase Kinase Kinase Kinase (MAP4K), der MAPKK Kinase (MAP3K), der MAP2K, der MAP-Kinase und der MAPK-aktivierte Proteinkinase (MAPKAPK). Ein Signal wird über eine Abfolge von Phosphorylierungen der Kinasen weitergeleitet: MAP4K phosphoryliert MAP3K, MAP3K wiederum MAP2K usw.. Die MAPK aktiviert und phosphoryliert die Zielproteine. Die ersten drei Schritte sind in allen Kaskaden vertreten, wohingegen die letzten beiden je nach Zelltyp und Stimuli vorhanden sein können oder fehlen [37]. Es sind sechs MAP-Kinase Kaskaden-Systeme bekannt: ERK1/2, Jun NH₂terminal Kinasen (JNK1/2/3), p38 (p38α/β/γ/δ), ERK7/8, ERK3/4 und ERK5 [37]. Für die Aktivierung ist die charakteristische zweifache Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosin-Rest (TGY-Motiv) in der Aktivierungsregion der Kinasen von zentraler Bedeutung. Die Signalwege haben wegen ihrer wichtigen Rolle in der Reaktion auf Stimuli Einfluss auf die Tumorentstehung und das Tumorwachstum sowie auf die Pathogenese von Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Diabetes Mellitus [38, 39]. JNK und p38 scheinen primär auf Stress- und Apoptose-Signale zu reagieren, wohin gegen ERK1/2 eher für die Differenzierung und Proliferation zuständig zu sein scheint [40]. Die drei meistuntersuchten MAP-Kinasen und ihre jeweiligen Kaskaden sind in Abb. 3 schematisch dargestellt und sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

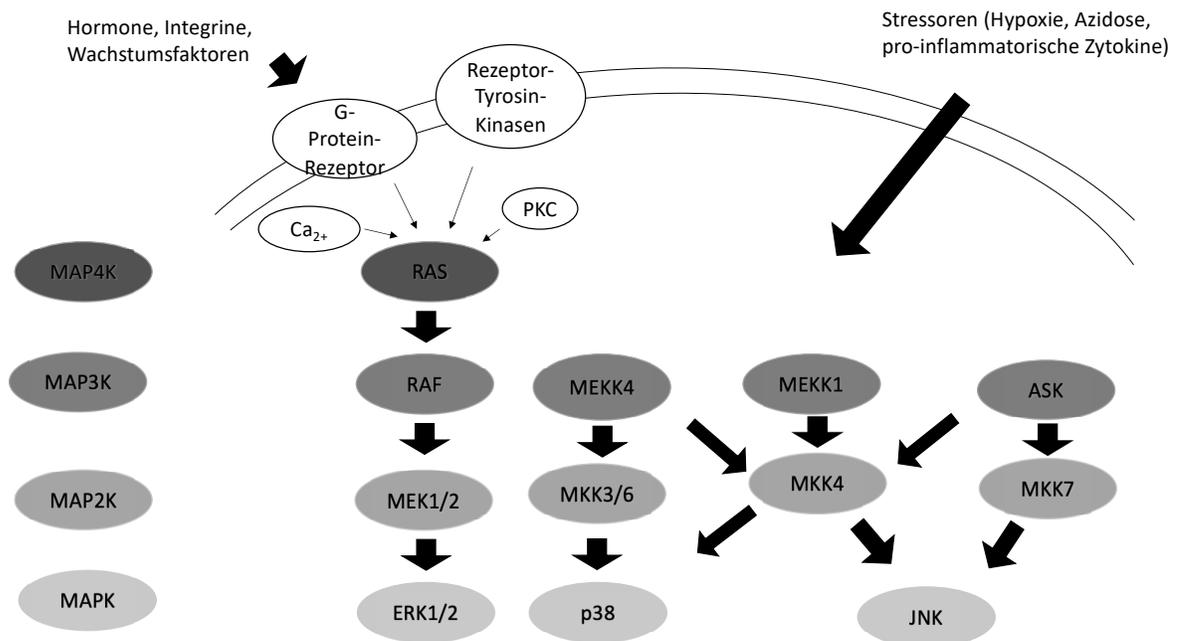


Abb. 3 Schematische Darstellung der Mitogen-aktivierenden Protein-Kinasen Kaskaden ERK1/2, p38 und JNK. Extrazelluläre Stimuli wie Hormone, Integrine oder Wachstumsfaktoren werden über G-Protein-Rezeptoren und

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen weitergeleitet und aktivieren RAS, eine MAP4K. Auch Calcium-Ionen oder die Proteinkinase C können RAS aktivieren. Andere extrazelluläre Stressoren wie Hypoxie oder Azidose können G-Protein-Rezeptor und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen unabhängig die MAP3K aktivieren. Die vier Stufen der Phosphorylierung und ihre zugehörigen Kinasen sind in von Phosphorylierung zu Phosphorylierung heller werdenden grau Stufen dargestellt. Die einzelnen MAPK-Kaskaden ERK1/2 und die JNK interagieren untereinander [37].

a ERK

Die ERK-Familie besteht aus ERK 1-6. Die extrazellulären Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 sind fast homologe Isoformen und die meist untersuchten aller MAP-Kinasen. Sie spielen vor allem in der Zellteilung, -differenzierung und -proliferation eine entscheidende Rolle. ERK1 und 2 haben ein Molekulargewicht von 42 bzw. 44 kDa. In ihrer Funktion und Regulation sind sie durch ihre molekulare Ähnlichkeit vergleichbar, weshalb ERK 1 und 2 hier gemeinsam betrachtet werden [41]. Die ERK1/2-Kaskade ist vierschichtig und wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Viren, G-Protein-gekoppelte Rezeptorliganden und Onkogene aktiviert. Die ERK1/2-Aktivierung scheint ein Zelltyp- und System-spezifischer Überlebensmechanismus zu sein. Teilweise ist die ERK-Aktivierung aber auch mit Apoptose-Induktion in Zusammenhang gebracht worden [42]. Ras, die MAP4K, kann durch Ca^{2+} , Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (z.B. der EGF-Rezeptor), PKC-vermittelte oder G-Protein-gekoppelte Rezeptor aktiviert werden. Das aktivierte Ras phosphoryliert nun Raf, die MAP3K. Danach erfolgt die Aktivierung von MEK 1 und 2, die wiederum ERK1 und 2 phosphorylieren und aktivieren. Phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) kann durch das Entfernen der beiden Phosphatgruppen wieder inaktiviert werden. ERK1/2 ist im Zytoplasma lokalisiert. Nach Aktivierung kann pERK in den Zellkern transloziert werden und dort Transkriptionsfaktor-Aktivität und Genexpression beeinflussen [40]. ERK1/2 scheint auch in den mitochondrialen Stoffwechsel von Zellen einzugreifen. Es gibt Hinweise, dass ERK1/2 Komplexe mit Enzymen des Lipidstoffwechsels bildet und darüber regulierend in die mitochondriale Oxidation eingreift. Es besteht auch die Möglichkeit, dass ERK1/2 über die Bindung an eine Untereinheit der ATP-Synthase die oxidative Phosphorylierung moduliert [43]. Es wird davon ausgegangen, dass ERK1/2 hierzu direkt an die Mitochondrien bindet und vom Zytosol in die Mitochondrien übertritt [42]. ERK1/2 kann die Mitochondrienaktivität aber auch über die Regulation der Translation mitochondrialer Proteine beeinflussen. Zudem scheinen sich ERK1/2 und seine MAP2K in Mitochondrien in aktiviertem Zustand anzureichern. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unklar, da noch kein Teil der ERK1/2-Kaskade bekannt ist, der für die Translokation verantwortlich sein könnten [41]. ERK1/2 kann sich auch in andere Zellorganellen verlagern, um dort seine

Substrate zu erreichen. Dazu gehören das Endoplasmatische Retikulum, die Endosomen und der Golgiapparat [44].

b p38

p38 wurde als stimulierender Faktor von $\text{TNF}\alpha$ entdeckt und ist für seine Rolle als Vermittler von Zellstress wie Entzündungen oder Hypoxie bekannt. Über die p38-Kaskade werden Transkriptionsfaktoren für Gene der Stressantwort reguliert. Zudem kann p38 die Zytokin-Produktion anregen und RNA-splicing modulieren. Mittlerweile ist aber auch bekannt, dass der p38-Signalweg Einfluss auf Zelldifferenzierung, -alterung, -tod und den Zellzyklus hat [45]. Es sind vier Isoformen von p38 im menschlichen Gewebe bekannt (α , β , γ und δ). Obwohl sie sich in ihrer Sequenz sehr ähneln, bestehen doch deutliche Unterschiede der Expression in verschiedenen Geweben. Auch gibt es Unterschiede bezüglich ihrer Aktivatoren und ihrer Effektorproteine [46]. Die verschiedenen Isoformen sind in unterschiedlichen Organellen einer Zelle nachweisbar und haben teilweise gegensätzliche Effekte auf gleiche Substrate [45]. p38 spielt eine entscheidende proinflammatorische Rolle in vielen chronischen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Asthma bronchiale, Psoriasis und Morbus Crohn [47]. Verschiedene p38-Inhibitoren befinden sich momentan in der klinischen Prüfung für die anti-inflammatorischen Therapie dieser Erkrankungen [48]. Auch in neurodegenerativen, kardiovaskulären und onkologischen Erkrankungen sowie bei Diabetes mellitus ist der p38-Signalweg beteiligt. Bei Krebserkrankungen scheint p38 als Tumorsuppressor zu wirken. Erst seine Inaktivierung führt zu einer gesteigerten zellulären Transformation [49]. Besonders durch seine Rolle als Checkpoint-Inhibitor, durch welche es über Zellzyklusarrest und Apoptose-Induktion sowie über Alterung oder Zellteilung entscheidet, ist er relevant für die Tumorgenese [50].

1.3.2 PI3K

Die Gruppe der Phosphoinositid-3-Kinasen sind Enzyme, die die 3-OH-Gruppe von Phosphatidylinositol an der Plasmamembran phosphorylieren. Sie wurden vor circa 25 Jahren im Zusammenhang mit der Transformationsfähigkeit von viralen Onkogenen entdeckt. Mittlerweile ist bekannt, dass PI3K in viele relevanten Prozesse der Zelle eingreift. Dazu zählen der Metabolismus und das Wachstum, sowie die Entzündungsreaktion und die Tumorentstehung. Es sind drei Klassen von PI3Ks in humanen Zellen bekannt. Klasse 1 ist untergliedert in Klasse 1A und 1B und wird am engsten mit Tumorentwicklung und Tumorstadium in Verbindung gebracht. Klasse 2 PI3Ks scheinen in der Signaltransduktion von Bedeutung zu sein, auch wenn über sie noch am wenigsten bekannt ist. Die Klasse 3 besteht nur aus einer einzigen PI3K, dem *vacuolar protein sorting 34*. Sie

ist wichtig für die Regulation zellulärer Vorgänge als Antwort auf eine sich ändernde Nährstoffversorgung der Zellen [32]. Alle PI3Ks werden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Ihr Signal wird durch Phosphorylierung der 3-Hydroxyl-Gruppe des Inositol-Rings von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) weitergeben. PIP₃ ist ein wichtiger Second Messenger, der zytosolische Proteine zur Plasmamembran befördern kann, um Proteine zu aktivieren oder diese zu deren Effektorproteinen zu transportieren. Die Zielproteine enthalten eine PH-Domäne (Pleckstrin Homologie Domäne). Eines dieser Proteine ist die Protein Kinase Akt, das bekannteste Downstream Protein von PI3K. Es spielt eine zentrale Rolle im Glukosemetabolismus sowie in der Tumorentstehung und im Tumorwachstum [33]. Den Glukosemetabolismus beeinflusst es über den mitochondrialen Stoffwechsel, da es die Expression von glykolytischen und lipogenetischen Genen erhöht und damit die Glykolyse steigert [27]. Des Weiteren stimuliert PI3K die Glukose-Aufnahme von Zellen. Wird PI3K gehemmt, wird die Glukose-Aufnahme von Zellen gehemmt und die Apoptose wird eingeleitet [8]. PI3K ist außerdem an der Mitophagie beteiligt. Es spielt eine Rolle in der Mitophagie Typ 1, die durch Nährstoffmangel ausgelöst wird, nicht aber an Typ 2, bei der defekte Mitochondrien der Ausgangspunkt sind [51]. Neben Akt gibt es aber noch weitere Effektorproteine von PI3K, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese zu spielen scheinen. Es gibt einige zelluläre Mechanismen, die zwar PI3K-abhängig, jedoch Akt unabhängig sind. Trotzdem ist der am besten untersuchte Signalweg der PI3K/Akt-Signalweg und Akt das wichtigste Zielprotein von PI3K. Durch die Aktivierung wird Akt zur inneren Zellmembran transportiert, wo es durch die *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDK1) phosphoryliert wird. Diese Modifikation wiederum aktiviert mTOR1. mTOR (mammalian target of rapamycin) ist ein Downstream Target des PI3K/Akt-Signalweges. Es ist eine Serine/Threonin Kinase und gehört der PI3K-related Protein Kinasen Familie (PIKKs) an, da sein C-Terminus große Ähnlichkeit zum katalytischen Zentrum von PI3K aufweist. mTOR wird aber auch über andere Signalwege aktiviert. Der mTOR-Signalweg verknüpft Signale wie Wachstumsfaktoren und Nährstoff- und Energieverfügbarkeit mit Zellwachstum, -überleben und -proliferation. Aus diesen Funktionen ergibt sich die Relevanz für Tumorentstehung und -wachstum. mTOR besteht aus zwei verschiedenen Proteinkomplexen: mTORC1 und mTORC2. mTORC1 wird über den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert. Seine Downstream-Proteine sind Regulatoren der ribosomalen Biogenese und Proteinsynthese. mTORC2 wird direkt von Wachstumsfaktoren aktiviert. Es phosphoryliert Akt, PKC- α und Paxillin und wirkt regulatorisch auf die Aktivität

der Signalfaktoren Rho und Rac, welche bei Zellüberleben, Zellmigration und bei der Regulation des Zytoskeletts eine Rolle spielen. mTORC1 und mTORC2 übernehmen daher physiologisch unterschiedliche Funktionen [52].

mTOR scheint ein wichtiger Akteur im Mitophagie-Prozess zu sein. Seine Suppression ist essentiell für die Einleitung der Autophagie-abhängigen Mitophagie, die über Parkin und Pink1 zu der Depolarisation der Mitochondrienmembran führt [52].

1.3.3 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C ist Mitglied der AGC Serin/Threonin Kinasen, zu der noch zwei weitere Vertreter (Proteinkinase A und Proteinkinase G) gehören. Die Familie der AGC Serin/Threonin Kinasen, zu der über 60 Enzyme gehören, sind Regulatoren überlebenswichtiger Funktionen der Zelle, unter anderem des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung, des Zellüberlebens und des Zelltods. Durch diese regulatorischen Aufgaben ergibt sich ihre Relevanz bei Karzinomen und vielen anderen Erkrankungen. Mutationen in spezifischen Genen oder Dysregulationen sind in vielen Tumoren und Erkrankungen nachweisbar. Im Menschen sind 9 Gene der PKC bekannt, die 10 Isoformen kodieren. Alle übernehmen spezifische Funktionen, sind teilweise Zelltyp-spezifisch und haben charakteristische Zielproteine [53]. Den PKCs konnte eine wichtige Position in der Tumorgenese zugeschrieben werden. Durch ihre Funktion als intrazellulärer Rezeptor für Phorbol-Ester übernehmen sie die Signaltransduktion für kanzerogene Signale. Hierdurch wurden die PKCs Ziel für die Entwicklung von Tumorthapeutika. Die bisher entwickelten Inhibitoren haben in klinischen Studien jedoch nur einen geringen therapeutischen Erfolg erzielen können [53]. Mittlerweile wird angenommen, dass die PKCs zwar das Zellüberleben fördern, jedoch deuten neuere Studien auch eine tumorsuppressive Funktion der PKCs an [54]. Deshalb könnte anstelle einer Inhibition eine Aktivierung aller Funktionen der PKCs einen besseren antitumoralen therapeutischen Effekt erzielen [55]. Grund hierfür könnte die teils entgegengesetzte Wirkung einzelner PKC-Isoformen auf die Zellen sein. So hat die PKC ϵ in Myozyten eine hemmende Wirkung auf die mitochondriale Apoptose, wohingegen die PKC δ eine Inhibierung der Mitochondrienaktivität sowie eine Aktivierung der mitochondrialen Apoptose bewirkt. Sowohl PKC δ als auch PKC ϵ regulieren die Apoptose und mitochondriale Funktion nach der Translokation an die Mitochondrien [56].

1.3.4 Calcium

Calcium-Ionen sind als Second Messenger an der Signalweiterleitung vieler fundamentaler zellulärer Prozesse beteiligt, z.B. der Zellmotilität und Apoptose. Es konnte gezeigt werden,

dass fehlerhafte Calcium-Signalweiterleitung zur Tumorentstehung beiträgt. Tumorzellen sind in hohem Maße von Calcium-Signalwegen abhängig und reagieren daher sensitiver auf Veränderungen der extrazellulären und damit auch der intrazellulären Calciumkonzentration [57]. Für eine abnorm hohe intrazelluläre Calciumkonzentration konnte der Zusammenhang mit der Entstehung maligner Prozesse gezeigt werden [57, 58]. Außerdem spielt eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration wohl eine Rolle bei der Bildung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika [59-61]. Im Allgemeinen kann festgehalten werden, dass eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration proliferative Signale verstärkt. Wenn die Konzentration jedoch über längere Zeit erhöht bleibt, wird Apoptose gefördert [57]. Gründe für einen erhöhten zytosolischen Calciumspiegel können veränderte Calciumtransporter oder Kanäle sein. Dies ist bekannt für verschiedene Entitäten und Subtypen von Tumoren wie beispielsweise von Brust-, Prostata-, Colon-, oder Bronchialkarzinomen [61]. Aber auch eine erniedrigte Calciumleitfähigkeit, die zu einer reduzierten Ca^{2+} -Konzentration führen kann, scheint in manchen Tumorentitäten ähnlich proliferative Effekte zu haben [61]. Zu bemerken ist, dass durch eine reine Hoch- oder Runterregulation der Expression von Calciumkanälen und -transportern die Calciumhomöostase nicht zwangsläufig gestört sein muss. Auch ohne die Veränderung der Expression könnte über die Veränderung der Aktivität der Kanäle eine Calciumsensitivierung der Tumorzellen erklärt werden [61]. Des Weiteren ist Calcium ein wichtiger Mediator zwischen dem Tumormikromilieu und den Tumorzellen. Die Aufgaben von Calcium in diesem Zusammenhang sowie beim Fortschreiten und bei der Metastasierung des Tumors, sind aber noch nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass Calcium-abhängige Signalwege sensitiv auf den Sauerstoffpartialdruck, den pH-Wert, Wachstumsfaktoren und andere Faktoren des Tumormikromilieus reagieren [61]. So konnte gezeigt werden, dass in Tumorzellen die intrazelluläre Calciumkonzentration deutlich sinkt, wenn diese einem sauren pH-Wert ausgesetzt werden [62]. Im Gegensatz dazu kommt es über den ASIC1 (acid-sensing ion channel 1), der beispielsweise in MCF-7 Mammakarzinimzellen exprimiert wird, bei Azidose zu einem Calciumeinstrom in die Zelle. Dies führt zu einer gesteigerten Calciumaufnahme der Mitochondrien, einer Aktivierung der Atmungskette und einer möglicherweise gesteigerten ROS-Produktion [63]. Beides zeigt eine Verknüpfung zwischen dem Mikromilieu und Calcium-Signalwegen auf, auch wenn die Effekte gegensätzlich scheinen.

2 Fragestellung der Arbeit

Die extrazelluläre Azidose ist Teil des metabolischen Mikromilieus solider Tumoren und resultiert aus den Besonderheiten des Metabolismus von Karzinomzellen. Es ist bekannt, dass der pH_e selbst Einfluss auf den Stoffwechsel von Tumorzellen hat. So steigert Azidose die β -Oxidation von Fettsäuren und die Glutaminolyse sowie den Pentosephosphat-Weg [21]. Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu untersuchen, ob die extrazelluläre Azidose auch die respiratorische Aktivität von Tumor- und Normalzellen beeinflusst. Bei diesen Untersuchungen sollten sowohl die einzelnen Schritte der Atmungskette als auch der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch analysiert werden. Hierbei war von Interesse, ob sich Tumorzellen von Normalzellen unterscheiden und ob eine Beeinflussung des extrazellulären pH zu vergleichbaren Resultaten in verschiedenen Tumorentitäten führen. Es ist bekannt, dass das extrazelluläre metabolische Milieu (und insbesondere der extrazelluläre pH-Wert) verschiedene Signalwege aktivieren kann (ERK1/2 und p38 MAP-Kinasen, PI3K/Akt, PKC, Ca^{2+} -abhängige Signalwege [22, 26]). Ebenfalls wurde bereits gezeigt, dass sie die Mitochondrienaktivität beeinflussen [43, 52, 56, 63, 64]. Daher war eine mögliche Vermittlung des Einflusses der Azidose auf den Sauerstoffverbrauch über diese Signalkaskaden eine zentrale Frage. Hierfür wurden durch Inhibitoren die verschiedenen Signalwege unterbrochen und der Einfluss des extrazellulären pH auf den zellulären O_2 -Verbrauch gemessen. Da außerdem bekannt ist, dass einige Signalfaktoren bei Aktivierung an die Mitochondrien translokiert werden und dort z.B. nach Bindung ihre Wirkung entfalten, sollte die Frage beantwortet werden, ob es durch die Azidose zu einer Aktivierung der Signalwege im mitochondrialen Kompartiment der Zellen kommt oder ob die aktivierten Signalfaktoren im Zytosol verbleiben.

Um zu überprüfen, ob die Azidose-abhängige Beeinflussung der Zellatmung auch zu funktionellen Veränderungen des Energiestoffwechsels führt, wurde als Parameter der mitochondrialen Aktivität das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ gemessen, welches die treibende Kraft für die ATP-Synthese ist. Hier sollte systematisch der Einfluss der Azidose aber auch der verschiedenen Signalwege auf die Änderung des $\Delta\Psi_m$ analysiert werden, von der bekannt ist, dass sie mit der Tumorgenese in Verbindung steht [33, 36].

Aus den Schlussfolgerungen dieser Untersuchungen sollte analysiert werden, ob eine Modulation bestimmter Signalwege in azidotischen Tumoren einen Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel hat und sich daraus eventuell therapeutische Ansätze für die Beeinflussung von Zellzyklus, Proliferation oder Apoptose ergeben.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Materialien

3.1.1 Zelllinien

AT-1-Zellen	Ratten R-3327 Dunning Prostata-Karzinomzellen subline CLS # 500121, CLS GmbH, Eppelheim, Germany
NCL-H358-Zellen	humane Bronchialkarzinomzellen American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA CRL-2134
MCF-7-Zellen	humane Mammakarzinomzelle, CLS GmbH, Eppelheim, Deutschland, # 300273
NRK-49F-Zellen	Normale Ratten Nieren Fibroblasten, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, CRL-1570

3.1.2 Geräte

Brutschrank	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
CASY® Cell Counter + Analyser	OMNI Life Science (Bremen, Deutschland)
Cytation 3 imaging reader	BioTek Instruments, Inc. (Winooski, USA)
Elektrophorese (Consort E835)	Firma A. Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer (Minigel Twin)	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Infinite®	Tecan Trading AG (Männedorf, Schweiz)
Mikroskop Nikon TMS	Nikon (Tokio, Japan)
Reinraumbank	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Thermoblock Thermo-Shaker TS-100	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Trans-Blot® Turbo™ Tranfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)
Ultrasonic processor UP100H	Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow, Deutschland)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, USA)
Wasserbad (GFL 1083)	GFL (Burgwedel, Deutschland)
WB-Floureszenzdetektionsgerät Odyssey	LI-COR Biosciences; Lincoln; USA

Zentrifuge CS-15R

Zentrifuge Heraeus Fresco 21

Zentrifuge MiniStar silverline

3.1.3 Materialien

15-/50-ml-Zentrifugenröhrchen

Cell Culture Microplate Seahorse XF96

Filterpapiere

Filterspitzen

Glas Pestile

Nitrozellulosemembranen

Pipetten

Pipettenspitzen

Reaktionsgefäße

Zellkulturschalen

3.1.4 Computerprogramme

i-control 1.11

Image Studio™ Lite 5.2

Microsoft Excel

Odyssey Application Software 3.0

Seahorse Wave Controller Software 2.4.2

Seahorse Wave Desktop Software

Sigma Plot 12.5

3.1.5 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Aqua Sigma

BIM1

Bovine Serum Albumin (BSA)

Bromphenolblau

CaCl₂

Beckmann (Krefeld, Deutschland)

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

VWR International bvba (Leuven, Belgien)

Corning (New York; USA)

Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

GE Healthcare (Chicago; USA)

Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)

Kontes Scientific Glassware/Instruments
(Vineland, USA)

GE Healthcare (Chicago; USA)

Eppendorf (Hamburg; Deutschland)

Eppendorf (Hamburg; Deutschland)

Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)

Corning (New York; USA)

Tecan (Männedorf; Schweiz)

LI-COR Biosciences (Lincoln; USA)

Microsoft Corporation (Redmont, USA)

LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)

Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

Systat Software (Erkrath; Deutschland)

Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)

Carl Roth GmbH und Co KG. (Karlsruhe,
Deutschland)

Sigma-Aldrich (München; Deutschland)

Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Capricorn Products LLC (Portland, USA)

SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg,
Deutschland)

Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

CASYton- Lösung	OLS OMNI Life Science (Bremen, Deutschland)
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Honeywell Specialty Chemicals Seelze (Seelze, Deutschland)
DMEM- Medium	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
EDTA Titriplex III	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
ERK1/2 Antikörper Maus	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA); Bestellnummer: 4696
Ethanol 70%	WALTER-CMP GMBH & CO. KG (Kiel, Deutschland)
FCCP	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
FCS	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Glukose	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Glutamin	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Glycerol	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
HSP90 Antikörper Ratte	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA); Bestellnummer: 9101
Isopropanol	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
JC-1 (CBI ₂ (3))	Molecular Probes, Inc. (Eugene, USA)
KCl	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ly294002	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
MEM - Medium	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
MES	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Methanol	Carl Roth GmbH und Co KG. (Karlsruhe, Deutschland)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Milchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Carl Roth GmbH und Co KG. (Karlsruhe, Deutschland)

NaF	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
NaHCO ₃	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Nonidet P40	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
pERK1/2 Antikörper Ratte	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA); Bestellnummer: 4874
PMA	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Ponceaurot	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Proteinmarker Page Ruler	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
Rapamycin	Selleck Chemicals (Houston, USA)
RPMI 1640 Medium w/o L-Glutamin, Calcium free	Biozol Diagnostica GmbH (Eching, Deutschland)
RPMI 1640 Medium w/o L-Glutamine Salzsäure HCl 1M	PAN-BioTec GmbH (Aidendach, Deutschland) Carl Roth GmbH und Co KG. (Karlsruhe, Deutschland)
SB203580	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
SDS (sodium dodecylsulfate)	Carl Roth GmbH und Co KG. (Karlsruhe, Deutschland)
Sucrose	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
TEMED	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Trans-Blot Turbo 5x Transferpuffer	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)
TRIS	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH und Co KG. (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
U0126	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
VDAC Antikörper Ratte	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA); Bestellnummer: 4661
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Ziege Anti-Maus Antikörper 680RD	LI-COR® Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) Bestellnummer: 926-68070

Ziege Anti-Ratte Antikörper 620CW

LI-COR® Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA)
Bestellnummer: 926-32211

3.1.6 Verwendete Puffer/Lösungen:

Blockierungslösung	5% (w/v) Milchpulver in TBS-T
CASYton©	Isotonischer Puffer für die Zellzählung
EDTA-Lösung	0,7 mmol/l EDTA; 1,5 mmol/l KH_2PO_4 ; 2,7 mmol/l KCl; 140 mmol/l NaCl; 6,5 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
HEPES Puffer (pH 7,4)	24 mM NaHCO_3 ; 0,8 mM Na_2HPO_4 ; 0,2 mM NaH_2PO_4 ; 86,5 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,2 mM CaCl_2 ; 0,8 mM MgCl_2 ; 20 mM (4,76 g/l) HEPES; 11 mM (2,18 g/l) Glukose
Homogenisierungspuffer	10mM Tris-HCl; 0,25 Sucrose, 0,2 mM EDTA, 0,1% Protease Inhibitor Mixture
Laufpuffer	25 mmol/l Tris-Base; 192 mmol/l Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
MES-Puffer (pH 6,6)	4,5 mM (0,38 g/l); NaHCO_3 ; 0,8 mM Na_2HPO_4 ; 0,2 mM NaH_2PO_4 ; 106 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,2 mM CaCl_2 ; 0,8 mM MgCl_2 ; 20 mM (3,91 g/l) MES; 11 mM (2,18 g/l) Glucose
PBS:	140mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,5mM KH_2PO_4
Primärantikörperlösung:	5% (w/v) BSA in TBS-T; Primärantikörper in jeweiliger Verdünnung
Proteinlysepuffer:	0,05M Tris (Base); 0,15 M NaCl, 1% Nonidet P-40; 0,2% Protease Inhibitor Mixture; 1mM Natriumorthovanadat; 15 mM NaF
Redmix (Laemmli-Puffer):	1,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 30 % (w/v) SDS; 15 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 3,6 mM Glycerol; HCl zur Titration auf pH 6,8
Sekundärantikörperlösung:	Blockierungslösung; Sekundärantikörper in jeweiliger Verdünnung

TBS-Puffer:	17 mmol/l Tris-HCl; 3 mmol/l Tris-Base; 14 mmol/l NaCl; HCl zur Titration auf pH 7,6
TBS-T:	0,01% (v/v) Tween-20 in TBS
Transferpuffer:	20 % MeOH; 25 mM Tris; 192 mM Glycin
Trypsin-Lösung:	140mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O; 1,5mM KH ₂ PO ₄
Turbotransferpuffer:	25 mmol/l Tris-Base; 192 mmol/l Glycin; 20 % (v/v) Methanol

3.1.7 Kits

BCA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Extracellular Flux Essay Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

3.2 Zellkultur

Für die *in vitro* Versuche wurden drei Tumorzelllinien (AT-1-Zellen, MCF-7-Zellen und NCL-H358-Zellen) und eine normale Zelllinie (NRK-49F-Zellen) verwendet. Alle Zelllinien sind adhärenente, als Monolayer wachsende Zellen und wurden zweimal pro Woche kurz vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Die Kultivierung erfolgte in angefeuchteter Luft mit 5% CO₂ bei 37°C. Für alle Versuche wurden die Zellen in Petrischalen angesät. Die Arbeit an der Zellkultur erfolgte stets an einer sterilen Werkbank und unter Beachtung der Regeln des sterilen Arbeitens.

3.2.1 Zelllinien

a **AT-1-Zellen** (Sublinie AT-1 des R-3327 Dunning Prostata-Karzinoms der Ratte)

Die Zellen wurden ursprünglich 1961 von W.F. Dunning aus einem Prostatakarzinom einer 22 Monate alten Kopenhagen Ratte isoliert. AT steht für „anaplastic tumor“, da histopathologisch ausgeprägte Anaplasien zu sehen waren. Aus dieser Zelllinie entstanden mehrere Subzelllinien, unter anderem die Sublinie AT-1 R3327-Prostatakarzinomzelle, mit der hier gearbeitet wurde. Die Zellen wurden in RPMI 1640 –Medium mit 10% fetalen Kalbserum (FCS) kultiviert (Abb. 4).

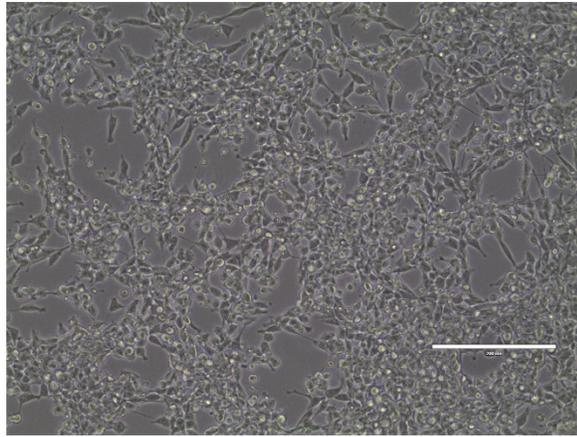


Abb. 4 AT-1-Zellen (weißer Balken = 200 μm)

b NCL-H358-Zellen (humane Bronchialkarzinom-Zellen)

A.F. Gazdar et al. haben 1981 diese Zelllinie aus einem humanen bronchio-alveolären Karzinom eines Chemotherapie-naiven, männlichen Patienten entnommen. Die Zellen zeigen Charakteristika von Clara-Zellen. Die H358-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS kultiviert (Abb. 5).

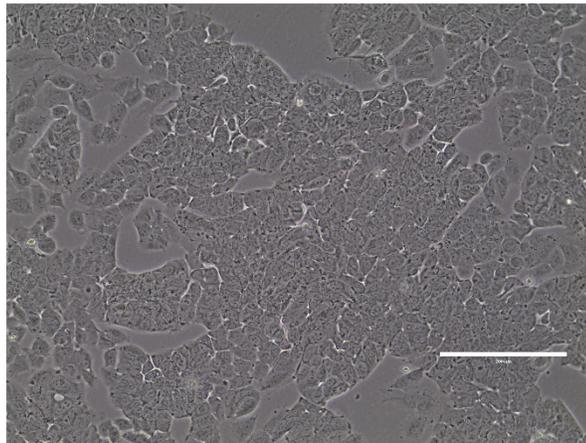


Abb. 5 H358-Zellen (weißer Balken = 200 μm)

c MCF-7-Zellen (humane Mammakarzinom-Zellen)

MCF7-Zellen stammen aus einem humanen Adenokarzinom der Mamma einer 69-jährigen, kaukasischen Frau. Die Kultivierung erfolgte in MEM-Medium mit 10% FCS (Abb. 6).

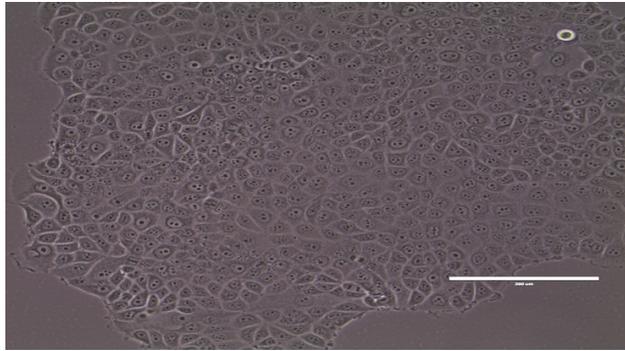


Abb. 6 MCF-7-Zellen (weißer Balken = 200 μm)

d **NRK-49F-Zellen** (NRKF, normale Ratten Nieren Fibroblasten)

Als nicht tumoröse Zelllinie wurden Fibroblasten der Rattenniere (*Rattus norvegicus*) verwendet. Diese Zellen wurden in DMEM mit 5% FCS kultiviert (Abb. 7).

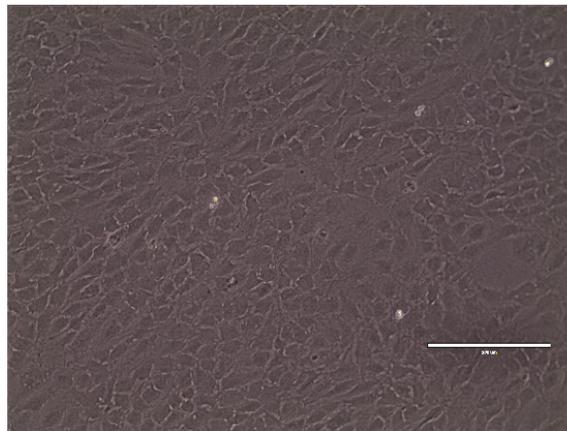


Abb. 7 NRK-49F-Zellen (weißer Balken = 200 μm)

3.2.2 Mediumwechsel und Passagieren

Das Passagieren erfolgte durch Absaugen des Mediums und anschließendes Waschen der Zellen mit 6 ml EDTA-Lösung pro 90 mm Petrischale. Anschließend erfolgt die Inkubation mit 0,5 ml Trypsin-Lösung pro Petrischale, wodurch sich die Zellen von der Oberfläche ablösen. Die Inkubationszeit betrug je nach Zelllinie eine bis zehn Minuten. Die Zellen wurden dann in dem entsprechenden Medium resuspendiert und in einer Dichte von 0,1-0,5 ml Zellsuspension in 10 ml neuem Medium angesät. Insbesondere AT-1-Zellen haben einen hohen Nährstoffverbrauch, sodass nach 72 Stunden ein Mediumwechsel, also das Absaugen des alten und Ersetzen durch 10 ml frisches Medium, notwendig war. Der Zustand der Zellen und die Zelldichte wurde regelmäßig unter dem Mikroskop geprüft.

3.2.3 Herstellen des pH-Mediums

Um für die Versuche Bedingungen mit einem stabilen pH zu schaffen, wurde für die Experimente zusätzlich gepuffertes Medium verwendet. Hierfür wurde dem jeweiligen

Medium (DMEM, RPMI und MEM) zunächst 10 mmol/l HEPES und 10 mmol/l MES zugesetzt, um die Pufferkapazität zu erhöhen. Diesen pH-Medien wurde kein FCS zugesetzt. Um den Einfluss des extrazellulären pH-Werts auf die mitochondriale Funktion zu untersuchen, wurde das gepufferte Medium mit Natriumhydroxid (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl) auf einen pH von 7,4 bzw. 6,6 titriert und anschließend im Brutschrank mit 5% CO₂ äquilibriert. Der Vorgang der Titration und Äquilibration wurde mehrmals wiederholt, bis sich der pH auf dem gewünschten Wert stabilisiert hatte. Die Lagerung dieser Medien erfolgte gekühlt bei 8°C. Vor jedem Versuch wurde das jeweilige pH-Medium für 24 Stunden erneut im Brutschrank mit CO₂-inkubiert und danach nochmals mit dem NaOH bzw. HCl eingestellt.

3.3 Allgemeiner Versuchsaufbau

Das Ansäen der Zellen in der jeweiligen Dichte erfolgte am Vortag der Versuche in Nährmedium mit FCS. 24 Stunden später wurde ein Mediumwechsel zu dem jeweiligen Minus-Medium (ohne FCS) mit unterschiedlichen pH-Werten vorgenommen. Die Zellen wurden für drei Stunden in den wie oben erläuterten gepufferten Medien bei pH 6,6 bzw. 7,4 inkubiert. Über diesen Zeitraum erfolgte auch die Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren bzw. Aktivatoren der verschiedenen Signalwegen. Für die Versuche zum Einfluss der Ca²⁺-Konzentration wurde Ca²⁺-freies Medium mit einem pH von 7,4 verwendet. Für die Messungen ohne Inhibitoren der Signalwege wurde dem Medium eine vergleichbare Menge des Lösungsmittels (DMSO) zugesetzt.

3.4 Sauerstoffverbrauchsmessung

Für die Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs wurde der Agilent Seahorse XFp Cell Mito Stress Test verwendet [65]. Es handelt sich um ein Lebend-Zell-Assay. Gemessen wurde der Sauerstoffverbrauch im zeitlichen Verlauf unter verschiedenen Bedingungen. Der Sauerstoffverbrauch wurde durch Sensoren erfasst, die über entsprechende O₂-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe den O₂-Partialdruck (pO₂) in einer abgeschlossenen Messkammer von speziellen 96-Well-Kulturplatte gemessen haben [66-69] (Abb. 8).

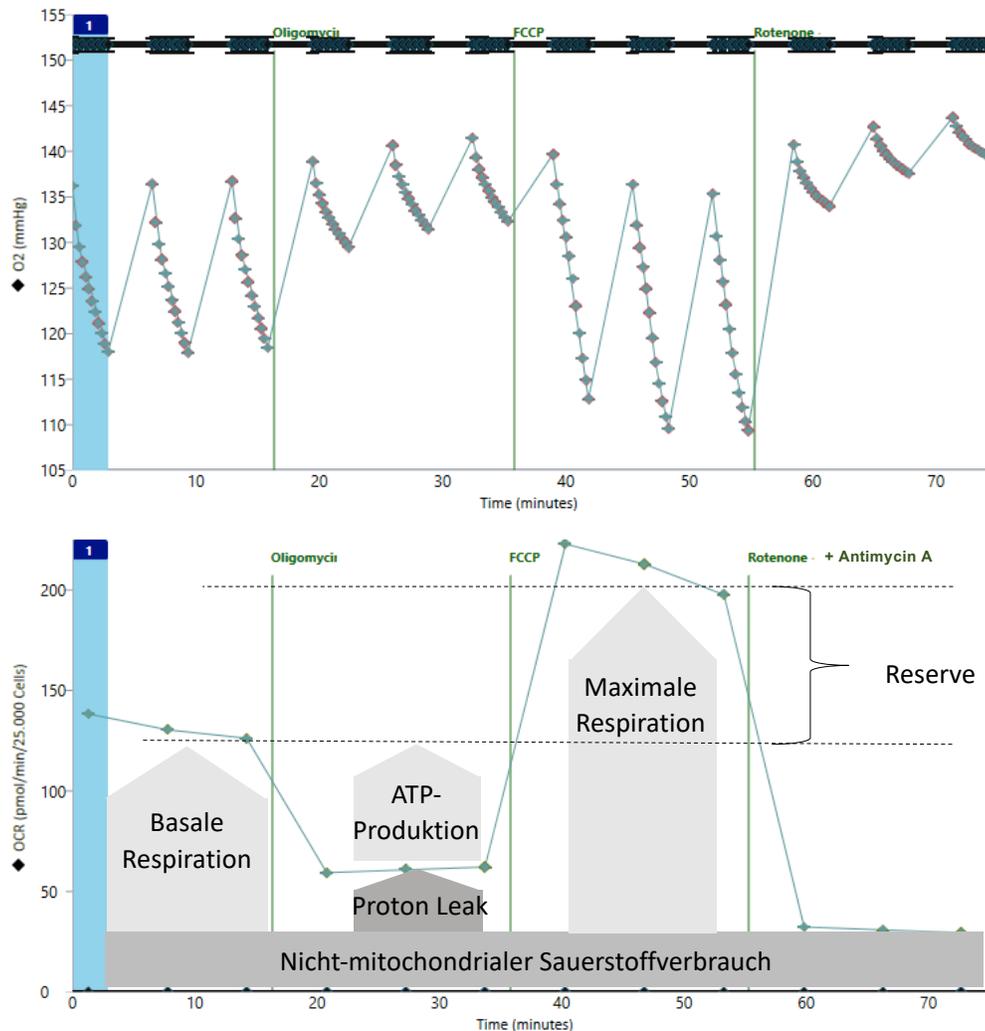


Abb. 8 Beispielhafte O₂-Verbrauchsmessung am Seahorse XF96 mit dem Mito Stress Kit. Oben: Messung des O₂-Partialdrucks in Abhängigkeit der Zeit unter 4 Messbedingungen (1. Kontrolle und nach Zugabe von 2. Oligomycin, 3. FCCP, 4. Rotenone und Antimycin A) jeweils 3-mal pro Bedingung; Unten: Sauerstoffverbrauch (OCR) in pmol/min/25.000 Zellen in Abhängigkeit der Zeit und den daraus zu entnehmenden Größen. Nacheinander wird der Sauerstoffverbrauch unter den oben genannten 4 Bedingungen 3-mal in Folge gemessen. Der nicht mitochondriale Sauerstoffverbrauch bleibt nach Zugabe der vier Inhibitoren übrig und wird von allen anderen Parametern des Sauerstoffverbrauchs abgezogen, da diese sich alle auf die Mitochondrien beziehen. Nach Abzug verbleibt die basale mitochondriale Respiration in Messbedingung 1, das Protonen Leak (Protonenleck) nach Zugabe von Oligomycin (Messbedingung 2) und die maximale mitochondriale Respiration nach der Zugabe von FCCP (Messbedingung 3). Der für die ATP-Produktion verbrauchte Sauerstoff errechnet sich aus der Differenz des Protonen Leaks zur basalen mitochondrialen Respiration

Für die O₂-Verbrauchsmessung wurden zunächst die jeweiligen Zellen in einer Dichte von 321.500 Zellen/ml auf den 96-Well Platte angesät. Die Zell-Zählung erfolgte automatisiert am Casy TT Cell Counter. In jedes Well wurden 80 µl Zell-Medium-Suspension gegeben

und die Zellen wurden für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das Medium wie folgt durch entsprechendes Minus-Medium ersetzt: Für azidotische Bedingungen mit pH 6,6 Medium und für Kontrollbedingungen mit pH 7,4 Medium. Die Inhibitoren bzw. Aktivatoren wurden in der jeweiligen Konzentration hinzugegeben. Nach 2 h Inkubation wurden zusätzliche 100 µl des gleichen Mediums mit zusätzlich 20 mM Glutamin hinzugefügt, sodass ein Volumen von 180 µl in jedem Well vorlag. Um den Sauerstoffverbrauch der Zellen messen zu können, war es wichtig, dass die Messung in einem luftdichten Raum erfolgte. Andernfalls würde stetig Sauerstoff aus der Umgebungsluft in das Medium diffundieren und das Ergebnis verfälschen. Deshalb hatten die verwendeten Zellkulturplatten eine spezielle Form, wobei der untere Teil jedes Wells schmaler war (Abb. 9). Bei jeder Messung fuhren O₂-Sensoren in das Well und schlossen diesen Teil zu einer 2,28 µl großen Mikrokammer ab [70]. Die Messung bezog sich auf den Sauerstoffverbrauch in dieser Mikrokammer. Am Ende jeder Messung (vor Beginn der nächsten) wurde der Einsatz mit den Sensoren mehrfach hoch und runtergefahren, damit das Medium wieder gut durchmischt und mit Luftsauerstoff äquilibriert wurde. Abbildung 9 zeigt schematisch die Stellung der Sensoren in der Ruhephase (links) und während der Messphase (rechts).

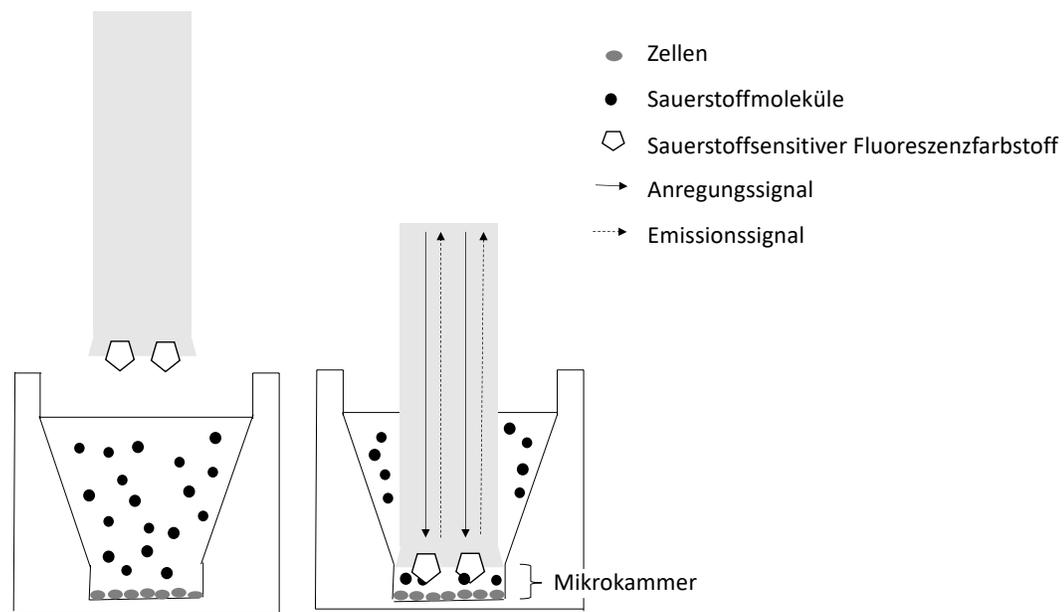


Abb. 9 Schematische Darstellung der Funktionsweise der Sauerstoffverbrauchsmessung. Auf der linken Seite ist die Ausgangslage vor Messung des Sauerstoffverbrauchs dargestellt. Der Sensor mit seinem sauerstoffsensitiven Fluoreszenzfarbstoff ist noch nicht in das Well eingetaucht, Sauerstoff kann frei in das Medium diffundieren. Zur Messung taucht der Sensor nun in das Well ein, sodass eine luftdicht abgeschlossene Mikrokammer direkt über dem Zellrasen entsteht und der Sauerstoffpartialdruck über die Ermittlung des Emissionssignals gemessen werden kann.

Die O_2 -Verbrauchsmessung erfolgte unter vier Messbedingungen, bei denen unterschiedliche Komplexe der Atmungskette durch Inhibitoren blockiert wurden (Abb. 10): (1) der basale Sauerstoffverbrauch, (2) nach Zugabe von Oligomycin ($2 \mu\text{M}$), (3) FCCP ($2 \mu\text{M}$) und (4) Antimycin A/Rotenon (AA/Ro; $0,5 \mu\text{M}$). Für jede Messbedingung erfolgten jeweils 3 Messungen à 3 Minuten mit 3 Minuten Abstand. Oligomycin, FCCP und AA/Ro wurden automatisiert durch das Agilent Seahorse System zugegeben (Abb. 8). Die Messung erfolgte voll automatisiert und die Platten wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet. Mit diesem Messprotokoll war es möglich, alle Teilschritte der Atmungskette, die entsprechend der Theorie von Mitchell [71] zur oxidativen Phosphorylierung führen, einzeln zu analysieren. Für die Identifizierung der einzelnen Prozesse des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurden nacheinander die genannten Inhibitoren der verschiedenen Komplexe der Atmungskette den Zellen zugeben. Mit dem gesamten Protokoll lässt sich der basale O_2 -Verbrauch, der für die ATP-Synthese genutzte Anteil der Atmung, den Verlust durch Protonenlecks (Protonen Leak), die maximale Respiration und die mitochondriale Reservekapazität bestimmen. Schließlich ist es mit diesem Protokoll auch möglich, den nicht-mitochondrialen O_2 -Verbrauch zu bestimmen.

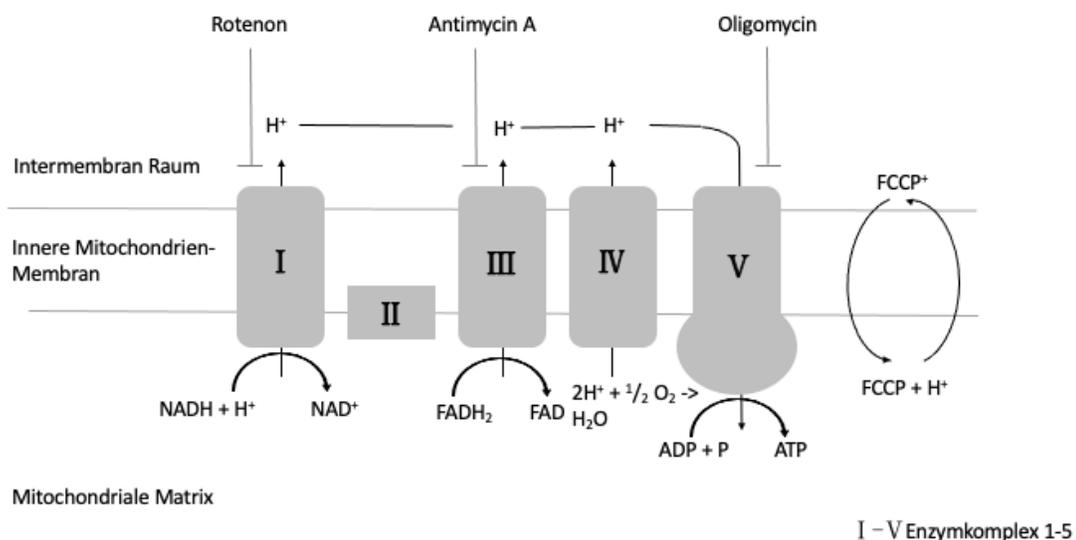


Abb. 10 Schematische Darstellung der Angriffspunkte der in der Sauerstoffverbrauchsmessung verwendeten spezifischen Inhibitoren für die verschiedenen Komplexe der Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran. Komplex I wird durch Rotenon gehemmt, Komplex II durch Antimycin A und Komplex V durch Oligomycin. FCCP entkoppelt die Atmungskette, indem es den Protonengradienten durch die Verlagerung von Protonen von dem Intermembranraum in die Mitochondrien Matrix abbaut.

Normierung der Zellzahl

Um zu berücksichtigen, dass in jedem Well unterschiedlich viele Zellen vorliegen, erfolgte eine Normierung des Sauerstoffverbrauchs auf die tatsächlich im Well befindlichen Zellen. Hierzu wurden nach Abschluss der gesamten O₂-Verbrauchsmessung die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342 (Konzentration von 20 mM) angefärbt. Hoechst 33342 interkaliert mit der DNA der Zellen und lagert sich so im Zellkern an. Gebunden an DNA liegt das Absorptionsmaximum bei 355 nm; das Emissionsmaximum bei etwa 465 nm. Aus der Fluoreszenz ließ sich die Zellzahl in jedem Well bestimmen.

3.5 Verwendete Inhibitoren und Aktivatoren

Um zu untersuchen, ob MAP-Kinasen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen unter azidotischen bzw. Kontrollbedingungen haben, wurden unterschiedliche Inhibitoren und Aktivatoren der verschiedenen Signalwege eingesetzt. Für die Hemmung von ERK1/2 wurde U0126 in einer Konzentration von 10 µM verwendet. U0126 inhibiert MEK1/2, welches wiederum ERK1/2 aktiviert. Für die ERK1/2-Aktivierung wurde sowohl PMA (1 µM) als auch EGF (100 µg/l) verwendet. Die Hemmung von p38 wurde über SB203580 (10 µM) erreicht, welches die katalytische Aktivität von p38 hemmt.

Andere untersuchte Signalwege waren der PI3K/Akt-Signalweg und die Proteinkinase C (PKC). PI3K wurde mit Ly294002 gehemmt. Eingesetzt wurde es in einer Konzentration von 50 µM. mTOR wurde über Rapamycin (200 nM) gehemmt. Eine Hemmung der Proteinkinase C erfolgte durch Zugabe von BIM-1 (1 µM).

Alle Modulatoren, außer EGF (gelöst in Wasser), wurden in DMSO gelöst. Da DMSO das Zellwachstum über Veränderungen des Zytoskeletts beeinflussen kann, wurde für die Kontrollgruppe ein gleiches Volumen an DMSO zugefügt.

3.6 ERK1/2-Aktivitätsmessung

Für die Bestimmung der ERK1/2-Aktivität wurde der Quotient aus phosphoryliertem ERK1/2 (pERK) zum Gesamt-ERK1/2 (ERK1/2) gebildet. Hierfür musste der Proteingehalt von ERK und pERK1/2 gemessen werden. Die Messung erfolgte mittels Western-Blot und umfasste drei Schritte:

3.6.1 Proteinisolation

Die Zellen wurden in 60 mm Petrischalen angesät und 24 Stunden kultiviert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel zu Minus-Medium des jeweiligen pH-Werts. Diesem Medium waren gegebenenfalls die entsprechenden Aktivatoren beziehungsweise Inhibitoren zugefügt. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel (DMSO) inkubiert worden waren. Nach dreistündiger Inkubation wurden die Zellen mit 4°C kaltem PBS

gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in zweifach Redmix lysiert und durch mehrfaches Auf- und Abziehen in einer 20 G Kanüle geschert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Dies diente der Denaturierung der Proteine. Das Zelllysat konnte nun bei -20°C aufbewahrt werden.

3.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht. Polyacrylamid diente als Trägermedium und je nach der verwendeten Konzentration entstehen Gele mit unterschiedlicher die Porengröße. Die denaturierten Proteine bilden Komplexe mit anionischem SDS. Diese Komplexe sind negativ geladen. SDS bindet abhängig von der Polypeptidlänge (ca. 1,4 g SDS/g Protein), aber unabhängig von der Proteinsequenz. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine durch das elektrische Feld in Richtung Anode hängt somit nur von ihrem relativen Molekulargewicht ab.

Das Gel war zweiphasig aufgebaut und besteht aus den in Tabelle 1 aufgelisteten Bestandteilen. Die erste Phase der SDS-Page diente dem Sammeln der Proteine auf gleicher Höhe im Gel. Die Lysate durchliefen für 36 Minuten bei 11 mA das sogenannte Sammelgel, das eine niedrigere Konzentration (5%) an Acrylamid enthielt. In der zweiten Phase wurden die Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt. Sie durchliefen das Trenngel (12% Acrylamid) bei 22 mA für 100 Minuten. Als Marker für die Proteinmasse lief ein Proteinmarker mit, der Banden von spezifischen bekannten Molekulargewichten abbildet. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer.

	5% Sammelgel	12% Trenngel
Wasser	1700 µl	2075 µl
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	312µL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1563 µl
Acrylamid/Bisacrylamid 26:0,7	425 µl	-
Acrylamid/Bisacrylamid 29,3:0,53	-	2550 µl
10 % SDS (Natriumlaurylsulfat)	25 µl	125 µl
10% APS (Ammoniumpersulfat)	25 µl	75 µl
TEMED (Tetramethylthylenmid)	5 µl	20 µl

Tabelle 1 Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für Western-Blot

3.6.3 Western Blot

Beim Blotten wurden Moleküle, in diesem Fall Proteine, von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Erst dadurch konnten die Proteine sichtbar und auswertbar gemacht werden. Die Proteine wanderten durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld in Richtung Anode auf die Membran. Hierfür wurde der BioRad-Trans-Blot® Turbo™ Transfer System verwendet. Durch „Blockingsolution“ wurden die Proteine nachfolgend auf der Membran fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper gegen pERK1/2 (Verdünnung 1:1000) bzw. gegen ERK1/2 (Verdünnung 1:2000). Für pERK1/2 wurde ein Antikörper aus Kaninchen und für ERK1/2 ein Maus-Antikörper verwendet. Beide sind kreuzreaktiv für humanes ERK1/2 bzw. pERK1/2, um auch in den humanen Zelllinien messen zu können. Es ist wichtig, Primärantikörper von unterschiedlichen Spezies zu verwenden, um am Ende die auf der gleichen Höhe liegenden Banden unterscheiden zu können. Als Referenz für die Proteinkonzentration des Blots wurde ein HSP90-Ratte-Antikörper (Verdünnung 1:1000) verwendet. Die Inkubation mit den fluoreszierenden Zweitantikörper war der nächste Schritt. Hierbei wurde ein Anti-Maus- (700 nm; rot; Verdünnung 1:40.000) und ein Anti-Rabbit-Antikörper (800 nm; grün; Verdünnung 1:40.000) verwendet.

Die Detektion erfolgte am LI-COR Odyssey-System. Dieser misst die emittierte Fluoreszenz bei den Wellenlängen 600 nm und 800 nm. Die abschließende Auswertung wurde mit dem Programm Image Studio Lite Ver 5.2 durchgeführt. Es erfolgt eine semi-quantitative Auswertung anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals.

3.7 Mitochondrien-Isolation

Das Ansäen der Zellen erfolgt wie bei der Protein-Lysat-Herstellung der kompletten Zelle. Um am Ende ausreichend Protein zu erhalten, wurden die Zellen jedoch in 90 mm anstelle von 60 mm Petrischalen angesät. Alle nun folgenden Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Als Erstes wurden die Zellen mit 5 ml PBS versetzt und mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst. Nun wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß aufgenommen und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Das PBS wurde abgesaugt und das Pellet in 300 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde in einer Dounce-Glasgewebemühle 30–40 Mal homogenisiert. Dieser Schritt diente der Auftrennung der Zelle in ihre einzelnen Organellen. Die Suspension wurde wieder in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 x g (3000 rpm) für 4 Minuten zentrifugiert, um unlysierte Zellen, den

Zellkern und restliche Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und dieser bei 10000 x g (12000 rpm) für 10 Minuten zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand entsprach dem Zytosol. Er wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 100 µl Proteinlysepuffer resuspendiert und die enthaltenden Mitochondrien mittels Ultraschalls zerstört (Ultraschallstab: Pulsmodus Cycle: 0,5, Amplitude 100; 20 Zyklen). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 x g (14000 rpm) für 5 Minuten, um die Mitochondrientrümmmer zu entfernen. Nun wurde das Mitochondrienproteinlysate und das des Zytosols mit sechsfach Redmix versetzt. Da die Proteinkonzentration geringer war als bei Proteinlysaten der ganzen Zelle, wurde Redmix in höher Konzentration eingesetzt. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten auf 95°C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Auftrennung in einer SDS-Page und der Western-Blot erfolgten wie oben beschrieben. Zusätzlich zu den Primär-Antikörpern gegen ERK (Maus) bzw. pERK (Ratte) wurde noch ein Primärantikörper gegen den spannungsabhängigen Anionen-Kanal (voltage-dependent anion-channel) vDAC (Verdünnung 1:1000) zugeben. vDAC ist eine Pore der äußeren Mitochondrienmembran und befindet sich nur dort in der Zelle. Er diente als Qualitätskontrolle für Auftrennung von Mitochondrien und Zytosol.

3.8 BCA-Assay

Der BCA-Assay wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Die Grundlage des Assays ist Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen in Gegenwart von Peptidbindungen. Die in Abhängigkeit von der Menge der Peptidbindungen entstandenen Cu^{+} -Ionen bilden nun Farbkomplexe mit der Bicinchoninsäure (BCA). Die Komplexe wurden bei 562 nm mittels eines Photometers gemessen. Für die Messung wurden 5 µl der zu messenden Lösung, in diesem Fall Proteinlysate, in eine 96-Well-Platte pipettiert. Für den Leerwert wurde die gleiche Menge des Proteinlysepuffers zugegeben. Zusätzlich wurde eine Standardreihe mit vorverdünntem BSA in den Konzentrationen 100 mg/l, 300 mg/l, 500 mg/l, 700 mg/l, und 1000 mg/l auf die Platte gegeben. Nun wurde in jedes Well 200 µl BCA-Reagenz zugegeben. BCA-Reagenz besteht aus 50 Teilen BCA-Reagenz-A und einem Teil BCA-Reagenz B. Die 96-Well-Platte wurde nun für 30 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 562 nm in einem Photometer. Anhand der Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der eigenen Proben berechnet werden.

3.9 Messung des mitochondrialen Membranpotential $\Delta\Psi$ (MMP)

Für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) wurde ein optisches Fluoreszenz-Verfahren verwendet. Die Zellen wurden, wie bei der Messung des Sauerstoffverbrauchs, mit einer Zelldichte von 25.000 Zellen pro Well auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und nach 24 Stunden wurden die Zellen mit entsprechenden pH-gepufferten Minus-Medium (ohne FCS) und den Inhibitoren versetzt. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden. 30 Minuten vor Ende der Inkubation wurde der Farbstoff JC-1 zugegeben. JC-1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der positiv geladen ist. Durch seine positive Ladung verlagert er sich in der Zelle an das Innere der negativ geladenen Mitochondrienmembran. JC-1 verändert abhängig vom MMP das Spektrum des von ihm emittierten Lichts. Bei einem hohen MMP wandern viele JC-1-Moleküle in die Mitochondrien. Dort bilden die Monomere sogenannte „J-Aggregate“. Das Maximum des Emissionsspektrums liegt im roten Bereich bei ca. 590 nm. Bei niedrigem MMP liegt JC-1 als Monomer vor. Ihr Emissionsmaximum liegt dann im grünen Bereich bei ca. 529 nm. Das Verhältnis von grüner zu roter Fluoreszenz ist lediglich vom MMP und nicht von anderen Faktoren wie der Größe, der Form oder der Dichte der Mitochondrien abhängig. Für die Messung wurde JC-1 in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ zugefügt. Als Kontrolle wurde zudem noch FCCP (200 μM) in ein Well zu den Zellen gegeben. FCCP ist ein Entkoppler der Atmungskette und hebt das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran auf. FCCP diente als Kontrolle, ob die Potentialmessung an sich funktioniert hat (Negativkontrolle). Nun erfolgte die Messung der JC-1 Fluoreszenz. Durch den Vergleich des Verhältnisses von roten zum grünem Fluoreszenzsignal konnte eine Aussage über eine relative Zu- oder Abnahme des MMP nach Zugabe der unterschiedlichen Substanzen getroffen werden.

3.10 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Tabellen-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel und der Statistik- und Graphik-Software SigmaPlot. Die Beschreibung der Verteilungen der Messwerte erfolgte jeweils durch Angabe des Mittelwerts und des Medians sowie des Standardfehlers (SEM) und des Interquartilabstands sowie den Abstand der 10%- und 90%-Perzentile. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mittels des zweiseitigen students-t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben (in Abhängigkeit der Fragestellung). Alle Tests wurden auf dem Signifikanzniveau $\alpha=5\%$ und $\alpha=1\%$ durchgeführt. Eine α -Adjustierung erfolgte nicht, sodass die angegebenen p-Werte nur deskriptiv sind.

4 Ergebnisse

4.1 Sauerstoffverbrauchsmessung

4.1.1 Messungen unter Kontrollbedingungen

Die Untersuchung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte mittels eines Fluoreszenzsignal-Verfahrens am Seahorse XF96 Analyzer. Die Messungen zeigten bereits unter Kontrollbedingungen bei pH 7,4 zelltypspezifische Unterschiede.

a Tumorzellen hatten einen höheren Sauerstoffverbrauch

Beim Vergleich des basalen Sauerstoffverbrauchs (pro Zelle) der vier Zelllinien zeigte sich, dass Tumorzellen einen signifikant höheren mitochondrialen und nicht mitochondrialen Verbrauch aufwiesen als die verwendete Normalzelllinie (Abb. 11). Den höchsten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch hatten die MCF-7-Mamma-Karzinomzellen mit etwa $8,85 \pm 1,49$ fmol/min/Zelle, gefolgt von den H358- und AT-1-Zellen, welche annähernd halb so viel Sauerstoff verbrauchten (H358: $4,53 \pm 0,42$ fmol/min/Zelle; AT-1: $4,23 \pm 0,41$ fmol/min/Zelle). Die NRKF-Zellen hingegen verbrauchten einen Bruchteil dessen, im Schnitt $1,28 \pm 0,35$ fmol/min/Zelle.

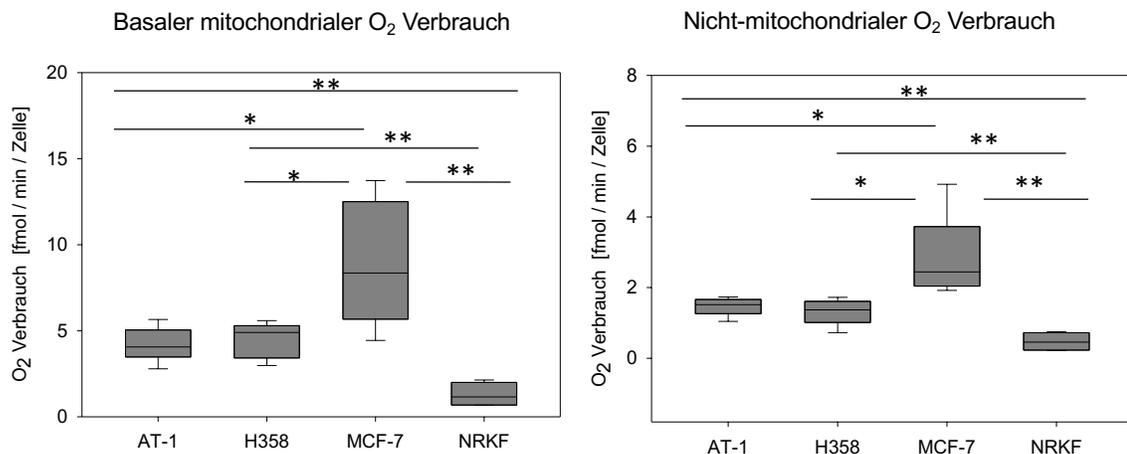


Abb. 11 Basaler mitochondrialer Sauerstoffverbrauch (links) und nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch (rechts) der AT-1-, MCF-7-, H358- und NRKF-Zellen, $n=4-11$, (*) $p<0,05$ (**) $p<0,01$

b Entkopplung der Atmungskette steigerte den Sauerstoffverbrauch zellabhängig nur gering

FCCP ist ein Entkoppler der Atmungskette und dient im Versuchsaufbau der Testung, wie viel Sauerstoff die Zellen maximal verbrauchen können. Die Differenz zum basalen Verbrauch zeigt die Reservekapazität der Zellen auf. Bei den drei Tumorzellen lag die Reservekapazität mit $2,47 \pm 0,33$ fmol/min/Zelle (AT-1-Zellen, Abb. 12), $1,53 \pm 0,36$

fmol/min/Zelle (H358-Zellen, Abb. 13) und $3,17 \pm 2,29$ fmol/min/Zelle (MCF-7-Zellen, Abb. 14) in der gleichen Größenordnung. Der basale Verbrauch lag zwischen 63% und 75% des maximalen Verbrauchs, wohingegen NRKF-Zellen unter Normalbedingungen schon das Maximum erreicht hatten (Reservekapazität von $0,04 \pm 0,09$ fmol/min/Zelle) (Abb. 15).

4.1.2 Einfluss der Azidose

Für die vier verschiedene Zellreihen wurde der Sauerstoffverbrauch unter dreistündiger extrazellulärer Azidose (pH 6,6) untersucht. Als Kontrolle dienten Normalbedingungen bei pH 7,4.

a AT-1-Zellen

Bei den Prostatakarzinomzellen konnte eine signifikante Steigerung des basalen Sauerstoffverbrauchs um >100% unter Azidose festgestellt werden (pH 7,4: $4,19 \pm 0,41$ fmol/min/Zelle; pH 6,6: $10,30 \pm 0,92$ fmol/min/Zelle; $p=0,0001$; Abb. 12). Das Protonen Leak nahm um etwa 38% zu (pH 7,4: $1,39 \pm 0,12$; pH 6,6: $2,25 \pm 0,15$; $p=0,001$). Am deutlichsten war die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs für die ATP-Synthese. So verbrauchten sie im Schnitt unter neutralem pH $2,80 \pm 0,28$ fmol/min/Zelle, im sauren Milieu $8,05 \pm 0,80$ fmol/min/Zelle ($p=0,0001$). Bei der Reservekapazität ließ sich unter Azidose ebenfalls eine Zunahme erkennen, obwohl diese statistisch nicht signifikant war (pH 7,4: $2,47 \pm 0,33$; pH 6,6: $5,03 \pm 1,55$; $p=0,14$). Der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch nahm um circa 37% zu (pH 7,4: $1,46 \pm 0,10$; pH 6,6: $2,30 \pm 0,25$; $p=0,01$).

b H358-Zellen

Der Sauerstoffverbrauch der Bronchialkarzinom-Zellen wurde durch Azidose beeinflusst (Abb. 13), jedoch waren die Änderungen gegenüber pH 7,4 zumeist nicht statistisch signifikant. Sowohl der basale als auch der an die ATP-Bildung gekoppelte O_2 -Verbrauch nahmen um 10% bzw. 30% zu. Die Reservekapazität hingegen verringerte sich signifikant (pH 7,4: $1,53 \pm 0,36$ fmol/min/Zelle; pH 6,6: $-0,44 \pm 0,26$ fmol/min/Zelle; $p=0,001$). Die Entkopplung der Atmungskette mittels FCCP konnte den Sauerstoffverbrauch der Zellen unter Azidose nicht weiter steigern. Das Protonen Leak nahm ebenfalls ab und sank von $1,68 \pm 0,09$ fmol/min/Zelle auf $1,27 \pm 0,12$ fmol/min/Zelle ($p=0,02$). Der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch nahm unter Azidose leicht ab (von $1,31 \pm 0,15$ fmol/min/Zelle auf $0,97 \pm 0,15$ fmol/min/Zelle), diese Änderung war aber nicht statistisch signifikant ($p=0,13$).

AT-1

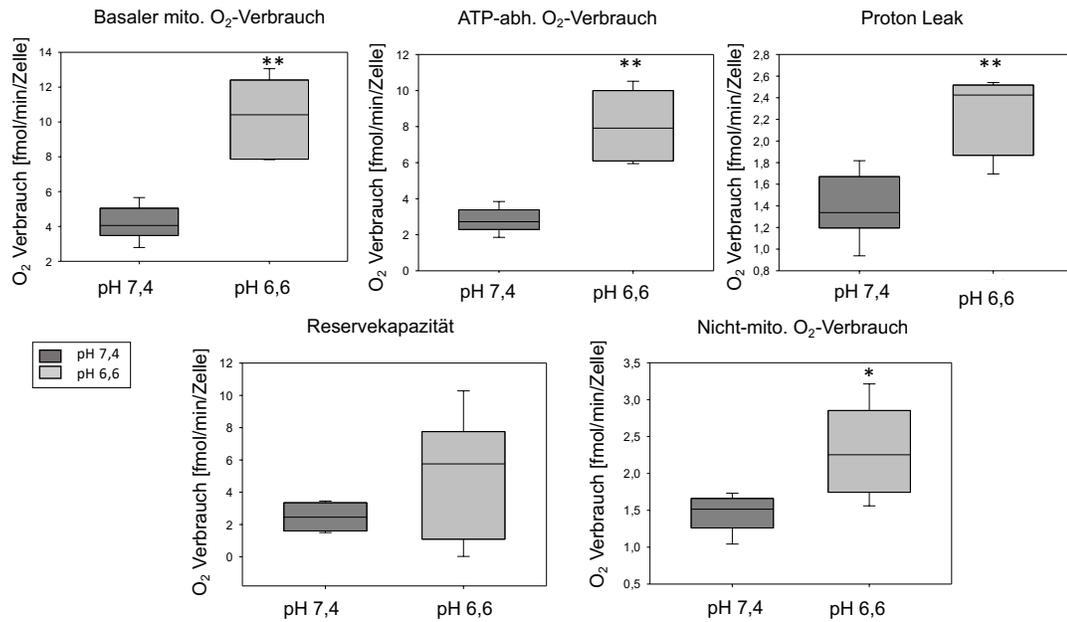


Abb. 12 Vergleich des basalen, ATP-abhängigen und des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs sowie der Reservekapazität und des Protonen Leaks bei pH 7,4 und pH 6,6 in AT-1-Zellen, n=6; (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4

H358

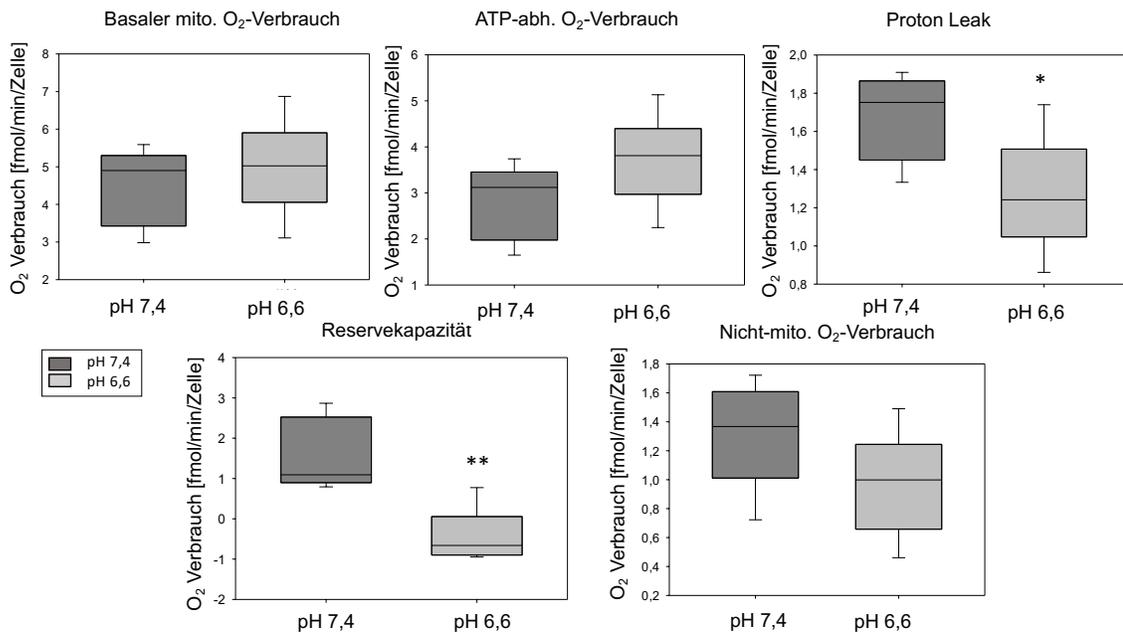


Abb. 13 Vergleich des basalen, ATP-abhängigen und des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs sowie der Reservekapazität und des Protonen Leaks bei pH 7,4 und pH 6,6 in H358-Zellen, n=6; (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4

c MCF-7-Zellen

In dieser Zelllinie hatte die Azidose keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch (Abb. 14). Lediglich beim Protonen Leak ließ sich eine leichte, signifikante Abnahme unter Azidose feststellen (pH 7,4: $3,69 \pm 0,34$ fmol/min/Zelle; pH 6,6: $2,38 \pm 0,12$ fmol/min/Zelle; $p=0,005$).

d NRKF-Zellen

Die Azidose hatte auf den Sauerstoffverbrauch der Fibroblasten keinen signifikanten Einfluss (Abb. 15). Unter Azidose zeigte sich jedoch eine leichte Steigerung des Protonen Leak ($0,32 \pm 0,08$ fmol auf $0,39 \pm 0,08$ fmol/min/Zelle, $p=0,55$) und der Reservekapazität ($0,04 \pm 0,09$ fmol/min/Zelle auf $0,44 \pm 0,25$ fmol/min/Zelle, $p=0,20$.)

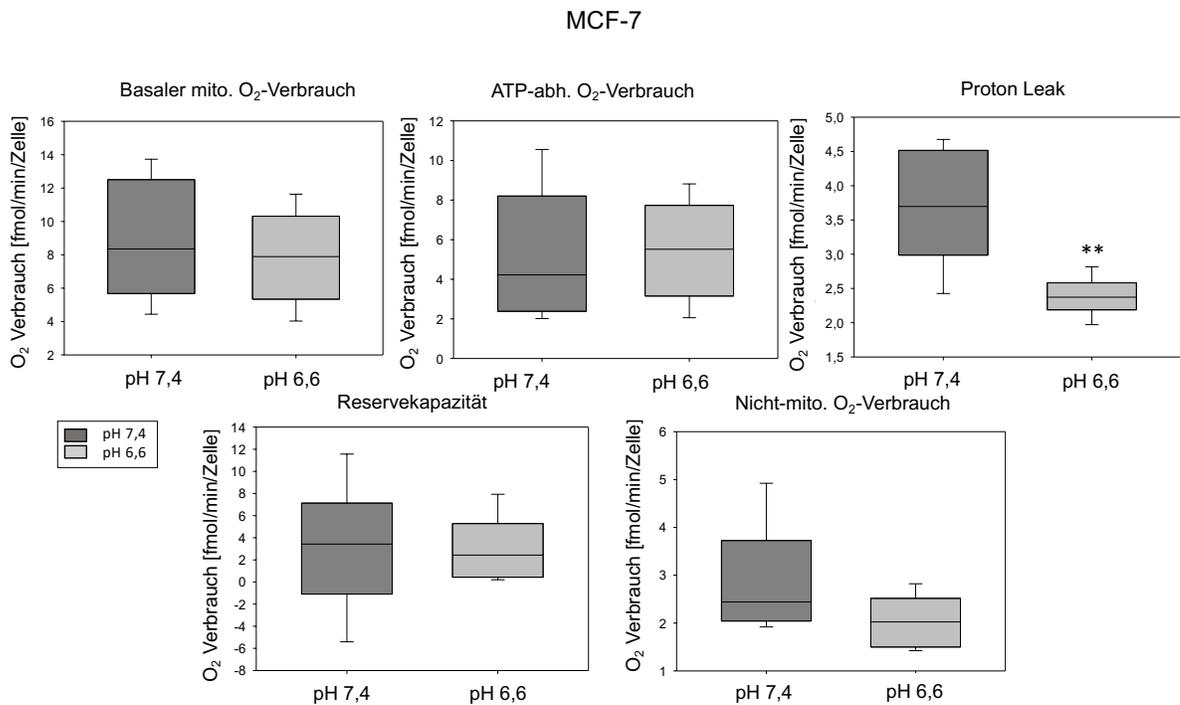


Abb. 14 Vergleich des basalen, ATP-abhängigen und des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs sowie der Reservekapazität und des Protonen Leaks bei pH 7,4 und pH 6,6 in MCF-7-Zellen, $n=6$; (*) $p<0,05$ (**) $p<0,01$ vs. pH 7,4

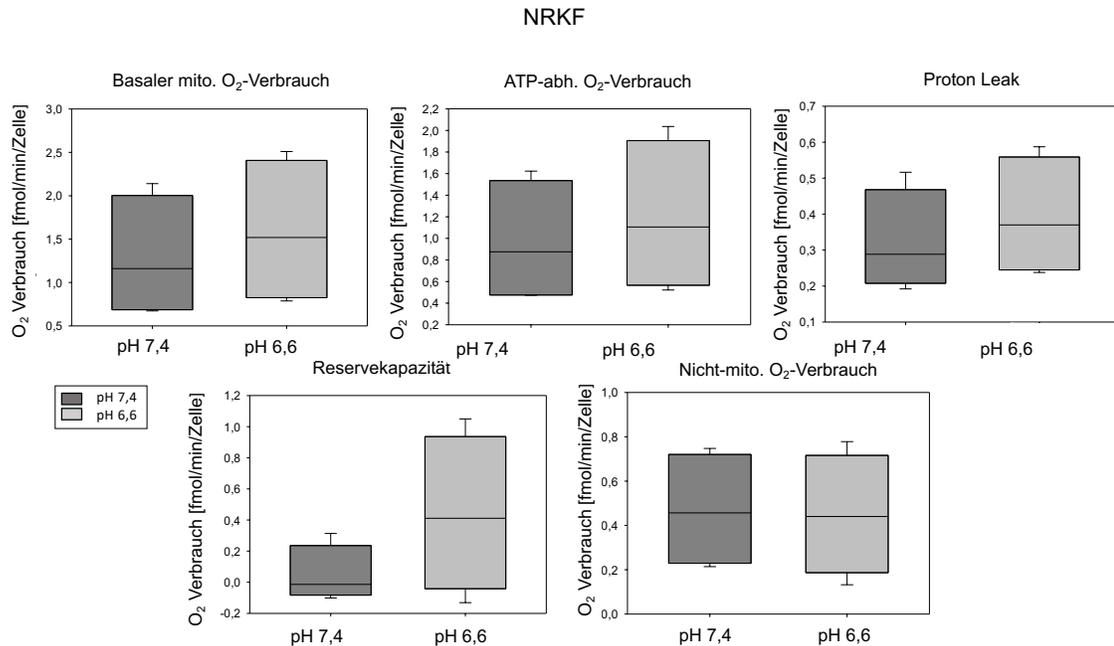


Abb. 15 Vergleich des basalen, ATP-abhängigen und des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs sowie der Reservekapazität und des Protonen Leaks bei pH 7,4 und pH 6,6 in NRKF-Zellen, n=4; (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4

4.1.3 Einfluss der Inhibition von p38

Die Hemmung von p38 durch SB203580 beeinflusste in den verwendeten Prostata-Karzinomzellen und den NRKF-Zellen den Sauerstoffverbrauch der Zellen annähernd nicht, auch unabhängig vom Umgebungs-pH (Abb. 16, Abb. 19). Bei den Mammakarzinomzellen und den Lungenkarzinomzellen konnten vereinzelt Effekte beobachtet werden (Abb. 17, Abb. 18).

a AT-1-Zellen

Die Hemmung von p38 durch SB203580 hatte keinen Effekt auf den Sauerstoffverbrauch der verwendeten Prostata-Karzinomzellen (Abb. 16).

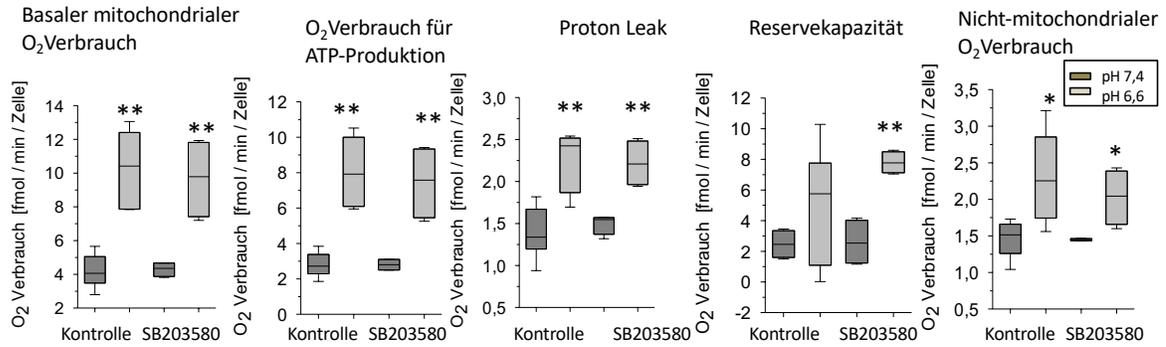


Abb. 16 Einfluss der Inhibition von p38 (mit SB203580) auf den Sauerstoffverbrauch (in fmol/min/Zelle) bei pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von p38 in AT-1-Zellen, n=6, (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. ungehemmt

b H358-Zellen

Die deutlichsten, wenn gleich geringen Auswirkungen der Inhibition von p38 zeigten sich bei den H358-Zellen (Abb. 17). Unter pH 7,4 war keine Veränderung der verschiedenen Parameter des Sauerstoffverbrauchs nachweisbar. Bei extrazellulärer Azidose stieg der basale Sauerstoffverbrauch der Zellen um circa 0,5 fmol/min/Zelle an (pH 6,6: 5,00 ± 0,51 fmol/min/Zelle; pH 6,6 + SB203580: 5,52 ± 0,87 p=0,02). Das Protonen Leak (pH 6,6: 1,27 ± 0,12; pH 6,6 + SB203580: 1,50 ± 0,17 fmol/min/Zelle, p=0,008) und der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch (pH 6,6: 0,97 ± 0,15 fmol/min/Zelle; pH 6,6 + SB203580: 1,18 ± 0,26 fmol/min/Zelle, p= 0,045) nahmen bei Hemmung um circa 0,2 fmol/min/Zelle zu. Die restlichen Parameter waren auch unter Azidose unverändert.

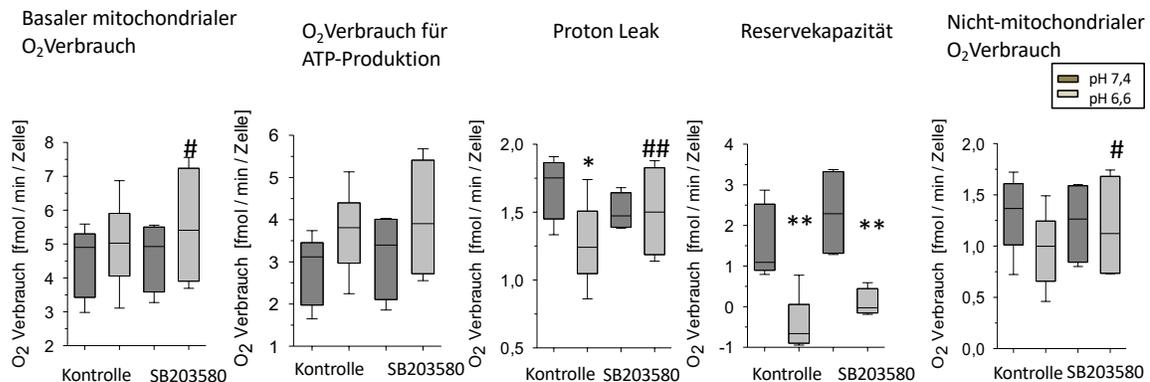


Abb. 17 Einfluss der Inhibition von p38 (mit SB203580) auf den Sauerstoffverbrauch (in fmol/min/Zelle) bei pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von p38 in H358-Zellen, n=4-6, (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. ungehemmt

c MCF-7-Zellen

Unter der Hemmung von p38 zeigte sich bei Normalbedingungen (pH 7,4) eine signifikante Zunahme des basalen Sauerstoffverbrauchs der Zellen (von 8,85 ± 1,49 fmol/min/Zelle auf

9,76 ± 2,05 fmol/min/Zelle; p=0,008; Abb. 18). Eine geringgradige Erhöhung war auch bei dem Sauerstoffverbrauch für die ATP-Produktion zu beobachten (von 5,16 ± 1,37 fmol/min/Zelle auf 6,47 ± 1,93 fmol/min/Zelle; p= 0,007). Auf die anderen Parameter der Sauerstoffverbrauchs hatte die Hemmung von p38 keinen Effekt. Bei pH 6,6 beeinflusste die Inhibition den Sauerstoffverbrauch nicht.

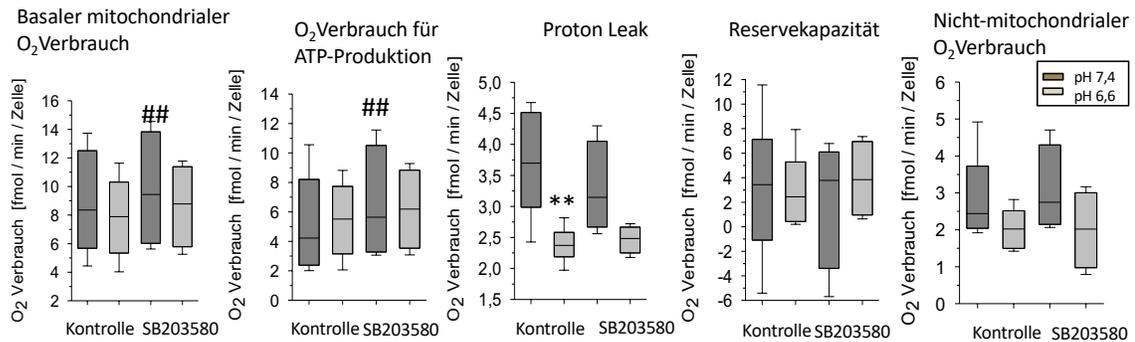


Abb. 18 Einfluss der Inhibition von p38 (mit SB203580) auf den Sauerstoffverbrauch (in fmol/min/Zelle) bei pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von p38 in MCF-7-Zellen, n=4-6, (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. ungehemmt

d NRKF-Zellen

Die Inhibition des p38-Signalwegs beeinflusste die NRKF-Zellen nicht. Die Azidose abhängige Beeinflussung des Protonen Leak und der Reservekapazität (Abb. 15) zeigte sich auch bei Inhibition des p38-Signalwegs (Abb. 19). Das Protonen Leak nahm unter Azidose ohne Inhibition des p38-Signalwegs (0,32 ± 0,07 fmol/min/Zelle auf 0,39 ± 0,08 fmol/min/Zelle; p=0,55) und mit Inhibition (0,31 ± 0,07 fmol/min/Zelle auf 0,41 ± 0,08 fmol/min/Zelle, p=0,42) um circa ein Drittel zu. Bei der Reservekapazität zeigte sich ebenfalls eine Steigerung um circa 0,4 fmol/min/Zelle unter Azidose, unabhängig der Inhibition des p38-Signalwegs. Ohne Inhibition stieg die Reservekapazität von 0,04 ± 0,09 fmol/min/Zelle auf 0,44 ± 0,25 fmol/min/Zelle, (p=0,20) und mit Inhibition von -0,07 ± 0,06 fmol/min/Zelle auf 0,37 ± 0,28 fmol/min/Zelle (p=0,17).

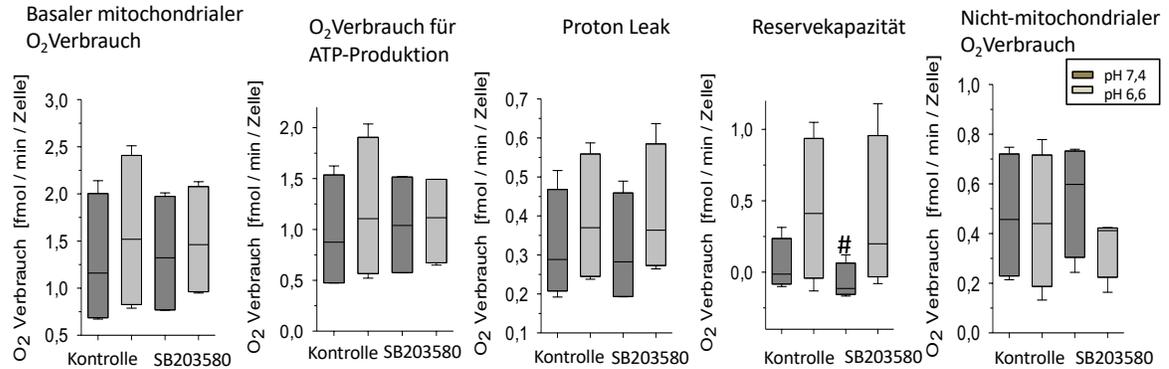


Abb. 19 Einfluss der Inhibition von p38 (mit SB203580) auf den Sauerstoffverbrauch (in fmol/min/Zelle) bei pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von p38 in NRKF-Zellen, n=4, (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. ungehemmt

4.1.4 Einfluss der Inhibition von ERK1/2

Die Inhibition des ERK1/2-Signalwegs mit U0126 beeinflusste bei allen Tumor-Zelllinien den Sauerstoffverbrauch. Die Hemmung führte zu einer signifikanten Reduktion. Lediglich bei der Normal-Zelllinie war kein signifikanter Effekt durch Inhibition zu beobachten.

a AT-1-Zellen

AT-1-Zellen verbrauchten mitochondrial und nicht-mitochondrial unter ERK1/2-Inhibition bei einem pH von 7,4 genauso viel Sauerstoff wie unter Kontrollbedingungen (Abb. 20). Wurde der ERK1/2-Signalweg jedoch bei pH 6,6 gehemmt, reduzierte sich der Verbrauch signifikant. Der basale Sauerstoffverbrauch sank von $10,30 \pm 0,92$ fmol/min/Zelle auf $7,9 \pm 0,97$ fmol/min/Zelle ($p=0,02$). Während ungehemmt die Prostata-Karzinomzellen eine Reservekapazität von ungefähr $5,03 \pm 1,55$ fmol/min/Zelle aufwiesen, war nach Inkubation mit U0126 praktisch keine Reservekapazität vorhanden ($0,34 \pm 0,79$ fmol/min/Zelle; $p=0,01$). Der für die ATP-Produktion verwendete Sauerstoff verringerte sich um ungefähr ein Viertel (pH 6,6: $8,05 \pm 0,80$ fmol/min/Zelle; pH 6,6 + U0126: $6,06 \pm 0,93$ fmol/min/Zelle; $p=0,01$). Der nicht-mitochondrial O₂-Verbrauch halbierte sich (pH 6,6: $2,30 \pm 0,25$ fmol/min/Zelle; pH 6,6 + U0126: $1,57 \pm 0,14$ fmol/min/Zelle; $p=0,04$). Dies lässt vermuten, dass der ERK1/2-Signalweg, der unter Azidose aktiviert wird, zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs führt. Durch Hemmung des ERK1/2-Wegs (bei gleichzeitiger Azidose) wurde dieser Effekt antagonisiert.

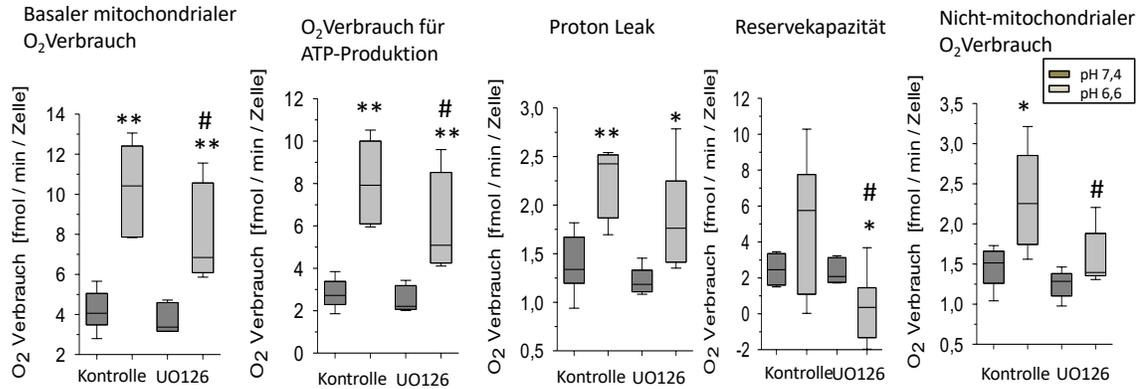


Abb. 20 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von ERK1/2 in AT-1-Zellen, n=6, (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. ungehemmt

b H358-Zellen

Alle gemessenen Parameter des Sauerstoffverbrauchs nahmen bei Hemmung von ERK1/2 sowohl bei pH 6,6 als auch bei pH 7,4 im Vergleich zum ungehemmten Zustand signifikant ab (Abb. 21). Die Abnahme des basalen und ATP-Produktions-abhängigen Sauerstoffverbrauchs bei Azidose durch die Inhibition mit U0126 betrug bei pH 7,4 zwischen 30 und 40%. Der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch und das Protonen Leak sanken weniger stark durch die Zugabe von U0126 um 18% bzw. 29%. Somit näherten sich die Werte des Sauerstoffverbrauchs bei pH 6,6 und 7,4 durch die Hemmung von ERK1/2 an.

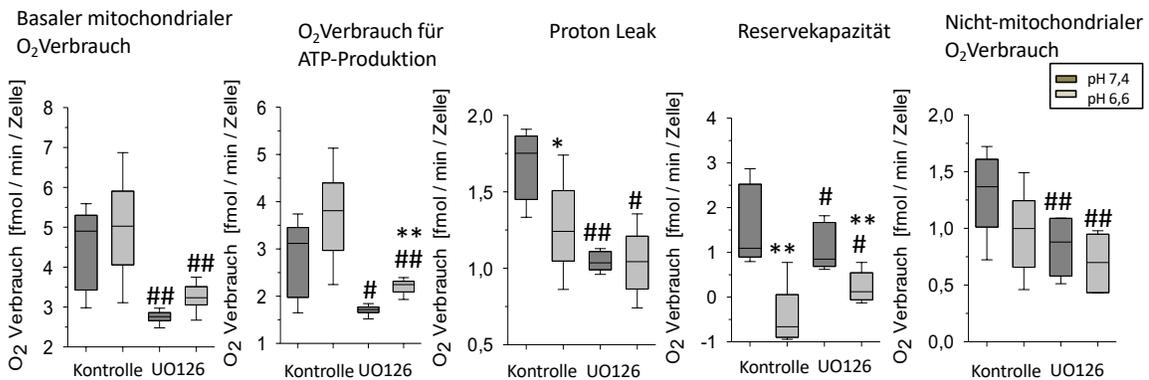


Abb. 21 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von ERK1/2 in H358-Zellen, n=4-6, (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. ungehemmt

c MCF-7-Zellen

Die Inkubation der Mammakarzinom-Zellen mit U0126 führte unter Normalbedingungen zu einer signifikanten Abnahme des basalen Sauerstoffverbrauchs, des Protonen Leaks und des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (Abb. 22). Besonders deutlich sank das

Protonen Leak von $3,69 \pm 0,34$ fmol/min/Zelle auf $2,1 \pm 0,21$ fmol/min/Zelle ($p=0,0001$). Das Protonen Leak und der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch wurden auch unter pH 6,6 durch U0126 vermindert. Die restlichen Parameter blieben durch die Hemmung von ERK1/2 sowohl bei Azidose als auch bei pH 7,4 unbeeinflusst.

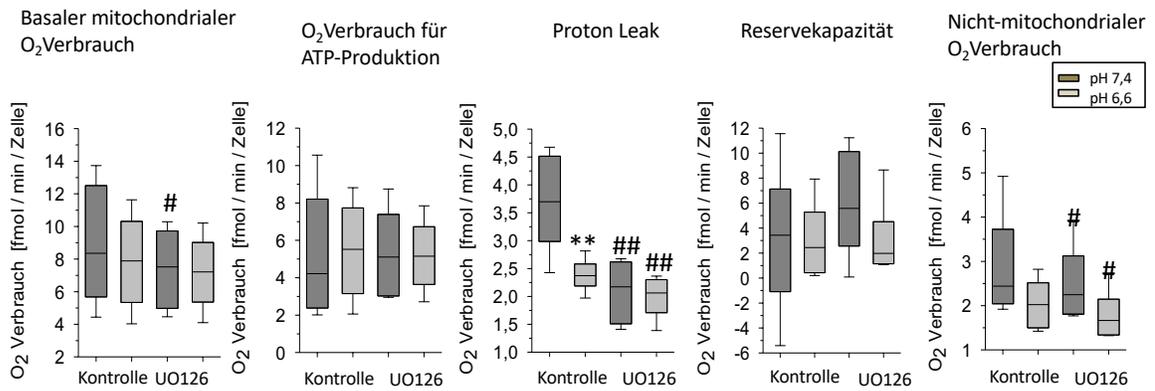


Abb. 22 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von ERK1/2 in MCF-7-Zellen, n=4- 6, (*) p < 0,05 (**) p < 0,01 vs. pH 7,4; (#) p < 0,05 (##) p < 0,01 vs. ungehemmt

d NRKF

U0126 bewirkte nur bei Kontroll-pH eine Abnahme des basalen Sauerstoffverbrauch in der Normalzellreihe (Abb. 23). Er nahm bei Inhibition von $1,28 \pm 0,35$ fmol/min/Zelle auf $0,84 \pm 0,23$ fmol/min/Zelle ab ($p=0,048$). Die Reservekapazität wurde unter gleichen Bedingungen sogar um circa 0,2 fmol/min/Zelle gesteigert ($p=0,008$). Auf die anderen Parameter hatte U0126 in dieser Zelllinie keinen Effekt.

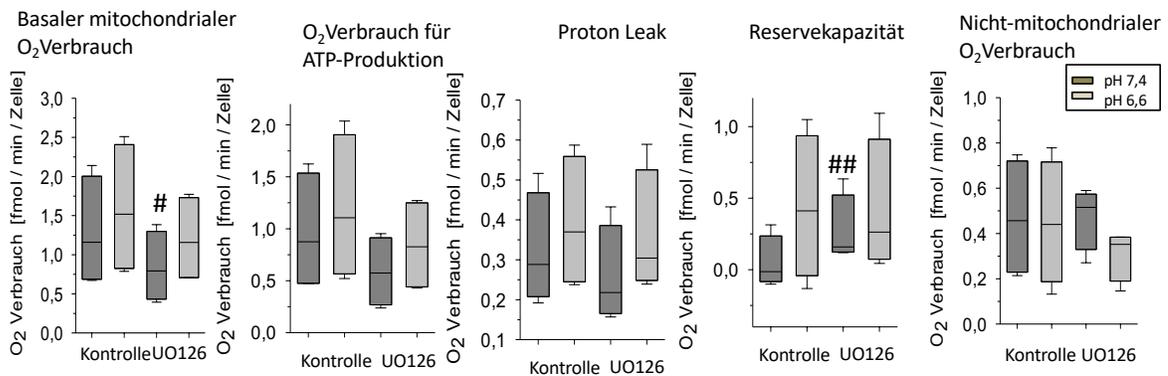


Abb. 23 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von ERK1/2 in AT-1-Zellen, n=4, (*) p < 0,05 (**) p < 0,01 vs. pH 7,4; (#) p < 0,05 (##) p < 0,01 vs. ungehemmt

4.1.5 Einfluss der Aktivierung von ERK1/2

Da in den Tumorzelllinien die Hemmung von ERK1/2 zu einer Verminderung des Sauerstoffverbrauchs führte, sollte geprüft werden, ob eine Stimulation dieses Wegs bei normalem pH zu einer Zunahme des Verbrauchs führte. Hierzu wurden die Lungen- und

Mamma-Karzinomzellen mit 1 μM PMA stimuliert. Bei beiden konnte eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs durch die Inhibition des ERK1/2-Signalwegs beobachtet werden und die Wirksamkeit von PMA als Aktivator des Signalwegs wurde mittels Western-Blot nachgewiesen (siehe 4.2.2). Bei AT-1-Zellen war keiner der untersuchten ERK1/2-Aktivatoren (PMA, EGF) wirksam, sodass dieser Versuch für diese Zelllinie nicht durchgeführt werden konnte (siehe 4.2.2). Auch in dieser Versuchsserie wurden die Zellen zusätzlich auch mit U0126 inkubiert, um zu untersuchen, ob der stimulierende Effekt reversibel war.

Bei beiden Zelllinien (H358, MCF-7) war keine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch PMA feststellbar. Der basale Sauerstoffverbrauch nahm sogar leicht ab. Durch gleichzeitige Inhibition mit U0126 ließ sich er Sauerstoffverbrauch wieder signifikant reduzieren.

Es ist anzumerken, dass die Reservekapazität der beiden Zellreihen unter Kontrollbedingungen sehr gering war und dieser Versuch eine sehr große Streuung hatte. Die beiden Zelllinien scheinen basal schon beinahe maximal viel Sauerstoff zu verbrauchen, sodass vermutlich unter PMA-Einfluss keine deutliche Steigerung des Verbrauchs mehr möglich war.

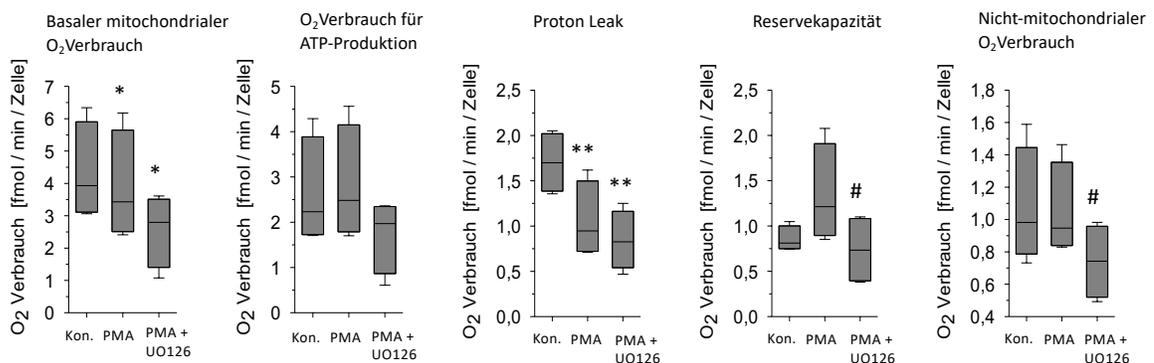


Abb. 24 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 als Kontrolle (Kon.) und zusätzlicher Aktivierung des ERK1/2-Signalweges mittels PMA sowie gleichzeitiger Aktivierung und Inhibition in H358-Zellen, n=4, (*) p<0,05 (***) p<0,01 vs. Kon.; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. PMA

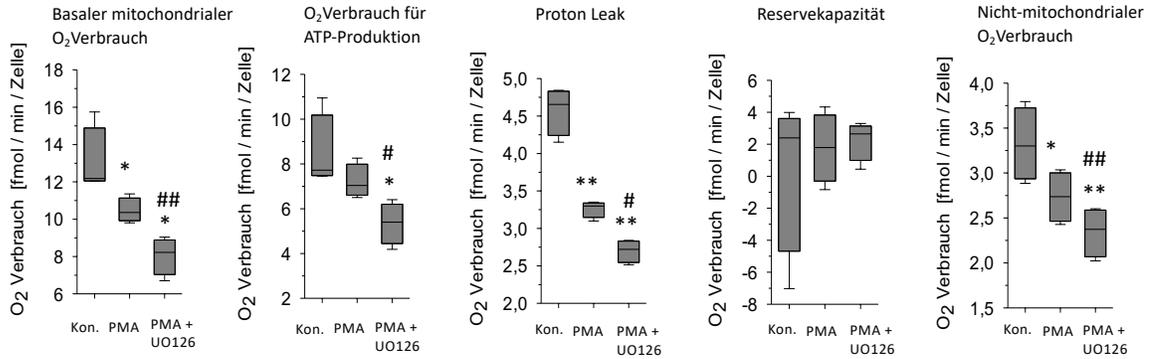


Abb. 25 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 als Kontrolle (Kon.) und zusätzlicher Aktivierung des ERK1/2-Signalweges mittels PMA sowie gleichzeitiger Aktivierung und Inhibition in MCF-7-Zellen, n=4 (*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,01$ vs. Kon.; (#) $p < 0,05$ (##) $p < 0,01$ vs. PMA

4.1.6 Einfluss der Inhibition von PI3K

Durch die Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor Ly294002 sanken einige Parameter des Sauerstoffverbrauchs der Tumorzellen signifikant. Bei den NRKF-Zellen war keine Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs durch den PI3K-Signalweg erkennbar.

a AT-1-Zellen

Bei pH 7,4 ließ sich der Sauerstoffverbrauch der AT-1-Zellen durch Ly294002 nicht beeinflussen (Abb. 26). Bei pH 6,6 hingegen, nahm der basale Sauerstoffverbrauch von $10,30 \pm 0,92$ fmol/min/Zelle durch die Hemmung von PI3K auf $8,08/ \pm 0,96$ fmol/min/Zelle ab ($p=0,04$). Auch der für die ATP-Produktion verwendete Sauerstoff der Zellen wurde unter Azidose und Hemmung weniger und sank um etwa 2 fmol/min/Zelle (von $8,05 \pm 0,80$ SEM fmol/min/Zelle auf $6,05 \pm 0,77$ fmol/min/Zelle, $p=0,03$). Die restlichen Parameter blieben von der Hemmung durch Ly294002 unbeeinflusst.

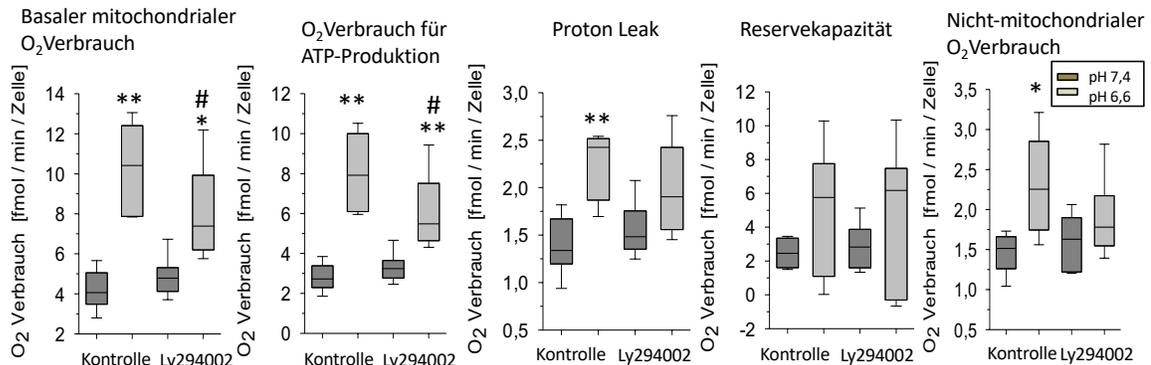


Abb. 26 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von PI3K in AT-1-Zellen, n=4-6, (*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,01$ vs. pH 7,4; (#) $p < 0,05$ (##) $p < 0,01$ vs. ungethemmt

b H358

Basal verbrauchten die Lungen-Karzinomzellen (Abb. 27) bei neutralem pH $4,53 \pm 0,42$ fmol/min/Zelle und nach Hemmung $3,71 \pm 0,27$ fmol/min/Zelle ($p=0,01$). Bei Azidose verhielt sich der basale Verbrauch ähnlich ($5,00 \pm 0,51$ fmol/min/Zelle sowie $4,22 \pm 0,31$, $p=0,034$). Das Protonen Leak nahm bei Hemmung von PI3K ebenfalls im sauren und neutralen Milieu signifikant ab. So sank es bei pH 7,4 von $1,68 \pm 0,09$ fmol/min/Zelle auf $0,90 \pm 0,04$ fmol/min/Zelle ($p= 0,00007$), bei saurem pH von $1,27 \pm 0,12$ fmol/min/Zelle auf $0,99 \pm 0,07$ fmol/min/Zelle ($p=0,008$). Lediglich die Reservekapazität nahm unter pH 6,6 und Hemmung im Vergleich zum ungehemmten Zustand leicht zu. So stieg sie von $-0,43 \pm 0,26$ fmol/min/Zelle auf $0,33 \pm 0,21$ fmol/min/Zelle ($p=0,004$). Auf den ATP-abhängigen Sauerstoffverbrauch hatte Ly294002 keinen Einfluss. Der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch reduzierte sich durch die Zugabe von Ly294002 bei pH 7,4 leicht, von $1,31 \pm 0,15$ fmol/min/Zelle auf $1,05$ fmol/min/Zelle ($p=0,03$).

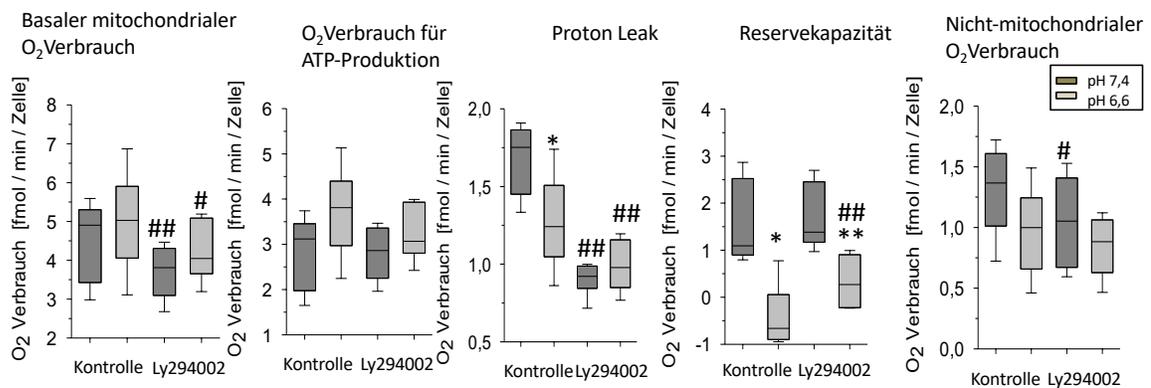


Abb. 27 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 und pH 6,6 und zusätzlicher Inhibition von PI3K in H358-Zellen, $n=4-6$, (*) $p<0,05$ (**) $p<0,01$ vs. pH 7,4; (#) $p<0,05$ (##) $p<0,01$ vs. ungehemmt

c MCF-7-Zellen

Die Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs durch die PI3K-Inhibition in MCF-7-Zellen betraf den basalen Sauerstoffverbrauch und das Protonen Leak (Abb. 28). Der basale Sauerstoffverbrauch unter Azidose sank durch die Hemmung um circa 1 fmol/min/Zelle von $7,84 \pm 1,13$ fmol/min/Zelle auf $6,84 \pm 0,83$ fmol/min/Zelle ($p=0,04$). Das Protonen Leak halbierte sich bei neutralem pH und Inhibition. So lag es ungehemmt bei $3,69 \pm 0,34$ fmol/min/Zelle und bei Inhibition nur noch bei $1,87 \pm 0,17$ fmol/min/Zelle ($p=0,0006$). Die anderen Kenngrößen des Sauerstoffverbrauchs blieben durch die Hemmung unbeeinflusst.

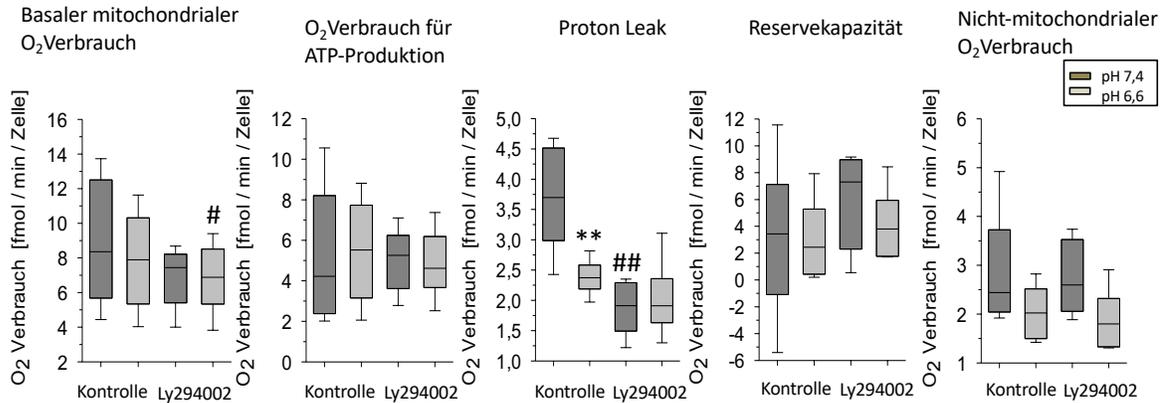


Abb. 28 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von PI3K in MCF-7-Zellen, n=4-6, (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. ungehemmt

d NRKF

Die Inhibition von PI3K hatte keinen relevanten Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch der Nierenfibroblasten (Abb. 29).

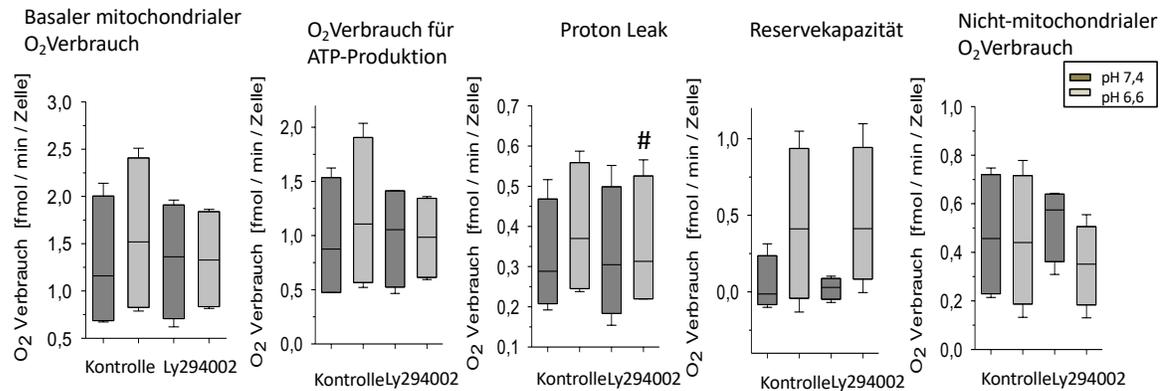


Abb. 29 Sauerstoffverbrauch in fmol/min/Zelle unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von PI3K in NRKF-Zellen, n=4, (*) p<0,05 (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05 (##) p<0,01 vs. ungehemmt

4.1.7 Einfluss der Inhibition von mTor

Die Sauerstoffverbrauchsmessung bei Hemmung von mTOR wurde in AT-1-Zellen durchgeführt. Die Inhibition von mTOR durch Rapamycin hatte weder bei pH 7,4 noch bei pH 6,6 einen Effekt auf den Sauerstoffverbrauch dieser Zelllinie (Abb. 30).

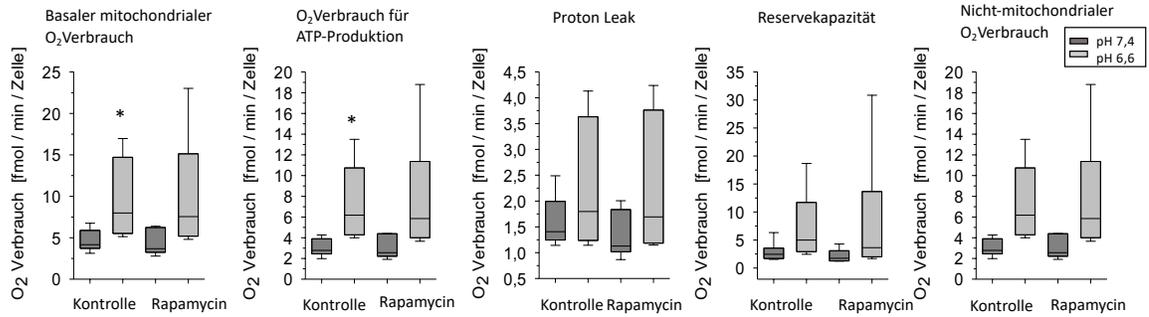


Abb. 30 Sauerstoffverbrauch in $\text{fmol}/\text{min}/\text{Zelle}$ unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition von mTOR in AT-1-Zellen, $n=4$, (*) $p<0,05$ (**) $p<0,01$ vs. pH 7,4; (#) $p<0,05$ (##) $p<0,01$ vs. ungehemmt

4.1.8 Einfluss der Inhibition der PKC und von calciumfreiem Medium

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs bei Inkubation in calciumfreiem Medium (Abb. 31) und bei Inhibition der PKC (Abb. 32) wurde an AT-1-Zellen durchgeführt. Sowohl die Inhibition der PKC wie auch die Inkubation in calciumfreiem Medium beeinflusste den Sauerstoffverbrauch der Zellen nicht.

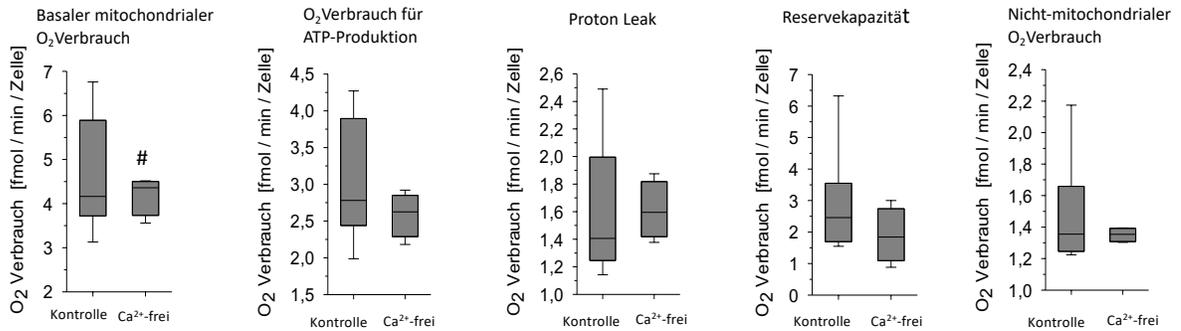


Abb. 31 Sauerstoffverbrauch in $\text{fmol}/\text{min}/\text{Zelle}$ unter pH 7,4 und Inkubation mit calciumfreiem Medium in AT-1-Zellen, $n=4$, (#) $p<0,05$

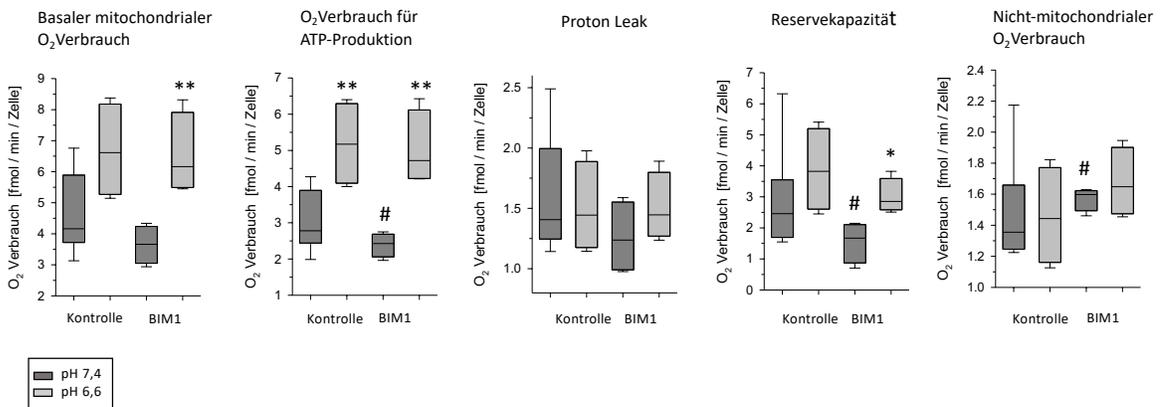


Abb. 32 Sauerstoffverbrauch in $\text{fmol}/\text{min}/\text{Zelle}$ unter pH 7,4 und 6,6 und zusätzlicher Inhibition der PKC in AT-1-Zellen, $n=4$, (*) $p<0,05$ (**) $p<0,01$ vs. pH 7,4; (#) $p<0,05$ (##) $p<0,01$ vs. ungehemmt

4.2 ERK1/2-Aktivierung

Mittels Western-Blot wurde die Aktivierung des ERK1/2-MAP-Kinase Signalwegs unter Azidose in den unterschiedlichen Zelllinien analysiert. Zudem wurde überprüft, ob die verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren den jeweiligen Signalweg inhibieren bzw. aktivieren. Hierbei wurde sowohl die Änderung der Gesamtmenge des Signalmoleküls ERK1/2 (unabhängig vom Phosphorylierungsgrad) als auch die Menge des phosphorylierten Proteins bestimmt. Als Maß für die Aktivierung eines Signalwegs diente das Verhältnis des phosphorylierten ERK1/2 (pERK) zur Gesamtproteinmenge (ERK) (Abb. 33). Das Verhältnis vom Gesamtprotein zu dem verwendeten House-Keeper-Protein Hsp90 diente als Maß der Expression (Abb. 34).

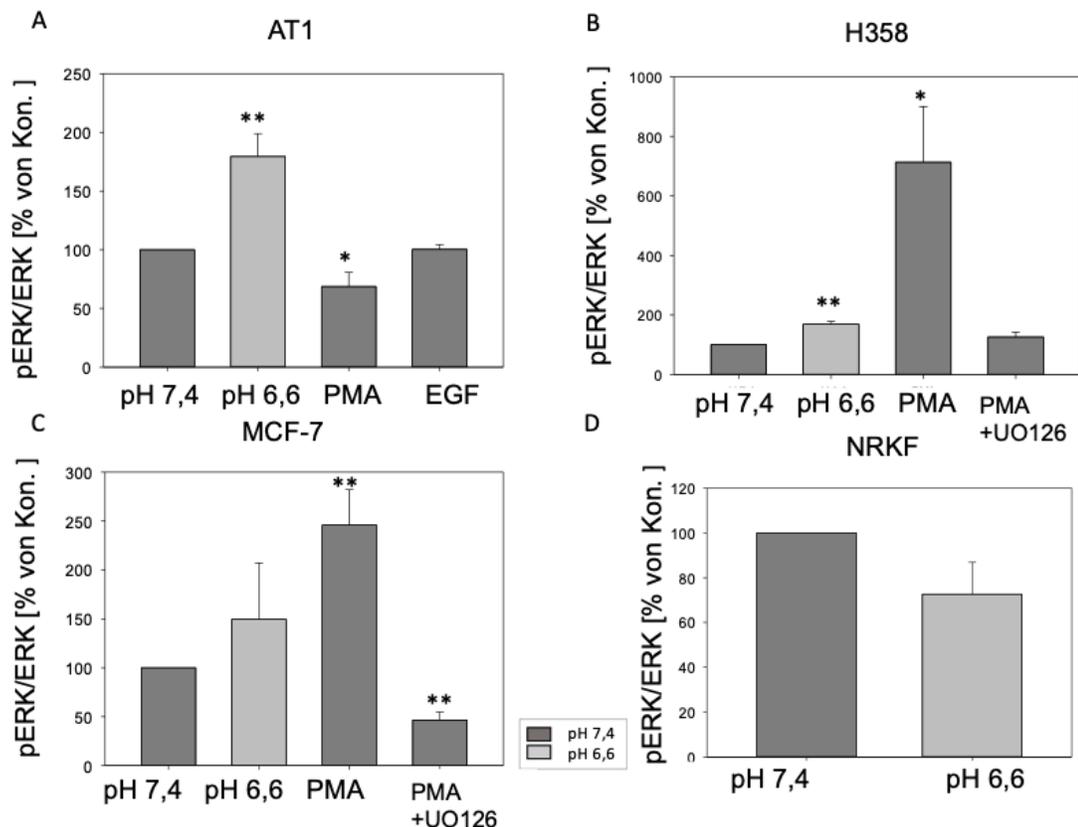


Abb. 33 Das relative Verhältnis pERK/ERK in (A) AT-1-, (B) H358-, (C) MCF-7-, (D) NRKF-Zellen unter pH 7,4 und pH 6,6 sowie unter ERK-Aktivierung mit PMA oder EGF und ERK1/2-Inhibition, n=4-8, (*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,01$ vs. pH 7,4 Kontrolle.

4.2.1 Azidose

Azidose hatte auf die Aktivität des ERK1/2-Signalwegs in den verwendeten Zellen unterschiedliche Effekte. Eine signifikante Zunahme von pERK/ERK durch extrazelluläre Azidose konnte in den AT-1- und den H358-Zellen beobachtet werden (Abb. 33). So stieg

pERK/ERK in den AT-1-Zellen auf $179\% \pm 19\%$ ($p=0,0008$), in den H358-Zellen auf $169\% \pm 10\%$ ($p=0,0002$). In den MCF-7-Zellen hingegen zeigte sich keine signifikante Änderung der ERK1/2-Aktivität durch Inkubation in pH 6,6. Auch bei NRKF-Zellen schien Azidose keinen Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierung zu haben. In den AT-1-, MCF-7- und NRKF-Zellen beeinflusste Azidose die Expression von ERK1/2 nicht, in den MCF-7-Zellen hingegen nahm die Expression von ERK1/2 signifikant um im Mittel 24% ab ($76\% \pm 9\%$, $p=0,02$) (Abb. 34).

4.2.2 Einfluss der ERK1/2-Aktivatoren PMA und EGF

In der Literatur wird PMA vielfach für die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs verwendet [72, 73]. In MCF-7 und H358- Zellen (Abb. 33) konnte das Verhältnis von pERK/ERK durch die Inkubation mit PMA signifikant gesteigert werden. Das Verhältnis von pERK/ERK nahm unter Inkubation mit PMA in MCF-7 um 146% zu ($245 \pm 36\%$, $p=0,007$), in H358-Zellen sogar um 613% ($713 \pm 187\%$, $p=0,02$) zu. Bei der gleichzeitigen Inkubation von PMA mit U0126 hoben sich der aktivierende von PMA und der hemmende Effekt von U0126 in den H358-Zellen annähernd auf. In den MCF-7-Zellen überwog der hemmende Effekt des U0126 und die Aktivität war um die Hälfte gegenüber unbehandelten Kontrollen reduziert ($46 \pm 8\%$, $p=0,002$). In AT-1 Prostatakarzinomzellen ließ sich keine Aktivierung von ERK1/2 induzieren (Abb. 33). Das Verhältnis pERK/ERK nahm durch PMA nicht zu, sondern führte sogar zu einer Abnahme um circa ein Drittel ($69 \pm 12\%$, $p=0,03$). Da PMA nicht den erwünschten Effekt hatte, kam der ebenfalls oft verwendete ERK1/2-Aktivator EGF zur Anwendung [74, 75]. EGF hatte ebenfalls keinen aktivierenden Effekt auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in AT-1-Zellen.

PMA, EGF und PMA plus U0126 führten in keiner der vier Zelllinien zu einer signifikanten Änderung der Expression von ERK1/2 (Abb. 34).

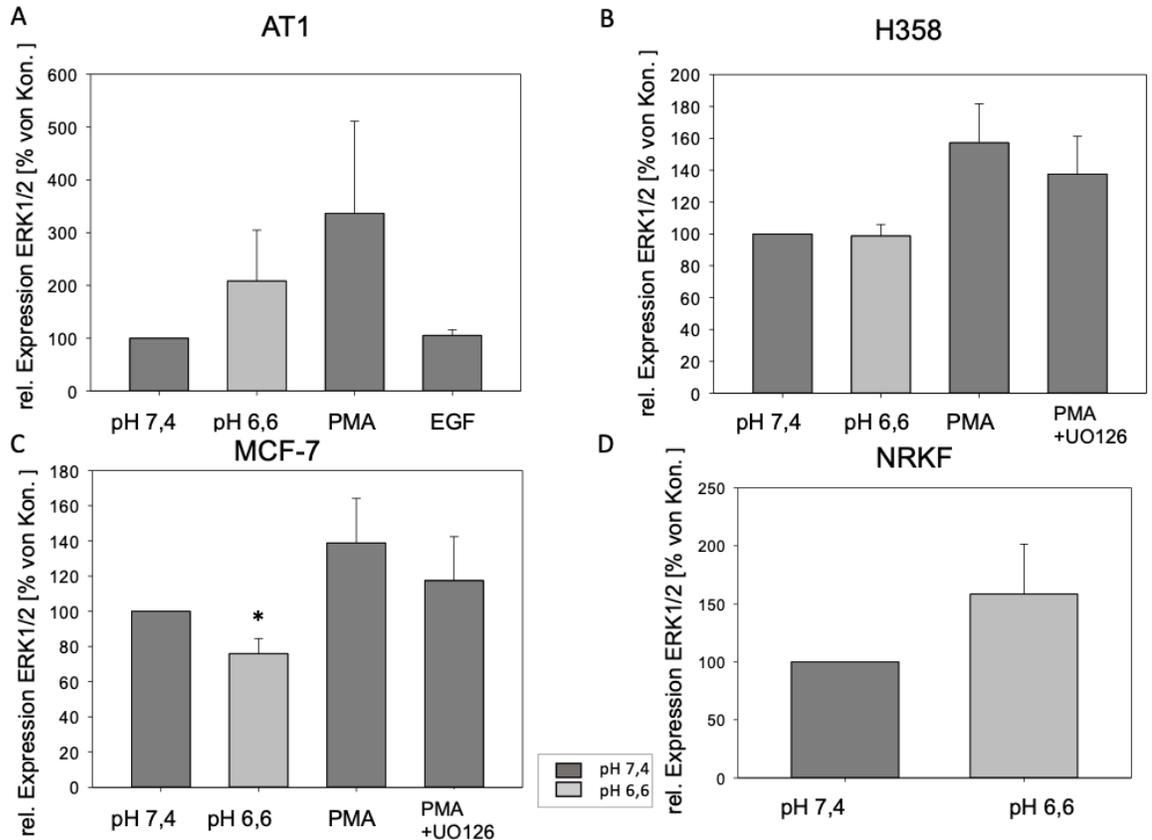


Abb. 34 Relative Expression von ERK1/2 in (A) AT-1, (B) H358-, (C) MCF-7- und (D) NRKF-Zellen unter pH 6,6 und pH 7,4 unter ERK1/2-Aktivierung allein und gleichzeitiger Inhibition mit UO126, n=5-6, (*) $p < 0,05$ vs. pH 7,4 Kontrolle.

4.3 Mitochondrienisolation

Für die Untersuchung der Anlagerung von pERK bzw. pAkt an oder in den Mitochondrien, erfolgte die getrennte Analyse der ERK1/2- bzw. Akt-Expression und Phosphorylierung im zytosolischen und dem mitochondrialen Kompartiment der Zellen. Für die Messungen wurden die Proteine dieser beiden Kompartimente getrennt. Als Qualitätskontrolle des Isolierungsschrittes und damit der Reinheit des Mitochondrienlysats wurde die Expression des zytosolischen Proteins HSP90 in der Mitochondrienfraktion gemessen und ins Verhältnis zur Gesamt-HSP90-Expression gesetzt. Als Kontrolle für die Trennung der Mitochondrien vom Rest der Zelle wurde vDAC verwendet. vDAC ist lediglich in Mitochondrien nachweisbar, nicht jedoch im Zytosol-Proteinlysate. Wie Abb. 35 zeigt, war die Zytosolfraction annähernd frei von mitochondrialem Protein, jedoch konnte die Mitochondrienfraktion nicht komplett von zytosolischen Protein gereinigt werden.

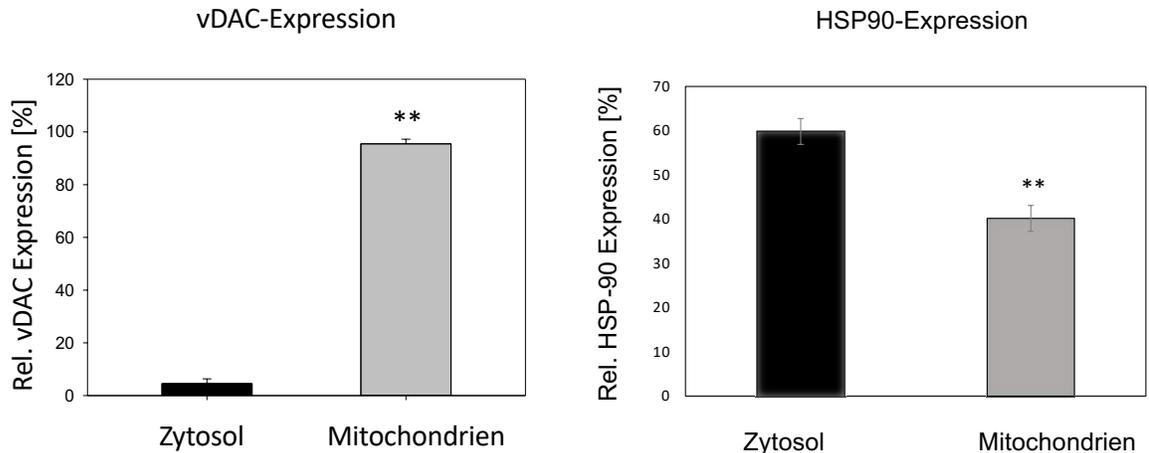


Abb. 35 Relative Expression von vDAC in der Proteinfraktion des Zytosols und der Mitochondrien bei pH 7,4 in AT-1-Zellen, n=6, (**) $p < 0,01$

4.3.1 Verhalten von ERK1/2

Die Ergebnisse zeigten, dass unter Azidose pERK1/2 vermehrt in der Mitochondrienfraktion nachweisbar war (Abb. 36). Bei Hemmung durch U0126 war dieser Effekt antagonisierbar. Das Verhältnis von pERK/ERK, welches als Maß des Aktivierungsstatus von ERK1/2 verwendet wurde, nahm in den Mitochondrien bei pH 6,6 signifikant um circa 50 % zu ($149\% \pm 14\%$, $p=0,006$). Durch Zugabe von U0126 nahm die Aktivität von ERK1/2 unter Azidose und bei pH 7,4 in Zytosol und Mitochondrien signifikant ab.

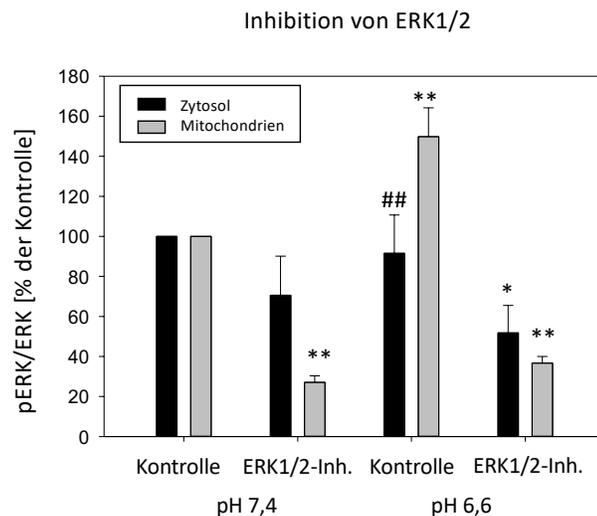


Abb. 36 Das relative Verhältnis pERK/ERK im Zytosol und in den Mitochondrien von AT-1-Zellen unter pH 7,4 und pH 6,6 sowie unter ERK1/2-Inhibition, n=6-7; (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ vs. pH 7,4; (##) $p < 0,01$ vs. Mitochondrien

4.3.2 Verhalten von Akt

Im Zytosol war die Expression von aktiviertem Akt bei extrazellulärer Azidose nicht höher als unter Kontrollbedingungen (Abb. 37). An den Mitochondrien jedoch schien sich pAkt bei pH 6,6 anzureichern, die relative Expression stieg auf 176% ± 24% (p=0,01). Bei Inhibition des PI3K-Signalwegs mittels Ly294002 zeigte sich unter den zwei Bedingungen in beiden Proteinfraktionen eine Reduktion von pAkt/Akt auf circa ein Viertel.

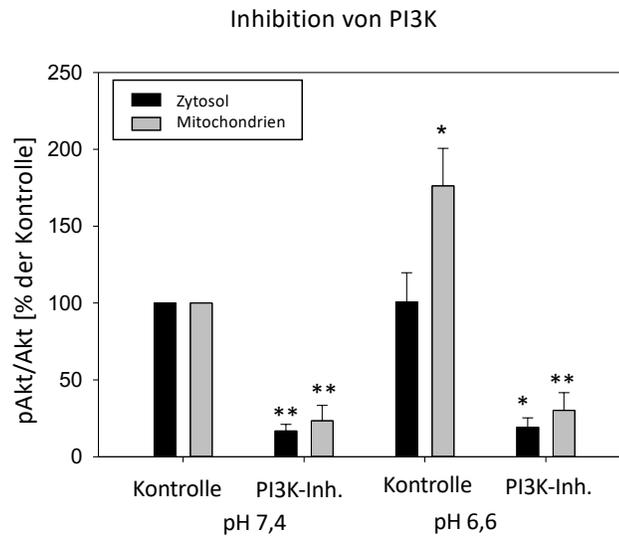


Abb. 37 Das relative Verhältnis pAkt/Akt im Zytosol und in den Mitochondrien von AT-1-Zellen unter pH 7,4 und pH 6,6 sowie unter Akt-Inhibition mit Rapamycin, n=5-6, (*) p<0,05, (**) p<0,01 vs. pH 7,4

4.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ erfolgte mit dem potential-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1. Als Negativ-Kontrolle der Messung wurden die Zellen mit FCCP inkubiert, welches die Atmungskette entkoppelt und somit das $\Delta\Psi_m$ zusammenbrechen lässt.

4.4.1 Einfluss von Azidose

Durch Azidose war eine signifikante Steigerung des mitochondrialen Membranpotentials in AT-1-Zellen und H358-Zellen nachweisbar (Abb. 38). In den Prostata-Karzinomzellen stieg das relative Membranpotential bei pH 6,6 auf 165 ± 6% (p=0,00002). Bei den Lungen-Karzinomzellen war die mittlere relative Zunahme sogar noch deutlicher und das relative MMP stieg auf 188 ± 12% (p=0,004). Bei den Normalzellen (Fibroblasten) war kein Unterschied im Membranpotential zwischen Azidose und pH 7,4 erkennbar (Abb. 38).

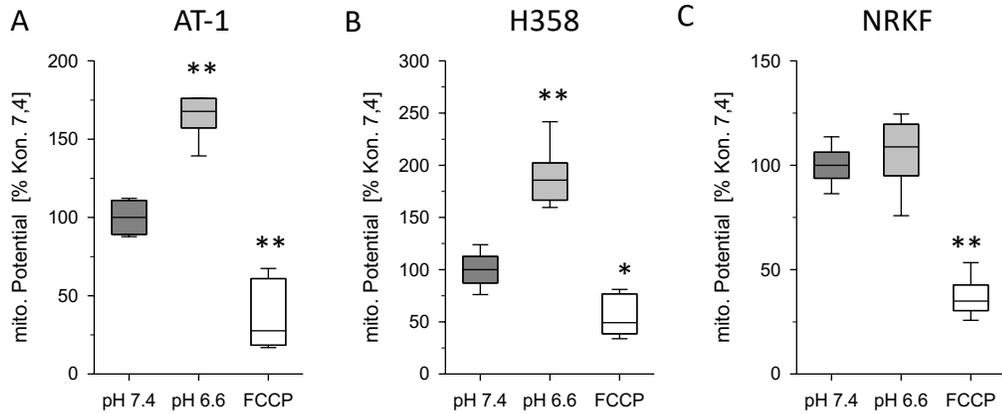


Abb. 38 Relatives mitochondriales Membranpotential (bezogen auf Kontrollbedingungen bei pH 7,4) in (A) AT-1-Zellen, (B) H358-Zellen und (C) NRKF-Zellen unter pH 7,4, pH 6,6 und nach Zugabe von FCCP; n=6, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ vs. pH 7,4

4.4.2 Einfluss der Inhibition von ERK1/2

Die Inhibition des ERK1/2-Signalwegs beeinflusste bei Kontroll-pH das $\Delta\Psi_m$ beider Tumorzelllinien nicht (Abb. 39). Unter Azidose jedoch führte die Inhibition mit U0126 in diesen Zellen zu einer signifikanten Abnahme des $\Delta\Psi_m$. So sank es in den AT-1-Zellen von $165 \pm 6\%$ auf $113 \pm 18\%$ ($p=0,02$) und in den H358-Zellen von $188 \pm 12\%$ auf $110 \pm 11\%$ ($p=0,005$). Das mitochondriale Membranpotential näherte sich demnach den Werten unter Kontrollbedingungen an. Die Normalzellen verhielten sich anders. Dort führte die Hemmung von ERK1/2 bei pH 7,4 zu einer signifikanten Abnahme des $\Delta\Psi_m$ aber lediglich um etwa 10% ($p=0,04$), unter Azidose hingegen um etwa 50% ($p=0,002$)

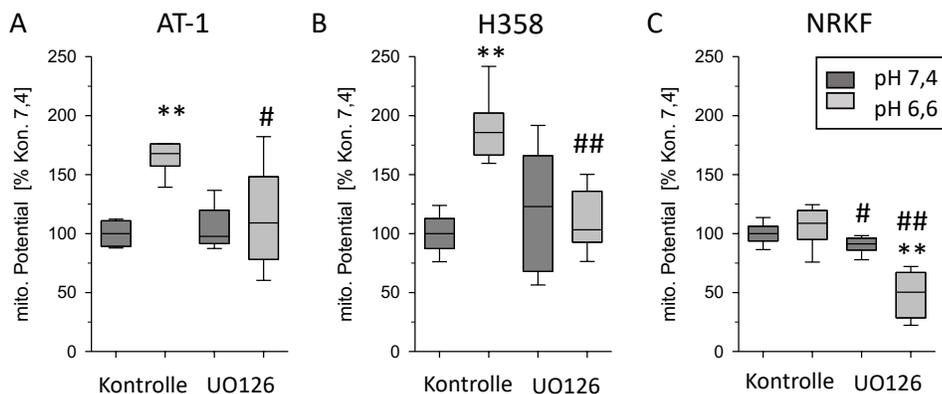


Abb. 39 Relatives mitochondriales Membranpotential (bezogen auf Kontrollbedingungen bei pH 7,4) in (A) AT-1-Zellen, (B) H358-Zellen und (C) NRKF-Zellen unter pH 7,4 und pH 6,6 mit und ohne Zugabe von U0126; n=6, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ vs. pH 7,4; (#) $p < 0,05$, (###) $p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrolle

4.4.3 Einfluss der Inhibition von PI3K

Die Inhibition von PI3K beeinflusste lediglich die beiden verwendeten Tumorzellenlinien, nicht jedoch die NRKF-Zellen (Abb. 40). Unter neutralem pH-Wert führte die Inkubation mit Ly294002 zu einer Steigerung des $\Delta\Psi_m$ bei den Prostata-Karzinom- und den Lungen-Karzinomzellen. So verdoppelte sich das $\Delta\Psi_m$ in AT-1-Zellen unter Normalbedingungen. Diese Änderung war aber wegen der großen Streuung der Werte nicht signifikant ($p=0,07$). In den H538-Zellen war die Zunahme etwas geringer. Das $\Delta\Psi_m$ stieg signifikant auf $176 \pm 17\%$ ($p=0,01$). Unter Azidose verändert die Hemmung des PI3K-Signalwegs das mitochondriale Membranpotential der beiden Zelltypen nicht.

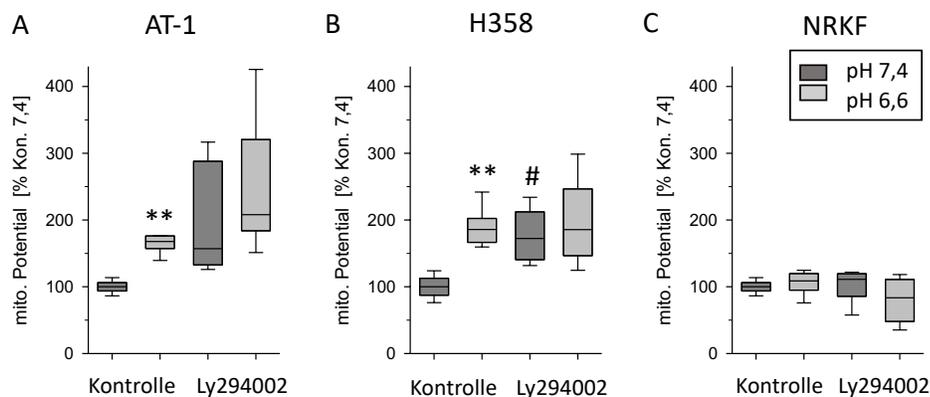


Abb. 40 Relatives mitochondriales Membranpotential (bezogen auf Kontrollbedingungen bei pH 7,4) in (A) AT-1-Zellen, (B) H358-Zellen und (C) NRKF-Zellen unter pH 7,4 und pH 6,6 mit und ohne Zugabe von Ly294002; $n=6$, (*) $p<0,05$, (**) $p<0,01$ vs. pH 7,4; (#) $p<0,05$, (##) $p<0,01$ vs. entsprechende Kontrolle

4.4.4 Einfluss der Inhibition von mTOR

In allen drei Zelllinien steigerte die Inhibition von mTOR mittels Rapamycin bei pH 7,4 das mitochondriale Membranpotential signifikant (Abb. 41). Es stieg in AT-1-Zellen im Mittel auf $149 \pm 11\%$ ($p=0,007$), in H358-Zellen auf $184 \pm 18\%$ ($p=0,02$) und in NRKF-Zellen auf $117 \pm 5\%$ ($p=0,01$). Die Hemmung von mTOR unter Azidose steigerte lediglich in den Prostata-Karzinomzellen das $\Delta\Psi_m$ auf $208 \pm 16\%$ ($p=0,047$). Das $\Delta\Psi_m$ der beiden anderen Zellreihen blieb bei pH 6,6 durch Inhibition von mTOR unbeeinflusst.

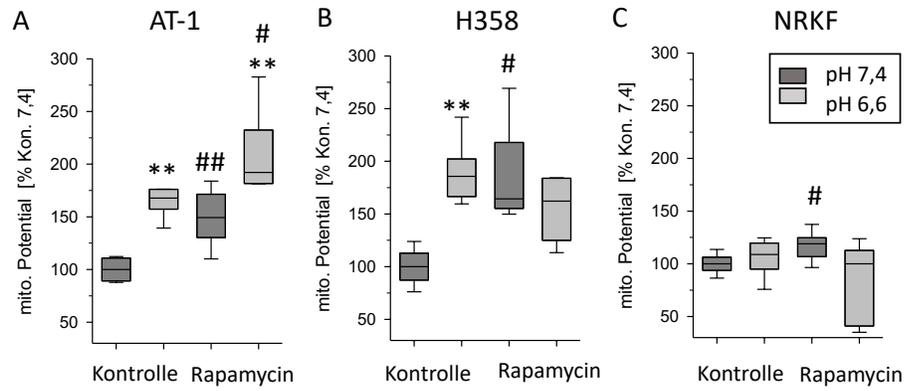


Abb. 41 Relatives mitochondriales Membranpotential (bezogen auf Kontrollbedingungen bei pH 7,4) in (A) AT-1-Zellen, (B) H358-Zellen und (C) NRKF-Zellen unter pH 7,4 und pH 6,6 mit und ohne Zugabe von Rapamycin; n=6, (*) p<0,05, (**) p<0,01 vs. pH 7,4; (#) p<0,05, (##) p<0,01 vs. entsprechende Kontrolle

5 Diskussion

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

In den Zellversuchen wurden die verschiedenen Zelllinien zunächst in 96-Well Platten angezüchtet und drei Stunden vor der Messung wurde das Medium auf den jeweiligen pH-Wert gewechselt. Hierbei wurde auf ein "Ruhigstellen" der Zellen für 24 Stunden, d.h. eine Kultivierung in Medium ohne FCS-Zusatz, verzichtet. Lediglich drei Stunden vor der Messung wurden die Zellen in Serum-freien Medium kultiviert. Zumeist wird eine „Ruhigstellen“ der Zellen für 24 Stunden praktiziert, da FCS nicht kontrollierbare Variabilität in das Kulturschema bringt. Der Gehalt an stimulierenden oder inhibierenden Zytokinen kann je nach Charge variieren [76]. Für den hier vorliegenden Versuch war es jedoch wichtig, möglichst kurz auf diese Wachstumsfaktoren zu verzichten, da sie insbesondere für das Zellproliferation von Bedeutung sind. Zellwachstum wiederum macht einen Teil des Sauerstoffverbrauchs von Zellen aus. Würde man diesen Teil ausklammern, wäre ein unvollständiges Bild des Sauerstoffverbrauchs der Zellen die Folge.

5.1.2 Wahl der Zelllinien

Für die Versuche wurden drei unterschiedliche Tumorzellreihen häufiger solider Tumoren verwendet: Mamma-, Prostata- und Bronchialkarzinomzellen. Es sind damit die zwei häufigsten Krebserkrankungen des Mannes (Prostata- und Bronchialkarzinom), sowie die häufigste und dritthäufigste Krebserkrankung der Frau (Mamma- und Bronchialkarzinom) repräsentiert. Diese machen bei beiden Geschlechtern über ein Drittel aller Krebserkrankungen in Deutschland aus, was die Relevanz dieser Erkrankungen für das deutsche Gesundheitssystem verdeutlicht [77]. Alle drei Zellreihen sind zudem gut etabliert und in ihrer Handhabbarkeit und ihren Eigenschaften eingehend charakterisiert [78-80]. Neben den Tumorzellen sind auch die Stroma-Zellen dem Tumormikromilieu und somit der Azidose ausgesetzt. Zentral dabei sind die Tumor-assoziierte Fibroblasten (cancer associated fibroblasts, CAF) [81]. Es war daher für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, ob sich Azidose-assoziierte Veränderungen der Mitochondrienaktivität in Tumorzellen von den der Stroma-(Normal)-Zellen unterschied. NRKF-Zellen boten sich als schon über Jahrzehnte gut untersuchte Zellreihe dafür an [82].

5.1.3 Messung des Sauerstoffverbrauchs

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels des Seahorse XF96 und des Stress Mito Stress Kits ermöglicht es, verschiedene Parameter des Sauerstoffverbrauchs einer Zelle zu

betrachten. Die einzelnen Parameter sind teils nicht direkt gemessen, sondern werden errechnet. Für die basale mitochondriale Sauerstoffverbrauchsmessung wird der Sauerstoffverbrauch (OCR, oxygen consumption rate) der Zellen ohne Zugabe von Modulatoren gemessen. Anschließend wird Oligomycin zugegeben. Oligomycin hemmt die ATP-Synthase (Komplex V) der Atmungskette und inhibiert somit die oxidative Phosphorylierung der Zellen [83]. Typischerweise nimmt die OCR um den für die ATP-Bildung verwendeten Sauerstoff ab [84]. Übrig bleibt der Oligomycin-unabhängige Sauerstoffverbrauch, welcher sich aus dem Protonenleck und dem nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zusammensetzt. Der Protonenleck-Strom definiert sich als der Protonenfluss, der unabhängig von der ATP-Synthase die innere Mitochondrienmembran überwinden und in die Matrix strömt [85]. Der Protonenleck-Strom setzt sich aus einem basalen und einem induzierbaren Teil zusammen. Das basale Protonenleck ist unreguliert, Zelltyp-spezifisch und korreliert mit der metabolischen Rate der Zelle [85]. Das induzierbare Protonenleck hingegen wird über die Adenin-Nukletid-Translokase und „uncoupling proteins“ reguliert und kann durch Fettsäuren, Superoxide und Peroxidationsprodukte aktiviert werden [85]. In braunem Fettgewebe dient der induzierbare Protonenleck-Strom der Wärmeproduktion, in andere Zelltypen ist der physiologische Grund des induzierbaren Protonenleck-Stroms jedoch noch unklar [85]. Der Protonenleck-Strom von Zellen verhält sich nicht-linear sondern exponentiell (nicht-ohmsch) zu der Protonen-treibenden Kraft, also dem Membranpotential [85]. Oligomycin erhöht das Membranpotential, wodurch der Protonenleck-Strom steigt. Durch diese Erhöhung resultiert eine Überschätzung des Protonen Leaks [84, 86-88]. Im dritten Schritt erfolgte die Zugabe von FCCP, einem sogenannten „uncoupling agent“. FCCP hebt den Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran komplett auf. Das Resultat ist ein ungehinderter Fluss von Elektronen durch die Atmungskette und ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch. Hieraus lässt sich der maximale Sauerstoffverbrauch durch die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) ableiten. Die Differenz zwischen dem maximalen FCCP-induzierten und dem basalen Sauerstoffverbrauch wird als Reservekapazität der Zelle bezeichnet. In Zeiten von erhöhtem ATP-Bedarf oder anderem Stress kann eine Zelle ihren Verbrauch maximal um diese Größe erhöhen [89]. Außerdem lässt sich aus diesem Wert abschätzen, inwieweit die maximale mögliche Mitochondrienaktivität bereits unter Ruhebedingungen ausgeschöpft ist. Ein Wert der Reservekapazität nahe "0" bedeutet, dass die Zelle bereits in Ruhe einen annähernd maximalen O₂-Verbrauch aufweist. Im letzten Schritt wurde Rotenon und Antimycin A zugegeben. Antimycin A hemmt Komplex III, Rotenon wiederum hemmt Komplex I [90, 91].

Nun ist der Sauerstoffverbrauch der Atmungskette vollständig gehemmt. Übrig bleibt der nicht-mitochondriale O_2 -Verbrauch, welcher von allen mitochondrialen Sauerstoffparametern abgezogen werden muss.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Erhöhter Sauerstoffbedarf von Tumorzellen

Tumorzellen sind durch eine hohe Teilungsrate gekennzeichnet, denn eine schnelle Proliferation ist Ziel der Zellen. Dementsprechend ist der Sauerstoffverbrauch in verschiedenen Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe erhöht [92]. Auch in den Resultaten dieser Arbeit war der Sauerstoffverbrauch in Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen eindeutig höher (Abb. 11). Alle vier untersuchten Zellreihen wiesen jedoch bereits unter Ruhebedingungen einen relative hohen basalen Sauerstoffverbrauch auf, denn ihre Reservekapazität war niedrig. Die Reservekapazität von Zellen gilt als Maß für die mögliche Steigerung des Sauerstoffverbrauchs unter Stressbedingungen. Die Reservekapazität wird als klein bezeichnet, wenn sie kleiner als das Doppelte des basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs ist [93]. Alle vier untersuchten Zellreihen haben nach dieser Definition unter allen Messbedingungen eine kleine Reservekapazität (Abb. 12 – Abb. 15). Gründe hierfür können unterschiedlicher Natur sein. Vorgänge, die zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs führen und somit den basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch steigern, sind unter anderem Differenzierung oder Proliferation, da diese viel ATP benötigen [93]. Da Tumorzellen stets proliferieren, wäre dies eine Erklärung für ihre niedrige Reservekapazität [93]. Chronische Erkrankungen, Zellalterung und Mitochondrienschäden können ebenfalls zu einer Abnahme der Anpassungsfähigkeit der mitochondrialen Sauerstoffproduktion an den Bedarf führen und dadurch die Reservekapazität vermindern [93]. Weshalb auch die Reservekapazität der Fibroblasten niedrig war, bleibt unklar. Eine niedrige Reservekapazität könnte sich prinzipiell als Nachteil erweisen, da die Zellen unter Stressbedingungen nur im geringen Maße ihre ATP-Produktion mittels oxidativer Phosphorylierung steigern können. Jedoch ist es Tumorzellen möglich mittels des Warburg Effekt Sauerstoff-unabhängig ATP zu erzeugen, wodurch eine niedrige Reservekapazität kompensiert werden kann [93].

Der erhöhte Sauerstoffverbrauch der Tumorzellen könnte ein Grund für die in Tumoren vorherrschende Hypoxie sein, welche wiederum entscheidenden Einfluss auf die Tumorprogression, Metastasierung, sowie Resistenz gegen einige Chemotherapeutika und Bestrahlungstherapien hat [94]. Die Hypoxie in soliden Tumoren wiederum beeinflusst den

Metabolismus hin zur Glykolyse, welche zu einer Ansäuerung des Mikromilieus beiträgt [94]. Neue Erkenntnisse zeigen, dass bei Tumorzellen unter Normoxie der Großteil des ATPs aus den Mitochondrien kommt [95]. Die Zellen scheinen also neben der aeroben Glykolyse auch in hohem Maße oxidative Phosphorylierung zu betreiben, und abhängig von internen und externen Stressoren zwischen beiden Stoffwechselwegen zu wechseln [93]. Dies lässt sich auch aus den Ergebnissen dieser Studie ableiten, denn der Grundverbrauch von Sauerstoff für die ATP-Gewinnung ist in allen drei Tumorzelllinien im Vergleich zu normalen Fibroblasten deutlich erhöht. Ergebnisse anderer lassen sogar vermuten, dass das Maß der Flexibilität der Tumorzellen zwischen Glykolyse und oxidativen Phosphorylierung zu wechseln, die Aggressivität von Tumoren vorhersagen lässt [96]. Ein kompletter Wechsel hin zur oxidativen Phosphorylierung erscheint jedoch unwahrscheinlich, denn Tumore lassen sich mittels FDG-Akkumulation, also mittels ihrer hohen glykolytischen Rate, detektieren. Womöglich ist der Schlüssel dazu nicht die Tumorzelle selbst, sondern die sie umgebenden Stromazellen. Es konnte gezeigt werden, dass Mammakarzinomzellen über Wasserstoffperoxid Mitophagie in den Stromazellen ihrer Umgebung induzieren und so bei ihnen die Glykolyse antreiben [97]. Diese geben vermehrt die Endprodukte der Glykolyse Laktat und Ketone ab, welche die Tumorzellen wiederum zur mitochondrialen Energiegewinnung verwenden. Diese Interaktion zwischen Tumormikromilieu und den Tumorzellen wird als „reverser Warburg-Effekt“ bezeichnet und kann unter anderem als Erklärung für die hohe glykolytische Rate von soliden Tumoren angesehen werden [27].

5.2.2 Bedeutung der untersuchten Signalwege für den Sauerstoffverbrauch bei neutralem pH

a p38

Die Inhibition des p38-Signalwegs führte bei Kontroll pH (7,4) zu einer geringen Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs. Lediglich in den Mammakarzinomzellen kam es bei Inhibition zu einer leichten Steigerung des basalen mitochondrialen, sowie des ATP-abhängigen Sauerstoffverbrauchs. In U2OS humane Osteosarkomzellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von p38 zu einer Zunahme des Sauerstoffbrauchs führt, die vermutlich durch eine gesteigerte mitochondriale Proliferation zu erklären ist. Auch zeigte sich unter längerdauernder p38-Aktivierung eine Zunahme des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP-Produktion, was auf eine regulatorische Wirkung von p38 im mitochondrialen Stoffwechsel hindeutet [64]. Die hier durchgeführten Versuche konnten

diese Ergebnisse nicht für die verwendeten Tumorzellen bestätigen und es zeigte sich keine, beziehungsweise eine entgegengesetzter Beeinflussung.

b ERK1/2

Die Inhibition des ERK1/2-Signalwegs nahm Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch der untersuchten Zellen. Der basale mitochondriale Sauerstoffverbrauch in MCF-7-, H358- und NRKF-Zellen nahm bei Inhibition des ERK1/2-Signalwegs bei pH 7,4 ab, auf den basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch der AT1-Zellen hatte die Inhibition unter neutralen Bedingungen jedoch keinen Einfluss (Abb. 20 – Abb. 23). Dies stimmt mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die zeigen konnten, dass der ERK1/2-Signalweg die oxidative Phosphorylierung beeinflussen kann [98-100]. Bei den Mamma- und Bronchialkarzinomzellen sank bei Inhibition ebenfalls der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch, sowie das Protonen Leak. Die Reservekapazität nahm bei NRKF-Zellen zu, bei den H358-Zellen leicht ab. Damit stehen die Ergebnisse im Gegensatz zu einer weiteren Studie, die zeigte, dass die Aktivierung des ERK1/2-Signalweg in Tumorzellen zu einer Senkung der Reservekapazität führte [101].

U0126 ist als Inhibitor des ERK1/2-Signalweges etabliert und weitverbreitet. Es gibt Hinweise, dass U0126, sowie andere verbreitete ERK1/2-Inhibitoren, nicht nur MEK1/2 hemmen, sondern eine direkte Wirkung auf Komplex 1 der Atmungskette ausüben [100]. In dieser Arbeit konnte im Kontrast dazu eine Zell-Typ abhängige Reduktion des Sauerstoffverbrauchs bei Zugabe von U0126 festgestellt werden. Bei einer direkten Wirkung auf die Atmungskette von U0126 wäre eine Reduktion in allen Zellreihen gleichermaßen und unabhängig von den Versuchsbedingungen zu erwarten gewesen.

c PI3K

Die Inhibition von PI3K bei pH 7,4 hatte einen Effekt auf den Sauerstoffverbrauch der Lungenkarzinomzellen, bei denen der basale und nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch sank. Das Protonen Leak sank bei den Mamma-Karzinom- und Bronchialkarzinom-Zellen (Abb. 26 – Abb. 29). Diese Ergebnisse für die Lungenkarzinomzellen stehen im Einklang mit Studien andere, die ebenfalls eine Beeinflussung der oxidativen Phosphorylierung durch den PI3K-Signalwegs nachwiesen [102, 103].

Calcium-abhängige Signaltransduktion, der mTOR-Signalweg sowie die Inhibition von PKC hatten keinen relevanten Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen.

5.2.3 Einfluss der Azidose auf den Sauerstoffverbrauch von Tumorzellen

Bekannt ist, dass die mitochondriale Aktivität von verschiedenen Faktoren des in Tumoren vorherrschenden metabolischen Mikromilieus, wie Hypoxie oder oxidativen Stress, beeinflusst wird [104, 105]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch extrazelluläre Azidose auf die mitochondriale Aktivität Einfluss nimmt. In AT1-Zellen war eine sehr deutliche Steigerung des mitochondrialen O₂-Verbrauchs unter Azidose zu erkennen (Abb. 12). Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch in H358-Zellen (Abb. 13). Bei den H358-Zellen nahm die Reservekapazität unter Azidose signifikant auf circa Null ab. Dies spricht dafür, dass die Bronchialkarzinomzellen nun das Maximum des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs erreicht hatten, wohingegen die AT-1-Zellen ihren Sauerstoffverbrauch noch steigern könnten. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass AT-1-Zellen eine viel höhere mitochondriale Aktivität haben. Die Reservekapazität der AT-1-Zellen ist bei pH 7,4 ungefähr doppelt so groß wie die der H358-Zellen. Einige wenige Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben sich ebenfalls mit dem O₂-Verbrauch in Normal- und Tumorzellen bei Azidose beschäftigt und konnten ähnliche Ergebnisse beschreiben. So wurde für Gliom-Stammzellen gezeigt, dass bei einem pH von 6,8 der mitochondriale und nicht mitochondriale Sauerstoffverbrauch zunimmt [106]. In kortikalen Neuronen nahm der Sauerstoffverbrauch unter extrazellulärer Azidose von pH 6,5 um circa 50% zu, der nicht-mitochondriale und ATP-abhängige Sauerstoffverbrauch blieb jedoch unbeeinflusst [107]. Auch Xie et al. konnten einen ähnlichen Effekt für eine Laktat-Azidose beschreiben [108].

Im Gegensatz hierzu wurde in der vorliegenden Untersuchung in MCF-7-Karzinomzellen keine Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs durch einen niedrigen pH gefunden (Abb. 14). Eine generelle Aussage über Tumorzellen ist daher schwer zu treffen. Auch auf den Sauerstoffverbrauch der normalen Nierenfibroblasten hatte Azidose keinen Einfluss (Abb. 15). Trotzdem scheint es in vielen Tumorzellen zu einer Zunahme der Zellatmung unter azidotischen Bedingungen zu kommen. Bekanntermaßen wird der Metabolismus nicht allein durch Aktivierung metabolischer Signalwege wie den Wachstumsfaktoren oder Zytokine reguliert. Auch Hypoxie, als Teil des metabolischen Mikromilieus solider Tumoren, beeinflusst den Metabolismus. Über die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors wird die Bildung von Enzymen der Glykolyse, die vermehrte Bildung von Glukose-Transportern (und damit die Aufnahme von Glukose in die Zelle) und die Bildung der Pyruvat-Dehydrogenase gesteigert. Hypoxie fördert auf Translationsebene einen Wechsel des Stoffwechsels hin zu Glykolyse [6]. Ähnliches ist auch für den Einfluss der Azidose denkbar. So könnte Azidose

Signalwege aktivieren, welche wiederum die Translation mitochondrialer Proteine steigern, die für die oxidative Phosphorylierung zentral sind. Auch eine direkte Beeinflussung der Atmungskette ist denkbar. Einige Signaltransduktionswege, die insbesondere für die Regulation des Zell-Zyklus und des Zellüberlebens bekannt sind, sind für die Signalübermittlung denkbar [93]. Zu ihnen gehören die MAP-Kinasen-Kaskaden, der PI3K-Signalweg, aber auch die PKC und Calcium-abhängige Signalwege.

5.2.4 Einfluss der Signalwege unter Azidose

a p38

Die Inhibition des p38-Signalweges führte bei Azidose in H358-Zellen zu einer Zunahme des basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, sowie einer Zunahme des Protonenleck-Stroms und des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. In den anderen untersuchten Zellreihen konnte keine pH-abhängige Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs durch die Inhibition von p38 nachgewiesen werden. p38 scheint daher keinen relevanten Einfluss auf die Azidose-abhängige Steigerung des Sauerstoffverbrauchs von Tumorzellen zu haben.

b ERK1/2-Signalweg

Frühere Ergebnisse und die aktuellen Messungen der Arbeitsgruppe habe eindeutig gezeigt, dass es in Tumorzellen durch Inkubation unter azidotischen Bedingungen zu einer Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs kommt [22]. Die Hemmung des ERK1/2-Signalweges führt zu einer Reduktion des mitochondrialen und nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs unter Azidose in allen drei Tumorzelllinien, nicht jedoch in den Normalzellen (Abb. 20 - Abb. 23). Durch die Hemmung des ERK1/2-Signalwegs in Tumorzellen (AT-1 und H358) konnte die durch die Azidose induzierte Steigerung des mitochondrialen und nicht mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs zumindest teilweise unterdrückt werden und der Sauerstoffverbrauch näherte sich dem bei neutralem pH-Wert an. Jedoch wurde das Ausgangsniveau bei neutralem pH-Wert zu keinem Zeitpunkt erreicht. Daraus lässt sich folgern, dass der ERK1/2-Signalweg den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch beeinflusst, jedoch nicht allein für die Azidose-abhängige Steigerung des Sauerstoffverbrauchs verantwortlich sein kann. Die Reservekapazität wurde ebenfalls durch die Inhibition des ERK1/2-Signalweg verändert, wenngleich die Beeinflussung uneinheitlich blieb (Abb. 20 - Abb. 23). Während bei den H358-Zellen die Inhibition mit U0126 bei Azidose zu einer Steigerung der Reservekapazität führte und Azidose alleine keinen Einfluss auf sie hatte, ist bei AT1-Zellen eine Senkung der Reservekapazität bei

Azidose und Inhibition zu erkennen. Eine abschließende Beurteilung für Tumorzellen bleibt daher schwierig.

Unterschiedliche Mechanismen der Anpassung des Sauerstoffverbrauchs an die metabolischen Anforderungen sind Teil aktueller Forschung, unter anderem die Fusion und Teilung von Mitochondrien, welche insbesondere unter Stress der Anpassung dienen [109]. So wird durch Mitochondrienteilung Mitophagie eingeleitet und der Sauerstoffverbrauch reduziert sowie durch Fusion eine höhere Energieproduktion möglich [109]. Fusion von Mitochondrien konnte bei niedrigem pH in neuronalen Zellen nachgewiesen werden [107]. Fusion ist daher ein denkbarer Mechanismus, über den die Tumorzellen ihren mitochondrialen Sauerstoffverbrauch steigern. Gleichzeitig wird Mitochondrienteilung primär über einen Phosphorylierungsvorgang des DRP1 eingeleitet, welches wiederum von MAPK wie ERK1/2 reguliert wird [110, 111]. Der Zusammenhang von extrazellulärer Azidose, ERK1/2 und Mitochondrienfusion und -teilung mit dem Sauerstoffverbrauch der Zelle erscheint somit ein interessantes Feld für zukünftige Studien.

Aus Mangel eines geeigneten Aktivators des ERK1/2-Signalwegs in AT-1-Zellen, konnte die Aktivierung nur in MCF7- und H385-Zellen untersucht werden. Die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges wurde zuvor mittels Western Blot gesichert (Abb. 33). Die Ergebnisse zeigten, dass eine Aktivierung nicht unmittelbar zu einer Zunahme des Sauerstoffverbrauchs führte, sondern den basalen mitochondrialen Verbrauch sogar sinken ließ (Abb. 24 - Abb. 25). Der ATP-abhängige Verbrauch blieb annähernd unbeeinflusst. Bei gleichzeitiger Inkubation mit PMA und U0126 ließ sich eine größere Abnahme des Sauerstoffverbrauchs als bei alleiniger Inkubation mit U0126 feststellen. Ob dies auf eine Beeinflussung der Zellatmung durch PMA (unabhängig von einer ERK1/2-Aktivierung) zurückzuführen ist, lässt sich derzeit nicht sicher sagen. Es ist anzumerken, dass die Reservekapazität der beiden Zellreihen unter Kontrollbedingungen sehr gering war. Die Zellen scheinen basal schon beinahe das Maximum an Sauerstoff zu verbrauchen. Eine weitere Steigerung des O₂-Verbrauchs durch eine PMA-induzierte Stimulation von ERK1/2 ist daher vermutlich in nur sehr beschränktem Umfang möglich. Über welche Mechanismen PMA den Sauerstoffverbrauch in den untersuchten Tumorzelllinien beeinflusst, muss derzeit offen bleiben.

c PI3K-Signalweg

Ebenso wie der ERK1/2-Signalweg nahm auch der PI3K-Signalweg in der vorliegenden Untersuchung Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch unter azidotischen Bedingungen. In allen Tumorzellen führte eine Hemmung dieses Signalwegs zu einer Reduktion des basalen

mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs bei pH 6,6, nicht jedoch in den Normalzellen (Abb. 26 - Abb. 29). Der ATP-abhängige Sauerstoffverbrauch wurde nur bei den AT-1 Zellen durch Inhibition des PI3K-Signalwegs negativ beeinflusst. Zudem hatte die Inhibition des PI3K-Signalwegs unter Azidose Einfluss auf den Protonenleck-Strom der Zellen. In allen vier Zelllinien nahm er unter Azidose bei Hemmung des PI3K-Signalwegs ab, wenn auch nur in den Lungenkarzinomzellen signifikant. Für die Regulation der Reservekapazität ist ein Einfluss des PI3K-Signalweges bekannt [93]. In den Messungen der vorliegenden Arbeit lässt sich lediglich eine Abhängigkeit der Reservekapazität der Bronchialkarzinomzellen vom PI3K-Signalweg nachweisen. Azidose führte zunächst zu einer signifikanten Abnahme der Reservekapazität der Zellen, die zusätzliche Inhibition führte wieder zu einer deutlichen Zunahme. Dies spricht für eine Azidose-abhängige Aktivierung des PI3K-Signalwegs in den Lungenkarzinomzellen, welcher die Reservekapazität negativ beeinflusst.

Neben ERK1/2 konnte auch für den PI3K-Signalweg eine Beeinflussung der mitochondrialen Teilung gezeigt werden [112]. Somit ist wie auch schon für ERK1/2 eine Phosphorylierung von DRP1 über den PI3K-Signalweg und eine gesteigerte Teilung für die Abnahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in Tumorzellen denkbar.

mTOR als Down-Stream-Faktor in der PI3K-Kaskade wiederum hatte keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch (Abb. 30). Somit wird die PI3K-abhängige Reduktion des Sauerstoffverbrauchs vermutlich über andere Zielproteine geregelt.

Die Inhibition der anderen untersuchten Signalwege (Calcium-abhängig, PKC) führte zu keiner Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs und sind daher vermutlich nicht an dessen Regulation beteiligt.

5.2.5 Anlagerung von pAkt und pERK1/2 an die Mitochondrien

Extrazelluläre Azidose führt bekanntermaßen zu einer Aktivierung des Signalwegs ERK1/2 und PI3K [22]. Auch in der vorliegenden Untersuchung führte Azidose zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 in den Tumorzellen, nicht hingegen in den normalen Fibroblasten (Abb. 33). Die Expression von ERK1/2 wurde hingegen nicht beeinflusst (Abb. 34). Es ist bekannt, dass ERK1/2 direkt mit Mitochondrien interagieren und beispielsweise in die Regulation der Mitochondrien-Teilung bzw. -Fusion eingreifen kann [113]. Bei der Analyse, in welcher Zellfraktion (Zytosol oder Mitochondrien) der Vorgang der Azidose-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung vorrangig in AT1-Zellen stattfindet, zeigte sich, dass aktiviertes phosphoryliertes ERK1/2 vor allem an den Mitochondrien lokalisiert war (Abb. 36). Ähnliches zeigte sich auch für phosphoryliertes Akt, welches als Zielprotein der PI3K-

Kaskade der Überprüfung der Aktivität dieses Signalwegs diene. pAKT war ebenfalls vermehrt in der mitochondrialen Proteinfraction bei Azidose nachweisbar (Abb. 37). Eine direkte Interaktion von Signalfaktoren mit den Mitochondrien wurde bereits von anderen Autoren untersucht. So konnte eine Translokation von phosphoryliertem ERK1/2 und eine Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs unter anderem in Maus-Nierenepithelzellen gezeigt werden [99]. Für pAkt ließ sich ebenfalls eine Verlagerung an die Mitochondrien sowie eine Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität nachweisen [102, 103]. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass vermutlich sowohl der ERK1/2-Signalweg als auch die PI3K-Kaskade Azidose-abhängig den Sauerstoffverbrauch von Tumorzellen über eine direkte Interaktion an den Mitochondrien beeinflusst.

5.2.6 Einfluss von Azidose auf das $\Delta\Psi_m$

Das mitochondriale Membranpotential ist, neben dem Sauerstoffverbrauch, ein funktioneller Indikator für die Mitochondrienaktivität, weshalb es ebenfalls untersucht wurde. In Tumorzellen war das mitochondriale Membranpotential nach einer dreistündigen Inkubation in saurem Medium erhöht, nicht jedoch in der Normalzellreihe (Abb. 38). Die fehlende Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ unter Azidose in den Normalzellen kann mit dem fehlenden Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in Zusammenhang gebracht werden. Die Tumorzellen hingegen erhöhten ihren ATP-abhängigen Sauerstoffverbrauch unter Azidose und es kam zu einer Vergrößerung von $\Delta\Psi_m$. Eine Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ nach einstündiger Azidose konnte schon für kortikale Astrozyten der Ratte gezeigt werden [114]. In dieser sowie in einer anderen Studie mit Lymphozyten des peripheren Blutes kam es parallel zur Erhöhung des mitochondrialen Potentials unter Azidose zu einer Erhöhung des ADP/ATP-Verhältnisses [115]. In den hier vorliegenden Ergebnissen stieg hingegen der ATP-abhängige Sauerstoffverbrauch unter Azidose, wenngleich das ADP/ATP-Verhältnis hier nicht untersucht wurde. Für eine genaue Aussage sind weitere Versuche nötig.

Aus der Erhöhung des Membranpotentials könnte gefolgert werden, dass unter Azidose-Bedingungen weniger Mitophagie betrieben wird, da die Depolarisation der Mitochondrienmembran ein wichtiger Auslöser für diesen Abbau von Mitochondrien ist. [116]. Eine verminderte Autophagie kann ihrerseits zu einer gesteigerten Tumorgenese führen, weshalb viele Onkogene die Autophagie unterdrücken. Eine Untersuchung, ob die Mitophagie unter Azidose vermindert ist, wäre demnach ein interessanter Ansatz, insbesondere im Zusammenhang mit der Azidose-abhängigen Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs. Bisher ist die genaue Rolle der Mitophagie in Krebserkrankungen noch nicht vollständig verstanden [52]. Bezüglich des Mitochondrienpotentials gibt es aber Hinweise

darauf, dass eine Hyperpolarisation von $\Delta\Psi_m$ mit einer Förderung der Tumorprogression in Zusammenhang gebracht wird [117]. Insofern könnte das azidotische Tumormikromilieu über eine Erhöhung des Potentials und einer Verminderung der Mitophagie das maligne Verhalten von Tumoren negativ beeinflussen.

5.2.7 Einfluss von ERK1/2 und PI3K auf das $\Delta\Psi_m$

Neben dem Sauerstoffverbrauch stieg auch das mitochondriale Membranpotential unter Azidose in den verwendeten Tumorzellen. Dieser Anstieg konnte durch die Inhibierung von ERK1/2 komplett antagonisiert werden, sodass das Membranpotential, dem bei neutralem pH entsprach (Abb. 39). Bei neutralem pH hatte die Inhibition keinen Einfluss auf das $\Delta\Psi_m$ der Tumorzellen. Dies ist mit den Ergebnissen der Sauerstoffverbrauchsmessung in Einklang zu bringen und spricht dafür, dass ERK1/2 (zumindest teilweise) die Aktivitätssteigerung der Mitochondrien unter Azidose in Tumorzellen vermittelt. Das mitochondriale Membranpotential der Normalzellen wurde durch die Inhibition hingegen nicht beeinflusst. In einer Untersuchung an Makrophagen konnte ebenfalls eine Azidose abhängige Translokation von pERK an die Mitochondrien, sowie eine Reduktion des $\Delta\Psi_m$ bei Inhibition des ERK1/2-Signalwegs nachgewiesen werden [42]. Da Makrophagen Teil des Immunsystems in Tumorgeweben sind (Tumor-assoziierte Makrophagen, TAM) sind sie ebenfalls dem besonderen Mikromilieu einschließlich der extrazellulären Azidose ausgesetzt, sodass sich durchaus Parallelen zwischen dieser und der vorliegenden Arbeit ziehen lassen.

Im Gegensatz dazu hatte die Inhibition von PI3K bei Azidose kaum Einfluss auf das $\Delta\Psi_m$ der Tumor- und Normalzellen, obwohl der Sauerstoffverbrauch der Tumorzellen von diesem Signalweg beeinflusst wurde (Abb. 40). In menschlichen Adenokarzinomzellen der Lunge konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von PI3K zu einer Hyperpolarisation führte [103]. In Astrozyten wurde beschrieben, dass eine Akt-Aktivierung mit SC79 eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials erzeugte [114]. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung stehen hierzu im Widerspruch und eine abschließende Beurteilung des Einflusses des PI3K-Signalwegs auf des mitochondriale Membranpotential muss derzeit offenbleiben.

Die Inhibition von mTOR führte zu einer Hyperpolarisation bei neutralem pH aller Zellreihen und bei AT-1-Zellen auch bei Azidose (Abb. 41). Es ist bekannt, dass mTOR über die Depolarisation des $\Delta\Psi_m$ Autophagie einleiten kann [52], umgekehrt die Inhibierung also in einer Hyperpolarisation resultieren könnte. Da PI3K-inhibition in der vorliegenden Arbeit

nicht wie die Inhibition von mTOR zu einer Hyperpolarisation führte, scheint mTOR unabhängig von PI3K aktiviert zu werden.

5.3 Stärken und Schwächen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss der extrazellulären Tumorzidose auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und das Membranpotential untersucht. Ein Schwerpunkt lag hierbei einerseits im Vergleich zwischen Tumor- und Normalzellen sowie der Untersuchung der Rolle verschiedener intrazellulärer Signalwege. Grundlegend schon bekannte Ergebnisse bezüglich des erhöhten Sauerstoffverbrauchs von Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden [92]. Für den Vergleich von Tumor- zu Normalzellen wurden immortalisierte Nierenfibroblasten verwendet. Dieser Ansatz könnte aber auch zu einer Limitierung der Aussagekraft führen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) in einigen funktionellen Parametern anderes verhalten können als Normalgewebsfibroblasten. Eventuell könnten die TAFs Adaptationsprozesse an das Mikromilieu durchlaufen haben [81]. Dieser Kompromiss musste in der vorliegenden Arbeit eingegangen werden, da die Gewinnung primärer Tumor-assoziiierter Fibroblasten außerordentlich arbeitsaufwändig ist. In weitergehenden Studien sollte aber die Wirkung der Azidose auch auf TAFs untersucht werden. Die Auswahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorzellreihen erfolgte auf der Grundlage der Häufigkeit der Krebserkrankungen aus epidemiologischer Sichtweise (Prostata-, Bronchial- und Mamma-Karzinom) und kann daher als repräsentativ für die wichtigsten Tumorentitäten angesehen werden.

Für die Fragestellung von Bedeutung und somit als positives Ergebnis zu bewerten ist die eindeutig nachzuweisende Anreicherung zweier aktivierter Signalproteine (pERK und pAKT) in räumlicher Nähe zu den Mitochondrien. Es zeigt deutlich, dass Azidose-aktivierte Signalkaskaden zu Veränderungen im mitochondrialen Kompartiment führen und somit eine Verknüpfung vom extrazellulären Mikromilieu zu Mitochondrien besteht. Einschränkend muss berücksichtigt werden, dass die verwendete Aufreinigungsmethode keine Aussage darüber zulässt, ob sich die aktivierten Proteine in oder an den Mitochondrien beziehungsweise deren Membran befinden. Die Arbeit muss daher derzeit offenlassen, ob die Signalwege tatsächlich in den Mitochondrien ihre Wirkung entfalten.

Eine weitere Stärke der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass die Untersuchung nicht auf einen Signalweg beschränkt wurde. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass zwar verschiedene Wege, aber nicht alle einen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen haben. Außerdem ist hervorzuheben, dass neben dem Sauerstoffverbrauch der Zellen auch

das mitochondriale Membranpotential als weiterer Parameter der Aktivität herangezogen wurde. Die Zusammensicht beider Parameter unterstützt die Schlussfolgerung, dass die Azidose das funktionelle Verhalten der Mitochondrien beeinflusst. Beide Messparameter zeigten in Bezug auf den ERK1/2-Signalweg kongruente Ergebnisse und untermauern daher die Rolle von ERK1/2 für die mitochondriale Aktivität in Krebszellen. Auch hier sollte eine Einschränkung der Aussagekraft nicht unerwähnt bleiben. Leider musste aus Mangel eines passenden Aktivators des ERK1/2-Signalwegs auf eine artifizielle ERK1/2-Aktivierung verzichtet werden. Untersuchungen mit einem solchen Aktivator hätten die Ergebnisse auf eine fundiertere Basis gestellt.

Schließlich muss auch die Frage, auf welcher Ebene und über welche Mechanismen die MAP-Kinasen die Mitochondrien beeinflussen, derzeit noch unbeantwortet bleiben. Aus den vorliegenden Ergebnissen eröffnen sich aber hierzu zahlreiche Fragestellungen für zukünftige Untersuchungen.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der saure extrazelluläre pH-Wert, der typischerweise in dem metabolischen Mikromilieu solider Tumoren vorliegt, den mitochondrialen und teilweise auch den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch in zwei der drei untersuchten Tumorzelllinien erhöhte. Zudem nahm unter Azidose das Membranpotential zu, was ebenfalls auf eine Aktivitätssteigerung der Mitochondrien in Tumorzellen hinweist. In Normalzellfibroblasten, welche ebenfalls Teil des Tumorgewebes sind, waren beide Effekte nicht nachweisbar. Die vorliegenden Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs zumindest teilweise durch den ERK1/2- und PI3K-Signalweg vermittelt wird. Die Hyperpolarisation von $\Delta\Psi_m$ wird eventuell ebenfalls vom ERK1/2-abhängig zu sein. Für die Signalübermittlung scheinen sich pERK1/2 beziehungsweise pAkt direkt an die Mitochondrien anzulagern.

Weshalb es zu einer Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials und des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in Tumorzellen kommt, kann derzeit noch nicht entschieden werden. Eine mögliche Erklärung für die Azidose-abhängige Erhöhung des Membranpotentials, sowie der Erhöhung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in den Tumorzellen könnte die Fusion von Mitochondrien sein. Mitochondrien passen sich durch morphologische Veränderungen an den Energiebedarf der Zellen an. Unter Stressbedingungen kann es zu einer verstärkten Fusion kommen, welche eine Erhöhung der Energieproduktion zur Folge hat. Zellulärer Stress kann aber auch zu einer verstärkten

Teilung von Mitochondrien führen, wodurch Mitophagie eingeleitet werden kann [109]. Der Effekt von Azidose auf die Morphologie der Mitochondrien und der Einfluss von ERK1/2 und PI3K ist daher ein interessanter Ansatz für weitere Forschung.

Erste Inhibitoren des ERK1/2- und des PI3K- Signalweges befinden sich in klinischen Studien an Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen oder haben bereits Einzug in die Therapie gefunden [118, 119]. Ein umfassendes Verständnis der Signalwege und seine Wirkungsorte (z.B. auch an den Mitochondrien der Tumorzellen) und für den Energiestoffwechsel hat daher große Relevanz für Entwicklung dieser Therapeutika.

6 Zusammenfassung

Das metabolische Mikromilieu solider Tumoren ist neben einer ausgeprägten Hypoxie unter anderem durch extrazelluläre Azidose charakterisiert. Der Stoffwechsel der Tumor- und Stromazellen des Tumorgewebes ist zum Teil der Ursprung der Azidose, da es sowohl durch den Sauerstoffmangel zu einer verstärkten anaeroben Glykolyse als auch durch den „Warburg Effekt“ zu einer verstärkten Milchsäurebildung selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung kommt. Neben der Glykolyse betreiben Tumor- und Normalzellen, die ebenfalls Bestandteil des Tumorgewebes sind, oxidative Phosphorylierung. Dieser Vorgang findet in den Mitochondrien an den Enzymkomplexen der Atmungskette statt und das entstehende ATP ist essenziell, für das Zellüberleben sowie die Proliferation der Tumorzellen. Der Energiestoffwechsel des Tumorgewebes lässt sich am zellulären O₂-Verbrauch abschätzen, wobei aber nicht der gesamte Sauerstoffverbrauch für die ATP-Synthese eingesetzt wird. Darüber hinaus verbrauchen Zellen O₂ auch unabhängig von Mitochondrien. Das mitochondriale Membranpotential wird als Indikator für die Aktivität der Mitochondrien zur ATP-Synthese angesehen.

Da für Faktoren des extrazellulären Tumormilieus (z.B. Hypoxie, Zytokine) bekannt ist, dass sie die mitochondriale Aktivität beeinflussen können, war das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung, ob auch der azidotische extrazelluläre Tumor-pH den zellulären O₂-Verbrauch und das mitochondriale Membranpotential beeinflusst. Hierzu sollten unterschiedliche Komponenten der Zellatmung (z.B. O₂-Verbrauch für ATP-Synthese, Reservekapazität oder nicht-mitochondrialer Verbrauch) analysiert werden. Da aus Voruntersuchungen bekannt war, dass es durch die Azidose zu einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege (z.B. p38, ERK1/2) kommt, sollte anschließend ermittelt werden, ob diese Signalwege für die Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität von Bedeutung sein könnten.

Die Untersuchungen wurden an drei Tumorzellreihen (AT-1-Prostatkarzinom-, MCF7-Mammakarzinom- und H358-Bronchialkarzinom-Zellen) und einer Normalzell-Fibroblasten-Linie (NRKF-Zellen) durchgeführt. Die Zellen wurden bei pH 7,4 oder pH 6,6 für drei Stunden inkubiert. Der Sauerstoffverbrauchsmessung erfolgte über Messung der Änderung des O₂-Partialdrucks mittels fluoro-optischen pO₂-Sensoren (*Seahorse XF 96* mit *Mito Stress Kit*). Das Membranpotential wurde mittels des Farbstoffs JC-1 gemessen. Um den Einfluss der Aktivierung möglicher Signalkaskaden (p38, ERK1/2, PI3K, PKC, Akt, mTOR und Calcium-abhängige Signalwege) für den O₂-Verbrauch bzw. das

Mitochondrienpotential zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich mit Inhibitoren dieser Signalwege inkubiert. Für ERK1/2 und Akt erfolgte darüber hinaus eine Messung der Phosphorylierung der Signalmoleküle mittels Western-Blot, wobei auch unterschieden wurde, ob es im zytosolischen oder mitochondrialen Zellkompartiment zu einer Aktivierung kam.

Die Messungen ergaben zunächst, dass Tumorzellen bei neutralem pH-Wert einen erhöhten Sauerstoffverbrauch haben. Extrazelluläre Azidose steigerte in den verwendeten Lungen- und Prostatakarzinomzellen den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch deutlich weiter (z.T. um mehr als 150%). Die Zunahme war am deutlichsten beim basale O₂-Verbrauch und beim Verbrauch zur ATP-Synthese, aber auch die nicht-mitochondriale Atmung nahm unter Azidose deutlich zu. Der Sauerstoffverbrauch der MCF7- und NRKF-Zellen wurde nicht von einer extrazellulären Ansäuerung beeinflusst. Weshalb die Mammakarzinomzellen im Gegensatz zu den anderen beiden Tumorzellreihen keine Azidose-abhängige Steigerung des Sauerstoffverbrauchs zeigten, bleibt unklar. Die Azidose-abhängige Zunahme in AT1- und H358-Zellen war abhängig von der Aktivität der ERK1/2- und PI3K-Signalkasade, wohingegen p38, mTOR, die Proteinkinase C und Calcium-abhängige Signalwege keinen Einfluss auf die Zellatmung hatten.

Neben dem Sauerstoffverbrauch steigerte die extrazelluläre Azidose auch das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) der Lungen- und Prostatakarzinomzellen, während die Fibroblasten keine pH-abhängige Veränderung zeigten. Die Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ hing ebenfalls vom ERK1/2-Signalweg ab, hingegen hatte der PI3K-Signalweg keinen Einfluss auf das Potential. Die Inhibition von mTOR senkte das $\Delta\Psi_m$, was eventuell auf seine Rolle bei der Einleitung der Mitophagie hindeuten könnte.

Unter Azidose fanden sich die phosphorylierten und damit aktivierten Kinasen pAkt und pERK1/2 vermehrt im mitochondrialen Kompartiment der Zelle. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich diese Signalfaktoren bei Azidose direkt an die Mitochondrien anlagern und hierüber zu einer Azidose-abhängige Zunahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und des mitochondrialen Membranpotentials führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Azidose in Tumorzellen den Sauerstoffverbrauch (nicht in MCF7-Zellen) und das mitochondriale Membranpotential steigert. Diese Steigerung ist dabei in Teilen vom ERK1/2 und PI3K-Signalwegen abhängig. Die Wirkung von pAkt und pERK1/2 wird hierbei vermutlich direkt an den Mitochondrien ausgeübt. Die genauen Angriffspunkte sowie den Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie müssen in weiteren Studien untersucht werden. Da sich die Oxygenierung des Tumorgewebes aus dem

Gleichgewicht zwischen O₂-Versorgung und O₂-Bedarf ergibt, kann die Azidose-induzierte Zunahme der Zellatmung eine bereits bestehende Tumorphypoxie verstärken und hierdurch die Therapiebarkeit (z.B. Strahlentherapie) beeinflussen. Da Inhibitoren der PI3K- und ERK1/2-Signalwege in der Onkologie therapeutisch verwendet werden, können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über den Metabolismus und das metabolische Mikromilieu von Tumoren Relevanz für derartigen Therapieformen haben.

7 Literaturverzeichnis

1. Bejarano, L., M.J.C. Jordão, and J.A. Joyce, *Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment*. *Cancer Discov*, 2021. **11**(4): 933-959.
2. Wu, Y., et al., *Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers*. *Cancer Lett*, 2014. **345**(2): 164-73.
3. Michiels, C., C. Tellier, and O. Feron, *Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1866**(1): 76-86.
4. Konerding, M.A., et al., *Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts*. *Br J Cancer*, 1999. **80**(5-6): 724-32.
5. Hui, L. and Y. Chen, *Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil*. *Cancer Lett*, 2015. **368**(1): 7-13.
6. Semenza, G.L., *HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism*. *Curr Opin Genet Dev*, 2010. **20**(1): 51-6.
7. Schowen, R.L., *Principles of biochemistry 2nd ed. (Lehninger, Albert L.; Nelson, David L.; Cox, Michael M.)*. *Journal of Chemical Education*, 1993. **70**(8): A223.
8. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*, 2009. **324**(5930): 1029-33.
9. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
10. Porporato, P.E., et al., *Mitochondrial metabolism and cancer*. *Cell Res*, 2018. **28**(3): 265-280.
11. Warburg, O., *Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle*. *Naturwissenschaften*, 1924. **12**(50): 1131-1137.
12. Vinaik, R., et al., *Regulation of glycolysis and the Warburg effect in wound healing*. *JCI Insight*, 2020. **5**(17).
13. Zhou, W., et al., *HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition*. *Embo j*, 2012. **31**(9): 2103-16.
14. DePeaux, K. and G.M. Delgoffe, *Metabolic barriers to cancer immunotherapy*. *Nat Rev Immunol*, 2021. **21**(12): 785-797.
15. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Cancer metabolism: a therapeutic perspective*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(1): 11-31.
16. Vaupel, P., F. Kallinowski, and P. Okunieff, *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*. *Cancer Res*, 1989. **49**(23): 6449-65.
17. Tannock, I.F. and D. Rotin, *Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation*. *Cancer Res*, 1989. **49**(16): 4373-84.
18. Spugnini, E.P., et al., *Proton channels and exchangers in cancer*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2015. **1848**(10): 2715-2726.
19. Chiche, J., M.C. Brahimi-Horn, and J. Pouyssegur, *Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(4): 771-94.
20. Corbet, C. and O. Feron, *Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat*. *Nature Reviews Cancer*, 2017. **17**(10): 577-593.
21. LaMonte, G., et al., *Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress*. *Cancer & Metabolism*, 2013. **1**(1): 23.

22. Riemann, A., et al., *Acidic Environment Leads to ROS-Induced MAPK Signaling in Cancer Cells*. PLoS ONE, 2011. **6**(7): e22445.
23. Costa, A., A. Scholer-Dahirel, and F. Mechta-Grigoriou, *The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment*. Semin Cancer Biol, 2014. **25**: 23-32.
24. Huang, L. and A.L. Mellor, *Metabolic control of tumour progression and antitumour immunity*. Curr Opin Oncol, 2014. **26**(1): p. 92-9.
25. Riemann, A., et al., *Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2014. **466**(11): 2127-2138.
26. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. **103**(2): 239-52.
27. Wallace, D.C., *Mitochondria and cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(10): p. 685-98.
28. Horbay, R. and R. Bilyy, *Mitochondrial dynamics during cell cycling*. Apoptosis, 2016. **21**(12): 1327-1335.
29. Warburg, O.H., *The classic: The chemical constitution of respiration ferment*. Clin Orthop Relat Res, 2010. **468**(11): 2833-9.
30. Greenbaum, A.L., *The History of Cell Respiration and Cytochrome*. Medical History, 1966. **10**,4: 419-420.
31. Papa, S., et al., *The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria*. Adv Exp Med Biol, 2012. **942**: 3-37.
32. Ye, X.-Q., et al., *Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells*. International Journal of Cancer, 2011. **129**(4): 820-831.
33. Schieke, S.M., et al., *Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(42): 28506-12.
34. Hockenbery, D.M., *A mitochondrial Achilles' heel in cancer?* Cancer Cell, 2002. **2**(1): 1-2.
35. Chen, L.B., *Mitochondrial membrane potential in living cells*. Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: 155-81.
36. Ye, X.Q., et al., *Heterogeneity of mitochondrial membrane potential: a novel tool to isolate and identify cancer stem cells from a tumor mass?* Stem Cell Rev Rep, 2011. **7**(1): 153-60.
37. Krishna, M. and H. Narang, *The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(22): 3525-44.
38. Dewanjee, S., et al., *Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets*. Eur J Pharmacol, 2018. **833**: 472-523.
39. Rai, S.N., et al., *The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders*. Neurotox Res, 2019. **35**(3): 775-795.
40. Guo, Y.J., et al., *ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis*. Exp Ther Med, 2020. **19**(3): 1997-2007.
41. Wortzel, I. and R. Seger, *The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles*. Genes & Cancer, 2011. **2**(3): 195-209.
42. Monick, M.M., et al., *Constitutive ERK MAPK activity regulates macrophage ATP production and mitochondrial integrity*. J Immunol, 2008. **180**(11): 7485-96.
43. Galli, S., et al., *A new paradigm for MAPK: structural interactions of hERK1 with mitochondria in HeLa cells*. PLoS One, 2009. **4**(10): e7541.
44. Cook, S.J., et al., *Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling*. FEBS J, 2017. **284**(24): p. 4177-4195.
45. Coulthard, L.R., et al., *p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics*. Trends Mol Med, 2009. **15**(8): 369-79.

46. Jiang, Y., et al., *Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): 30122-8.
47. Kumar, S., J. Boehm, and J.C. Lee, *p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(9): 717-26.
48. Martínez-Limón, A., et al., *The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).
49. Han, J. and P. Sun, *The pathways to tumor suppression via route p38*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(8): 364-71.
50. Ambrosino, C. and A.R. Nebreda, *Cell cycle regulation by p38 MAP kinases*. Biol Cell, 2001. **93**(1-2): 47-51.
51. Dombi, E., H. Mortiboys, and J. Poulton, *Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease*. Curr Med Chem, 2018. **25**(40): 5597-5612.
52. Ding, W.X. and X.M. Yin, *Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis*. Biol Chem, 2012. **393**(7): 547-64.
53. Cooke, M., et al., *Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions*. Mol Carcinog, 2017. **56**(6): 1531-1542.
54. Antal, C.E., et al., *Cancer-associated protein kinase C mutations reveal kinase's role as tumor suppressor*. Cell, 2015. **160**(3): 489-502.
55. Isakov, N., *Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression*. Semin Cancer Biol, 2018. **48**: 36-52.
56. Churchill, E.N. and D. Mochly-Rosen, *The roles of PKCdelta and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): 1040-2.
57. Wang, C., et al., *Cancer-Specific Therapy by Artificial Modulation of Intracellular Calcium Concentration*. Adv Healthc Mater, 2019. **8**(18): e1900501.
58. Motiani, R.K., et al., *Orai3 is an estrogen receptor α -regulated Ca^{2+} channel that promotes tumorigenesis*. Faseb j, 2013. **27**(1): 63-75.
59. Jing, Z., et al., *SKF-96365 activates cytoprotective autophagy to delay apoptosis in colorectal cancer cells through inhibition of the calcium/CaMKII γ /AKT-mediated pathway*. Cancer Lett, 2016. **372**(2): 226-38.
60. Denmeade, S.R., et al., *Engineering a prostate-specific membrane antigen-activated tumor endothelial cell prodrug for cancer therapy*. Sci Transl Med, 2012. **4**(140): 140ra86.
61. Monteith, G.R., N. Prevarskaya, and S.J. Roberts-Thomson, *The calcium-cancer signalling nexus*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(6): 367-380.
62. Thews, O., et al., *Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs*. Neoplasia, 2006. **8**(2): 143-52.
63. Gupta, S.C., et al., *Regulation of breast tumorigenesis through acid sensors*. Oncogene, 2016. **35**(31): 4102-11.
64. Trempolec, N., et al., *Induction of oxidative metabolism by the p38 α /MK2 pathway*. Sci Rep, 2017. **7**(1): 11367.
65. Smolina, N., et al., *Assaying Mitochondrial Respiration as an Indicator of Cellular Metabolism and Fitness*. Methods Mol Biol, 2017. **1601**: 79-87.
66. Hynes, J., et al., *Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes*. J Biomol Screen, 2003. **8**(3): 264-72.
67. Gerencser, A.A., et al., *Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion*. Anal Chem, 2009. **81**(16): 6868-78.
68. Dmitriev, R.I. and D.B. Papkovsky, *Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(12): 2025-39.

69. O'Riordan, T.C., et al., *Analysis of intracellular oxygen and metabolic responses of mammalian cells by time-resolved fluorometry*. Anal Chem, 2007. **79**(24): 9414-9.
70. Divakaruni, A.S., et al., *Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data*. Methods Enzymol, 2014. **547**: 309-54.
71. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature, 1961. **191**: 144-8.
72. Sugden, P.H., et al., *Monophosphothreonyl extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) are formed endogenously in intact cardiac myocytes and are enzymically active*. Cellular Signalling, 2011. **23**(2): 468-477.
73. Smirnova, I.S., S. Chang, and T.G. Forsthuber, *Prosurvival and proapoptotic functions of ERK1/2 activation in murine thymocytes in vitro*. Cell Immunol, 2010. **261**(1): 29-36.
74. Hu, Y., et al., *ERK1/2 Signaling Pathway Activated by EGF Promotes Proliferation, Transdifferentiation, and Migration of Cultured Primary Newborn Rat Lung Fibroblasts*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: 7176169.
75. Han, J., et al., *Additive effects of EGF and IL-1 β regulate tumor cell migration and invasion in gastric adenocarcinoma via activation of ERK1/2*. Int J Oncol, 2014. **45**(1): 291-301.
76. van der Valk, J., *Fetal bovine serum-a cell culture dilemma*. Science, 2022. **375**(6577): 143-144.
77. *Krebs in Deutschland, Ergebnisse nach ICD-10*. 2018, Zentrum für Krebsregisterdaten.
78. Isaacs, J.T., et al., *Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers*. Prostate, 1986. **9**(3): 261-81.
79. Comşa, Ş., A.M. Cîmpean, and M. Raica, *The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research*. Anticancer Res, 2015. **35**(6): p. 3147-54.
80. Phelps, R.M., et al., *NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base*. J Cell Biochem Suppl, 1996. **24**: 32-91.
81. Cirri, P. and P. Chiarugi, *Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression*. Cancer Metastasis Rev, 2012. **31**(1-2): 195-208.
82. de Larco, J.E. and G.J. Todaro, *Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation*. J Cell Physiol, 1978. **94**(3): 335-42.
83. Hao, W., et al., *Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): 12647-54.
84. Brand, M.D., *The proton leak across the mitochondrial inner membrane*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1018**(2-3): 128-33.
85. Jastroch, M., et al., *Mitochondrial proton and electron leaks*. Essays Biochem, 2010. **47**: 53-67.
86. Brown, G.C., *The leaks and slips of bioenergetic membranes*. Faseb j, 1992. **6**(11): 2961-5.
87. Nicholls, D.G., *The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution*. Eur J Biochem, 1974. **50**(1): 305-15.
88. Nicholls, D.G., *The effective proton conductance of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue. Dependency on proton electrochemical potential gradient*. Eur J Biochem, 1977. **77**(2): 349-56.
89. Dranka, B.P., B.G. Hill, and V.M. Darley-Usmar, *Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(7): 905-14.

90. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat Neurosci, 2000. **3**(12): 1301-6.
91. Yadava, N. and D.G. Nicholls, *Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone*. J Neurosci, 2007. **27**(27): p. 7310-7.
92. Dunn, T., *Oxygen and cancer*. N C Med J, 1997. **58**(2): 140-3.
93. Marchetti, P., et al., *Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells*. Faseb j, 2020. **34**(10): 13106-13124.
94. Horsman, M.R. and P. Vaupel, *Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment*. Front Oncol, 2016. **6**: 66.
95. Ashton, T.M., et al., *Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(11): p. 2482-2490.
96. Valcarcel-Jimenez, L., et al., *Mitochondrial Metabolism: Yin and Yang for Tumor Progression*. Trends Endocrinol Metab, 2017. **28**(10): 748-757.
97. Pavlides, S., et al., *The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma*. Cell Cycle, 2009. **8**(23): p. 3984-4001.
98. Hüttemann, M., et al., *Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007. **1773**(12): 1701-1720.
99. Nowak, G., et al., *Activation of ERK1/2 pathway mediates oxidant-induced decreases in mitochondrial function in renal cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(4): F840-55.
100. Ripple, M.O., N. Kim, and R. Springett, *Acute Mitochondrial Inhibition by Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase (MEK) 1/2 Inhibitors Regulates Proliferation*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(5): 2933-2940.
101. Masgras, I., et al., *The Chaperone TRAP1 As a Modulator of the Mitochondrial Adaptations in Cancer Cells*. Front Oncol, 2017. **7**: 58.
102. Lim, S., et al., *Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation*. Cell Biosci, 2016. **6**: 25.
103. Gao, M., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase affects mitochondrial function in part through inducing peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 β expression*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(4): 1000-8.
104. Duarte, F.V., et al., *Regulation of Mitochondrial Function and its Impact in Metabolic Stress*. Curr Med Chem, 2015. **22**(20): 2468-79.
105. O'Malley, J., et al., *Mitochondrial Stress Response and Cancer*. Trends Cancer, 2020. **6**(8): 688-701.
106. Hu, P., et al., *Acidosis enhances the self-renewal and mitochondrial respiration of stem cell-like glioma cells through CYP24A1-mediated reduction of vitamin D*. Cell Death & Disease, 2019. **10**(1): 25.
107. Khacho, M., et al., *Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival*. Nature Communications, 2014. **5**(1): 3550.
108. Xie, J., et al., *Beyond Warburg effect – dual metabolic nature of cancer cells*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): 4927.
109. Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science, 2012. **337**(6098): 1062-5.
110. Kashatus, J.A., et al., *Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth*. Mol Cell, 2015. **57**(3): 537-51.
111. Lima, A.R., et al., *Dynamin-Related Protein 1 at the Crossroads of Cancer*. Genes (Basel), 2018. **9**(2).

112. Morita, M., et al., *mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1*. Mol Cell, 2017. **67**(6): 922-935.e5.
113. Prieto, J., et al., *Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming*. Nat Commun, 2016. **7**: 11124.
114. Wu, K.-C., et al., *Perturbation of Akt Signaling, Mitochondrial Potential, and ADP/ATP Ratio in Acidosis-Challenged Rat Cortical Astrocytes*. Journal of Cellular Biochemistry, 2017. **118**(5): 1108-1117.
115. Gergely, P., Jr., et al., *Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(1): 175-90.
116. Zong, W.X., J.D. Rabinowitz, and E. White, *Mitochondria and Cancer*. Mol Cell, 2016. **61**(5): 667-676.
117. Singh, K.K., et al., *Mutations in mitochondrial DNA polymerase- γ promote breast tumorigenesis*. Journal of Human Genetics, 2009. **54**(9): 516-524.
118. Roskoski, R., Jr., *Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers*. Pharmacol Res, 2019. **142**: 151-168.
119. Alzahrani, A.S., *PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside*. Semin Cancer Biol, 2019. **59**: 125-132.

8 Thesen

- I. Sowohl Tumorzellen als auch Stromazellen, wie Fibroblasten, werden in soliden Tumoren von extrazellulärer Azidose umgeben, welche auf eine glykolytische Stoffwechsellage, unzureichende Gefäßversorgung und einen ungenügenden Abtransport von Metaboliten zurückzuführen ist.
- II. Azidose aktiviert Signalwege in Tumorzellen, die zur Tumorprogression und Metastasierung beitragen.
- III. Der Sauerstoffverbrauch von Tumorzellen ist höher als der von Normalzell-Fibroblasten.
- IV. Azidose erhöht den Sauerstoffverbrauch von H358- und AT-1-Tumorzellen, nicht jedoch von MCF7-Tumorzellen und NRKF-Zellen.
- V. Die Erhöhung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs der H358- und AT1-Zellen wird durch die ERK1/2- und PI3K-Signalwege beeinflusst.
- VI. Unter Azidose finden sich die aktivierten Kinasen pAkt und pERK1/2 vornehmlich im mitochondrialen Kompartiment von Tumorzellen.
- VII. Extrazelluläre Azidose führt zu einer Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials in Tumorzellen, die ebenfalls durch den ERK1/2-Signalweg vermittelt wird.
- VIII. Normalzell-Fibroblasten reagieren weder mit einer Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials noch mit einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs auf extrazelluläre Azidose und verhalten sich somit grundlegend anders als Tumorzellen.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift

Publikationen

C. Degitz, S. Reime and O. Thews,

Role of acidosis induced signaling pathways on mitochondrial O₂-consumption of tumor cells

Poster auf der 48. Konferenz der International Society of Oxygen to Transport to Tissue, online, 2021

C. Degitz, S. Reime and O. Thews, Role of acidosis induced signaling pathways on mitochondrial O₂-consumption of tumor cells, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2022

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. O. Thews und dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Einführung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten. Zu großem Dank bin ich ihm zudem für die stets hervorragende Betreuung und ausführliche Beratung bei der Durchführung der Experimente und Anfertigung der Arbeit verpflichtet.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, insbesondere Frau S. Reime, danke ich für die freundliche und kollegiale Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. S. Al-Robaiy des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung der Universitätsklinik Halle (Saale) für die Unterstützung in der Versuchsdurchführung am Seahorse XF Analyzer.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden und meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums sowie der Fertigstellung dieser Arbeit.