

Aus dem Physiologischen Institut  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. Stefan Silbernagl

**Einfluß des Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Kaliumkanals hK1 auf die Migration  
humaner neutrophiler Granulozyten auf Fibronectin**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius – Maximilians - Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Bernward Gottfried Hinkes  
aus Nürnberg

Würzburg, im Juli 2003

Referent: Prof. Dr. med. Albrecht Schwab

Korreferent: Prof. Dr. med. Michael Gekle

Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der Mündlichen Prüfung: 10. November 2003

Der Promovend ist Arzt.

# Gliederung

|  |          |
|--|----------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b> |
| 1.1 Migration neutrophiler Granulozyten im physiologischen Kontext | 1        |
| 1.2 Mechanismen der Zellmigration                                  | 2        |
| 1.2.1 Zytoskelettale Mechanismen                                   | 2        |
| 1.2.2 Ionentransportproteine                                       | 4        |
| 1.3 Zielsetzung und Vorgehensweise der Arbeit                      | 5        |
| <br>   |          |
| <b>2. Material und Methoden</b>                                    | <b>9</b> |
| 2.1 Zellisolation  | 9        |
| 2.2 Giemsa- und Trypanblaufärbung                                  | 10       |
| 2.2.1 Giemsafärbung  | 10       |
| 2.2.2 Trypanblaufärbung  | 11       |
| 2.3 Volumenmessung   | 11       |
| 2.4 Western-Blot   | 11       |
| 2.4.1 Herstellung der Proben                                       | 12       |
| 2.4.2 SDS-Gelelektrophorese  | 13       |
| 2.4.3 Blotting   | 14       |
| 2.4.4 Färbung mit Erst- und Zweitantikörper                        | 14       |
| 2.4.5 ECL-Detektion  | 14       |
| 2.5 Immunfluoreszenz   | 15       |
| 2.5.1 Zellfixierung  | 15       |
| 2.5.2 Färbung mit Erst- und Zweitantikörper                        | 15       |
| 2.5.3 Fluoreszenzmikroskopie                                       | 16       |
| 2.6 Migrationsexperimente  | 16       |
| 2.6.1 Versuchsaufbau   | 16       |
| 2.6.2 Versuchsablauf   | 17       |
| 2.6.3 Versuchsauswertung und Statistik                             | 19       |
| 2.7 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen                         | 19       |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>21</b> |
| 3.1 Zellisolation (Vitalität, Reinheit, Volumen)               | 21        |
| 3.2 Antikörperspezifität im Western-Blot                       | 21        |
| 3.3 Integrinnachweis in der Immunfluoreszenz                   | 23        |
| 3.4 Migrationsexperimente                                      | 24        |
| 3.4.1 Kanalhemmung und -aktivierung auf Fibronectin (100µg/ml) | 26        |
| 3.4.2 Morphologie und Geschwindigkeit bei Variation der Matrix | 28        |
| 3.4.3 Kanalhemmung bei Variation der Matrix                    | 35        |
| <br>   |           |
| <b>4. Diskussion</b>   | <b>37</b> |
| 4.1 Einführung   | 37        |
| 4.2 Die Methoden   | 38        |
| 4.3 Die Ergebnisse   | 40        |
| <br>   |           |
| <b>5. Zusammenfassung</b>                                      | <b>45</b> |
| <br>   |           |
| <b>6. Anhang</b>   | <b>47</b> |
| 6.1 Materialienliste   | 47        |
| 6.2 Literaturverzeichnis                                       | 51        |

# 1. Einleitung

## 1.1 Migration neutrophiler Granulozyten im physiologischen Kontext

Neutrophile Granulozyten, die auch als polymorphkernige neutrophile Leukozyten bezeichnet werden, besitzen eine Schlüsselfunktion in der angeborenen, zellulären Immunität. Sie haben die Fähigkeit, Bakterien, Pilze und einige nicht umhüllte Viren zu lokalisieren, mittels Migration (Zellwanderung) im Gewebe aufzuspüren und dort durch Freisetzung eines Gemisches aus Proteasen, Phospholipasen, Stickoxiden und toxischen Sauerstoffmetaboliten auszuschalten <sup>1</sup>.

Diese zellspezifischen Funktionen setzen eine langwierige Differenzierung der Neutrophilen im Knochenmark aus Vorläuferzellen der granulopoetischen Reihe voraus. Als ausdifferenzierte und funktionstüchtige Zellen gelangen sie erst während der letzten 6-12 Stunden vor ihrem Absterben in den Blutkreislauf und machen hier mit 60-70% die größte Leukozytenpopulation im Differentialblutbild aus. Bei ihrer Rekrutierung durch gewebsständige Makrophagen im Rahmen des Entzündungsgeschehens gelangen sie aus dem Blut in peripheres Gewebe. Als chemotaktische Botenstoffe dienen dabei Chemokine, die bei Erregerkontakt aus Makrophagen (z.B. Interleukin-8 (IL-8)) <sup>2</sup> oder direkt aus Bakterien (z.B. formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP)) freigesetzt werden <sup>3</sup>. Chemokine markieren durch interstitielle Diffusion unter Ausbildung eines Konzentrationsgradienten den Infektionsherd und ermöglichen es den Neutrophilen, gezielt in entzündete Areale einzuwandern. Dabei werden im Blut befindliche Granulozyten aktiviert und verlangsamen sich gegenüber dem Blutstrom in einem als "Rolling" bezeichneten Vorgang unter Erhöhung ihrer Adhäsion an der Gefäßwand. Nach interzellulärer "Diapedese" durch das Gefäßendothel polarisiert sich die wandernde Zelle in der Matrix in Richtung des ansteigenden Chemotaxingradienten und migriert zum Infektionsherd <sup>4, 5</sup> Dort phagozytiert sie Erreger und verstärkt durch Freisetzung eigener Chemokine die Entzündungsreaktion.

Aber nicht immer ist das Einwandern neutrophiler Granulozyten in das Gewebe erwünscht. Im Rahmen chronisch entzündlicher Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis führen die proinflammatorischen und zytotoxischen Substanzen die-

ser Zellen zu massiven Gewebsschädigungen und den damit verbundenen Symptomen der Erkrankung<sup>6, 7</sup>. Möglichkeiten, diesen Vorgang durch medikamentöse Hemmung des Einwanderns der Entzündungszellen zu unterbrechen, sind bisher nicht bekannt. Dieses Vorgehen würde eine alternative Strategie zu gängigen antiinflammatorischen Therapien eröffnen. Ein detailliertes zellphysiologisches Verständnis der Migration neutrophiler Granulozyten ist für einen solchen Ansatz grundlegend.

## 1.2 Mechanismen der Zellmigration

Zellmigration ist ein ebenso komplexes wie ubiquitäres zellbiologisches Phänomen. Ihre physiologische Bedeutung liegt beispielsweise in der embryogenetischen Organ-differenzierung, der Regeneration bei der Wundheilung, Neovaskularisation oder der endothelialen Defektdeckung, sowie in der zellulären Immunität, vermittelt durch neutrophile Granulozyten und die verschiedenen Formen gewebsspezifischer Makrophagen<sup>8, 9</sup>. Neben den erwähnten autoimmun-inflammatorischen Erkrankungen kann als Beispiel für das schädigende Potential wandernder Zellen auf die Metastasierung von Neoplasien wie dem malignen Melanom hingewiesen werden.

Zwei voneinander sehr verschiedene zellbiologische Systeme liegen dieser Migration unter anderem zugrunde: Zum einen die Interaktion des Zytoskeletts mit der die Zelle umgebenden Matrix, zum anderen Ionentransportproteine und die durch sie vermittelten Volumenbewegungen in der Zelle<sup>10-13</sup>.

### 1.2.1 Zytoskelettale Mechanismen

Wie alle migrierenden Zellen weisen auch neutrophile Granulozyten bei ihrer Zellwanderung eine Polarität in der Bewegungsrichtung auf. Man bezeichnet das Vorderende als Lamellipodium, den hinteren Zellpol als Uropod<sup>14, 15</sup>. Durch Polymerisation von Aktinfilamenten und den Einbau von Membranvesikeln mittels Exozytose am Vorderende der Zelle "wächst" das Lamellipodium des Neutrophilen in Bewegungsrichtung. Zeitgleich sorgen Filamentkontraktionen und Membranendozytose im seinem Hinterende für dessen Nachgleiten<sup>16</sup>. Eine Bewegung ist aber nur möglich, weil zytoskelettale Kontraktionen mittels Zelladhäsionsrezeptoren, wie beispielsweise den Integrinen, auf die umge-

bende Matrix übertragen werden. Wichtige Integrinverteiler bei Neutrophilen sind dabei das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit einer Spezifität für die Matrixproteine Fibronectin- bzw. Vitronectin<sup>17</sup>. Durch die Ausbildung von integrinvermittelten Adhäsionskomplexen am Lamellipodium ist es der Zelle möglich, mit der umgebenden Matrix Kontakte aufzubauen und sich an diesen nach vorne zu ziehen<sup>18-20</sup>. Eine niedrige intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_{iz}$ ) am Vorderende des Neutrophilen ermöglicht es den Integrinen, diese Bindung mit der Matrix einzugehen. Zugleich unterhält sie die Polymerisation des Zytoskeletts in der Zelle<sup>21-23</sup>. Die Lösung von Integrin-Matrix-Kontakten am Hinterende scheint durch Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_{iz}$  vermittelt zu werden. Ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{iz}$  führt dort über die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin (CN) zur Lösung der Integrin-Matrix-Bindungen und der Wiederaufnahme der Integrine durch Endozytose. Nach einem zytoskelettal vermittelten Transport in Vesikeln zum Vorderende werden diese im Bereich des Lamellipodiums erneut in die Zellmembran eingebaut (vgl. Abb. 1: 24-29).

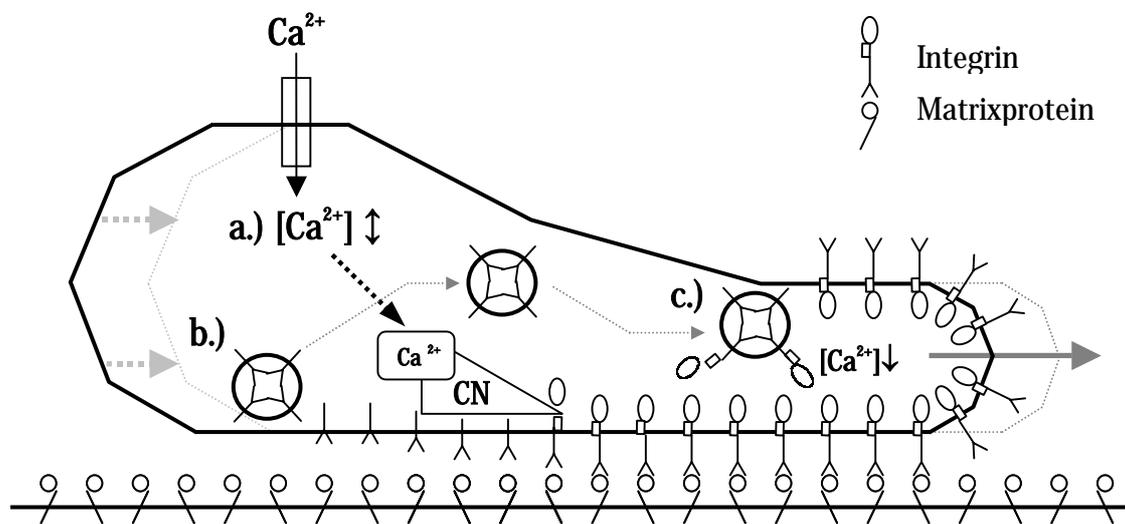


Abbildung 1.: Zytoskelettale Mechanismen im "Migrationsmodell nach Lawson und Maxfield": Oszillationen der intrazellulären Kalziumkonzentration führen vermittelt durch die a.) Aktivierung des Enzyms Calcineurin (CN) zur Lösung der Integrin-Matrix-Bindung im hinteren Ende des migrierenden Neutrophilen. Die Integrine werden b.) endozytotisch aufgenommen, in Vesikeln zum Vorderende der Zelle transportiert und dort erneut c.) exozytiert. Unter dem Einfluß des dort niedrigen intrazellulären Kalziumspiegels bilden sich nun neue Matrixkontakte aus. (nach Lawson, M. A, Maxfield, F. R.; Nature; 1995)

### 1.2.2 Ionentransportproteine

Die Bedeutung des eben beschriebenen Kalziumgradienten verdeutlicht bereits, dass gerichtete Zellbewegung in entscheidender Weise von der Regulation der intrazellulären Ionenkonzentrationen und damit von der Aktivität von Ionentransportproteinen abhängt. Die Funktion von Kanal- und Transporterproteinen wird unter anderem in der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und pH-Homöostase sowie in der Regulation des Zellvolumens gesehen. Die Wichtigkeit dieser Moleküle für die Migration konnte bei vielen Zelltypen, wie embryonalen Zellen<sup>30</sup>, immunkompetenten T-Zellen<sup>31</sup>, Fibroblasten und Melanomzellen<sup>32</sup> bereits gezeigt werden<sup>13,33</sup>.

Das in Abbildung 2 wiedergegebene Migrationsmodell beschreibt das Zusammenspiel des in meiner Arbeit an neutrophilen Granulozyten untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanals (IK1) mit dem Natrium-Protonen-Austauscher (NHE1) und dem Chlorid-Bikarbonat-Anionenaustauscher (AE2). Es wurde an transformierten Nierenepithelzellen des Hundes, den sogenannten MDCK-F-Zellen erarbeitet<sup>34-36</sup>. Die beiden Austauscher führen am vorderen Zellpol dieses Zelltyps durch Aufnahme von Natriumchlorid unter osmotisch bedingter Mitnahme von Wasser zu einem Anschwellen in der zytoskelettalen Polymerisationszone. Die Migration dieser Zellen ließ sich experimentell durch spezifische Blockade des NHE1 im Lamellipodium dosisabhängig verlangsamen<sup>37</sup>. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindliche Kaliumkanal IK1 vermittelt zeitgleich am hinteren Zellpol durch Abgabe von Kalium unter osmotisch bedingter Mitnahme von Wasser aus der Zelle ein Schrumpfen des Zelleibs<sup>38,39</sup>. Für seine lokal begrenzte Aktivität im hinteren Teil der Zelle wird seine Sensitivität gegenüber dem intrazellulär herrschenden Kalziumspiegel verantwortlich gemacht. Ein Anstieg der Membranspannung am Zelleib hinter dem nach vorne strebenden Lamellipodium könnte durch Öffnung mechanosensitiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bei steigender Membranspannung eine transiente Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{iz}$  hervorrufen<sup>40</sup>. Der daraufhin im hinteren Teil der Zelle an der Zellmembran herrschende hohe Kalziumspiegel aktiviert dort lokal die IK1-Kanäle, während der Kanal im Lamellipodium in einem nicht aktiven Zustand vorliegt. So kommt es ausschließlich im hinteren Teil der Zelle unter Mithilfe des aktiven IK1-Kanals zu einer Retraktion durch den Volumenverlust<sup>35</sup>.

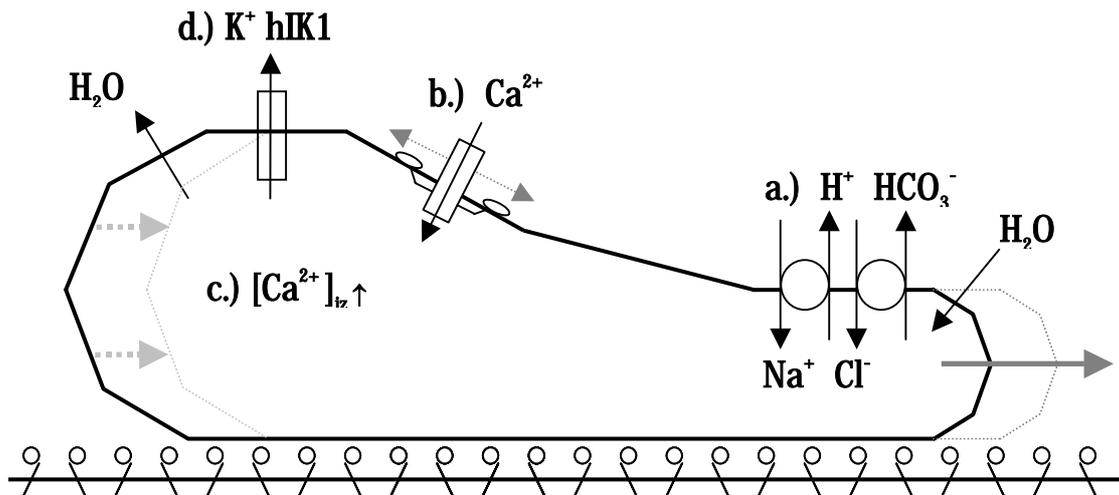


Abbildung 2.: Ionentransportproteine im "Migrationsmodell nach Schwab": Migrierende MDCK-F-Zellen nehmen an ihrem Lamellipodium über Ionen-Austauscher Salz und osmotisch bedingt Wasser auf a.). Die Zelle zieht nach vorne und erhöht dadurch die Membranspannung in den hinteren Zellabschnitten. Hier öffnen sich zugempfindliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle b.), und der intrazelluläre Kalziumspiegel steigt c.). Dies aktiviert den kalziumabhängigen Kaliumkanal IK1 d.), der über eine Volumenreduktion das Nachziehen des Hinterendes der migrierenden Zelle vermittelt. (Schwab, A.; 2001)

### 1.3 Zielsetzung und Vorgehensweise

Es gibt Hinweise dafür, daß die humane Isoform des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanals (hIK1) auch bei der Migration humaner neutrophiler Granulozyten benötigt wird. Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Erforschung der Funktion des hIK1 in Neutrophilen besteht jedoch darin, daß ein spezifischer Antikörper gegen das native Kanalprotein nicht vorliegt. Seine jeweilige Präsenz und sein Verteilungsmuster auf der Zelloberfläche sind somit immunhistochemisch nicht darstellbar. Der Nachweis von hIK1-mRNA durch Polymerasekettenreaktion und nested-PCR aus humanen neutrophilen Granulozyten<sup>41</sup>, sowie elektrophysiologische Untersuchungen mit der Patch-clamp-Technik lieferten jedoch starke Hinweise auf die Expression und Aktivität des Kanals in der Zellmembran der Granulozyten unter definierten Bedingungen<sup>46-50</sup>. Nicht zuletzt ergaben Versuche mit migrierenden Neutrophilen bei spezifischer pharmakologischer Blockade des hIK1 mit Clotrimazol und Charybdotoxin eine klar dosisabhängige Minderung der Migrationsgeschwindigkeit um bis zu 80%, wenn diese Migration auf dem Substrat Polylysin erfolgte<sup>41</sup>.

Unabhängig davon wiesen klinische Befunde darauf hin, dass das Antimykotikum Clotrimazol, welches eben auch Hemmstoff des hIK1 ist, eine Linderung der entzündungsbedingten Beschwerden der chronischer Arthritis auslöst<sup>6, 42</sup>. Eine denkbare pathophysiologische Erklärung für diesen Befund und ein zukunftsweisender therapeutischer Ansatzpunkt wäre eine Reduktion des Einwanderns von Neutrophilen in betroffene Gelenke durch Hemmung des hIK1<sup>43</sup>. Diesem Gedanken wurde bislang nicht nachgegangen, auch wenn der hIK1-Kanal schon heute in anderem Zusammenhang als wichtiger Baustein im Immunsystem gilt. So sind insbesondere seine Funktion bei der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen<sup>44</sup>, sowie bei der Bildung von Sauerstoffradikalen durch gewebsständige Makrophagen<sup>45</sup> bekannt. Durch den Nachweis einer hIK1-Funktion im Rahmen des in Abbildung 3 postulierten Migrationsmodelles für Neutrophile würde diesem Kanal endgültig eine Schlüsselfunktion in der zellvermittelten Immunität zukommen.

Ziel meiner Arbeit war es daher zu klären, ob der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kaliumkanal hIK1 für die Migration humaner neutrophiler Granulozyten essentiell ist und ob seine pharmakologische Beeinflussung deshalb zum Ansatzpunkt zukünftiger immunmodulatorisch-antiinflammatorischer Therapien werden könnte.

Folgende Vorgehensweise wurde zur Klärung dieser Fragestellung gewählt: Um bestmögliche Rückschlüsse auf die physiologische Kanalfunktion beim Menschen zu erhalten, wurden humanen neutrophilen Granulozyten gewonnen, deren Isolation aus Spenderblut anhand definierter Parameter kontrolliert wurde:

1. Reinheit der Isolation: Zum Ausschluß anderer migrationsfähiger Zellen (Monozyten, Lymphozyten), mittels Giemsa-Färbung.
2. Vitalität und Zellvolumen: Nachweis der Zellvitalität nach physikalisch belastendem Isolationsverfahren (d.h. Zentrifugationen, wechselnde Osmolaritäten), mittels Trypanblaufärbung und Feststellung des Zellvolumens mittels Coulter Counter® Bestimmung.
3. Expression des Fibronektinrezeptors  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin: Darstellung des Moleküls mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz.

Das zweidimensionale Migrationsmodell zur Beobachtung der Wanderung dieser Zellen wurde anhand der Migrationsgeschwindigkeit und Zellmorphologie auf einer Standardbeschichtung mit Referenzwerten aus der Literatur optimiert. Objektträger wurden mit dem humanen Matrixprotein Fibronectin beschichtet. Neutrophile Granulozyten wurden auf den Objektträgern angesät und mit dem Chemokin formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) stimuliert. Unter Superfusion mit vorgewärmter Ringerlösung wurde ihre Wanderung videomikroskopisch aufgezeichnet und computergestützt ausgewertet. Um die Frage der hIK1-Funktion zu klären, verwendete ich den kanalspezifischen Inhibitor Clotrimazol ( $IC_{50} \sim 50\text{nmol/l}$ ) und den Kanalaktivator 1-Ethyl-2-benzimidazolone (1-EBIO,  $EC_{50} \sim 70\mu\text{mol/l}$ ). In gepaarten Experimenten wurden die Migrationsgeschwindigkeiten unter Kontrollbedingungen mit denen bei Kanalaktivierung bzw. Kanalhemmung verglichen. Anhand der Migrationsgeschwindigkeit konnte untersucht werden, inwieweit eine Veränderung der Kanalaktivität durch diese Substanzen zu einer Beeinflussung der Migration führte.

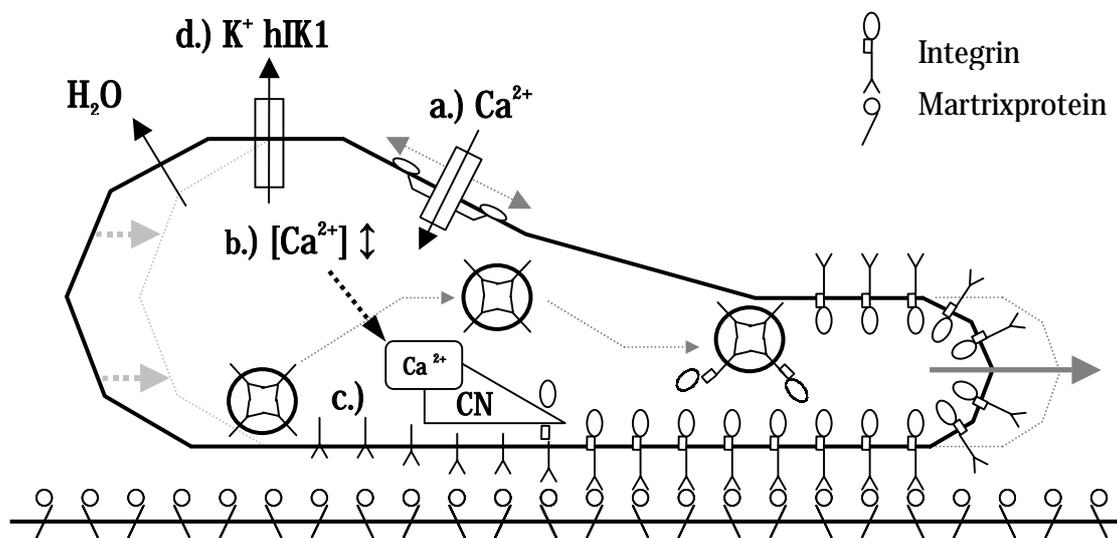


Abbildung 3.: Einfluß des kalziumabhängigen Kaliumkanals hIK1 auf die Migration neutrophiler Granulozyten auf Fibronectin in einem hypothetischen Modell: Durch die Aktivierung mechanosensitiver Kalziumkanäle in der Membran des Hinterendes a.) kommt es zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration b.). Dieser bedingt einerseits über Aktivierung von Calcineurin (CN) c.) die Lösung von Integrin-Matrix-Adhäsionspunkten. Andererseits ermöglicht er über die Öffnung des kalziumabhängigen Kaliumkanals hIK1 d.) einen  $K^+$ -Ausstrom unter Mitnahme von Wasser. Der Zelleib kann in Bewegungsrichtung nachgleiten.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellisolation

Es wurden an jedem Versuchstag neutrophile Granulozyten aus humanem Blut gewonnen und die Zellisolierung anhand ihrer Reinheit, Vitalität und des Zellvolumens kontrolliert. Alle Versuche wurden mit Granulozyten gesunder Spender durchgeführt, die über Art und Zielsetzung der Experimente unterrichtet waren und diesen ausdrücklich zugestimmt hatten.

Nach Punktion der Cubitalvene gewann ich 10ml heparinisierten venösen Blutes. Die folgenden Isolationsschritte fanden unter sterilen Bedingungen (Gelaire<sup>®</sup>BSB 6A Flow) statt <sup>(vgl. Abb. 4)</sup>. Das heparinisierte Blut wurde in Phosphate Buffered Saline (PBS; 10ml, 37°C) aufgenommen. 15ml Ficoll'sche Lösung wurden in einem 50ml Röhrchen (Falcon) vorgelegt und das Gemisch aus Blut und PBS aufgeschichtet. Durch Zentrifugation (22°C, 25min, 1.500 U/min) des Gradienten erhielt man von oben nach unten vier Phasen: Klare Serumfraktion über einem weißen Monozytenring, darunter die Ficoll'sche Lösung und in der Spitze des Röhrchens Erythrozyten und Granulozyten in einer gemeinsamen Phase. Die drei oberen Phasen wurden verworfen und das Erythrozyten-Granulozyten-Zellgemisch in ein neues von Zellrückständen freies Röhrchen überführt. Mittels zweimaliger Zentrifugation (22°C, 5min, 1.500 U/min) in PBS wurde die Zellen gewaschen. Dem Zellpellet wurde dann ein gleicher Volumenteil RPMI-Medium und weitere 10%Vol. einer 4%igen Dextransulfatlösung (Dextransulfat in RPMI) zugegeben. Der Gradient wurde in ein neues Röhrchen überführt und 35min im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Es resultiert eine klare, die Neutrophilen enthaltende Phase über den darunter sedimentierten Erythrozyten. Die Granulozyten wurden abgenommen, ein weiteres Mal in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit PBS (22°C, 5min, 1.500 U/min) gewaschen. Der Reinheitsgrad der Granulozyten wurde mittels Lyse verbliebener Erythrozyten durch 15sec. Zusatz von 3ml Aqua dest. erhöht. Durch Zugabe von 3ml 1,8%iger NaCl-Lösung, sowie einem Überschuß an PBS wurde anschließend isotoniert. Die Neutrophilen wurden nochmals gewaschen und entsprechend ihrem Ausgangs-

volumen in 10ml PBS aufgenommen. Bis zum Versuchsbeginn wurden sie hierin bei 4°C aufbewahrt.

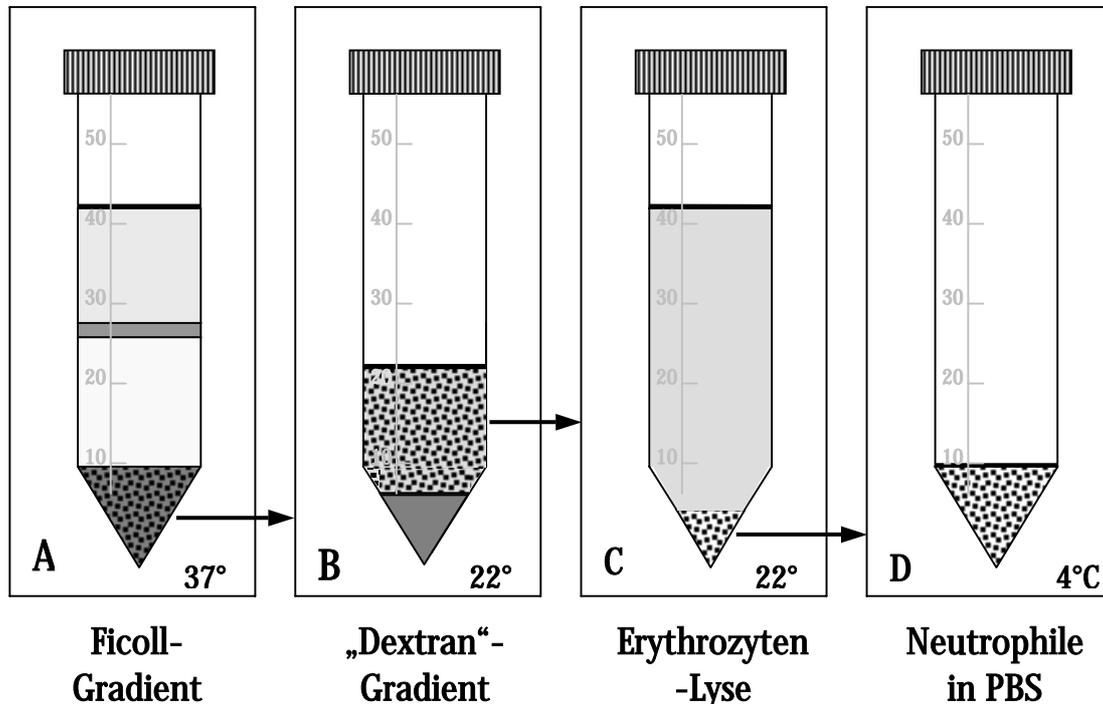


Abbildung 4.: Neutrophilenisolation: A.) Der Ficoll'sche Gradient lieferte von oben nach unten: Serumfraktion, Monozytenring, Ficoll'sche Lösung und Suspension aus Erythrozyten und Granulozyten. B.) Der Dextransulfatgradient trennte die Neutrophilen von den sedimentierten Erythrozyten. C.) Die hypotone Lyse von verbliebenen Erythrozyten führte zur Aufreinigung der Granulozyten. D.) Die Granulozyten wurden in PBS aufbewahrt.

## 2.2 Giemsa- und Trypanblaufärbung

### 2.2.1. Giemsa-Färbung

Die neutrophilen Granulozyten wurden mittels Giemsa-Färbung gegenüber ebenfalls migrationsfähigen und unter den Lichtmikroskop ungefärbt nicht unterscheidbaren Mono- und Lymphozyten abgegrenzt.

Es wurde das Giemsa-Schnellkit Diff-Quick® eingesetzt. Auf einem Objektträger wurde die Zellsuspension luftgetrocknet. Das Präparat wurde nun sukzessive fünf Mal für je eine Sekunde in Fixierer, dann Farblösung I und abschließend Farblösung II getaucht. Nach dem abschließenden Schritt wurde der Objektträger mit Aqua dest. gespült, luft-

getrocknet und die Reinheit der Neutrophilen durch Auszählung mikroskopisch bestimmt.

### 2.2.2. Trypanblaufärbung

Da neutrophile Granulozyten in der Blutbahn eine kurze Überlebenszeit (6-12 Stunden) haben und bei ihrer Isolation mehrere physikalisch sehr belastende Schritte stattfinden mussten, wurde die Trypanblaufärbung als Test für die Vitalität der Zellen während und nach der Isolierung eingesetzt<sup>7</sup>. So war es durch Färbung vor und nach einem Arbeitsschritt möglich, dessen Auswirkungen auf die Zellvitalität einzuschätzen und das Protokoll initial entsprechend zu optimieren.

50µl der Zellsuspension wurden auf einen Objektträger mit 5µl Trypanblau versetzt. Vitale Zellen behielten ihre Transparenz unter dem Lichtmikroskop, während der blaue Farbstoff in abgestorbenen Zellen akkumulierte.

## 2.3 Volumenmessung

Ziel dieser Technik war es, das Volumen der Neutrophilen nach ihrer Isolation mittels Ficoll- und Dextransulfatgradienten und hypotoner Erythrozytenlyse zu kontrollieren und dabei durch Vergleich mit Normwerten denkbare osmotisch bedingte Volumenänderungen auszuschließen.

Die Messungen wurden mit dem Coulter Counter Z2 Gerät durchgeführt. Die Schwellenwerte der Messung lagen bei 250 und 500fl. Es wurden nach Abschluss der Isolation 250µl der Zellsuspension in PBS in 10ml isotoner Ringerlösung (37°C) in einer Messküvette überführt. Die Ermittlung der Zellzahl und des durchschnittlichen Zellvolumens erfolgte vollautomatisch nach Einsetzen der Küvette in die Messapparatur.

## 2.4 Western-Blot

Ein direkter Nachweis des hIK1-Kanals mittels immunhistochemischer Methoden oder FACS-Analyse wäre wünschenswert gewesen, war mangels eines spezifischen Antiköpers aber unmöglich. Stellvertretend für die Anwesenheit physiologisch konfigurierter Transmembranmoleküle nach der Zellisolation wurde der Nachweis des  $\beta$ 1-Integrins erbracht.

Dies war von Interesse, da es als Rezeptor der verwendeten Fibronectinmatrix fungieren sollte, und von DAVEY et al. gezeigt worden, dass Integrine bei starker Stimulation einer Autodegradation durch die Zelle unterliegen können<sup>51</sup>. Der Nachweis eines normal konformierten Integrins sollte daher als Zeichen einer wenig belastenden Zellisolierung und einer adäquaten chemotaktischen Stimulation nachgewiesen werden. Im Western-Blot wurde zunächst der für die Färbungen verwendete Antikörper (MAB 1965, monoclonal mouse anti human  $\beta_1$ -integrin, Chemicon, Temecula, CA/USA) auf seine Epitopspezifität getestet.

In den Western-Blot-Proben wurden Proteinlysate aus neutrophilen Granulozyten und als Positivkontrolle solche aus humanen Melanomzellen eingesetzt. Das Vorkommen des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins beim malignen Melanom ist gesichert und wird gegenwärtig als prognostischer Faktor für dessen Metastasierung diskutiert<sup>52, 53</sup>. Zusätzlich wurden die zytoskelettal fixierten Proteine der Neutrophilen untersucht, um ggf. bei der Proteinextraktion am Zytoskelett verbleibende Integrine nachzuweisen<sup>(vgl. 17, 19, 20)</sup>. Über die Darstellung des  $\beta_1$ -Integrins aus neutrophilen Granulozyten war allerdings von Seiten des Antikörperherstellers bekannt, daß sie im Western-Blot wegen der Freisetzung von Proteasen aus den zelleigenen Granula kaum gelingen würde.

#### 2.4.1. Herstellung der Proben

Die Zellen wurden pellettiert (4°C, 5min, 2.000 U/min) und in 200 $\mu$ l Lysepuffer auf Eis suspendiert. Nach Zentrifugation (30min, 4°C, 13.000 U/min) erhielt man die im Überstand gelösten Proteinbestandteile der fragmentierten Zellen. Um zytoskelettal verankerte Proteine zu detektieren, wurde das Pellet danach ebenfalls in 100 $\mu$ l Lysepuffer aufgenommen und als eigenständige Probe in den Western-Blot eingesetzt. Zur Fertigstellung der Proben wurden je 25 $\mu$ l Proteinlysate und Probenpuffer auf Eis vermischt und 10 Minuten auf 95°C erhitzt. In der Proteinbestimmung errechnete sich die Proteinmenge je Geltasche von 80 $\mu$ g.

### 2.4.2. SDS-Gelelektrophorese

Das SDS-Gel für die Gelelektrophorese wurde bereits am Vorabend des ersten Versuchstages gegossen und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Komponenten des 10%igen Trenngels <sup>(siehe Tabelle 1)</sup> wurden in einer Küvette zügig unter abschließender Zugabe des 10%igen Ammoniumpersulfats vermischt. Das flüssige Gel wurde in die Gießkammer pipettiert, wo es in 30min aushärtete. Anschließend wurde analog mit dem 3%igen Sammelgel verfahren (siehe Tabelle1). Nach dem Füllen der Kammer mit dem aufgeschichteten Sammelgel wurde ein zehntaschiger Gelkamm gesteckt, und das Gel härtete aus.

Die SDS-Elektrophoresekammer wurde aus zwei Gießkammern und dem Gehäuse zusammengesetzt und mit Laufpuffer gefüllt. Die Taschen des Geles wurden nun mit maximalen Probenvolumina (ca. 40µl/Tasche) gefüllt. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5µl der BioRad Prestained SDS-Page Standard Low Range Leiter eingesetzt. Die Trennung der Proteine im elektrischen Feld erfolgte in zwei Phasen. Der Sammelgelphase (36min, 220V, 10mA/Gel) und der Trenngelphase (90min, 220V, 20mA/Gel).

| Bestandteile                       | Trenngel 10%ig (µl) | Sammelgel 3%ig (µl) |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Bis-/Acrylamid 0,5:29              | 2.140               | -                   |
| Bis-/Acrylamid 0,7:26              | -                   | 288                 |
| Ammoniumpersulfat (APS) 10%ig      | 75                  | 30                  |
| Dodecylsulfate-Na-Salt (SDS) 10%ig | 125                 | 25                  |
| 1,5M Tris-HCl pH 8,8               | 1.563               | -                   |
| 0,5M Tris-HCl pH 6,8               | -                   | 625                 |
| TEMED                              | 20                  | 10                  |
| H <sub>2</sub> O                   | 2.283               | 1.540               |

*Tab. 1: Zusammensetzung der SDS-Gele*

### 2.4.3. Blotting

Beim "Blotting" überführte man die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteinbanden aus dem SDS-Gel auf eine Protan<sup>®</sup> Nitrocellulosemembran. Das SDS-Gel wurde in Transferpuffer gebracht und seine Fläche minimiert. Vier Stücke Gel Blotting Papier, sowie eine Protan<sup>®</sup> Nitrocellulosemembran wurden in Gelgröße zugeschnitten, mit Transferpuffer angefeuchtet und im Fast Blot<sup>®</sup> Transfergerät in der folgenden Reihenfolge geschichtet: Bodenelektrode, zwei Blot-Papiere, Nitrocellulosemembran, SDS-Gel, zwei Blot-Papiere, Deckelektrode. Der Proteintransfer im elektrischen Feld erfolgte bei 2 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche in 30min.

### 2.4.4. Färbung mit Erst- und Zweitantikörper

Die Nitrocellulosemembran wurde in Blockierungslösung überführt und unspezifische Bindungsstellen durch diese binnen zwei Stunden abgesättigt. Währenddessen wurde der Erstantikörper (MAB 1965, monoclonal mouse anti human  $\beta$ 1-integrin) ausgehend von der Stammlösung (2,4mg/ml) 300fach mit Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Nitrocellulosemembran und verdünnter Antikörper wurden zusammen in einer Kunststofftasche eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran für je 10min erst zweimalig in Blockierungslösung und dann in Waschpuffer für den Zweitantikörper (anti mouse IgG HRP conjugate) vorbereitet. Er wurde in die oben erwähnte Antikörperverdünnungslösung in einer Konzentration von 1:25.000 eingesetzt und die Membran mit dem Ansatz 2h inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten von je 10min in Waschpuffer wurde die Membran kurz unter Seralwasser abgeschwenkt und der Versuch in der Dunkelkammer fortgesetzt.

### 2.4.5. ECL-Detektion

Die Detektion des mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte mit Hilfe der ECL-Reagenzien<sup>™</sup>. Eine Mischung aus gleichen, raumtemperierten Volumina Reagenz I+II (0,2ml/cm<sup>2</sup> Blot) wurde für 60sec auf die Blotmembran aufgebracht. Das Reagenz wurde abgetropft und die Membran in Seran<sup>®</sup> Folie eingeschlagen. Die Ober-

seite der lumineszierenden Membran kam bei Rotlicht in einer Fotokassette auf dem Hyperfilm™ ECL™ zum Liegen. Die Filme wurden sukzessive 2, 5, 45min und 12h belichtet. Der Film wurde danach jeweils 60sec im Röntgen-Rapid-Entwickler entwickelt, ausgiebig in Aqua dest. gewaschen, 60sec im Röntgen-Rapid-Fixierer fixiert und nochmals im Wasserbad von Rückständen gereinigt. Der fertige Film wurde mehrere Stunden luftgetrocknet und dann ausgewertet.

## 2.5 Immunfluoreszenz

### 2.5.1. Zellfixierung

Alle Zellen wurden bis zu ihrer Fixierung analog dem Protokoll für die Migrationsexperimente <sup>(vgl. Absatz 2.6.2)</sup> behandelt, um sie mit diesen morphologisch zu korrelieren.

Immunfluoreszenzobjektträger wurden bei 37°C für 60min mit humanem Plasma-Fibronektin der Verdünnungsstufen (200/100/10/1 µg/ml in Aqua dest.) beschichtet, die "Glas"-Felder blieben unbeschichtet. Im Brutschrank wurden 20µl der Neutrophilensuspension in PBS für 5min auf die Felder gebracht und dort mit fMLP stimuliert. Das Präparat wurde nun 10min in 4°C kaltem 3,5%igen Paraformaldehyd (PFA) und anschließend 30min in raumtemperiertem PFA fixiert. Nach mehrmaligem Auswaschen des PFA in PBS begann der Färbeschritt.

### 2.5.2. Färbung mit Erst- und Zweitantikörper

Der Objektträger wurde 15min in einer 100mmol/l Glycin enthaltenden PBS-Lösung vorbehandelt und unspezifische Bindungsstellen 30min durch Aufbringen von 10%igem Ziegennormalserum (ZNS) maskiert. Der Erstantikörper (MAB 1965) gegen β1-Integrin wurde mit 10%igem ZNS auf 1:200 verdünnt und je 20µl dieses Ansatzes auf die von einem Feuchtigkeitfilm bedeckten Löcher gegeben. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die vor Licht geschützte 45min Inkubation mit dem cy3-gekoppelten Zweitantikörper in einer Verdünnungstufe in ZNS von 1:100.

Auf jedem Objektträger wurde die unspezifische Bindungsaffinität des Zweitantikörpers durch dessen alleinige Auftragung in einem Kontrollfeld überprüft. Zellen der Negativ-

kontrolle kamen an dieser Stelle erstmals in Antikörperkontakt, nachdem zuvor ausschließlich der Inkubationsschritt mit dem Erstantikörper ausgelassen worden war. Nach mehrfachem Waschen des Präparates mit PBS wurde es 10min mit 3,5%igem PFA nachfixiert und letztmalig mit PBS gewaschen. Das Präparat wurde durch einen Vectashield-film zwischen Objektträger und Deckglas versiegelt und bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

### 2.5.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzaufnahmen entstanden mit Hilfe des Zeiss IM 35 Mikroskops bei 630facher Vergrößerung (63fach Objektiv, 10fach Okular). Die Belichtungszeit der in dieser Arbeit gezeigten Bilder betrug 778ms bei einer Anregungswellenlänge von 552nm und einer Emissionswellenlänge von 565nm. Über eine lichtempfindliche digitale Kamera (ORCA, Hamamatsu) wurden die Bilder in einem PC mit Hilfe des Programmes Aquacosmos® 1.3 digital aufgezeichnet und archiviert.

## 2.6 Migrationsexperimente

Das Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten wurde anhand videomikroskopischer Zeitrafferaufnahmen der Zellbewegungen untersucht. Dazu wurden die Zellen auf fibronectinbeschichtete Glasobjektträgern aufgebracht, und chemokinetisch stimuliert. Ihre Wanderung während der Superfusion mit der Kontrollösung in der initialen Phase des Experimentes wurde mit der unter Zusatz des kanalspezifischen Hemmstoffes oder Aktivators im zweiten Teil des Versuches verglichen. In der computergestützten Auswertung konnten die gepaart durchgeführten Versuche hinsichtlich Geschwindigkeit und Bewegungsrichtung der Zellen untersucht werden. Jede Versuchsserie wurde an drei Versuchstagen mit neutrophilen Granulozyten dreier unterschiedlicher Spender durchgeführt.

### 2.6.1 Versuchsaufbau

Auf dem Phasenkontrastmikroskop Zeiss ID 03 wurden spezielle, selbstgefertigte Glasobjektträger mit Kunststoffrand über eine Mikropipettenspitze mit Lösungen superfun-

diert. Eine weitere in die Objektträgerlösung tauchende Pipettenspitze wurde an eine Vakuumpumpe angeschlossen, um nach dem Überlaufprinzip Medium kontinuierlich vom Deckglas abzusaugen. Der dabei entstehende Volumenumsatz wurde auf 1,2ml/min und eine konstante Strömungsrichtung standardisiert und gewährleistet bei einem Gesamtvolumen von ~1ml auf dem Objektträger ein rasches Anfluten der Testsubstanzen. Ein Wasserbad im zuführenden Superfusionsschenkel sorgte für die einheitliche Temperatur von 36-37°C auf dem Deckglas. Die Versuche wurden mit einer am Mikroskop installierten Videokamera (Hamamatsu XC-ST70CE, Hamamatsu, Herrsching, D) aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte anhand dieser Videosequenzen <sup>(siehe 2.6.3)</sup>.

### 2.6.2 Versuchsablauf

Vorbereitung der Superfusionslösungen: Die Superfusionslösungen der in Tabelle 2 gezeigten Konzentrationen wurden auf der Basis einer Ringerlösung hergestellt. Diese wurde jeweils am Versuchstag aus den in Tabelle 3 aufgeführten Bestandteilen angesetzt, bei Raumtemperatur auf einen pH-Wert von 7,40 titriert und bis zum Versuchsbeginn bei 4°C aufbewahrt. Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der darüber hinaus verwendeten Stammlösungen des hIK1-Hemmstoffes Clotrimazol, hIK1-Aktivators 1-Ethyl-2-Benzimidazolone (1-EBIO) und des Chemokins Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) neben der jeweiligen Endkonzentrationen der Substanzen in den fertigen Superfusionslösungen. Der Kontrolllösung wurde ebenfalls das Lösungsmittel DMSO in einer den Versuchslösungen entsprechenden Konzentration zugesetzt, nachdem zuvor ein Effekt von DMSO auf die Migration ausgeschlossen worden war.

| Substanz    | Konzentrationen der Versuchslösungen (µmol/l) | Konzentrationen der Stammlösungen (mmol/l) |
|-------------|---|--|
| Clotrimazol | 1   | 5 (in DMSO)                                |
| 1-EBIO      | 100   | 500 (in DMSO)                              |
| fMLP        | 0,01  | 1,25 (in EtOH)                             |

*Tab. 2: Konzentrationen der Stamm- und Versuchslösungen*

In einem Kontrollexperiment wurde eine Variation der Osmolarität ohne Zusatz der kanalspezifischen Substanzen durchgeführt. Die dabei verwendeten Perfusionslösungen zeigt ebenfalls Tabelle 3.

| Bestandteile  | Isotone Ringer-<br>lösung (mmol/l) | Hypotone Ringer-<br>lösung (mmol/l) | Hypertone Ringer-<br>lösung (mmol/l) |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| NaCl  | 122,5                              | 72,5                                | 122,5                                |
| KCl   | 5,4                                | 5,4                                 | 5,4                                  |
| MgCl  | 0,8                                | 0,8                                 | 0,8                                  |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 1,2                                | 1,2                                 | 1,2                                  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O | 1,0                                | 1,0                                 | 1,0                                  |
| Glucose   | 5,5                                | 5,5                                 | 5,5                                  |
| Mannitol  | -                                  | -                                   | 100,0                                |
| HEPES   | 10,0                               | 10,0                                | 10,0                                 |
| pH  | 7,4                                | 7,4                                 | 7,4                                  |

*Tab. 3: Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösungen verschiedener Osmolarität*

Vorbereitung der Zellen auf den Deckgläsern: Es wurden 150-250µl der frisch isolierten neutrophilen Granulozyten aus der PBS-Zellsuspension auf einem Deckglas mit 750-850µl vorgewärmter Ringer-Lösung aufgebracht. Während der jeweils 5min betragenden Adhäsionszeit und der 5min chemokinetischen Vorstimulation mit fMLP befand sich das Deckglas im Brutschrank (37°C, Raumluft). Diese Zeiten mussten exakt eingehalten werden, da sich bei Verkürzung eine unzureichende Adhäsion der Zellen während der Experimente ergab und bei Verlängerung die Vitalität der Zellen und ihre Migrationsfähigkeit litten.

Jedes Migrationsexperiment bestand aus zwei Phasen. Einer initialen 3-5min Kontrollphase unter Perfusion mit Kontrolllösung und einer sich unmittelbar anschließenden 10-12min Versuchsphase unter Zusatz des hIK1-Aktivators 1-EBIO bzw. hIK1-Hemmstoffes Clotrimazol. Der Wechsel der auf 36-37°C vortemperierten Lösungen erfolgte nahtlos

durch Umlegen eines Dreiwegehahnes im Superfusionsschenkel. Jede Zelle konnte daher „gepaart“, d.h. zunächst ohne und dann mit Testsubstanz, in einer Videosequenz aufgezeichnet werden. Die Auswahl der beobachteten Zellen (7-15 / Versuch) erfolgte zufällig, allerdings wurden Blickfelder vergleichbarer mittlerer Zelldichte gewählt. Zell-Zell-Interaktionen bei hoher Dichte bzw. mangelhafte Größe der Stichprobe bei geringer Dichte wurden so vermieden. Die „zufällig“ beobachteten Zellen entsprachen damit einem repräsentativen Querschnitt der gesamten Zellpopulation. Nur bei Versuchsbeginn migrierende Zellen wurden gewertet, wobei Migration als superfusionsunabhängige gerichtete Bewegung der Vorder- und Hinterkante der Zellen definiert wurde. Analog zu Experimenten anderer Arbeitsgruppen musste die Bewegung auf der Standardbeschichtung von 100µg/ml Fibronectin mindestens 6µm in den ersten 3min der Versuches betragen<sup>25, 28</sup>. Die Superfusionsapparatur wurde nach Abschluss des Versuches gründlich von Rückständen der Versuchslösungen gereinigt und die neuen Superfusionslösungen in ihr vortemperierte.

### 2.6.3 Versuchsauswertung und Statistik

Anhand der Videoaufzeichnungen wurden Standbilder der Zellbewegung in Intervallen von 1 bzw. 2min Abstand mit Hilfe der Software JAVA<sup>®</sup> 1.0 ausgewertet. Für jede Zelle wurden die Koordinaten der Zellmittelpunkte dieser Standbilder als xy-Datensätze ermittelt und aus ihnen die zurückgelegten Strecken (nach Pythagoras:  $\delta s = \sqrt{\delta x^2 + \delta y^2}$ ) und Geschwindigkeiten (als:  $v = s/t$ ) errechnet. Die Ergebnisse wurden im Graphikprogramm Sigmaplot<sup>®</sup> 4.0 statistisch ausgewertet und dargestellt.

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM festgehalten. Signifikanzen wurden mit dem Student's t-test für gepaarte und ungepaarte Stichproben bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ermittelt.

### 2.7 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen

Die digitalisierten Abbildungen der Zellmorphologie auf verschiedenen Substraten wurden mit der Software HiPic<sup>®</sup> (High Performance Image Control System) von Hama-

matsu aus analogen Videobildern erstellt. Der Aufbau entsprach dem der Migrationsexperimente, wobei anstelle des Videorekorders ein PC die Kamerasignale empfing.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Zellisolation (Vitalität, Reinheit, Volumen)

Die Zellisolation lieferte neutrophile Granulozyten, die in der Giemsa-Färbung eine Reinheit von >96% aufwiesen. In der Trypanblaufärbung waren die Zellen durchweg vital. Ihr durchschnittliches Zellvolumen betrug physiologische 428 fl. Und es konnte an allen Versuchstagen mit vergleichbaren Konzentrationen der Zellen (5-10 Zellen/Blickfeld) in den Experimenten gearbeitet werden.

#### 3.2 Antikörperspezifität im Western-Blot

Die Isolation der Neutrophilen von rund 3h Dauer belastete die Zellen physikalisch erheblich und war mit der Freisetzung zytotoxischer Stoffe aus Granula abgestorbener Zellen verbunden. Die Vitalität der Zellen allein stellte bei Exposition gegenüber diesen Inhaltsstoffen noch nicht sicher, dass wichtige Oberflächenmarker in funktionsfähiger Konformation erhalten blieben. Deshalb sollte exemplarisch für die membranständigen Proteine das für die in der Folge durchgeführte Migration auf Fibronectin wichtige  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin mit einem spezifischen Antikörper (MAB 1965, monoclonal mouse anti human  $\beta_1$ -integrin) gegen die vital-konformierte  $\beta_1$ -Untereinheit dargestellt werden <sup>(vgl. Abbildung 5)</sup>. Der Antikörper wurde mittels Western Blot auf seine Epitopspezifität getestet. Als Proben wurde neben dem Proteinlysat neutrophiler Granulozyten auch zytoskelettale Bestandteile dieser Zellen und eine weitere Probe aus kultivierten humanen MV3 Melanomzellen untersucht.

Der Western-Blot bestätigte die Spezifität des Antikörpers für die  $\beta_1$ -Untereinheit <sup>(Abbildung 6)</sup>. Die in der Abbildung links aufgetragene Probe aus Melanomzellen zeigt die charakteristische Bande bei etwa 110kd. Das in der benachbarten Spur aufgetragene Neutrophilenlysate und die Probe aus zytoskelettalen Elementen der Granulozyten blieben hingegen auch nach mehrfacher Modifizierung des Versuchsprotokolls ohne Banden. Da die aufgetragene Proteinmenge mit rund 80 $\mu$ g nachweislich ausreichend groß war, mußte man zu diesem Zeitpunkt davon ausgehen, dass das Integrin in den Neutrophilen nicht vorhanden war oder seine vitale Konformation verloren hatte und

deshalb nicht mehr für den Antikörper erkennbar vorlag. Sollte es sich um die nach Angaben des Antikörperherstellers sehr wahrscheinliche Konformationsänderung durch während der Herstellung der Proben freigesetzte zytotoxische Zellgranula handeln, konnte man für die nun durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung nicht lysierter Zellen eine spezifische Anfärbung erwarten.

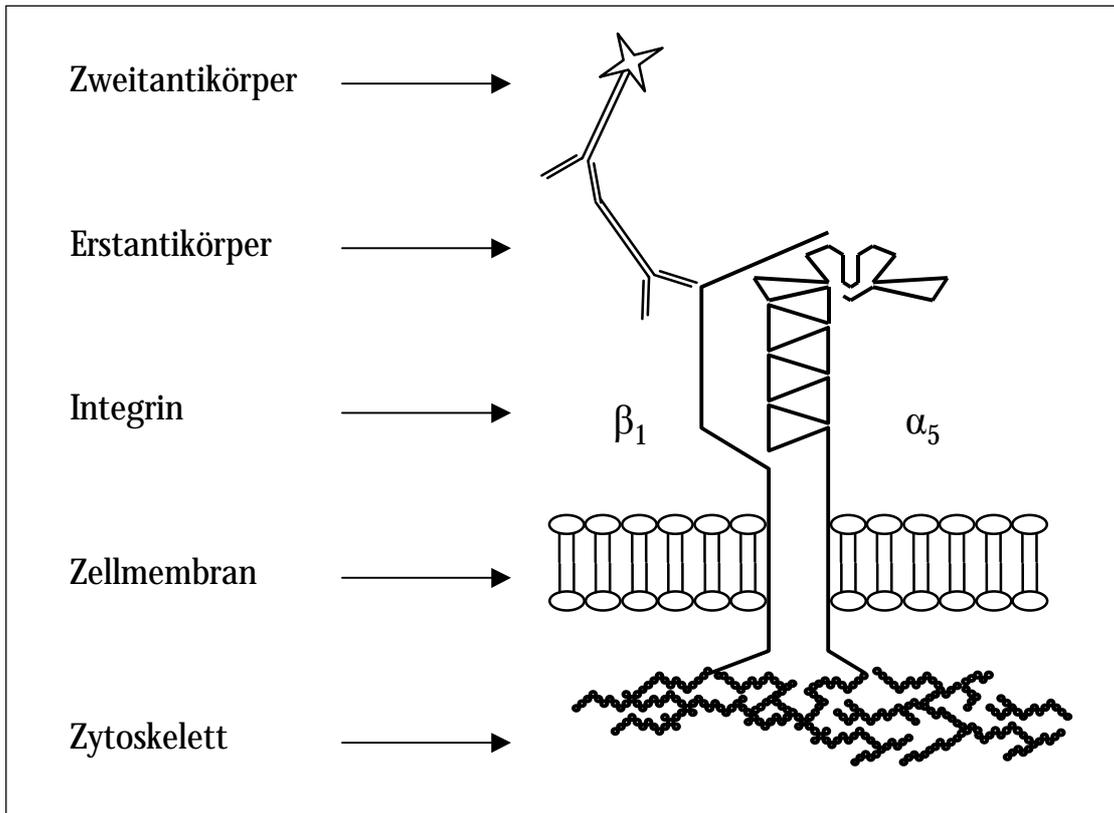


Abbildung 5.: Das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin dient den neutrophilen Granulozyten als Fibronektinrezeptor bei ihrer Migration. Das heterodimere Transmembranmolekül weist je eine nicht kovalent gebundene  $\alpha_5$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit mit stark variierenden Glykosilierungen auf. Seine Verankerung am Zytoskelett erlaubt die Zellbewegung durch Übertragung dort erzeugter Kräfte auf die Matrix. Die vital konformierte  $\beta_1$ -Untereinheit des Proteins wurde mittels Immunfluoreszenz dargestellt.

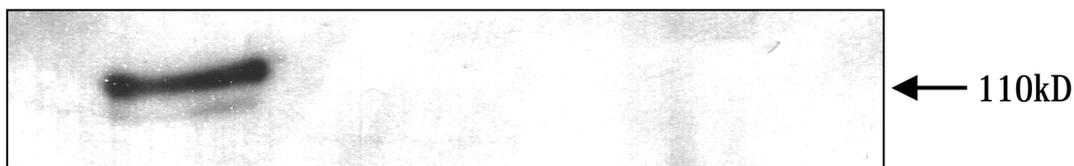


Abbildung 6.: Der Western-Blot zeigt die spezifische Bande der  $\beta_1$ -Untereinheit der MV3 Melanomzellprobe (links) mit darunter angedeutet zu erkennenden Spuren eines zusätzlichen Glykosilierungszustandes. Daneben die negativen Spuren des Neutrophilenlysates (mittig) und der zytoskelettalen Neutrophilenfraktion (rechts).

### 3.3 Integrinnachweis in der Immunfluoreszenz

Das Vorhandensein des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins auf der Zelloberfläche von unpermeabilisierten Neutrophilen wurde nach dem für das Neutrophilen- $\beta_1$ -Integrin negativen Western-Blot in einem zweiten Schritt durch Immunfluoreszenz mit dem identischen Antikörper untersucht. Bei den fixierten, unpermeabilisierten Zellen kamen einzig auf der Zelloberfläche exprimierte Proteine zur Anfärbung, ohne mit den schädigenden Proteasen lysierter Neutrophiler in Kontakt gekommen zu sein.

Die Immunfluoreszenz ergab eine spezifische Anfärbung des  $\beta_1$ -Integrins auf der Zelloberfläche der Neutrophilen. Abbildung 7 zeigt in direktem Vergleich eine Anfärbung auf zwei verschiedenen Fibronectinbeschichtungen (100 $\mu$ g/ml und 1 $\mu$ g/ml). Insbesondere bei letzterer zeigten sich am Zellrand Strukturen, wie sie typisch für fokale Adhäsionskomplexe sind. Damit war neben der Expression des Integrins auch dessen funktionstüchtige Konformation im Zellisolat gezeigt. Angesichts der intakten Oberflächenproteine waren hiermit alle wichtigen Voraussetzungen für die Migrationsexperimente gesichert.

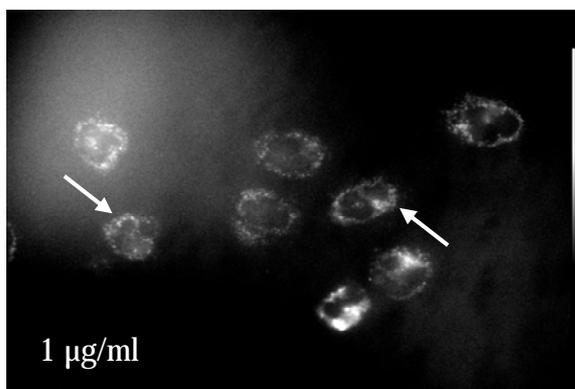
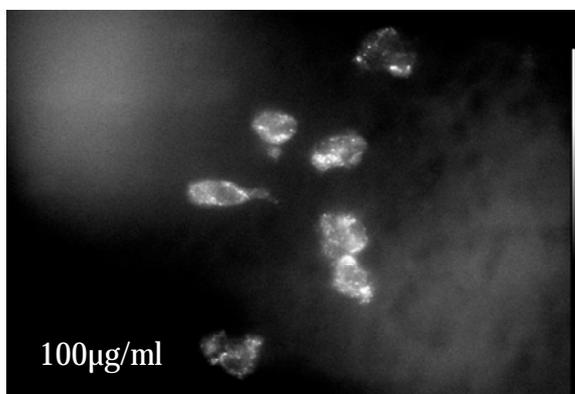


Abbildung 7.: Spezifische immunfluoreszente Anfärbung der  $\beta_1$ -Untereinheit in nichtpermeabilisierten Granulozyten. Dargestellt sind Präparate auf den Fibronectinbeschichtungen 100  $\mu$ g/ml (oben, amöboid konfiguriert) und 1  $\mu$ g/ml (unten, Pfeile: mgl. fokale Adhäsionskomplexe).

### 3.4 Migrationsexperimente

Die Migrationsexperimente konnten nach Ermittlung der Koordinaten der Zellmittelpunkte für jedes Versuchsintervall im Rahmen der Auswertung graphisch wiedergegeben werden. Die Superfusionsrichtung lag immer in Richtung der Abszisse des für die Auswertung der Migrationsversuche verwendeten kartesischen Koordinatensystems. Zum besseren Verständnis ist hier ein in Abbildung 8 visualisierter Versuchsverlauf auf Fibronectin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) exemplarisch wiedergegeben. In meinem Versuchsaufbau konnten die Zellen keinem Chemotaxingradienten folgen, so daß die wiedergegebene zufällige Richtungsverteilung ihres Bewegungsmusters die superfusionsunabhängige Migration zeigte und Effekte im Sinne eines „Rolling“-Phänomens ausschloß.

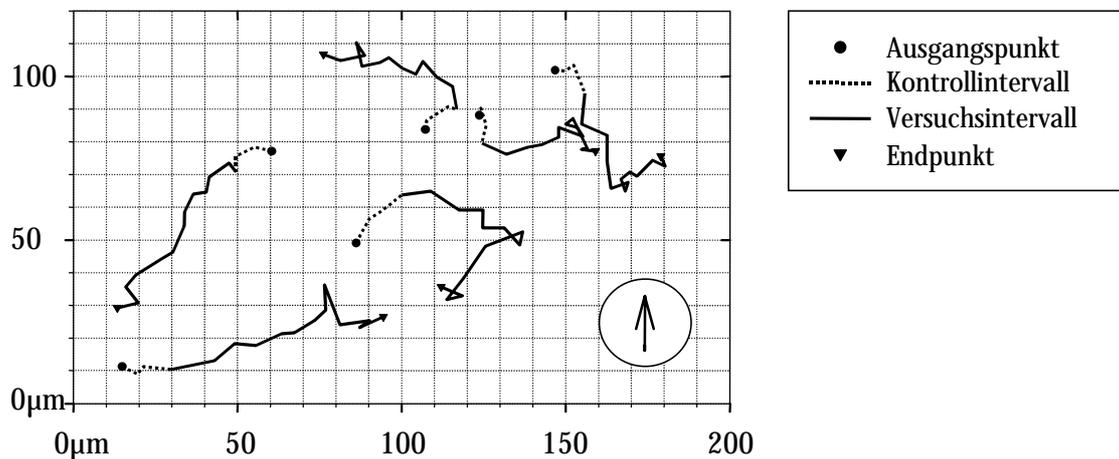


Abbildung 8.: Trajektorien migrierender Neutrophiler: Die Migration Neutrophiler auf Fibronectin erfolgt ohne Richtungspräferenz. (Kontrollphase 3min (gepunktet), Clotrimazol 1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ , 7min (durchgehend), Superfusionsrichtung durch Pfeil wiedergegeben).

In einem Kontrollexperiment konnte man auch das sofortige Ansprechen der Zellpopulation auf Veränderungen der Superfusionslösungen beobachten. Bei Verminderung der Osmolarität durch Entzug von 50mmol/l NaCl bzw. ihrer Erhöhung durch Hinzufügen von 100mmol/l Mannitol in der Versuchslösung gegenüber der Kontrolllösung kam es zum sofortigen Abfall der Migrationsgeschwindigkeit um rund 55% (hypoton) bzw. 30% (hyperton) gegenüber dem Kontrollintervall. In Abbildung 9 ist die bei diesen Versuchen in Abhängigkeit von der Zeit zurückgelegte Wegstrecke dargestellt. Man

erkennt das prompte Abknicken der Graphen bei Applikation der in ihrer Osmolarität veränderten Ringerlösungen.

Das Versuchssystem stellte somit ein geeignetes und sensibles Migrationsmodell dar, um Reaktionen der neutrophilen Granulozyten auf Veränderungen der Superfusionslösung anhand des Parameters Migrationsgeschwindigkeit zu beurteilen.

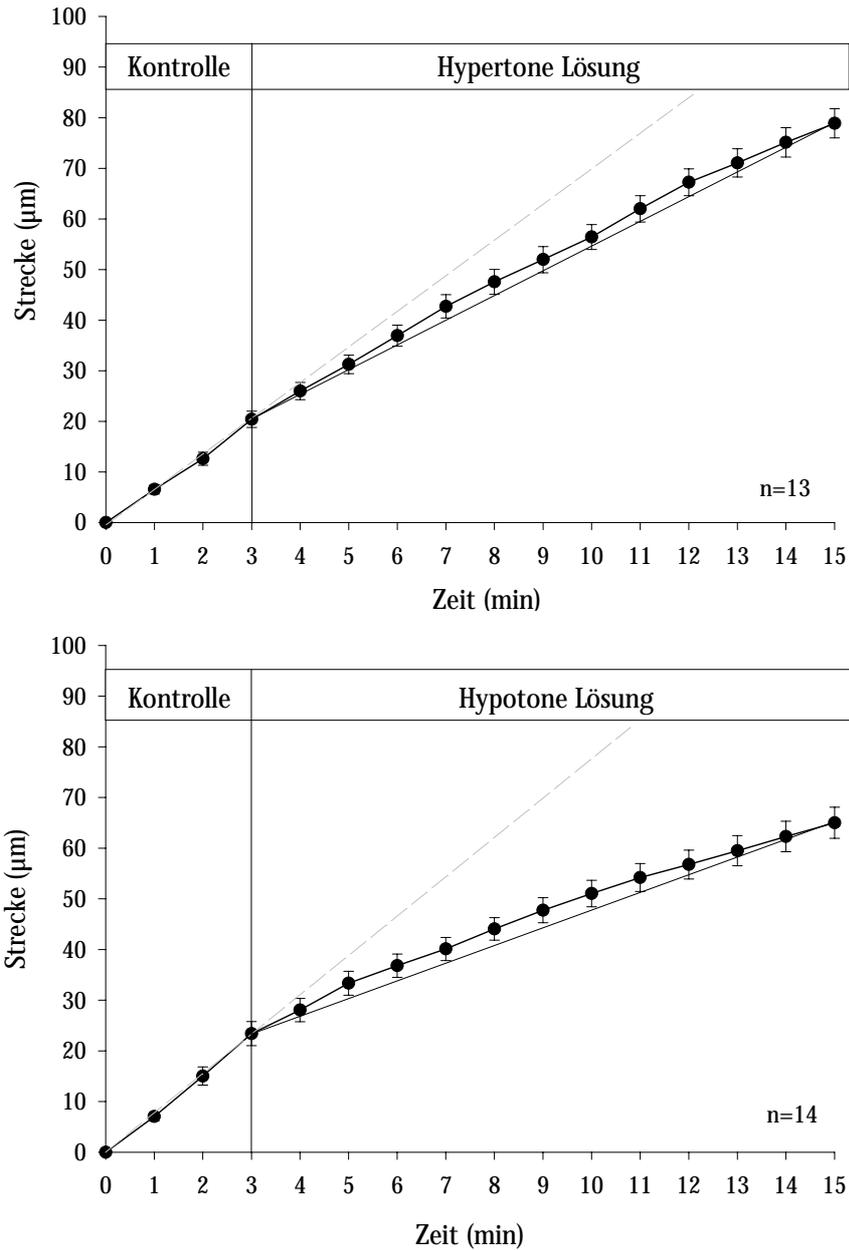


Abbildung 9.: Bei Veränderung der Osmolarität führten sowohl ein hypotones Medium (Entzug von 50mmol NaCl) als auch ein hypertones Medium (Zusatz von 100mmol Mannitol) zur sofortigen Verlangsamung der Zellen.

### 3.4.1 Kanalhemmung und -aktivierung auf Fibronectin (100µg/ml)

Die Migration der Neutrophilen wurde auf einem Deckglas der Fibronectinbeschichtung 100µg/ml beobachtet. Die Rolle der hHK1-Kanäle beurteilte ich durch Zugabe des Kanalhemmstoffs Clotrimazol bzw. des Kanalaktivators 1-EBIO. Diesem Versuch waren in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Migrationsexperimente an neutrophilen Granulozyten vorangegangen, die eine dosisabhängige Reduzierung der Migrationsgeschwindigkeit durch die hHK1 spezifischen Blocker Clotrimazol und Charybdotoxin ergeben hatten <sup>41</sup>. Den entscheidenden Unterschied zu meinen Versuchen bildete das Substrat Polylysin, das im menschlichen Organismus im Gegensatz zu Fibronectin nicht anzutreffen ist.

Die Zellpopulation war migratorisch außerordentlich aktiv, ließ sich aber überraschenderweise weder durch den Hemmstoff Clotrimazol (1µmol/l) noch durch den Aktivator 1-EBIO (100µmol/l) signifikant in ihrer Migrationsgeschwindigkeit beeinflussen. Abbildung 10 zeigt die Migrationsgeschwindigkeiten der neutrophilen Granulozyten während des Versuchsintervalls unter dem Einfluß von Clotrimazol bzw. 1-EBIO und der Kontrolle. Die Geschwindigkeiten wurden jeweils auf das initiale Kontrollintervall der Versuche bezogen. Man erkennt, daß die Zellen ihre Kontrollgeschwindigkeit während des Versuchsintervalls unverändert beibehielten und keine signifikante Änderung während der Aktivierung bzw. Hemmung der hHK1-Kanäle eintrat. Clotrimazol hatte dagegen auf Polylysin in gleicher Dosis eine Geschwindigkeitsreduktion der Neutrophilen um rund 80% bewirkt <sup>41</sup>. Dieses in zahlreichen Versuchsserien reproduzierte Versuchsergebnis ließ nur eine Schlußfolgerung zu:

Die Migrationsgeschwindigkeit neutrophiler Granulozyten auf Fibronectin (100µg/ml) ließ sich nicht signifikant durch pharmakologische Beeinflussung des Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kaliumkanals hHK1 beeinflussen, sie war kanalunabhängig.

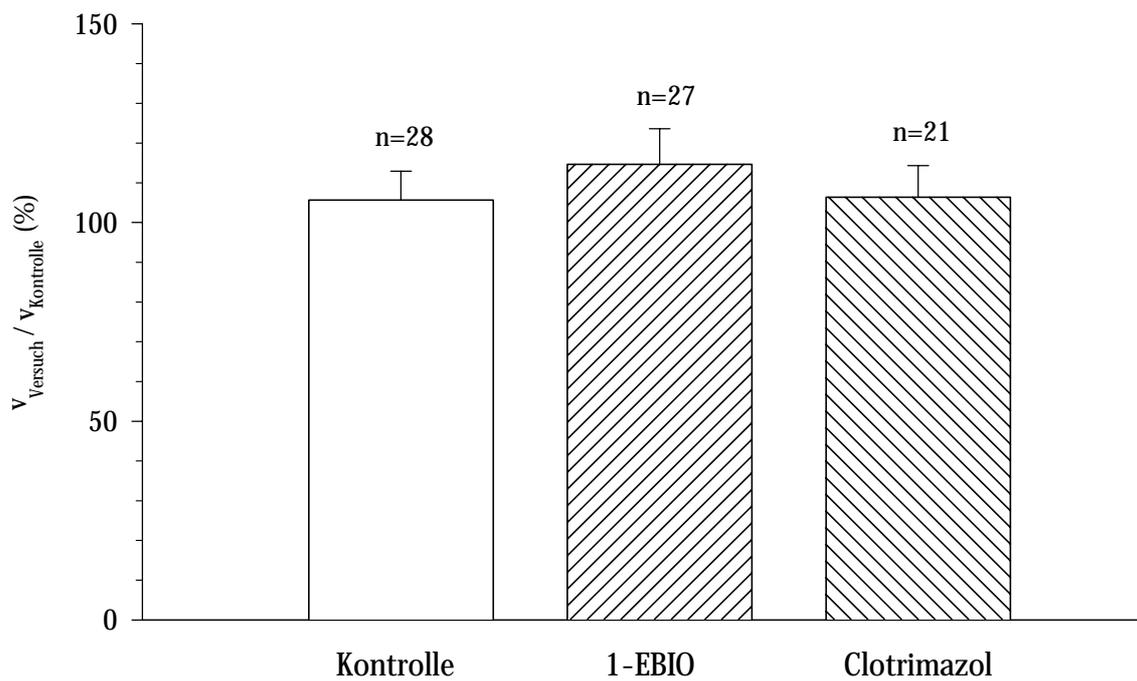


Abbildung 10.: Der kanalspezifische Hemmstoff Clotrimazol ( $1\mu\text{mol/l}$ ) und der Aktivator 1-EBIO ( $100\mu\text{mol/l}$ ) beeinflussen die Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten bei der Migration auf Fibronectin ( $100\mu\text{g/ml}$ ) nicht signifikant.

### 3.4.2 Morphologie und Geschwindigkeit bei Variation der Matrix

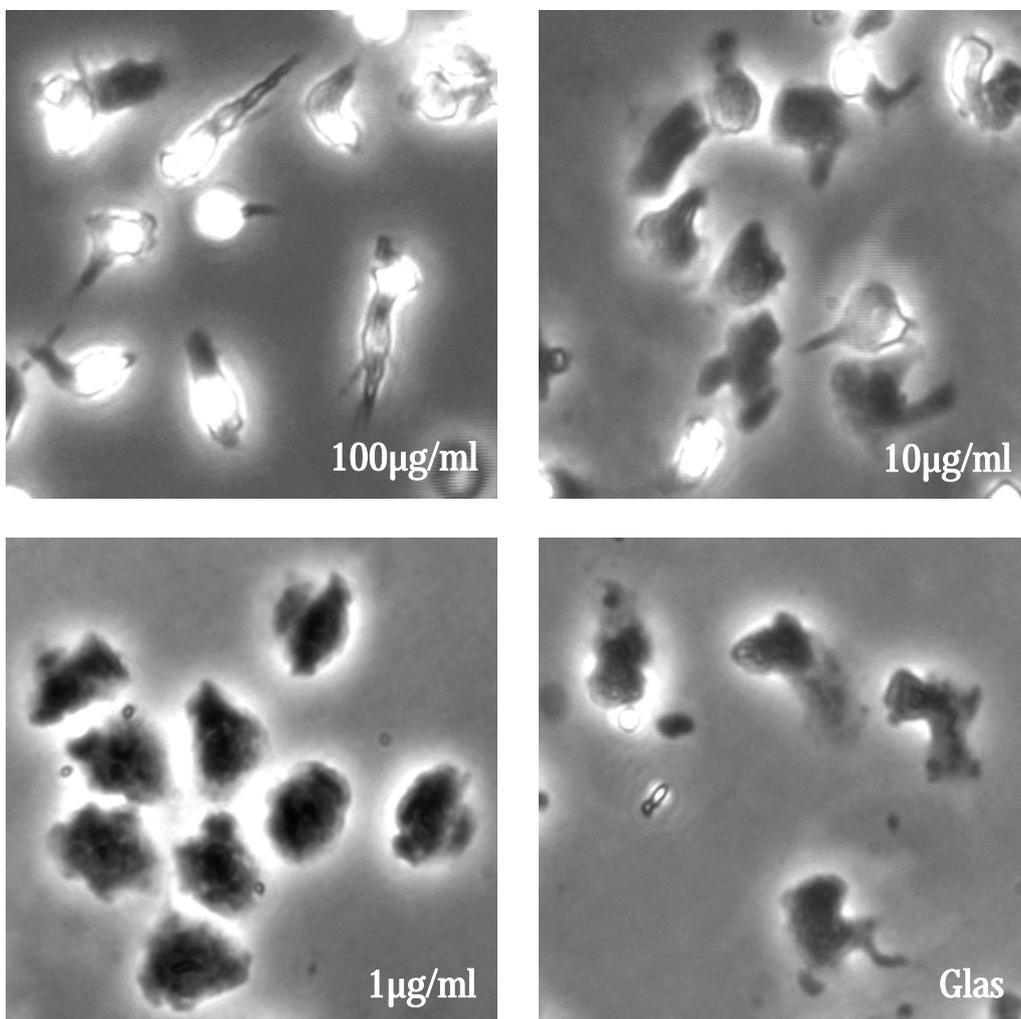
Es stellte sich nun die Frage, worin der bezüglich der hIK1-Kanalfunktion offensichtlich entscheidende Unterschied zwischen einer Migration Neutrophiler auf Fibronectin gegenüber Polylysin bestand. Zwei Aspekte schienen denkbar:

1. Verschiedenartige physikalische Eigenschaften, wie etwa die Adhäsivität des Substrates waren ausschlaggebend. So waren die Zellen auf Fibronectin (100µg/ml) mit rund 6µm/min mehr als doppelt so schnell wie bei den verwandten Experimenten auf Polylysin<sup>41</sup> und zeigten auf Fibronectin eine weniger adhärente, rein amöboide Morphologie.
2. Biochemische Eigenschaften der Matrixproteine waren für den Unterschied verantwortlich. Denkbar schienen die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden und daran gekoppelte Kanalaktivitäten.

Um zwischen diesen Alternativen differenzieren zu können, untersuchte ich den in meinem Versuchsaufbau leichter zu erfassenden Einfluß der physikalischen Parameter. Aus der Literatur war bekannt, dass Migrationsgeschwindigkeiten durch die Ligandenkonzentration (d.h. Fibronectinkonzentration), die Integrinkonzentration und die Integrin-Liganden-Bindungsstärke beeinflusst werden<sup>54</sup>. Die Integrin-Liganden-Bindungsstärke ist eine Konstante. Eine Variation der Integrinkonzentration wäre durch die abgestufte Zugabe blockierender Antikörper möglich gewesen. Ich variierte jedoch die Ligandenkonzentration, um die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der Neutrophilen auf ein „Polylysin-Niveau“ zu senken. Neben der Geschwindigkeitsreduktion wollte ich eine gleichzeitige Erhöhung der mechanischen Membranspannung durch ein verstärktes Abflachen der Zellen erzielen. Dies sollte die Öffnung mechanosensitiver Ca<sup>2+</sup>-Kanäle bewirken und die Aktivität des Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanals hIK1 maximieren (vgl. 1.2.2 Ionentransportproteine). Ich testete Fibronectinbeschichtungen der Konzentrationen 200, 100, 10, 1, 0µg/ml.

Die Zellen wiesen zu Beginn des Versuches in Abhängigkeit von der Fibronectinkonzentration sehr unterschiedliche Morphologien auf. Abbildung 11 zeigt die Zellen auf den verschiedenen Substraten in der Phasenkontrastmikroskopie. Man erkennt, daß

die Neutrophilen bei einer Beschichtung mit 100 $\mu$ g/ml Fibronectin eine amöboide Morphologie zeigten, d.h. langgestreckt und der Matrix nur locker anhaftend vorlagen und am Vorderende fingerförmige Ausstülpungen, sog. Pseudopodien aufwiesen. Auch die Zellen auf Beschichtungen mit 200 $\mu$ g/ml Fibronectin wiesen diese Morphologie auf. Senkte man die Konzentration des Fibronectins, veränderte sich das Erscheinungsbild graduell. Die Zellen adhärten auf der Suche nach einer ausreichenden Zahl von Adhäsionspunkten immer breitbasiger und wiesen dabei zunehmende Ähnlichkeiten zu migrierenden Fibroblasten oder MDCK-F-Zellen auf<sup>32, 39</sup>.



*Abbildung 11.: Morphologie neutrophiler Granulozyten auf Fibronectin. Die amöboide Morphologie der Neutrophilen bei 100 $\mu$ g/ml Fibronectin ging bei Abnahme der Fibronectinkonzentration zunehmend in eine Fibroblasten bzw. MDCK-F-Zellen ähnliche Form über.*

Mit den morphologischen Veränderungen der Zellen ging ein Anstieg ihrer Projektionsfläche von  $80 \pm 3 \mu\text{m}^2$  bei  $100\mu\text{g/ml}$  auf  $220 \pm 13 \mu\text{m}^2$  bei  $1\mu\text{g/ml}$  einher. Bei  $200\mu\text{g/ml}$  betrug sie  $81 \pm 3 \mu\text{m}^2$ , bei  $10\mu\text{g/ml}$   $136 \pm 8 \mu\text{m}^2$  und bei Glas  $206 \pm 11 \mu\text{m}^2$  (vgl. Abb. 12). Dieser Anstieg der Adhäsionsfläche bei verminderter Fibronektinkonzentration war mit einem Abfall der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit verbunden (vgl. Abb. 13). Die mittlere Geschwindigkeit von  $5,8 \pm 0,3 \mu\text{m/min}$  bei  $100\mu\text{g/ml}$  Fibronektin fiel über  $3,4 \pm 0,2 \mu\text{m/min}$  bei  $10\mu\text{g/ml}$ , auf  $2,2 \pm 0,1 \mu\text{m/min}$  bei  $1\mu\text{g/ml}$  ab. Auch eine Erhöhung der Fibronektinkonzentration auf  $200\mu\text{g/ml}$  ( $4,8 \pm 0,3 \mu\text{m/min}$ ) führte, wie meine Versuche auf Glas ( $2,7 \pm 0,2 \mu\text{m/min}$ ), zu einer Abnahme der Geschwindigkeit gegenüber dem Maximum bei  $100\mu\text{g/ml}$  Fibronektin. Es ergab sich somit für die Migration neutrophiler Granulozyten eine glockenkurvenförmige Verteilung der Durchschnittsgeschwindigkeiten bei Zunahme der Fibronektinkonzentration. Sie erreichte ein Maximum, wenn die Neutrophilen einerseits genügend Adhäsionspunkte mit der Matrix eingingen, an denen sich die Zellen vorwärts bewegen konnten, andererseits ihre Zahl nicht so hoch war, dass die Intensität der Bindung und das Lösen der Adhäsionspunkte die Zellbewegung bremste.

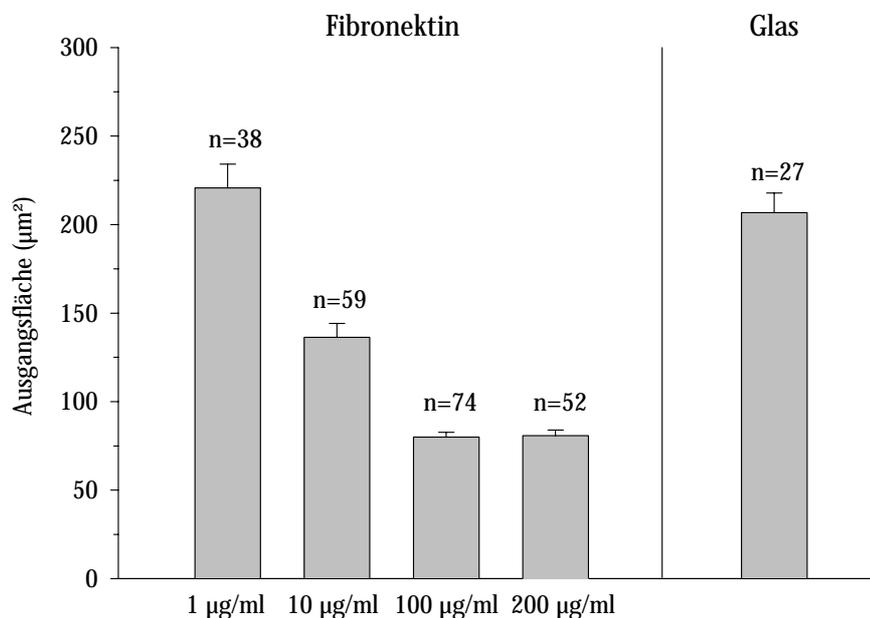


Abbildung 12.: Die Projektionsfläche neutrophiler Granulozyten verändert sich in Abhängigkeit von der Matrix. Bei Zunahme der Fibronektinkonzentration nahm die Fläche der Neutrophilen ab.

Die Projektionsfläche der Zellen verhielt sich gegensinnig zur Geschwindigkeit. Dieses Ergebnis dokumentierte für neutrophile Granulozyten die von PALECEK et al. für CHO B2-Zellen gemachten Aussagen zur Geschwindigkeit-Matrix-Korrelation<sup>54</sup>.

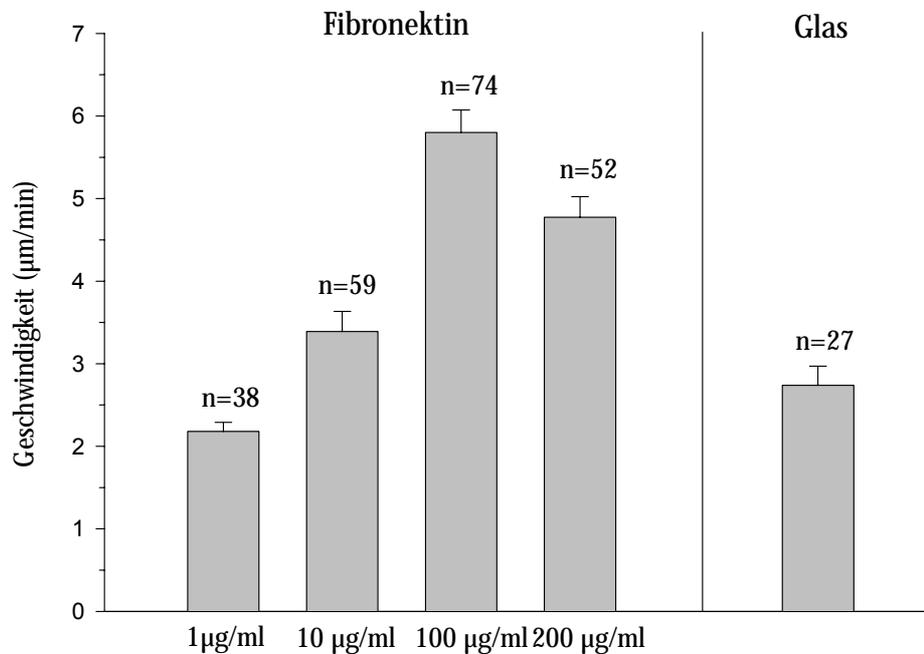


Abbildung 13.: Die Geschwindigkeit neutrophiler Granulozyten hängt von der Matrix ab. Mit Abnahme der Fibronectinkonzentration reduziert sich die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der Zellen.

Aus der Korrelation der Geschwindigkeiten der Zellen mit ihren Ausgangsflächen ergab sich, dass die Population auf 100µg/ml Fibronectin bei konstanter Fläche eine breite Streuung der Geschwindigkeiten aufwies<sup>(Abbildung 14)</sup>. Dem gegenüber zeigten die Zellen auf 1µg/ml Fibronectin eine homogene Durchschnittsgeschwindigkeit mit hoher Streuung der Projektionsflächen. Die Beschichtung mit 10µg/ml Fibronectin zeigte eine mittlere Varianz von Fläche und Geschwindigkeit und stand damit zwischen den beiden anderen Bedingungen. Hinzu kamen morphodynamische Unterschiede der Zellen. In den in Abbildung 15 festgehaltenen Bewegungssequenzen erkennt man, daß die schnelle Bewegung auf 100µg/ml Fibronectin „amöboid“ erfolgte. Die Zelle „huschte“ über das Substrat, Bewegungsaktivität im vorderen und hinteren Zellpol wechselten sich dabei sehr rasch ab. Die Zellen auf 1µg/ml Fibronectin hingegen zeigten eine durch langsamen,

kontinuierlichen Membranfluß gekennzeichnete Bewegung und ähneln mit ihrer breiten Membranfalte am führenden Zellpol auch in ihrer Dynamik migrierenden Fibroblasten oder MDCK-F-Zellen <sup>(Abbildung 15)</sup>.

Die Fibronektinkonzentrationen 100, 10, 1, 0µg/ml waren für das folgende Experiment entscheidende Punkte der Titrationskurve, da sich anhand einer rein „amöboiden“ (100µg/ml), einer „fibroblastenartigen“ (1µg/ml) und einer aus diesen beiden Bewegungsarten gemischten Population (10µg/ml) unterschiedliche Grade der mechanisch bedingten Membranspannung untersuchen ließen. Ein über die Aktivierung mechanosensitiver Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vermittelter Einfluß des hIK1-Kanals, der bei den vorangegangenen Versuchen mit rein amöboider Morphologie möglicherweise noch nicht zum Tragen gekommen sein konnte, sollte nun demaskierbar werden und entsprechend den graduell zunehmenden Scherkräften in abgestufter Ausprägung sichtbar werden.

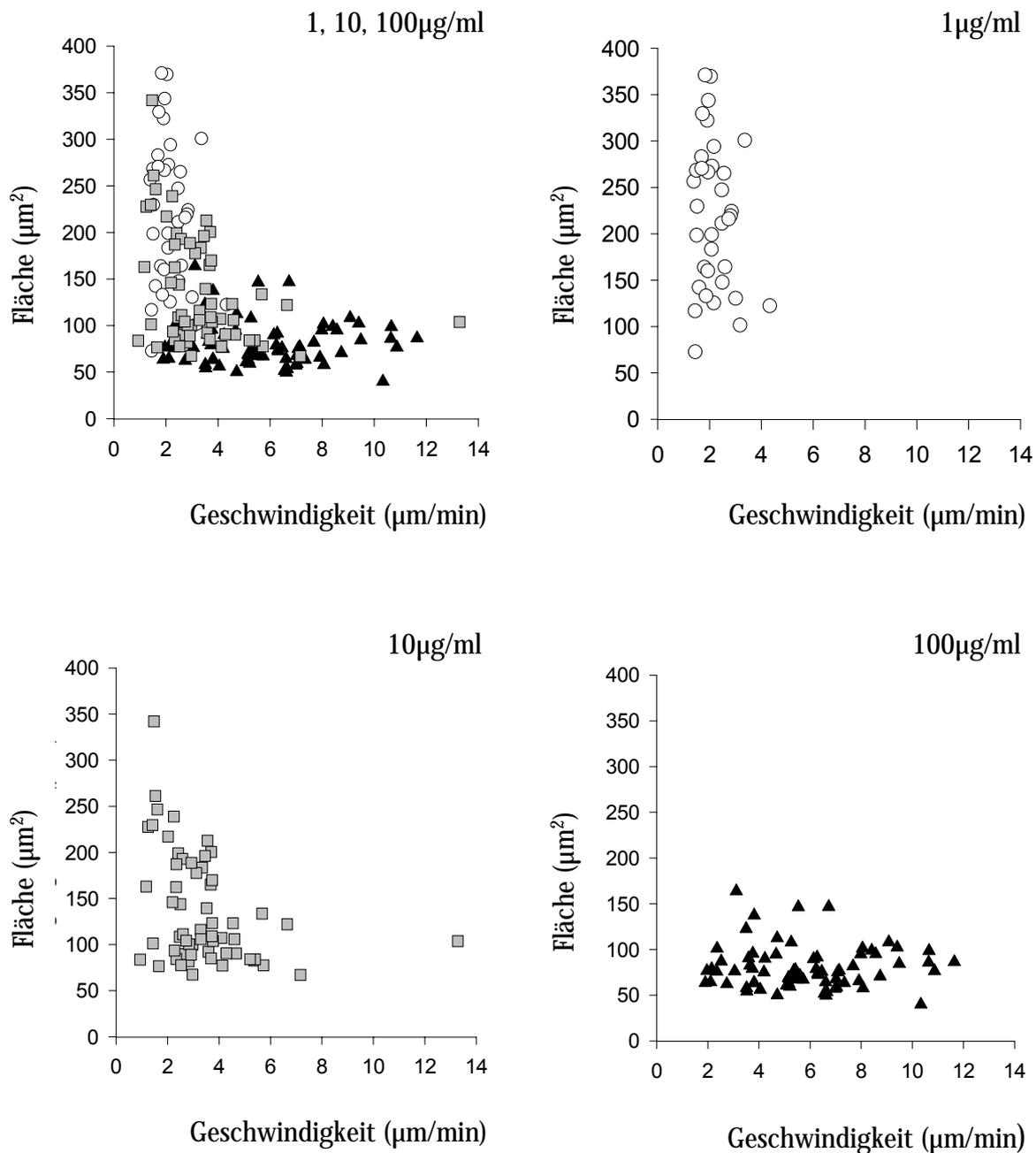
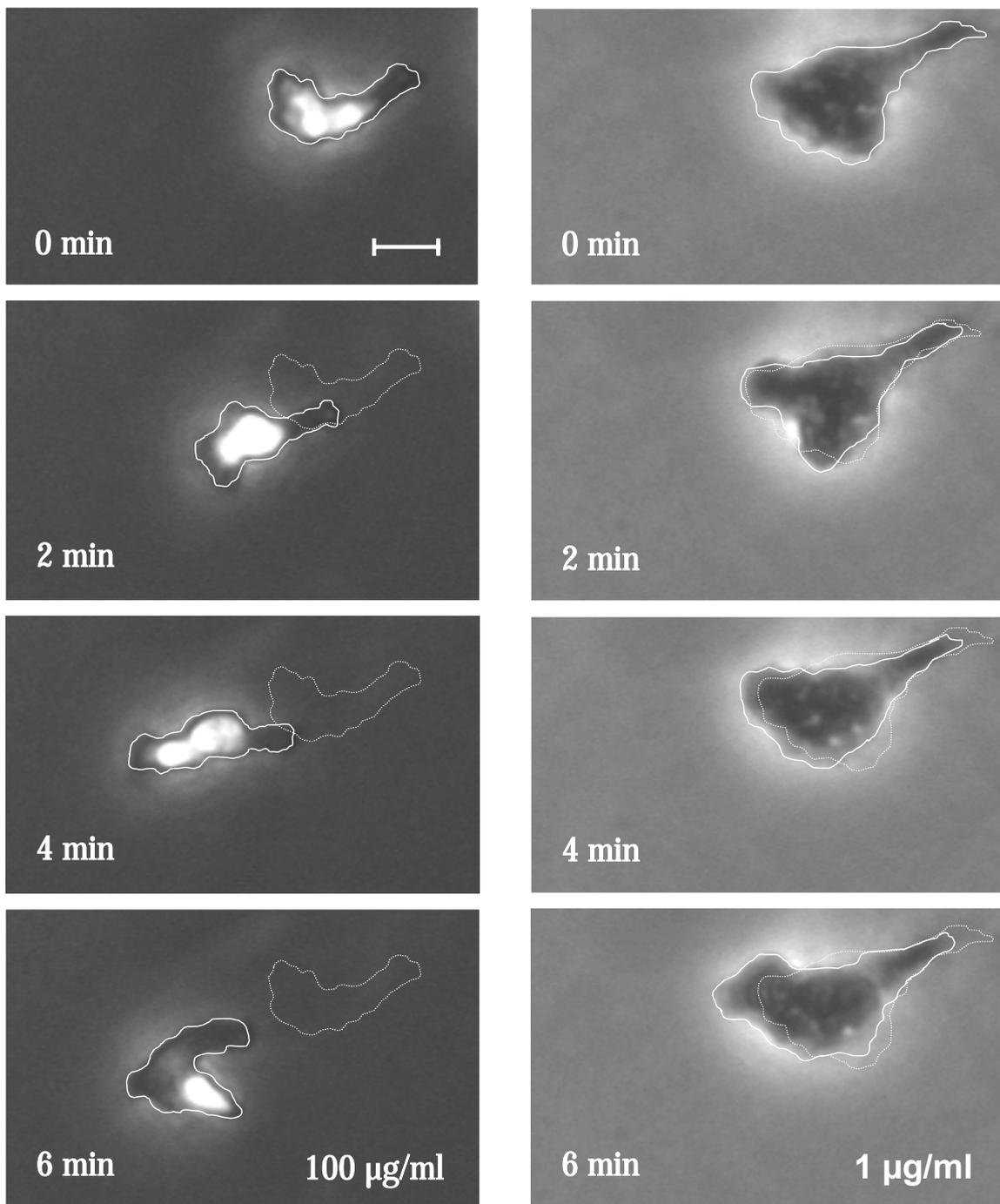


Abbildung 14.: Migrationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Projektionsfläche auf den verschiedenen Fibronectinbeschichtungen: Darstellung für die Gesamtpopulation (oben links), für die sich auf Fibronectin 1µg/ml rein "fibroblastenartig" bewegenden (oben rechts), auf Fibronectin 10µg/ml gemischt bewegenden (unten links) und die sich auf Fibronectin 100µg/ml rein "amöboid" bewegenden Granulozytenpopulationen (unten rechts).



*Abbildung 15.: Migrationssequenzen neutrophiler Granulozyten auf 100 µg/ml und 1 µg/ml Fibronectin. Die links dargestellte Zelle auf 100 µg/ml Fibronectin zeigt die amöboide Migrationsform. Die rechts gezeigte Migration auf 1 µg/ml Fibronectin verläuft deutlich langsamer und fibroblastenartig. (Maßstab: 10 µm)*

### 3.4.3 Kanalhemmung bei Variation der Matrix

Unter der Prämisse verschieden hoher hIK1-Kanalaktivierung bei verschiedener Membranspannung wurde die Migration bei unterschiedlich starken Fibronectin-beschichtungen (200, 100, 10, 1, 0 $\mu$ g/ml ) untersucht. Die Bedeutung des hIK1 wurde mit dem Hemmstoff Clotrimazol (1 $\mu$ mol/l) ermittelt:

Es ergab sich für alle Beschichtungen übereinstimmend keine signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens während des Versuchszeitraumes gegenüber dem Kontrollintervall. Abbildung 16 gibt die zurückgelegte Wegstrecke der Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Die vertikale Linie teilt die Graphen in das Kontrollintervall (links) und den Versuchszeitraum (rechts). Die Geschwindigkeit der Zellpopulation, ablesbar als Steigung des Graphen, wird nicht signifikant verlangsamt. Auch die Graphen der reinen Zeitkontrollen verdeutlichen durch ihren den Versuchspopulationen parallelen Verlauf, dass die Blockade des Kanals keine Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit auslösen konnte.

Die Migrationsgeschwindigkeit neutrophiler Granulozyten auf Fibronectin ließ sich demnach auch bei Variation der Fibronectinkonzentration nicht über die Hemmung des Ca<sup>2+</sup> abhängigen K<sup>+</sup>-Kanal hIK1 mittels Clotrimazol senken. Das bedeutete:

1. Der hIK1 K<sup>+</sup>-Kanal konnte nicht essentieller Bestandteil der zellulären Migrationsmaschinerie neutrophiler Granulozyten sein.
2. Die auf Polylysin beobachtete Hemmung durch hIK1-Blockade konnte nicht alleine durch physikalische Parameter wie Adhäsivität oder Geschwindigkeit der Neutrophilen erklärt werden.

Diese Befunde sollen neben methodischen Aspekten im folgenden Kapitel diskutiert werden.

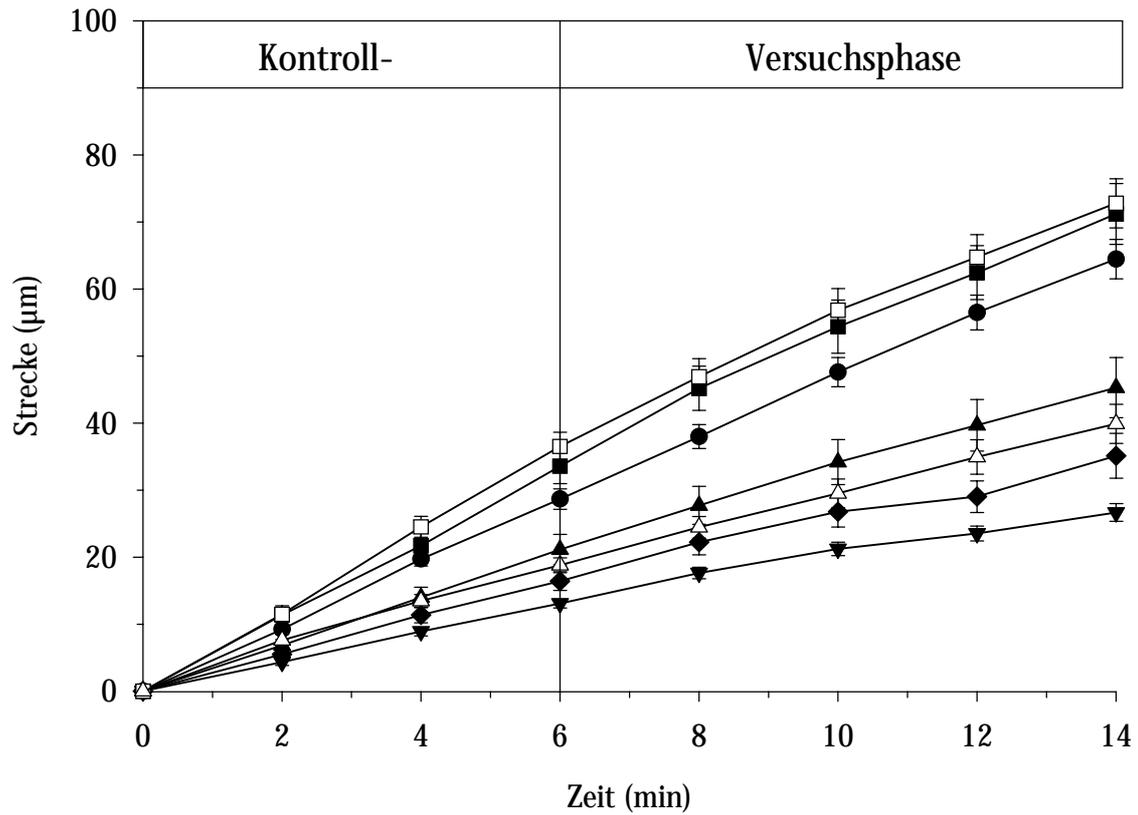
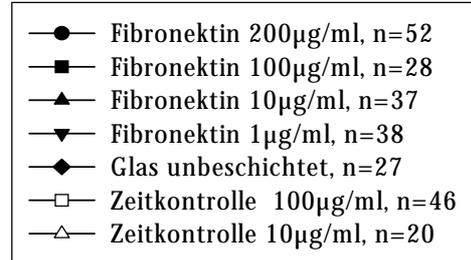


Abbildung 16.: Die Migration neutrophiler Granulozyten auf den verschieden hoch konzentrierten Beschichtungen mit Fibronectin verläuft unbeeinflusst durch die Gabe des Kanalhemmstoffes Clotrimazol. Die über die Zeit zurückgelegte Wegstrecke der Zellpopulation zeigt eine kontinuierliche Zunahme.



## 4. Diskussion

### 4.1. Einführung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanals hIK1 auf die Migration humaner neutrophiler Granulozyten zu untersuchen. Die Versuche fanden auf dem physiologischen Matrixprotein Fibronectin statt. Es wurde dabei zunächst der Nachweis des intakten Fibronectinrezeptors  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin auf der Zellmembran der aus Spenderblut isolierten Neutrophilen erbracht und in der Folge deren Migration auf Fibronectinbeschichtungen verschiedener Konzentrationen untersucht. Durch Applikation des kanalspezifischen hIK1-Hemmstoffes Clotrimazol bzw. des ebenfalls spezifischen hIK1-Aktivators 1-EBIO wurde der Einfluß des Kanals hIK1 auf die Migrationsgeschwindigkeit analysiert.

Dieser Arbeit vorangegangene, analoge Versuche auf dem Substrat Polylysin hatten eine dosisabhängige Geschwindigkeitsreduktion migrierender Neutrophiler um bis zu 80% durch die spezifischen hIK1-Kanalblocker Clotrimazol und Charybdotoxin ergeben<sup>41</sup>. Daraus hatte man gefolgert, daß der aktive hIK1-Kanal, in Übereinstimmung mit einem an MDCK-F-Zellen erarbeiteten Migrationsmodell, im Uropod migrierender Neutrophiler entscheidend an der Volumenreduktion und dem durch sie vermittelten Nachgleiten des Zelleibs bei der Zellwanderung beteiligt sei<sup>13, 32</sup>.

Die Annahme, der Kanal sei ungeachtet der äußeren Gegebenheiten der Migration essentieller Bestandteil der von den neutrophilen Granulozyten benötigten zellulären Strukturen wurde durch die von mir durchgeführten Versuchen widerlegt. Die Migrationsgeschwindigkeit der Granulozyten auf Fibronectin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) blieb sowohl bei Applikation des hIK1-Aktivators 1-EBIO wie auch des hIK1-Hemmstoffes Clotrimazol unverändert. Daraufhin wurden die Durchschnittsgeschwindigkeit und Morphologie der Zellen durch Reduktion der Fibronectinkonzentration den Werten angenähert, wie sie auf einer Polylysinmatrix beobachtet worden waren. Die Membranspannung wurde graduell erhöht, die Geschwindigkeit reduziert. Es ergab sich eine glockenkurvenförmige Verteilung der Migrationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Fibronectinkonzentration mit einem Maximum von rund 6 $\mu\text{m}/\text{min}$  bei einer Beschichtung mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fibronectin.

Parallel hierzu nahm die Projektionsfläche der Zellen bei Abnahme der Beschichtungskonzentration zu. Hohe Fibronektinkonzentrationen führten zu amöboider Morphologie und Bewegungsweise, während die Zellen bei niedrigen Fibronektinkonzentrationen in Morphologie und Dynamik Analogien zu Fibroblasten und MDCK-F-Zellen aufwiesen. Gerade diese langsamen und stark abgeflachten Zellen mit weit gefächertem Lamellipodium wären gemäß dem Migrationsmodell nach SCHWAB <sup>(vgl. Abb. 2)</sup> über ihre hohe Membranspannung und den resultierenden Kalziumeinstrom durch mechanosensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle für eine hohe hIK1-Aktivität prädestiniert gewesen <sup>34, 13</sup>. Aber auch unter diesen modifizierten Bedingungen reduzierte Clotrimazol die Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten nicht. Eine Beteiligung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals hIK1 bei der Migration neutrophiler Granulozyten auf Fibronektin war somit nicht nachweisbar.

## 4.2 Die Methoden

Die limitierter Überlebenszeit neutrophiler Granulozyten nach ihrer Freisetzung aus dem Knochenmark ins Gefäßsystem von 6-12 Stunden und ihre Anfälligkeit gegenüber zytotoxischen Substanzen aus anderen Neutrophilen machten die Handhabung der Zellen während der mehrstündigen Versuchsserien sehr schwierig <sup>1</sup>. Mittels Trypanblaufärbung konnte die Vitalität der Zellen im Verlauf der Isolation auf einfache Weise kontrolliert und das Isolationsprotokoll optimiert werden. Eine Giemsa-Schnellfärbung stellte sicher, daß eine schonende Isolation nicht auf Kosten der Reinheit geschah. Die Verfälschung der Ergebnisse durch andere migrationsfähige Zellpopulationen, insbesondere Makrophagen oder Lymphozyten konnte ausgeschlossen werden.

Der Nachweis des Fibronektinrezeptors  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen nach chemokinetische Stimulation der Zellen sollte dokumentieren, dass sowohl die Zellisolation als auch die Vorstimulation der Zellen im Migrationsexperiment sehr schonend verliefen, und die transmembranären Proteine in ihrer physiologischen Konformation erhalten blieben. Nachdem kein spezifischer Antikörper für das hIK1-Kanalprotein verwendet werden konnte, war im Rahmen meiner Experimente auf Fibronektin das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin als Fibronektinrezeptor für

einen solchen Nachweis besonders interessant. Eine aus der Literatur bekannte proteolytische Autodegradation von Integrinmolekülen konnte dabei für meine Zellen ebenfalls ausgeschlossen werden<sup>51</sup>. Die täglich durchzuführende Isolation humaner neutrophiler Granulozyten war zwar eine sehr zeitaufwendige Vorgehensweise. Sie führte aber zu guten und reproduzierbaren Ergebnissen, und erlaubte es mit „physiologischen“ Zellen zu arbeiten.

Das weitere Vorgehen bei der Beschichtung der Objektträger sowie das Protokoll zur Zelladhäsion und fMLP-Stimulation für die Migrationsexperimente orientierte sich eng an der Literatur. In den Versuchen auf 100µg/ml Fibronectin konnte ich eine hohe migratorische Aktivität der gesamten Neutrophilenpopulation über mein Versuchsintervall von 15min beobachten. Die dabei beobachteten Migationsgeschwindigkeiten spiegelten die Daten der anderen Arbeitsgruppen wieder<sup>3, 25-27, 29, 55</sup>. In hier nicht wiedergegebenen Versuchsserien steigerte ich die Dosen des Hemmstoffes und des Aktivators sukzessive und stellte dabei keinen hIK1-Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit fest. Schließlich lagen die in dieser Arbeit dargestellten Konzentrationen für Clotrimazol mit 1µmol/l bzw. für 1-EBIO mit 100µmol/l deutlich über der IC<sub>50</sub> von ~50nmol/l bzw. der EC<sub>50</sub> von ~70µmol/l. Auch unter diesen Bedingungen ergab sich zweifelsfrei, dass eine Hemmung oder Aktivierung des hIK1-Kanals keinen Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten hatte.

Kritischer beurteile ich die anschließend durchgeführte Variation der Beschichtungsstärke. Sie stellte eine bewußte Abweichung von den experimentellen Standardbedingungen dar und war in der Durchführung störungsanfälliger. Auch die Auswertung resultierender sehr langsamer Zellbewegungen war technisch wesentlich schwieriger. Alle Fibronectinkonzentrationen sollten in einer Versuchsserie im direkten Vergleich getestet werden. Trotz der Beschränkung auf letztlich noch fünf Konzentrationen betrug der erforderliche Versuchszeitraum bei je zwei zu korrelierenden Einzelversuchen pro Fibronectinkonzentration und Tag mindestens dreieinhalb Stunden. Zeitkontrollen für jede der Beschichtungen hätte die Zahl der Einzelexperimente und folglich den Versuchszeitraum verdoppelt. Ein siebenstündiges Versuchsintervall erwies sich aber angesichts der begrenzten Haltbarkeit der Zellen als nicht durchführbar, zumal die vorangegangene

Isolation der Zellen immer 2-3 Stunden in Anspruch nahm. Die reinen Zeitkontrollen wurden aus diesem Grund auf 10µg/ml und 100µg/ml Fibronectin begrenzt. Es zeigte sich in den Kontrollen, dass eine absolut konstante Migrationsgeschwindigkeit über den Versuchszeitraum von 15min in diesen Versuchsserien nicht aufrechterhalten werden konnte. Die Ursache des spontanen Geschwindigkeitsverlustes von etwa 20% konnte auch nach explizitem Ausschluss apparativer Fehlerquellen nicht geklärt werden. Dennoch sind die Versuche valide, da zwischen der Entnahme der Zellen aus dem Zellvorrat in 4°C PBS und dem Versuchsbeginn ein einheitliches Zeitintervall lag. Die Messungen untersuchten die Zellen demnach zu analogen Zeitpunkten bezüglich ihrer Entnahme. Alle durchschnittlichen Ausgangsgeschwindigkeiten der Experimente waren nicht signifikant verschieden, und auch die Zeitkontrollen zu Beginn und Ende eines Versuchstages wiesen neben übereinstimmenden Ausgangsgeschwindigkeiten konstante Geschwindigkeitsabnahmen auf. Man darf deshalb davon ausgehen, dass die Geschwindigkeitsabnahme eine Konstante war. Sie fand nachträglich in der Auswertung anhand der Zeitkontrollen Berücksichtigung.

Zusammenfassend läßt sich über mein methodisches Vorgehen sagen, dass der Versuchsaufbau in einem zweidimensionalen Migrationssystem mit einer deutlichen Reduktion gegenüber den physiologischen Verhältnissen einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix verbunden war. Er wies dafür aber, entgegen beispielsweise Versuchen in der Boydenkammer, den entscheidenden Vorteil eines für jede einzelne Versuchszelle gepaart durchführbaren Experimentes auf. Das unmittelbare Ansprechen der Neutrophilen auf veränderte Versuchsbedingungen <sup>(vergleiche Osmolaritätsversuche)</sup> während ein und desselben Experimentes war nur so beurteilbar. Damit konnte dem Vorhaben, die hIK1-Funktion auf die Migration unter pharmakologischer Stimulation oder Hemmung zu untersuchen, entsprochen werden.

### 4.3 Die Ergebnisse

Die Hemmung oder Aktivierung des  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanals hIK1 bei der Migration neutrophiler Granulozyten auf Fibronectin ließ nur den Schluss zu, dass der Kanal für ihre Migration nicht essentiell ist bzw. unter den hier gewählten Versuchsbedingungen

entbehrlich ist. Wie ist dieses Ergebnis zu interpretieren, und welche zukünftigen experimentellen Ansätze ergeben sich daraus?

Elektrophysiologische Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten und granulozytär differenzierten HL60-Zellen hatten bereits 1990 erstmals Hinweise auf das Vorhandensein von kalziumempfindlichen Kaliumkanälen mittlerer Leitfähigkeit (hIK1-Kanälen) in diesen Zelltypen geliefert. Ein unmittelbarer und zweifelsfreier Nachweis eines hIK1-Kanals in der Zellmembran neutrophiler Granulozyten war aber bis heute nicht möglich<sup>46, 47, 50</sup>. Mittels PCR und nested-PCR gelang in unserem Labor erstmalig der Nachweis von mRNA des hIK1-Kanals aus humanen neutrophilen Granulozyten. Die daran anschließenden Migrationsexperimente auf Polylysin zeigten, daß der hIK1-Kanal unter bestimmten Voraussetzungen für die Migration humaner neutrophiler Granulozyten wichtig ist<sup>41</sup>.

Da der Kanal aber unter meinen Versuchsbedingungen keinen Effekt auf die Migration der Neutrophilen erkennen ließ, stellt sich zunächst die grundsätzliche Frage, ob der hIK1 Kanal in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird bzw. - in einer aktiven Form- in ihrer Zellmembran zu finden ist? Zur Beantwortung dieser Frage wäre es sehr wünschenswert, in naher Zukunft über einen kanalspezifischen Antikörper zu verfügen, mit dessen Hilfe man an verschieden stimulierten und auf verschiedenen Substraten befindlichen Zellen das Vorkommen und das Verteilungsmuster des hIK1 immunhistochemisch untersuchen kann. Damit einhergehende Messungen kanalspezifischer Ionenströme mittels patch-clamp Technik wären anzustreben. Aber auch derartige elektrophysiologische Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten gestalten sich außerordentlich schwierig. Dies belegt die hierzu spärlich vorhandene Literatur ebenso wie auch unsere eigenen von Frau Dr. Andrea Wulf unternommenen Versuche<sup>46, 47</sup>. Die begrenzte Lebenszeit der Zellen und ihre hohe migratorische Aktivität wirken dabei limitierend. Dennoch gehe ich vom Vorliegen des aktiven Kanals in meinen Versuchen aus. Die hemmende, hIK1 vermittelte Wirkung von Clotrimazol und Charybdotoxin in den im Vorgehen mit meinen Versuchen beinahe identischen Experimenten erlauben diese Annahme<sup>41</sup>.

Zum anderen ergeben sich aus meinen Versuchen unter Variation physikalischer Faktoren bereits wichtige Anhaltspunkte darauf, wie der Kanal in die Zellbewegung eingreifen könnte. Die aus der unterschiedlichen Substratadhäsivität entstehenden abweichenden

Migrationsgeschwindigkeiten und Zellmorphologien haben keinen Einfluß auf die Clotrimazolwirkung und können den unterschiedlichen hIK1-Effekt nicht erklären.

Dies legt nahe, dass biochemische Eigenschaften der Matrixproteine und womöglich auch die Art der chemokinetischen Stimulation der Zellen entscheidend für deren unterschiedliche Aktivierungszustände waren. Die jeweilige Aktivierungsform könnte variable Kanalexpressionen und/oder -aktivierungen ausgelöst haben. So könnte beispielsweise das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin nach Kontakt mit Fibronectin ein intrazelluläres Signal hervorgerufen haben, welches zum Einbau anderer  $K^+$ -Kanäle in die Zellmembran führte, die eine Kompensation für den in meinen Versuchen gehemmten hIK1-Kanal erlaubten<sup>41</sup>. Zu denken wäre in diesem Zusammenhang insbesondere an den Kaliumkanal Kv1.3, der bislang als der einzige sicher in Neutrophilen nachgewiesene  $K^+$ -Kanal gilt und dessen Bedeutung für die Zellmigration während der Embryogenese bereits gezeigt wurde<sup>30, 46</sup>. Bei retrospektiver Betrachtung der Literatur finden sich weitere Anhaltspunkte dafür, dass die Migration neutrophiler Granulozyten auf elektrophysiologischer Ebene wesentlich komplexer als in den eingangs vorgestellten Modellen ablaufen könnte. Ohne eine Erklärung zu liefern, schilderten ZIGMOND (1988) und MARKS (1991) gesondert, daß Albumin ein Substrat für migrierende Neutrophile darstellt, auf dem die Migration der Zellen unabhängig von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Oszillationen stattfinden kann<sup>56, 57</sup>. Diese Ausnahme zum von MARKS selbst mit erarbeiteten „Migrationsmodell nach Lawson und Maxfield“ (vgl. Abb.1 und 25-29), deutet ebenfalls darauf hin, dass es alternative Mechanismen der Neutrophilenmigration geben muss und dass ein matrixspezifischer „crosstalk“ zwischen Zelle und Untergrund daran höchstwahrscheinlich beteiligt ist. Bezogen auf den hIK1 hieße das, daß er für die Zellen entbehrlich wird, wenn diese je nach verwendetem Substrat in einen unterschiedlichen Migrationsmodus umschalten und sich fortan anderer Rezeptoren und anderer Kanäle bedienen können. Derartige Änderungen des Migratinsmodus werden gegenwärtig auch von anderen Arbeitsgruppen favorisiert und etwa anhand unterschiedlicher, durch Migration entstandener Metastasierungsmuster ein und desselben malignen Melanomtyps anschaulich belegt<sup>58, 59</sup>. Dieser Wechsel der Migrationstechnik gelang den Neutrophilen in meinen Versuchen auf einem für sie vertrauten, da physiologischen Matrixprotein Fibronectin offensichtlich problemloser, als auf dem unphysiologischen Substrat Polylysin.

Neben zusätzlichen Matrixproteinen werden zukünftige Beobachtungen auch neue Chemokine als wichtigen Faktor verschiedenartiger Zellaktivierung berücksichtigen müssen. Denn die Zellaktivierung erfolgt im Organismus durch einen Cocktail verschiedener endo-, wie exogener Chemokine, die neben der wichtigen Funktion, der Zelle eine Polarität zu verleihen, auch Einfluss auf im Detail heute noch nicht hinreichend bekannte Rezeptoren und daran gekoppelte Signalkaskaden haben <sup>1</sup>. Der Einfluss chemokinvermittelter Signalkaskaden wiederum erstreckt sich auf eine Vielzahl von Zellfunktionen, zu denen neben der Zelladhäsion auch die Kanaltranskription bzw. -expression gehören könnte <sup>4, 5, 15, 60</sup>. Deshalb war es möglicherweise ein Nachteil meiner Experimente, dass ein der gerichteten Wanderung dienender Chemokingradienten als Orientierungshilfe nicht herstellbar war <sup>3,4</sup>. Es ist mir heute nicht möglich, ein abschließendes Urteil über die Bedeutung des hIK1 bei der Migration von neutrophilen Granulozyten abzugeben. Die hier untersuchte Kombination von Fibronectin als Matrix und fMLP als Chemokin stellte nur eine unter vielen Kombinationsmöglichkeiten dar. Doch in Einklang mit meinen Ergebnissen würde es auch evolutionsbiologisch gesehen durchaus Sinn machen, wenn neutrophile Granulozyten als Abwehrzellen in vorderster Front eingedrungenen Erregern unter verschiedensten gewebsspezifischen, osmotischen und pH-Bedingungen mit veränderlichen Migrationsstrategien näher kommen könnten. Von ihrer erfolgreichen Migration zum sich formierenden Entzündungsherd und der dadurch ermöglichten, entzündungsvermittelten Abwehr der Bedrohung für den Organismus dürfte während der Evolution oftmals das Überleben abgehangen haben. Grund genug, dass Neutrophile sich dafür vielschichtiger Mechanismen zu bedienen lernten, um etwa den Ausfall des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanals hIK1 kompensieren zu können und ihr Ziel zu erreichen <sup>(Abbildung 17)</sup>.

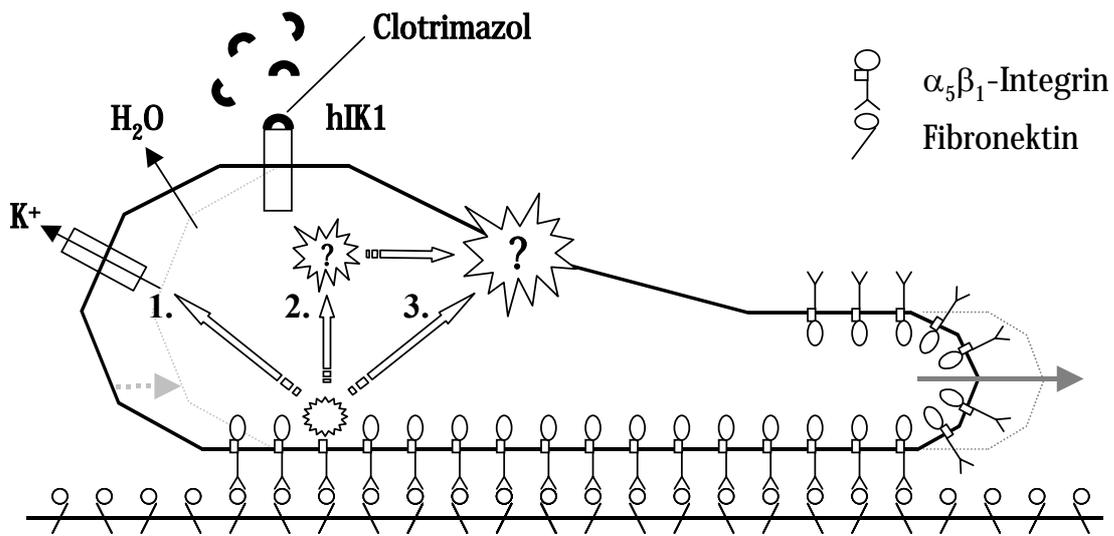


Abbildung 17.: Migration neutrophiler Granulozyten auf Fibronektin: Der hIK1-Kanal kann durch Clotrimazol gehemmt werden ohne die Migration der Zellen zu beeinflussen. Mögliche Erklärungen sind 1. die Aktivierung kompensierender zusätzlicher Kaliumkanaltypen (Bsp. Kv1.3), 2. indirekte oder 3. direkte Aktivierung noch unbekannter alternativer Migrationsmechanismen durch die  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Matrix-Interaktion.

## 5. Zusammenfassung

Die Migration neutrophiler Granulozyten aus dem Gefäßsystem in das umgebende Gewebe stellt einen zentralen Schritt bei der Entstehung von akuten Entzündungsherden dar. Es ist bislang vergleichsweise wenig über die Rolle von Ionenkanälen und Carriermolekülen wie dem  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanal hIK1 oder den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern bei der Wanderung von Neutrophilen bekannt. Nach heutigem Wissen ist die Funktion dieser Transportmoleküle neben zytoskelettalen Umbauvorgängen aber unter anderem in metastasierenden Melanomzellen, Fibroblasten oder auch sogenannten MDCK-F-Zellen für die Migration wichtig. Große Übereinstimmungen bekannter Migrationsmechanismen zwischen diesen Zelltypen und Neutrophilen, wie auch erste Versuche an Granulozyten legen eine Kanalfunktion auch bei ihnen nahe.

In meiner Arbeit untersuchte ich, inwieweit ein Einfluss  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlicher  $\text{K}^+$ -Kanäle auf die Migration von humanen neutrophilen Granulozyten bei einer Migration auf dem Matrixprotein Fibronectin nachweisbar ist. Dazu wurden humane neutrophile Granulozyten mit dem Chemotaxin fMLP stimuliert und auf verschieden starken Fibronectinbeschichtungen zur Migration gebracht. Die Neutrophilen wurden dabei mit erwärmter Ringerlösung überströmt, und ihre Migrationsgeschwindigkeit mittels Zeitraffer-Video-mikroskopie und computergestützter Auswertung der Migrationstrajektorien bestimmt. Den Einfluss der hIK1-Kanäle auf die Migration beobachtete ich durch Kanalinhibition mittels Clotrimazol bzw. Kanalaktivierung mittels 1-EBIO.

Es stellte sich heraus, dass die Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten stark von der Fibronectinbeschichtung abhing. Die Migrationsgeschwindigkeit hing biphasisch von der Fibronectinkonzentration ab und wies ein Maximum von  $6 \mu\text{m}/\text{min}$  bei einer mittleren Beschichtungsstärke von  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  Fibronectin auf. Unter diesen Bedingungen wanderten die Neutrophilen in einer amöboiden Weise. Bei Hemmung der Kaliumkanäle mit Clotrimazol oder Aktivierung mit 1-EBIO zeigten alle Zellen unabhängig von ihrer Morphologie und Geschwindigkeit keine Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit. Dies war angesichts vergleichbarer Versuche auf Polylysinbeschichtungen überraschend, da diese eine dosisabhängige Verlangsamung der Neutrophilen nach Blockade der Kaliumkanäle mit Clotrimazol und Charybdotoxin ergeben

hatten. Nachdem ausgeschlossen wurde, dass Zellmorphologie oder -geschwindigkeit diesen Unterschied bedingten, spricht dies für einen matrixspezifischen „Crosstalk“ zwischen Adhäsionsmolekülen der Zelle und Untergrund. Die dabei aktivierten verschiedenartigen Signalkaskaden bzw. alternative in die Zellmembran eingebrachte Kaliumkanaltypen könnten zur Kompensation der hIK1-Blockade auf Fibronectin geführt haben. Vor dem Hintergrund der sich durch meine Arbeit abzeichnenden hohen Modulationsfähigkeit kanalvermittelter Migrationsschritte dürfte sich die Entwicklung neuer antimigratorisch-antiinflammatorisch wirkender Kaliumkanalhemmstoffe für Neutrophile deutlich schwieriger gestalten, als bislang vermutet.

## 6. Anhang

### 6.1 Materialienliste

Alle verwendeten Substanzen und Geräte bzw. Lösungen werden alphabetisch geordnet aufgeführt, soweit sie nicht bereits in tabellarischer Form im Text dargestellt worden sind.

#### A

|  |   |
|--|---|
| Acrylamid/Bis-Acrylamid (26,0:0,7)                                     | Sigma, St.Louis, MO/USA                               |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid (29,3:0,53)                                    | Sigma, St.Louis, MO/USA                               |
| Ammoniumpersulfat (analytisch)   | Sigma, St.Louis, MO/USA                               |
| Anti mouse IgG HPR conjugate antibody                                  | Promega, Madison, WI/USA                              |
| Antikörperverdünnungslösung<br>(= PBS mit<br>bovinem Serumalbumin (5%) | Sigma, St.Louis, MO/USA,<br>Sigma, St.Louis, MO/USA ) |
| Polyoxyethylenesorbitat-Monolaurate (0,05%)                            | Sigma, St.Louis, MO/USA )                             |
| Aquacosmos® 1.3 Software   | Hamamatsu, Herrsching, D                              |

#### B

|  |   |
|--|---|
| BioRad Prestained SDS-Page Standard Low Range                      | BioRad, Hercules, CA/USA                                    |
| Blockierungslösung<br>(= PBS,<br>Naturaflor® Magermilchpulver (5%) | Töpfer GmbH, Dietmannsried, D,<br>Sigma, St.Louis, MO/USA ) |
| Polyoxyethylenesorbitat-Monolaurate (0,1%)                         | Sigma, St.Louis, MO/USA )                                   |
| Bovines Serumalbumin   | Sigma, St.Louis, MO/USA                                     |

#### C

|                                |                                    |
|--------------------------------|------------------------------------|
| CaCl <sub>2</sub> (analytisch) | Merck, Darmstadt, D                |
| Clotrimazol                    | Bayer, Ebersfeld, D                |
| Coulter Counter® Z2            | Coulter Electronics, Miami, FL/USA |

#### D

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| Dextransulfat   | Sigma, St.Louis, MO/USA       |
| Dextransulfatlösung<br>(= RPMI- mit<br>Dextransulfat (4%) | Sigma, St.Louis, MO/USA )     |
| Diff-Quick® (Giemsa-Schnellkit)                           | Dade-Behring AG, Düdingen, CH |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                   | Merck, Darmstadt, D           |
| Dodecylsulfate-Na-Salt (SDS)                              | Serva, Heidelberg, D          |

#### E

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| ECL-Reagenzien I+II™                | Amersham pharmacia biotech,<br>Buckinghamshire, UK |
| Ethanol (99,9% rein)                | Merck, Darmstadt, D                                |
| 1-Ethyl-2-benzimidazolinon (1-EBIO) | Aldrich, Steinheim, D                              |

#### F

|  |                        |
|--|------------------------|
| Fast Blot® Transfergerät                       | Biometra, Göttingen, D |
| Fibronektin (siehe Humanes Plasma Fibronektin) |                        |

|   |  |
|---|--|
| Ficoll`sche Lösung (1,077)  | Seromed Biochrom, Berlin, D  |
| Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)   | Sigma, St.Louis, MO/USA  |
| G   |  |
| Gelaire®BSB 6A Flow   | Gelaire Flow Laboratories GmbH,<br>Hamburg, D                                      |
| Glukose („analytisch“)  | Merck, Darmstadt, D  |
| Glycin  | Sigma, St.Louis, MO/USA  |
| Gycinlösung<br>(= PBS mit<br>Glycin (100mmol/l) )   | Sigma, St.Louis, MO/USA )  |
| H   |  |
| HCl (32%)   | Merck, Darmstadt, D  |
| Heparin (I.E. 5000)   | Braun AG, Melsungen, D   |
| Hepes   | Serva, Heidelberg, D   |
| HiPic® Software   | Hamamatsu, Herrsching, D   |
| Humanes Plasma Fibronectin  | Gibco®BRL, Heidelberg, D   |
| Hyperfilm™ECL™  | Amersham pharmacia biotech,<br>Buckinghamshire, UK                                 |
| I, J  |  |
| Immunfluoreszenzobjektträger  | Dunn, Asbach, D  |
| JAVA® 1.0 Software  | Jandel scientific, Corte Madera, CA/USA  |
| K   |  |
| KCl (analytisch)  | Merck, Darmstadt, D  |
| KHPO <sub>4</sub> (analytisch)  | Merck, Darmstadt, D  |
| L   |  |
| Laufpuffer<br>(= Seralwasser mit<br>Trizma® Base (3,1g/l)<br>Glycin (14,4g/l)<br>Sodium-Dodecylsulfate-Salt (1g/l)  | Sigma, St.Louis, MO/USA,<br>Sigma, St.Louis, MO/USA,<br>SDS, Serva, Heidelber, D ) |
| Lysepuffer<br>(= PBS (97,8%Vol) mit<br>Triton 100fach (2%Vol)<br>Protease-Inhibitor-Cocktail III (0,1%Vol)<br>Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 0,1%Vol) | Sigma, St.Louis, MO/USA ,<br>Calbiochem, Bad-Soden, D,<br>Serva, Heidelberg, D )   |
| M   |  |
| MAB 1965 (1.AK Maus vs. humanes beta1-Integrin)   | Chemicon, Temecula, CA/USA   |
| 2-Mercaptoethanol   | Sigma, St.Louis, MO/USA  |
| Methanol (20%Vol.)  | Merck, Darmstadt, D  |
| MgCl <sub>2</sub> (analytisch)  | Merck, Darmstadt, D  |
| Mouse monoclonal antibody<br>(2.AK Maus vs. Fc-Maus, clone 12CA5, subtype mouse Ig2bk)  | Boeringer, Mannheim, D   |
| N   |  |
| NaCl (analytisch)   | Merck, Darmstadt, D  |

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (analytisch) | Merck, Darmstadt, D                  |
| Naturaflor® Magermilchpulver                  | Töpfer GmbH, Dietmannsriet, D        |
| O   |                                      |
| ORCA Digitalkamera                            | Hamamatsu, Herrsching, D             |
| P   |                                      |
| Paraformaldehyd (PFA)                         | Merck, Darmstadt, D                  |
| Phasenkontrastmikroskop Zeiss ID 03           | Zeiss, Oberkochen, D                 |
| Phosphate Buffered Saline (PBS)               |                                      |
| (= Aqua dest. mit                             |                                      |
| NaCl (8g/l)                                   | Merck, Darmstadt, D,                 |
| KCl (0,2g/l)                                  | Merck, Darmstadt, D,                 |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,4g/l)     | Merck, Darmstadt, D,                 |
| KHPO <sub>4</sub> (0,2g/l)                    | Merck, Darmstadt, D )                |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 0,1%Vol)   | Serva, Heidelberg, D                 |
| Polyoxyethylenesorbitat Monolaurate           | Sigma, St.Louis, MO/USA              |
| Probenpuffer                                  |                                      |
| (= 2-Mercaptoethanol (1,4mmol/l               | Sigma, St.Louis, MO/USA,             |
| Sodium-Dodecylsulfate-Salt (SDS, 2%)          | Serva, Heidelber, D,                 |
| Glycin (10%)                                  | Sigma, St.Louis, MO/USA,             |
| Trizma® Base /HCl (pH 6,8, 62,5mmol/l )       | Sigma, St.Louis, MO/USA,             |
| Bromphenolblau (0,01%)                        | Sigma, St.Louis, MO/USA)             |
| Protan® Nitrocellulose Transfer Membrane      | Schleicher & Schnell, Dassel, D      |
| Protease-Inhibitor-Cocktail III               | Calbiochem-Novabiochem, Bad-Soden    |
| Q   |                                      |
| R   |                                      |
| RPMI-Medium                                   | Sigma, St.Louis, MO/USA              |
| Röntgen-Rapid-Entwickler®                     | Adefo-Chemie GmbH, Nürnberg, D       |
| Röntgen-Rapid-Fixierer®                       | Adefo-Chemie GmbH, Nürnberg, D       |
| S   |                                      |
| SDS-Gelkammer                                 | BioRad, Hercules, CA/USA             |
| SDS-Gießkammern                               | BioRad, Hercules, CA/USA             |
| SigmaPlot® 4.0                                | Jandel scientific, Corte Madera, USA |
| Sodium-Dodecylsulfate-Salt (SDS)              | Serva, Heidelberg, D                 |
| S&S Gel-Blotting-Papier (300*600mm)           | Schleicher & Schnell, Dassel, D      |
| T   |                                      |
| Temed   | Amresco, Solon, OH/USA               |
| Toppits® Gefrier-Beutel                       | Melitta, Minden, D                   |
| Transferpuffer                                |                                      |
| (= Seralwasser mit                            |                                      |
| Trizma® Base (3,1g/l)                         | Sigma, St.Louis, MO/USA,             |
| Glycin (14,4g/l)                              | Sigma, St.Louis, MO/USA,             |
| Methanol (20%Vol)                             | Merck, Darmstadt, D )                |
| Triton  | Serva, Heidelberg, D                 |
| Trizma®Base                                   | Sigma, St.Louis, MO/USA              |

|   |                            |
|---|----------------------------|
| Trypanblau                                  | Sigma, St.Louis, MO/USA    |
| U   |                            |
| V   |                            |
| Vectashield                                 | Vector, Burlingame, CA/USA |
| Videokamera-IF, Hamamatsu C4742-95          | Hamamatsu, Herrsching, D   |
| Videokamera-Migration, Hamamatsu XC-ST70CE  | Hamamatsu, Herrsching, D   |
| W, X, Y                                     |                            |
| Waschpuffer                                 |                            |
| (= PBS mit                                  |                            |
| Polyoxyethylenesorbitat-Monolaurate (0,05%) | Sigma, St.Louis, MO/USA )  |
| Z   |                            |
| Ziegennormalserum (ZNS)                     | Vector, Burlingame, CA/USA |
| Zeiss IM 35 Mikroskop                       | Zeiss, Oberkochen, D       |

## 6.2 Literaturverzeichnis

1. Janeway, C., Travers, P.: Immunologie, 2. Auflage, Heidelberg Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1997.
2. Kuhns, D.B., Young, H.A., Gallin, E.K. & Gallin, J.I.:  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent production and release of IL-8 in human neutrophils, *J. Immunol.* 161, 4332-4339, 1998.
3. Albrecht, E. & Petty, H.R.: Cellular memory: neutrophil orientation reverses during temporally decreasing chemoattractant concentrations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5039-5044, 1998.
4. Foxman, E.F., Campbell, J.J. & Butcher, E.C.: Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis, *J. Cell Biol.* 139, 1349-1360, 1997.
5. Campbell, J.J., Foxman, E.F. & Butcher, E.C.: Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration, *Eur. J. Immunol.* 27, 2571-2578, 1997.
6. Davies, E.V. & Hallett, M.B.: Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in inflammatory neutrophils: implications for rheumatoid arthritis, *Int. J. Mol. Med.* 1, 485-490, 1998.
7. Gross, R., Schölmerich, P., and Gerok, W.: Die Innere Medizin, 9. Auflage., Stuttgart, New York, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1996.
8. Zahm, J.M., Kaplan, H., Herard, A.L., et al.: Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium, *Cell Motil. Cytoskeleton* 37, 33-43 (1997).
9. Bretscher, M.S.: Wie tierische Zellen kriechen, *Spektrum d. Wissenschaft* (Februar):56-62, 1988.
10. Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F.: Cell migration: A physically integrated molecular process, *Cell* 84, 359-369, 1996.
11. Stossel, T.P.: The machinery of cell crawling, *Sci. Am.* 271, 54-63, 1994.
12. Stockem, W. & Klopocka, W.: Ameboid Movement and Related Phenomena, *Int. Rev. Cyt.* 112, 137-183, 1988.
13. Schwab, A.: Ion channels and transporters on the move, *News Physiol. Sci.* 16, 29-33, 2001.
14. Nabi, I.R.: The polarization of the motile cell, *J. Cell Sci.* 112, 1803-1811, 1999.

15. Sanchez-Madrid, F. & del Pozo, M.A.: Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions, *EMBO J.* 18, 501-511, 1999.
16. Bretscher, M.S.: Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells, *Cell* 87, 601-606, 1996.
17. Harris, E.S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. & Zimmerman, G.A.: The leukocyte integrins, *J. Biol. Chem.* 275, 23409-23412, 2000.
18. Horwitz, A.F.: Integrine, *Spektrum d. Wissenschaft* Januar, 86-92, 1998.
19. Huttenlocher, A., Sandborg, R.R. & Horwitz, A.F.: Adhesion in cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 697-706, 1995.
20. Hynes, R.O.: Integrins: a family of cell surface receptors, *Cell* 48, 549-554, 1987.
21. Schwab, A., Finsterwalder, F., Kersting, U., Danker, T. & Oberleithner, H.: Intracellular Ca<sup>2+</sup> distribution in migrating transformed epithelial cells, *Pflügers Arch.* 434, 70-76, 1997.
22. Brundage, R. A., Fogarty, K. E., Tuft, R. A., and Fay, F. S.: Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils, *Science* 254, 703-706, 1991.
23. Gollnick, F., Meyer, R., and Stockem, W.: Visualization and measurement of calcium transients in *Amoeba proteus* by fura-2 fluorescence, *Eur. J. Cell Biol.* 55, 262-271, 1991.
24. Eddy, R.J., Pierini, L.M., Matsumura, F. & Maxfield, F.R.: Ca<sup>2+</sup>-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration, *J. Cell. Sci.* 113, 1287-1298, 2000.
25. Pierini, L.M., Lawson, M.A., Eddy, R.J., Hendey, B. & Maxfield, F.R.: Oriented endocytic recycling of alpha5beta1 in motile neutrophils, *Blood* 95, 2471-2480, 2000.
26. Mandeville, J.T. & Maxfield, F.R.: Effects of buffering intracellular free calcium on neutrophil migration through three-dimensional matrices, *J. Cell. Physiol.* 171, 168-178, 1997.
27. Lawson, M.A. & Maxfield, F.R.: Ca<sup>2+</sup>- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils, *Nature* 377, 75-79, 1995.
28. Mandeville, J.T., Ghosh, R.N. & Maxfield, F.R.: Intracellular calcium levels correlate with speed and persistent forward motion in migrating neutrophils, *Biophys. J.* 68, 1207-1217, 1995.

29. Hendey, B. & Maxfield, F.R.: Regulation of neutrophil motility and adhesion by intracellular calcium transients, *Blood Cells* 19, 143-161, 1993.
30. Hendriks, R., Morest, D.K. & Kaczmarek, L.K.: Role in neuronal cell migration for high-threshold potassium currents in the chicken hindbrain, *J. Neurosci. Res.* 58, 805-814, 1999.
31. Levite, M., Cahalon, L., Peretz, A., HersHKoviz, A., Sobko, A., Ariel, A., Desai, R., and Attali, B.: Extracellular  $K^+$  and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell migration and functional association between Kv1.3 channels and b1 integrins, *J. Exp. Med.* 191, 1167-1176, 2000.
32. Schwab, A., Reinhardt, J., Schneider, S.W., Gassner, B. & Schuricht, B.:  $K^+$  channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells, *Cell Physiol. Biochem.* 9, 126-132, 1999.
33. Schwab, A., Gabriel, K., Finsterwalder, F., et al.: Polarized ion transport during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells, *Pflügers Arch.* 430, 802-807, 1995.
34. Schwab, A: Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration, *Am. J. Renal. Physiol.* 280, F739-F747, 2001.
35. Schwab, A., Schuricht, B., Seeger, P., Reinhardt, J. & Dartsch, P.C.: Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by  $K^+$  channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume, *Pflügers Arch.* 438, 330-337, 1999.
36. Schwab, A. & Oberleithner, H.: Plasticity of renal epithelial cells: the way a potassium channel supports migration, *Pflügers Arch.* 432, R87-R93, 1996.
37. Klein, M., Seeger, P., Schuricht, B., Alper, S.L. & Schwab, A.: Polarization of  $Na^+/H^+$  and  $Cl^-/HCO_3^-$  exchangers in migrating renal epithelial cells, *J. Gen. Physiol.* 115, 599-608, 2000.
38. Schwab, A., Wulf, A., Reinhardt, J., et al.: Cloning, regulation and subcellular localization of  $Ca^{2+}$  sensitive  $K^+$  channel (cIK1) in migrating cells, *Pflügers Arch.* 439, (R310):Abstract, 2000.
39. Reinhardt, J., Golenhofen, N., Pongs, O., Oberleithner, H. & Schwab, A.: Migrating transformed MDCK cells are able to structurally polarize a voltage-activated  $K^+$  channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 5378-5382, 1998.
40. Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B. & Jacobson, K.: Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels, *Nature* 400, 382-386, 1999.

41. Röhl, A., Wulf, B., Schuricht, B., and Schwab, A.: K<sup>+</sup> channel (hIK1) dependent migration of human neutrophil granulocytes (Abstract), *Pflügers Arch., Eur. J Physiol.* 439, R447, 2000.
42. Dennison, W.B., Loeser, R.F., Turner, R.A., Johnson, J.A. & Wells, H.B.: A double blind placebo controlled trial of low dose clotrimazole in rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* 17, 1003-1007, 1990.
43. Schwab, A.: Calcium-sensitive potassium channels of intermediate conductance: A potential therapeutic target?, *Current Research in Ion Channel Modulators* 3, (4):126-130, 1998.
44. Jensen, B.S., Odum, N., Jorgensen, N.K., Christophersen, P. & Olesen, S.P.: Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96 , 10917-10921, 1999.
45. Schmid-Antomarchi, H., Schmid-Alliana, A., Romey, G., et al.: Extracellular ATP and UTP control the generation of reactive oxygen intermediates in human macrophages through the opening of a charybdotoxin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel, *J. Immunol.* 159, 6209-6215, 1997.
46. Aiyar, J.: Potassium channels in leukocytes and toxins that block them: Structure, function and therapeutic implications, *Perspectives in Drug Discovery and Design* (15/16):257-280, 1999.
47. Varnai, P., Demarex, N., Jaconi, M., Schlegel, W., Lew, D.P. & Krause, K.H.: Highly co-operative Ca<sup>2+</sup> activation of intermediate-conductance K<sup>+</sup> channels in granulocytes from a human cell line, *J. Physiol.* 472, 373-390, 1993.
48. Gallin, E.K. & Grinstein, S.: *Ion Channels and Carriers in Leukocytes, Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Raven Press, New York, Second Edition, 441-457, 1992.
49. Gallin, E.K.: Ion channels in leukocytes, *Physiol. Rev.* 71, 775-811, 1991.
50. Krause, K.H. & Welsh, M.J.: Voltage-dependent and Ca<sup>2+</sup>-activated ion channels in human neutrophils, *J. Clin. Invest.* 85, 491-498, 1990.
51. Davey, P.C., Zuzel, M., Kamiguti, A.S., Hunt, J.A. & Aziz, K.A.: Activation-dependent proteolytic degradation of polymorphonuclear CD11b, *Br. J. Haematol.* 111, 934-942, 2000.
52. Vihinen, P., Nikkola, J., Vlaykova, T., et al.: Prognostic value of beta<sub>1</sub> integrin expression in metastatic melanoma, *Melanoma Res.* 10, 243-251, 2000.

53. Yoshinaga, I.G., Vink, J., Dekker, S.K., Mihm, M.C.J. & Byers, H.R.: Role of  $\alpha_3\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$  integrins in melanoma cell migration, *Melanoma Res.* 3, 435-441, 1993.
54. Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F.: Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness, *Nature* 385, 537-540, 1997.
55. Eddy, R.J., Pierini, L.M., Matsumura, F. & Maxfield, F.R.:  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration, *J. Cell Sci.* 113, 1287-1298, 2000.
56. Marks, P.W., Hendey, B. & Maxfield, F.R.: Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration, *J. Cell Biol.* 112, 149-158, 1991.
57. Zigmond, S H., Slonczewski, J. L., Wilde, M. W., and Carson, M.: PMN locomotion is insensitive to lowered cytosolic calcium levels, *Cell Motil. Cytoskel.* 9, 184-189, 1988.
58. Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker EB, Friedl P.: Collective cell movement in primary melanoma explants: Plasticity of cell-cell interaction,  $\beta_1$ -integrin function, and migration strategies, *Cancer Res.* 62(7):2, 125-30, 2002.
59. Friedl P, Borgmann S, Bröcker EB.: Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: Lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement, *J. Leukoc. Biol.* 70(4), 491-509, 2001.
60. Baggiolini, M., Boulay, F., Badwey, J.A. & Curnutte, J.T.: Activation of neutrophil leukocytes: Chemoattractant receptors and respiratory burst, *FASEB J.* 7, 1004-1010, 1993.

## Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an alle ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre:

- Herrn Prof. Albrecht Schwab für das Thema, die Infrastruktur im Labor und seine Hilfe und intensive Betreuung.
- Herrn Prof. Michael Gekle, Frau Birgit Gassner, Frau Agnes Röhl und dem gesamten Team des Lehrstuhls für die freundliche Aufnahme und die vielen wertvollen praktischen Tipps und Tricks.
- Herrn Michael Römer für seine freundschaftliche Unterstützung im und um das Labor.
- Meinen Eltern Gerda und Gottfried für ihre langjährige liebe- und mühevollen Vorarbeit.
- Meiner Frau Helen für ihren unerschütterlichen Glauben an ein Ziel und vieles mehr.
- Meinen Söhnen Noah Samuel und Benjamin Kidane für jede durchgeschlafene Nacht während der Schaffensphasen und vieles mehr.

Vielen Dank!

Bernward Hinkes

## Lebenslauf

Name: Bernward Gottfried Hinkes  
Geboren: 1.12.1972, in Nürnberg  
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder  
Eltern: Gerda Hinkes, Restauratorin,  
Dr. Gottfried Frenzel (†), Kunsthistoriker

Schulbildung: 1979–1983 Grundschule-Nürnberg-Fischbach, Nürnberg  
1983–1990 Leibniz-Gymnasium-Altdorf, Altdorf b. Nürnberg  
1990–1991 Kanab-High-School, Utah/USA (Graduierung)  
1991–1993 Neues-Gymnasium-Nürnberg, Nürnberg (Abitur)

Studium: 10/1993–4/1995 Landespflege, TU-München, Weihenstephan  
4/1995–4/2003 Medizin, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
3/1997 Ärztliche Vorprüfung  
3/1998 1. Staatsexamen  
10/1999–3/2000 Auslandssemester in Lima / Peru  
3/2001 2. Staatsexamen  
4/2001–1/2002 Promotion und Erziehungszeit  
2/2001–1/2003 Praktisches Jahr:  
-Pädiatrie: Universitäts-Kinderklinik, Würzburg  
-Innere Medizin: Sunderland Royal Hospital, Sunderland  
/ GB und Missionsärztliche Kliniken, Würzburg  
-Chirurgie: Missionsärztliche Kliniken, Würzburg  
5/2003 3. Staatsexamen

Famulaturen: 3/1996 Unfallchirurgische Notaufnahme, Süd-Klinikum, Nürnberg  
7-9/1997 Pädiatrie, Watford General Hospital, Watford / GB  
10/1998 Chirurgie, Filderkliniken, Stuttgart-Filderstadt  
4/1999 Innere Medizin, Filderkliniken, Stuttgart-Filderstadt  
8-9/1999 Allgemeinmedizin, Dr. Amon, Pforzheim  
11/1999 Chirurgie, Hospital National Arzobispo Loayza, Lima / Peru  
12/1999 Notfallmedizin, ebendort  
1/2000 Gynäkologie- und Geburtshilfe, ebendort

Stipendien: 1993–2000 Bayrischen Begabtenförderung  
1994–2000 Studienstiftung des Deutschen Volkes

Würzburg, den 14.07.2003

Bernward Hinkes