

"Azidose-induzierte Veränderung der Signaltransduktion und
Invasivität von Prostatakarzinomzellen der Ratte (AT-1):
Mechanismen und Bedeutung"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Anne Riemann

geb. am: 04.10.1982 in: Halle/Saale

Gutachter

1. Prof. Dr. K. Mäder
2. Prof. Dr. M. Gekle
3. PD Dr. C. Stock

Halle (Saale), 28.11.2012

Inhaltsangabe

1	Einleitung.....	1
1.1	Vorwort.....	1
1.2	Tumormikromilieu allgemein und Azidose im Speziellen.....	2
1.3	Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)	4
1.4	Bedeutung der MAPK bei Tumorerkrankungen	6
1.5	Schwerpunkte dieser Arbeit.....	9
1.5.1	Azidose-induzierte Signaltransduktion.....	9
1.5.2	Azidose und Proliferation, Metabolismus sowie Invasivität	11
1.5.3	Zielsetzung.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Chemikalien.....	14
2.2	Zellkultur	14
2.3	Allgemeiner Versuchsaufbau	15
2.4	Pharmakologische Untersuchungen	16
2.5	RNA-Isolation	17
2.6	OGR1-PCR.....	17
2.7	Protein-Isolation	18
2.8	Bestimmung des Proteingehalts.....	18
2.9	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.10	Westernblot.....	20
2.11	Gel-Färbungen	21
2.11.1	Coomassie-Brillantblau-Färbung.....	21
2.11.2	Silberfärbung nach Blum	21
2.12	Intrazelluläre pH-Messung	22
2.13	Bestimmung des Zellvolumens	23

2.14	Wachstumskurve und Zellzyklusanalyse.....	23
2.15	Messung von Apoptose und Nekrose	24
2.15.1	Caspase-3-Messung	24
2.15.2	Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung	25
2.16	Bestimmung des extrazellulären pH-Wertes, der Glukose- und Laktatkonzentration	25
2.16.1	pH-Messung.....	25
2.16.2	Glukosekonzentration	25
2.16.3	Laktatkonzentration	26
2.17	Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	27
2.18	Bestimmung der Migration.....	28
2.19	Bestimmung der Invasivität.....	29
2.19.1	Messung des elektrischen Widerstands	29
2.19.2	BioCoat-Invasionskammer	29
2.19.3	Aktivitätsbestimmung von Matrixmetalloproteasen und Cathepsin B	30
2.20	Statistische Analyse	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Einfluss einer extrazellulären Azidose auf den intrazellulären pH-Wert	33
3.1.1	Der intrazellulärer pH-Wert unter Kontroll- und azidotischen Bedingungen	33
3.1.2	Azidose-induzierte Veränderung des intrazellulären pH-Wertes in unterschiedlichen Zelllinien.....	35
3.1.3	Aufrechterhaltung der intrazellulären pH-Homöostase	36
3.2	Einfluss des extra- und intrazellulären pH-Wertes auf die MAPK	40
3.2.1	Regulation der MAP-Kinase JNK durch extrazelluläre Azidose	40
3.2.2	Azidose-vermittelte Aktivierung von MAPK in unterschiedlichen Zelllinien.....	41
3.2.3	Zeitverlauf der ERK1/2- und p38-Aktivierung	43

3.2.4	Abhängigkeit der ERK1/2- und p38-Phosphorylierung vom extra- und intrazellulären pH-Wert	45
3.3	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als pH-Sensoren	46
3.4	Wege/Mechanismus der MAPK-Aktivierung	48
3.4.1	Einfluss der MAP-Kinase-Kinasen	49
3.4.2	Einfluss von Phosphatasen	49
3.5	Beteiligung anderer Signalwege	51
3.6	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase und Zellvolumen	54
3.7	Bedeutung von Sauerstoffradikalen (ROS)	57
3.8	Einfluss von Azidose auf die Zellviabilität	59
3.9	Effekt der Azidose auf die Zellproliferation	60
3.10	Azidose und Metabolismus	61
3.11	Beeinflussung der Zellmotilität durch Azidose	63
3.12	Invasivität und Zellgedächtnis	65
4	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	69
4.1	AT-1-Zellen als Modellsystem	69
4.3	Azidose-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und p38	71
4.4	Mechanismus der MAPK-Aktivierung	73
4.5	Tumorzellinvasivität und Azidose	75
4.5.1	Änderung der Zellmotilität durch Azidose	75
4.5.2	Invasivität von Tumorzellen und Azidose	76
4.6	Zusammenfassung	78
5	Anhang	80
5.1	Abbildungsverzeichnis	80
5.2	Tabellenverzeichnis	82
5.3	Abkürzungsverzeichnis	83
6	Literatur	86

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Etwa einer von drei Menschen erkrankt innerhalb seines Lebens an einem Tumor. Obwohl es über 200 verschiedene Krebsarten gibt, treten charakteristische Kennzeichen auf, die bei fast allen Tumorzellen zu finden sind. Dazu gehört die Unabhängigkeit der Tumorzellen von Wachstumsfaktoren und solchen Faktoren, die das Wachstum vermindern, das Umgehen von Apoptose und Anoikis, unbegrenztes Replikationspotential, Veränderungen des Metabolismus, anhaltende Angiogenese sowie Invasivität und Metastasenbildung (4). Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung beim Mann. Pro Jahr treten in Deutschland etwa 49000 neue Fälle auf. Zudem handelt es sich, nach Lungen- und Darmkrebs, um die dritthäufigste Todesursache bei an Krebs erkrankten Männern (Robert-Koch-Institut, GEKID). Durch verbesserte Früherkennung bestehen gute Heilungschancen bei Prostatakarzinomen in frühen Stadien. Fortgeschrittene, invasive und kastrationsresistente Formen sind aber schwer zu behandeln. Oft reagieren die Tumoren nur anfänglich auf den durch operative oder chemische Kastration ausgelösten Androgenmangel, aber entwickeln sich später weiter, trotz geringer Mengen an zirkulierenden Androgenen (5). Sie sind unempfindlich gegenüber den Standardtherapien wie Hormon-, Strahlen- oder Chemotherapie und können nur noch palliativ behandelt werden (6;7). Es ist daher wichtig, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die die Prostataepithelzellen und ihr Mikromilieu derart verändern, dass invasive und metastasierende Tumorstadien entstehen können. Zudem könnte ein Erkenntnisgewinn neue Therapiemöglichkeiten bei kastrationsresistenten Prostatakarzinomen aufzeigen. Die Aufklärung der molekularen Grundlagen ist zudem im Rahmen einer personalisierten Medizin wichtig, die verbesserte Therapie im Zusammenspiel mit verringerten Nebenwirkungen zum Ziel hat.

1.2 Tumormikromilieu allgemein und Azidose im Speziellen

Tumoren unterscheiden sich in vielfältiger Weise vom Normalgewebe und das nicht nur histopathologisch und morphologisch, sondern auch hinsichtlich physiologischer Faktoren. So treten Abweichungen bei der Mikrozirkulation, der Sauerstoff- und Substratversorgung, dem Transport im Interstitium, der Entsorgung von Stoffwechselendprodukten, dem pH-Wert und dem bioenergetischen Status auf (8). Diese Faktoren sind stark miteinander verknüpft und bilden zusammen das Tumormikromilieu (Abb. 1).

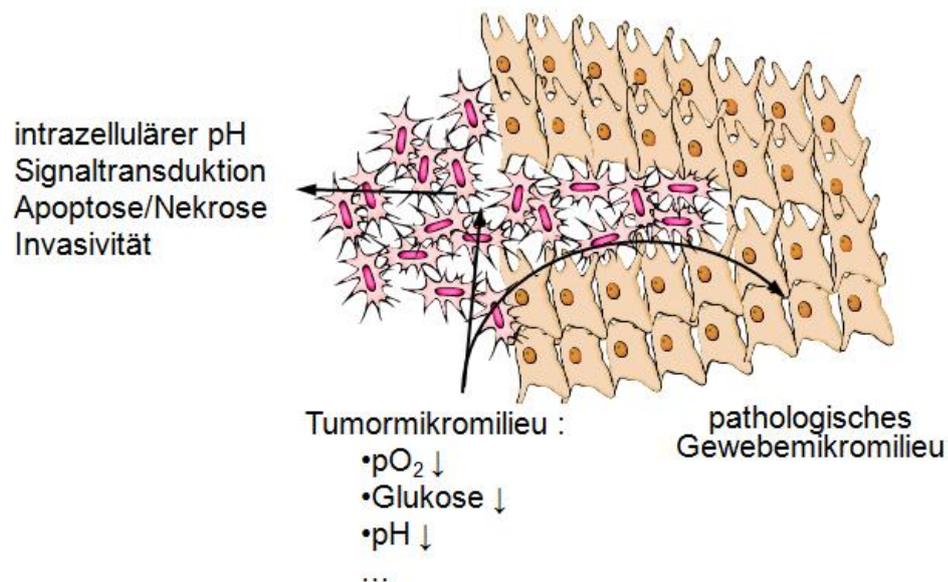


Abbildung 1 Übersicht über das Tumormikromilieu und seine Effekte auf die Tumorzellen und das benachbarte Gewebe

Veränderungen des Tumormikromilieus beruhen auf mangelhafter Durchblutung ausgelöst durch Unregelmäßigkeiten im Gefäßsystem. Oft fehlt eine klare Gefäßhierarchie, es treten blind-endende Blutgefäße und arterio-venöse Shunts auf. Außerdem ist die Gefäßpermeabilität erhöht (7). Dies wirkt sich auf die Tumoroxygenierung aus, so dass im Tumorgewebe Bereiche mit Sauerstoffmangel (Hypoxie) auftreten. Der Sauerstoffpartialdruck kann bis unter 5 mmHg absinken (9). Als Folge davon kann die Tumorzelle ihren Energiebedarf nicht mehr durch oxidative Phosphorylierung decken. Stattdessen wird Glukose zu Milchsäure verstoffwechselt (anaerobe Glykolyse), was wegen der geringeren Energieeffizienz zu einem erhöhten Glukoseverbrauch führt. Neben dem daraus resultierenden Mangel an Glukose und ATP

wird vermehrt Milchsäure gebildet, die durch Monocarboxylat-Transporter in den Extrazellularraum sekretiert wird und zur Ansäuerung des Tumormikromilieus beiträgt (8;10;11). Die direkte Umsetzung von Glukose zu Milchsäure tritt in Tumorzellen häufig auch bei Vorhandensein von Sauerstoff auf (Warburg-Effekt). Azidose wird allerdings selbst bei fehlender Umsetzung von Glukose zu Milchsäure bei Tumoren beobachtet (12;13). Neben Monocarboxylat-Transportern können auch Na^+/H^+ -Austauscher, Bikarbonat-Transporter, V-Typ ATPasen durch Sekretion von Protonen in den Extrazellularraum, sowie Carboanhydrase 9 durch die Umwandlung von CO_2 zu Kohlensäure, zur Reduktion des pH-Wertes beitragen (14-17). Die meisten Tumoren weisen einen pH-Wert von 6,6 bis 7,0 auf. Aber auch sehr niedrige Werte von 5,8 wurden bereits gemessen, wobei der pH-Wert in unterschiedlichen Bereichen des Tumors sowie zu verschiedenen Zeiten sehr stark variieren kann (4;18). Man nimmt an, dass die Tumorzellen an die saure Umgebung adaptieren und dadurch einen selektiven Vorteil gegenüber Nicht-Tumorzellen erhalten (4). Azidose fördert die maligne Transformation, Chromosomenveränderungen, die Zerstörung der extrazellulären Matrix, Migration und Invasivität sowie die Expression von Wachstumsfaktoren und Proteasen. Zudem wird die Vitalität des angrenzenden Normalgewebes beeinträchtigt (19). Es ist lange bekannt, dass das Tumormikromilieu die Effektivität bestimmter Tumortherapien beeinflussen kann. Azidose beeinflusst die Effektivität der Strahlentherapie, der kombinierten Hyperthermie/Strahlentherapie, fördert den Zelltod durch Hyperthermie und verhindert die Ausbildung von Thermotoleranz (8;20). Zudem moduliert Azidose die Wirksamkeit von bestimmten Chemotherapeutika (8). Die Aufnahme von Wirkstoffen, die selber schwache Säuren oder Basen sind, ist pH-abhängig. Die Diffusion der Wirkstoffe durch die Zellmembran findet vor allem in ihrer undissoziierten Form statt. Stellt der Wirkstoff eine schwache Base dar, wie z.B. Vinblastin, vermindert sich die intrazelluläre Wirkstoffkonzentration bei sinkendem pH-Wert und dadurch verringert sich auch die Zytotoxizität (21). Die verminderte Wirksamkeit von Chemotherapeutika beruht allerdings nicht nur auf direkten pH-Effekten. Vielmehr scheint Azidose auch aktive Transportmechanismen zu beeinflussen. Experimentelle Studien konnten zeigen, dass Azidose die Aktivität von Transportern der ABC-Familie erhöht, die verantwortlich für die Ausbildung von Chemoresistenzen (MDR - multidrug resistance) sind. Sowohl das p-Gykoprotein, wie auch MRP-1 (multidrug resistance-associated protein 1) zeigen bei Azidose erhöhte *in*

vitro und *in vivo* Aktivitäten und verringern so die Zytotoxizität bestimmter Chemotherapeutika (22-25). Vermittelt wurden diese Effekte durch die MAPK (mitogen-activated protein kinase) ERK1/2 und p38.

1.3 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Zellen erkennen und reagieren durch den MAPK-Signalweg auf extrazelluläre Stimuli. Dieser Signalweg ist bei allen Eukaryonten vertreten. Bei Säugern unterscheidet man grob drei Hauptgruppen, die ERK (extracellular signal-regulated kinase)-, die p38- und die JNK (c-Jun amino-terminal kinases) -Gruppe (Tab. 1).

Tabelle 1 Nomenklatur der humanen MAPK entnommen aus (1)

Name	Alternative name	Gene name	Chromosomal location	LocusID/accession number
ERK1	p44 MAPK	<i>MAPK3</i>	16p11.2	5595
ERK2	p42 MAPK	<i>MAPK1</i>	22q11.21	5594
ERK3-related	p63 MAPK	<i>MAPK4</i>	18q12-q21	5596
ERK3	p97 MAPK	<i>MAPK6</i>	15q21	5597
ERK5	Big MAP kinase, BMK	<i>MAPK7</i>	17p11.2	5598
ERK7		<i>ERK7</i>		XM 139448
ERK8		<i>ERK8</i>	Chromosome 8	225689
p38 α	CSBP, RK, SAPK2A	<i>MAPK14</i>	6p21.3-p21.2	1432
p38 β	p38-2, p38 β 2, SAPK2B	<i>MAPK11</i>	22q13.33	5600
p38 γ	SAPK3, ERK6	<i>MAPK12</i>	22q13.33	6300
p38 δ	SAPK4	<i>MAPK13</i>	6p21.1	5603
JNK1	SAPK γ , SAPK1C	<i>MAPK8</i>	10q21.1	5599
JNK2	SAPK α , SAPK1A	<i>MAPK9</i>	5q35	5601
JNK3	SAPK β , SAPK1B	<i>MAPK10</i>	4q22.1-q23	5602

Die MAPK regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie die Genexpression, Mitose, Metabolismus, Motilität, Zellüberleben und Apoptose, sowie Differenzierung. Zu ihren Substraten zählen Transkriptionsfaktoren, Phospholipasen, Zytoskelettproteine und MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MK), die durch Phosphorylierung von Serin/Threonin gefolgt von einem Prolin aktiviert werden (26). Alle MAPK sind in ihrer Nukleotidsequenz und ihrer enzymatischen Funktionalität miteinander verwandt. Zudem werden sie ähnlich aktiviert, nämlich durch eine Kaskade, die schließlich zur Phosphorylierung eines Thr-Xyy-Tyr-Motifs führt (Abb.2). Dabei ist Xyy bei ERK1/2 ein Glutamat, bei p38 ein Glycin und bei JNK ein Prolin (1).

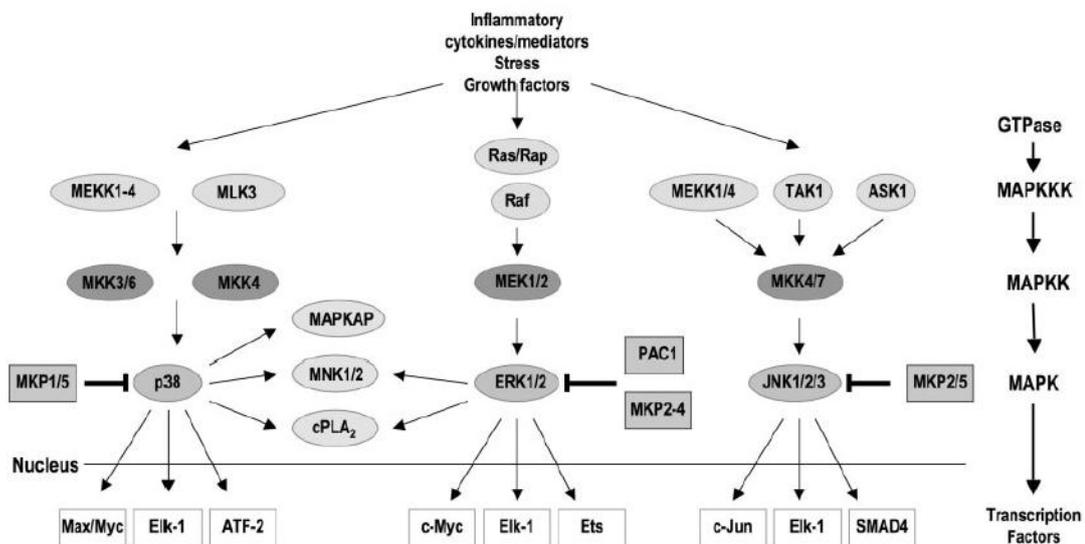


Abbildung 2 Schematische Darstellung der MAPK-Kaskade von p38, ERK1/2 und JNK1/2/3 mit allgemeiner Übersicht (rechts), entnommen aus Thalhamer et al, 2008 (3)

ERK1 und ERK2 besitzen eine Übereinstimmung von 83% in ihrer Aminosäuresequenz und werden in allen Geweben exprimiert (27). Aktiviert werden diese MAPK durch Mitogene und Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF (epidermal growth factor), Serum, Phorbol ester, aber auch durch Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Zytokinen, Mikrotubuli-Depolymerisation und osmotischen Stress (28). Sie spielen eine wichtige Rolle bei Proliferation, Motilität, Differenzierung und Zellüberleben (1;27;28). ERK1/2 werden durch MEK1/2 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Abb. 2). Eine Inhibition von MEK1/2, z.B. durch U0126, führt zur Inhibierung des ERK-Signalwegs (29). Da nur sehr wenig über die anderen ERK-Kinasen (Tab. 1) bekannt ist, besonders über ihre Aktivierung und ihren Einfluss auf die Tumorgenese, fokussiert diese Arbeit auf ERK1/2 und bezieht sich auch nur auf diese beiden Kinasen, wenn vom ERK-Signalweg die Rede ist.

Die Isoformen von p38 teilen etwa 40% Sequenzhomologie mit den anderen MAPK und nur etwa 60% untereinander (30). Sie werden durch Zytokine und bei Stressbelastung der Zelle, z.B. durch oxidativem Stress, Röntgen- und UV- Bestrahlung sowie Hypoxie, aktiviert (2). Allerdings können auch Wachstumsfaktoren und Serum zu einer Aktivierung führen (2;31). Die p38-Kinasen sind bei der Immunantwort und Entzündungsprozessen wichtig, denn sie kontrollieren die Transkription, mRNA-Stabilität und Translation von Zytokinen wie Interleukin-1 und -6 oder Tumornekrosefaktor (1). Außerdem sind sie für die Regulation des Zellzyklus und des

Zytoskeletts bedeutend. Sie beeinflussen Apoptose, Differenzierung und die Migration von Zellen (30;31). Die Expression variiert stark zwischen den einzelnen Isoformen. So treten p38 α und - β ubiquitär auf, während p38 γ vor allem im Skelettmuskel und p38 δ in Lunge, Niere, endokrinen Drüsen und dem Dünndarm exprimiert werden (27;30). Die Aktivierung von p38 erfolgt einmal durch MKK3/6 oder durch MKK4, letztere kann auch JNK phosphorylieren (32). Mit dem spezifischen Inhibitor SB203580 wird die katalytische Aktivität von p38 α und p38 β durch Bindung in der ATP-Bindungsstelle inhibiert, ohne die p38-Phosphorylierung durch die vorgelagerten Kinasen zu hemmen (31;33).

Die Gruppe der JNK-Kinasen reagiert zum Teil auf die gleichen Stimuli wie die p38-Gruppe - z.B. auf Zytokine und Stress - und werden deshalb oft mit ihr zusammengefasst als SAPK (stress-activated protein kinases). Sie werden durch 3 Gene kodiert mit einer Sequenzhomologie von über 85%. Insgesamt gibt es mindestens 10 Isoformen durch alternatives Splicen (34;35). JNK1 und-2 sind ubiquitär exprimiert, während JNK3 vor allem im Gehirn, aber auch Herz und Hoden vorkommt (1). JNK-Kinasen spielen eine Rolle bei Zellüberleben, aber auch Apoptose, Differenzierung, Zytokinproduktion und Metabolismus (1;27). Sie werden durch MKK4/7 phosphoryliert und dadurch aktiviert.

1.4 Bedeutung der MAPK bei Tumorerkrankungen

Der MAPK-Signalweg zeigt häufig eine starke Fehlregulation in Tumoren (Tab. 2). Dabei können Komponenten der Signalkaskade, aber auch Gene der vorgelagerten Rezeptoren mutiert oder anomal exprimiert sein. Selbst wenn eine offensichtliche Mutation fehlt, wird oftmals eine Aktivierung des Signalwegs beobachtet, die mit einer schlechten Prognose sowie Resistenzen gegenüber bestimmten Chemotherapeutika verbunden ist (36). Diese abweichende Aktivierung tritt z. B. bei 50% der akuten myeloischen Leukämien oder akuten lymphatischen Leukämien, aber auch bei Brust- und Prostatakarzinomen auf (37).

Tabelle 2 Übersicht der Krebs-assoziierten Veränderungen des ERK1/2-Signalwegs, entnommen aus Dhillon et al, 2007 (2)

<i>EGFR</i> overexpression	<ul style="list-style-type: none"> • Most carcinomas (>50%)
<i>ERBB2</i> overexpression	<ul style="list-style-type: none"> • Breast (30%)
<i>RAS</i> mutation	<ul style="list-style-type: none"> • Pancreas (90%) • Lung adenocarcinoma (35%) (non-small cell) • Thyroid; follicular (55%) • Thyroid; undifferentiated papillary (60%) • Seminoma (45%) • Melanoma (15%) • Bladder (10%) • Liver (30%) • Kidney (10%) • Myelodysplastic syndrome (40%) • Acute myelogenous leukemia (30%)
<i>BRAF</i> mutation	<ul style="list-style-type: none"> • Melanoma (66%) • Colorectal (12%)

Der ERK-Signalweg ist bei etwa einem Drittel aller Tumoren fehlreguliert (2). Eine konstitutive Aktivierung des Signalwegs wird entweder durch aktivierende Mutationen oder Überexpression der Rezeptor-Tyrosinkinasen, durch anhaltende autokrine oder parakrine Produktion aktivierender Liganden oder durch Mutationen von Ras oder B-Raf ausgelöst (2). Die aktivierte ERK-Signalkaskade fördert das Zellwachstum, aber auch viele Schritte der Tumorgenese. Sie spielt bei anti-apoptotischen Vorgängen eine wichtige Rolle (37) und erhöht durch verstärkte Expression von Matrixmetalloproteasen (MMPs) die Tumorzellmigration und -Invasivität. Sie schützt weiterhin vor Anoikis, das heißt Apoptose durch Verlust der Zelladhäsion (38;39). Daher ist die Hemmung des ERK-Signalwegs auch ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Krebstherapie z.B. durch den Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib. Dieser hemmt Raf und wird u.a. bei fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen eingesetzt (40). Der ERK-Signalweg kann jedoch auch zu Zellzyklusarrest und Seneszenz führen. Diese Diskrepanz ist u.a. bei Prostatatumoren beschrieben. Eine Aktivierung des ERK-Signalwegs wird mit fortgeschrittenen Prostatatumoren, hormoneller Unabhängigkeit und schlechter Prognose in Verbindung gebracht (41-43). Über den Mechanismus ist bisher wenig bekannt und es treten nur selten Mutationen des Signalwegs auf. Wahrscheinlich ist die autokrine und parakrine Wirkung von Wachstumsfaktoren in den

Prostatakarzinomzellen verantwortlich für die Aktivierung des ERK-Signalwegs (37). Einige Prostatakarzinome exprimieren allerdings die Mitglieder der MAPK-Kaskade in nur geringen Mengen, selbst einige aus fortgeschrittenen, Hormon-unabhängigen Karzinomen stammende Tumorzelllinien (37). Daher ist die Rolle von ERK1/2 in Prostatakarzinomen noch nicht geklärt.

Die Wirkung der Stress-aktivierten Kinasen p38 und JNK ist in Tumoren weniger eindeutig. Tumorzellen sind zahlreichen Stresssituationen ausgesetzt wie z.B. Hypoxie, Entzündungsprozessen und metabolischem Stress. Dazu kommen genotoxischer und pharmakologischer Stress während der Bestrahlung oder Chemotherapie. Generell wirken die Kinasen p38 und JNK eher anti-proliferativ und pro-apoptotisch, aber je nach Kontext können sie die Tumorgenese auch fördern. Es ist aus der Literatur bekannt, dass p38 als Tumorsuppressor wirken kann (44-46). So führt die Kinase zu Zellzyklusarrest bei DNA-Schäden oder im Rahmen der Kontaktinhibition (31). Reaktive Sauerstoffspezies, die in hohen Mengen in Tumoren gefunden werden, können p38 aktivieren und zu Apoptose führen (47). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen ist die Aktivität von p38 z.B. in Leberkarzinomen vermindert (48). Im Gegensatz dazu ist p38 aber auch bei der Ausbildung einer Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit der Tumorzellen und einem unbeschränktem Replikationspotential, beim Schutz vor Apoptose sowie Angiogenese und Invasivität beteiligt (31;49). Die verstärkte Expression von MMPs und damit eine erhöhte Invasivität der Tumorzellen ist abhängig von p38 und auch bei Prostatakarzinomzellen beschrieben (50). Ricote und Mitarbeiter beschäftigten sich mit dem p38-Signalweg in normalem Prostatagewebe im Vergleich mit Prostatahyperplasien und Prostatakarzinomen. Dabei zeigte sich, dass der Signalweg bei Hyperplasie und noch stärker bei Karzinomen aktiviert war und dadurch zu verstärkter Proliferation und Zellüberleben führte (51). Diese Aktivierung erfolgte durch eine verstärkte Expression der MAPK-Kinase MKK4 und führt zu einer erhöhten Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren Elk-1 und ATF-2. Interessanterweise war die Expression von JNK zwischen normalem Prostatagewebe und der Prostatahyperplasie unverändert, nahm aber bei den Prostatakarzinomen stark ab. ERK1/2 wurden bei den Hyperplasien sogar stärker als bei den Karzinomen exprimiert. Somit korrelierte die ERK-Expression nicht direkt mit der Malignität.

1.5 Schwerpunkte dieser Arbeit

1.5.1 Azidose-induzierte Signaltransduktion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Milieufaktors Azidose auf die Tumorzellen vor allem in Bezug auf die Signalwege und den Phänotyp zu untersuchen. Dazu wurde zuerst der Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf den intrazellulären pH-Wert mit Hilfe des pH-sensitiven, membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffs 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein (BCECF-AM) untersucht. Besonderes Interesse lag auf der pH-Regulation der Zellen. Es wurden verschiedene Transporter, die den intrazellulären pH-Wert unter sauren Bedingungen regulieren, gehemmt und die Auswirkung auf den pH_i analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Unterscheidung zwischen Effekten durch extrazelluläre und isolierte intrazelluläre Ansäuerung. Dafür musste ein Protokoll erarbeitet werden, das eine intrazelluläre Azidose bei neutralem extrazellulären pH-Wert ermöglicht. Schließlich konnte der Effekt des extrazellulären und des intrazellulären pH-Wertes auf die Signalwege der Tumorzellen, insbesondere auf die MAPK ERK1/2, p38 und JNK, mittels Westernblot untersucht werden. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass ERK1/2 und p38 bei Azidose in Prostatakarzinomzellen aktiviert werden (24). Um eine mögliche Korrelation zwischen pH-Wert und MAPK-Aktivität aufzudecken, wurden weitere Zelllinien stammend aus Tumor- und Normalgewebe analysiert. Besonderes Interesse lag zudem auf der Aufklärung des genauen Mechanismus der MAPK-Aktivierung durch Azidose. Dazu wurde ein pharmakologischer Ansatz gewählt. Vielversprechende Signalwege wurden gehemmt und der Effekt auf die MAPK-Phosphorylierung mittels Westernblot untersucht. Unter den studierten Signalmolekülen war OGR-1 (ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1), der als Sensor für extrazelluläre Protonen fungiert und intrazelluläre Signalkaskaden, darunter die MAPK, aktivieren kann (52;53). Außerdem wurde eine mögliche Beteiligung des EGF (epidermal growth factor)-Rezeptors analysiert, der in vielen Tumoren eine Fehlregulation erfährt und die Aktivität der MAPK beeinflusst (54-57). Unter den in dieser Arbeit untersuchten Kinasen waren Proteinkinase C (PKC), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und die Familie der Src-Kinasen. Sie alle können einen Einfluss auf die MAPK nehmen und spielen gleichzeitig auch eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese.

Die Serin-/Threonin-Kinasen der PKC-Familie sind an zahlreichen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Organisation des Zytoskeletts, Migration und Apoptose beteiligt (58). Sie zeigen eine verstärkte Aktivierung in vielen Tumoren und vermitteln unter anderem Tumorzellinvasivität und Metastasierung (59;60). Vor allem die Isoform PKC ϵ scheint ein hohes karzinogenes Potential zu besitzen und wird daher als diagnostischer Marker und als möglicher Therapieansatz diskutiert (61). Mitglieder der PKC-Familie können sowohl die ERK1/2- (62-64) als auch die p38-Signalkaskade aktivieren (65). Zudem fungiert die PKC über die Ca²⁺-bindende C2-Domäne als intrazellulärer pH-Sensor (66).

Eine erhöhte PI3K-Aktivität führt zu maligner Transformation (67). Daher ist es nicht überraschend, dass Komponenten dieses Signalwegs in etwa 30% aller humanen Tumoren mutiert sind (68). PI3K aktiviert die Kinase Akt, die wichtig für Zellüberleben und -Wachstum, Zellzyklus-Progression sowie Metabolismus ist (69). In HEMEC (human esophageal microvascular endothelial cells) -Zellen konnte nach Azidose eine Aktivierung der MAPK und PI3K beobachtet werden (70). Beide Signalwege sind eng miteinander vernetzt und eine PI3K-abhängige Aktivierung von ERK1/2 ist für Tumor- und Nicht-Tumorzellen beschrieben (71;72). In der Arbeit von Fiegl et al. erfolgte diese Aktivierung durch den Tumormikromilieufaktor Hypoxie (73).

Die Familie der Src-Kinasen gehört zu den nicht-membrangebundenen Tyrosinkinasen und ihre Erforschung ist durch die Redundanz der einzelnen Familienmitglieder erschwert (74). Das Proto-Onkogen c-Src ist nur selten mutiert in Tumoren, reguliert allerdings eine Vielzahl an zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Motilität, Angiogenese und Metastasierung bei Tumoren (75). Unter verschiedensten Bedingungen kann c-Src zu einer Aktivierung von p38 (57;65;76;77) oder ERK1/2 (60;78;79) führen.

Signalwege aktiviert durch cAMP (cyclic adenosine monophosphate) sind in Tumor- und Nicht-Tumorzellen in Proliferation und Differenzierung involviert (80-82). Durch cAMP kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die in zahlreichen Tumoren überexprimiert vorliegt und mit einer schlechten Prognose korreliert (83). Die durch cAMP aktivierten Signalwege können den ERK1/2-Signalweg entweder aktivieren oder hemmen (82;84-90) sowie p38 aktivieren (87). In Prostatakarzinomen sind starke Interaktionen zwischen Signalwegen des Androgenrezeptors (AR) und cAMP-abhängigen Signalwegen beschrieben (81). Einige der komplexen

Wechselwirkungen der verschiedenen Signalwege mit der ERK1/2-Signalkaskade sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.

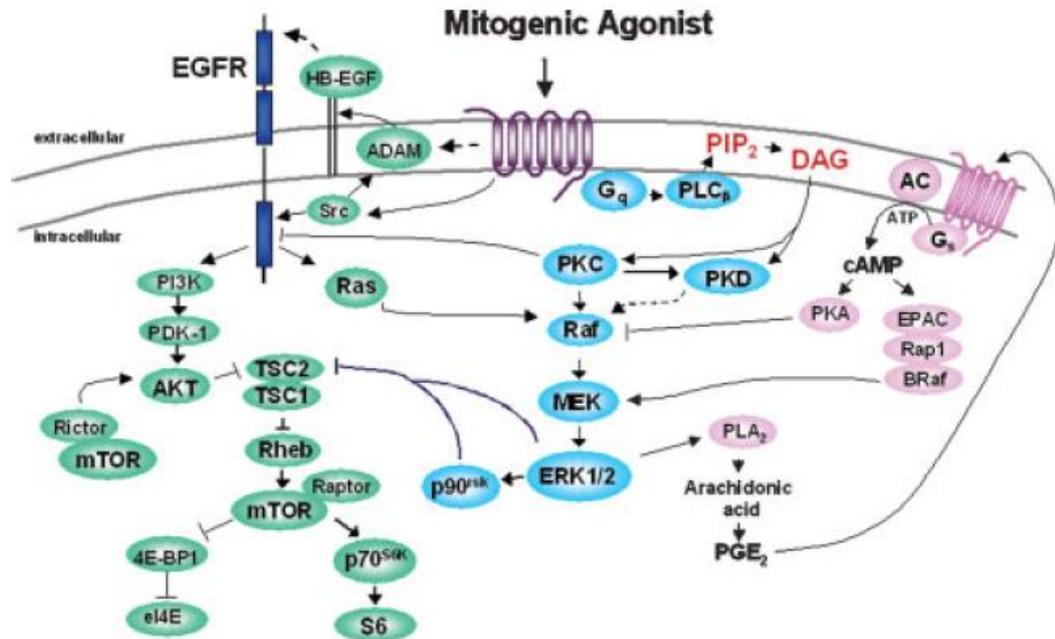


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung einiger Interaktionen der ERK1/2-Signalkaskade mit Signalwegen abhängig von PKC, EGFR, cAMP, PI3K und Src, entnommen aus Rozenfurt et al, 2007 (91)

1.5.2 Azidose und Proliferation, Metabolismus sowie Invasivität

Neben der Aufklärung der Mechanismen, die an der Azidose-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind, wurde der Effekt einer Azidose auf andere zelluläre Parameter wie Apoptose oder Nekrose, Proliferation, Metabolismus sowie Migration und Invasivität analysiert. Vorversuche konnten zeigen, dass Azidose die Chemoresistenz der AT-1-Prostatakarzinomzellen erhöht (24;25). Ob sich ein saures Milieu ganz allgemein eher schädlich oder eher fördernd auf die Zellen auswirkt, sollte durch Messung der Caspase-3-Aktivität zur Bestimmung von Apoptose und der Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) als Marker für Nekrose bestimmt werden. Um die Änderungen der Proliferation der AT-1-Zellen bei Azidose zu untersuchen, wurde die Zellzahl mit einem Casy Cell Counter-System bestimmt und Wachstumskurven erstellt. Zusätzlich wurde mittels Durchflusszytometrie die Zahl der Zellen, die sich in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus befinden, ermittelt. Die fehlende Regulation des Zellzyklus und andauernde Proliferation gilt als ein Kennzeichen von Tumorzellen. Auch die MAPK sind an Veränderungen des Zellzyklus

in Prostatakarzinomen beteiligt (92). Mögliche Effekte der Azidose auf den Tumorzellmetabolismus wurden durch Messung des Glukoseverbrauchs und der Laktatbildung bestimmt. Krebszellen zeichnen sich durch einen verschwenderischen Metabolismus aus, sie meiden die oxidative Phosphorylierung und müssen dadurch exzessiv Nährstoffe aufnehmen. Man nimmt an, dass dadurch die schnelle ATP-Bildung, die erhöhte Biosynthese von Makromolekülen und der streng überwachte Redoxstatus gewährleistet werden (10;11). Zudem werden Nachbarzellen ausgehungert. Zur Ausbildung des abnormen Metabolismus von Tumorzellen tragen genetische Änderungen, aber auch das Tumormikromilieu bei, das wiederum entscheidend durch den veränderten Metabolismus beeinflusst wird (Abb. 4) (10;93).

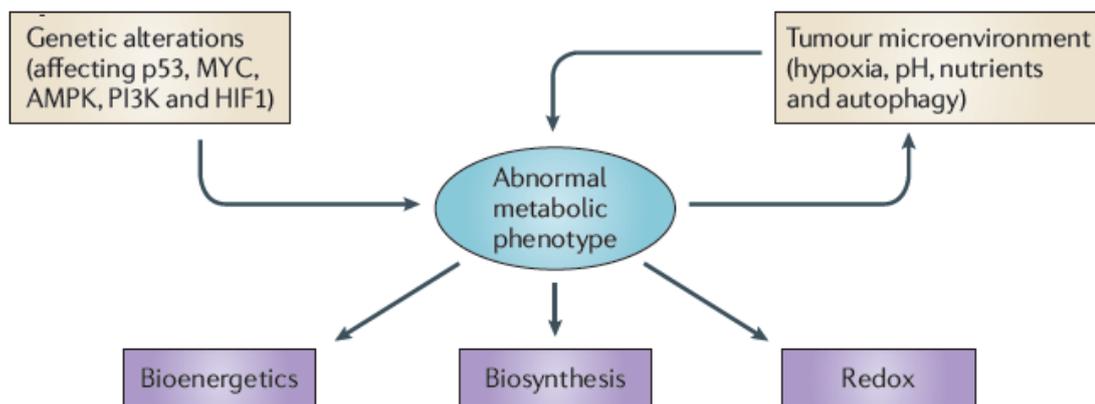


Abbildung 4 Darstellung der Verbindung zwischen Metabolismus, dem Tumormikromilieu und genetischen Veränderungen aus Cairns et al, 2011 (10)

Man geht davon aus, dass der niedrige pH-Wert in Tumoren zu einer Steigerung der Invasivität und Metastasierung führt (94-100). Die Migration von Zellen ganz allgemein (101-103), aber auch die Expression von Proteasen wie Cathepsinen oder Matrixmetalloproteasen (MMPs) (94;104-106) ist abhängig vom pH-Wert. Zudem schädigt ein azidotisches Tumormilieu angrenzende Epithelschichten und fördert so die Invasivität der Tumorzellen (95). Die Invasivität der AT-1-Zellen wurde durch zwei verschiedene Methoden erfasst. Einmal wurde ihre Fähigkeit, ein intaktes Epithel aufzulockern durch die Messung des transepithelialen Widerstands (TEER) bestimmt (107). Andererseits wurde analysiert, ob AT-1-Zellen ein Gel, das in seiner Zusammensetzung der Basalmembran nachempfunden ist, überwinden können. Die Migration der Zellen unter sauren Bedingungen wurde mittels Video-Mikroskopie auf Einzelzellebene bestimmt.

1.5.3 Zielsetzung

Zusammenfassend sollte der Mechanismus und die Bedeutung der Azidose-induzierten Veränderungen in Ratten-Prostatakarzinomzellen analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde untersucht:

- (I) wie eine extrazelluläre Ansäuerung den intrazellulären pH-Wert beeinflusst und zwischen Effekten ausgelöst durch extrazellulärer und isolierter intrazellulärer Azidose unterschieden
- (II) wie die MAPK durch Azidose reguliert werden und falls eine Aktivierung vorliegt, wie der Zeitverlauf ist und welche Rolle extra- und intrazellulärer pH-Wert sowie beteiligte Signalwege spielen
- (III) ob sich die Azidose auf Zellüberleben und Proliferation, Metabolismus sowie Migration und Invasivität auswirkt und in wie weit diese Prozesse durch die MAPK vermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

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

2.2 Zellkultur

Folgende Zellen wurden für die einzelnen Experimente verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37°C und 5% CO₂.

AT-1-Zellen:

Die Sublinie AT-1 des R-3327 Dunning-Prostatakarzinoms aus der Ratte (ATCC, Rockville, MD, USA; JHU-29 oder CLS, Eppelheim, Deutschland) wurde in RPMI-Medium zuzüglich 10 % FCS (fötale Kälberserum) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. AT-1-Zellen sind anaplastisch und schwach metastasierend.

CHO-Zellen (Chinese hamster ovary):

Die CHO-Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA; CCL-61) erhielten Hams F12-Medium mit 10 % FCS. Es handelt sich um immortalisierte Fibroblasten aus dem Ovar des chinesischen Hamsters.

LS513-Zellen:

LS513-Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA; CRL-2134) wurden wie die AT-1-Zellen in RPMI mit 10% FCS gehalten. Die Isolation der LS513-Zellen erfolgte 1985 aus einem humanen Kolonkarzinom. Sie sind resistent gegenüber einer Vielzahl von Arzneimitteln (Multi Drug Resistance) und tumorigen in Nacktmäusen.

MDCK-C7-Zellen (Madin-Darby canine kidney, Subklon C7):

MDCK-Zellen sind Epithelzellen aus dem renalen Sammelrohr des Hundes. Bei dem Subklon C7 handelt es sich um Hauptzellen des Sammelrohres, die ein sehr dichtes Epithel ausbilden (108) und sich daher für Messungen des transepithelialen Widerstands

eignen mit Messwerten zwischen 1000 bis 20000 Ωcm^2 (109). MDCK-C7-Zellen wurden in MEM-Medium mit 10% FCS kultiviert.

NCI-H358:

Die NCI-H358-Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA; CRL-5807) stammen ursprünglich aus einem humanen bronchioloalveolären Karzinom und wuchsen in DMEM-Medium mit 10% FCS.

OK-Zellen (opossum kidney):

Der OK-Zellklon 3/B2 (110) wurde von Prof. Biber zur Verfügung gestellt und in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert. OK-Zellen sind Epithelzellen aus dem proximalen Tubulus einer Opossumniere.

Die Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1-2x wöchentlich subkultiviert. Dazu erfolgte zuerst ein Waschschrift mit EDTA-Lösung (0,2 g/l) und darauf folgend die Inkubation mit Trypsin (0,1%, Sigma-Aldrich, München) bis die Zellen von den Zellkulturflaschen abgelöst waren. Die Trypsinaktivität wurde mit Serum-haltigem Medium abgestoppt und die Zellen für Experimente in Petri-Schalen (Westernblot) oder auf mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichteten Objektträgern (Messung des pH_i) angesät. 24 h vor den Experimenten erfolgte (wenn nicht anders angegeben) ein Mediumwechsel auf Serum-freies Medium um eine Grundstimulation der Zellen durch Hormone zu vermeiden und das Wachstum zu synchronisieren.

2.3 Allgemeiner Versuchsaufbau

Im Anschluss an den 24-stündigen Serumentzug, wurden die Zellen mit gepufferten Ringerlösungen für bis zu 3 h inkubiert. Unter Kontrollbedingungen erhielten die Zellen HEPES-Ringerlösung mit einem pH-Wert von 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 HEPES; 11 mM Glukose; pH-Einstellung mit 1N NaOH), bei Azidose eine MES-gepufferte Ringerlösung (4,5 mM 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 MES (Morpholinoethansulfonsäure); 11 mM Glukose; pH-Justierung auf 6,6 mit 1N NaOH). Die Pufferkapazität der HEPES-Ringerlösung (pH 7,4) betrug 5,9 mM, die der MES-

Ringerlösung (pH 6,6) 3,9 mM pro pH-Einheit. Um eine isolierte intrazelluläre Ansäuerung zu erreichen, wurden 40 mM NaCl der HEPES-Ringerlösung pH 7,4 durch 40 mM Natriumlaktat ersetzt. Ein kompletter Austausch von NaCl durch Na-Glukonat reduzierte die Konzentration an Chlorid in der HEPES-gepufferten Ringerlösung auf 7,4 mM. Die Beigabe der Aktivatoren oder Inhibitoren erfolgte während der 3-stündigen Inkubationszeit in den jeweiligen Ringerlösungen.

2.4 Pharmakologische Untersuchungen

Um die Beteiligung verschiedener Signalwege an der Azidose-vermittelten ERK1/2- und p38-Aktivierung zu ermitteln, wurde diese mit spezifischen Inhibitoren gehemmt. Damit Probleme mit der Spezifität vermieden werden, wurden möglichst geringe Konzentrationen der Hemmer eingesetzt. Tabelle 3 stellt einige Inhibitoren samt verwendeten Konzentrationen, IC₅₀ und alternative Angriffsziele dar.

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Inhibitoren mit IC₅₀-Werten und möglichen unspezifischen Zielproteinen

Inhibitor	Zielprotein	c [nM]	IC ₅₀ [nM]	andere Zielproteine
AG1478	EGFR	100	3	HER2/neu (IC ₅₀ > 100 µM) PDGFR (IC ₅₀ > 100 µM) p210 ^{Bcr-Abl} (IC ₅₀ > 50 µM)
BIM	PKC _{α, βI, δ, ε, ζ}	100	8-20	PKA (IC ₅₀ > 2 µM)
LY294002	PI3K	10000	1400	keine Hemmung EGFR, MAPK, PKC und c-Src bis 50 µM
PP2 (AG1879)	Src-Familie	100	Lck: 4 Fyn: 5 Hck: 5 Src: 100	EGFR (IC ₅₀ = 480 nM) JAK2 (IC ₅₀ > 50 µM)

Die cAMP-abhängigen Signalwege wurden entweder durch membrangängiges N⁶,2'-O-Dibutytyl-cAMP (300 µM, Sigma-Aldrich, München), ein lipophiles cAMP-Analogen, oder durch 3 µM Forskolin, das die endogene cAMP-Bildung durch Aktivierung der

Adenylzyklase stimuliert, angeregt. Eine Inhibierung der durch cAMP-aktivierten PKA erfolgte durch 50 μM R_p -Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphorothioat (R_p -cAMPS), einem kompetitiven Antagonisten der cAMP-Bindedomäne der PKA (111). Klassische Hemmer der PKA wie H89 und KT5720 zeigen z.T. starke Auswirkungen auf andere Kinasen darunter auch die MAPK (112). Wegen möglichen Einschränkungen bei der Nutzung von pharmakologischen Hemmern müssen identifizierte Signalwege noch durch andere Methoden bestätigt werden. Dazu könnten z.B. spezifische siRNAs oder Modellsysteme, in dem das Zielprotein nicht oder nicht funktionell exprimiert wird, eingesetzt werden.

Bei der Untersuchung der pH-Regulation wurde die Aktivität verschiedener Transporter blockiert. Um den Na^+/H^+ -Austauscher zu hemmen, wurde entweder Amilorid/EIPA (10 μM ; Sigma-Aldrich, München) oder Cariporid/HOE642 (10 μM ; Aventis Pharma, Frankfurt) verwendet. 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure (DIDS; Sigma-Aldrich, München) inhibiert Anionenaustauscher und Na^+/Cl^- -Kotransporter und wurde in einer Konzentration von 200 μM eingesetzt.

Bei der Analyse der Zellvolumenregulation wurden die Na^+/K^+ -ATPase mit Ouabain (100 μM ; Sigma-Aldrich, München), einem herzwirksames Glykosid, gehemmt.

Um die Rolle der MAPK bei Azidose-induzierten Effekten untersuchen zu können, erfolgte die Hemmung von p38 durch 10 μM SB203580 (4-[4-Fluorophenyl]-2-[4-methylsulfinylphenyl]-5-[4-pyridyl]1H-Imidazol; Merck, Darmstadt) und der ERK1/2-Aktivierung durch Inhibition von MEK1/2 mit 10 μM U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]-Butadien; Calbiochem, Darmstadt). Beide Inhibitoren sind hoch-spezifisch (Angaben des Herstellers).

2.5 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden AT-1-Zellen in 3cm-Petrischalen angesät und ohne vorherigen Serumentzug für das Experiment verwendet.

2.6 OGR1-PCR

Der Nachweis der Transkription des OGR1-Gens erfolgte mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion). Dazu wurde das SuperScript One-Step-

RT-PCR-System von Invitrogen (Paisley, UK) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

Tabelle 4 PCR-Programm für OGR1.RT-PCR

cDNA-Synthese	PCR-Amplifikation	Finale Elongation
50°C für 30 min 94°C für 2 min	35 Zyklen mit 94°C für 0,5 min 55°C für 0,5 min 72°C für 1 min	72°C für 10 min

Folgende intronspannende Primer wurden eingesetzt:

OGR1-sense: TAT CTC CAT CGA CCG CTA CC

OGR1-antisense: TCG TCT TCG ATG ACC TCC TT

Das erhaltene PCR-Produkt wurde auf ein 1,5% w/v Agarosegel (PeqGold Universal-Agarose; Peqlab, Erlangen) aufgetragen, als Laufpuffer für die Auftrennung wurde TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA; pH 8,0) verwendet. Das Produkt hat eine erwartete Größe von 156 bp.

2.7 Protein-Isolation

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen je dreimal mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem Lysepuffer (0,1% Triton X-100 in PBS; 37 mg/l Natriumorthovanadat; Proteasen-Inhibitor-Cocktail) für 30 min bei 4 °C. Die Zellen wurden schließlich mit einem Zellschaber von der Petrischale abgelöst, bei 16000 g für 15 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Nach der Messung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte dessen Lagerung bei -20 °C.

2.8 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die BCA (Bicinchoninsäure)-Methode genutzt. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) und anschließender Chelatisierung des Cu⁺ mit

zwei Molekülen Bicinchoninsäure. Der wasserlösliche Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und ist annähernd linear bei einer Proteinkonzentration von 20 bis 20000 µg/ml. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Eine Kalibrierung der erhaltenen Messwerte erfolgte mit einer Eichreihe von BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen (100-1000 µg/ml).

2.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 5 Zusammensetzung der Minigele

SDS-PAGE	3% Sammelgel	12% Trenngel	10% Trenngel	8% Trenngel
Wasser	1,54 ml	1,88 ml	2,285 ml	2,713 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	625 µl	-	-	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1,563 ml	1,563 ml	1,563 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 26 : 0,7	288 µl	-	-	-
Acrylamid/Bisacrylamid 29,3 : 0,53	-	2,55 ml	2,14ml	1,715 ml
10% SDS	25 µl	125 µl	125 µl	125 µl
10% APS	30 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Bei der SDS-PAGE werden Proteine entsprechend ihren Molekulargewichten in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die denaturierten Polypeptidketten binden SDS, werden dadurch negativ geladen und wandern im elektrischen Fluss zur Anode. Die Menge an gebundenen SDS ist proportional dem Molekulargewicht (pro 1 g Protein binden etwa 1,4 g SDS), aber unabhängig von der Aminosäuresequenz. Somit ist die Motilität der Protein-SDS-Komplexe allein abhängig von der Größe der Proteine. Zur Denaturierung wurden die Proteinlysate 1:1 mit Laemmlipuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 10% β-Mercaptoethanol; 20% Glycerol; 0,01% Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Schließlich wurden die Proben mit Minigelen mit

3%igem Sammelgel und 8-12%igem Trenngel (Tab. 5) entsprechend der Größe der gesuchten Proteine aufgetrennt. Der für die Elektrophorese verwendete Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 3,5 mM SDS und 192 mM Glycin. Als Marker des Molekulargewichts diente der PeqGold Proteinmarker IV (Peqlab, Erlangen).

2.10 Westernblot

Die Proteine wurden durch das Semidry-Blot-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen (Protran; Whatman, Dassel) übertragen. Der Blot erfolgte bei 2 mA/cm² über 40-60 min mit 25 mM Tris, 20% Methanol und 192 mM Glycin als Transferpuffer. Nach dem Blot wurde die Nitrozellulosemembran über 3 min mit Ponceau-S-Lösung (30% TCA, 1,18 M 5-Sulfosalicylsäure, 26 mM Ponceau S) gefärbt, um die Beladung zu dokumentieren, gewaschen in TBS/Tween (20 mM Tris; 140 mM NaCl; 0,05% Tween 20) und unspezifische Bindungsstellen für 60 min mit Blocking-Lösung (5% fettfreies Milchpulver in TBS/Tween) abgesättigt. Darauf erfolgte die Primärantikörper-Inkubation über Nacht bei 4°C in TBS/Tween mit 5% BSA (bovine serum albumin) und nach weiterem Waschen mit TBS/Tween die Inkubation mit Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper in Blocking-Lösung für 2 h bei Raumtemperatur.

Tabelle 6 Im Westernblot verwendete Primär- und Sekundärantikörper und ihre eingesetzte Verdünnung

Antikörper	Verdünnung	Firma
Kaninchen anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-p44/42 (Erk1/2)	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-p38	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-phospho-Src (Tyr 416)	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti -Src	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	1:1000	Cell Signaling
Kaninchen anti-SAPK/JNK	1:1000	Cell Signaling
Ziegen anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	1:1000	Cell Signaling
Ziegen anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	1:20000	Rockland

Die Detektion erfolgte mit dem ECL- (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) oder dem Immun-Star WesternC (Biorad, Hercules, CA, USA)-System, das auf einer Peroxidase-katalysierten Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol durch H_2O_2 unter alkalischen Bedingungen beruht. Die Chemolumineszenz wurde mit dem ChemiDocXRS-System (Biorad, Hercules, CA, USA) detektiert und mit der Software QuantityOne (Biorad, Hercules, CA, USA) semi-quantitativ ausgewertet. Sollte dieselbe Membran mit verschiedenen Primärantikörpern inkubiert werden, so wurde als Zwischenschritt bereits gebundener Antikörper mit dem Restore-Western-Blot-Stripping-Puffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) entfernt.

2.11 Gel-Färbungen

2.11.1 Coomassie-Brillantblau-Färbung

Zur Anfärbung von Proteinen im Acrylamidgel wurde der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie G-250 genutzt, der sich an basischen Aminosäureseitenketten anlagert. Dazu wurden die Gele im 10-fachen Gelvolumen Fixierlösung (25% Isopropanol, 10% Essigsäure) für 15 min fixiert, danach für etwa 2 h bei Raumtemperatur in 10% Essigsäure mit 0,006% Coomassie G-250 gefärbt und schließlich in 10% Essigsäure entfärbt.

2.11.2 Silberfärbung nach Blum

Die Silberfärbung beruht auf einer Anlagerung von Silberionen an die Proteine mit anschließender Reduktion zu elementarem Silber durch Formaldehyd, wodurch die Proteine schwarz gefärbt werden. Im Vergleich zur Coomassie-Färbung ist die Silberfärbung hochsensitiv mit einer Nachweisgrenze von 0,1 bis 1 ng pro Bande. Für die Silberfärbung wurden die Acrylamidgele erst fixiert (40% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,05% Formaldehyd), mit 50% Ethanol gewaschen und in 0,02% $Na_2S_2O_3$ reduziert. Nach dreimaligem Waschen in Wasser erfolgte die Färbung mit Silberlösung (0,16% $AgNO_3$; 0,075% Formaldehyd) für 30 min und nach erneutem Waschen in Wasser die Entwicklung mit 5% Na_2CO_3 ; 0,25% $Na_2S_2O_3$ und 0,04% Formaldehyd. Die Entwicklung wurde mit 1% Glycin abgestoppt und die Gele mit Wasser gewaschen,

bevor sie zur Aufbewahrung in Cellophanfolie (Biorad, Hercules, CA, USA) eingeschweißt wurden.

2.12 Intrazelluläre pH-Messung

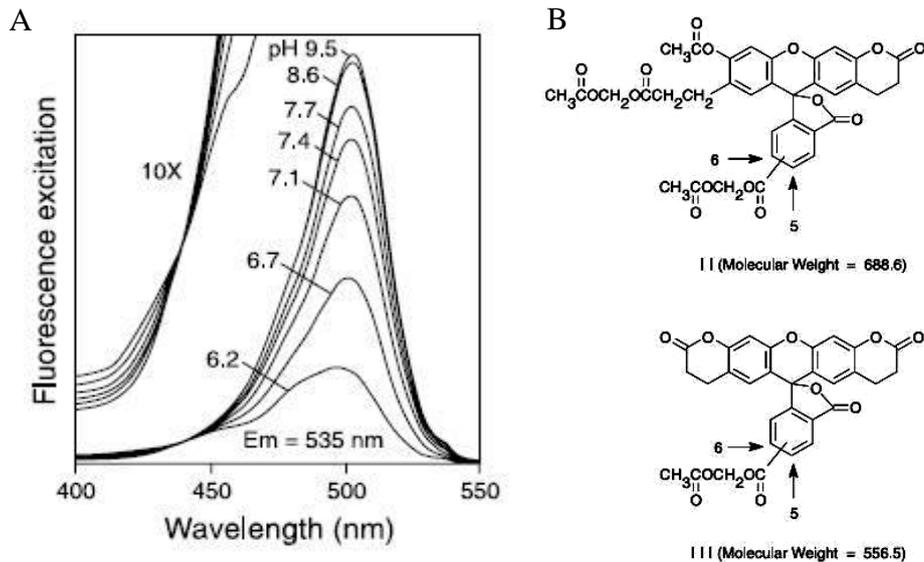


Abbildung 5 (A) Fluoreszenzanregungsspektrum von BCECF bei verschiedenen pH-Werten und (B) die am häufigsten auftretenden BCECF-Strukturen, beide Abbildungen entnommen aus Invitrogen (Paisley, UK)

Um den intrazellulären pH-Wert zu bestimmen, wurde der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein (BCECF-AM; Invitrogen, Paisley, UK) verwendet. Der Vorteil von pH-sensitiven Farbstoffen im Vergleich zu anderen Methoden, wie z.B. NMR (nuclear magnetic resonance) oder pH-sensitiven Mikroelektroden, ist ihre unkomplizierte und zeitsparende Handhabung, ihre Unabhängigkeit von der Zellgröße sowie ihre hohe Sensitivität (113). BCECF ist mit seinem pK_a von 7,0 gut für Messungen im Zytosol geeignet. Das Fluoreszenzanregungsspektrum zeigt eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert, mit einem Maximum um 500 nm und einem isosbestischen Punkt bei 450 nm (Abb. 5). Die Modifizierung des BCECF mit der Acetoxymethylestergruppe (AM) vermittelt dessen Zellpermeabilität. Die Abspaltung des Esters durch intrazelluläre Esterasen setzt das fluoreszierende BCECF frei und verhindert die Diffusion aus der Zelle heraus. Für die Messung wurden die Zellen für 15 min mit 5 μ M BCECF-AM inkubiert, danach zweimal gewaschen, um den restlichen Farbstoff zu entfernen und

schließlich auf ein invertiertes Axiovert100-TV-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) transferiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte alle 10 s bei den Anregungswellen 450 und 490 nm und einer Emission von 535 nm. Um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern, erfolgten die Messungen nie länger als 30 min. Die Zellen wurden während dieser Zeit stets bei 37°C mit den angegebenen Lösungen überströmt, um einerseits ein Entweichen von BCECF aus den Zellen zu umgehen und andererseits freien Farbstoff zu entfernen. Nach jeder Messung erfolgte eine Zweipunkt-Kalibrierung mit Nigericin-haltigen Hochkaliumpuffern (132 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 µM Nigericin) pH 7,6 und 6,8. Das K⁺/H⁺-Ionophor Nigericin ist unter diesen Bedingungen in der Lage, den intra- und extrazellulären pH-Wert anzugleichen, indem es über die Zellmembran K⁺ für H⁺ austauscht (113;114). Zur Berechnung des intrazellulären pH-Wertes wurde die Hintergrundfluoreszenz abgezogen und dann das Verhältnis der beiden Wellenlängen gebildet. Da eine Anregungswellenlänge am isosbestischen Punkt liegt, ist keine zusätzliche Normalisierung der Werte nötig. Der Messbereich von BCECF ist von pH 6,4 bis pH 7,5 linear (113).

2.13 Bestimmung des Zellvolumens

Änderungen des Zellvolumens wie auch der Zellzahl und Vitalität wurden elektronisch mit dem Casy-Zellzähler (Innovatis, Reutlingen) bestimmt. Bei dieser Technology werden Partikel über das Widerstandsmessprinzip ermittelt und die erhaltenen Signale durch Pulsflächenanalyse ausgewertet. Etwaige Inkubation der Zellen (siehe 2.2.2 Versuchsaufbau) erfolgten vor dem Ablösen der Zellen durch Trypsin. Danach wurden die abgelösten Zellen in die entsprechende Ringerlösung überführt und nach 10 min vermessen.

2.14 Wachstumskurve und Zellzyklusanalyse

Die Zellzahl für die Wachstumskurven wurde mit dem Casy-Zellzähler (Innovatis, Reutlingen) ermittelt. Dazu mussten die Zellen abgelöst, vereinzelt und in isotonischer CASY[®]-Lösung (Innovatis, Reutlingen) verdünnt werden (siehe 2.2).

Um die Anzahl an Zellen in der S-Phase zu bestimmen, wurde der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dazu wurde Propidiumiodid genutzt,

das stöchiometrisch an DNA bindet. Da auch RNA gebunden werden kann, ist ein RNase-Verdau nötig. Das Fluoreszenzsignal des Propidiumiodids (Anregung bei 488 nm, Emission bei 578 nm) korreliert mit dem DNA-Gehalt und gibt Aufschluss darüber, in welcher Phase des Zellzykluses sich die Zelle befindet (G1: diploider Chromosomensatz, G2: tetraploider Chromosomensatz, S-Phase: liegt zwischen G1 und G2). Für die Analyse wurden die Zellen nach der Inkubation bei pH 7,4 oder pH 6,6 mittels Trypsin abgelöst, mit PBS gewaschen und über Nacht bei -20°C in 70%igen Ethanol inkubiert. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen für 5 min mit 0,025% Triton X-100 in PBS bei 4°C permeabilisiert, erneut mit PBS gewaschen und schließlich in Propidiumiodidlösung (50 µg/ml Propidiumiodid, 0,1 mg/ml RNase A in PBS pH 7,2) für 30 min gefärbt. Es wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Propidiumiodidlösung aufgenommen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C für 5 min bei 500 g. Die Proben wurden im BD LSR Fortessa und mit der BD FACS Diva Software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) vermessen und die Auswertung der DNA-Histogramme erfolgte mit der Software ModFit LT™ (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

2.15 Messung von Apoptose und Nekrose

2.15.1 Caspase-3-Messung

Zur Messung der Apoptose wurde die Caspase-3-Aktivität in Zelllysaten bestimmt. Caspase-3 ist eine Cysteinprotease und gehört zu den Effektor-Caspasen, die nach Aktivierung zelleigene Proteine wie Aktin und Lamin spalten sowie Nukleasen wie CAD (Caspase-aktivierte DNase) aktivieren und dadurch die Apoptose vermitteln. Die Zellen wurden mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und mit 100 µl Caspase-Lysepuffer (10 mM Tris; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,01% Triton X-100; pH 7,5) lysiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16000 g erfolgte die Inkubation von 60 µl Überstand mit 60 µl Caspase-Reaktionspuffer (20 mM PIPES; 4 mM EDTA; 0,2% CHAPS, 10 mM DTT bei pH 7,4) und 5 µl Caspase-3-Substrat (1 mM DEVD-AFC in DMSO). Die Fluoreszenz des Spaltprodukts 7-Amino-4-Trifluoromethylcumarin (AFC) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emission von 505 nm in einem Multiwellreader (Infinite; Tecan, Berlin) gemessen. Für die Eichkurve wurden bekannte Konzentration von AFC (1, 2, 4, 8 µM) eingesetzt. Sämtliche Messungen wurden auf die Proteinmenge normalisiert.

2.15.2 Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung

Nekrotischer Zelltod wurde über die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) ins Kulturmedium nach Standardprotokoll (115) bestimmt. LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD⁺ sowie dessen Rückreaktion. Da LDH im Zytoplasma von praktisch allen Zellen vorhanden ist, eignet sie sich gut zur Bestimmung von Nekrose und wird auch als klinischer Parameter zur Diagnose von Gewebs- und Organschädigungen genutzt. Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 10 µl Medium mit 190 µl LDH-Reaktionspuffer (10 mM HEPES; 1,25 mM Pyruvat; 213 µM NADH) oder 5 µl Zelllysate mit 195 µl LDH-Reaktionspuffer versetzt und bei 37°C alle 20 s für insgesamt 60 Zyklen die Absorption bei 334 nm in einem Multiwellreader (Infinite; Tecan, Berlin) gemessen. Mit den erhaltenen Anstiegen (ΔE/min) konnte nach folgender Gleichung die LDH-Aktivität in mU/ml berechnet werden:

$$\text{LDH-Volumenaktivität} = 100 \times (\Delta E/\text{min} \times V_{\text{total}}) / (\epsilon \times V_{\text{Probe}} \times d)$$

$$\text{mit } \epsilon \text{ (Extinktionskoeffizient NADH}_{334 \text{ nm}}) = 6,11 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$$

$$\text{und } d \text{ (Schichtdicke der Küvette)} = 0,52 \text{ cm bei 96-Well mit } V=200 \mu\text{l}$$

Die Summe der LDH-Aktivität im Medium und dem Zelllysate entspricht der LDH-Gesamtaktivität, die Freisetzung von LDH ins Medium ist der prozentuelle Anteil der LDH-Aktivität im Medium von der Gesamtaktivität.

2.16 Bestimmung des extrazellulären pH-Wertes, der Glukose- und Laktatkonzentration

2.16.1 pH-Messung

Der pH-Wert der eingesetzten Lösungen wurde mit einem Blutgasanalysator (ABL5, Radiometer; Kopenhagen, Dänemark) bestimmt.

2.16.2 Glukosekonzentration

Die Messung der Glukosekonzentration erfolgte mit dem Glucose-(HK)-Assay-Kit von Sigma (Sigma-Aldrich, München) nach Angaben des Herstellers. Der Nachweis beruht auf der Phosphorylierung von Glukose durch Hexokinase und anschließende Umsetzung zu 6-Phosphogluconat unter NADH-Bildung durch Glukose-6-Phosphat-

Dehydrogenase. Das gebildete NADH führt zu einem Anstieg der Absorption bei 340 nm und ist direkt proportional zur Glukosekonzentration. 5 µl Überstand oder 5 µl Standard (1, 2, 4 mM Glukose) wurden mit 200 µl Glukose-Reagenz versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 37°C und die Messung bei 340 nm am Multiwellreader (Infinite; Tecan, Berlin).

2.16.3 Laktatkonzentration

Die Bestimmung der Laktatkonzentration im Überstand erfolgte mit dem Laktat-Reagenz von Trinity (Bray, Co Wicklow, Irland) nach Angaben des Herstellers. Bei diesem Reagenz reagiert Laktat zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid durch Laktatoxidase. Wasserstoffperoxid und Peroxidase katalysieren nachfolgend eine oxidative Kondensation chromogener Vorstufen und führen zu einer, zur Laktatkonzentration direkt proportionalen, Bildung eines Farbstoffs mit einem Absorptionsmaximum von 540 nm. Für die Messung wurden 10 µl Probe oder Standard (1, 2, 3 mM Laktat) mit 100 µl Reagenz vermischt und die Absorption sofort bei 540 nm im Multiwellreader (Infinite; Tecan, Berlin) bestimmt.

2.17 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

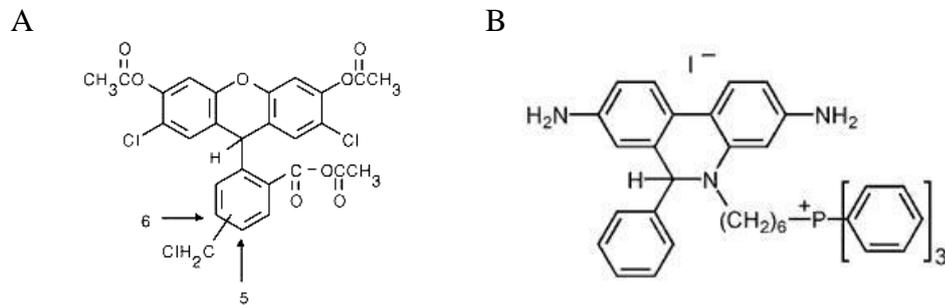


Abbildung 6 Struktur von (A) CM-H₂DCFDA und (B) MitoSox™ (entnommen aus: den entsprechenden Datenblättern von Invitrogen, Paisley, UK)

Für die Detektion von ROS in der Zelle wurde der Acetylolester des reduzierten Fluoresceinderivats CM-H₂DCFDA (5-(und-6-)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diacetat) genutzt (Invitrogen, Paisley, UK; Abb. 6A). CM-H₂DCFDA-AM ist zellpermeabel und erst nach der Abspaltung der Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen und Oxidation ist die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emission von 530 nm messbar. Ein Verlust an Farbstoff durch Diffusion aus dem Zytosol wird durch die Esterasen-vermittelte Spaltung umgangen, da die geladene Form nicht membrangängig ist. Allerdings ist CM-H₂DCFDA-AM anfällig gegenüber Auto-Oxidation bei Kontakt mit Licht. Zur Bestimmung der ROS-Bildung wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und mit den angegebenen Ringerlösungen zuzüglich 10 µM CM-H₂DCFDA-AM inkubiert. Nach 180 min wurden die Zellen bei 4°C mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und mit 100 µl Lysepuffer (20 mM MOPS; 0,1% Triton X-100) aufgeschlossen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem Multiwellreader (Infinite; Tecan, Berlin) und alle erhaltenen Werte wurden auf die Proteinmenge normalisiert. Neben CM-H₂DCFDA-AM wurde zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff MitoSox™ (Invitrogen, Paisley, UK; Abb. 6B) genutzt, der schnell und selektiv in die Mitochondrien transportiert wird und dort von Superoxid-Radikalen oxidiert wird. Die Durchführung der Experimente mit MitoSox™ entsprach der der Experimente mit CM-H₂DCFDA-AM, allerdings wurde 5 µM Farbstoff eingesetzt und die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 510 nm und einer Emission von 580 nm gemessen.

2.18 Bestimmung der Migration

Die Migration der Tumorzellen wurde mit Hilfe von Videomikroskopie analysiert. Dazu wurden 600.000 AT-1-Zellen pro 3 cm-Petrischale angesät, 24 h vor Versuchsbeginn mit RPMI-Medium ohne Serum ruhiggestellt, schließlich mit den angegebenen Ringerlösungen inkubiert und in ein Inkubationssystem für Mikroskope, das Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO₂-Gehalt kontrolliert (Stage Top Incubator INU-KI-F1; Tokai Hit, Fujinomiya, Japan), überführt. Für die Zeitverläufe wurden alle 5 min Bilder (20fache Vergrößerung) mit einem Keyence BZ-8100E-Fluoreszenzmikroskop (Keyence Corporation, Osaka, Japan) aufgenommen (insgesamt 20 Bilder) und mit der dazugehörigen Bildanalysesoftware („BZ-Analyser“) ein Film aus den einzelnen Bildern generiert. Diese Filme wurden dann mit ImageJ analysiert. Die migratorischen Geschwindigkeit wurde als zurückgelegte Strecke einzelner Zellen in μm pro min bestimmt. Dazu wurde das „Manual Tracking Tool“, ein zusätzliches Softwaremodul von ImageJ, genutzt. Die Bewegung mehrerer Einzelzellen wurde anhand von markanten Stellen von Bild zu Bild verfolgt (Abb. 7). Zusätzlich wurde der Umfang (p) und die Fläche (A) der migrierenden Zellen bestimmt und der Strukturindex (102) nach folgender Formel berechnet: $\text{Strukturindex (SI)} = (4\pi A)/p^2$

Der Strukturindex spiegelt die Morphologie der Zelle wieder, wobei ein SI von „1“ eine Kugelform und Werte nahe „0“ eher spindelförmige oder dendritische Zellformen darstellen. Um die Genauigkeit der angewandten Methode zu überprüfen, wurde bei einzelnen Experimenten die Migration zusätzlich durch Verschiebung des Zellmittelpunkts bestimmt (Methode und Software: (102)). Die beobachteten Effekte konnten auch mit dieser Auswertungsmethode bestätigt werden.

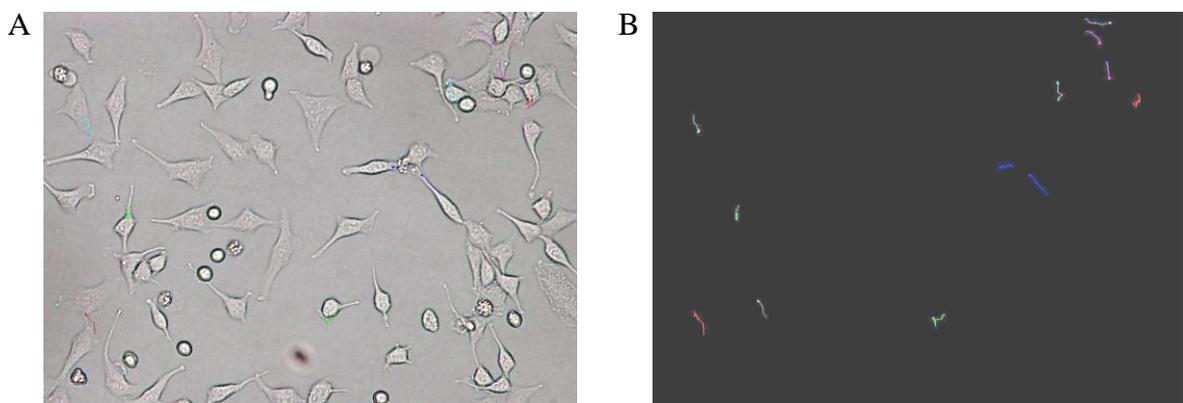


Abbildung 7 Erhaltene Migrationsdaten (Track) mit ImageJ (A) Überlagerung des letzten Bildes mit dem Track und (B) Track allein. Jede farbige Spur repräsentiert die Migration einer einzelnen Zelle über die Zeit.

2.19 Bestimmung der Invasivität

2.19.1 Messung des elektrischen Widerstands

Um zu untersuchen, ob die AT-1-Zellen in der Lage sind, eine dichte Epithelschicht aufzulockern, wurde die Messung des elektrischen Widerstandes (TEER), wie von Zak et al. und Ludwig et al. beschrieben, genutzt (107;116). Dazu wurden MDCK-C7-Zellen dicht auf einem Filtereinsatz mit 0,4 μm Porengröße (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) ausgesät und nach 96 h apikal und basolateral das MEM-Medium mit Serum durch MEM-Medium ohne Serum ersetzt. Der MDCK-Subklon C7 bildet besonders hohe elektrische Widerstände aus (108). Die AT-1-Zellen wurden für 3 h bei pH 7,4 oder pH 6,6 inkubiert und 200.000 Zellen basolateral unter den Filtereinsatz gegeben, sobald sich ein ausreichend hoher elektrischer Widerstand des MDCK-C7-Epithels ausgebildet hatte. Danach wurde alle 24 h der elektrische Widerstand, wie in Abb. 8 gezeigt, bestimmt.

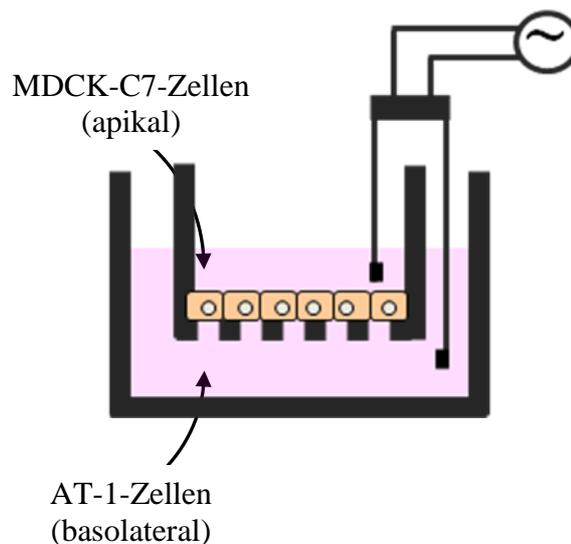


Abbildung 8 Schematische Aufbau der TEER-Messung. Auf dem Filtereinsatz (apikal) bilden die MDCK-C7-Zellen ein dichtes Epithel, die AT-1-Zellen wachsen auf dem Boden des 6-Well-Platten-Wellenblocks (basolateral) ohne direkten Zell-Zell-Kontakt zu den MDCK-C7-Zellen.

2.19.2 BioCoat-Invasionskammer

Für die Analyse der Invasivität wurden BioCoat-Matrigel-Invasionskammern (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. Die Matrigel-Beschichtung imitiert eine Basalmembran *in vitro* und enthält nach Angaben des Herstellers u.a. Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykane, Entaktin/Nidogen und verschiedene

Wachstumsfaktoren. Der Zellkultureinsatz hat eine Porengröße von 8 µm, so dass die Zellen, wenn sie das Gel überwunden haben, durch die Poren des Filtereinsatzes migrieren können. Die AT-1-Zellen wurden nach einer 3-stündigen Inkubation bei pH 7,4 oder pH 6,6 durch Trypsin in Suspension gebracht, in RPMI-Medium ohne Serum aufgenommen und 200.000 Zellen apikal auf den beschichteten Zellkultureinsatz ausgesät. Basolateral wurde RPMI-Medium mit Serum dazugegeben, um eine gerichtete Migration auszulösen. Nach 48 h wurde die Anzahl der migrierten Zellen durch Trypanblaufärbung bestimmt. Dazu wurden die Zellen auf der basolateralen Seite des Filtereinsatzes mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen, dann mit 4% Paraformaldehyd in TBS (20 mM Tris; 140 mM NaCl) für 60 min bei Raumtemperatur fixiert und nach weiterem Waschen über Nacht mit 0,2% Trypanblaulösung gefärbt. Die Filtermembranen wurden fotografiert, bzw. mit 1% SDS-Lösung für 30 min inkubiert und die Absorption bei 560 nm im Multiwellreader (Infinite; Tecan, Berlin) vermessen.

2.19.3 Aktivitätsbestimmung von Matrixmetalloproteasen und Cathepsin B

a) Zymographie

Zur Aufklärung des löslichen Faktors, der für die Auflockerung des MDCK-Epithels verantwortlich war, wurden die Überstände der TEER-Messungen durch Auftrennung in der SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.9) mit anschließender Färbung der Gele (s. 2.11) analysiert. Allerdings zeigte sich, dass der Großteil der sekretierten Proteine von den MDCK-C7-Zellen stammte und der Faktor konnte nicht näher eingegrenzt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde ganz gezielt die MMP- und Cathepsin-Aktivität untersucht. Der Nachweis von MMP-2 und -9-Aktivität erfolgte mittels Zymographie. Dazu wurde 400 µl Überstand mit 1 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung (750 g/l) bei 4 °C für 30 min gefällt, der Überstand nach 15 min Zentrifugation bei 16000g verworfen und das Pellet in 20 µl Wasser aufgenommen. Die Probe wurde 1:1 mit nicht-reduzierendem Laemmli-Probenpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS, 20% v/v Glycerol; 0,1 mg/ml Bromphenolblau) gemischt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mittels Gelelektrophorese erst bei 11 mA für 0,6 h und dann für 1h bei 21 mA aufgetrennt (Gelzusammensetzung siehe Tab. 7) und das Gel anschließend in 2,5% Triton X-100 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation in Enzympuffer (50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 0,136 mg/l ZnCl₂, 0,1% v/v

Triton X-100, 3 mM NaN₃, pH 7,5) über Nacht bei 37°C und anschließend eine Coomassie-Färbung des Gels (siehe 2.11). Das gelatinehaltige Gel färbt sich komplett blau an bis auf Bereiche mit Gelatinaseaktivität, die ungefärbt bleiben. Für MMP-2 wird im Gel eine ungefärbte Bande auf der Höhe von 72 kDa, für MMP-9 bei 92 kDa erwartet. Als Positivkontrolle wurden 1000 ng Kollagenase (unbehandelt und gefällt mit Ammoniumsulfat; Sigma-Aldrich, München) eingesetzt.

Tabelle 7 Zusammensetzung der nicht-denaturierenden Minigele für die Zymographie

SDS-PAGE	5 % Sammelgel [μ l]	7,5 % Trenngel [μ l]
H ₂ O	1750	2250
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	750	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1500
5,2 mg/ml Gelatinelösung	-	750
Acrylamid/Bisacrylamid 26 : 0,7	500	-
Acrylamid/Bisacrylamid 29,3 : 0,53	-	1500
TEMED	12	25
APS 10 %	35	35

b) Gelatinase-Assay

Ein anderer sehr sensibler Nachweis für die Aktivität von MMPs ist die Nutzung von DQ-Gelatine (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Dazu wurde 100 μ l Überstand aus der TEER-Messung mit 95 μ l Reaktionspuffer (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,136 mg/l ZnCl₂; 0,2 mM NaN₃; pH 7,6) und 1 μ l DQ-Gelatinelösung (1 mg/ml in H₂O und 2 mM NaN₃) vermischt und die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emission von 535 nm sowie 37°C in einem Multiwellreader (Infinite; Tecan, Berlin) bestimmt. Die Messung erfolgte alle 5 min für 20 Zyklen. Als Positivkontrolle dienten 5 ng Kollagenase (Sigma-Aldrich, München).

c) Cathepsin B

Die Aktivität von Cathepsin B wurde entweder in aufkonzentrierten Mediumproben oder Zelllysaten (Lysepuffer: 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% Triton X-100, pH 7,5) ermittelt. Dazu wurde die Probe 1:1 mit Reaktionspuffer (10 mM PIPES, 2 mM

EDTA, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT, pH 6,0) und 40 μM fluorogenem Cathepsin B-Substrat z-Arg-Arg-AMC (Sigma-Aldrich, München) inkubiert und die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 348 nm und einer Emmission von 440 nm sowie 37°C alle 10 min über 12 Zyklen in einem Multiwellreader (Infinite; Tecan, Berlin) gemessen. Die Erstellung einer Standardkurve erfolgte mit 0, 1, 2, 4 und 8 μM AMC.

2.20 Statistische Analyse

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Tabellen-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel und der Statistik- und Graphik-Software GraphPad Prism. Die Verteilung der Messdaten ist als arithmetischer Mittelwert plus Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mittels Students-t-Test oder dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, wenn für die zugrundeliegenden Daten keine Normalverteilung angenommen werden konnte. Werte von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und mit einem „*“ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss einer extrazellulären Azidose auf den intrazellulären pH-Wert

3.1.1 Der intrazellulärer pH-Wert unter Kontroll- und azidotischen Bedingungen

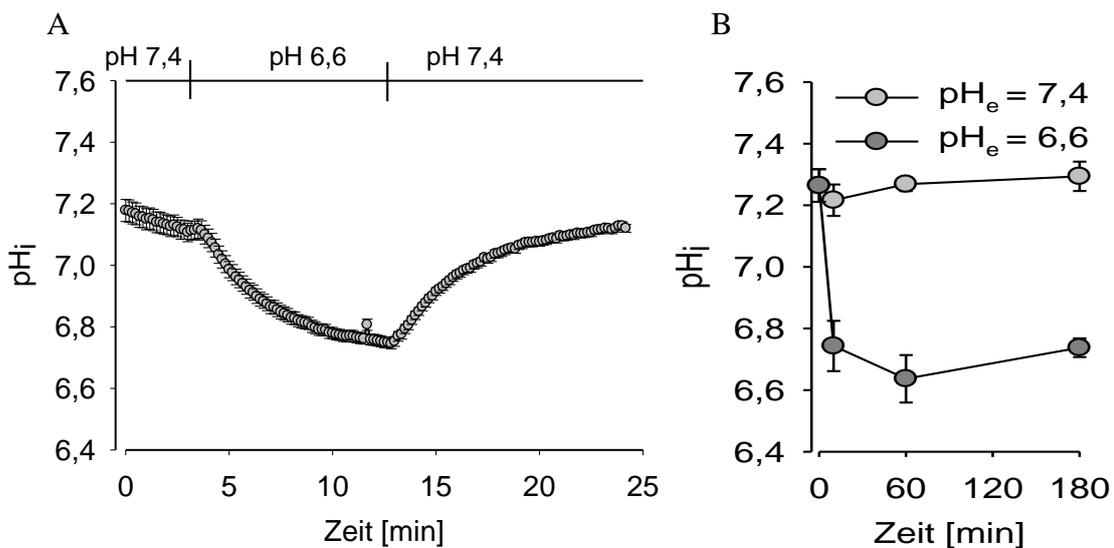


Abbildung 9 Zeitverlauf der Entwicklung des intrazellulären pH nach Kurzzeit- (A, B) und Langzeit-Inkubationen (B) mit einem pH_e von 6,6. $n = 3-16$

Die Auswirkungen einer extrazellulären Azidose auf den intrazellulären pH-Wert (pH_i) wurden mittels des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs BCECF-AM gemessen. Abbildung 9A zeigt den typischen pH-Verlauf einer Inkubation der Zellen mit einer bikarbonathaltigen Ringerlösung pH 7,4 und pH 6,6. Der pH_i folgt dem extrazellulären pH-Wert (pH_e). Senkte sich der pH_e , erreichte auch der pH_i nach etwa 10 min sein Minimum. Wurde der pH_e anschließend erhöht auf 7,4, erholte sich der pH_i wieder und kehrte zu seinem Anfangswert zurück. Messungen des pH_i in der gleichen Ringerlösung nach 10, 60 oder 180 min zeigten keine statistisch signifikanten Änderungen (Abb. 9B). Der pH_i ist über eine Zeit von 180 min stabil. Er lag unter Kontrollbedingungen ($pH_e = 7,4$) bei 7,29 mit einem Standardfehler von 0,01; bei $pH_e = 6,6$ ergab sich ein pH_i von 6,74 mit dem gleichen Standardfehler. Abbildung 10 zeigt den pH_i nach 10 und 180 min im Vergleich mit dem pH_e der bikarbonathaltigen Ringerlösungen. Während der pH_i sich über 180 min weitgehend stabil verhielt, sank der pH_e der Lösungen schwach, aber statistisch signifikant. Unter Kontrollbedingungen ($pH_e = 7,4$) waren die Zellen

intrazellulär saurer als ihre Umgebung ($\text{pH}_i < \text{pH}_e$). Interessanterweise dreht sich dieses Verhältnis im azidotischen Milieu ($\text{pH}_e = 6,6$) um, denn verglichen mit dem pH_e sind die Zellen intrazellulär basischer ($\text{pH}_i > \text{pH}_e$). Nimmt man für die Zellen ein Membranpotential von $E = -40$ mV an, entspräche das nach der Nernst-Gleichung einem pH-Gradienten von $\Delta\text{pH} = -0,65$. Das heißt, wenn keine Regulation des pH_i durch die Zelle stattfände, würde man bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4 einen pH_i von 6,75 statt 7,29 erwarten. Bei azidotischen Bedingungen läge der pH_i bei 5,95. Dass zeigt, dass ständig eine Kontrolle des intrazellulären pH-Wertes durch die Zelle stattfindet. Diese ist besonders stark ausgeprägt bei einem pH_e von 6,6, sodass der pH_i sogar höher als der extrazelluläre pH-Wert ist. Diese Umkehr der Beziehung zwischen extra- und intrazellulären pH-Wert wird als reverser pH-Gradient bezeichnet und wurde für Tumoren bereits beschrieben (96;117;118). Der pH_i im Normalgewebe liegt um die 7,0 und ist damit meist saurer der Extrazellularraum mit einem durchschnittlichen pH_e von 7,52 (18;117). In Tumoren ist der pH_i identisch mit dem des Normalgewebes oder mit Werten von 7,1 bis 7,2 etwas alkalischer (117;118), während der pH_e bei den meisten Tumoren zwischen 6,5 bis 7,0 liegt und somit im Vergleich zum Normalgewebe deutlich niedriger ist (4). Dass die AT-1-Zellen unter Kontrollbedingungen intrazellulär eher saurer im Vergleich zum pH_e sind, unter azidotischen Bedingungen sich dieses Verhältnis aber umkehrt, spiegelt eine gute Übereinstimmung des gewählten Zellmodells mit der *in vivo* Situation wieder.

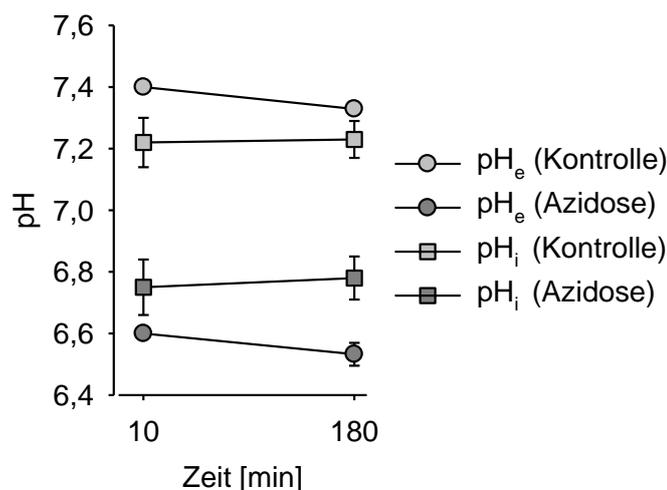


Abbildung 10 Intra- und extrazellulärer pH-Wert nach einer Inkubationszeit von 10 oder 180 min sowohl unter Kontroll- ($\text{pH}_e = 7,4$) als auch unter azidotischen ($\text{pH}_e = 6,6$) Bedingungen. $n = 6-16$

3.1.2 Azidose-induzierte Veränderung des intrazellulären pH-Wertes in unterschiedlichen Zelllinien

Es sollte ermittelt werden, ob die beobachteten Effekte auf den pH_i Zell-spezifisch oder eher allgemeiner Natur waren. Dazu wurden neben den AT-1-Zellen weitere Zelllinien stammend aus Tumor- (NCI-H358 und LS513) aber auch aus Normalgewebe (CHO, MDCK-C7, OK) untersucht. Bei den NCI-H358- und den LS513-Zellen handelt es sich um humane Epithelzellen aus einem bronchioloalveolären, beziehungsweise aus einem kolorektalen Karzinom. Die epithelialen Zelllinien CHO, MDCK-C7 und OK stammen ihrer Reihenfolge folgend aus Hamsterovar, Hundeniere sowie Opossumnieren. In Abbildung 11 ist der pH_i unter Kontroll- und azidotischen Bedingungen dargestellt. Alle hier untersuchten Zelllinien reagierten auf einen pH_e von 6,6 mit einer Reduktion des pH_i . Wie stark diese Reduktion ausfiel, war unabhängig davon, ob es sich um Tumorzellen handelte oder nicht. Die stärkste Reduktion des pH_i konnte in CHO-Zellen beobachtet werden. Der sinkende pH_i als Reaktion auf die Azidose scheint also ein genereller Effekt zu sein, während dessen Ausmaß Zelltyp-spezifisch ist.

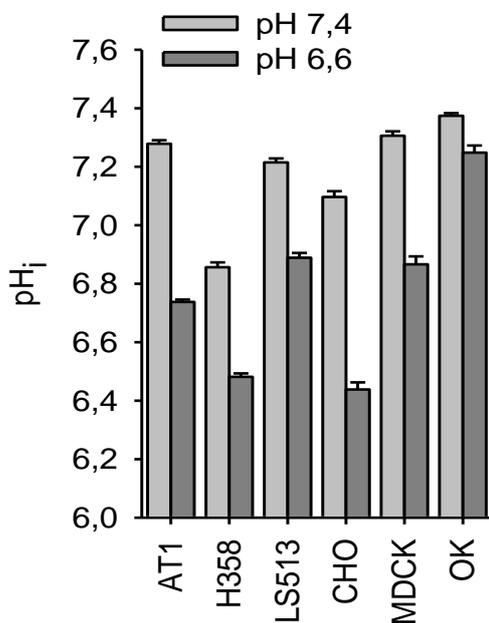


Abbildung 11 Intrazellulärer pH-Wert bei verschiedenen Zelllinien stammend aus Tumoren (AT1, H358, LS513) und aus Normalgewebe (CHO, MDCK, OK) unter Kontroll- ($\text{pH}_e = 7,4$) und azidotischen ($\text{pH}_e = 6,6$) Bedingungen.
 $n = 3-8$

3.1.3 Aufrechterhaltung der intrazellulären pH-Homöostase

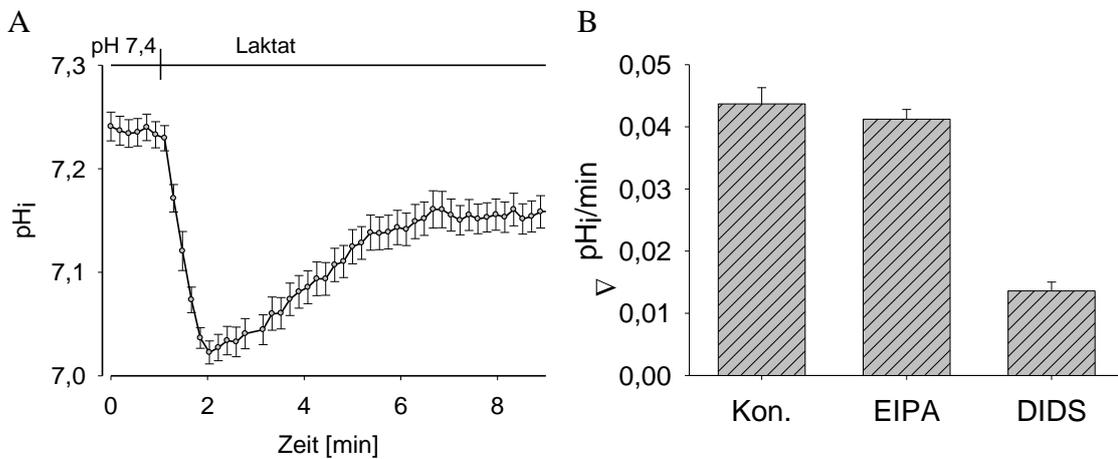


Abbildung 12 (A) Transiente intrazelluläre Ansäuerung mit Laktat und (B) Einfluss der Inhibition von Na⁺/H⁺-Austauschern mittels EIPA bzw. von Anionentransportern mittel DIDS auf die Normalisierung des intrazellulären pH-Wertes in AT-1-Zellen. n = 3

Die Regulation des intrazellulären pH-Wertes unter azidotischen Bedingungen kann kurzfristig über physikochemisches Puffern, Protonen-verbrauchende metabolische Reaktionen oder den Transfer von Säuren aus dem Zytosol in Organellen erreicht werden. Für eine längerfristige Regulation, wie hier beobachtet, sind Membran-basierende Mechanismen des Ionenaustauschs nötig (18), deren Beteiligung genauer untersucht wurde. Auch da der Einfluss einer gezielten intrazellulären Azidose auf die zellulären Prozesse, vor allem die Aktivierung von ERK1/2 und p38, interessant war, war es erforderlich, die Regulation des pHi genauer zu studieren. Bei ersten Versuchen wurden die Zellen mit Natriumlaktat (40 mM) in HEPES-Ringerlösung pH 7,4 inkubiert. Natriumlaktat kann in seiner ungeladenen Form in die Zellen diffundieren, setzt dort sein Proton frei und senkt dadurch den intrazellulären pH-Wert. Wie in Abbildung 12A zu sehen ist, konnte eine intrazelluläre Azidose nach kürzester Zeit induziert werden. Danach erholte sich der pHi allerdings schnell und erreichte nach etwa 6 min fast seinen anfänglichen Wert. Verantwortlich für die Regulation des pHi unter diesen Bedingungen sind hauptsächlich Na⁺/H⁺-Austauscher, die mit Amilorid (EIPA) oder Cariporid (HOE642) gehemmt werden können oder Na⁺-abhängige und -unabhängige Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher. Letztere können mit DIDS, einem Inhibitor des Anionentransports, blockiert werden (18;119-122). Zur Identifizierung der pH-Regulationsmechanismen wurden die Zellen mit Natriumlaktat zuzüglich der Inhibitoren der Austauscher überströmt. Die Erholung des pHi nach anfänglicher

intrazellulärer Ansäuerung wurde als Maß der Transporteraktivität genutzt. Dabei weist eine schnelle Erholung trotz Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors auf eine geringe Aktivität des entsprechenden Transporters hin. Eine verminderte oder fehlende Erholung des pH_i zeigt eine Beteiligung des Transporters bei der pH-Homöostase an. Abbildung 12B stellt den Anstieg des pH_i pro Minute unmittelbar nach dessen Minimum dar. Vergleicht man diesen Anstieg mit Laktat allein, so hat die Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers mit 10 μM EIPA keinen Einfluss, wohingegen bei Anwesenheit von 200 μM DIDS die Erholung des pH_i stark vermindert ist. Die Hemmung des Anionentransportes mit DIDS beeinträchtigt also die Regulation des pH_i bei AT-1-Zellen unter diesen Bedingungen. Um zu beweisen, dass ein funktioneller $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in AT-1-Zellen vorhanden ist, wurde Natriumchlorid durch Natriumglukonat ersetzt und so die Konzentration des Chlorids in der Ringerlösung von 93,9 mM auf 7,4 mM vermindert. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer Umkehr des Transportes durch den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Chlorid wird, seinem Konzentrationsgradienten folgend, aus der Zelle transportiert. Im Gegenzug wird Bikarbonat in die Zelle transportiert und führt zu einem Anstieg des pH_i . Der pH_i stieg bei einer stark verringerten Chloridkonzentration bis sich ein neues Gleichgewicht einstellte an und kehrte bei einem Wechsel auf die chloridhaltige Ringerlösung zu seinem ursprünglichen Wert zurück (Abb. 13A). Ein funktioneller $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher ist demnach in den AT-1-Zellen vorhanden. Dieses Ergebnis konnte noch weiter bestätigt werden, da Bikarbonat für die Regulation des pH_i essentiell war. Wurden die Zellen mit einer Ringerlösung ohne Bikarbonat überströmt, so stellte sich kein konstanter pH_i ein. Stattdessen fiel dieser leicht über die gesamte Dauer des Experiments (Abb. 13B). Dieser Effekt konnte auch erreicht werden, indem der Ringerlösung 200 μM DIDS zugesetzt wurde (Abb. 13C).

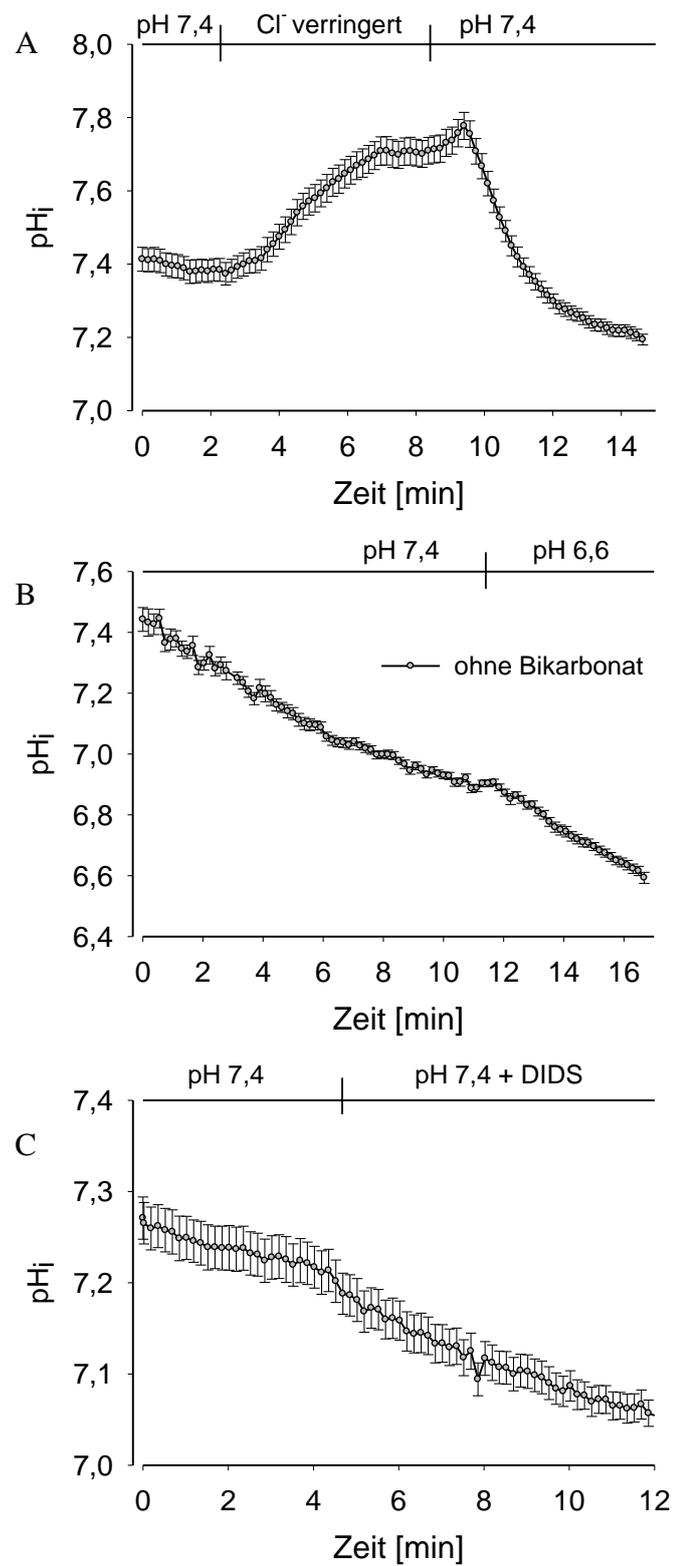


Abbildung 13 Einfluss von (A) verringerter Chloridkonzentration, (B) Lösungen ohne Bikarbonat und (C) Inhibition des Anionentransportes durch DIDS auf den intrazellulären pH-Wert in AT-1-Zellen. Repräsentative Zeitverläufe, N = 14

Diese Experimente weisen deutlich auf die entscheidende Rolle der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher bei der Regulation des intrazellulären pH-Wertes in AT-1-Zellen hin. Da Na^+ -unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher normalerweise für den Transport von Bikarbonat aus der Zelle heraus verantwortlich sind, also gegen eine Erhöhung des pH_i wirken (18), kann nur der Na^+ -getriebene $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher der intrazellulären Ansäuerung entgegenwirken. Das wird auch durch die vorliegenden Konzentrationsgradienten deutlich. Extrazellulär sind bei einem pH-Wert von 7,4 24 mM HCO_3^- und 94 mM Cl^- vorhanden. Intrazellulär betragen die Konzentrationen etwa 4-7 mM für Cl^- und nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung etwa 16 mM für HCO_3^- . Der stark einwärts-gerichtete Chloridgradient führt daher fast immer zum Transport von Bikarbonat aus der Zelle heraus.

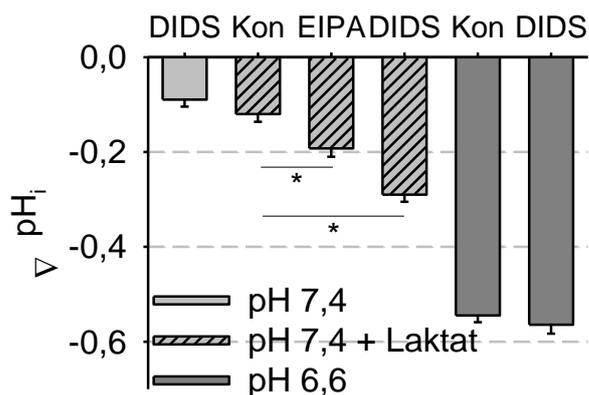


Abbildung 14 Reduktion des intrazellulären pH-Wertes in AT-1-Zellen nach Inkubation mit Ringerlösungen mit DIDS, EIPA und/oder Natriumlaktat. n = 4-8; Kon ...Kontrolle (Ringerlösung ohne Inhibitor)

Abb. 14 zeigt die Änderung des pH_i (bezogen auf Ringerlösung pH 7,4) nach einer dreistündigen Inkubation mit verschiedenen Ringerlösungen mit und ohne Transportinhibitoren. Waren 40 mM Laktat oder 200 μM DIDS in der HEPES-Ringerlösung pH 7,4 vorhanden, sank der pH_i leicht um 0,12 bzw. 0,09 pH-Einheiten. Bei einem Zusatz von Laktat und DIDS konnte die stärkste intrazelluläre Ansäuerung erreicht werden (0,29 pH-Einheiten). Die intrazelluläre Azidose war allerdings deutlich schwächer, als die Änderung des pH_i bei einer extrazellulären Azidose (0,54 pH-Einheiten). Im Gegensatz zu den Versuchen zur akuten Ansäuerung mit Natriumlaktat, bei denen der Na^+/H^+ -Austauscher keine Rolle spielte, war nach einer längeren Inkubationszeit (von 3 h) ein leichter Effekt mit 10 μM EIPA auf den pH_i sichtbar (Abfall um 0,07 pH-Einheiten verglichen mit Natriumlaktat allein). Es scheint daher, dass der Na^+/H^+ -Austauscher zwar nicht bei einer akuten Ansäuerung, aber bei der

dauerhaften Einstellung des pH-Wertes eine geringe Rolle spielt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die extrazelluläre Azidose durch Zusatz von 200 μM DIDS verstärkt werden kann (Abb. 14). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Unter sauren Bedingungen liegt auf Grund des pK-Wertes und der daraus resultierenden geringeren Dissoziation ein Mangel an Bikarbonat, also an Substrat für den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, vor. Daher spielt der Bikarbonattransport unter diesen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation des pH_i .

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine extrazelluläre Azidose zu einer intrazellulären Ansäuerung führt. Diese wurde sowohl bei AT-1-Zellen wie auch bei allen anderen untersuchten Zelllinien festgestellt. Bei der Regulation des pH_i in AT-1-Zellen spielt der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter eine entscheidende Rolle. Durch Inhibition dieser Transporter und simultaner Gabe von Laktat konnte eine alleinige intrazelluläre Ansäuerung bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4 erreicht werden.

3.2 Einfluss des extra- und intrazellulären pH-Wertes auf die MAPK

3.2.1 Regulation der MAP-Kinase JNK durch extrazelluläre Azidose

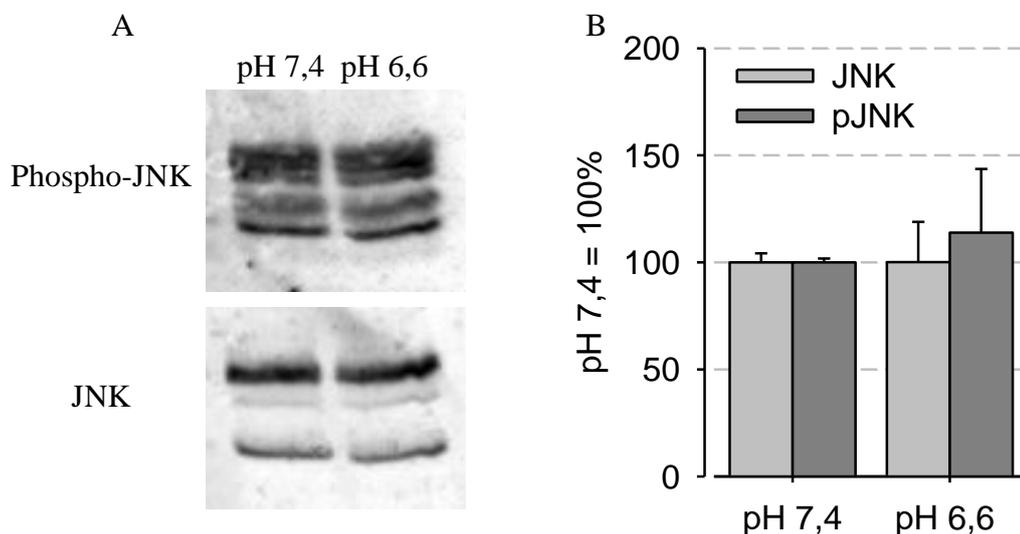


Abbildung 15 Abhängigkeit der JNK-Phosphorylierung und -Expression vom pH
(A) Typischer Westernblot und (B) semi-quantitative Analyse verschiedener Westernblots
(n = 7-8) für Phospho- und Gesamt-JNK

Um den Einfluss von Azidose auf die zellulären Signalwege näher zu beleuchten, wurde die Aktivität der MAPK analysiert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 (Thr202/Tyr204) und p38 (Thr180/Tyr182) nimmt in AT-1-Zellen unter azidotischen

Bedingungen zu, während die Expression des Gesamtproteins unverändert ist (24). Die Untersuchung der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) mittels phospho-spezifischen Antikörpern (Phospho-Thr183/Tyr185) zeigte im Westernblot keinen Einfluss der Azidose auf die Phosphorylierung. Auch das Gesamtprotein blieb unverändert (Abb. 15). Da es zu keiner Aktivierung von JNK nach Azidose kommt, wurde der Schwerpunkt der folgenden Experimente auf ERK1/2 und p38 gelegt.

3.2.2 Azidose-vermittelte Aktivierung von MAPK in unterschiedlichen Zelllinien

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Azidose und der Aktivierung der MAPK ERK1/2 und p38 aufzudecken, wurden weitere Zelllinien, die aus Tumor- und Normalgewebe stammen, analysiert. Die Zelllinien NCI-H358, LS513, CHO, MDCK-C7 und OK wurden für 3 h unter Kontrollbedingungen (pH 7,4) oder Azidose (pH 6,6) inkubiert, lysiert und mittels phospho-spezifischen Antikörpern gegen ERK1/2 und p38 im Westernblot untersucht (Abb. 16).

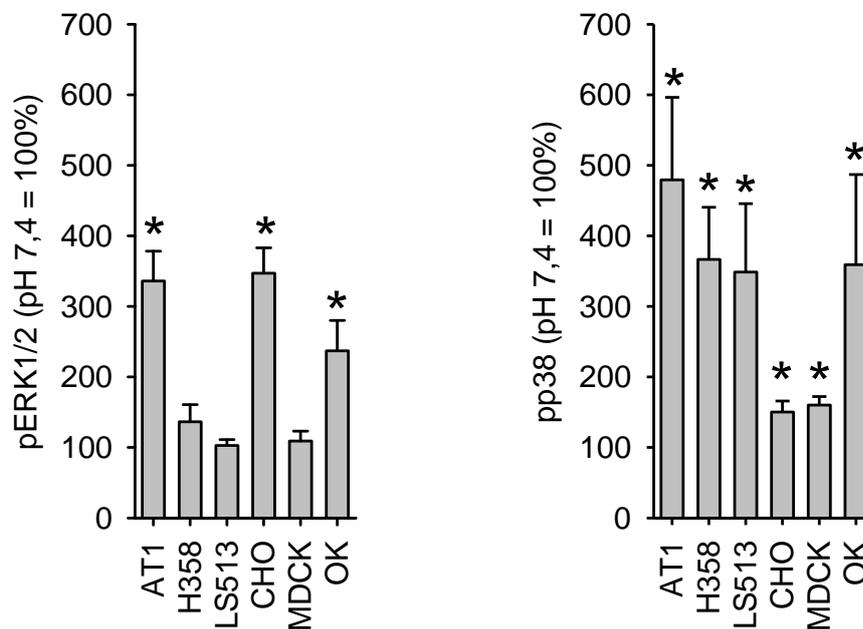


Abbildung 16 Azidose-induzierte ERK1/2- und p38-Phosphorylierung in Zelllinien aus Tumor- (AT-1, H358, LS513) und Normalgewebe (CHO, MDCK, OK). n = 5-44

Die Reduktion des extrazellulären pH-Wertes führte zu einer Aktivierung von p38 in sämtlichen Zelllinien, unabhängig davon, ob es sich um Tumorzellen handelte oder nicht. Da alle Zelllinien auch mit einer Reduktion des pH_i nach Azidose reagiert hatten

(Abschnitt 3.1.2), wurde nach einer möglichen Korrelation zwischen MAPK-Aktivierung und pH_i beziehungsweise ΔpH_i gesucht. Allerdings war die p38-Aktivierung nicht abhängig vom pH_i an sich oder von der Stärke der intrazellulären Ansäuerung (Abb. 17). Die vermehrte Phosphorylierung von p38 nach Azidose scheint ein genereller Mechanismus der Stressabwehr zu sein, der in allen hier untersuchten Zelllinien vorhanden ist.

Im Gegensatz dazu steht die Aktivierung von ERK1/2. Neben den AT-1-Zellen konnte eine vermehrte Phosphorylierung nur bei CHO- und OK-Zellen beobachtet werden. Wie schon bei der Aktivierung von p38 gab es allerdings keine Korrelation zwischen vermehrter Phosphorylierung und dem pH_i oder ΔpH_i (Abb. 17). Auch war es nicht entscheidend, ob die untersuchte Zelllinie ursprünglich von einem Tumor stammte oder nicht. Somit ist die Aktivierung von ERK1/2 und deren Stärke Zell-spezifisch.

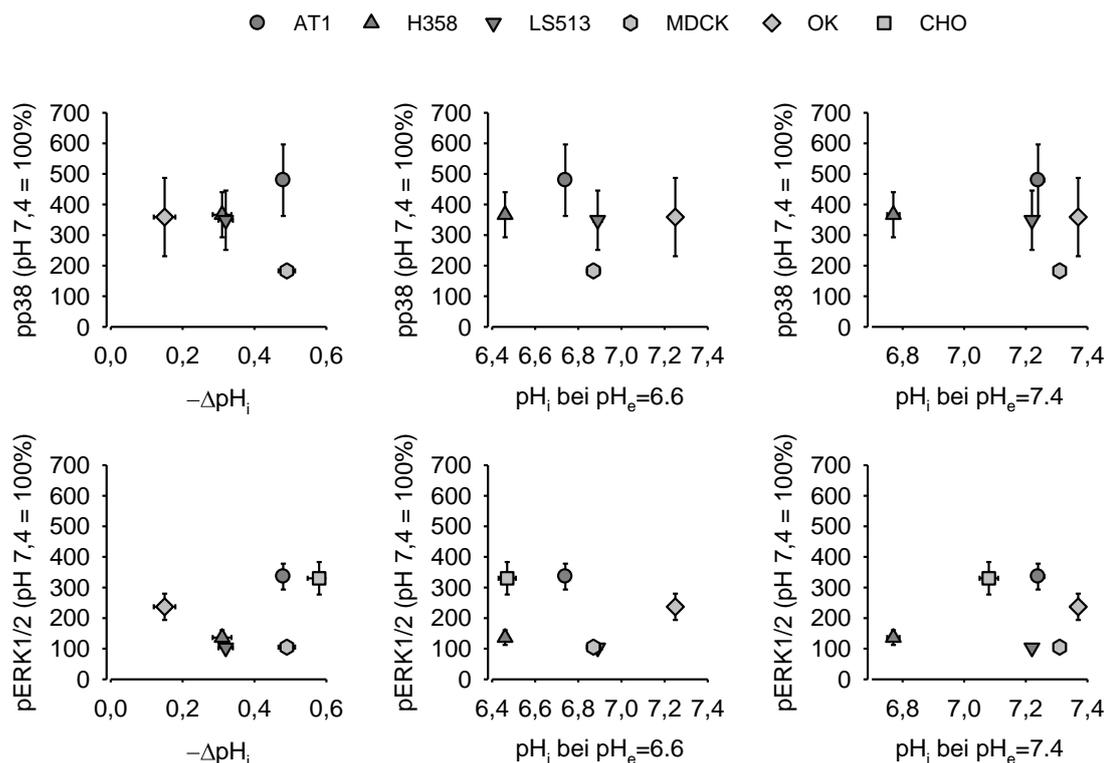


Abbildung 17 Fehlen einer Korrelation zwischen der relativen ERK1/2-bzw. p38-Phosphorylierung und dem pH_i bzw. dem ΔpH_i in Tumor- (AT1, H358, LS513) und Nicht-Tumor- (MDCK, OK, CHO) Zelllinien

3.2.3 Zeitverlauf der ERK1/2- und p38-Aktivierung

Der Zeitverlauf der MAPK-Aktivierung kann Hinweise auf den genauen Mechanismus der ERK1/2- und p38-Phosphorylierung geben. So könnte eine sehr schnelle Aktivierung ein Zeichen für eine direkte Wirkung des sauren Milieus auf die MAPK-Signalkaskade sein. Bei sehr später Aktivierung ist es wahrscheinlich, dass weitere Signalwege dazwischen geschaltet sind, die vorher aktiviert oder gehemmt werden müssen. Zudem ist für die Signalantwort die Dauer (und Intensität) entscheidend (31;123). So führt z.B. eine transiente Aktivierung von ERK1/2 eher zu Wachstum, während eine anhaltende Aktivierung einen Wachstumsarrest und Differenzierung von Phäochromozytomzellen auslöst (124). In anderen Arbeiten führt nur eine anhaltende ERK1/2-Aktivierung zum Eintritt in den Zellzyklus (125;126). AT-1-Zellen wurden für 5, 10, 15, 60, 120 und 180 min mit Ringerlösungen pH 7,4 oder pH 6,6 inkubiert, lysiert und im Westernblot analysiert.

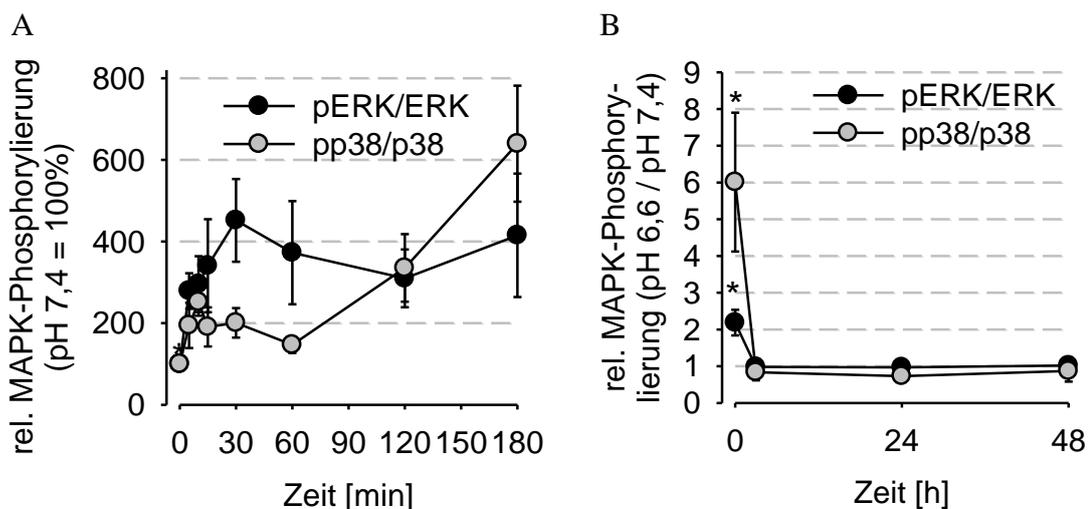


Abbildung 18 Zeitverlauf der ERK1/2- und p38-Aktivierung bei Azidose. (A) Die relative Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 (bezogen auf das Gesamtprotein) war über den gesamten Zeitverlauf statistisch signifikant erhöht. $n = 4-10$ (B) Nach 180 min Inkubation bei pH 7,4 oder pH 6,6 wurden AT-1-Zellen für 0, 3, 24 und 48 h in RPMI-Medium (pH 7,4) überführt. Dargestellt ist die Azidose-induzierte Aktivierung von ERK1/2 und p38 als Verhältnis pH 6,6 zu pH 7,4. $n = 3-4$.

Abbildung 18 zeigt, dass die Aktivierung von ERK1/2 und p38 sehr schnell verlief und bereits nach 5 min nachzuweisen war. Die Stärke der ERK1/2-Phosphorylierung blieb über den gesamten Zeitraum relativ konstant. Im Gegensatz dazu schien die Phosphorylierung von p38 nach 60 min sogar noch zuzunehmen, sodass von einer

Aktivierung in zwei Phasen ausgegangen werden kann: Eine schnelle Phase mit einem relativ geringen Anstieg der Phosphorylierung und eine späte Phase, die erst nach 60 min einsetzte und eine stark erhöhte Phosphorylierung zeigte. Solch eine biphasische Aktivierung ist z.B. für ERK1/2 in der Arbeit von Chambard et al. beschrieben (127). Zahlreiche Stimuli führten zu einer schnellen, aber nur für 30-60 min anhaltenden ERK1/2-Aktivierung. Unter einer persistenten Anwesenheit von Mitogenen wurde eine über mehrere Stunden anhaltende, späte Phase beobachtet. Diese späte Phase war entscheidend für die Progression des Zellzyklus (128) und den Eintritt in die S-Phase (126). In der Arbeit von Iijima und Kollegen ist eine biphasische Aktivierung von p38 beschrieben. In Abhängigkeit vom eingesetzten Stimulus wurde p38 entweder bereits nach 15 min (frühe Phase) oder nach 3-6 h (späte Phase) aktiviert und führte dadurch zu einer Aktivierung von verschiedenen Signalwegen (129). Trotz dieser möglichen Aktivierung von p38 in zwei Phasen, ist die Menge an phosphoryliertem Protein bei Azidose zu allen Zeitpunkten größer als die unter Kontrollbedingungen (pH 7,4).

Das Tumormikromilieu weist normalerweise keine konstanten Bedingungen, also auch keine dauerhafte Azidose auf. Daher wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte auch längerfristig nach der Azidose erhalten bleiben. Dafür wurden AT-1-Zellen erst mit Ringerlösungen pH 7,4 oder pH 6,6 für 3 h inkubiert, danach in Zellkulturmedium ohne Serum (pH 7,4) überführt und schließlich nach weiteren 3, 24 oder 48 h lysiert. Die ERK1/2- und p38-Phosphorylierung wurde im Westernblot mit Phosphoprotein-spezifischen Antikörpern analysiert. Bereits nach 3 h in Zellkulturmedium konnte kein Unterschied zwischen pH 7,4 oder pH 6,6 mehr festgestellt werden (Abb. 18B). Die Zellen zeigten also, zumindest was die Aktivierung der MAPK betraf, keinen Gedächtniseffekt nach Azidose. Bei den Proben, die 48 h im Serum-freien Medium gehalten wurden, zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung von p38, allerdings unabhängig davon, ob die Zellen vorher in Ringerlösung pH 7,4 oder pH 6,6 inkubiert wurden. Zugleich war die Menge an Protein in den Zelllysaten deutlich vermindert. Diese Beobachtungen deuten auf einen vermehrten Zelltod, ausgelöst durch Serumentzug für insgesamt 72 h, hin und sind unabhängig von der Azidose. Zellen, die bis zu 48 h ohne Serum gehalten wurden, waren noch vital.

3.2.4 Abhängigkeit der ERK1/2- und p38-Phosphorylierung vom extra- und intrazellulären pH-Wert

Eine extrazelluläre Azidose führte zu einer Aktivierung von ERK1/2 und p38. Da sie auch mit einer Verminderung des pH_i einherging, wurde untersucht, ob eine Verringerung des pH_i allein ausreichend ist, um die MAPK zu aktivieren. Wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, wurde die intrazelluläre Azidose durch eine 3-stündige Inkubation mit 40 mM Natriumlaktat und 200 μM DIDS in HEPES-Ringerlösung $\text{pH}_e = 7,4$ induziert. Abb. 19 stellt den Effekt einer intrazellulären Ansäuerung im Vergleich mit alleiniger Inkubation mit Natriumlaktat oder DIDS auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 dar.

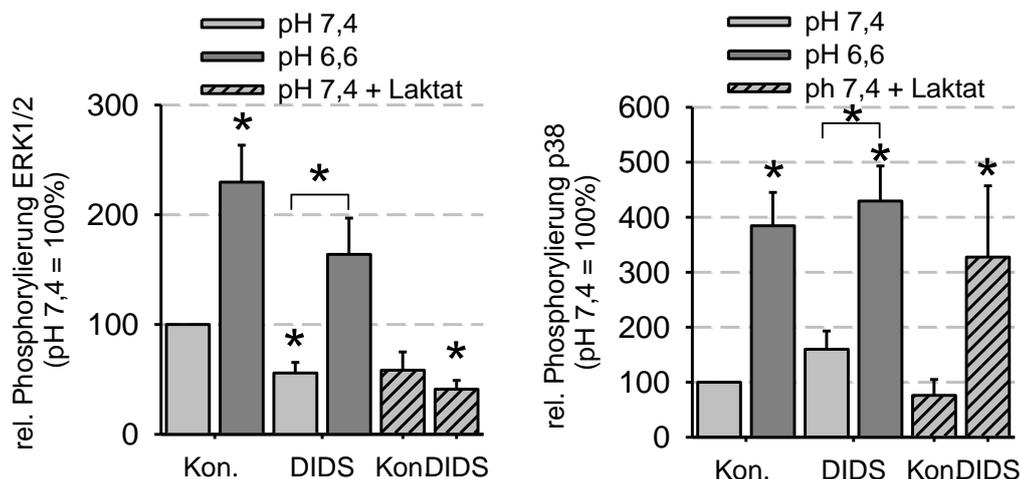


Abbildung 19 Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 in Abhängigkeit von extra- (pH 6,6) und intrazellulärer Ansäuerung (Laktat + DIDS) in AT-1-Zellen. Unter Kontrollbedingungen (Kon.) fehlen die Inhibitoren; $n = 6-10$.

Das Gesamtprotein der beiden MAPK blieb unter den verschiedenen Bedingungen unverändert, das heißt, es traten keine Änderungen der Expression der Kinasen auf. DIDS allein wirkt sich nicht auf die p38-Phosphorylierung aus, vermindert aber die Gesamtmenge an phosphoryliertem ERK1/2 und zwar unabhängig vom extrazellulären pH -Wert. Auf welchem Weg DIDS die Menge an phosphorylierten ERK1/2 reduziert, ist nicht bekannt. Da DIDS kovalent an die Oberfläche von Membranproteinen bindet und dadurch zur Inhibition des Anionentransports und z.T. zur Vernetzung der Transporter führt und da ERK1/2 oft assoziiert an Membranrezeptoren und Transportern vorliegt (30), sind zahlreiche Angriffspunkte in diesem Signalweg denkbar. Möglich ist z.B. eine verminderte oder fehlende Aktivierung der Rezeptoren

durch die kovalente Modifikation oder eine gestörte Signalübertragung durch Beeinträchtigung der lokalen Anordnung einzelner Komponenten des Signalwegs durch die Vernetzung mit DIDS. Die Inkubation mit 40 mM Natriumlaktat, das ähnlich wie DIDS nur zu einer sehr schwachen intrazellulären Ansäuerung führte (siehe Abb. 14), hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung und somit die Aktivität der MAPK. Simultane Gabe von Natriumlaktat und DIDS induzierte eine starke Aktivierung von p38, hatte aber keinen Einfluss auf ERK1/2. Somit war eine intrazelluläre Ansäuerung ausreichend, um den p38-Signalweg anzuschalten, nicht aber den von ERK1/2. Möglicherweise sind extrazelluläre Signale und kein Abfall des pH_i nötig, um eine vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 zu induzieren. Andererseits könnte auch ein pH_i -Grenzwert existieren, der bei der intrazellulären Ansäuerung nicht überschritten wurde (ΔpH_i bei extrazellulärer Azidose = 0,54 pH-Einheiten). Dafür sprechen die Ergebnisse von p38, welches nicht durch DIDS oder Natriumlaktat allein ($\Delta\text{pH}_i = 0,09$, bzw. 0,12 pH-Einheiten), aber durch DIDS und Natriumlaktat zusammen ($\Delta\text{pH}_i = 0,29$ pH) aktiviert werden konnte. Auch in einer Arbeit von Zheng et al. ist ein pH_i -Grenzwert für die Aktivierung von p38 bei intrazellulärer Azidose beschrieben (130). Eine mögliche Beteiligung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die als Sensoren von extrazellulären Protonen agieren, wird im nächsten Abschnitt erörtert.

3.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als pH-Sensoren

Aktuelle Arbeiten beschreiben Lysolipid-sensitive G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mittels Histidinresten als Sensor für den extrazellulären pH-Wert fungieren (52). Diese Rezeptoren können eine Vielzahl von Signalwegen über verschiedene heterotrimere G-Proteine aktivieren. Einige Mitglieder dieser Familie, wie z.B. GPR4 (G-protein coupled receptor 4), G2A (G2 accumulation) und TDAG8 (T cell death-associated gene 8), wirken als Onkogene und sind in zahlreichen humanen Tumorgeweben überexprimiert (131). Andere Mitglieder, wie z.B. OGR1 (ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1), unterdrücken bei Überexpression die Metastasenbildung von Prostatakarzinomen (132), können aber auch die Tumorgenese von Melanomzellen in OGR1-defizienten Mäusen fördern (133). OGR1 stimuliert unter sauren Bedingungen die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 in ASMC-Zellen (53) und wurde daher in AT-1-Zellen als Kandidat weiter untersucht.

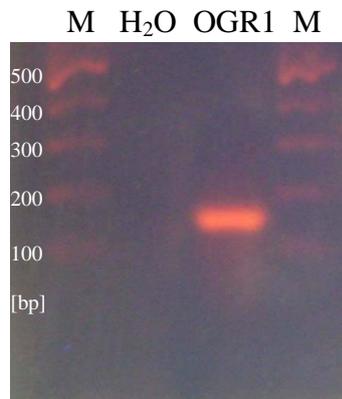


Abbildung 20 Nachweis der OGR1-Expression in AT-1-Zellen mittels PCR.

M ... Marker, H₂O = Negativkontrolle, erwartete Bande: 156 bp

Abbildung 20 zeigt die Expression des Rezeptors, nachgewiesen mittels PCR. Da ein pharmakologischer OGR1-Inhibitor bisher nicht identifiziert wurde, steht für die Hemmung von OGR1 lediglich Cu²⁺ im mM-Konzentrationsbereich zur Verfügung. Durch diese unspezifische Hemmung kann eine Beteiligung von OGR1 zwar nicht belegt, aber mit einiger Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Ungeachtet dessen können Nebeneffekte, auch die MAPK betreffend, auftreten. Erhöhte zelluläre Kupferkonzentrationen führen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Lipide, Proteine sowie Nukleinsäuren oxidativ schädigen (134). Zudem wirkt Kupfer auch durch direkte Bindung an Sulfhydrylgruppen von Proteinen mit anschließender Inaktivierung oder veränderter Konformation toxisch (135). ERK1/2 und p38 können in humanen Endothelzellen über den Angiotensin-Rezeptor Typ 1 bereits durch 0,1 µM CuSO₄ aktiviert werden (136). In der Arbeit von Gaitanaki et al. wurde eine vermehrte Phosphorylierung von p38 durch mikromolare CuCl₂-Konzentrationen ausgelöst (137). Bleibt die Behandlung mit Cu²⁺ aber ohne Auswirkungen auf die Azidose-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und p38, dann kann man davon ausgehen, dass der Protonensensor OGR1 keine Rolle bei diesem Prozess spielt. In Übereinstimmung mit den Beschreibungen aus der Literatur, löste Cu²⁺ in diesen Experimenten eine starke, pH-unabhängige Aktivierung von ERK1/2 und p38 aus (Abb. 21A). Die toxischen Effekte des Cu²⁺ zeigten sich in einer stark verringerten Vitalität der AT-1-Zellen (deutliche Abnahme des Zellproteins) und machten eine Verkürzung der Inkubationszeit von 3 h auf 1 h und eine Verringerung der CuCl₂-Konzentration nötig. Die Azidose-induzierte Aktivierung der MAPK ist mit und ohne CuSO₄ unverändert (Abb. 21B). Sowohl die Inkubation unter azidotischen Bedingungen allein (pH 6,6), als auch die mit

Kupfer (pH 6,6 + Cu²⁺) führten zu einer Verdopplung der Menge an phosphoryliertem ERK1/2 sowie an phosphoryliertem p38. Diese Daten sprechen gegen eine Beteiligung des Protonensensors OGR1 bei der Aktivierung von ERK1/2 und p38 in einem sauren Milieu.

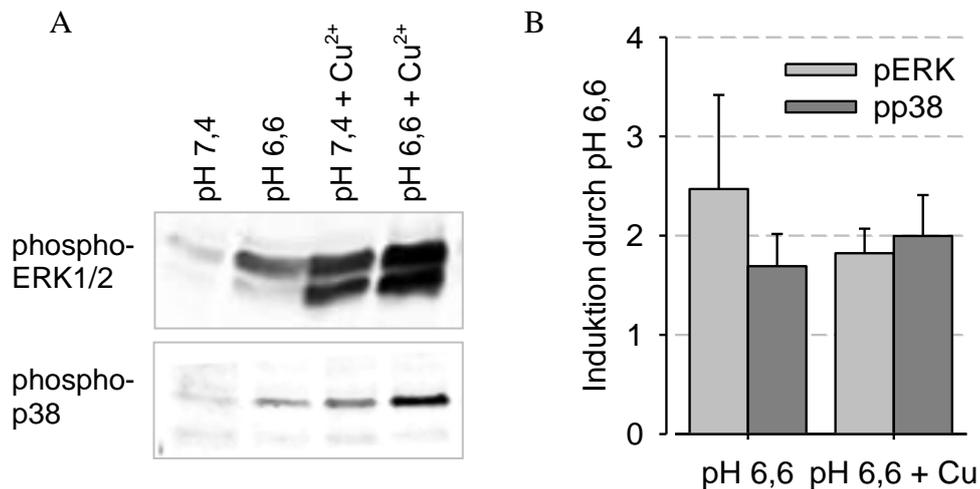


Abbildung 21 Einfluss von CuSO₄ auf die MAPK-Phosphorylierung. (A) Repräsentativer Westernblot und (B) semi-quantitative Auswertung der Westernblots, n = 3-4

3.4 Wege/Mechanismus der MAPK-Aktivierung

Um Mechanismus und beteiligte Signalwege der Azidose-vermittelten ERK1/2- und p38-Aktivierung aufzuklären, wurde untersucht, ob die erhöhte MAPK-Phosphorylierung Ergebnis einer verstärkten Aktivität von MAPK-Kinasen (3.4.1) oder einer verminderten Wirkung von Phosphatasen (3.4.2) war. Zudem wurden Signalwege abhängig vom epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Proteinkinase C (PKC) und A (PKA), der Src-Kinasenfamilie und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) hinsichtlich ihrer Beteiligung analysiert (3.5 - 3.7).

3.4.1 Einfluss der MAP-Kinase-Kinasen

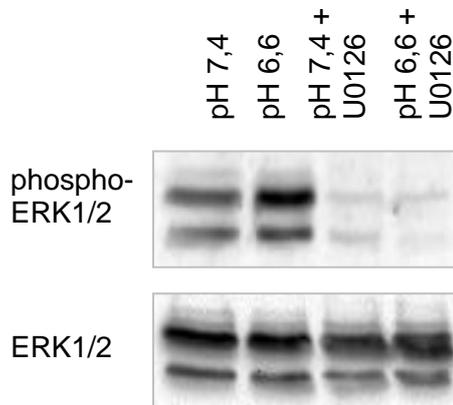


Abbildung 22 Einfluss der MEK1/2-Inhibition mit U0126 auf die ERK1/2-Phosphorylierung und das Gesamtprotein gezeigt in einem repräsentativem Westernblot.

Die MAP-Kinase-Kinasen MEK1 und MEK2 phosphorylieren und aktivieren dadurch ERK1/2. Sie wurden mit 10 μ M U0126 gehemmt und der Effekt auf die ERK1/2-Phosphorylierung im Westernblot untersucht (Abb. 22). Inhibition von MEK1/2 führte zu einer Reduktion an phosphoryliertem ERK1/2 unter Kontroll- (pH 7,4) und azidotischen Bedingungen (pH 6,6). Die Expression von ERK1/2, also die Gesamtmenge an Kinase im Westernblot, wurde nicht beeinflusst. Außerdem zeigte U0126 keine unspezifischen Effekte auf die p38-Phosphorylierung. Bei Hemmung von MEK1/2 traten keine Azidose-induzierten Effekte auf die ERK1/2-Phosphorylierung auf. Daraus lässt sich schließen, dass MEK1 und 2 entscheidend für die Aktivierung von ERK1/2 durch Azidose sind. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, hängt die Azidose-induzierte Aktivierung von p38 von deren MAPK-Kinasen MKK3 und 6 ab. Die Arbeitsgruppe um O. Thews konnte zeigen, dass mit sinkendem pH-Wert, die Aktivität von MKK3/6 steigt (25) und es ist bekannt, dass p38 selbst nicht pH-empfindlich ist (130).

3.4.2 Einfluss von Phosphatasen

Die Aktivität der MAPK wird in der Zelle strikt überwacht und durch das Verhältnis von MAP-Kinase-Kinasen und Phosphatasen reguliert. Dephosphorylierung des Phospho-Threonin oder Phospho-Tyrosin, gelegen in der Aktivierungsschleife der MAPK, führt zu einem Aktivitätsverlust und kann durch Phosphatasen spezifisch für Tyrosin, Serin/Threonin oder beidem (dual-spezifische Phosphatasen) bewerkstelligt werden. Serin-/Threonin-Phosphatasen können durch Okadasäure gehemmt werden, während Tyrosin-Phosphatasen empfindlich gegenüber Orthovanadat sind. Okadasäure

inhibiert stark die Proteinphosphatase (PP) 2A ($IC_{50} = 1 \text{ nM}$), schwächer PP1 ($IC_{50} = 0,1 - 0,5 \text{ }\mu\text{M}$) und am schwächsten PP2B ($IC_{50} = 4 - 5 \text{ }\mu\text{M}$) (138). Natriumorthovanadat wirkt wie ein Phosphat analogon und inhibiert neben Ser/Thr-Phosphatasen auch die alkalische Phosphatase und eine Vielzahl von ATPasen. Es wird in einem μM -Konzentrationsbereich eingesetzt (139). Wenn die erhöhte Menge an phosphorylierten MAPK bei Azidose durch eine verminderte Wirkung der Phosphatasen ausgelöst würde, dürfte bei Hemmung der Phosphatasen unter sauren Bedingungen (pH 6,6) keine weitere Steigerung der MAPK-Phosphorylierung auftreten. Unter Kontrollbedingungen (pH 7,4) erhöhte sich die Menge an phosphorylierten ERK1/2 und p38 deutlich, wenn ihre Dephosphorylierung gehemmt war (Abb. 23).

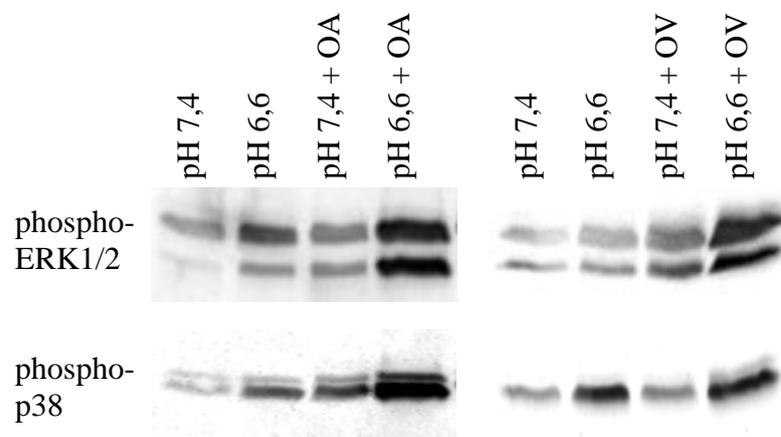


Abbildung 23 Einfluss der Hemmung von Ser/Thr-Phosphatasen mit Okadasäure (OA) und der Tyr-Phosphatasen mit Orthovanadat (OV) auf die ERK1/2- und p38-Phosphorylierung. Gezeigt sind repräsentative Westernblots.

Die Gesamtproteinmenge beider Kinasen blieb unverändert. Bei Azidose stieg die Menge an Phosphoprotein noch weiter an, ein Effekt für den die Phosphatasen nicht verantwortlich sein konnten. Das Ausmaß des Azidose-induzierten Effekts unterschied sich nicht bei An- oder Abwesenheit der Inhibitoren. Daher kann ein verändertes Ausmaß an MAPK-Dephosphorylierung durch Phosphatasen als Quelle für ihre gesteigerte Aktivität in einem sauren Milieu ausgeschlossen werden. Zusammenfassend konnte erwiesen werden, dass die Azidose-induzierte Aktivierung von ERK1/2 und p38 abhängig von ihren MAP-Kinase-Kinasen, aber unabhängig von Phosphatasenaktivität war.

3.5 Beteiligung anderer Signalwege

Da der MAP-Kinase-Signalweg von zentraler Bedeutung für die Regulation zentraler Prozesse, wie z.B. Embryogenese, Proliferation, Differenzierung und Apoptose ist, gibt es zahlreiche weitere Signalwege, die mit ihm interagieren. Verschiedene Kandidaten, die sowohl den MAPK-Signalweg aktivieren als auch in Zusammenhang mit Tumoren beschrieben sind, wurden ausgewählt, pharmakologisch gehemmt und der Effekt auf die Aktivierung von ERK1/2 und p38 mittels Westernblot untersucht. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht der untersuchten Signalmoleküle, darunter EGFR, PKC und PKA, die Src-Kinasenfamilie sowie PI3K. Der Effekt einer Azidose (pH 6,6) auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 und p38 mit und ohne Inhibitor ist dargestellt. Um mögliche Eigeneffekte der Hemmer zu berücksichtigen, wurden diese auch unter Kontrollbedingungen zugegeben (pH 7,4 + Inhibitor). Die Azidose-induzierte Aktivierung von ERK1/2 und p38 wurde durch eine Inhibition des EGF-Rezeptors mit 100 nM AG 1478 nicht beeinflusst (Tab. 8).

Tabelle 8 Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 in Abhängigkeit verschiedener Inhibitoren und Azidose. Semi-quantitative Auswertung von Westernblots (pH 7,4 = 100%), angegeben ist der Mittelwert \pm Standardfehler, n = 4-13.

Inhibitor		AG 1478	Bisindolylmaleimid 1	R _p -cAMPS	PP2	LY 294002
Ziel		EGFR	PKC	PKA	Src-Familie	PI3K
pERK1/2	pH 6,6	411 \pm 133	397 \pm 105	329 \pm 31	344 \pm 29	765 \pm 219
	pH 7,4 + Inhib.	198 \pm 40	190 \pm 53	108 \pm 21	123 \pm 15	71 \pm 7
	pH 6,6 + Inhib.	475 \pm 133	330 \pm 53	273 \pm 66	364 \pm 113	873 \pm 378
phospho-p38	pH 6,6	389 \pm 72	330 \pm 55	557 \pm 107	404 \pm 35	412 \pm 72
	pH 7,4 + Inhib.	125 \pm 27	137 \pm 24	124 \pm 29	104 \pm 23	164 \pm 42
	pH 6,6 + Inhib.	649 \pm 72	273 \pm 43	762 \pm 203	337 \pm 65	516 \pm 123

Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung der MAPK nicht über den EGFR läuft. Ebenso verhält es sich mit der PKC, die durch 100 nM BIM gehemmt wurde. Unter Kontrollbedingungen (pH 7,4) wurde mit beiden Inhibitoren ein leichter Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet, der aber nicht statistisch signifikant war. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde zusätzlich eine höhere Konzentration von 1 μ M AG 1478 oder Bim eingesetzt. Auch unter diesen Bedingungen konnte eine Abhängigkeit vom EGFR oder von der PKC ausgeschlossen werden. Hemmung der PKA mit 50 μ M R_p-cAMPS zeigte, dass die PKA ebenso nicht an der vermehrten Phosphorylierung der MAPK bei Azidose beteiligt ist. Allerdings konnte festgestellt werden, dass der PKA-Signalweg eng mit dem ERK1/2-Signalweg verknüpft ist. Membran-gängiges Dibutyryl-cAMP oder die Stimulation der endogenen cAMP-Produktion durch Forskolin können die ERK1/2-Aktivität entweder über PKA oder über EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) beeinflussen. Geht der Signalweg über EPAC wird über B-Raf ERK1/2 aktiviert (82), bei einer Beteiligung von PKA kann ERK1/2 entweder über B-Raf aktiviert oder über Raf-1 inhibiert werden (87). Die Inkubation mit 300 μ M Dibutyryl-cAMP reduzierte die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 stark unter Kontroll- und sauren Bedingungen (Abb. 24).

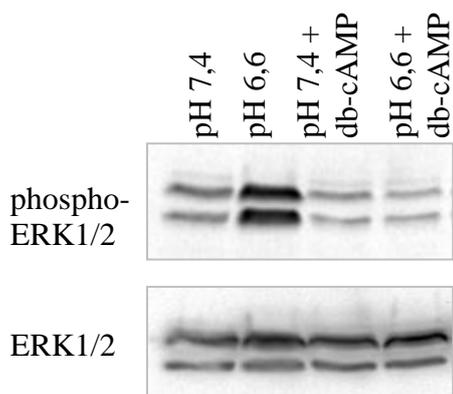


Abbildung 24 cAMP-induzierte Effekte auf die ERK1/2-Phosphorylierung unter Kontroll- (pH 7,4) und azidotischen Bedingungen (pH 6,6)

Es waren keine Azidose-induzierten Effekte mehr zu beobachten. Diese Ergebnisse konnten mit Forskolin (3 μ M) bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Da eine gesteigerte Menge an cAMP zu einer starken Hemmung der ERK1/2-Aktivierung führte, erfolgt die Interaktion beider Signalwege höchstwahrscheinlich über PKA und Raf-1. Verändertes PKA-Signalling war also nicht verantwortlich für die Phosphorylierung von ERK1/2 bei Azidose. Dennoch sind beide Signalwege eng

miteinander verknüpft, insofern als der PKA-Signalweg inhibitorisch auf die ERK1/2-Kaskade wirkt. Eine Inhibition der Src-Kinasefamilie mit 100 nM PP2 hatte keinen Einfluss auf die MAPK-Phosphorylierung bei pH 7,4 oder pH 6,6. Diese Ergebnisse wurden auch mit einer höheren Konzentration von 1 μ M bestätigt und schließen eine Beteiligung der Src-Kinasefamilie bei der Aktivierung von ERK1/2 oder p38 aus.

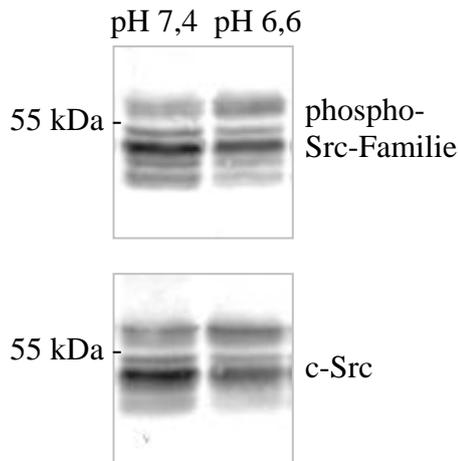


Abbildung 25 Repräsentativer Westernblot für phosphoryliertes und Gesamt-Src unter Kontroll- (pH 7,4) und sauren Bedingungen (pH 6,6) von AT-1-Zellen.

Abb. 25 zeigt Gesamt- und phosphoryliertes (Tyr416), also aktiviertes Src unter Kontroll- (pH 7,4) und sauren (pH 6,6) Bedingungen. Beide Antikörper können mit den anderen Familienmitgliedern (Lyn, Fyn, Yes, Lck, Blk, Hck) kreuzreagieren. Da diese auch ein ähnliches Molekulargewicht besitzen, ist eine Unterscheidung im Westernblot nicht möglich. Azidose-vermittelte Effekte, untersucht mit Antikörpern gegen phospho- und Gesamt-Src, waren weniger deutlich als bei den MAPK. Die prominenteste Bande unter 55 kDa wurde bei pH 6,6 sogar schwächer. Diese Veränderung traf sowohl für phosphorylierte Src- als auch Gesamt-Src-Kinasefamilienmitglieder zu und deutet daher auf Veränderungen der Expression hin. Ob die PI3K die Azidose-induzierte Aktivierung von ERK1/2 und p38 vermittelt, wurde mit ihrem Hemmer LY294002 (10 μ M) analysiert und konnte ausgeschlossen werden, da die MAPK-Phosphorylierung weder unter Kontroll- noch unter azidotischen Bedingungen signifikant verändert war (Tab. 8). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass keiner der untersuchten Signalwege wesentlich an der MAPK-Aktivierung durch Azidose beteiligt ist.

3.6 Na^+/K^+ -ATPase und Zellvolumen

Ein anderer möglicher Mechanismus der zur Aktivierung der MAPK beitragen kann, ist das Zellvolumen. Veränderungen des Zellvolumens können den Phosphorylierungsstatus einer Vielzahl von Proteinen wie Tyrosinkinasen, PKC, Adenylylcyclase, WNK (with no K kinases) und MAPK beeinflussen (140). Bei extrazellulärer Azidose (pH 6,6) sank das Zellvolumen der AT-1-Zellen bereits nach 10 min, nach 180 min hatte es sich auf 87% verglichen mit pH 7,4 verringert (Abb. 26).

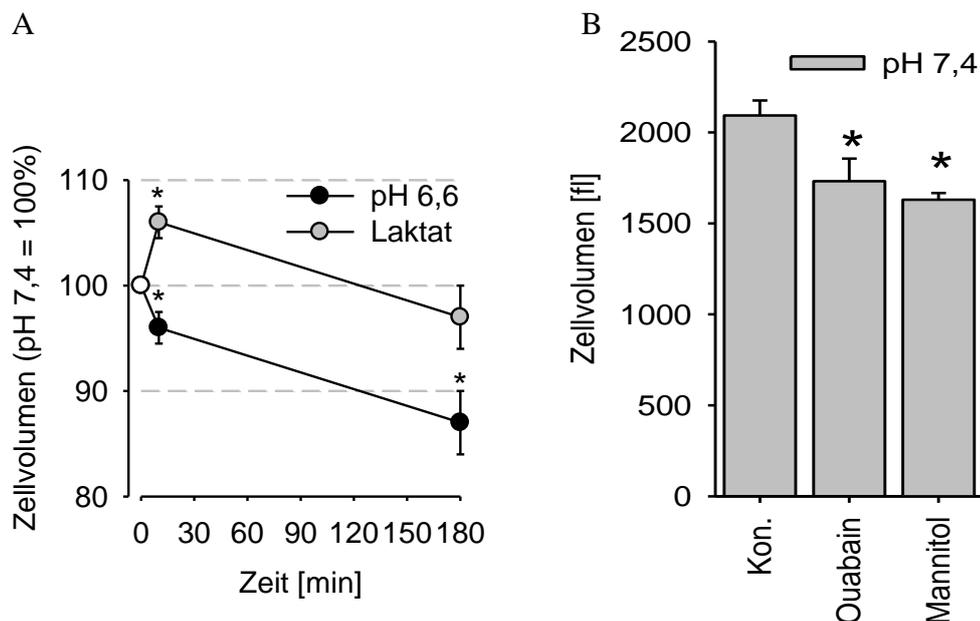


Abbildung 26 (A) Einfluss der extra- und intrazellulären Azidose auf das Zellvolumen von AT-1-Zellen bei Kurzzeit- (10 min) und Langzeit- (180 min) Inkubation, $n = 5-8$ sowie (B) Änderungen des Zellvolumens durch Ouabain- oder Mannitolinkubation für 180 min, $n = 3-7$

Eine transiente intrazelluläre Azidose wurde durch Inkubation mit Natriumlaktat ausgelöst. Milchsäure kann in seiner ungeladenen Form über die Zellmembran in die Zellen diffundieren, wo sie anschließend dissoziiert und eine Anreicherung von Protonen und Laktat stattfindet. Die erhöhte Osmolarität führt dann zu einem Einstrom von Wasser und zum Anschwellen der Zellen. Die Inkubation mit Natriumlaktat führte zu einer Zellvolumenzunahme nach 10 min. Diese war aufgrund von vorhandenen Regulationsmechanismen, z.B. durch verschiedene Transporter, transient. Die Veränderungen des Zellvolumens korrelieren mit dem Verlauf des intrazellulären pH-Wertes. Extrazelluläre Azidose löste eine stabile intrazelluläre Ansäuerung und eine anhaltende Reduktion des Zellvolumens aus, wohingegen eine gezielte intrazelluläre

Ansäuerung mit Natriumlaktat zu transienten Effekten auf den pH_i und das Zellvolumen führte. Verantwortlich für die Regulation des Zellvolumens ist unter anderem die Na^+/K^+ -ATPase. Deren Aktivität ist unter azidotischen Bedingungen vermindert (141) und sie kann durch Ouabain gehemmt werden. Die Isoformen von Nagern sind allerdings deutlich weniger sensitiv gegenüber Ouabain als zum Beispiel humane Isoformen (142). Sowohl pH 6,6 als auch die Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase mit 100 μM Ouabain reduzierten das Zellvolumen (Abb. 25). Daher könnte die verminderte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase im Säuren verantwortlich für das verminderte Zellvolumen sein. Ob eine reduzierte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase Einfluss auf die MAPK hat, wurde mittels Westernblot untersucht (Abb. 27).

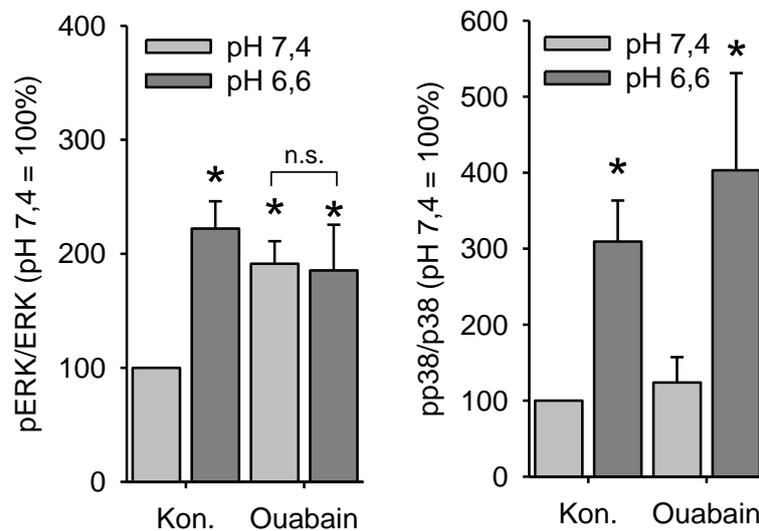


Abbildung 27 Einfluss der Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38. Semi-quantitative Analyse von Westernblots ($n = 7-11$); das Verhältnis von phosphoryliertem zu gesamtem Protein ist dargestellt. Kon...Kontrolle

Die Anwesenheit von Ouabain bei einem pH -Wert von 7,4 führte zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK1/2 - vergleichbar mit der Steigerung unter azidotischen Bedingungen ohne Inhibitor. Bei einem pH -Wert von 6,6 plus Hemmer konnte kein weiterer Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet werden. Somit könnte die Na^+/K^+ -ATPase an der Azidose-vermittelten ERK1/2-Aktivierung beteiligt sein. Die Menge an phospho-p38 blieb bei Inkubation mit Ouabain unverändert, so dass eine Beteiligung der Na^+/K^+ -ATPase an der Aktivierung von p38 ausgeschlossen werden

kann. Die beobachteten Effekte auf ERK1/2 beruhten nicht allein auf einer Änderung des Zellvolumens. Wurde dieses durch Zugabe von 30 mM Mannitol reduziert (Abb. 26B), zeigte sich kein Effekt auf die ERK1/2-Phosphorylierung. Auch Änderungen des Membranpotentials durch Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase konnten ausgeschlossen werden, denn eine Inkubation mit 10 mM KCl beeinflusste die Phosphorylierung von ERK1/2 ebenso wenig. Eine andere mögliche Ursache sind Konzentrationsänderungen des intrazellulären Natriums und infolgedessen des Calciums (143). Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei AT-1-Zellen sind bereits beschrieben (25). Allerdings wurde eine Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beobachtet, was eine Calcium-vermittelte ERK1/2-Aktivierung unwahrscheinlich macht. Ein weiterer beschriebener Mechanismus, wie die Na^+/K^+ -ATPase an der Signaltransduktion beteiligt sein kann, verläuft über c-Src und eine Transaktivierung des EGFR (144). Deren Beteiligung konnte allerdings in 3.5 ausgeschlossen werden. Gegen eine allgemeine Beteiligung der Na^+/K^+ -ATPase bei der Azidose-induzierten ERK1/2-Aktivierung sprechen die bei anderen Zelllinien erhaltenen Daten zum Zellvolumen (Abb. 28).

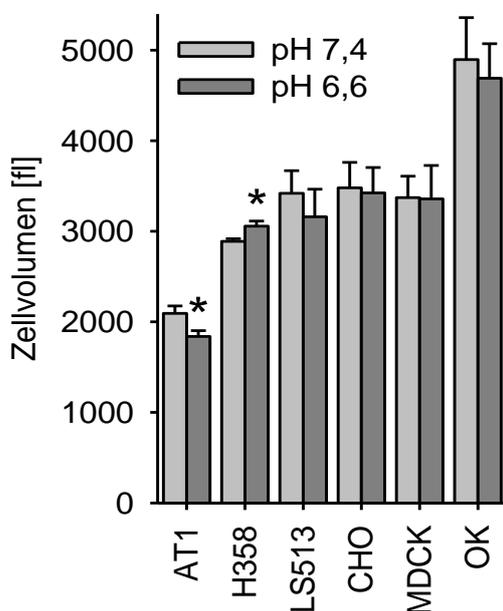


Abbildung 28 Azidose-induzierte Zellvolumenänderungen bei Zelllinien isoliert aus Tumor- (AT1, H358, LS513) und Normalgewebe (CHO, MDCK, OK), n = 6-10

Die Mehrzahl der untersuchten Zelllinien zeigte nach Azidose kein verändertes Zellvolumen. Es bestand keine Korrelation zwischen der verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 bei einem pH-Wert von 6,6 und einer Reduktion des Zellvolumens.

3.7 Bedeutung von Sauerstoffradikalen (ROS)

Viele Tumorzellen zeigen ein Redoxungleichgewicht hervorgerufen durch oxidativen Stress (145). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind an der Krebsentstehung und Tumormalignität beteiligt (146;147). Sie aktivieren verschiedene Signalwege, darunter auch die ERK1/2- und p38-Signalkaskade (145;148;149) und könnten daher die Azidose-induzierten Effekte vermitteln. Änderungen der ROS-Konzentration in AT-1-Zellen wurden durch den Fluoreszenzfarbstoff DCF-DA-AM untersucht. Eine 3-stündige extra- (pH 6,6) oder intrazelluläre Azidose (pH 7,4 plus Laktat und DIDS) führten zu einer vermehrten Produktion von ROS (Abb. 29).

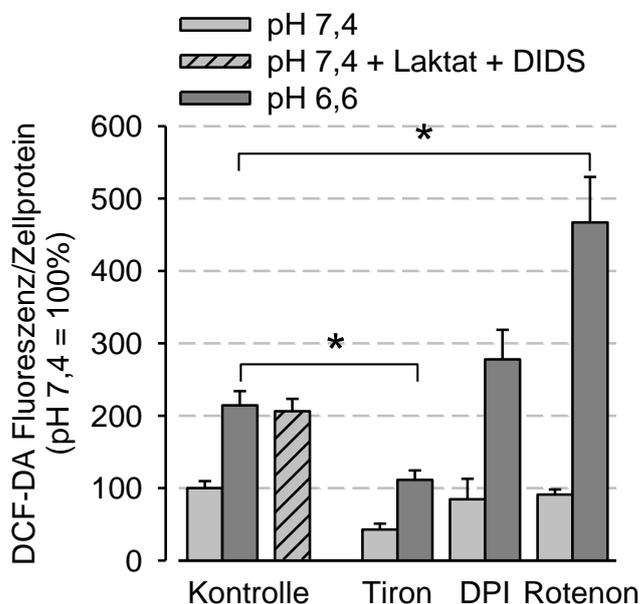


Abbildung 29 ROS-Bildung in Abhängigkeit von extra- und intrazellulärer Azidose, sowie von Flavoproteinen (DPI) und dem mitochondrialen Komplex I (Rotenon), n = 9-12

Mit dem Radikalfänger Tiron konnte die ROS-Konzentration deutlich verringert werden. Um die ROS-Quelle zu bestimmen, wurden einmal Flavoproteine wie die NO-Synthase oder die NADPH-Oxidase mit Diphenyleiodoniumchlorid (DPI) inhibiert. Zum anderen wurde der Komplex I der Atmungskette mit Hilfe von Rotenon gehemmt. Inhibition der Flavoproteine änderte die ROS-Konzentration nicht statistisch signifikant. Bei Hemmung des mitochondrialen Komplexes I wurde allerdings deutlich mehr ROS bei pH 6,6 produziert. Mit dem für die Mitochondrien spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoSox konnte die gesteigerte ROS-Produktion bei pH 6,6 und Rotenon bestätigt werden. Die Ergebnisse deuten auf eine gesteigerte ROS-Produktion in den Mitochondrien hin. Der Anstieg der ROS-Menge nach Rotenongabe ist ein typisches

Merkmal der ROS-Bildung in Komplex I, hervorgerufen durch ein gesteigertes Verhältnis von NADH zu NAD⁺ (150). Eine gesteigerte Aktivität der Mitochondrien, gemessen durch die Potenzial-abhängige Akkumulation von Rhodamin-123, wurde in der Literatur nicht beobachtet (166). Der Effekt von ROS auf die MAPK wurde mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an H₂O₂ im Westernblot untersucht (Abb. 30).

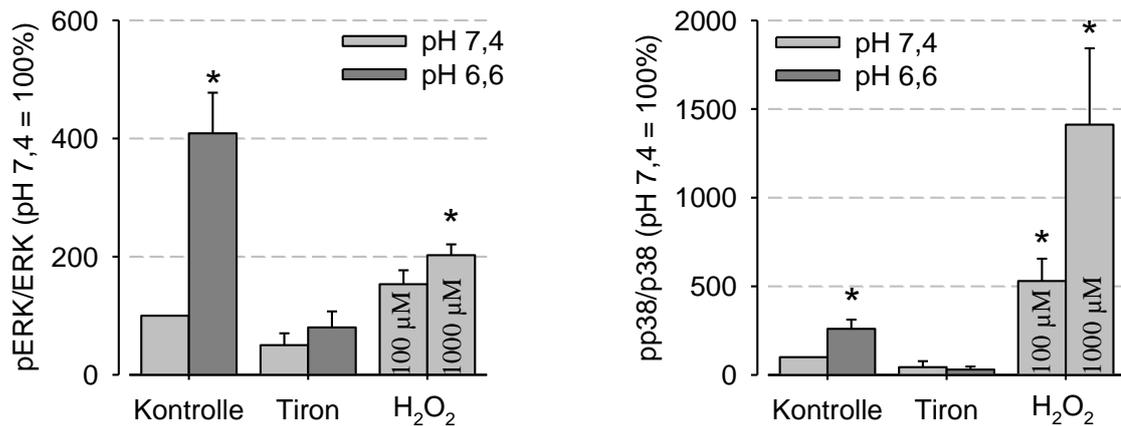


Abbildung 30 Abhängigkeit der ERK1/2- und p38-Phosphorylierung von ROS. Semi-quantitative Auswertung von Westernblots; n = 9-14.

H₂O₂ führte zu einer Dosis-abhängigen, vermehrten Phosphorylierung von p38. ERK1/2 wurde schwächer und nur bei höheren Konzentrationen aktiviert. Eine Reduktion der Radikalmenge durch Inkubation mit Tiron verhinderte die Aktivierung von ERK1/2 und p38. Somit scheint die Azidose-induzierte ROS-Bildung zu der Aktivierung von ERK1/2 und p38 zu führen. Dass die ROS-Produktion der MAPK-Aktivierung vorgelagert sein muss, zeigte sich bei Hemmung der MAPK mit U0126 oder SB203580, die zu keiner verminderten ROS-Produktion führte (Abb. 31).

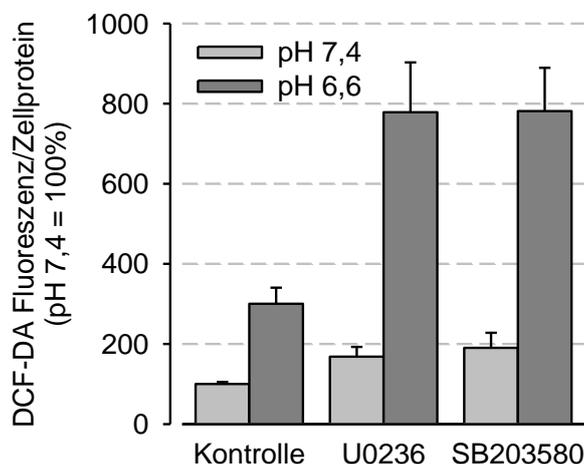


Abbildung 31 Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Abhängigkeit von ERK1/2 (U0126) und p38 (SB203580), n = 3

3.8 Einfluss von Azidose auf die Zellviabilität

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Azidose die Chemoresistenz der AT-1-Zellen *in vitro* und *in vivo* fördert (24). Nun wurden mögliche Effekte auf die Zellviabilität, die Proliferation sowie auf die Invasivität der Tumorzellen untersucht. Die Zellviabilität wurde durch Bestimmung des Zellproteins, über die Caspase-3-Aktivität (Apoptose) sowie die Freisetzung von LDH (Nekrose) bestimmt. Azidose (pH 6,6) führte zu keiner Beeinflussung des Zellproteins und induzierte keinen Zelltod über Apoptose oder Nekrose (Abb. 32).

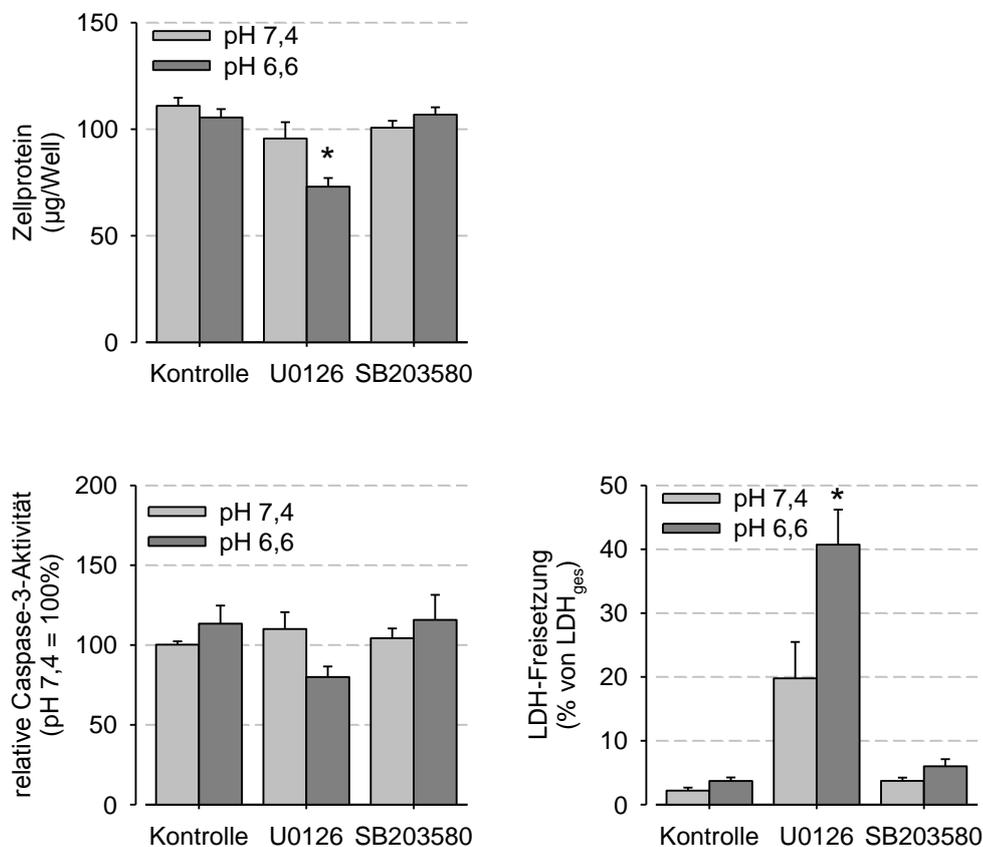


Abbildung 32 Zellprotein, Apoptose (Caspase-3-Aktivität) und Nekrose (LDH-Freisetzung) in Abhängigkeit vom extrazellulären pH sowie ERK1/2 (U0126) und p38 (SB203580), n = 12-18

Durch Hemmung des ERK1/2-Signalwegs mit U0126 und der p38-Signalkaskade mit SB203580 wurde analysiert, ob ihre Aktivierung bei Azidose von Bedeutung für die Zellviabilität ist. Inhibierung von p38 führte zu keiner Abnahme des Zellproteins und keinen Veränderungen der Caspase-3-Aktivität oder der LDH-Freisetzung, weder unter Kontrollbedingungen noch bei Azidose. Die Hemmung der Phosphorylierung von

ERK1/2 reduzierte im Kontrast dazu das Zellprotein bei pH 6,6 deutlich. Diese Abnahme der Zellviabilität beruhte nicht auf einer Induktion von Apoptose, denn die Caspase-3-Aktivität blieb unverändert. Der erhöhte Zelltod beruhte auf einer Steigerung von Nekrose, die sich in einem starken Anstieg der LDH-Freisetzung widerspiegelte. Dass die Inhibition der ERK1/2-Signalkaskade bei Azidose zu nekrotischem Zelltod führte, zeigt die Wichtigkeit des ERK1/2-Signalweg bei der Aufrechterhaltung der Zellviabilität unter sauren Bedingungen.

3.9 Effekt der Azidose auf die Zellproliferation

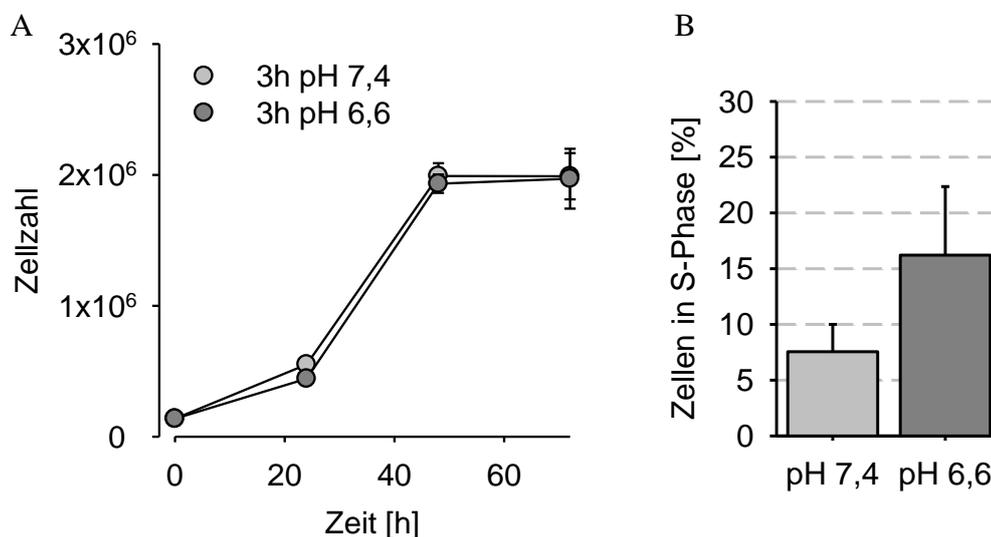


Abbildung 33 Zellproliferation und Azidose. (A) Wachstumskurven nach 3-stündiger Inkubation bei pH 7,4/6,6 zum Zeitpunkt $t = 0$, $n = 6$ sowie (B) Zellen in der S-Phase des Zellzyklus ermittelt mittels Durchflusszytometrie, $n = 6$

Neben kurzfristigen Effekten auf die Vitalität könnten auch langfristige Effekte durch Azidose ausgelöst werden, z.B. auf die Zellproliferation. Nach einer 3-stündigen Inkubation mit Ringerlösungen pH 7,4 oder pH 6,6 (bei Zeitpunkt $t = 0$ h) wurden die Zellen auf RPMI ohne Serum überführt und ihre Zellzahl nach 24, 48 und 72 h bestimmt. Die erhaltene Wachstumskurve (Abb. 33A) zeigt keine Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Zellen. Somit beeinflusste die Azidose nicht das allgemeine Wachstumsverhalten der Zellen. Diese Ergebnisse stimmten gut überein mit einer Analyse des Zellzyklus mittels Propidiumiodid. Wurde der DNA-Gehalt der Zellen nach 3-stündiger Inkubation (pH 7,4 oder pH 6,6) untersucht, um die Anzahl der

Zellen in der S-Phase zu bestimmen, ergaben sich ebenfalls keine statistisch relevanten Veränderungen (Abb. 33B).

3.10 Azidose und Metabolismus

Viele Tumorzellen zeigen einen stark veränderten Metabolismus resultierend aus genetischen Veränderungen und den besonderen Eigenschaften des Tumormikromilieus. So tritt z.B. eine Verschiebung zu Glykolyse und Milchsäuregärung, d.h. vermehrter Glukoseverbrauch und Laktatproduktion trotz ausreichender Sauerstoffversorgung (Warburg-Effekt) auf. Vorversuche hatten gezeigt, dass AT-1-Zellen ihren Energiebedarf hauptsächlich durch Glykolyse abdecken und zwar unabhängig von der Sauerstoffkonzentration, denn selbst unter hypoxischen Bedingungen ($[O_2] < 1\%$) änderte sich der Glukoseverbrauch nicht signifikant. Unter azidotischen Bedingungen verringerten die Zellen deutlich ihren Glukoseverbrauch und die damit verbundene Laktatproduktion (Abb. 34).

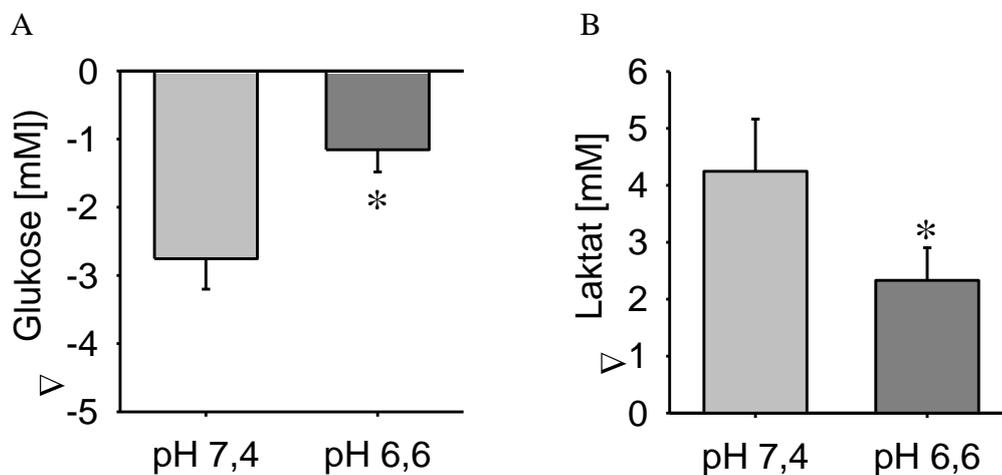


Abbildung 34 Effekt von Azidose auf den Glukoseverbrauch (A) und die Laktatbildung (B) in AT-1-Zellen nach 3-stündiger Inkubation, n = 10

Um eine Beteiligung der ERK1/2- oder p38-Signalwege zu untersuchen, wurden diese gehemmt und die Änderungen der Laktatproduktion untersucht (Abb. 35).

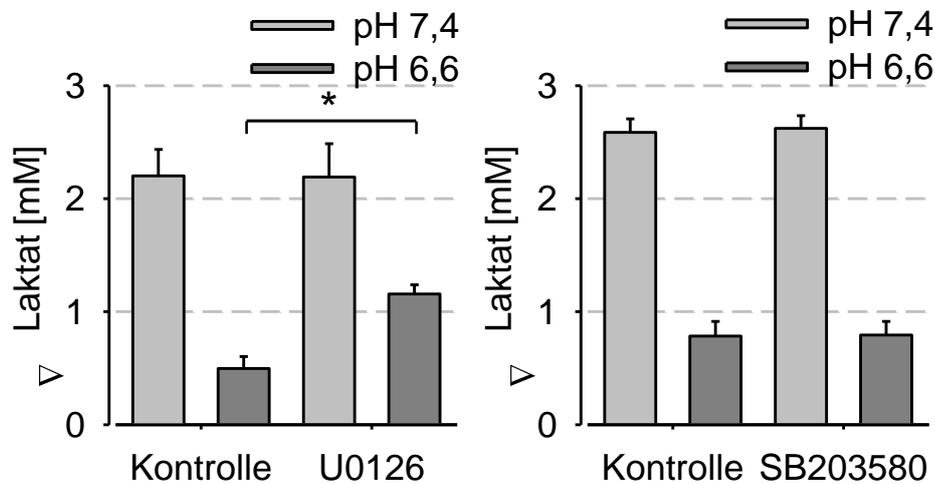


Abbildung 35 Laktatbildung in Abhängigkeit von ERK1/2 (U0126) und p38 (SB203580), n = 6-9

Dabei stellte sich heraus, dass p38 (SB203580) nicht an Änderungen des Metabolismus beteiligt war. Im Gegensatz dazu wurde die Laktatproduktion bei pH 6,6 gesteigert, wenn die Phosphorylierung von ERK1/2 durch U0126 gehemmt war. Allerdings wurden die Ausgangswerte (pH 7,4) nicht erreicht, so dass neben ERK1/2 auch noch andere Signalwege diese Veränderungen des Metabolismus bei Azidose bewirkten. Neben den MAPK wurde auch noch der Effekt von DIDS auf den Metabolismus untersucht (Abb. 36). Inkubation mit DIDS verringerte die Laktatproduktion unabhängig vom extrazellulären pH-Wert. Eine mögliche Ursache für die verminderte Laktatproduktion ist die durch DIDS ausgelöste intrazelluläre Ansäuerung (3.1.3). Diese war vor allem bei pH 7,4 ausgeprägt und bei pH 6,6 nur tendenziell zu erkennen. Dementsprechend sank die Laktatproduktion bei pH 7,4 mit DIDS stark und bei pH 6,6 nur schwach, aber statistisch signifikant. Eine andere mögliche Ursache ist die Hemmung des Monocarboxylattransports durch DIDS (151). Diese Hemmung des Laktattransports würde zu weniger messbarem Laktat im Medium und zu einer Anreicherung von Laktat in der Zelle, mit nachfolgend reduzierter Laktatbildung, führen. Die Angaben in der Literatur zur dafür benötigten DIDS-Konzentration schwanken stark. In Makrophagen konnte der Laktattransport mit 200 μM DIDS nicht gehemmt werden (152), aber in einer Arbeit von Poole und Halestrap (151) reichten bereits 100 μM DIDS um etwa 50% des Laktattransports in Erythrozyten zu hemmen.

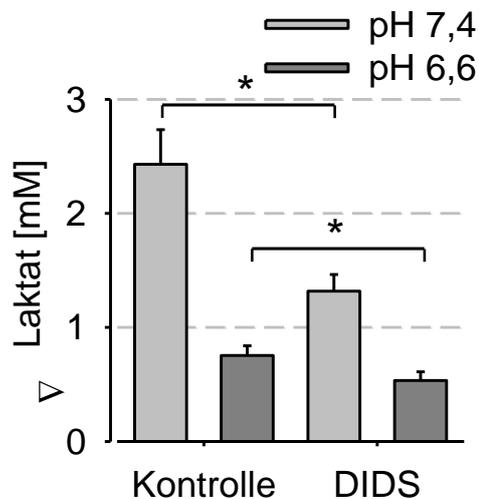


Abbildung 36 Laktatbildung unter Hemmung des Anionenaustauschs durch DIDS bei pH 7,4 und pH 6,6. n = 12

Als Richtwert für die Inhibition des Monocarboxylattransports mit DIDS werden in der zuletzt genannten Veröffentlichung 0,5-1 mM DIDS genannt, sodass die hier verwendete DIDS-Konzentration deutlich darunter liegt, aber ein Effekt nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Zusammenfassend führt Azidose zu Änderungen des Glukoseverbrauchs und der damit zusammenhängenden Laktatproduktion. Diese Effekte waren abhängig von der Aktivität von ERK1/2 und sensitiv gegenüber DIDS.

3.11 Beeinflussung der Zellmotilität durch Azidose

Die Fähigkeit einer Krebszelle zu metastasieren, korreliert mit ihrer Fähigkeit zur Migration. Migration beinhaltet die Bildung und Auflösung von Adhäsionskontakten, Kontrolle der Zytoskelettdynamik, Verdau und Reorganisation der extrazellulären Matrix sowie lokaler Ionen- und Wassertransport über die Plasmamembran (103). Diese Prozesse sind abhängig vom intra- und extrazellulären pH-Wert. Um die Zellmotilität bei den verschiedenen pH-Werten zu untersuchen, wurden von den AT-1-Zellen die migratorische Geschwindigkeit und der Strukturindex als Marker der Zellmorphologie mittels Videomikroskopie bestimmt. Die Zellen bewegten sich bei einem pH-Wert von 7,4 um 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$. Bei pH 6,6 stieg dieser Wert auf 0,63 $\mu\text{m}/\text{min}$ an. Somit führte Azidose zu einer gesteigerten Motilität der Zellen, die in Abbildung 37A prozentuell dargestellt ist. Zudem veränderte sich die Zellmorphologie im Sauren (Abb. 37B). Der Strukturindex sank, das heißt die Zellformen wurden mehr spindelförmig/dendritisch.

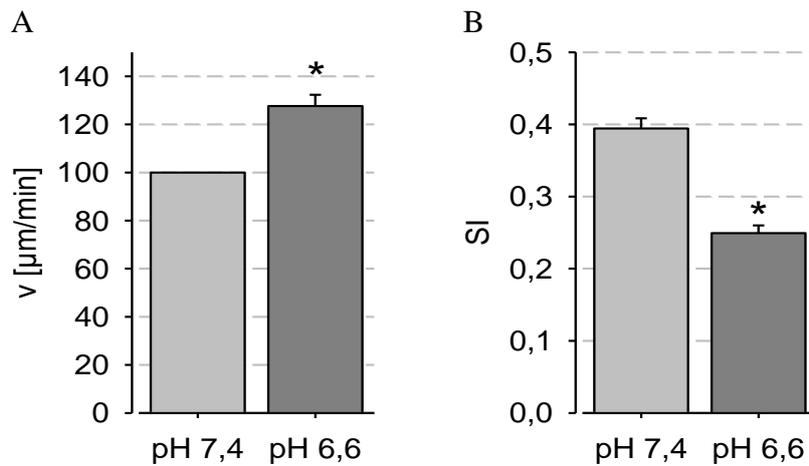


Abbildung 37 (A) Migratorische Geschwindigkeit und (B) Morphologie (Strukturindex) in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert. Die Daten wurden durch Videomikroskopie mit anschließender Bestimmung von zurückgelegter Strecke (ungerichteten Bewegung), Umfang und Fläche der Zellen erhalten. n = 35

Eine prinzipielle Beteiligung des ERK1/2- und des p38-Signalwegs an der Migration von Zellen ist bekannt (38). Daher wurde untersucht, ob ihre veränderte Aktivität auch für die Azidose-induzierte Steigerung der Motilität verantwortlich war (Abb. 38).

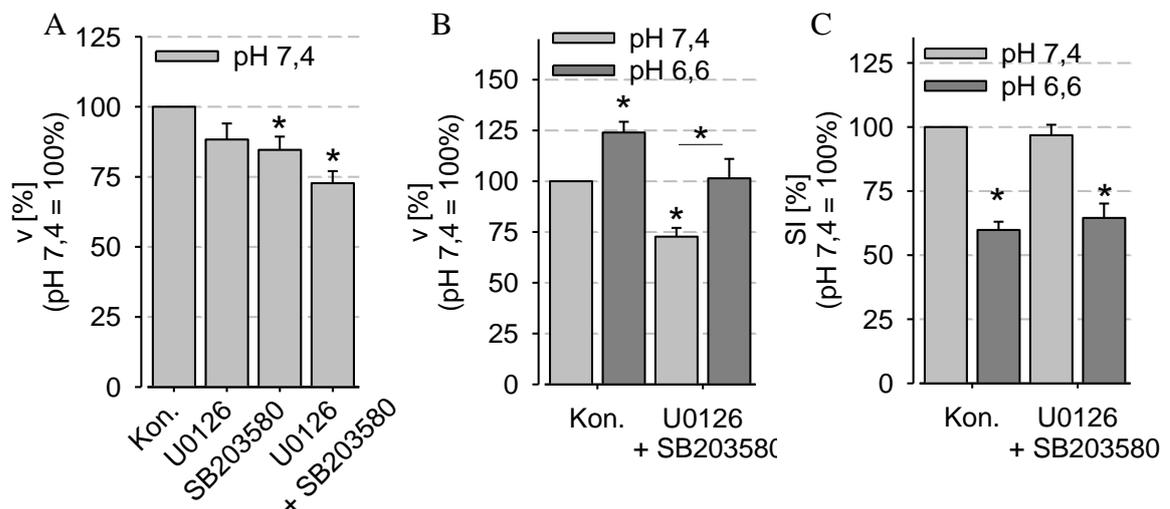


Abbildung 38 Migration in Abhängigkeit von ERK1/2 und p38. (A) Einfluss von ERK1/2 (U0126) und p38 (SB203580) auf die Motilität der AT-1-Zellen unter Kontrollbedingungen (pH 7,4), n = 5-20 (B und C) Motilität und Morphologie (Strukturindex) bei Azidose und Hemmung der MAPK-Signalwege, n = 4-20

Die Hemmung des ERK1/2- und des p38-Signalwegs resultierte in einer verminderten Motilität unter Kontrollbedingungen (Abb. 38A). Diese war am stärksten ausgeprägt, wenn beide Signalwege gehemmt wurden (U0126 + SB203580). Die Migration von AT-1-Zellen ist also generell abhängig von diesen Signalwegen. Allerdings blieb trotz Inhibition beider Signalkaskaden durch simultane Gabe von U0126 und SB203580 die Steigerung der Motilität im Sauren bestehen (Abb. 38B). Somit sind weder der ERK1/2- noch der p38-Signalweg für die Azidose-induzierte Erhöhung der migratorischen Geschwindigkeit verantwortlich. Im Gegensatz zur Motilität blieb der Strukturindex bei Hemmung der MAPK bei sowohl pH 7,4 als auch pH 6,6 unverändert (Abb. 38C). Daher scheint keine direkte Korrelation zwischen Strukturindex und migratorischer Geschwindigkeit bei den AT-1-Zellen zu bestehen. Die Bedeutung der morphologischen Änderung im Sauren muss in zusätzlichen Experimenten aufgeklärt werden.

3.12 Invasivität und Zellgedächtnis

Um die Auswirkung der veränderten Motilität auf die Invasivität zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht, extrazelluläre Matrix zu überwinden. Dazu wurden mit Matrigel beschichtete Filtereinsätze genutzt und die Menge an AT-1-Zellen bestimmt, die nach 48 h durch das Gel gewandert waren. Die Zellen wurden erst für 3 h mit Ringerlösungen pH 7,4 oder pH 6,6 inkubiert, danach in Medium ohne Serum überführt und auf die Filtereinsätze gegeben. Um eine gerichtete Bewegung auszulösen, wurde unter die Filtereinsätze Serum-haltiges Medium pipettiert. Da die Zellen nach der 3-stündigen Azidose wieder in normales Medium überführt wurden, würde ein Effekt darauf hindeuten, dass die Zellen ihre veränderten Eigenschaften auch über einen größeren Zeitraum beibehalten und sich somit die Azidose „merken“ können.

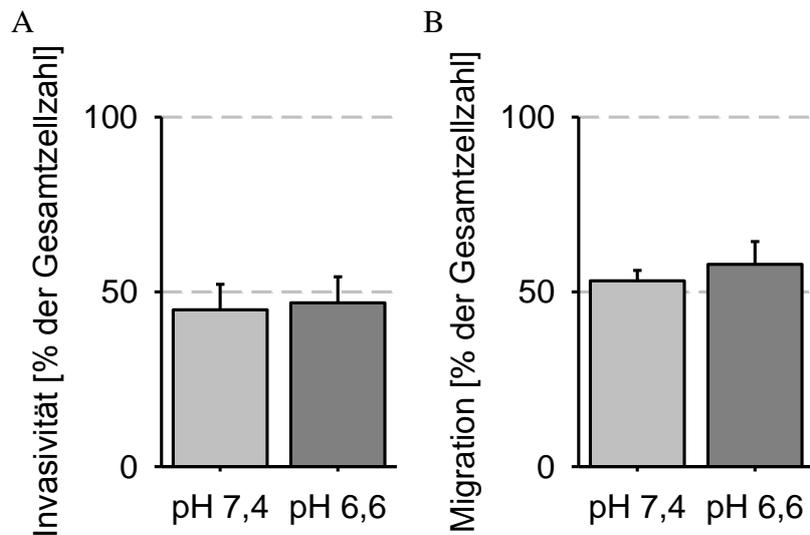


Abbildung 39 Effekt der Azidose auf (A) die Invasivität (mit Matrigelbeschichtung, nach 48 h) und auf (B) die Migration (ohne Matrigelbeschichtung, nach 24 h), n = 5-7

Es konnten allerdings keine pH-abhängigen Änderungen bei der Überwindung des Matrigels festgestellt werden (Abb. 39A). Auch bei der Analyse der Zellmigration mit Filtersätzen ohne Matrigel gab es keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Zellen (Abb. 39B). Somit sind die AT-1-Zellen in der Lage komplexe Gele, die der Basalmembran nachempfunden sind, zu überwinden. Sie behalten allerdings in Medium mit pH 7,4 die Azidose-induzierten Änderungen der Motilität über Zeiträume von 24 h bis 48 h nicht bei. Dieses Ergebnis konnten auch mit der in Abschnitt 3.11 beschriebenen Methode bestätigt werden (Abb. 40).

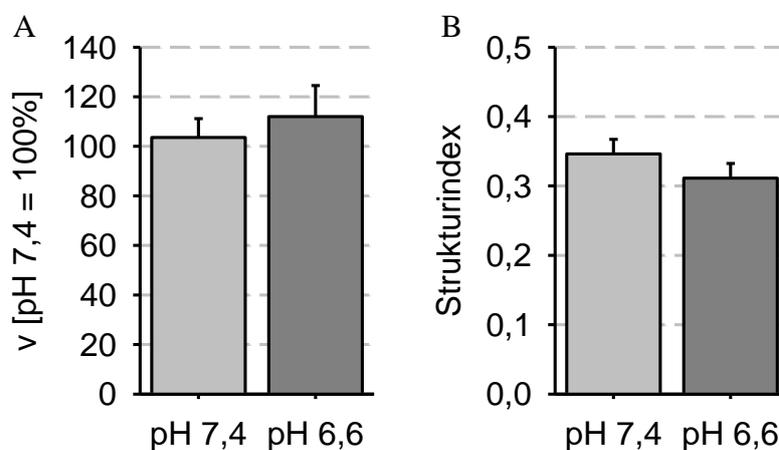


Abbildung 40 Migration (A) und Strukturindex (B) von AT-1-Zellen 24 h nach der 3-stündigen Inkubation bei pH 7,4 oder pH 6,6 und anschließendem Mediumwechsel auf pH 7,4. n = 7

In einem anderen Ansatz sollte die Fähigkeit der AT-1-Zellen untersucht werden, ein intaktes Epithel zu zerstören. Dazu wurde über einer konfluenten Schicht MDCK-C7-Zellen der transepitheliale Widerstand (TEER) gemessen. Die AT-1-Zellen wurden nach 3 h Inkubation bei pH 7,4 oder pH 6,6 unter den Filtereinsatz mit dem MDCK-C7-Epithel in Serum-freies Medium (pH 7,4) gegeben. Wie in Abb. 41 deutlich zu sehen ist, sinkt der TEER nach Zugabe der AT-1-Zellen schnell und erreicht nach 72 h sein Minimum. Diese Zerstörung des Epithels war aber unabhängig vom pH-Wert. Somit stimmen diese Ergebnisse mit den Vorherigen gut überein. Die Zellen behalten ihre veränderten Eigenschaften nach Überführung in ein Medium mit physiologischem pH-Wert nicht bei. Bei Fehlen von Tumorzellen (Kontrolle: keine Zellen und NRKE: normal rat kidney epithelial cells, d.h. keine Tumorzellen) blieb der epitheliale Widerstand der MDCK-C7 über die Versuchszeit stabil.

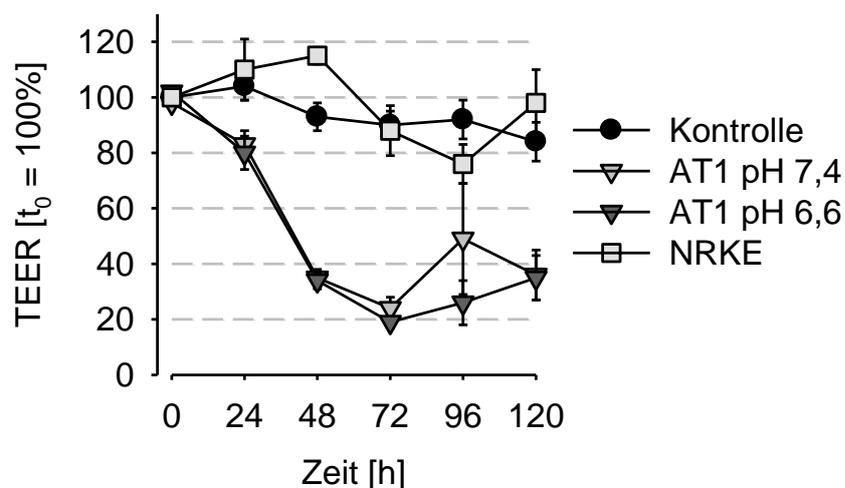


Abbildung 41 Messung des transepithelialen Widerstands (TEER) über einem MDCK-C7-Epithel in Abhängigkeit vom pH; Kontrolle: keine Zellen, NRKE (normal rat kidney epithelial cells): nicht-invasive Zelllinie; n = 11

Da die AT-1-Zellen keinen direkten Kontakt mit dem Epithel haben, müssen lösliche Faktoren für die Auflockerung des Epithels verantwortlich sein. Daher wurde die Überstände der TEER-Messungen mittels Coomassie- und Silberfärbung auf sekretierte Proteine untersucht. Es zeigte sich allerdings, dass der Großteil der sekretierten Proteine von dem MDCK-C7-Epithel stammte und mit dieser Methode keine vielversprechenden Kandidaten für weitere Analysen ermittelt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

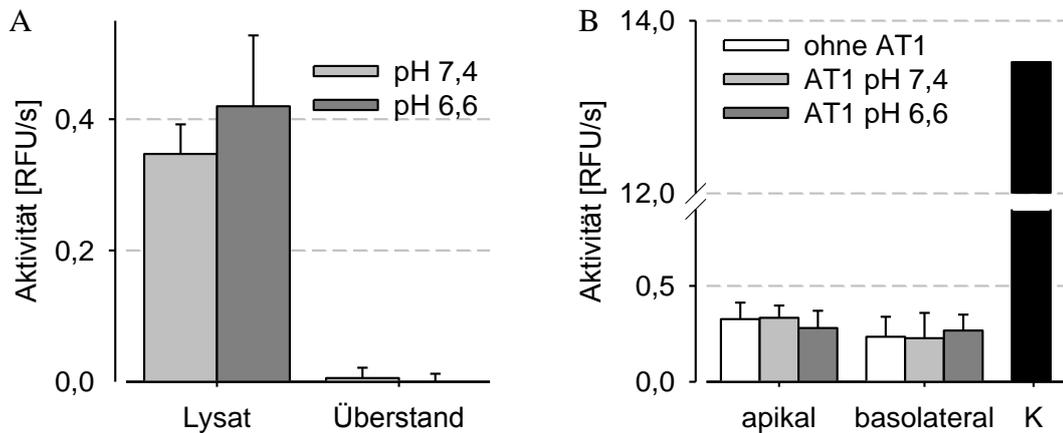


Abbildung 42 (A) Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität in AT-1-Lysaten und -Überständen in Abhängigkeit vom pH (72 h nach Inkubation); n = 3-4 sowie (B) MMP-Aktivität in den Überständen der TEER-Messreihen (nach 120 h) in Abhängigkeit vom Vorhandensein der AT-1-Zellen und dem pH-Wert. K...Kollagenase; n = 6

Cathepsine und Matrixmetalloproteasen (MMP) sind pH-abhängige Enzyme mit wichtiger Rolle bei der Invasivität (94;97;104;106;145). Daher wurde die Enzymaktivität fluorimetrisch und mittels Zymographie (MMPs) bestimmt. In den Überständen der TEER-Messung wurden nur Werte bei der sehr sensitiven Fluoreszenzmessung der MMP-Aktivität erhalten (Abb. 42B). Diese gemessene MMP-Aktivität stammte allerdings allein von den MDCK-C7-Zellen und nicht von den AT-1-Tumorzellen, da mit und ohne AT-1-Zellen gleiche Werte berechnet wurden. Um die Aktivität von Cathepsin B -auch bei verschiedenen pH-Werten- zu untersuchen, wurden in einem zweiten Ansatz AT-1-Zellen erst 3 h bei pH 7,4 oder pH 6,6 inkubiert, dann die Ringerlösung durch Medium (pH 7,4) ersetzt und nach 72 h der Überstand und die Zellysate vermessen (Abb. 42A). Es zeigte sich, dass AT-1-Zellen keine messbaren Mengen an Cathepsinen sekretieren, daher konnte in den TEER-Überständen auch keine Cathepsin-Aktivität bestimmt werden. Somit scheiden sowohl MMPs als auch Cathepsine als Faktoren aus, die für die epitheldesintegrierenden Eigenschaften der AT-1-Zellen verantwortlich sind. Zukünftige Versuche können hoffentlich die Identität dieser Faktoren aufklären.

4 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

4.1 AT-1-Zellen als Modellsystem

In soliden Tumoren findet man ein Mikromilieu, das sich stark vom Milieu gesunder Gewebe unterscheidet. Unzureichende Durchblutung aufgrund struktureller und funktioneller Anomalien des Gefäßsystems führen zu einer unzureichenden Versorgung mit Sauerstoff (Hypoxie). Dieser Mangel an Sauerstoff führt zu Veränderungen des Tumorstoffwechsels und Glukose wird vermehrt zu Laktat umgesetzt. Diese verstärkte Bildung von Laktat kann allerdings auch bei Normoxie stattfinden (Warburg-Effekt). Der veränderte Stoffwechsel in Zusammenspiel mit unzureichendem Abtransport von Stoffwechselendprodukten wie Laktat oder CO_2 führt zu einer Ansäuerung des Tumormikromilieus (metabolische Azidose). Während der extrazelluläre pH-Wert in soliden Tumoren oft verringert ist, liegen die intrazellulären pH-Werte im neutralen oder leicht alkalischen Bereich (im Vergleich zum pH_e) (96). Dieses Tumorzell-spezifische Phänomen wird als reverser pH-Gradient bezeichnet (8), da im Normalgewebe die Zellen intrazellulär meist saurer sind als der Extrazellularraum. Man geht davon aus, dass diese besonderen Bedingungen des Tumormikromilieus die Tumorprogression fördern (153). Die „Seed and Soil“-Hypothese postuliert sogar, dass neben den genetischen Veränderungen der Tumorzellen das Milieu entscheidend für die Ausbildung eines invasiven Phänotyp ist (154).

In der vorliegenden Arbeit wurden AT-1-Prostatakarzinomzellen benutzt, um die Interaktion zwischen Tumorzelle und Umgebung *in vitro* genauer zu studieren. AT-1-Zellen erwiesen sich als gutes Modellsystem, da sie - selbst unter aeroben Bedingungen - große Mengen an Laktat produzieren. Zudem bildet sich unter sauren Bedingungen, übereinstimmend mit den *in vivo* vorhandenen Daten, ein reverser pH-Gradient ($\text{pH}_i > \text{pH}_e$) aus. Unter Kontrollbedingungen ist der intrazelluläre pH-Wert saurer als der Extrazellularraum. Somit stimmen die Ergebnisse der AT-1-Zellen qualitativ gut mit aus Tumoren erhaltenen Befunden überein. Quantitativ ist der intrazelluläre pH-Wert unter sauren Bedingungen relativ niedrig verglichen mit *in vivo* Werten. Nicht-invasive Messungen mittels ^{31}P -MRS (Magnetresonanzspektroskopie) ergaben pH_i -Werte nahe der Neutralität ($\text{pH}_i = 7,0$) (8;96;122;155) oder leicht alkalische Werte ($\text{pH}_i = 7,1-7,2$) (96;118;156). Diese quantitative Abweichung zu *in vivo* erhaltenen Daten wurde auch

in anderen *in vitro*-Studien beobachtet. Sie beruht wahrscheinlich auf dem stark vergrößerten Extrazellularraum in Zellkulturansätzen im Zusammenspiel mit der hohen Pufferkapazität des Mediums. Diese stellt eine größere Quelle an Protonen dar, als die Zelle kompensieren kann. Die starke Pufferung des Mediums war nötig, um einen möglichst konstanten pH_e über den gesamten Versuchszeitraum gewährleisten zu können. Trotz der starken Ansäuerung des Mediums durch die AT-1-Zellen, betrug die Reduktion des pH_e nur 0,07 pH-Einheiten (Abb.10).

4.2 Mechanismen und Bedeutung der intrazellulären pH-Regulation

Um die normale Zellfunktion aufrechtzuerhalten, ist eine Regulation des intrazellulären pH-Wertes in einem azidotischen Milieu essentiell. Dabei spielen vor allem Na^+/H^+ -Austauscher oder Bikarbonat-Transporter eine wichtige Rolle. Zusätzlich können auch Monocarboxylat-Transporter und ATPase-gekoppelte Protonenpumpen beteiligt sein (18;19). Der Einfluss der Na^+/H^+ -Austauscher und Bikarbonat-Transporter bei der Regulation des intrazellulären pH-Wertes in AT-1-Zellen wurde genauer untersucht. Neben der pH_i -Regulation haben diese Transporter noch vielfältige andere Funktionen in Tumorzellen, sie regeln z.B. das Zellvolumen (157). Zudem wird diskutiert, ob eine Hemmung der Transporter und die darauf folgende Absenkung des pH_i als Krebstherapie dienen könnte (19;158). Der Na^+/H^+ -Austauscher fördert die maligne Transformation von Zellen durch Erhöhung des pH_i (121). Er reguliert außerdem die Zellmorphologie sowie Organisation des Zytoskeletts und ist an Proliferation, Migration und Invasivität beteiligt (159;160).

Der Einfluss beider Transporter bei einer akuten oder dauerhaften ($t = 3 \text{ h}$) intrazellulären Ansäuerung mit 40 mM Natriumlaktat wurde in dieser Arbeit analysiert. Bei der akuten Inkubation mit Natriumlaktat kam es zu einer leichten intrazellulären Ansäuerung ($\text{pH}_i = 7,02$). Allerdings erholte sich der intrazelluläre pH-Wert innerhalb weniger Minuten wieder. Verantwortlich dafür war allein der Na^+ -getriebene $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Der Na^+/H^+ -Austauscher spielte keine Rolle. Im Gegensatz dazu war für die Aufrechterhaltung des pH_i bei einer dauerhaften Inkubation mit Laktat neben dem Na^+ -getriebenen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher auch der Na^+/H^+ -Austauscher verantwortlich, wenn auch in einem schwächeren Ausmaß. Diese Befunde sind in guter Übereinstimmung mit der Arbeit von Tonnessen et al. (120). Tonnessen postuliert, dass für die Regulation des intrazellulären pH-Wertes bei schwacher Ansäuerung fast

ausschließlich die Bikarbonat-Transporter verantwortlich sind. Die Erholung des pH_i nach gezielter intrazellulärer Ansäuerung war in dieser Studie ebenso allein abhängig vom Na^+ -getriebenen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauscher trägt erst bei starker intrazellulärer Azidose zur Regulation des pH_i bei. Auch in der Arbeit von Boyer und Tannock (122) wurde die Aktivität dieser Transporter bei verschiedenen Milieubedingungen gemessen. Der Na^+/H^+ -Austauscher war, je nach untersuchter Zelllinie, bei sehr niedrigen pH_i -Werten von 6,4 bis 6,8 maximal aktiv. Dagegen erreichte der Na^+ -getriebene $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher bei pH_i -Werten von 6,6 bis 7,0 seine volle Aktivität. Im Einklang damit spielte der Na^+ -getriebene $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in AT-1-Zellen bei sehr niedrigem intrazellulärem pH-Wert ($\text{pH}_i = 6,74$), ausgelöst durch extrazelluläre Azidose, keine Rolle mehr. Unter diesen Bedingungen liegt, auf Grund der geringen Dissoziation von CO_2 , ein Mangel an Bikarbonat als Substrat für den Transporter vor. Dagegen war der Na^+/H^+ -Austauscher, in guter Übereinstimmung mit den Arbeiten von Tonnessen sowie Boyer und Tannock, an der Regulation des pH_i stärker beteiligt.

4.3 Azidose-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und p38

Die ERK1/2- und p38-abhängigen Signalkaskaden spielen in vielfältiger Weise eine wichtige Rolle bei Tumorzellen. Der ERK-Signalweg ist bei etwa einem Drittel aller Tumoren fehlreguliert (2). Er ist an der Transformation von Tumorzellen beteiligt. ERK-Inhibitoren werden als Krebstherapeutika diskutiert (161). Die ERK-Signalkaskade ist in viele wichtige Prozesse, wie z.B. Proliferation, Zellüberleben, Migration, Angiogenese und Schutz vor oxidativem Stress involviert, kann aber auch zu Differenzierung und Seneszenz führen (2;37;39). Der p38-Signalweg kann in Tumorzellen Schutz vor Apoptose, Zellzyklus-Progression, Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und unbegrenzte Replikation vermitteln (31;51). Außerdem spielt er bei der Angiogenese, Invasivität und Metastasierung eine Rolle (31). Allerdings kann p38 auch als Tumorsuppressor wirken und Kontaktinhibierung, Differenzierung, Apoptose bei ROS-Stress oder DNA-Schäden sowie Seneszenz auslösen (2;31;45). Beide Signalkaskaden sind an der Ausbildung von Chemoresistenz in Tumoren beteiligt (37).

Eine extrazelluläre Azidose führte in allen studierten Zelllinien zu einer Aktivierung von p38. ERK1/2 lag nur in 3 von den 6 untersuchten Zelllinien vermehrt

phosphoryliert vor. Die Aktivierung der MAPK war allgemein sehr schnell (innerhalb von 5 min) und langanhaltend (über 3 h). Da in allen Zelllinien auch eine Verminderung des pH_i beobachtet wurde und bereits eine isolierte intrazelluläre Ansäuerung ($\text{pH}_e = 7,4$) ausreichte, um p38 zu aktivieren, scheint die Aktivierung von p38 bei sinkendem intrazellulären pH-Wert ein genereller Mechanismus der Zellen zu sein. Im Gegensatz dazu ist die steigende Aktivität von ERK1/2 nach metabolischer Azidose Zelltyp-spezifisch.

Es bestand keine Korrelation zwischen pH_i oder ΔpH_i nach Azidose und dem Maß an p38-Aktivierung. Somit scheint die Stärke der Azidose-induzierten Aktivierung von p38 Zelltyp-abhängig zu sein. Allerdings lässt sich das Vorhandensein eines pH_i -Grenzwertes, wie vorgeschlagen von Zheng et al. (130), nicht ausschließen. In dieser Veröffentlichung zeigte sich ebenfalls eine stark vermehrte p38-Phosphorylierung ausgelöst durch intrazelluläre Azidose in Kardiomyozyten, allerdings erst, wenn ein bestimmter Grenzwert ($\text{pH}_i \leq 7,0$) unterschritten wurde. Auch in AT-1-Zellen war eine schwache intrazelluläre Ansäuerung mit Laktat nicht ausreichend und erst bei stärkerer Reduktion des pH_i mit Laktat und DIDS ein Effekt auf die p38-Phosphorylierung zu beobachten. Die Arbeit von Zheng et al. beschreibt zudem, dass die intrazelluläre Azidose unabhängig von Änderungen des extrazellulären pH-Wertes p38 aktiviert, eine Konstellation wie sie bei Hypoxie auch in Tumoren anzutreffen ist (130). Die ERK-Phosphorylierung war abhängig vom extrazellulären pH-Wert und zeigte, wie bei p38, keine Korrelation mit pH_i oder ΔpH_i . Allerdings lässt sich nicht ganz ausschließen, dass die ERK1/2-Aktivität weniger sensitiv gegenüber einer Azidose ist und dadurch die intrazelluläre Ansäuerung mit Laktat und DIDS nicht ausreichend war. Gegen dieses Argument sprechen aber die Ergebnisse aus den Arbeiten von Zhen et al. und Huang et al. (130;162). Sie zeigten, dass bei einer gezielten intrazellulären Azidose keine ERK1/2-Aktivierung auftrat, obgleich ein ähnlicher pH_i wie nach extrazellulärer Azidose erreicht wurde. Vielmehr löste nur die extrazelluläre Azidose, die zu einer ähnlich starken Reduktion des pH_i führte, ein Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung aus (162).

Neben der extra- oder intrazellulären Azidose könnten auch die Versuchsbedingungen verantwortlich für die gesteigerte Aktivität der MAPK sein. Hier ist vor allem der Serumentzug für 24 h zu nennen. Dieser könnte Autophagie auslösen, was u.a. in einer MAPK-Phosphorylierung und ROS-Produktion resultiert (163-165). Gegen eine

Autophagie-induzierte MAPK-Aktivierung spricht erstens, dass die experimentellen Bedingungen für alle Versuche ähnlich waren und auch die Kontrollen ($\text{pH}_e = 7,4$) Serum-freies Medium erhielten. Zweitens konnte auch ohne Ruhigstellen der Zellen eine Azidose-induzierte Aktivierung der MAPK beobachtet werden. Und drittens kann Autophagie, neben der verstärkten MAPK-Phosphorylierung, auch ein Absterben der Zellen auslösen (163-165). Unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen gab es aber keine Zeichen von Apoptose und Nekrose. Daher können Serumentzug und Autophagie als Ursache der Aktivierung von ERK1/2 und p38 ausgeschlossen werden.

4.4 Mechanismus der MAPK-Aktivierung

Die Azidose-induzierte ERK1/2-Aktivierung ist abhängig von MEK1/2. Der Anstieg der Phosphorylierung von p38 ist abhängig von den MAPK-Kinasen MKK3 und -6. Die MKK3/6-Aktivität war in AT-1-Zellen nach Azidose stark erhöht (166) und p38 selbst ist laut Literaturbefunden nicht pH-sensitiv (130). Phosphatasen spielten keine Rolle bei den Änderungen der Aktivität der MAPK.

Um herauszufinden, auf welchem Weg die MAPK-Kaskade durch Azidose aktiviert wird, wurden verschiedene Signalwege pharmakologisch gehemmt und der Effekt auf die MAPK-Phosphorylierung untersucht. Es wurde keine Beteiligung des EGFR, der PKC, PKA oder PI3K und des Src-Signalwegs gefunden. Auch der Protonenrezeptor OGR1 war nicht beteiligt. Die MAPK-Signalkaskade könnte auch über Änderungen des Zellvolumens aktiviert werden. Das Zellvolumen war unter azidotischen Bedingungen in AT-1-Zellen reduziert und es ist bekannt, dass die Phosphorylierung einer Vielzahl an Proteinen, darunter auch der MAPK, durch Veränderungen des Zellvolumens beeinflusst werden kann (140). Die Auswirkungen einer metabolischen Azidose auf das Zellvolumen variierten allerdings stark zwischen den untersuchten Zelllinien. Es bestand keine Korrelation zwischen Änderungen des Zellvolumens und der MAPK-Aktivierung, so dass eine Rolle des Zellvolumens als entscheidender Signalweg bei Azidose ausgeschlossen werden kann.

Ein anderer möglicher Mechanismus der MAPK-Aktivierung ist die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS spielen bei der Krebsentstehung und der Tumormalignität eine wichtige Rolle (146;147). Zudem wirken sie als sekundäre Botenstoffe und regulieren, wie auch die MAPK, die Proliferation von Tumorzellen (167). Daher könnte der Mechanismus der MAPK-Aktivierung abhängig von ROS sein.

Tatsächlich ist die Produktion von ROS in AT-1-Zellen als Folge der metabolischen Azidose erhöht. Zudem werden ERK1/2 wie auch p38 durch Wasserstoffperoxid aktiviert und eine Reduktion der Sauerstoffradikale mit dem Radikalfänger Tiron verhindert die durch Azidose induzierte Phosphorylierung beider Kinasen. Somit ist die Aktivierung von sowohl ERK1/2 als auch p38 nach Azidose abhängig von ROS. Eine verstärkte Phosphorylierung der MAPK durch ROS ist in der Literatur bekannt (145;148;149), wenn auch nicht im Zusammenhang mit einem azidotischen Milieu. Interessanterweise, beschreiben Gupta und seine Kollegen eine erhöhte ROS-Konzentration bei Keratinozyten, die durch ionisierende Strahlung oder das Karzinogen N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin transformiert wurden (168). Davon abhängig wurden sowohl p38 als auch ERK1/2 verstärkt aktiviert, aber nicht JNK. Zudem zeigte sich eine erhöhte CRE (cAMP response element)-vermittelte Genexpression, allesamt Ergebnisse, die mit unseren Beobachtungen in AT-1-Zellen übereinstimmen (166). In der Arbeit von Gupta et al. waren ROS entscheidend für die Zellproliferation. In AT-1-Zellen führt Azidose und die damit verbundene Steigerung der ROS-Produktion zu keinen Veränderungen der Proliferation. Allerdings spielte die ROS-abhängige Aktivierung von ERK1/2 beim Schutz vor Nekrose unter azidotischen Bedingungen eine entscheidende Rolle. ROS werden entweder in den Mitochondrien oder durch Flavoproteine, wie die NAD(P)H-Oxidase, gebildet (150;169). Bei AT-1-Zellen erfolgt die ROS-Produktion in den Mitochondrien, denn sie wird stark beeinflusst von einer Inhibierung des mitochondrialen Komplex I mit Rotenon, aber nicht von einer Hemmung der Flavoproteine mit DPI. Zudem konnte die erhöhte Bildung an ROS mit dem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff MitoSOXTM bestätigt werden (166). ROS-Produktion durch die Mitochondrien kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen (150). Wenn ein hoher Protonengradient und ein großer Vorrat an reduzierten Coenzym Q vorhanden ist, können ROS durch umgekehrten Elektronentransfer gebildet werden. Die zweite Möglichkeit beruht auf der Reaktion von Sauerstoff mit reduzierten Flavinmononukleotid (FMN), einer prosthetischen Gruppe des Komplex I, und findet bei einem erhöhten Verhältnis von NADH zu NAD⁺ statt. Rotenon verhindert eine ROS-Bildung über umgekehrten Elektronentransfer, verstärkt allerdings die über den FMN-Kofaktor. Daher ist die Azidose-induziert ROS-Produktion nicht auf umgekehrten Elektronentransfer, sondern auf ein erhöhtes Verhältnis von NADH zu NAD⁺ zurückzuführen, wie es zum Beispiel bei Hemmung der Atmungskette oder niedriger

ATP-Produktion zu erwarten ist (150). Unter sauren Bedingungen wurde keine veränderte Aktivität der Mitochondrien beobachtet (166). Obwohl nicht klar ist, wie Azidose die Mitochondrien beeinflusst, sind diese dennoch die wahrscheinlichste Quelle der ROS. In zukünftigen Versuchen muss der dahinterliegende Mechanismus aufgeklärt werden.

4.5 Tumorzellinvasivität und Azidose

Metabolische Azidose kann auf vielfältige Weise den Tumorzellphänotyp beeinflussen. Vorgegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Azidose die Chemoresistenz in AT-1-Zellen erhöht (24;25). Bei diesem Prozess spielen die MAPK ERK1/2 und p38 eine wichtige Rolle. Zusätzlich ist p38 entscheidend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB, der an Tumor-Initiation, -Progression und Metastasierung beteiligt ist (170) und löst längerfristige Änderungen der Genexpression nach Azidose aus (166). ERK1/2 verhindert den Tumorzelltod durch Nekrose unter azidotischen Bedingungen. Da beide MAPK die Zellmigration modulieren (2;3;31;38;60;171-174) und Azidose über verschiedene Wege die Invasivität steigern kann (94-100;103;105), wurde die Zellmigration unter sauren Bedingungen, in Abhängigkeit von ERK1/2 und p38, in AT-1-Zellen untersucht.

4.5.1 Änderung der Zellmotilität durch Azidose

Migration beinhaltet verschiedene Schritte, darunter einen gezielten Umbau des Zytoskeletts, koordiniertes Bilden und Auflösen von fokalen Adhäsionskontakten sowie lokalen Ionen- und Wassertransport über die Membran. Alle diese Schritte sind abhängig vom extra- und intrazellulären pH-Wert (96;103). Die Migration der AT-1-Zellen konnte direkt bei Azidose bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die migratorische Geschwindigkeit bei pH 6,6 erhöht war und charakteristische Änderungen der Zellmorphologie auftraten. Die Zellen nahmen eine stärker spindelförmige/dendritische Morphologie an. Diese Änderungen blieben aber nicht bestehen, wenn die Zellen nach der Inkubation bei pH 6,6 für 24 h bei einem pH-Wert von 7,4 kultiviert wurden. Eine derartige Situation würde z.B. auftreten, wenn die Tumorzelle den Tumor verlässt. Ob die erhöhte migratorische Geschwindigkeit bei

Zeitpunkten kürzer als 24 h erhalten bleibt, muss in zukünftigen Arbeiten geklärt werden.

Die Motilität der AT-1-Zellen ist abhängig von sowohl ERK1/2 als auch p38. In einer Arbeit von Huang et al. werden eine Vielzahl von möglichen Zielproteinen der MAPK, die in Migrationsprozesse involviert sind, beschrieben (38). Zu den Substraten von ERK1/2 zählen u.a. MLCK (myosin light chain kinase), die Cysteinprotease Calpain sowie FAK (focal adhesion kinase) und Paxillin, die jeweils bei der Regulation von Membran-Ausstülpungen, Proteolyse sowie der Dynamik von Zelladhäsionen eine Rolle spielen. Die Kinase p38 reguliert ebenfalls Paxillin und beeinflusst außerdem die Aktin-Dynamik über Caldesmon und MAPKAPK2/3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2/3). Zudem wird die Transkription von verschiedenen, an der Migration beteiligten Genen induziert, wie z.B. AP-1, Fra-1, uPA (urokinase-type plasminogen activator) und MMP.

Die Motilitätssteigerung nach Azidose beruht allerdings nicht auf den MAPK. Der genaue Mechanismus, der für die Steigerung der migratorischen Geschwindigkeit unter azidotischen Bedingungen verantwortlich ist, wird Thema zukünftiger Arbeiten sein. In der Arbeit von Wu und Kollegen wurde eine entscheidende Rolle von ROS und langanhaltender MAPK-Aktivierung bei gesteigerter Migration beschrieben (60). Dort waren Interaktionen zwischen Integrinen, Rezeptor-Tyrosinkinasen und PKC entscheidend. PKC und MAPK können allerdings im Falle von AT-1-Zellen ausgeschlossen werden.

4.5.2 Invasivität von Tumorzellen und Azidose

Trotz unterschiedlicher genetischer Hintergründe, ist der Ablauf einer Metastasierung bei allen Tumoren gleich. Er umfasst das Ablösen vom Primärtumor, lokale Invasivität nach der Proteolyse der extrazellulären Matrix, Zerstörung der Basalmembran, Intravasation, Zirkulation im Blut und Extravasation (96). In dieser Arbeit wurde analysiert, ob AT-1-Zellen physiologische Barrieren, wie Epithelschichten oder der Basalmembran-nachempfundene Gele, überwinden können und welche potentielle Rolle Azidose dabei spielt. Allerdings konnten die Experimente nicht direkt unter azidotischen Bedingungen durchgeführt werden. Bei längeren Inkubationszeiten (über 24 h) ist die Zellviabilität drastisch verringert. Außerdem können Effekte auf die Gele oder Epithelschichten durch den pH-Wert selbst nicht ausgeschlossen werden. AT-1-

Zellen sind in der Lage, extrazelluläre Matrix zu degradieren und mit Hilfe von löslichen Faktoren intakte Epithelschichten aufzuweiten. Diese Fähigkeiten waren allerdings unabhängig von der vorangegangenen 3-stündigen Inkubation in einem azidotischen Milieu. Mit großer Wahrscheinlichkeit können die Azidose-induzierten Effekte auf die Invasivität nach 24/48 h bei pH 7,4 nicht mehr nachgewiesen werden, übereinstimmend mit der transienten Steigerung der Zellmigration. Es ist dennoch zu erwarten, dass sich die Steigerung der migratorische Geschwindigkeit bei Azidose vorteilhaft auf die Fähigkeit zur Metastasierung *in vivo* auswirkt. Die gesteigerte Motilität der AT-1-Zellen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass diese die Tumorgrenzen erreichen und durch Degradierung der extrazellulären Matrix, aktiver Migration durch das umgebende Epithel und Zerstörung der Basalmembran die Blutgefäße erreichen. Die vermehrte Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen würde schließlich das Risiko der Metastasenbildung erhöhen, selbst wenn die gesteigerte Motilität der Tumorzellen nicht länger anhält. Die Prüfung dieser Hypothese muss in zukünftigen *in vivo* Experimenten erfolgen.

4.6 Zusammenfassung

Das Mikromilieu von Tumoren unterscheidet sich deutlich von dem des Normalgewebes. Es zeichnet sich unter anderem durch einen Mangel an Sauerstoff und Glukose sowie durch eine metabolische Azidose aus (8). Das Tumormikromilieu ist neben genetischen Veränderungen ein entscheidender Faktor für den Tumorphänotyp und dessen Variabilität und hat einen starken Einfluss auf die Malignität des Tumors und die Erfolgchancen einer Tumorthherapie (19). Dennoch ist, mit Ausnahme der Hypoxie, wenig über den Einfluss des Tumormikromilieus auf den Tumorphänotyp bekannt. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen der Azidose auf die Signaltransduktion und den Phänotyp von AT-1-Prostatakarzinomzellen zu untersuchen. Azidose führt innerhalb von 5-10 min zu einer Reduktion des intrazellulären pH-Wertes und einer Aktivierung der MAPK ERK1/2 und p38, aber nicht JNK. Der p38-Signalweg konnte auch durch eine gezielte intrazelluläre Ansäuerung aktiviert werden, ist also abhängig vom intrazellulären pH-Wert. Die Reduktion des pH_i und die Aktivierung von p38 bei Azidose wurde in allen analysierten Zelltypen beobachtet und ist daher von allgemeiner Gültigkeit. Die Aktivierung von ERK1/2 ist im Gegensatz dazu Zelltyp-spezifisch. Die gesteigerte MAPK-Phosphorylierung ist abhängig von den jeweiligen MAPK-Kinasen, aber nicht von einer veränderten Phosphatase-Aktivität. Zudem spielen reaktive Sauerstoffspezies, die durch Azidose vermehrt vom mitochondrialen Komplex I gebildet werden, eine wichtige Rolle. MAPK sind in vielfältige Prozesse, wie z.B. Genexpression, Mitose, Metabolismus, Motilität und Metastasierung, Zellüberleben und Apoptose, sowie Differenzierung involviert (26). So ist die p38-Aktivierung in AT-1-Zellen entscheidend für eine erhöhte Chemoresistenz (24;25) und Veränderungen der Genexpression über den Transkriptionsfaktor CREB (166). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass ERK1 und -2 einen Azidose-induzierten nekrotischen Zelltod verhindern. Zudem sind sie an der verminderten Laktatbildung unter sauren Bedingungen beteiligt. Azidose führt zu einer gesteigerten Motilität der AT-1-Zellen, die allerdings unabhängig von ERK1/2 und p38 ist. Azidose kann die Fähigkeit von Tumoren zu metastasieren erhöhen (94-100;103;105). Dies könnte in der verstärkten Migration der Tumorzellen begründet sein. Wenn mehr Tumorzellen durch ihre erhöhte Motilität den Tumor verlassen und schließlich den Blutkreislauf erreichen, ist das Risiko einer Metastasenbildung erhöht, selbst wenn die verstärkte Migration nur transient ist, wie in

den AT-1-Zellen. Zusammenfassend konnte diese Arbeit die Modulation der Signaltransduktion und die vielfältigen Veränderungen des Phänotyps von AT-1-Tumorzellen durch Azidose aufzeigen und näher beleuchten (Abb. 43).

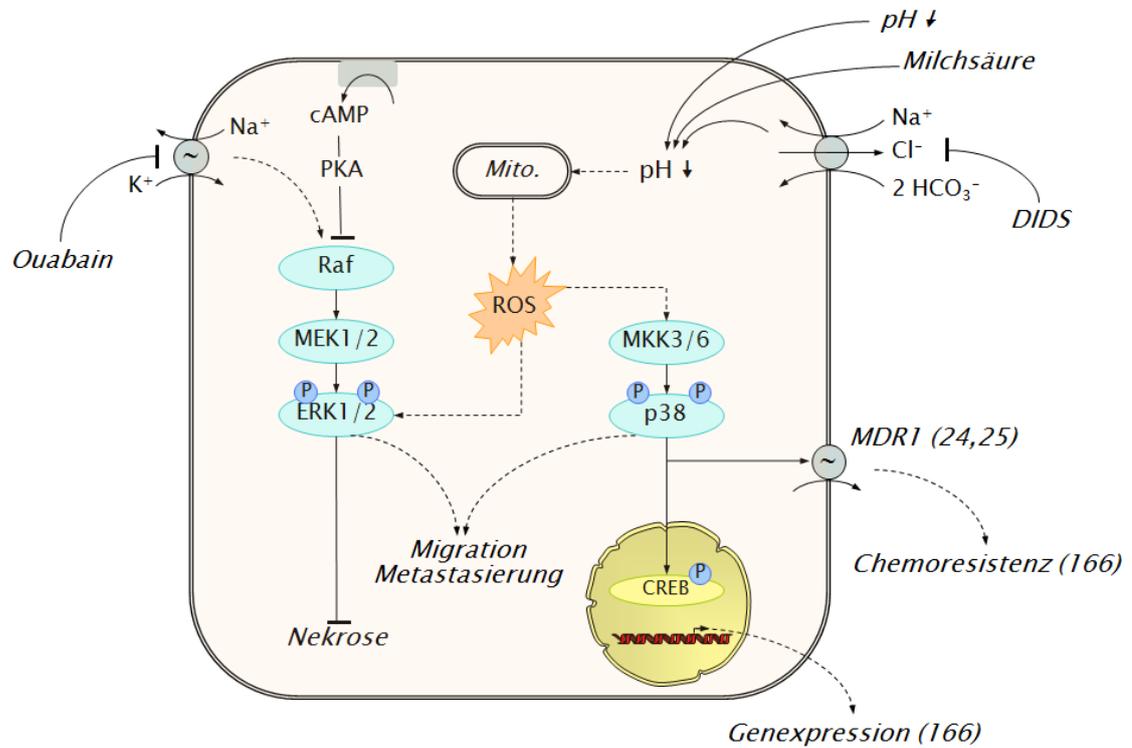


Abbildung 43 Modell der Azidose-induzierten Effekte auf die ERK1/2- und p38-Signalkaskaden und deren Auswirkungen in AT-1-Zellen. Mito...Mitochondrium

5 Anhang

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht über das Tumormikromilieu und seine Effekte auf die Tumorzellen und das benachbarte Gewebe	2
Abbildung 2 Schematische Darstellung der MAPK-Kaskade von p38, ERK1/2 und JNK1/2/3 (3)	5
Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung einiger Interaktionen der ERK1/2-Signalkaskade mit Signalwegen abhängig von PKC, EGFR, cAMP, PI3K und Src (91)	11
Abbildung 4 Darstellung der Verbindung zwischen Metabolismus, dem Tumormikromilieu und genetischen Veränderungen (10).....	12
Abbildung 5 BCECF-Fluoreszenzanregungsspektrum und -Strukturen	22
Abbildung 6 Struktur von (A) CM-H ₂ DCFDA und (B) MitoSox TM	27
Abbildung 7 Erhaltene Migrationsdaten mit ImageJ	28
Abbildung 8 Schematische Aufbau der TEER-Messung	29
Abbildung 9 Zeitverlauf der Entwicklung des intrazellulären pH nach Kurzzeit- und Langzeit-Inkubationen mit einem pH _e von 6,6.....	33
Abbildung 10 Intra- und extrazellulärer pH-Wert sowohl unter Kontroll- als auch unter azidotischen Bedingungen	34
Abbildung 11 Intrazellulärer pH-Wert bei verschiedenen Zelllinien.	35
Abbildung 12 Transiente intrazelluläre Ansäuerung mit Laktat und Einfluss der Inhibition von Na ⁺ /H ⁺ -Austauschern bzw. von Anionentransportern auf die Normalisierung des intrazellulären pH-Wertes	36
Abbildung 13 Einfluss von verringerter Chloridkonzentration, Lösungen ohne Bikarbonat und Inhibition des Anionentransportes auf den intrazellulären pH-Wert	38
Abbildung 14 Reduktion des intrazellulären pH-Wertes in AT-1-Zellen nach Inkubation mit Ringerlösungen mit DIDS, EIPA und/oder Natriumlaktat	39
Abbildung 15 Abhängigkeit der JNK-Phosphorylierung und -Expression vom pH	40
Abbildung 16 Azidose-induzierte ERK1/2- und p38-Phosphorylierung in Zelllinien aus Tumor- und Normalgewebe	41

Abbildung 17 Fehlen einer Korrelation zwischen der relativen ERK1/2-bzw. p38-Phosphorylierung und dem pH_i bzw. dem ΔpH_i	42
Abbildung 18 Zeitverlauf der ERK1/2- und p38-Aktivierung bei Azidose	43
Abbildung 19 Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 in Abhängigkeit von extra- und intrazellulärer Ansäuerung in AT-1-Zellen	45
Abbildung 20 Nachweis der OGR1-Expression in AT-1-Zellen mittels PCR.	47
Abbildung 21 Einfluss von CuSO_4 auf die MAPK-Phosphorylierung.....	48
Abbildung 22 Einfluss der MEK1/2-Inhibition auf die ERK1/2-Phosphorylierung	49
Abbildung 23 Einfluss der Hemmung von Ser/Thr-Phosphatasen und der Tyr-Phosphatasen auf die ERK1/2- und p38-Phosphorylierung	50
Abbildung 24 cAMP-induzierte Effekte auf die ERK1/2-Phosphorylierung.....	52
Abbildung 25 Repräsentativer Westernblot für phosphoryliertes und Gesamt-Src unter Kontroll- (pH 7,4) und sauren Bedingungen (pH 6,6) von AT-1-Zellen.	53
Abbildung 26 (A) Einfluss der extra- und intrazellulären Azidose auf das Zellvolumen sowie Änderungen des Zellvolumens durch Ouabain- oder Mannitolinkubation	54
Abbildung 27 Einfluss der Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38.....	55
Abbildung 28 Azidose-induzierte Zellvolumenänderungen bei Zelllinien isoliert aus Tumor- und Normalgewebe.....	56
Abbildung 29 ROS-Bildung in Abhängigkeit von extra- und intrazellulärer Azidose...	57
Abbildung 30 Abhängigkeit der ERK1/2- und p38-Phosphorylierung von ROS	58
Abbildung 31 Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Abhängigkeit von ERK1/2 und p38	58
Abbildung 32 Zellprotein, Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit vom extrazellulären pH sowie ERK1/2 und p38	59
Abbildung 33 Zellproliferation und Azidose.....	60
Abbildung 34 Effekt von Azidose auf den Glukoseverbrauch und die Laktatbildung...	61
Abbildung 35 Laktatbildung in Abhängigkeit von ERK1/2 und p38	62
Abbildung 36 Laktatbildung unter Hemmung des Anionenaustauschs.....	63
Abbildung 37 Migratorische Geschwindigkeit und Morphologie in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert	64

Abbildung 38 Migration in Abhängigkeit von ERK1/2 und p38	64
Abbildung 39 Effekt der Azidose auf die Invasivität und auf die Migration	66
Abbildung 40 Migration und Strukturindex nach Mediumwechsel auf pH 7,4	66
Abbildung 41 Messung des transepithelialen Widerstands (TEER)	67
Abbildung 42 (A) Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität sowie MMP-Aktivität.....	68
Abbildung 43 Modell der Azidose-induzierten Effekte auf die ERK1/2- und p38-Signalkaskaden und deren Auswirkungen in AT-1-Zellen.....	79

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Nomenklatur der humanen MAPK entnommen aus (1)	4
Tabelle 2 Übersicht der Krebs-assoziierten Veränderungen des ERK1/2-Signalwegs, entnommen aus Dhillon et al, 2007 (2).....	7
Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Inhibitoren mit IC50-Werten und möglichen unspezifischen Zielproteinen	16
Tabelle 4 PCR-Programm für OGR1.....	18
Tabelle 5 Zusammensetzung der Minigele	19
Tabelle 6 Im Westernblot verwendete Primär- und Sekundärantikörper	20
Tabelle 7 Zusammensetzung der Minigele für die Zymographie.....	31
Tabelle 8 Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 in Abhängigkeit verschiedener Inhibitoren und Azidose.....	51

5.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
BCA	Bicinchoninsäure
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein
BIM	Bisindolylmaleimid I
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CHO	Chinese hamster ovary
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GFP	Green fluorescent protein
HRP	Horseradish peroxidase
JNK	C-Jun amino-terminal kinase
kDa	Kilo-Dalton
LDH	Laktatdehydrogenase
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MDR	Multidrug resistance
MEM	Minimum essential medium
MKK	MAP-Kinase-Kinase
MMP	Matrixmetalloprotease
MRP-1	Multidrug resistance-associated protein 1

MRS	Magnetresonanzspektroskopie
NFaT	Nuclear factor of activated T cells
NRKE	Normal rat kidney epithelial (cells)
OD	optische Dichte bei x nm
OGR1	Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1
OK	Opossum kidney
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP	Proteinphosphatase
Raf	Ras activation protein
rcf	Relative centrifugal force
RFP	Red fluorescent protein
RFU	Relative fluorescence units
RNA	Ribonukleinsäure
R _p -cAMPS	R _p -Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphorothioat
RPMI	Roswell park memorial institute
RT	Reverse Transkriptase
SAPK	Stress-activated protein kinases
SB203580	4-[4-Fluorophenyl]-2-[4-methylsulfinylphenyl]-5-[4-pyridyl]1H- Imidazol
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-Phase	Synthesephase
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)-Butadien

UTR	Untranslated region
WNK	with no K kinases
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

6 Literatur

- (1) Bradshaw R, Dennis E. (Editor) Handbook of Cell Signalling. Elsevier Science, 2004.
- (2) Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007; 26(22):3279-3290.
- (3) Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* 2008; 47(4):409-414.
- (4) Glitsch M. Protons and Ca(2+): Ionic Allies in Tumor Progression? *Physiology* 2011; 26(4):252-265.
- (5) Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1(1):34-45.
- (6) Di Lorenzo G, De Placido S. Hormone refractory prostate cancer (HRPC): Present and future approaches of therapy. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2006; 19(1):11-33.
- (7) Konerding MA, Malkusch W, Klapthor B, van Ackern C, Fait E, Hill SA et al. Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *British Journal of Cancer* 1999; 80(5-6):724-732.
- (8) Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood-Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human-Tumors - A Review. *Cancer Research* 1989; 49(23):6449-6465.
- (9) Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93(4):266-276.
- (10) Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2011; 11(2):85-95.
- (11) Kaelin WG, Thompson CB. CANCER Clues from cell metabolism. *Nature* 2010; 465(7298):562-564.
- (12) Helmlinger G, Schell A, Dellian M, Forbes NS, Jain RK. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clinical Cancer Research* 2002; 8(4):1284-1291.
- (13) Newell K, Franchi A, Pouyssegur J, Tannock I. Studies with Glycolysis-Deficient Cells Suggest That Production of Lactic-Acid Is Not the Only Cause of Tumor Acidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90(3):1127-1131.

- (14) Chiche J, Ilc K, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv Enzyme Regul* 2010; 50(1):20-33.
- (15) Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in Cancer Biology* 2008; 18(5):330-337.
- (16) Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews* 2003; 29(6):541-549.
- (17) Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer and Metastasis Reviews* 2007; 26(2):299-310.
- (18) Tannock IF, Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* 1989; 49(16):4373-4384.
- (19) Stubbs M, McSheehy PMJ, Griffiths JR, Bashford CL. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular Medicine Today* 2000; 6(1):15-19.
- (20) Mivechi NF, Hofer KG, Hofer MG. Influence of Hypoxia and Acidity on Thermal Radiosensitization and Direct Heat-Induced Death of Bp-8 Sarcoma-Cells. *Radiology* 1981; 138(2):465-471.
- (21) Parkins CS, Chadwick JA, Chaplin DJ. Inhibition of intracellular pH control and relationship to cytotoxicity of chlorambucil and vinblastine. *British Journal of Cancer* 1996; 74:S75-S77.
- (22) Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(7):2092-2102.
- (23) Lotz C, Kelleher DK, Gassner B, Gekle M, Vaupel P, Thews O. Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells. *Oncol Rep* 2007; 17(1):239-244.
- (24) Sauvant C, Nowak M, Wirth C, Schneider B, Riemann A, Gekle M et al. Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. *Int J Cancer* 2008; 123(11):2532-2542.
- (25) Thews O, Gassner B, Kelleher DK, Schwerdt G, Gekle M. Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Neoplasia* 2006; 8(2):143-152.
- (26) Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68(2):320-344.

- (27) Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu BE et al. MAP kinases. *Chemical Reviews* 2001; 101(8):2449-2476.
- (28) Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research*, Vol 74 1998; 74:49-139.
- (29) Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(29):18623-18632.
- (30) Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007; 26(22):3100-3112.
- (31) Cuenda A, Rousseau S. P38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 2007; 1773(8):1358-1375.
- (32) Ono K, Han JH. The p38 signal transduction pathway - Activation and function. *Cellular Signalling* 2000; 12(1):1-13.
- (33) Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 263(3):825-831.
- (34) Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298(5600):1911-1912.
- (35) Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* 2001; 81(2):807-869.
- (36) Warr MR, Shore GC. Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer. *Current Molecular Medicine* 2008; 8(2):138-147.
- (37) McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(8):1263-1284.
- (38) Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 20):4619-4628.
- (39) Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2010; 1802(4):396-405.
- (40) Chaparro M, Moreno LG, Trapero-Marugan M, Medina J, Moreno-Otero R. Review article: pharmacological therapy for hepatocellular carcinoma with sorafenib and other oral agents. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2008; 28(11-12):1269-1277.

- (41) Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF, Weber MJ. Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Research* 1999; 59(2):279-284.
- (42) Mukherjee R, Bartlett JMS, Krishna NS, Underwood MA, Edwards J. Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer. *Prostate* 2005; 64(1):101-107.
- (43) Weber MJ, Gioeli D. Ras signaling in prostate cancer progression. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004; 91(1):13-25.
- (44) Bulavin DV, Fornace AJ. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Advances in Cancer Research*, Vol 92 2004; 92:95-118.
- (45) Han J, Sun P. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(8):364-371.
- (46) Timofeev O, Lee TY, Bulavin DV. A subtle change in p38 MAPK activity is sufficient to suppress in vivo tumorigenesis. *Cell Cycle* 2005; 4(1):118-120.
- (47) Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38 alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2007; 11(2):191-205.
- (48) Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M et al. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97(12):3017-3026.
- (49) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
- (50) Xu L, Chen S, Bergan RC. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* 2006; 25(21):2987-2998.
- (51) Ricote M, Garcia-Tunon I, Bethencourt F, Fraile B, Onsurbe P, Paniagua R et al. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *Journal of Pathology* 2006; 208(3):401-407.
- (52) Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell Signal* 2005; 17(12):1466-1476.
- (53) Ichimonji I, Tomura H, Mogi C, Sato K, Aoki H, Hisada T et al. Extracellular acidification stimulates IL-6 production and Ca(2+) mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2010; 299(4):L567-L577.
- (54) Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology* 2010; 25(2):85-101.

- (55) Sheng G, Guo J, Warner BW. Epidermal growth factor receptor signaling modulates apoptosis via p38alpha MAPK-dependent activation of Bax in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293(3):G599-G606.
- (56) Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26(22):3291-3310.
- (57) Frey MR, Golovin A, Polk DB. Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. *J Biol Chem* 2004; 279(43):44513-44521.
- (58) Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7(4):281-294.
- (59) Ali AS, Ali S, El Rayes BF, Philip PA, Sarkar FH. Exploitation of protein kinase C: A useful target for cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews* 2009; 35(1):1-8.
- (60) Wu WS, Wu JR, Hu CT. Signal cross talks for sustained MAPK activation and cell migration: the potential role of reactive oxygen species. *Cancer and Metastasis Reviews* 2008; 27(2):303-314.
- (61) Toton E, Ignatowicz E, Skrzeczkowska K, Rybczynska M. Protein kinase C epsilon as a cancer marker and target for anticancer therapy. *Pharmacological Reports* 2011; 63(1):19-29.
- (62) Axmann A, Seidel D, Reimann T, Hempel U, Wenzel KW. Transforming growth factor-beta 1-induced activation of the Raf-MEK-MAPK signaling pathway in rat lung fibroblasts via a PKC-dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 249(2):456-460.
- (63) Chiu T, Santiskulvong C, Rozengurt E. ANG II stimulates PKC-dependent ERK activation, DNA synthesis, and cell division in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(1):G1-11.
- (64) Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB. Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(25):22558-22565.
- (65) Hofmann M, Zaper J, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Kippenberger S. Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 316(3):673-679.
- (66) Srivastava J, Barber DL, Jacobson MP. Intracellular pH sensors: design principles and functional significance. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22:30-39.
- (67) Samuels Y, Diaz LA, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7(6):561-573.

- (68) Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell* 2003; 4(4):257-262.
- (69) Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441(7092):424-430.
- (70) Rafiee P, Theriot ME, Nelson VM, Heidemann J, Kanaa Y, Horowitz SA et al. Human esophageal microvascular endothelial cells respond to acidic pH stress by PI3K/AKT and p38 MAPK-regulated induction of Hsp70 and Hsp27. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(5):C931-C945.
- (71) Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118(9):3065-3074.
- (72) Sampaio C, Dance M, Montagner A, Edouard T, Malet N, Perret B et al. Signal strength dictates phosphoinositide 3-kinase contribution to Ras/Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation via differential Gab1/Shp2 recruitment: Consequences for resistance to epidermal growth factor receptor inhibition. *Molecular and Cellular Biology* 2008; 28(2):587-600.
- (73) Fiegl M, Samudio I, Mnjayan Z, Korchin B, Fritsche H, Andreeff M. Physiological hypoxia promotes lipid raft and PI3K-dependent activation of MAPK 42/44 in leukemia cells. *Leukemia* 2010; 24(7):1364-1367.
- (74) Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J* 1999; 18(9):2459-2471.
- (75) Ishizawar R, Parsons SJ. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 2004; 6(3):209-214.
- (76) Thobe BM, Frink M, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Src family kinases regulate p38 MAPK-mediated IL-6 production in Kupffer cells following hypoxia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2006; 291(3):C476-C482.
- (77) Galliher AJ, Schiemann WP. Src phosphorylates Tyr(284) in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Research* 2007; 67(8):3752-3758.
- (78) Robey RB, Ruiz OS, Espiritu DJD, Ibanez VC, Kear FT, Noboa OA et al. Angiotensin II stimulation of renal epithelial cell Na/HCO₃ cotransport activity: A central role for src family kinase/classic MAPK pathway coupling. *Journal of Membrane Biology* 2002; 187(2):135-145.
- (79) Bourgin-Hierle C, Gobert-Gosse S, Therier J, Grasset MF, Mouchiroud G. Src-family kinases play an essential role in differentiation signaling downstream of macrophage colony-stimulating factor receptors mediating persistent

- phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 and MAP kinases ERK1 and ERK2. *Leukemia* 2008; 22(1):161-169.
- (80) Cho-Chung YS. cAMP signaling in cancer genesis and treatment. *Cancer Treat Res* 2003; 115:123-143.
- (81) Merkle D, Hoffmann R. Roles of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the progression of prostate cancer: Cross-talk with the androgen receptor. *Cellular Signalling* 2011; 23(3):507-515.
- (82) Misra UK, Pizzo SV. Epac1-Induced Cellular Proliferation in Prostate Cancer Cells Is Mediated by B-Raf/ERK and mTOR Signaling Cascades. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 108(4):998-1011.
- (83) Cho YS, Lee YN, Cho-Chung YS. Biochemical characterization of extracellular cAMP-dependent protein kinase as a tumor marker. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 278(3):679-684.
- (84) Wang ZP, Dillon TJ, Pokala V, Mishra S, Labudda K, Hunter B et al. Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26(6):2130-2145.
- (85) Vuchak LA, Tsygankova OM, Prendergast GV, Meinkoth JL. Protein Kinase A and B-Raf Mediate Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by Thyrotropin. *Molecular Pharmacology* 2009; 76(5):1123-1129.
- (86) Lissitzky JC, Parriaux D, Ristorcelli E, Verine A, Lombardo D, Verrando P. Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells in vitro. *Cancer Res* 2009; 69(3):802-809.
- (87) Gerits N, Kostenko S, Shiryayev A, Johannessen M, Moens U. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cellular Signalling* 2008; 20(9):1592-1607.
- (88) Fimia GM, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling. *Journal of Cell Science* 2001; 114(11):1971-+.
- (89) Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG et al. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biology* 2002; 4(11):901-906.
- (90) Burgering BMT, Pronk GJ, Vanweeren PC, Chardin P, Bos JL. Camp Antagonizes P21(Ras)-Directed Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-2 and Phosphorylation of Msos Nucleotide Exchange Factor. *Embo Journal* 1993; 12(11):4211-4220.
- (91) Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 2007; 213(3):589-602.

- (92) Lee JT, Lehmann BD, Terrian DM, Chappell WH, Stivala F, Libra M et al. Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle* 2008; 7(12):1745-1762.
- (93) Schornack PA, Gillies RJ. Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia* 2003; 5(2):135-145.
- (94) Cuvier C, Jang A, Hill RP. Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis: effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L + B) secretion. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15(1):19-25.
- (95) Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Research* 2006; 66(10):5216-5223.
- (96) Hashim AI, Zhang XM, Wojtkowiak JW, Martinez GV, Gillies RJ. Imaging pH and metastasis. *Nmr in Biomedicine* 2011; 24(6):582-591.
- (97) MartinezZaguilan R, Seftor EA, Seftor REB, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJC. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis* 1996; 14(2):176-186.
- (98) Robey IF, Baggett BK, Kirkpatrick ND, Roe DJ, Dosesco J, Sloane BF et al. Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases. *Cancer Research* 2009; 69(6):2260-2268.
- (99) Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 2006; 66(13):6699-6707.
- (100) Webb SD, Sherratt JA, Fish RG. Alterations in proteolytic activity at low pH and its association with invasion: a theoretical model. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17(5):397-407.
- (101) Schwab A, Rossman H, Klein M, Dieterich P, Gassner B, Neff C et al. Functional role of Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in migration of transformed renal epithelial cells. *Journal of Physiology-London* 2005; 568(2):445-458.
- (102) Stock C, Gassner B, Hauck CR, Arnold H, Mally S, Eble JA et al. Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *Journal of Physiology-London* 2005; 567(1):225-238.
- (103) Stock C, Schwab A. Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2009; 458(5):981-992.
- (104) Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noel A, Frankenne F et al. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2005; 280(12):10938-10944.

- (105) Kato Y, Ozawa S, Tsukuda M, Kubota E, Miyazaki K, St Pierre Y et al. Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *FEBS J* 2007; 274(12):3171-3183.
- (106) Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Taraboletti G, Carta G, Franceschini N et al. Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia* 2008; 10(5):481-488.
- (107) Ludwig T, Ossig R, Graessel S, Wilhelmi M, Oberleithner H, Schneider SW. The electrical resistance breakdown assay determines the role of proteinases in tumor cell invasion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(2):F319-F327.
- (108) Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H, Silbernagl S. Characterization of 2 Mdkc-Cell Subtypes As A Model System to Study Principal Cell and Intercalated Cell Properties. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 1994; 428(2):157-162.
- (109) Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, Schwerdt G, Oberleithner H. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int* 2004; 66(1):196-202.
- (110) Pfister MF, Lederer E, Forgo J, Ziegler U, Lotscher M, Quabius ES et al. Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters. *J Biol Chem* 1997; 272(32):20125-20130.
- (111) De Wit RJ, Hekstra D, Jastorff B, Stec WJ, Baraniak J, Van Driel R et al. Inhibitory action of certain cyclophosphate derivatives of cAMP on cAMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem* 1984; 142(2):255-260.
- (112) Murray AJ. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* 2008; 1(22):re4.
- (113) Bergman JA, McAteer JA, Evan AP, Soleimani M. Use of the pH-sensitive dye BCECF to study pH regulation in cultured human kidney proximal tubule cells. *Methods in Cell Science* 1991; 13(3):205-209.
- (114) Chaillet JR, Boron WF. Intracellular Calibration of A Ph-Sensitive Dye in Isolated, Perfused Salamander Proximal Tubules. *Journal of General Physiology* 1985; 86(6):765-794.
- (115) Bergmeyer HU. (Editor) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, 1974.
- (116) Zak J, Schneider SW, Eue I, Ludwig T, Oberleithner H. High-resistance MDCK-C7 monolayers used for measuring invasive potency of tumour cells. *Pflugers Arch* 2000; 440(1):179-183.
- (117) Webb SD, Sherratt JA, Fish RG. Mathematical modelling of tumour acidity: regulation of intracellular pH. *J Theor Biol* 1999; 196(2):237-250.

- (118) Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Research* 1996; 56(6):1194-1198.
- (119) Wahl ML, Owen JA, Burd R, Herlands RA, Nogami SS, Rodeck U et al. Regulation of intracellular pH in human melanoma: Potential therapeutic implications. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002; 1(8):617-628.
- (120) Tonnessen TI, Sandvig K, Olsnes S. Role of Na⁺-H⁺ and Cl⁻-Hco₃⁻ Antiports in the Regulation of Cytosolic Ph Near Neutrality. *American Journal of Physiology* 1990; 258(6):C1117-C1126.
- (121) Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M et al. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000; 14(14):2185-2197.
- (122) Boyer MJ, Tannock IF. Regulation of Intracellular Ph in Tumor-Cell Lines - Influence of Microenvironmental Conditions. *Cancer Research* 1992; 52(16):4441-4447.
- (123) Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences* 2006; 31(5):268-275.
- (124) Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of Map Kinase Kinase Is Necessary and Sufficient for Pc12 Differentiation and for Transformation of Nih 3T3 Cells. *Cell* 1994; 77(6):841-852.
- (125) Murphy LO, MacKeigan JP, Blenis J. A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Molecular and Cellular Biology* 2004; 24(1):144-153.
- (126) Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E. Continuous ERK activation downregulates anti proliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Current Biology* 2006; 16(12):1171-1182.
- (127) Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(8):1299-1310.
- (128) Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 2000; 22(9):818-826.
- (129) Iijima N, Yanagawa Y, Onoe K. Role of early- or late-phase activation of p38 mitogen-activated protein kinase induced by tumour necrosis factor-alpha or 2,4-dinitrochlorobenzene during maturation of murine dendritic cells. *Immunology* 2003; 110(3):322-328.

- (130) Zheng M, Reynolds C, Jo SH, Wersto R, Han Q, Xiao RP. Intracellular acidosis-activated p38 MAPK signaling and its essential role in cardiomyocyte hypoxic injury. *FASEB J* 2005; 19(1):109-111.
- (131) Sin WC, Zhang Y, Zhong W, Adhikarakunnathu S, Powers S, Hoey T et al. G protein-coupled receptors GPR4 and TDAG8 are oncogenic and overexpressed in human cancers. *Oncogene* 2004; 23(37):6299-6303.
- (132) Singh LS, Berk M, Oates R, Zhao Z, Tan H, Jiang Y et al. Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1, a new metastasis suppressor gene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(17):1313-1327.
- (133) Li H, Wang DM, Singh LS, Berk M, Tan HY, Zhao ZW et al. Abnormalities in Osteoclastogenesis and Decreased Tumorigenesis in Mice Deficient for Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1. *Plos One* 2009; 4(5).
- (134) Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189(1-2):147-163.
- (135) Jeon KI, Jeong JY, Jue DM. Thiol-reactive metal compounds inhibit NF-kappa B activation by blocking I kappa B kinase. *Journal of Immunology* 2000; 164(11):5981-5989.
- (136) Li Z, Carter JD, Dailey LA, Huang YC. Pollutant particles produce vasoconstriction and enhance MAPK signaling via angiotensin type I receptor. *Environ Health Perspect* 2005; 113(8):1009-1014.
- (137) Gaitanaki C, Pliatska M, Stathopoulou K, Beis I. Cu²⁺ and acute thermal stress induce protective events via the p38-MAPK signalling pathway in the perfused *Rana ridibunda* heart. *J Exp Biol* 2007; 210(Pt 3):438-446.
- (138) Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 1988; 256(1):283-290.
- (139) Swarup G, Subrahmanyam G. Purification and characterization of a protein-phosphotyrosine phosphatase from rat spleen which dephosphorylates and inactivates a tyrosine-specific protein kinase. *J Biol Chem* 1989; 264(14):7801-7808.
- (140) Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* 1998; 78(1):247-306.
- (141) Eaton DC, Hamilton KL, Johnson KE. Intracellular acidosis blocks the basolateral Na-K pump in rabbit urinary bladder. *Am J Physiol* 1984; 247(6 Pt 2):F946-F954.
- (142) Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1776(1):32-57.

- (143) Stanton BA, Kaissling B. Regulation of renal ion transport and cell growth by sodium. *Am J Physiol* 1989; 257(1 Pt 2):F1-10.
- (144) Xie Z. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 986:497-503.
- (145) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39(1):44-84.
- (146) Tobar N, Guerrero J, Smith PC, Martinez J. NOX4-dependent ROS production by stromal mammary cells modulates epithelial MCF-7 cell migration. *British Journal of Cancer* 2010; 103(7):1040-1047.
- (147) Blanchetot C, Boonstra J. The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 2008; 18(1):35-45.
- (148) Gabbita SP, Robinson KA, Stewart CA, Floyd RA, Hensley K. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; 376(1):1-13.
- (149) Hsieh CC, Papaconstantinou J. Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice. *Faseb Journal* 2006; 20(2):259-268.
- (150) Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 2009; 417:1-13.
- (151) Poole RC, Halestrap AP. Reversible and Irreversible Inhibition, by Stilbenedisulphonates, of Lactate Transport Into Rat Erythrocytes - Identification of Some New High-Affinity Inhibitors. *Biochemical Journal* 1991; 275:307-312.
- (152) Loike JD, Kaback E, Silverstein SC, Steinberg TH. Lactate Transport in Macrophages. *Journal of Immunology* 1993; 150(5):1951-1958.
- (153) Laconi E. The evolving concept of tumor microenvironments. *Bioessays* 2007; 29(8):738-744.
- (154) Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989; 8(2):98-101.
- (155) Rotin D, Steelenorwood D, Grinstein S, Tannock I. Requirement of the Na⁺/H⁺ Exchanger for Tumor-Growth. *Cancer Research* 1989; 49(1):205-211.
- (156) Stubbs M, Rodrigues L, Howe FA, Wang J, Jeong KS, Veech RL et al. Metabolic Consequences of A Reversed Ph Gradient in Rat-Tumors. *Cancer Research* 1994; 54(15):4011-4016.
- (157) Alper SL, Chernova MN, Stewart AK. Regulation of Na⁺-independent Cl⁻. *JOP* 2001; 2(4 Suppl):171-175.

- (158) Lagadic-Gossmann D, Huc L, Lecreur V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ* 2004; 11(9):953-961.
- (159) Wu KL, Khan S, Lakhe-Reddy S, Jarad G, Mukherjee A, Obejero-Paz CA et al. The NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival. *J Biol Chem* 2004; 279(25):26280-26286.
- (160) Pedersen SF, Darborg BV, Rentsch ML, Rasmussen M. Regulation of mitogen-activated protein kinase pathways by the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462(2):195-201.
- (161) Belouche-Babari M, Jackson LE, Al Saffar NMS, Workman P, Leach MO, Ronen SM. Magnetic resonance spectroscopy monitoring of mitogen-activated protein kinase signaling inhibition. *Cancer Research* 2005; 65(8):3356-3363.
- (162) Huang WC, Swietach P, Vaughan-Jones RD, Ansorge O, Glitsch MD. Extracellular acidification elicits spatially and temporally distinct Ca²⁺ signals. *Curr Biol* 2008; 18(10):781-785.
- (163) Chen SY, Chiu LY, Maa MC, Wang JS, Chien CL, Lin WW. zVAD-induced autophagic cell death requires c-Src-dependent ERK and JNK activation and reactive oxygen species generation. *Autophagy* 2011; 7(2):217-228.
- (164) Fu J, Shao CJ, Chen FR, Ng HK, Chen ZP. Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines. *Neuro-Oncology* 2010; 12(4):328-340.
- (165) Wong CH, Iskandar KB, Yadav SK, Hirpara JL, Loh T, Pervaiz S. Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. *Plos One* 2010; 5(4):e9996.
- (166) Riemann A, Schneider B, Ihling A, Nowak M, Sauvant C, Thews O et al. Acidic Environment Leads to ROS-Induced MAPK Signaling in Cancer Cells. *Plos One* 2011; 6(7).
- (167) Szatrowski TP, Nathan CF. Production of Large Amounts of Hydrogen-Peroxide by Human Tumor-Cells. *Cancer Research* 1991; 51(3):794-798.
- (168) Gupta A, Rosenberger SF, Bowden GT. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. *Carcinogenesis* 1999; 20(11):2063-2073.
- (169) Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 2002; 82(1):47-95.
- (170) Xiao X, Li BX, Mitton B, Ikeda A, Sakamoto KM. Targeting CREB for Cancer Therapy: Friend or Foe. *Current Cancer Drug Targets* 2010; 10(4):384-391.

- (171) Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 2006; 25(4):695-705.
- (172) Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 2003; 4(1):67-79.
- (173) Mitchell MD, Laird RE, Brown RD, Long CS. IL-1 beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007; 292(2):H1139-H1147.
- (174) Du J, Sun C, Hu Z, Yang Y, Zhu Y, Zheng D et al. Lysophosphatidic acid induces MDA-MB-231 breast cancer cells migration through activation of PI3K/PAK1/ERK signaling. *Plos One* 2010; 5(12):e15940.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), 28.11.2012

Anne Riemann

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die die Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht haben und mich auf meinem Weg dorthin unterstützt haben. Vielen Dank allen, die mir fachlich mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn ich nicht weiter kam; die mich anspornten, wenn ich zauderte und die mich bremsten, wenn ich zuforsch vorwärtsdrängte!

„Lehre tut viel, aber Aufmunterung tut alles.“ -Johann Wolfgang von Goethe

Lebenslauf

Name: Anne Riemann
Geburtsdatum: 04.10.1982
Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand: ledig

Werdegang:

09.1993 – 06.2002 Thomas-Müntzer-Gymnasium Halle/Saale
Allgemeine Hochschulreife

09.1999 – 06.2000 Simon Langton Grammar School, Canterbury (England)
Teilnahme an der 12. Klasse mit folgenden Fächern:
Chemistry, History, French, English Literature and
General Education

10.2002 – 09.2007 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Akademischer Grad: Diplom-Biochemikerin
Abschlussnote: 1,6

10.2005 – 11.2005 Forschungsgruppenpraktikum an der Max-Planck-
Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
Thema: Etablierung eines Flp-Rekombinase-Systems in
eukaryotischen Zellen

11.2006 – 08.2007 Diplomarbeit am Universitätsklinikum Halle
Sektion molekulare gastroenterologische Onkologie
Thema: Untersuchung zur SUMO-Modifikation des
Transkriptionsfaktors Prospero-homeobox related 1
(PROX1)
Abschlussnote: 1,4

09.2007 – 12.2007

Universität Kopenhagen

Institut für zelluläre und molekulare Medizin

durch Leonardo da Vinci unterstütztes Praktikum zur
Erlernung von Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie
sowie Isolierung von Mikrodomänen

04.2008 – 12.2011

Promotionsstelle an der MLU Halle-Wittenberg

Julius-Bernstein-Institut für Physiologie

Thema: Azidose-induzierte Veränderung der
Signaltransduktion und Invasivität von Prostatakarzinom-
zellen der Ratte (AT-1): Mechanismen und Bedeutung

Publikationen

Acidic environment leads to ROS-induced MAPK-signaling in cancer cells.

Riemann A, Schneider B, Ihling A, Nowak M, Sauvant C, Thews O, Gekle M.
PLoS One. 2011; 6(7):e22445

Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38.

Sauvant C, Nowak M, Wirth C, Schneider B, **Riemann A**, Gekle M, Thews O.
Int J Cancer. 2008 Dec 1;123(11):2532-42

Caveolae in fibroblast-like synoviocytes: static structures associated with vimentin-based intermediate filaments.

Berg KD, Tamas RM, **Riemann A**, Niels-Christiansen LL, Hansen GH, Michael
Danielsen E.
Histochem Cell Biol. 2009 Jan;131(1):103-14

Kongressbeiträge/ Posterpräsentationen

Acidosis-induced activation of ERK1/2 and p38 kinases in rat prostate cancer cells (AT1)

Riemann A, Schneider B, Sauvant C, Thews O, Gekle M.

88. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Gießen 2009
Acta Physiologica 195 (Suppl. 669): 41 (2009)

Acidosis modulates invasiveness of rat prostate cancer cells (AT1) via MAPK

Riemann A, Schneider B, Sauvant C, Thews O, Gekle M.

88. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Gießen 2009
Acta Physiologica 195 (Suppl. 669): 44 (2009)

Acidosis-induced activation of ERK1/2 and p38 kinases in rat prostate cancer cells (AT1)

Riemann A, Schneider B, Sauvant C, Thews O, Gekle M.

International Symposium Signal Transduction and Disease, Aachen 2009

Role of acidosis-induced ROS formation in the signalling cascade of tumour cells

Riemann A, Ihling A, Schneider B, Thews O, Gekle M.

Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Regensburg 2011

Acta Physiologica 201 (Suppl. 682): 149 (2011)