

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Oberleithner -

pH-Taxis:
Grundlagen und Versuche mit MV3 Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Bartel, Peter
aus Duisburg

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. rer.nat. Christian Martin Stock

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Eberhard Schlatter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie II

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Oberleithner -

Referent: apl. Prof. Dr. rer.nat. Christian Martin Stock

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Eberhard Schlatter

ZUSAMMENFASSUNG

pH-Taxis: Grundlagen und Versuche mit MV3 Zellen

Bartel, Peter

Die Migration menschlicher Melanomzellen (MV3) ist mit einer Maximalgeschwindigkeit bei $\text{pH}=7,0$ stark vom extrazellulären pH -Wert abhängig. Weiterhin ist bekannt, dass MV3 Zellen während der Migration ihr eigenes pH -Nanomilieu ausbilden, das für ihre Migrationsfähigkeit essentiell ist. Daneben herrscht in soliden Tumoren ein saurerer pH -Wert vor als im umgebenden gesunden Gewebe. Dadurch bildet sich zwischen dem Tumorzentrum und der -peripherie ein pH -Gradient aus.

In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob MV3 Zellen in der Lage sind, in einem von außen angelegten extrazellulären pH -Gradienten (ähnlich dem Milieu eines Tumors) eine gerichtete Migration zu zeigen – ein Phänomen, das als „ pH -Taxis“ bezeichnet werden kann. Auch die funktionelle Reaktion auf extrazelluläre Ansäuerung und die Expression von pH -sensitiven G-Protein gekoppelten Rezeptoren wurde orientierend untersucht.

Es konnte durch Etablierung eines entsprechenden in vitro Modellsystems gezeigt werden, dass MV3 Zellen unter geeigneten Bedingungen eine pH -Taxis in Richtung eines relativ sauren Milieus zeigen. Weiterhin wurde die Expression der G-Protein gekoppelten Rezeptoren OGR1, GPR4 und TDAG8 auf mRNA- sowie von OGR1 und GPR4 auf Proteinebene gezeigt. Ergänzend wurde ein deutliches intrazelluläres Kalziumsignal durch extrazelluläre Ansäuerung nachgewiesen.

Tag der mündlichen Prüfung:

27.03.2015

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:
„pH-Taxis: Grundlagen und Versuche mit MV3 Zellen“
im Institut für Physiologie II der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster unter der Anleitung von:
Herrn apl. Prof. Dr. rer.nat. Christian Martin Stock

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen
Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder
ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer
in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit,
Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades
vorgelegt habe.

Münster, 02.04.2015

Peter Bartel

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf dem Kongress „2nd Symposium of the International Society for Proton Dynamics in Cancer (ISPDC)“ (Poster 2) vom 18. bis zum 19. November 2011 in Nizza von mir selbst und auf dem „91st Annual Meeting of The German Physiological Society“ (Poster 113) (Bartel et al. 2012) vom 22. bis zum 25. März 2012 in Dresden von Herrn apl. Prof. Dr. rer.nat. Christian Martin Stock präsentiert.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Idee „pH-Taxis“	1
1.2 Erklärungsansätze für eine pH-Taxis	4
1.2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	4
1.2.2 Manipulation des zelleigenen pH-Nanomilieus	6
1.2.3 pH-Abhängigkeit anderer Strukturen	6
1.3 Richtung der pH-Taxis	7
1.4 pH-Begriff	7
1.5 Zielsetzung der Arbeit	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Zellkultur	9
2.1.1 MV3 Zellen	9
2.1.2 HL-60 Zellen	9
2.2 Lösungen	10
2.3 Polymerasekettenreaktion – PCR	10
2.3.1 Allgemeines Vorgehen	10
2.3.2 Einzelversuche	11
2.4 Immunfluoreszenz	13
2.5 Western Blot	14
2.5.1 Zellyse zur Proteingewinnung	14
2.5.2 Durchführung der Western Blots	15
2.6 Messung intrazellulärer Kalziumsignale	15
2.7 Etablierung eines extrazellulären pH-Gradienten	16
2.7.1 Grundlagen	17
2.7.2 Messaufbau	19
2.7.3 Spülen der μ -Slides	20

2.7.4 Aufbau des pH-Gradienten -----	22
2.8 Migrationsversuche – MV3 Zellen-----	24
2.8.1 Grundüberlegungen -----	24
2.8.2 Einzelversuche-----	25
2.9 Migrationsversuche – HL-60 Zellen-----	26
2.10 Statistik -----	27
3. Ergebnisse -----	28
3.1 Expression der GPCR auf mRNA-Ebene -----	28
3.2 Expression der GPCR auf Proteinebene -----	30
3.2.1 Immunfluoreszenz -----	30
3.2.2 Western Blot-----	32
3.3 Funktionelle pH-Sensitivität von MV3 Zellen -----	33
3.4 Aufbau eines extrazellulären pH-Gradienten-----	35
3.4.1 Austauschbarkeit der Lösung in Ibidi μ -Slides-----	35
3.4.2 Gradientenmessungen in HEPES-gepufferter Ringerlösung-----	38
3.4.3 Gradientenmessungen in RPMI 1640 Medium-----	41
3.5 pH-Taxis von MV3 Zellen-----	43
3.5.1 Vorversuche -----	43
3.5.2 Migration in HEPES-gepufferter Ringerlösung -----	43
3.5.3 Migration in RPMI 1640 Medium -----	47
3.6 pH-Taxis von HL-60 Zellen-----	51
4. Diskussion -----	52
4.1 Methodische Bedeutung des pH-Gradienten-----	52
4.2 Ergebnisse der pH-Taxis Versuche-----	55
4.3 Richtung der pH-Taxis-----	56
4.4 Erklärung der pH-Taxis und Rolle der GPCR -----	57
4.5 Ausblick-----	59
Literatur: Artikel -----	60

Literatur: Webseiten -----	66
Abkürzungen -----	67
Chemikalien -----	69
Tabellenverzeichnis -----	71
Abbildungsverzeichnis -----	72
Lebenslauf -----	73
Danksagung -----	74

1. Einleitung

1.1 Die Idee „pH-Taxis“

Es ist bekannt, dass die Migrationsfähigkeit menschlicher Melanomzellen der MV3 Linie, die ein aggressives Metastasierungsverhalten zeigen (van Muijen et al. 1991), entscheidend vom pH-Wert der umgebenden Lösung (pH_e = extrazellulärer pH-Wert) abhängt. Das Optimum für Migrationsgeschwindigkeit und Translokation vom Ursprungsort liegt bei $\text{pH}_e=7,0$. Erreicht pH_e dagegen 6,6 bzw. 7,5, kommt es zu einer erheblichen Einschränkung der Migrationsfähigkeit (Stock et al. 2005). Weiterhin ist bekannt, dass MV3 Zellen während der Migration ihr eigenes pH-Nanomilieu schaffen, das von essentieller Bedeutung für ihre Migrationsfähigkeit ist. Auf der Außenseite der Zellmembran bildet sich ein pH-Gradient aus, dessen saureres Ende an der Vorderseite der Zelle liegt (Stock et al. 2007). Korrespondierend existiert auch im Zytoplasma ein pH-Gradient, dessen Orientierung dem extrazellulären Gradienten entgegengesetzt ist (Martin et al. 2011).

Alle diese Effekte sind vom Vorhandensein bzw. der Funktionsfähigkeit des Natrium-Protonen Austauschers NHE1 abhängig (Stock et al. 2005; Stock et al. 2007; Martin et al. 2011), der verstärkt am Vorderende der Zelle exprimiert wird (Stock et al. 2007) und dort entsprechend auch seine höchste Aktivität zeigt (Martin et al. 2011). Dort akkumuliert NHE1 an fokalen Kontakten (Ludwig et al. 2013; Plopper et al. 1995), an denen die Zell-Matrix Interaktion über $\alpha_2\beta_1$ -Integrine vermittelt wird (Stock et al. 2005), und bildet pH-Nanodomänen mit saurem pH_e und alkalischem pH_i (= intrazellulärer pH-Wert) aus (Ludwig et al. 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrine durch eine protonenabhängige Konformationsänderung aktiviert werden (Paradise et al. 2011). Daher kann für die MV3 Migration angenommen werden, dass ein saurerer pH_e am Vorderende, insbesondere an fokalen Kontakten, die Zell-Matrix Interaktion verstärkt, während ein alkalischerer pH_e am Hinterende den gegenteiligen Effekt hat. Gleichzeitig können die vom NHE1 exportierten Protonen auch am Abbau von Proteinen

1. Einleitung

der extrazellulären Matrix und damit an der Invasion von Tumorzellen mitwirken (Stock et al. 2008).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die Migration von MV3 Zellen essentiell vom extrazellulären pH-Wert und von räumlich organisierten pH-Wertunterschieden abhängig ist.

Gleichzeitig gibt es in der menschlichen (Patho-)Physiologie mehrere Situationen, in denen der pH-Wert der Umgebung stark vom üblicherweise vorkommenden Bereich um 7,4 abweicht. Als einfachstes Beispiel sei hier auf den Magensaft verwiesen, dessen pH-Wert durch den primär aktiven Export von Protonen durch die H^+/K^+ -ATPase aus den Parietalzellen um mehrere Einheiten unter dem der umgebenden Gewebe liegt (Chu und Schubert 2012).

Eine Situation, die im Zusammenhang mit MV3 Zellen von besonderer Relevanz ist, ist das Milieu maligner Tumoren. Hier kommt es durch große Diffusionsstrecken zwischen Tumorzelle und Gefäß sowie durch unzureichende Perfusion und eventuelle Tumoranämie regelhaft zu hypoxischen Zuständen (Vaupel und Harrison 2004). Durch ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch in Kombination mit einer hohen Glykolyseaktivität resultiert ein verstärkter Anfall von sauren Valenzen in Form von Laktat (Vaupel et al. 1989). Neuere Studien zeigen, dass neben Laktat aus der Glykolyse auch CO_2 einen entscheidenden Anteil an der Säureproduktion in Tumoren hat (Helmlinger et al. 2002). Konsekutiv sinkt der extrazelluläre pH-Wert verglichen mit gesundem Gewebe um durchschnittlich etwa 0,3 bis 0,5 Einheiten ab (Vaupel et al. 1989).

Dadurch bildet sich ein pH-Gradient vom Zentrum des Tumors zum umgebenden gesunden (und relativ zum Tumor gesehen alkalischen) Gewebe aus, der sowohl in mathematischen Modellen vorhergesagt (Gatenby und Gawlinski 1996) als auch experimentell bestätigt wurde (Martin und Jain 1994).

Bereits unter physiologischen Bedingungen erfordert die Regulation des intrazellulären pH-Wertes ein komplexes Zusammenspiel von Puffern sowie von Säuren- und Basentransportern (Boron 2004). Unter Berücksichtigung

1. Einleitung

der besonderen Säurebelastung, der Tumorzellen ausgesetzt sind (s.o.), benötigen sie Mechanismen, die eine Anhebung des intrazellulären pH-Wertes durch Export saurer oder Import basischer Valenzen ermöglichen. Dazu zählen unter anderem der oben beschriebene NHE1, die H⁺-ATPase, Natrium-Bikarbonat Cotransporter sowie Chlorid-Bikarbonat Austauscher (Swietach et al. 2014).

Die Folgen des daraus resultierenden sauren extrazellulären und basischen intrazellulären pH-Wertes sind relativ gut bekannt. So kommt es zur Hemmung von Apoptose, Steigerung der Proliferation, Akkumulation schwach basischer Chemotherapeutika im Extrazellularraum (Webb et al. 2011) sowie zum gesteigerten Umbau der extrazellulären Matrix (Stock et al. 2008).

Die Rolle hingegen, die der extrazelluläre pH-Gradient in diesem Kontext spielt, wurde bisher noch wenig untersucht.

In diesem Zusammenhang ist vor allem das Migrationsverhalten der Tumorzellen – in dieser Studie der menschlichen Melanomzellen der MV3 Linie – von Interesse. Zellmigration spielt eine entscheidende Rolle beim Prozess der Metastasierung (Gupta und Massagué 2006). Die pH-Abhängigkeit der Migration im Allgemeinen wurde weiter oben dargelegt. In dieser Studie soll die Frage beantwortet werden, ob ein extrazellulärer pH-Gradient, wie er zum Beispiel in soliden Tumoren und damit im „natürlichen“ Umfeld der MV3 Zellen gefunden wird, die Richtung der Migration der Melanomzellen beeinflussen kann. Ergäbe sich eine gerichtete Migration entlang des pH-Gradienten, entweder ins Saure oder ins Alkalische, könnte dieses Phänomen mit dem Begriff „pH-Taxis“ beschrieben werden. Diese Reaktionen auf extrazelluläre pH-Gradienten wurden schon in den 1970er Jahren für eine Reihe humanpathogener Bakterien, darunter *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (Seymour und Doetsch 1973), und erst kürzlich für *Helicobacter pylori* (Croxen et al. 2006) beschrieben. Für eukaryote Zellen wurde eine solche Untersuchung vor dieser Studie jedoch noch nicht durchgeführt. Lediglich eine später in den USA durchgeführte Arbeit konnte pH-Taxis an nicht neoplastischen Zellen zeigen (Paradise et al. 2013).

1.2 Erklärungsansätze für eine pH-Taxis

Im folgenden Abschnitt soll darauf eingegangen werden, wie die Entstehung einer pH-Taxis theoretisch erklärt werden könnte. Dabei sei darauf hingewiesen, dass diese Aufzählung rein hypothetisch und nicht experimentell belegt ist. Weiterhin wurden die Überlegungen unter besonderer Berücksichtigung der Physiologie von MV3 Zellen aufgestellt. Damit ist es denkbar, dass für andere Zellen oder andere physiologische und pathologische Bedingungen auch andere Erklärungsansätze anzunehmen sind.

1.2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Aus mehreren (patho-)physiologischen Kontexten ist das Phänomen der Chemotaxis (Jin 2013) bekannt. Einfach ausgedrückt wird damit eine gerichtete Migration einer Zelle bezeichnet, die währenddessen einem extrazellulären Gradienten eines Botenstoffes – in diesem Falle als „Chemokin“ bezeichnet – folgt. Chemotaxis findet sich unter anderem bei der Invasion neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe, wo sich mehrere hierarchisch organisierte Chemokingradienten aufbauen (Kolaczkowska und Kubes 2013). Auch Tumorzellen nutzen Prozesse der Chemotaxis für Metastasierungsvorgänge (Condeelis et al. 2005).

Eukaryote Zellen exprimieren für die Detektion von Chemokingradienten G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Jin et al. 2008) (im Folgenden auch als „GPCR“, englisch G-protein coupled receptor, abgekürzt). In Analogie zu diesem Prinzip könnte man postulieren, dass es auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren gibt, die Änderungen des extrazellulären pH-Wertes registrieren und entsprechend eine pH-Taxis vermitteln können. Tatsächlich wurde ab 1995 eine Familie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Übersicht in: Tresguerres et al. 2010; Justus et al. 2013) beschrieben, die sehr sensitiv pH-Wert Änderungen detektieren und über verschiedene Signalwege in das Zellinnere weiterleiten können. Diese besteht in der Reihenfolge der Erstbeschreibung aus GPR4 (G-protein coupled receptor 4) (Heiber et al. 1995; Mahadevan et al. 1995), TDAG8 (T-cell death associated gene 8)

1. Einleitung

(Choi et al. 1996; Kyaw et al. 1998), OGR1 (Ovarian cancer G-protein coupled receptor 1) (Xu und Casey 1996), und G2A (für G₂ accumulation) (Weng et al. 1998). Strukturelle Ähnlichkeiten wurden dabei früh beschrieben, während man die Funktion als Protonensensoren nicht direkt erkannte.

Zunächst wurde eine Sensorenfunktion für Lipid-Botenstoffe postuliert (u.a. in: Xu et al. 2000; Zhu et al. 2001, beide Artikel zurückgezogen), während später die Rolle von OGR1 und GPR4 (Ludwig et al. 2003), von TDAG8 (Wang et al. 2004) und von G2A (Murakami et al. 2004) als Protonensensoren beschrieben wurde. Durch funktionelle Messungen und aus strukturellen Gesichtspunkten besteht an der Funktion von G2A als protonensensitiver Rezeptor jedoch Zweifel (Radu et al. 2005). Aus diesem Grunde soll hier nicht weiter auf den G2A Rezeptor eingegangen werden.

Eine OGR1-Aktivierung führt über einen G_q-Mechanismus zur Bildung von Inositolphosphat (IP₃) mit einem Maximum bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,8. Eine Aktivierung von GPR4 oder TDAG8 führt im selben pH-Bereich zur Bildung von cAMP durch ein G_s-Protein (Ludwig et al. 2003; Wang et al. 2004). Beide Second Messenger können in chemotaktischen Vorgängen eine Rolle spielen (Swaney et al. 2010).

Im Kontext von Tumoren sind unterschiedliche Funktionen dieser Rezeptoren beschrieben (Übersicht in: Justus et al. 2013). Während eine OGR1-Überexpression eine Hemmung von Metastasierungsvorgängen bewirkt (Singh et al. 2007) und es Hinweise auf eine tumorsuppressive Wirkung gibt (Ren und Zhang 2011), sind onkogene Funktionen sowohl für GPR4 als auch für TDAG8 (Ihara et al. 2010; Sin et al. 2004) bekannt.

Eine Beteiligung dieser Rezeptoren – entweder alleine oder in Synergie miteinander – bei einer möglichen pH-Taxis liegt daher nahe.

1. Einleitung

1.2.2 Manipulation des zelleigenen pH-Nanomilieus

Wie oben beschrieben konnte bereits gezeigt werden, dass MV3 Zellen für ihre Migration einen engen Bereich an extrazellulären pH-Werten benötigen (Stock et al. 2005) und dass sie während ihrer Migration einen extrazellulären pH-Gradienten an ihrer Oberfläche ausbilden (Stock et al. 2007). Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für eine pH-Taxis wäre nun, dass der von außen angelegte pH-Gradient die Rolle des normalerweise von der Zelle selbst an ihrer Oberfläche erzeugten Gradienten übernimmt.

In diesem Modell würde also der experimentell angelegte pH-Gradient an der saureren Seite der Zelle zu einer stärkeren Bindung zwischen Zelle und Matrix führen, während diese Bindung an der alkalischen Seite weniger fest wäre. Dadurch könnte auch ohne die Beteiligung spezifischer Rezeptoren oder Signaling-Mechanismen eine pH-Taxis in Richtung des sauren Milieus erklärt werden.

1.2.3 pH-Abhängigkeit anderer Strukturen

Es gibt eine große Zahl von Kanälen und Transportern, die in ihrer Funktion direkt vom extrazellulären pH-Wert abhängig sind (Übersicht in: Tresguerres et al. 2010). Dazu zählen unter anderem die acid-sensing ion channels (ASICs) und der bereits erwähnte NHE1. Eine Beteiligung an einer möglichen pH-Taxis ist durchaus denkbar, sie soll in dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht werden.

Der gesamte Prozess der Tumorzellmigration ist von einer Vielzahl weiterer Kanäle und Transporter abhängig, die nicht als pH-Sensoren dienen (Übersicht in: Schwab und Stock 2014; Schwab et al. 2007). Auch diese könnten jedoch – wie prinzipiell jedes Protein – in ihrer Funktion einer pH-Abhängigkeit unterliegen und damit eine pH-Taxis vermitteln. Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll auf diese Möglichkeit allerdings ebenfalls nicht weiter eingegangen werden.

1.3 Richtung der pH-Taxis

Eine pH-Taxis, so diese existiert, ist sowohl in Richtung des sauren als auch in Richtung des alkalischen Endes eines pH-Gradienten denkbar. Einerseits sind Tumorzellen gut an ein saures extrazelluläres Milieu angepasst (Swietach et al. 2014; Webb et al. 2011) und das Aufsuchen desselben könnte ihnen einen Überlebens- oder Wachstumsvorteil gegenüber nicht neoplastischen Zellen verschaffen. Andererseits ist im komplexen Prozess der Metastasierung die Loslösung einzelner Zellen aus dem sauren Primärtumor mit anschließender Migration in gesundes (und damit relativ zum Tumor gesehen alkalisches) Gewebe erforderlich (Gupta und Massagué 2006). Das Auftreten von Chemotaxis ist hierbei bekannt (Condeelis et al. 2005) und das gleichzeitige Vorliegen einer pH-Taxis kann vermutet werden, da die hypoxiebedingte Ansäuerung des Tumors diesen deutlich von der Umgebung unterscheidet, sodass der resultierende pH-Gradient der Tumorzelle als „Richtschnur“ ihrer Migration dienen könnte.

1.4 pH-Begriff

In dieser Arbeit wird der pH-Wert vereinfacht als der negative dekadische Logarithmus der Protonenkonzentration in mol/l aufgefasst:

$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$$

Er wird entsprechend ohne Einheit verwendet. Dabei werden pH-Werte unter 7,0 als „sauer“ und pH-Werte über 7,0 als „alkalisch“ bezeichnet (Übersicht in: Nič et al. 2009).

Folglich wird eine steigende Protonenkonzentration synonym zu einer Ansäuerung und eine sinkende Protonenkonzentration synonym zu einer Alkalisierung verwendet.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird dabei die Tatsache, dass der chemische Effekt, den dieses Ion hervorruft, kleiner sein kann als seine eigentliche Konzentration, außer Acht gelassen. Diese Vereinfachung ist in der Physiologie gebräuchlich (Boron 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Es soll untersucht werden, ob menschliche Melanomzellen der MV3 Linie, zunächst einmal unabhängig von allen denkbaren Erklärungsansätzen, in der Lage sind, eine pH-Taxis zu zeigen.

Die Hypothese dieser Arbeit lautet folglich:

MV3 Zellen zeigen unter geeigneten Bedingungen eine pH-Taxis.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, musste zunächst ein Modellsystem etabliert werden, in dem MV3 Zellen einem extrazellulären pH-Gradienten ausgesetzt werden konnten, während die Möglichkeit zur Aufzeichnung ihres Migrationsverhaltens bestand. Danach folgten die eigentlichen Migrationsversuche in diesem pH-Gradienten.

Weiterhin wurde evaluiert, welche Erklärung für eine mögliche pH-Taxis in Frage käme. Diese Versuche hatten jedoch nicht das Ziel, den zugrundeliegenden Mechanismus endgültig aufzuklären.

Es wurden in diesem Zusammenhang folgende Nebenhypothesen aufgestellt:

MV3 Zellen exprimieren pH-sensitive G-Protein gekoppelte Rezeptoren.

MV3 Zellen zeigen funktionelle Kalziumsignale auf Ansäuerung.

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden PCR-Untersuchungen in Reverse-Transkriptase Technik, Western Blots und Immunfluoreszenz-Färbungen sowie funktionelle Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration durch ein ratiometrisches Verfahren durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die Zellkultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre.

Alle Zelllinien wurden für maximal 10-15 Passagen verwendet.

2.1.1 MV3 Zellen

Die MV3 Zellen (van Muijen et al. 1991) als adhärenente Zellkultur wurden in Zellkulturschalen in selbst angesetzttem RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich) mit 10 % FCS (fetal calf serum, englisch für fetales Kälberserum) (PAA, inzwischen Teil von GE Healthcare) und NaHCO₃ (Natriumhydrogenkarbonat = Bikarbonat) bei einem pH von 7,4 gehalten. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Zum Splitten wurde ein Gemisch mit 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA (Ethylendiamintetraacetat) verwendet.

2.1.2 HL-60 Zellen

Die HL-60 Zellen (Gallagher et al. 1979) als Suspensionskultur wurden in Zellkulturschalen in NaHCO₃-gepuffertem RPMI 1640 Medium (Gibco-Invitrogen) mit 10 % FCS (PAA) gehalten. Ein Mediumwechsel durch Abzentrifugieren erfolgte alle 2-3 Tage.

Analog zum Splitten der adhärenenten Kulturen wurde die Zellsuspension alle 7-10 Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Zur Stimulation zu migrationsfähigen HL-60 Zellen erfolgte die Inkubation in FCS freiem RPMI 1640 Medium mit einem Zusatz von 1,3 % DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma-Aldrich), entspricht ca. 180 µmol/l (Hauert et al. 2002). Ein Mediumwechsel erfolgte danach nicht mehr.

2.2 Lösungen

In mehreren Versuchen wurde HEPES-gepufferte (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) modifizierte Ringerlösung verwendet, die im Labor aus Stammlösungen hergestellt wurde (im Folgenden kurz „HEPES-gepufferte Ringerlösung“ genannt).

Ionen- und Molekülkonzentrationen in der fertigen Lösung waren: Na⁺: 123,5 mmol/l; K⁺: 5,4 mmol/l; Ca²⁺: 1,2 mmol/l; Mg²⁺: 0,8 mmol/l; Cl⁻: 131,9 mmol/l; H₂PO₄⁻: 1,0 mmol/l; Glukose: 5,5 mmol/l; HEPES: 10 mmol/l. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit einem geeichten pH-Meter bei 37 °C durch Zugabe von 1 M NaOH bzw. 1 M HCl.

2.3 Polymerasekettenreaktion – PCR

2.3.1 Allgemeines Vorgehen

Für die Gewinnung von cDNA aus MV3 und stimulierten HL-60 Zellen (vgl. 2.1.2) wurde zunächst die RNA der Zellen mit Trizol (Invitrogen) unter RNase freien Bedingungen isoliert. Die photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgte mit dem Nanodrop Verfahren (Thermo Scientific).

Die reverse Transkription mit Oligo-dT Primern von je 1 µg RNA erfolgte mit dem SuperScript III Kit (Invitrogen) und dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) mit einer Konzentration von 10 mmol/l (New England Biolabs).

Das entstandene Produkt (sowohl der MV3 als auch der stimulierten HL-60 Zellen) wurde als Template für PCR-Untersuchungen genutzt.

Die Sequenzen der benötigten Gene wurden über die PubMed-Gensuche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; Suche in der Kategorie „Gene“) abgefragt. Die PCR-Primer wurden mit der Website Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) designt und bei der Firma metabion international AG, Deutschland, bestellt. Alle Primer hatten eine Konzentration von 100 µmol/l und wurden für die Verwendung in der PCR-Reaktion im Verhältnis 1:10 mit molekularbiologischem Wasser verdünnt.

2. Material und Methoden

Es wurden PCR-Kits mit Taq-Polymerase und Puffer (Qiagen und Segenetic) und dNTPs in einer Konzentration vom 10 mmol/l (New England Biolabs) verwendet.

Für alle Primerpaare wurden sowohl mit MV3 cDNA als auch mit HL-60 cDNA Gradienten-PCRs (Mastercycler gradient, Eppendorf) durchgeführt, um die optimalen Annealing-Temperaturen zu bestimmen. Ebenso erfolgte die Anpassung von Zykluszahl und Elongationszeit. In jedem Falle wurde so lange optimiert, bis keine unspezifischen Produkte mehr detektiert werden konnten. Die wiedergegebenen Protokolle entsprechen jeweils den besten gefundenen Bedingungen.

Die anschließende Auftrennung der Produkte erfolgte auf Agarosegelen mit Konzentrationen zwischen 1 % und 1,5 % in TBE-Puffer (Trometamol-Borat-EDTA) bei Spannungen zwischen 80 V und 120 V. Nachfolgend wurden die Gele in SYBR Gold (Invitrogen) oder Red-Safe (iNtRON Biotechnology) nach Herstellerangaben gefärbt unter UV-Licht fotografiert.

2.3.2 Einzelversuche

OGR1 PCR

Es wurden folgende Primer verwendet:

OGR1-sense 5'-CTG AGC CCA TGA GGA GTG TG-3'
($T_m=61,4$ °C)

OGR1-antisense 5'-GGT AGG ACG CCA GCA GCA GG-3'
($T_m=65,5$ °C)

Erwartete Produktlänge: 653 bp

2. Material und Methoden

Protokoll für MV3 cDNA:			Protokoll für HL-60 cDNA:		
Reagenz	Volumen / μ l		Reagenz	Volumen / μ l	
Template (MV3 cDNA)	2,0		Template (HL-60 cDNA)	3,0	
10x Puffer	3,0		10x Puffer	3,0	
OGR1-sense	0,6		OGR1-sense	0,6	
OGR1-antisense	0,6		OGR1-antisense	0,6	
dNTP-Mix	0,6		dNTP-Mix	0,6	
Taq-Polymerase	0,3		Taq-Polymerase	0,3	
Q-Solution (Qiagen)	6,0		Q-Solution (Qiagen)	6,0	
H ₂ O (molekularbiologisch)	16,9		H ₂ O (molekularbiologisch)	15,9	
Temp / °C t / s			Temp / °C t / s		
	94	300		94	300
	94	30		94	30
	60	45		62	45
	72	50		72	50
	72	600		72	600
	} 34x			} 34x	

Tab. 1: OGR1 PCR

Zusammenfassung der PCR-Protokolle für MV3 und HL-60 Zellen

GPR4 PCR

Es wurden folgende Primer verwendet:

GPR4-sense 5'-GCG TGT CCA CCG AGC GCC AG-3'
($T_m=69,0$ °C)

GPR4-antisense 5'-GCC TTG GCC ACA TCG CTG CG-3'
($T_m=67,0$ °C)

Erwartete Produktlänge: 268 bp

Protokoll für MV3 cDNA:			Protokoll für HL-60 cDNA:		
Reagenz	Volumen / μ l		Reagenz	Volumen / μ l	
Template (MV3 cDNA)	2,0		Template (HL-60 cDNA)	1,0	
10x Puffer	3,0		10x Puffer	3,0	
GPR4-sense	0,6		GPR4-sense	0,6	
GPR4-antisense	0,6		GPR4-antisense	0,6	
dNTP-Mix	0,6		dNTP-Mix	0,6	
Taq-Polymerase	0,3		Taq-Polymerase	0,3	
H ₂ O (molekularbiologisch)	22,9		H ₂ O (molekularbiologisch)	23,9	
Temp / °C t / s			Temp / °C t / s		
	94	300		94	300
	94	30		94	30
	62	45		68	45
	72	40		72	40
	72	600		72	600
	} 34x			} 34x	

Tab. 2: GPR4 PCR

Zusammenfassung der PCR-Protokolle für MV3 und HL-60 Zellen

2. Material und Methoden

TDAG8 PCR

Es wurden folgende Primer verwendet:

TDAG8-sense 5'-CAC CTG CAT TGC CGT TGA TCG G-3'
($T_m=66,0$ °C)

TDAG8-antisense 5'-GTG CCG CAC AGC TTG GTA GAC-3'
($T_m=65,0$ °C)

Erwartete Produktlänge: 322 bp

<u>Protokoll für MV3 cDNA:</u>			<u>Protokoll für HL-60 cDNA:</u>		
<u>Reagenz</u>	<u>Volumen / μl</u>		<u>Reagenz</u>	<u>Volumen / μl</u>	
Template (MV3 cDNA)	1,0		Template (HL-60 cDNA)	2,0	
10x Puffer	3,0		10x Puffer	3,0	
GPR4-sense	0,6		GPR4-sense	0,6	
GPR4-antisense	0,6		GPR4-antisense	0,6	
dNTP-Mix	0,6		dNTP-Mix	0,6	
Taq-Polymerase	0,3		Taq-Polymerase	0,3	
H ₂ O (molekularbiologisch)	23,9		H ₂ O (molekularbiologisch)	22,9	

<u>Temp / °C</u>	<u>t / s</u>		
94	300	} 34x	
94	30		
62	45		
72	40		
72	600		

<u>Temp / °C</u>	<u>t / s</u>		
94	300	} 34x	
94	30		
62	45		
72	40		
72	600		

Tab. 3: TDAG8 PCR

Zusammenfassung der PCR-Protokolle für MV3 und HL-60 Zellen

2.4 Immunfluoreszenz

Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen für OGR1 und GPR4 in MV3 Zellen durchgeführt.

12mm-Deckgläschen wurden in 12-Well-Platten für 20 min mit Kollagen G (Biochrom) beschichtet. Anschließend erfolgte das Aussäen von MV3 Zellen nach gewünschter Zelldichte und mit einer Adhäsionszeit von mindestens 2 h. Die Zellen wurden mit 3,5 % PFA (Paraformaldehyd) fixiert, mit 100 mM Glycin behandelt und mit 0,1 % Triton / 1 % SDS (sodium dodecyl sulfate, englisch für Natriumlaurylsulfat) permeabilisiert.

Das für die Antikörperverdünnung benötigte Ziegennormalserum (im Folgenden kurz „10 % ZNS“ genannt) hatte folgende Zusammensetzung: Na₂HPO₄: 10 mmol/l; NaCl: 150 mmol/l und 10 % Ziegen Serum (Sigma-

2. Material und Methoden

Aldrich). Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht und die des Zweitantikörpers bei Raumtemperatur für 45 min.

Als Erstantikörper wurden polyklonale Kaninchen-anti-Mensch Antikörper (MBL International Corporation) 1:200 für OGR1 und 1:50 für GPR4 jeweils in 10 % ZNS verdünnt und als Zweitantikörper ein Alexa 488 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Invitrogen) 1:200 in 10 % ZNS verdünnt verwendet. Anschließend wurde erneut mit 3,5 % PFA fixiert.

Abschließend erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (Invitrogen) in Methanol.

Die Aufnahmen erfolgten mit der MetaVue Software (Molecular Devices) an einem Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss) mit einem α Plan-FLUAR 100x Objektiv (Zeiss) bei 570/40 nm Anregungs- und 540/50 nm Emissionswellenlänge mit einem 510 nm Strahlenteiler für die Alexa 488 gekoppelten Antikörper bzw. bei 365/12 nm Anregungs- und 397 nm Emissionswellenlänge mit einem 395 nm Strahlenteiler für die DAPI-Färbung. Es wurde eine RT-SE-Spot, Modell 9.0 Kamera (Visitron Systems) verwendet. Die Einzelbilder wurden mithilfe der MetaVue Software fusioniert. Für jede Färbung wurden Negativkontrollen durchgeführt, indem statt des Erstantikörpers reines 10 % ZNS verwendet wurde.

2.5 Western Blot

Zum Nachweis der GPCR auf Proteinebene wurden Western Blots für OGR1 und GPR4 in MV3 Zellen durchgeführt.

2.5.1 Zellyse zur Proteingewinnung

Die Lyse erfolgte mit selbst angesetztem RIPA-Puffer (radioimmunoprecipitation assay buffer) mit Proteaseinhibitor cOmplete, Mini (Roche Diagnostics) und Phosphataseinhibitor PhosSTOP (Roche Diagnostics). Die gewonnenen Proteine wurden nach dem abzentrifugierten Pellet und dem Überstand getrennt.

Der Proteingehalt der gewonnenen Lösungen wurde mit dem BCA-Protein-Assay (Pierce-Thermo Scientific) nach Herstellerangaben bestimmt.

2. Material und Methoden

2.5.2 Durchführung der Western Blots

Die Proben (jeweils Pellet und Überstand) wurden vorbehandelt, um Dimerisierungen und andere Protein-Protein Bindungen zu lösen. Für OGR1: Zugabe von 10 % 1 M DTT (Dithiothreitol) für 10 min auf Eis. Für GPR4: Zugabe von 10 % 1 M DTT für 10 min bei 100 °C.

Die Trennung erfolgte auf selbst hergestellten 10 % SDS-Gelen mit 5 % Sammelgel. Es wurden jeweils die vorbehandelten Proben, der PageRuler Prestained Protein Ladder Proteinstandard (Thermo Scientific) und der MagicMark XP Western Proteinstandard (Invitrogen) aufgetragen.

Der Blot erfolgte auf PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) bei 20 mA im Tank Blot Verfahren.

Die verwendeten Erstantikörper wurden bei der Immunfluoreszenzfärbung beschrieben (vgl. 2.4). Sie wurden jeweils 1:500 in 5 % Magermilch (Sigma-Aldrich) gelöst und der Blot damit bei 4 °C über Nacht inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein mit Peroxidase markierter Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper (Sigma Aldrich) 1:1000 in 5 % Magermilch verdünnt mit einer Inkubationszeit von 45 min bei Raumtemperatur verwendet.

Die abschließende Detektion erfolgte mit dem SuperSignal West Femto Chemiluminescent Kit (Thermo Scientific).

Es wurden verschiedene Bedingungen (u.a. Blots auf Nitrozellulose-Membran) getestet. Die hier gezeigten Protokolle brachten die besten Resultate.

2.6 Messung intrazellulärer Kalziumsignale

MV3 Zellen wurden wie oben beschrieben (2.1.1) mit Trypsin/EDTA abgelöst. 200 µl Zellsuspension wurden in kommerziell erhältlichen µ-Slide I IbbidiTreat (Ibbidi)¹ ausgesät und adhärirten für 2 h. Anschließend wurden sie mit FURA-2 (Invitrogen) (6 µl pro ml RPMI 1640) für 30 min beladen.

¹ Nicht zu verwechseln mit den in den sonstigen Versuchen verwendeten µ-Slide Chemotaxis (ebenfalls Ibbidi).

2. Material und Methoden

Die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgte ratiometrisch mit den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm an einem Axiovert S100 Mikroskop (Zeiss) mit einem Plan-APOCHROMAT 63x Objektiv (Zeiss). Die Konzentration wurde nach Korrektur der einzelnen Intensitäten um die Hintergrundfluoreszenz und nach Eichung mit der MetaFluor Software (Molecular Devices) errechnet.

Zunächst wurde die Grundaktivität in HEPES-gepufferter Ringerlösung (pH=7,4) gemessen. Anschließend erfolgte die extrazelluläre Ansäuerung auf pH=6,4 in ansonsten identischer Lösung oder zur Kontrolle das Überspülen mit unveränderter Lösung (pH=7,4).

Für die abschließende Eichung der Messungen wurden folgende Eichlösungen verwendet, die aus Stammlösungen angesetzt wurden (Angabe der Ionen- bzw. Molekülkonzentrationen in fertiger Lösung), jeweils mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Ionomycin (MP-Biomedicals).

Eichlösung 1 (Ca^{2+} frei): Na^+ : 122,5 mmol/l; K^+ : 5,4 mmol/l; Mg^{2+} : 0,8 mmol/l; Cl^- : 129,5 mmol/l; EGTA (Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure): 5 mmol/l; HEPES: 10 mmol/l.

Eichlösung 2 (Ca^{2+} ↑↑): Na^+ : 122,5 mmol/l; K^+ : 5,4 mmol/l; Ca^{2+} : 5 mmol/l; Mg^{2+} : 0,8 mmol/l; Cl^- : 139,5 mmol/l; HEPES: 10 mmol/l.

2.7 Etablierung eines extrazellulären pH-Gradienten

Um experimentell die Frage untersuchen zu können, ob menschliche Melanomzellen in der Lage sind, pH-Taxis zu zeigen, musste zuerst ein Modellsystem etabliert werden, mit dessen Hilfe ein extrazellulärer pH-Gradient an MV3 Zellen angelegt werden konnte. Dabei mussten sowohl die „Steilheit“ des Gradienten (pH-Wertunterschiede zwischen einem Ende des Versuchsaufbaues und dem anderen) als auch die „Form“ (pH-Verlauf im Gradienten) sowie die zeitliche Stabilität gezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.7.1 Grundlagen

Es wurden kommerziell erhältliche Chemotaxiskammern, μ -Slide Chemotaxis 2D IbidiTreat (Ibidi) (im Folgenden kurz „ μ -Slide“ genannt) verwendet, in denen normalerweise Chemokingradienten aufgebaut werden (Zengel et al. 2011).

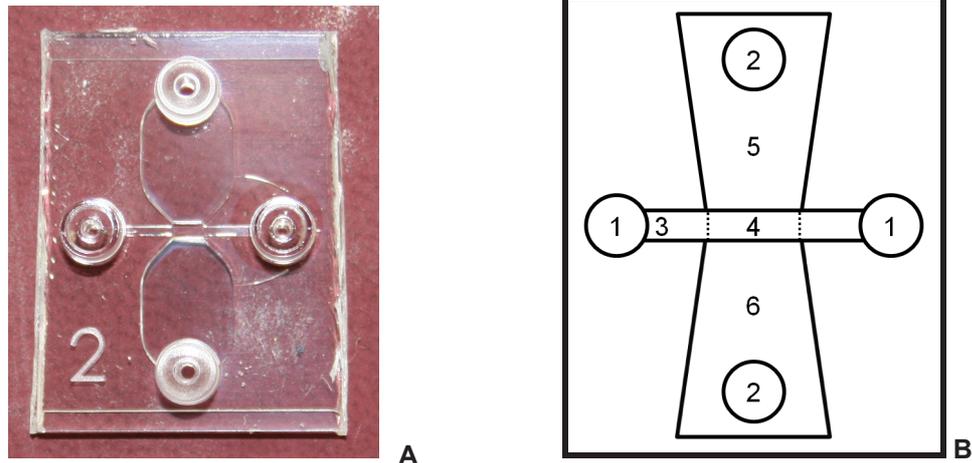


Abb. 1: μ -Slide Chemotaxis 2D (Ibidi)

A: Foto eines μ -Slide Chemotaxis

B: Schematische Darstellung:

- 1: Stützen zum Befüllen des Kanales (3)
- 2: Stützen zum Befüllen der Reservoirs (5,6)
- 3: Kanal
- 4: Bereich für die Beobachtung der Zellmigration im Kanal
- 5: Reservoir 1
- 6: Reservoir 2

Das Prinzip dieser Kammer beruht darauf, dass Zellen, die im Kanal adhären sind, durch Zugabe eines Chemokines in eines der Reservoirs einem Gradienten ausgesetzt werden können.

2. Material und Methoden

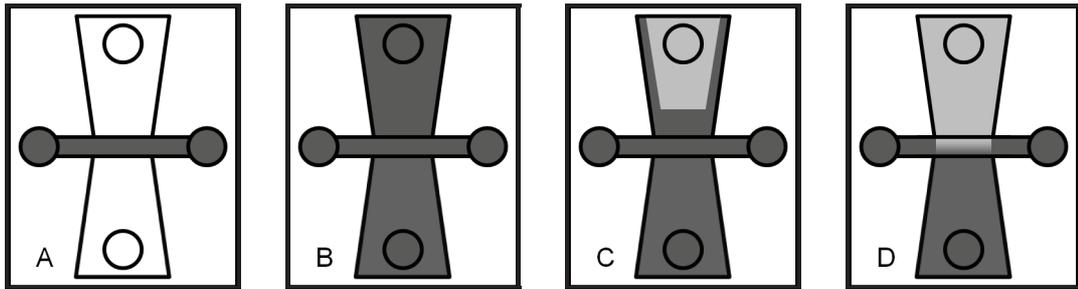


Abb. 2: Befüllen der μ -Slides für die Zellmigration

- A: Adhärenz der Zellen
- B: Füllen der Reservoirs
- C: Zugabe des Chemokins
- D: Aufbau des Gradienten

(In den Reservoirs gibt es nach Angabe des Herstellers keinen Gradienten.)

Da nicht ohne Weiteres angenommen werden kann, dass die Einstellung eines pH-Gradienten analog verlaufen wird, mussten der Aufbau und die Einstellung des Gradienten in den μ -Slides gemessen werden.

Diese pH-Messungen erfolgten mit einem ratiometrischen Verfahren mit dem pH-sensitiven Farbstoff BCECF-Acid (Invitrogen) (im Folgenden kurz „BCECF“ genannt). Das Prinzip dieser Messungen ist, dass sich die Anregbarkeit durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge mit dem pH-Wert ändert. Die Emission erfolgt stets mit derselben Wellenlänge, im Falle vom BCECF mit 535 nm.

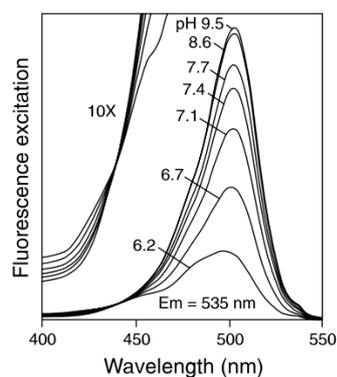


Abb. 3: Fluoreszenz von BCECF

Gezeigt wird die Anregbarkeit bei unterschiedlichen Wellenlängen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Herstellerangabe.

(Aus: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp01150.pdf>)

2. Material und Methoden

Es wird der Quotient (englisch „Ratio“) der gemessenen Emissionsintensitäten bei zwei Anregungswellenlängen gebildet. Für BCECF kommen hierfür 495 nm und 440 nm zum Einsatz. Durch die Quotientenbildung können eventuelle Konzentrationsunterschiede rechnerisch ausgeglichen werden.

Trotzdem ist es erforderlich, bei der Messung Eichpunkte zu generieren, indem die Ratio bei zwei bekannten pH-Werten gemessen wird.

2.7.2 Messaufbau

Der μ -Slide wurde an der Unterseite mit einer Nadel leicht eingekratzt, um später einen optischen Orientierungspunkt für die Lage unter dem Mikroskop zu erhalten. Danach wurde der Slide bei 37 °C in einer Wärmekammer unter einem Axiovert S 100 Mikroskop (Zeiss) mit einem EC Plan-NOEFLUAR 10x Objektiv (Zeiss) und einer Photometrics Cool Snap EZ Kamera (Visitron Systems) platziert. Anschließend erfolgten das Füllen der Kammer und das Fokussieren unter Durchlicht. Zur Orientierung wurde die Lage der Seitenränder des Kanals und des vorher angebrachten Kratzers in der Software markiert, um nach jeder Manipulation am μ -Slide die ursprüngliche Position exakt wieder einstellen zu können.

Die eigentliche Messung erfolgte mit der MetaFluor Software (Molecular Devices). Dabei werden einzelne Messregionen definiert, in denen der Mittelwert der gemessenen Intensitäten bestimmt und daraus die Ratio berechnet wurde.

Die Kamera musste dabei um ca. 45° um die Achse des einfallenden Lichts gedreht werden, um beide Seiten des Kanals erfassen zu können.

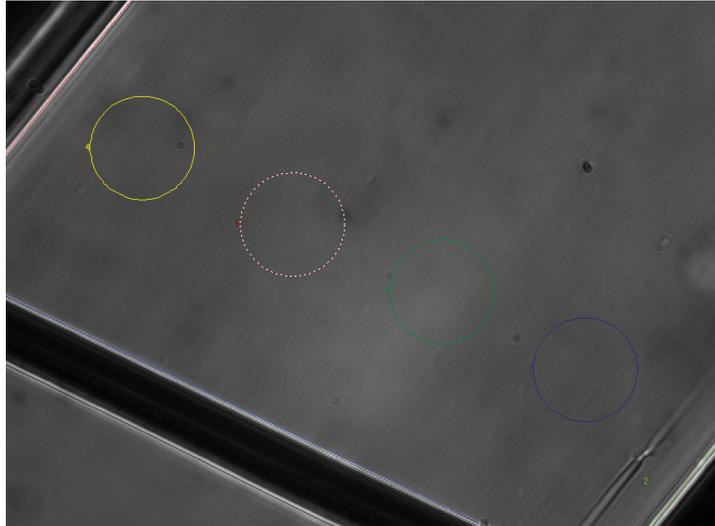


Abb. 4: Messregionen pH-Messung

Zeigt exemplarisch eine Messanordnung im Durchlichtbild. Linke obere und rechte untere Ecke: Seiten des Kanales. Links unten im Bild: Vor der Messung angebrachter Kratzer. Mittig im Bild: Messregionen.

Die Tatsache, dass der Kanal scheinbar schräg durch das Bild verläuft, kommt durch die 45°-Drehung der Kamera zustande.

2.7.3 Spülen der μ -Slides

Um bei der späteren Messung des pH-Gradienten zwei Eichpunkte zu erhalten, musste die Lösung in den μ -Slides ohne nennenswerte Reste ausgetauscht werden können. Diese Prozedur ist vom Hersteller nicht vorgesehen.

In einem ersten Schritt wurde der gesamte μ -Slide mit gepufferter Lösung (genaue Angabe bei den Einzelversuchen) mit 5 μ g BCECF-Acid auf 1 ml Lösung mit bekanntem pH-Wert (pH_1) gefüllt. Danach wurden wie oben beschriebenen Messregionen festgesetzt und es wurden mindestens 10 Datenpunkte für die Ratio gemessen.

Im zweiten Schritt wurde die Kammer mit identischer Lösung, die allerdings auf einen anderen pH-Wert (pH_2) eingestellt war, gespült. Dazu wurde eine 5 ml-Spritze, auf die eine abgeschnittene Pipettenspitze gesteckt wurde, verwendet. Die Spritze wurde auf einen der Stützen am Kanal (Abb.1, B 1) gesetzt und danach die Flüssigkeit sowohl im Kanal als auch in den Reservoiren durch neue ersetzt. Die jeweils nicht gespülten Teile (Kanal oder Reservoir) wurden dabei durch vom Hersteller mitgelieferte Stopfen

2. Material und Methoden

verschlossen. Anschließend wurde die Position der Kammer anhand der vorher angebrachten Markierungen in der MetaFluor Software überprüft und falls erforderlich korrigiert. Danach erfolgte eine erneute Messung der Ratio für mindestens 10 Datenpunkte. So konnten Messungen für mehrere pH-Werte erfolgen. Abschließend wurde erneut mit der im ersten Schritt verwendeten Lösung gespült (pH_1).

Durch diese Prozedur sollten zwei Fragen beantwortet werden: Lässt sich erstens die Lösung in den μ -Slides durch das Spülen vollständig austauschen? (In diesem Falle müssten die erste und letzte gemessene Ratio denselben Wert ergeben, da zuletzt erneut mit der am Anfang verwendeten Lösung gespült wurde. Vgl. Abb. 16 und Abb. 18.) Und liegt zweitens für die verwendete Lösung und den Puffer eine lineare Beziehung zwischen pH-Wert und Ratio im betrachteten Bereich vor? (Sichtbar an den erhaltenen Messwerten. Vgl. Abb. 17 und Abb. 19.) Die letzte Frage ist wichtig für die spätere Gradientenmessung, da bei Vorliegen der Linearität zwei Eichpunkte genügen, um den pH-Wert aus der Ratio mit hinreichender Genauigkeit berechnen zu können.

Es wurden mehrere Sätze von Versuchen durchgeführt. Im ersten Versuch wurde HEPES-gepufferte modifizierte Ringerlösung verwendet.

Die verwendeten pH-Werte zum Spülen waren:

pH_1 : 6,5

pH_2 : 7,0

pH_3 : 7,5

pH_4 : 8,0

2. Material und Methoden

Im zweiten Versuch wurde selbst angesetztes RPMI 1640 Medium (Sigma Aldrich) verwendet (vgl. 2.1.1). Als Puffer wurde HEPES mit einer Konzentration von 10 mmol/l genutzt und es erfolgte keine Zugabe von FCS oder NaHCO_3 . Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte wie oben beschrieben.

Die verwendeten pH-Werte zum Spülen waren:

pH₁: 6,0

pH₂: 6,5

pH₃: 7,0

pH₄: 7,5

2.7.4 Aufbau des pH-Gradienten

Für die eigentlichen Gradientenmessungen wurden unterschiedliche Lösungen (siehe Einzelversuche) mit je zwei unterschiedlichen pH-Werten, pH₁ und pH₂ genannt, verwendet.

Im Grundsatz erfolgte der Aufbau des pH-Gradienten wie der unter 2.7.1 beschriebene Aufbau eines Chemokingradienten, es gab jedoch zwei wesentliche Unterschiede: Erstens wurde, als die ganze Kammer mit einer Lösung von pH₁ gefüllt war, die Ratio für mindestens 10 Datenpunkte gemessen. Somit wurde pH₁ als erster Eichpunkt verwendet. Zweitens wurde nach der eigentlichen Messung des Gradienten die ganze Kammer wie unter 2.7.3 beschrieben mit einer Lösung von pH₂ gespült und durch die anschließende Messung der Ratio mit mindestens 10 Datenpunkten ein zweiter Eichpunkt generiert. Es wurde in allen Lösungen dieselbe BCECF-Konzentration wie unter 2.7.3 beschrieben verwendet.

Weiterhin wurden über die gesamte Breite des Kanales linear angeordnete und deutlich kleinere Messregionen gewählt als bei der Messung der Spülbarkeit der μ -Slides (vgl. Abb. 4).

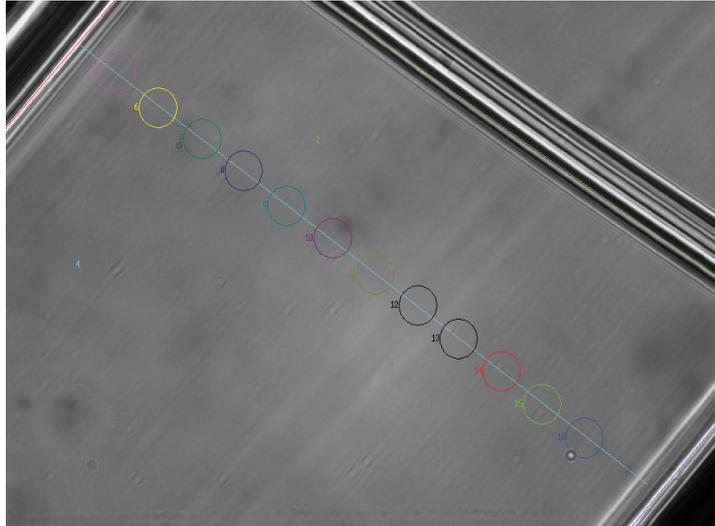


Abb. 5: Messregionen pH-Gradient

Zeigt exemplarisch Messregionen bei der Beobachtung des Gradientenaufbaus. (Vor der Messung angebrachter Kratzer jetzt oben rechts im Bild, ansonsten analog zu Abb. 4).

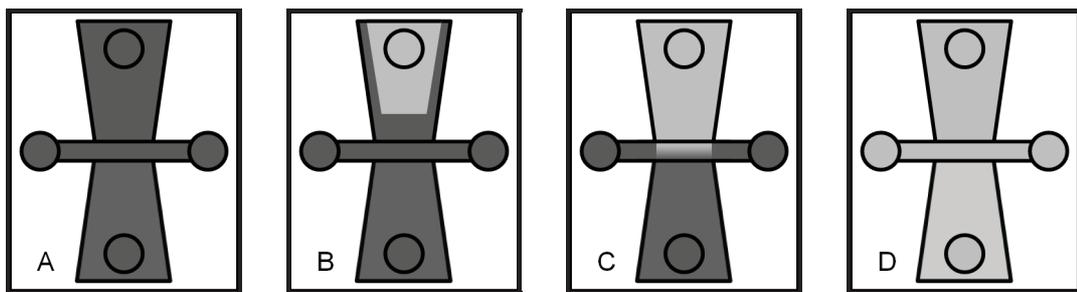


Abb. 6: Messung des pH-Gradienten

- A: Füllen der Kammer (pH_1) – Erster Eichpunkt
- B: Zugabe von 15 μl der zweiten Lösung (pH_2)
- C: Messung des Gradienten
- D: Spülen der Kammer (pH_2) - Zweiter Eichpunkt
(Analog zu Abb. 2)

Durch die Tatsache, dass an den Eichpunkten der pH-Wert in der Kammer genau bekannt war, konnte in der Auswertung unter Annahme einer linearen Beziehung zwischen gemessener Ratio und pH-Wert eine entsprechende Umrechnung erfolgen.

2. Material und Methoden

Im Verlauf der Versuche wurden diverse Bedingungen getestet, die an dieser Stelle nicht alle wiedergegeben werden sollen. Wichtig waren folgende Bedingungen (Details zur Auswahl dieser Bedingungen: siehe Ergebnisteil).

1. pH₁: 7,0 in HEPES-gepuffertes Ringerlösung
 pH₂: 7,8 / 8,0
2. pH₁: 6,8 in HEPES-gepuffertes Ringerlösung
 pH₂: 7,8
3. pH₁: 7,0 in RPMI 1640 Medium
 pH₂: 6,4

2.8 Migrationsversuche – MV3 Zellen

Diese Versuche sollen als eigentliches Kernstück der Arbeit die Frage beantworten, ob MV3 Zellen in der Lage sind, eine pH-Taxis zu zeigen.

2.8.1 Grundüberlegungen

Das Befüllen der μ -Slides erfolgte so, wie es unter Punkt 2.7.1 dargestellt wurde. Kurz zusammengefasst wurden zunächst die Zellen in einer Lösung mit pH₁ im Kanal ausgesät und adhären dort. Anschließend wurde die ganze Kammer mit derselben Lösung (weiterhin pH₁) gefüllt. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 15 μ l einer zweiten, bis auf den pH-Wert (also pH₂), identischen Lösung in eines der Reservoirs.

Danach wurde die Zellmigration unter Durchlicht mit je einem Bild alle 10 min für unterschiedliche Zeiträume aufgezeichnet. (Die verwendeten Mikroskope, Objektive und die Software zur Bildaufzeichnung sind bei den Einzelversuchen angegeben.)

Abschließend wurde die Zellbewegung für mehrere ausgewählte Zellen pro Versuch mit der Software Amira 2.2 oder Amira 4.1.1 (Mercury Computer Systems) manuell markiert und mit dem RLE-Plugin für ImageJ 1.26l (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) unter Berücksichtigung der jeweiligen Mikroskopvergrößerung in Bewegungsdaten, bestehend aus der Zellposition in einem zweidimensionalen kartesischen Koordinatensystem zu jedem

2. Material und Methoden

beobachteten Zeitpunkt, umgerechnet. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit Excel 2003 (Microsoft).

Im Verlauf wurden verschiedene Bedingungen für die Migrationsversuche getestet. Dabei gab es zwei wesentliche Voraussetzungen, die die möglichen Bedingungen limitierten: Erstens müssen MV3 Zellen beim pH-Wert in der ersten verwendeten Lösung (pH_1) sowohl überleben als auch adhären können. Wie bereits in der Einleitung dargestellt ergibt sich damit für pH_1 ein begrenzter möglicher Bereich. Zweitens muss der pH-Wert der zweiten Lösung (pH_2) so gewählt werden, dass während des gesamten Beobachtungszeitraumes Bedingungen in der Kammer herrschen, die zumindest das Überleben und sinnvollerweise auch eine gewisse Migration der Zellen erlauben. Dadurch ist auch pH_2 sowohl ins Saure als auch ins Alkalische limitiert.

Das Zutreffen der zweiten Bedingung konnte, da der Verlauf des pH-Gradienten bei gegebenem pH_1 und pH_2 bisher nur experimentell ermittelt werden kann, alleine durch Austesten unterschiedlicher pH-Werte festgestellt werden. Daher wurde eine ganze Reihe unterschiedlicher Bedingungen geprüft, die nicht alle dargestellt werden sollen.

2.8.2 Einzelversuche

Folgende drei Bedingungen wurden mehrfach erfolgreich – also unter Einhaltung der unter 2.8.1 gestellten Bedingungen – durchgeführt und waren daher auswertbar:

1. Mehrere Messungen in HEPES-gepufferter Ringerlösung mit entweder $\text{pH}_1=7,0$ und $\text{pH}_2=7,8$ oder $\text{pH}_1=7,0$ und $\text{pH}_2=8,0$. Es wurden ein Axiovert 25 Mikroskop (Zeiss) mit einem CP-ACHROMAT 10x Objektiv (Zeiss) und Axiovert 40 C Mikroskope (Zeiss) mit A-Plan 10x Objektiven (Zeiss) verwendet. Die Bildaufzeichnung erfolgte mit der Software HiPic 32 (Hamamatsu Photonics) oder Wasabi (Hamamatsu Photonics). Einzelne Messungen wurden auch mit einem Axiovert S 100 Mikroskop (Zeiss) mit einem EC Plan-NEOFLUAR 10x Objektiv (Zeiss) und der MetaFluor Software (Molecular Devices) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in diesen Versuchen noch nicht verblindet.

2. Mehrere Messungen in HEPES-gepufferter Ringerlösung mit $\text{pH}_1=6,8$ und $\text{pH}_2=7,8$. Verwendet wurden Axiovert 25 und Axiovert 40 C Mikroskope (siehe oben). Bei der Auswertung erfolgte eine Verblindung: Die zu markierenden Zellen in jedem Versuch wurden zufällig und ohne vorherige Betrachtung des Migrationsfilmes festgelegt. Sie wurden nur dann nicht mit in die Auswertung einbezogen, wenn sie sich während des Versuches vom Untergrund gelöst, sich geteilt oder den sichtbaren Bereich verlassen hatten. Außerdem war die Richtung des anliegenden pH-Gradienten dem Auswertenden nicht bekannt. Erst nach Abschluss der Auswertung erfolgte eine rechnerische Korrektur, so dass alle Einzelversuche miteinander vergleichbar wurden.

Beide Maßnahmen sollten den Auswerter daran hindern – bewusst oder unbewusst – Zellen auszuwählen, die sich einer vermuteten Migrationsrichtung entsprechend verhielten.

3. Mehrere Messungen in selbst angesetztem RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich) mit 10 mmol/l HEPES als Puffer. Diese Versuche erfolgten alle an einem Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss) mit einem EC Plan-NEOFLUAR 10x Objektiv (Zeiss) und der MetaFluor Software, da hier die Möglichkeit bestand, das Durchlicht während der Zeiten, in denen keine Aufnahme erfolgte, abzudunkeln. Die Verblindung erfolgte wie oben beschrieben.

2.9 Migrationsversuche – HL-60 Zellen

Migrationsversuche mit HL-60 Zellen, die 6 Tage in RPMI 1640 Medium mit 1,3 % DMSO stimuliert worden waren (vgl. 2.1.2), erfolgten in mit Fibronectin (Roche Diagnostics) beschichteten μ -Slides in einem pH-Gradienten mit $\text{pH}_1=6,8$ und $\text{pH}_2=7,8$ in HEPES-gepufferter Ringerlösung. Es wurde ein Axiovert S 100 Mikroskop (Zeiss) mit einem EC Plan-NEOFLUAR 10x Objektiv (Zeiss) und der MetaFluor Software (Molecular Devices) verwendet. Bei einer Versuchsdauer von 5 h erfolgte jede Minute die Aufnahme eines Bildes. Die Auswertung erfolgte ohne Verblindung. Es wurde dieselbe Software wie für die Migrationsversuche der MV3 Zellen verwendet.

2.10 Statistik

In Diagrammen werden entweder absolute Werte oder Mittelwerte dargestellt (Angabe s. jeweilige Abbildung).

Als Streuungsmaße werden Standardabweichung oder Standardfehler (= SEM, englisch standard error of the mean) verwendet (Angabe s. jeweilige Abbildung). Der Standardfehler errechnete sich dabei als Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel der Anzahl der Messwerte (n).

3. Ergebnisse

3.1 Expression der GPCR auf mRNA-Ebene

Sowohl in MV3 als auch in HL-60 Zellen konnte die Expression von OGR1, GPR4 und TDAG8 auf mRNA-Ebene durch PCR gezeigt werden.

OGR1

Es wurde eine Amplifikation bei der erwarteten Produktlänge von 653 bp gefunden.

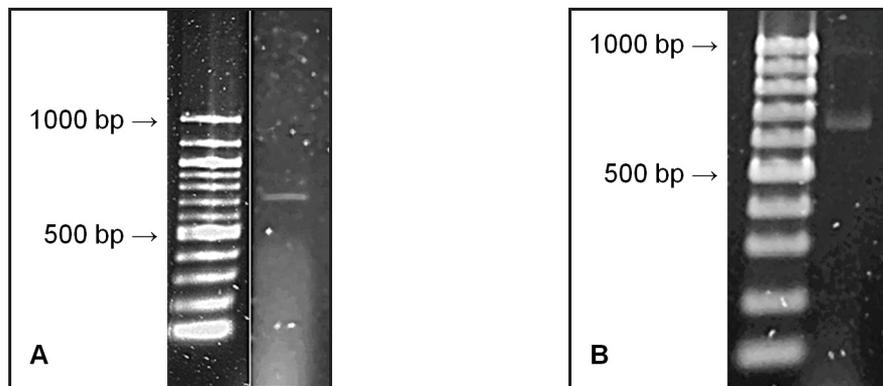


Abb. 7: PCR mit OGR1-Primern

Zeigt die Ergebnisse der PCR mit OGR1-Primern:

A: MV3 cDNA (Zwischen den gezeigten Banden wurden zwei Spuren (Lanes) durch Bildbearbeitung entfernt.)

B: HL-60 cDNA

Die Negativkontrolle (nicht gezeigt) zeigte keine Amplifikation und es lagen keine unspezifischen Bindungen vor.

3. Ergebnisse

GPR4

Es wurde eine Amplifikation bei der erwarteten Produktlänge von 268 bp gefunden.

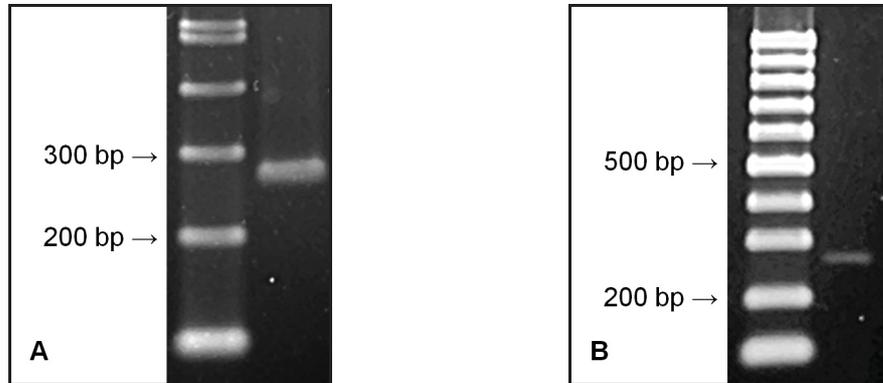


Abb. 8: PCR mit GPR4-Primern

Zeigt die Ergebnisse der PCR mit GPR4-Primern:

A: MV3 cDNA

B: HL-60 cDNA

Die Negativkontrolle (nicht gezeigt) zeigte keine Amplifikation und es lagen keine unspezifischen Bindungen vor.

TDAG8

Es wurde eine Amplifikation bei der erwarteten Produktlänge von 322 bp gefunden.

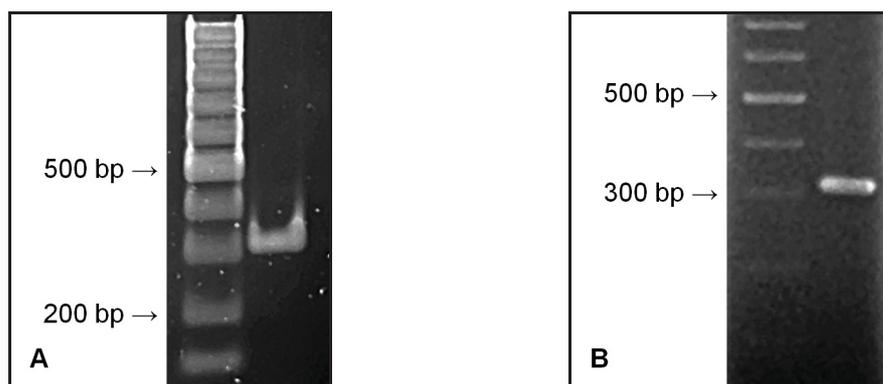


Abb. 9: PCR mit TDAG8-Primern

Zeigt die Ergebnisse der PCR mit TDAG8-Primern:

A: MV3 cDNA

B: HL-60 cDNA

Die Negativkontrolle (nicht gezeigt) zeigte keine Amplifikation und es lagen keine unspezifischen Bindungen vor.

3. Ergebnisse

3.2 Expression der GPCR auf Proteinebene

Die Expression von OGR1 und GPR4 auf Proteinebene konnte durch Immunfluoreszenz und Western Blot für MV3 Zellen gezeigt werden.

3.2.1 Immunfluoreszenz

Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für alle gemachten Aufnahmen. Keine der Negativkontrollen zeigte eine deutliche Bindung des Erstantikörpers.

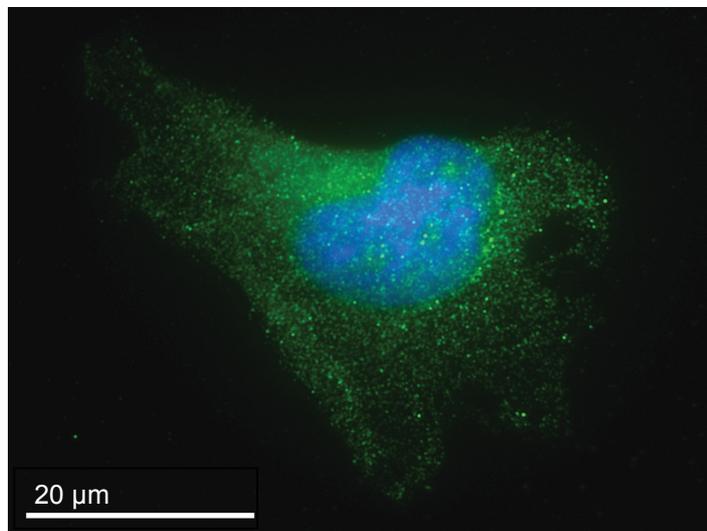


Abb. 10: OGR1 Immunfluoreszenz

3500 ms Belichtungszeit für Alexa 488; 10 ms Belichtungszeit für DAPI

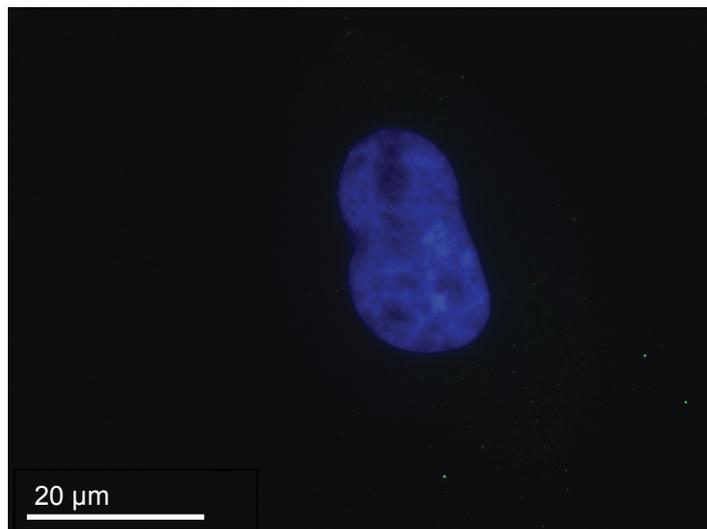


Abb. 11: OGR1 Immunfluoreszenz – Negativkontrolle

3500 ms Belichtungszeit für Alexa 488; 10 ms Belichtungszeit für DAPI

3. Ergebnisse

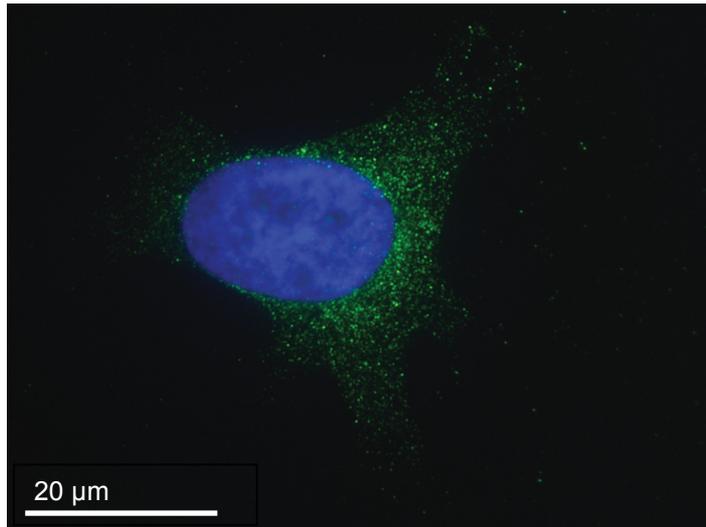


Abb. 12: GPR4 Immunfluoreszenz

2000 ms Belichtungszeit für Alexa 488; 10 ms Belichtungszeit für DAPI

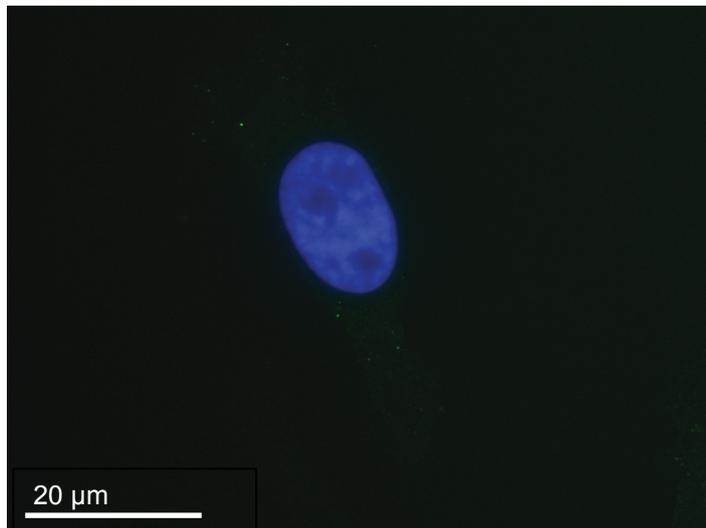


Abb. 13: GPR4 Immunfluoreszenz – Negativkontrolle

2000 ms Belichtungszeit für Alexa 488; 10 ms Belichtungszeit für DAPI

Ohne dass diese Frage durch weitere Tests untersucht wurde, konnte durch Betrachtung mit dem bloßen Auge keine eindeutige Verteilung von OGR1 oder GPR4 zwischen dem Vorder- und Hinterende der MV3 Zellen festgestellt werden, wie dies zum Beispiel für NHE1 bekannt ist (Stock et al. 2007). Dabei ist die perinukleäre Fluoreszenzanreicherung am ehesten durch eine Markierung der im endoplasmatischen Retikulum und / oder im Golgi Apparat lokalisierten Rezeptoren zu erklären.

3. Ergebnisse

3.2.2 Western Blot

Der Nachweis von OGR1 und GPR4 im Western Blot ist diskussionswürdig. Zwar erfolgte kein Nachweis bei der erwarteten Proteinmasse von jeweils ca. 41 kD, jedoch stellte sich eine klare Bande bei ca. 60 kD (OGR1) bzw. 50 kD (GPR4) dar.

Folgende Gründe lassen – obwohl der letztendliche Beweis nicht erbracht werden kann – klar vermuten, dass es sich bei diesen Banden um die jeweils angenommenen Proteine handelt:

1. Da die Banden bei deutlich größeren Proteinmassen als erwartet liegen, ist eine Homo- oder Heterodimerisierung der GPCR (Zaslavsky et al. 2006), die durch die verwendeten denaturierenden Lysemethoden (Zugabe von DTT, teilweise Erhitzen) nicht gelöst werden konnte, wahrscheinlich.
2. In einer anderen Arbeit (Yang et al. 2006) wurde ein OGR1 Western Blot mit vergleichbarem Ergebnis als Nachweis des Rezeptors publiziert. Leider erfolgt auch hier keine Erklärung dieser Beobachtung und ein persönlicher Kontakt mit dem Autor kam nicht zustande.
3. Von Herrn Dr. Klaus Seuwen (Novartis) konnte im Jahre 2011 in Erfahrung gebracht werden, dass auch in seinem Labor kein befriedigender Nachweis von OGR1 durch Western Blot geglückt ist. Der Nachweis auf mRNA-Ebene und durch funktionelle Kalziummessungen wurde als ausreichend angesehen (persönliche Kommunikation).
4. Ebenso konnte Herr Prof. Dr. Carsten Wagner (Universität Zürich) bestätigen, dass Western Blots von OGR1 bzw. GPR4 selten den erwarteten Erfolg haben (persönliche Kommunikation mit Herrn Prof. Dr. Christian Stock).
5. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen OGR1 und GPR4 (Ludwig et al. 2003) lässt vermuten, dass sich beide Rezeptoren – wie auch hier gezeigt – beim Western Blot ähnlich verhalten werden.

3. Ergebnisse

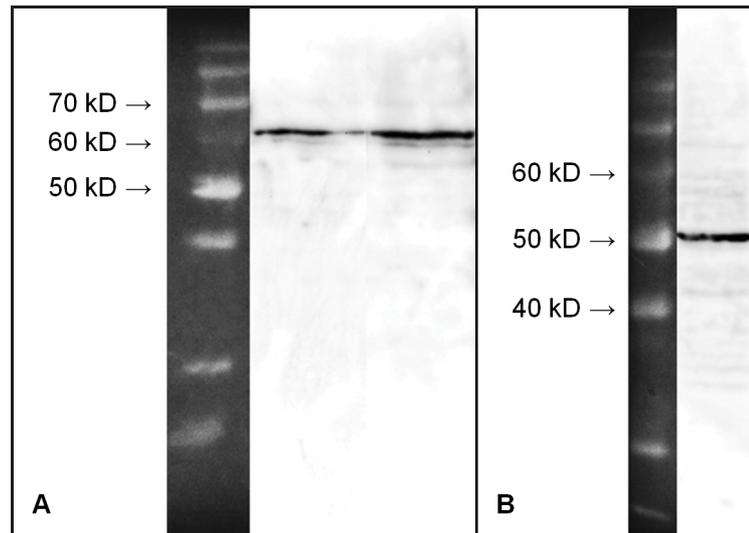


Abb. 14: Western Blot

Zeigt die Ergebnisse von Western Blot Versuchen mit MV3 Zellen jeweils mit Proteinstandard im Durchlichtbild.

A: OGR1 Western Blot (links: MV3 Pellet, rechts: MV3 Überstand; vgl. 2.5.1)

B: GPR4 Western Blot (MV3 Überstand)

Die gezeigten Banden wurden durch Bildbearbeitung zusammengefügt. Höhenbeziehungen (und damit Informationen über die Proteinmasse) blieben dabei unverändert.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass neben dem oben gezeigten Nachweis von OGR1 und GPR4 auf mRNA-Ebene auch der Nachweis auf Proteinebene geführt werden konnte: Die Immunfluoreszenz erbrachte eindeutige Ergebnisse und es ist mit relativ großer Sicherheit davon auszugehen, dass auch im Western Blot die (dimerisierten) Proteine nachgewiesen wurden.

3.3 Funktionelle pH-Sensitivität von MV3 Zellen

Durch Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden wichtige Hinweise darauf erzielt, dass MV3 Zellen auch funktionell in der Lage sind, auf Änderungen des extrazellulären pH-Wertes zu reagieren.

3. Ergebnisse

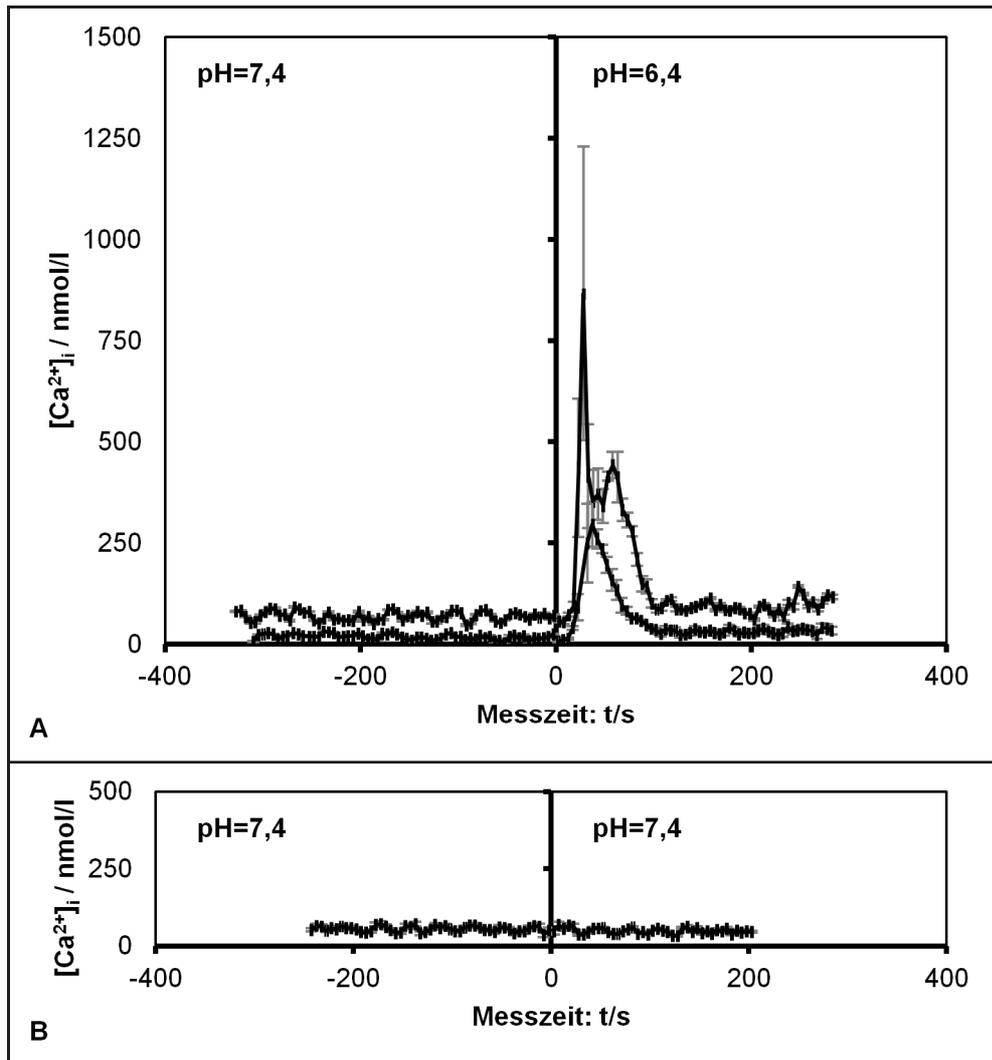


Abb. 15: Intrazelluläre Kalziumkonzentration

Zeigt exemplarisch die ratiometrisch gemessene intrazelluläre Kalziumkonzentration von MV3 Zellen. pH-Werte beziehen sich auf die verwendeten Lösungen und damit auf den extrazellulären Raum.

A: Zwei Versuche mit $n=3$ (obere Messreihe) bzw. $n=2$ (untere Messreihe). Dargestellt ist jeweils die Reaktion auf Ansäuerung von pH=7,4 auf pH=6,4.

B: Kontrollversuch mit $n=4$: Es erfolgte ein Überspülen der Zellen wie in A, der pH-Wert wurde jedoch konstant bei pH=7,4 gehalten.

Die Messzeit wurde in beiden Versuchen so korrigiert, dass der Lösungswechsel zum Zeitpunkt $t=0$ s erfolgte. Darstellung jeweils als Mittelwert mit SEM (grau).

Es ist also klar ersichtlich, dass MV3 Zellen innerhalb weniger Sekunden auf eine Änderung des extrazellulären pH-Wertes mit einem deutlichen intrazellulären Kalziumsignal reagieren können (Abb. 15, A) und dass dieser Effekt nicht durch den mechanischen Stress beim Überspülen der Zellen

3. Ergebnisse

bedingt ist (Abb. 15, B). Es ist bekannt, dass OGR1 ein analoges Signal auslösen kann (Ichimonji et al. 2010).

Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass der Ursprung des hier beobachteten Kalziumsignals durch unsere Versuche nicht eindeutig intrazellulären Speichern (und damit den G-Protein gekoppelten Sensoren) zugeordnet werden kann. In kalziumfreier Lösung zeigte sich ein massives Signalrauschen (möglicherweise durch den verwendeten Chelator EGTA verursacht), so dass keine sinnvolle Aussage über das Signalverhalten der MV3 Zellen möglich war (Details nicht gezeigt). Folglich kann auch ein Kalziumstrom aus dem extrazellulären Raum nicht ausgeschlossen werden.

Allerdings steht die funktionelle Reaktion auf Ansäuerung in physiologischem Milieu, in dem extrazellulär Kalziumionen vorhanden sind, außer Zweifel.

3.4 Aufbau eines extrazellulären pH-Gradienten

In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Lösung in μ -Slides mit der verwendeten Methode vollständig ausgetauscht werden kann. Weiterhin wurde die Linearität der Beziehung zwischen gemessener Ratio und dem pH-Wert sowohl für HEPES-gepufferte Ringerlösung als auch für RPMI 1640 Medium gezeigt. Damit waren die Voraussetzungen für die eigentlichen Gradientenmessungen gegeben. In diesen konnte gezeigt werden, dass sich unter verschiedenen Bedingungen ein steiler und zeitlich sehr stabiler pH-Gradient aufbauen lässt.

3.4.1 Austauschbarkeit der Lösung in Ibidi μ -Slides

Beim Spülen des μ -Slides mit HEPES-gepufferten Ringerlösung bei den oben angegebenen (2.7.3) pH-Werten zeigte sich folgendes Ergebnis:

3. Ergebnisse

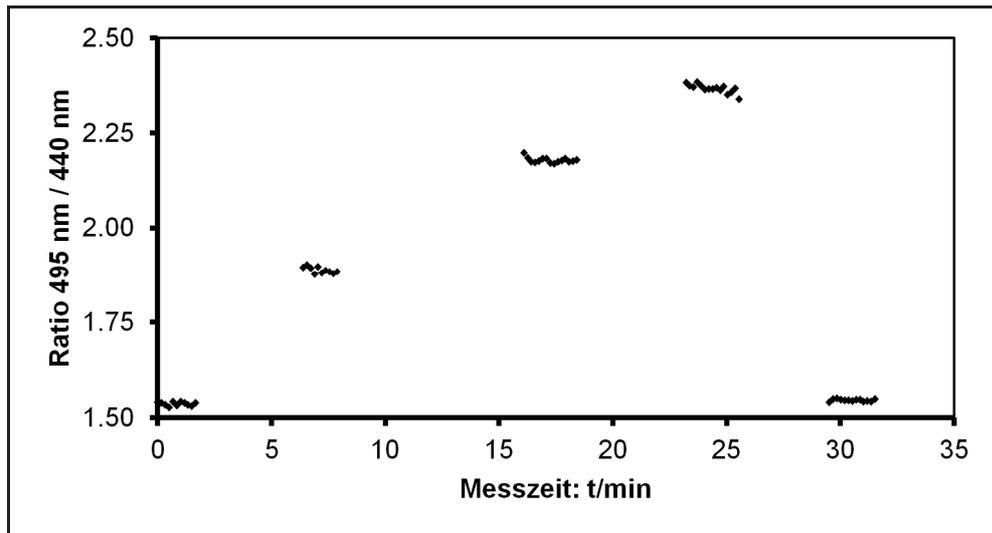


Abb. 16: Ratio über Zeit in HEPES-gepufferter Ringerlösung

Zeigt die Ratio der Emissionsintensitäten bei den Anregungswellenlängen 495 nm / 440 nm beim Spülen des μ -Slides mit den pH-Werten 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; und erneut 6,5 für eine exemplarische Messregion.

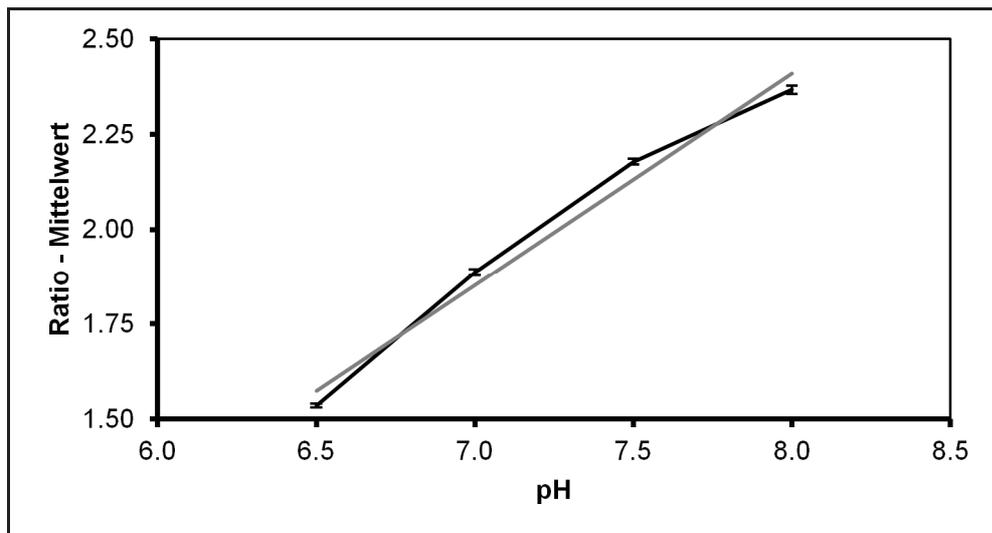


Abb. 17: Mittelwert der Ratio über pH in HEPES-gepufferter Ringerlösung

Zeigt den Mittelwert der Ratio der Emissionsintensitäten bei den Anregungswellenlängen 495 nm / 440 nm mit Standardabweichung in Abhängigkeit vom pH-Wert der Ringerlösung für eine exemplarische Messregion. Enthält eine lineare Ausgleichsgerade (grau).

Der Versuch wurde mehrfach durchgeführt und das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für alle Versuche.

Es lassen sich nun zwei Schlussfolgerungen ziehen: Erstens ist mit der verwendeten Methode ein Flüssigkeitsaustausch in den μ -Slide vollständig

3. Ergebnisse

möglich. Dies ist insbesondere in Abb. 16 daran zu erkennen, dass auch nach mehrfachem Flüssigkeitsaustausch bei Rückkehr zum ursprünglichen pH-Wert von 6,5 dieselbe Ratio gemessen wird wie am Anfang des Versuches. Verbliebe hingegen ein nennenswerter Lösungsrest aus den vorherigen Spülungen in der Kammer, müsste es durch Durchmischung zu einer Änderung des pH-Wertes und damit der gemessenen Ratio kommen. Zweitens besteht für den pH-Bereich von 6,5 bis 8,0 in HEPES-gepufferter Ringerlösung eine lineare Beziehung zwischen dem pH-Wert und der gemessenen Ratio. Dies wird dadurch ersichtlich, dass sich die in Abb. 17 dargestellten Messpunkte sehr nahe an der linearen Ausgleichsgeraden befinden. Folglich ist es für alle weiteren pH-Messungen zur Etablierung eines pH-Gradienten möglich, mit nur zwei Eichpunkten bei bekanntem pH-Wert zu arbeiten und zur Berechnung des pH-Wertes aus der gemessenen Ratio eine lineare Beziehung anzunehmen.

Beim Spülen des μ -Slides mit HEPES-gepuffertem RPMI 1640 Medium bei den oben angegebenen (2.7.3) pH-Werten zeigte sich folgendes Ergebnis:

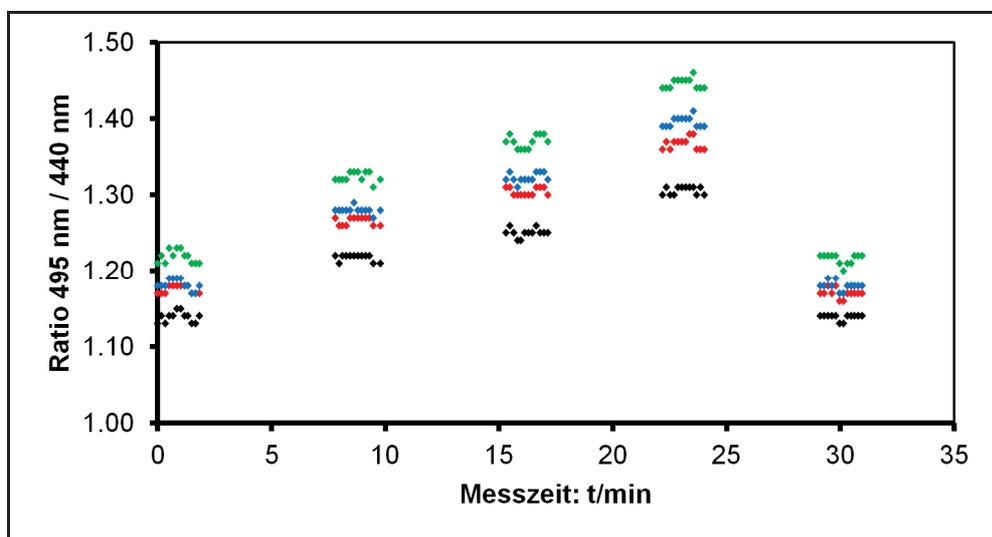


Abb. 18: Ratio über Zeit in RPMI 1640 Medium

Zeigt die Ratio der Emissionsintensitäten bei den Anregungswellenlängen 495 nm / 440 nm beim Spülen des μ -Slides mit den pH-Werten: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und erneut 6,0 für vier Messregionen (repräsentiert durch unterschiedliche Farben) eines Versuches (vgl. Abb. 16).

3. Ergebnisse

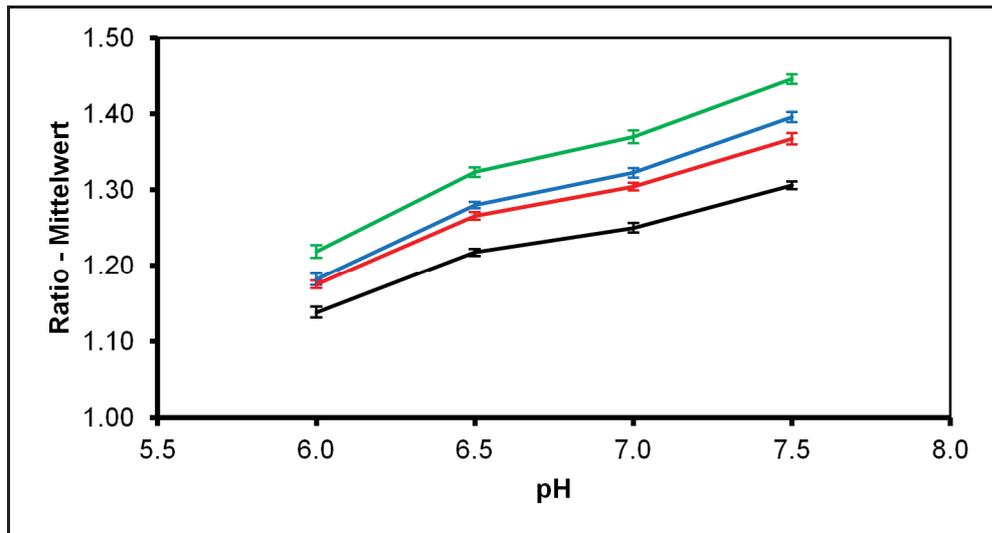


Abb. 19: Mittelwert der Ratio über pH in RPMI 1640 Medium

Zeigt den Mittelwert der Ratio der Emissionsintensitäten bei den Anregungswellenlängen 495 nm / 440 nm aus je ca. 10 Messungen eines Experiments mit Standardabweichung in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums. Unterschiedliche Farben entsprechen unterschiedlichen Messregionen (vgl. Abb. 18).

In diesem Versuch konnte erneut gezeigt werden, dass der Flüssigkeitsaustausch im μ -Slide vollständig möglich ist. Außerdem besteht auch für den pH-Bereich von 6,0 bis 7,5 in RPMI 1640 Medium ein linearer Zusammenhang zwischen dem pH-Wert des Mediums und der gemessenen Ratio.

3.4.2 Gradientenmessungen in HEPES-gepufferter Ringerlösung

Als erstes wurde ein Gradient zwischen $\text{pH}_1=7,0$ und $\text{pH}_2=8,0$ etabliert. Dabei ist mit pH_1 immer der pH-Wert derjenigen Lösung bezeichnet, die zuerst in die Kammer gefüllt wurde, während pH_2 die später in eines der Reservoirs zugegebene Lösung beschreibt (vgl. 2.7.4).

Da es zunächst nur um die Frage ging, ob ein Gradient sich überhaupt in irgendeiner Form erzeugen lässt, wurde keine zeitliche Dynamik aufgezeichnet, sondern nur die Einstellung nach durchschnittlich etwa 1-2 Stunden wiedergegeben.

3. Ergebnisse

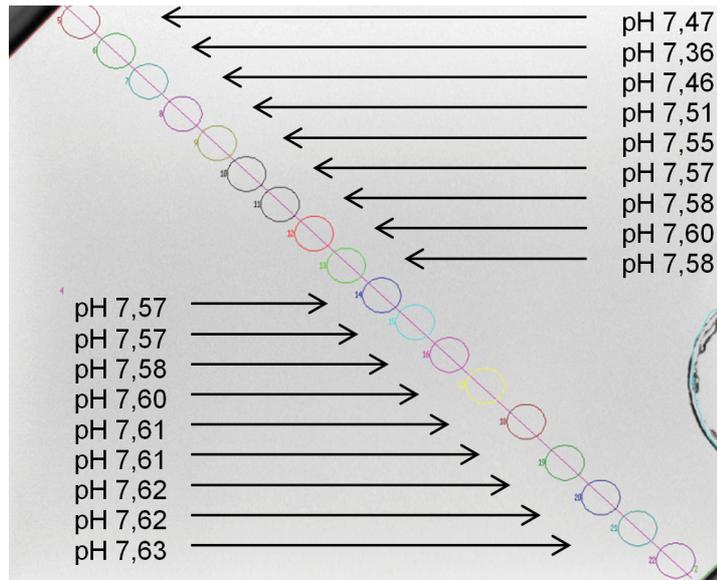


Abb. 20: pH-Gradient mit $pH_1=7,0$ und $pH_2=8,0$ in HEPES-gepufferter Ringerlösung

Zeigt exemplarisch den Gradientenverlauf über die Breite des Messkanales ca. 2 h nach Messbeginn. Dargestellt sind die einzelnen Messregionen im Durchlichtbild mit zugehörigen pH-Werten.

Das Ergebnis zeigt, dass sich mit der verwendeten Methode ein pH-Gradient aufbauen lässt (Abb. 20). Wiederholungsversuche brachten ähnliche Resultate, so dass von einer ausreichenden Reproduzierbarkeit ausgegangen werden kann.

In einem weiteren Satz von Versuchen wurden die Ausgangsbedingungen geändert, da im pH-Bereich des zuerst untersuchten Gradienten nicht mit einer ausreichenden Adhäsions- und Migrationsfähigkeit der MV3 Zellen zu rechnen war (Stock et al. 2005). Es wurden nun Werte von $pH_1=6,8$ und $pH_2=7,8$ verwendet.

Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich der Gradientenaufbau in zeitlicher Dynamik verhält. Es sollte so zum einen der Zeitraum bis zum Aufbau eines für die Migrationsversuche ausreichend steilen Gradienten und zum anderen die Stabilität des Gradienten über die Messzeit untersucht werden.

3. Ergebnisse

Für die Auswertung dieses Versuches wurde der pH-Wert in jeder Messregion für jeden gemessenen Zeitpunkt aus der Eichung errechnet. Nach jeweils 60 Minuten wurde der Mittelwert aus den zeitlich umliegenden Datenpunkten gebildet.

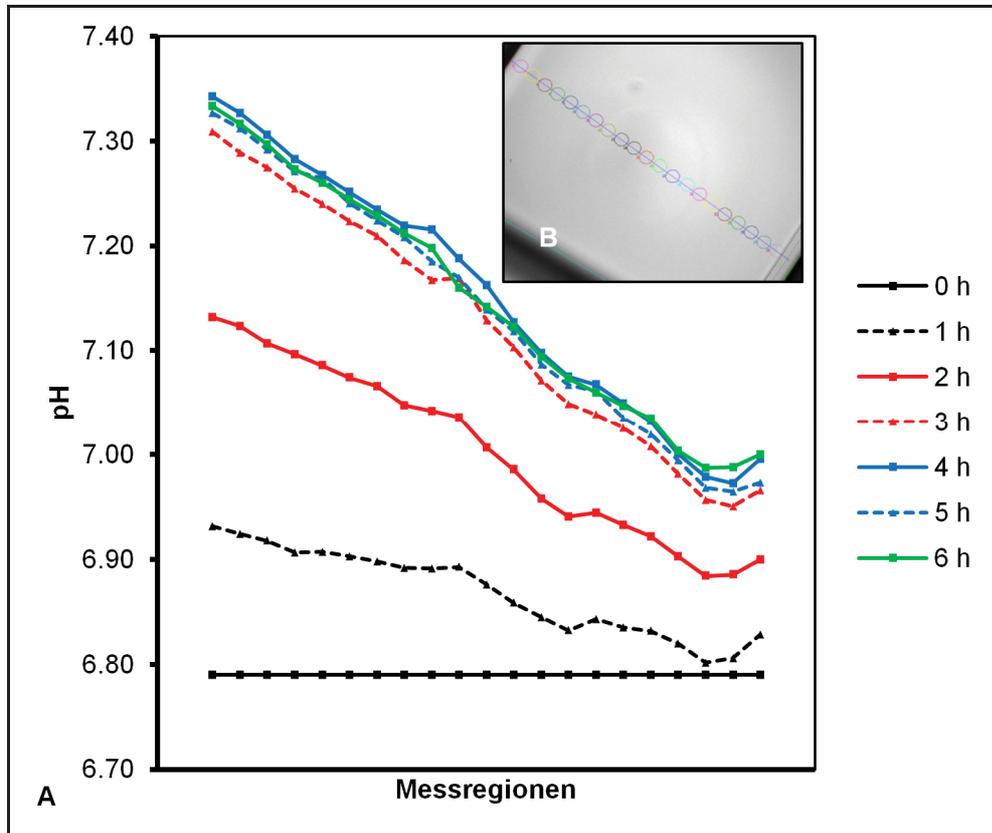


Abb. 21: pH-Gradient mit $pH_1=6,8$ und $pH_2=7,8$ in HEPES-gepufferter Ringerlösung

A: Zeigt einen Querschnitt durch den pH-Gradienten. Die übereinanderliegenden Datenpunkte entsprechen jeweils einer Messregion. Unterschiedliche Zeitpunkte sind durch Farbe und Linienart repräsentiert (s. Legende). Dargestellt sind die Mittelwerte zum angegebenen Zeitpunkt. Versuchsdauer 6 h.

B: Messregionen im Durchlichtbild

Hier wird deutlich, dass sich bereits nach einer Stunde ein pH-Gradient nachweisen lässt, der nach drei Stunden seine endgültige Steilheit erreicht hat. Danach ist der Gradient in engen Grenzen als stabil anzusehen. Außerdem zeigt sich ein homogener Verlauf des Gradienten von einer Seite des Kanals zur anderen.

3. Ergebnisse

Die Differenz der absoluten Protonenkonzentrationen zwischen dem sauren und dem alkalischen Ende des Gradienten liegt bei ca. 50 nmol/l².

Da für den Einsatz der μ -Slides für Chemokingradienten eine Stabilität des Gradienten auch für deutlich größere Zeiträume gezeigt wurde (Zengel et al. 2011), kann vermutet werden, dass auch bei längeren Migrationsversuchen ein stabiler pH-Gradient vorliegt.

3.4.3 Gradientenmessungen in RPMI 1640 Medium

Dieser Versuch entsprach in seinem grundsätzlichen Ablauf und der zeitlichen Auswertung der zweiten Gradientenmessung in Ringerlösung (vgl. Abb. 21). Analog zu den pH-Taxis Versuchen in RPMI 1640 Medium (vgl. 2.8.2) wurden hier die Bedingungen $\text{pH}_1=7,0$ und $\text{pH}_2=6,4$ bei einer Versuchsdauer von 5 Stunden gewählt.

² Berechnet nach $[\text{H}^+]=10^{-\text{pH}}$ mit gemessenen pH-Werten von 7,0 bzw. 7,3 an den Enden des Kanals:

$$\Delta[\text{H}^+] = 10^{-7,0} - 10^{-7,3} \text{ [mol/l]} \cong 50 \text{ nmol/l.}$$

3. Ergebnisse

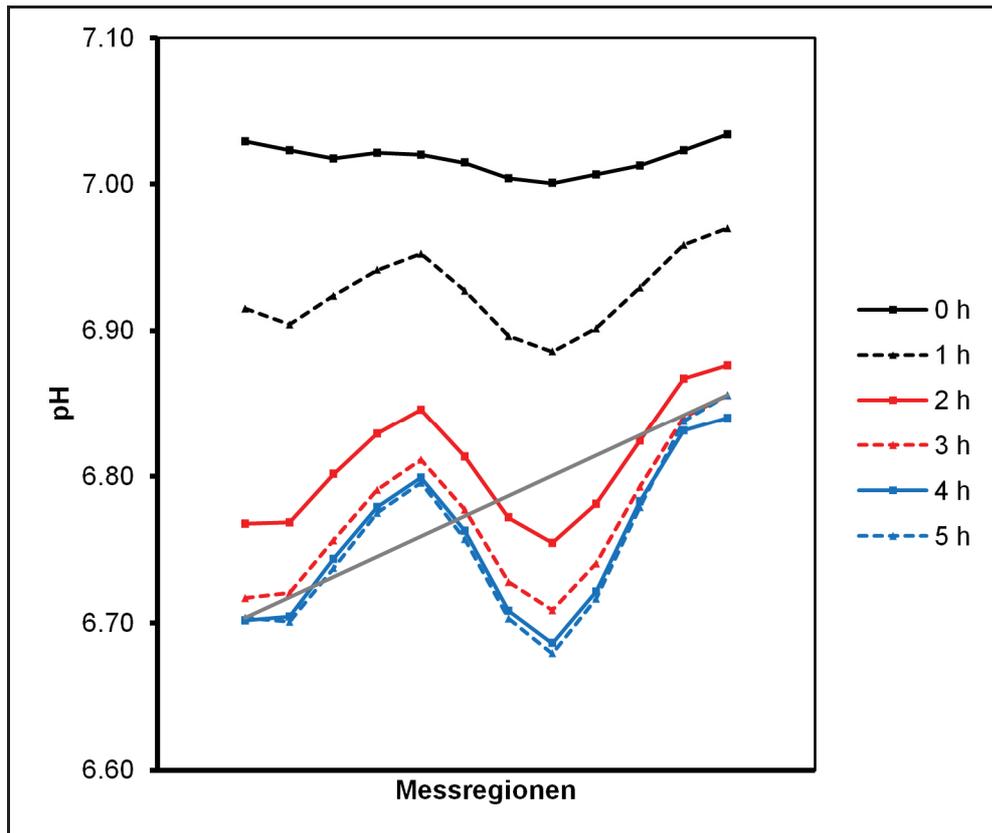


Abb. 22: pH-Gradient mit $pH_1=7,0$ und $pH_2=6,4$ in RPMI 1640 Medium

Zeigt einen Querschnitt durch den pH-Gradienten. Die Darstellung und die Anordnung der Messregionen entsprechen der vorherigen Abbildung. Angabe ebenfalls als Mittelwerte zum jeweiligen Zeitpunkt. Versuchsdauer 5 h. Enthält eine lineare End-zu-End Ausgleichsgerade (grau) für den Zeitpunkt $t=5$ h.

Die Differenz der absoluten Protonenkonzentrationen zwischen dem sauren und dem alkalischen Ende des Gradienten liegt bei ca. 58 nmol/l^3 . Außerdem stellte sich der Gradient in diesen Versuchen bereits nach 2 h relativ stabil ein.

Die pH-Messung über längere Zeiträume in RPMI 1640 Medium stellte aufgrund einer bei der zweiten Eichung auftretenden Luftblasenbildung nach dem Öffnen der Kammer (vgl. Abb. 6, D) eine gewisse technische Herausforderung dar. Bei den Migrationsversuchen kommt dieser Schritt allerdings nicht vor. Daher ist davon auszugehen, dass der hier gezeigte

³ Berechnet nach $[H^+]=10^{-pH}$ mit gemessenen pH-Werten von 6,7 bzw. 6,85 an den Enden des Kanals:

$$\Delta[H^+] = 10^{-6,7} - 10^{-6,85} [\text{mol/l}] \cong 58 \text{ nmol/l.}$$

3. Ergebnisse

relativ inhomogene Gradientenverlauf durch messtechnische Schwierigkeiten bedingt ist und dass bei den Migrationsversuchen ein homogenerer Verlauf erreicht wurde.

Zusammenfassend zeigt sich also auch unter den für die hauptsächlichen Migrationsversuche gewählten Bedingungen ein hinreichend steiler und stabiler pH-Gradient.

3.5 pH-Taxis von MV3 Zellen

Für die Untersuchung der Migration von MV3 Zellen in extrazellulären pH-Gradienten brachten verschiedene Versuchsansätze unterschiedliche Ergebnisse.

3.5.1 Vorversuche

In manchen Migrationsversuchen ($\text{pH}_1=7,0$ und $\text{pH}_2=7,8$ beziehungsweise $\text{pH}_1=7,0$ und $\text{pH}_2=8,0$ jeweils in HEPES-gepufferter Ringerlösung) konnte eine Tendenz zur pH-Taxis – oft in Richtung des alkalischen Milieus – gezeigt werden, während dies in anderen Versuchen nicht der Fall war.

Aufgrund der Tatsache, dass die Versuche noch nicht standardisiert (zum Beispiel mit teilweise unterschiedlicher Dauer) und die Auswertung nicht verblindet erfolgte, konnte hier keine zusammenfassende Auswertung mehrerer Versuche erfolgen.

3.5.2 Migration in HEPES-gepufferter Ringerlösung

In den Versuchen dieser Reihe ($\text{pH}_1=6,8$ und $\text{pH}_2=7,8$ in HEPES- gepufferter Ringerlösung) konnte eine Tendenz zur pH-Taxis in Richtung des sauren Milieus gezeigt werden.

3. Ergebnisse

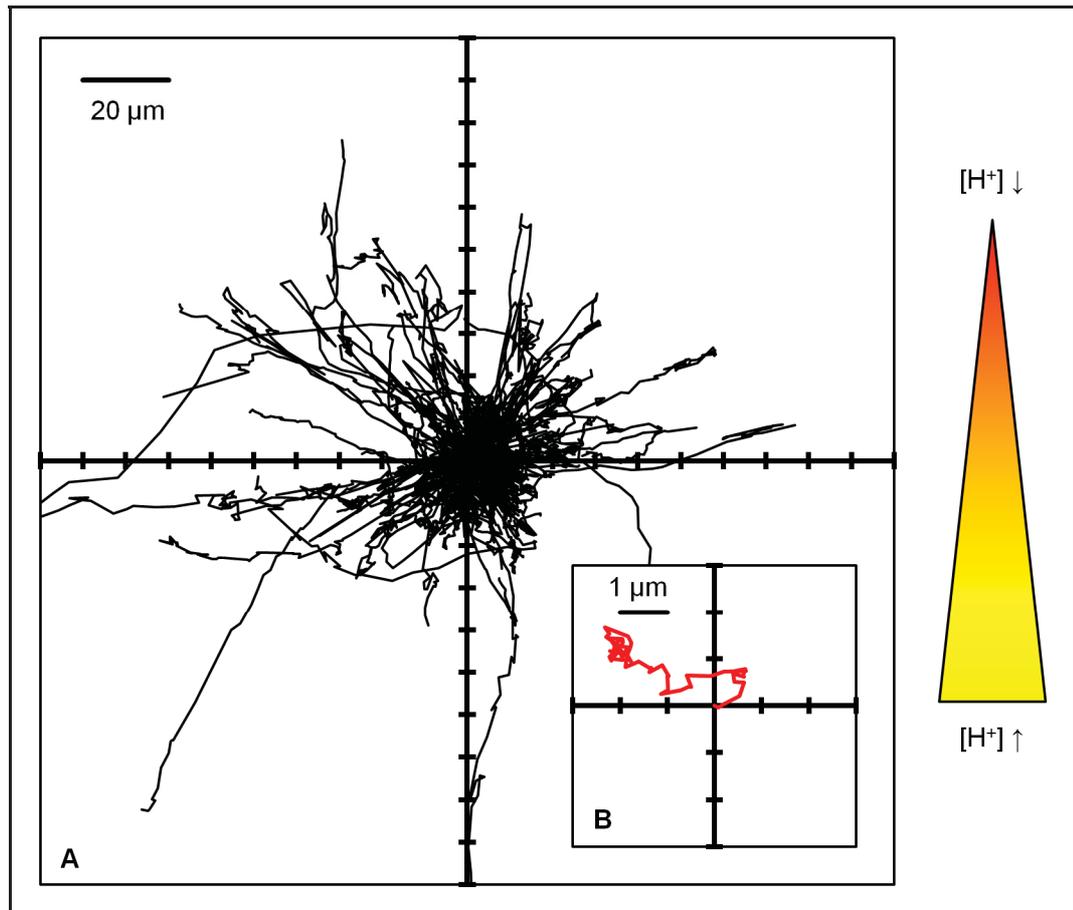


Abb. 23: MV3 Migration in HEPES-gepufferter Ringerlösung

Zeigt die Migration von MV3 Zellen (n=122 aus N=11) in HEPES-gepufferter Ringerlösung mit $\text{pH}_1=6,8$ und $\text{pH}_2=7,8$ für 10 h. Oben im Bild befindet sich der alkalischere und unten der saurere Teil des Gradienten.

- A: Spinnendiagramm: Die Startpunkte aller Zellen wurden rechnerisch auf den Koordinatenursprung (0/0) gesetzt und die Migration relativ zu diesem Punkt dargestellt.
- B: Mittelwert der Migration aller Zellen, ebenfalls vom Koordinatenursprung aus dargestellt.

3. Ergebnisse

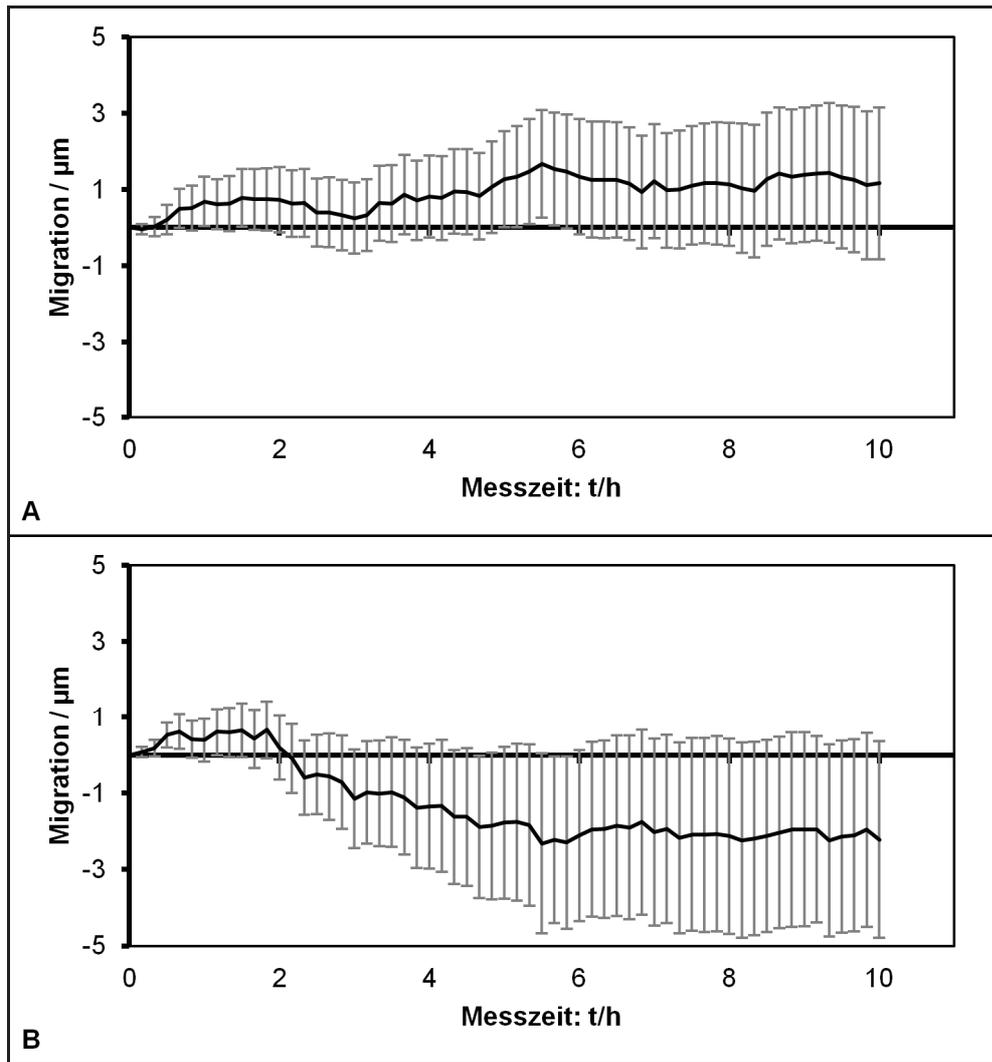


Abb. 24: Durchschnittliche Migration in HEPES-gepufferter Ringerlösung

Zeigt die durchschnittliche Migration aller 122 Zellen (vgl. Abb. 23) mit SEM.

A: Migration entlang des Gradienten

B: Migration rechtwinkelig zum Gradienten

Die Richtung des Gradienten entspricht der Darstellung im Spinnendiagramm (Abb. 23).

Bei dieser Betrachtung der Versuche fand sich zunächst kein Anhalt für das Vorhandensein einer pH-Taxis unter den gewählten Bedingungen. Weder ist eine deutliche Richtung im Spinnendiagramm sichtbar, noch überwiegt die Durchschnittsbewegung entlang des Gradienten die Bewegung rechtwinkelig zu ihm.

Um eine detailliertere Auswertung vornehmen zu können, wurden daher die Sichtfelder aller Migrationsfilme, in denen sowohl der obere als auch der untere Rand des Kanales sichtbar waren (technisch bedingt nicht an allen

3. Ergebnisse

verwendeten Mikroskopen möglich), in horizontal (entlang der Richtung des pH-Gradienten) übereinander liegende Viertel eingeteilt. Da sich die Bedingungen in diesen Bereichen voneinander unterscheiden, ist es prinzipiell denkbar, dass nur in einem dieser Bereiche eine pH-Taxis feststellbar ist.

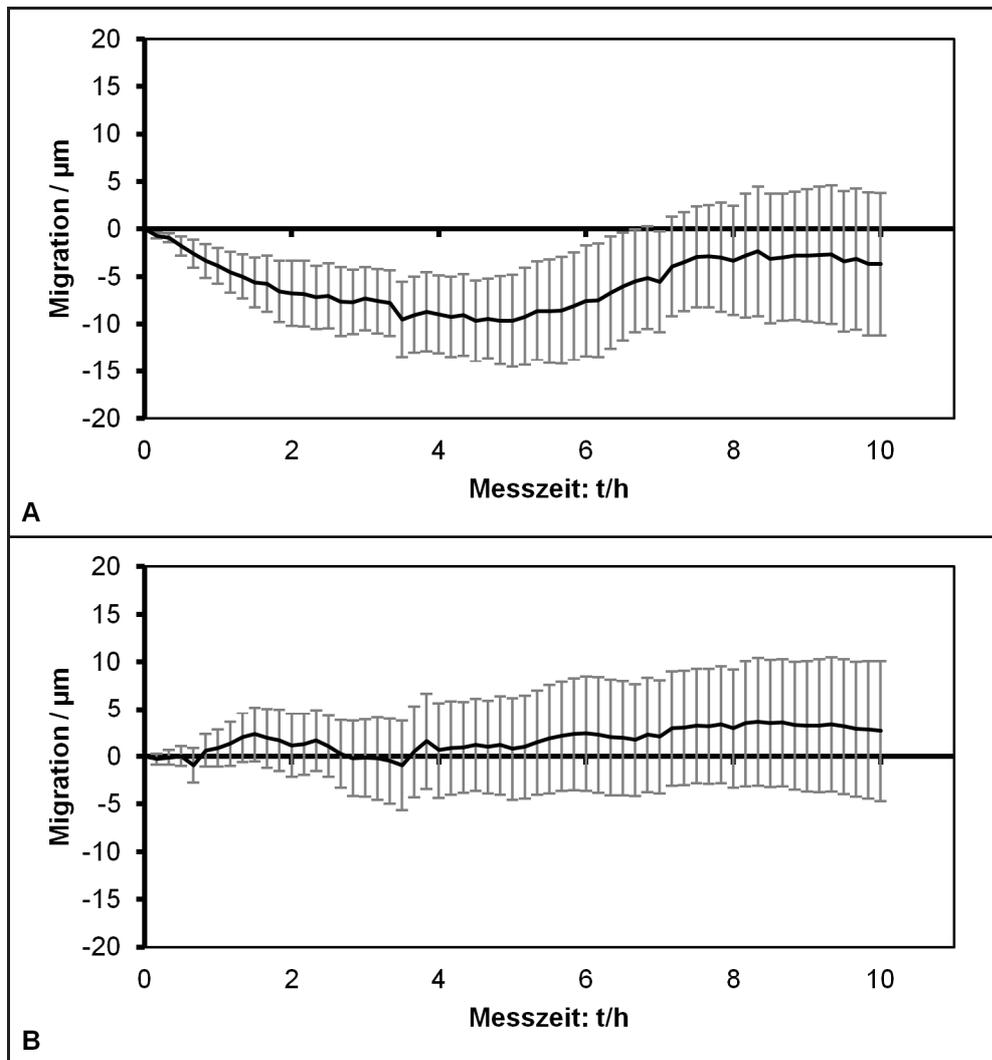


Abb. 25: Durchschnittliche Migration (alkalisches Viertel)

Zeigt die durchschnittliche Migration aller Zellen im alkalischsten Viertel des Gradienten (n=15, N=7) mit SEM.

A: Migration entlang des Gradienten

B: Migration rechtwinkelig zum Gradienten

Die Richtung des Gradienten entspricht der Darstellung im Spinnendiagramm (Abb. 23).

Bei der Betrachtung des alkalischsten Viertels fand sich nach etwa 4-6 Stunden eine deutliche Tendenz zur pH-Taxis in Richtung des saureren pH-Wertes. Dabei überwog die Migration entlang des Gradienten die

3. Ergebnisse

Migration rechtwinkelig zu ihm deutlich. Dieser Effekt konnte in den anderen Vierteln nicht gezeigt werden.

Allerdings ist noch nicht erklärt, warum sich dieser Effekt gegen Ende der Messzeit eher abschwächt als verstärkt. Außerdem konnte die hier gezeigte Tendenz nach einer nochmaligen Randomisierung und Neuauswertung aller Zellen im alkalischen Viertel nicht sicher bestätigt werden.

Daher kann der in diesem Versuchsteil gezeigte Trend nur als Hinweis auf und nicht als Beweis einer pH-Taxis gewertet werden.

3.5.3 Migration in RPMI 1640 Medium

In dieser Versuchsreihe ($\text{pH}_1=7,0$ und $\text{pH}_2=6,4$ in RPMI 1640 Medium) bestätigte sich eine pH-Taxis in Richtung des sauren Milieus. Der festgestellte Effekt ist zwar klein, aber in seiner Richtung eindeutig.

Das experimentelle Vorgehen in Form von Standardisierung und Verblindung war hier ausreichend. Außerdem entspricht das RPMI 1640 Medium eher dem physiologischen Milieu als Ringerlösung, so dass hier insgesamt auch ein kleiner Effekt als relevant angesehen werden darf. Die prinzipielle Übereinstimmung mit einer später in den USA an nicht neoplastischen Zellen durchgeführten Studie (Paradise et al. 2013) bestätigt zusätzlich die Ergebnisse dieser Versuche.

3. Ergebnisse

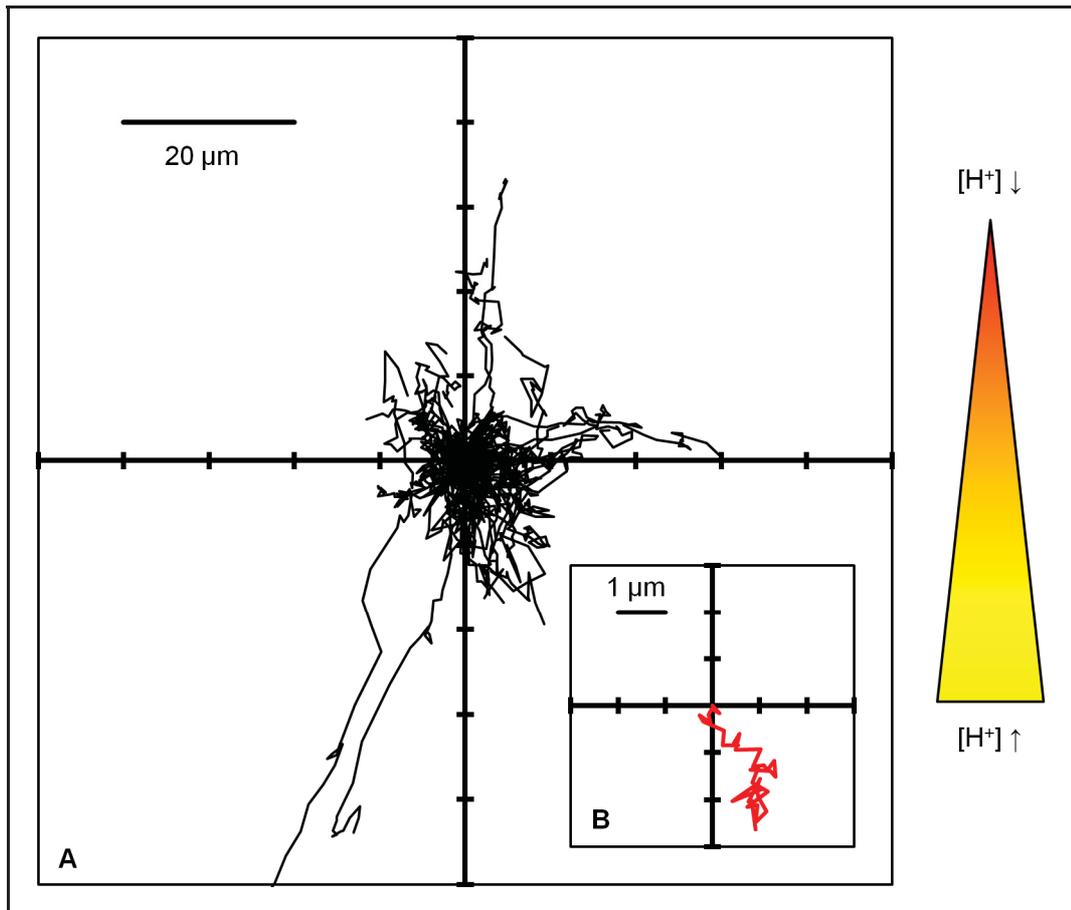


Abb. 26: MV3 Migration in RPMI 1640 Medium

Zeigt die Migration von MV3 Zellen ($n=53$ aus $N=5$) in RPMI 1640 Medium mit $\text{pH}_1=7,0$ und $\text{pH}_2=6,4$ für 6 h. Die Orientierung des pH-Gradienten entspricht den vorher gezeigten Versuchen. Zur Einschätzung der insgesamt migrierten Strecke und der Migrationsgeschwindigkeit sind der abweichende Maßstab und die Versuchsdauer zu beachten.

- A: Spinnendiagramm (Details siehe Abb. 23)
- B: Mittelwert der Migration aller Zellen

Trotz der deutlich geringeren Versuchszeit (6 h im Vergleich zu 10 h) entfernen sich die Zellen im Durchschnitt sogar weiter vom Startpunkt ihrer Bewegung: $2,8 \mu\text{m}$ in RPMI 1640 Medium im Vergleich zu $2,5 \mu\text{m}$ in Ringerlösung.

Weiterhin fällt bereits bei Betrachtung der Mittelwertbewegung auf, dass die Migration in Richtung des sauren Milieus verläuft.

3. Ergebnisse

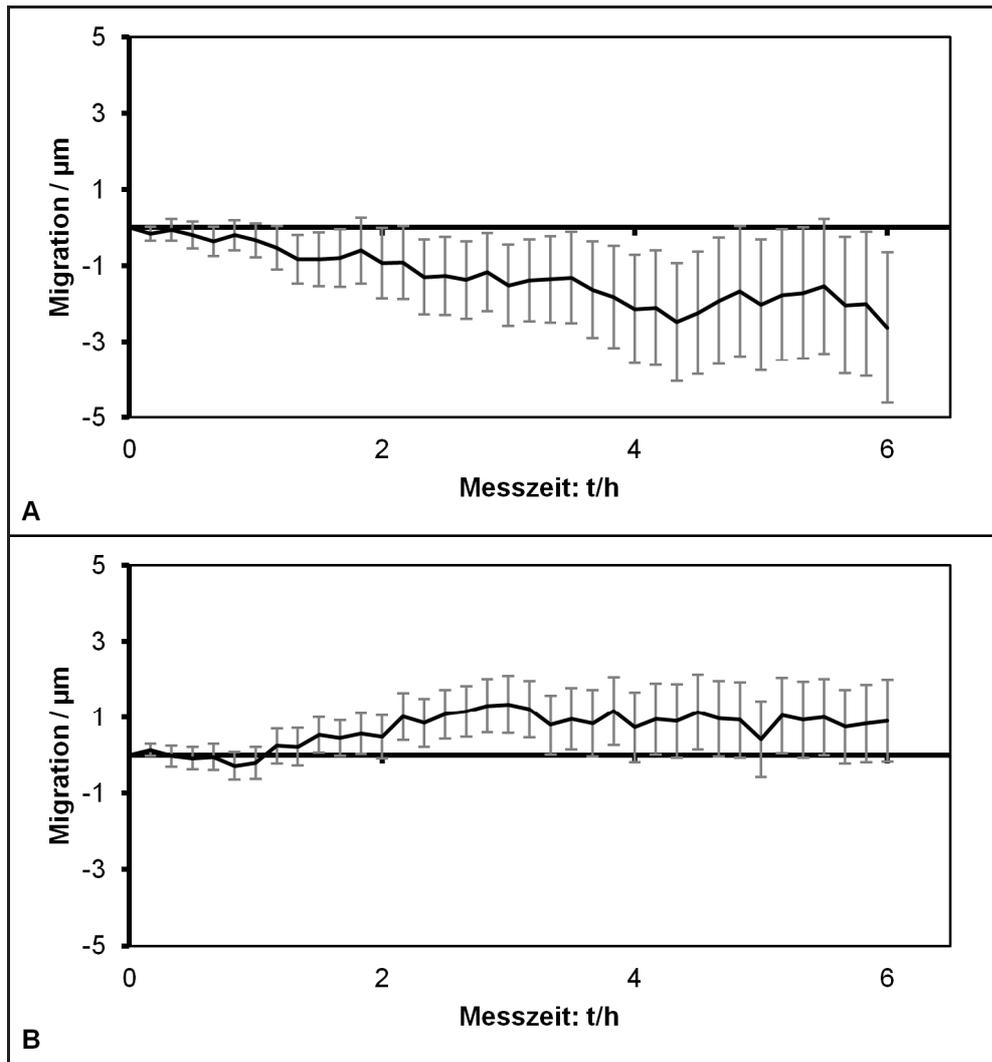


Abb. 27: Durchschnittliche Migration in RPMI 1640 Medium

Zeigt die durchschnittliche Migration aller Zellen mit SEM.

A: Migration entlang des Gradienten

B: Migration rechtwinkelig zum Gradienten

Die Richtung des Gradienten entspricht der Darstellung im Spinnendiagramm (Abb. 26).

In dieser Darstellung (Abb. 27) zeigt sich ein deutliches Überwiegen der Zellmigration entlang des Gradienten im Vergleich zur Migration rechtwinkelig zu ihm. Da unter der Annahme einer pH-Taxis die Migrationsrichtung rechtwinkelig zum Gradienten unbeeinflusst und damit zufällig verteilt bleiben müsste, sollte dieser Wert sich bei der Mittelung über eine große Zahl beobachteter Zellen null annähern. Ein deutliches Überwiegen der Migration entlang des Gradienten ist daher als positives Zeichen für den Einfluss desselben auf die Migrationsrichtung zu werten.

3. Ergebnisse

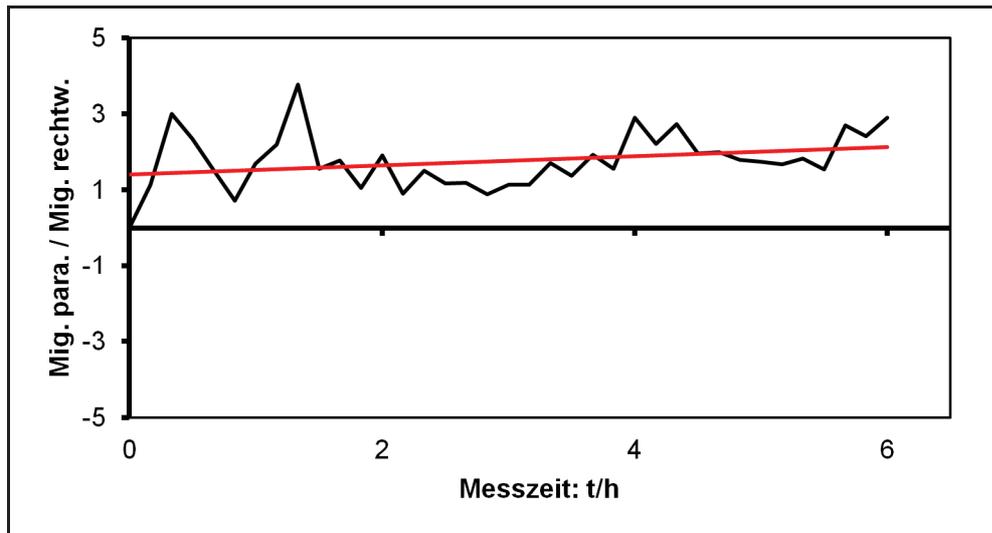


Abb. 28: Relativer Einfluss des pH-Gradienten

Dargestellt ist das Verhältnis aus der durchschnittlichen Migration parallel zum Gradienten und der durchschnittlichen Migration rechtwinkelig zu ihm mit linearer Regressionsgeraden (rot). (Es wurden zwei Ausreißer korrigiert, bei denen der dargestellte Wert bedingt durch die Division mit einem Wert nahe null eine unrealistische Größe angenommen hat.)

In dieser Darstellung (Abb. 28) wird der Einfluss des pH-Gradienten auf das Migrationsverhalten besonders deutlich: Das Verhältnis der Migration parallel zum Gradienten nimmt im Vergleich zur Migration rechtwinkelig zu ihm über den Versuchszeitraum stetig zu.

Dabei ist zu beachten, dass die relativ hohen Verhältniswerte in den ersten ca. 2 Stunden ohne Relevanz sind, da in diesem Zeitraum beide Durchschnittswerte der Migrationskomponenten noch nahe um null schwanken (vgl. Abb. 27). Dabei kommt es durch die Division mit einem sehr kleinen Wert zu großen Schwankungen des Verhältnisses, ohne dass daraus Rückschlüsse auf das tatsächliche Migrationsverhalten der Zellen gezogen werden könnten.

Zusammenfassend ist aus den vorliegenden Daten der Schluss zu ziehen, dass MV3 Zellen in der Lage sind, eine pH-Taxis zu zeigen.

Unter den von uns untersuchten Bedingungen fand sich, wenn sich ein eindeutiger Effekt nachweisen ließ, stets eine pH-Taxis in Richtung des sauren Milieus.

3.6 pH-Taxis von HL-60 Zellen

Da bekannt ist, dass HL-60 Zellen ein gutes Modellsystem für die Migration und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten sind (Fontana et al. 1980; Hauert et al. 2002), wurden Einzelversuche zu ihrer Fähigkeit zur pH-Taxis unternommen.

Unter den verwendeten Bedingungen (pH-Gradient mit $pH_1=6,8$ und $pH_2=7,8$ in HEPES-gepufferter Ringerlösung) konnte allerdings mit HL-60 Zellen (nach Stimulation mit DMSO über 6 Tage, vgl. 2.1.2) keine pH-Taxis nachgewiesen werden (Einzeldaten nicht gezeigt).

Da der Fokus dieser Arbeit auf den Versuchen mit MV3 Zellen lag, wurden keine weiteren Experimente mit HL-60 Zellen unternommen.

4. Diskussion

4.1 Methodische Bedeutung des pH-Gradienten

Es konnte gezeigt werden, dass sich unter verschiedenen Bedingungen in vitro ein steiler und zeitlich sehr stabiler pH-Gradient aufbauen lässt. Damit war die experimentelle Voraussetzung für die Untersuchung des Phänomens pH-Taxis an MV3 Zellen überhaupt erst gegeben.

Dabei lag der gemessene pH-Bereich in RPMI 1640 Medium nahe genug am für die MV3 Migration optimalen pH-Wert von 7,0 (Stock et al. 2005), um mit erhaltener, wenn auch eingeschränkter, Migrationsfähigkeit rechnen zu können. Außerdem sind die experimentell erzeugten pH-Profile in ähnlicher Form auch in soliden Tumoren zu finden, wo pH-Unterschiede von 0,3 bis 0,5 Einheiten im Vergleich zum gesunden Gewebe beobachtet werden (Vaupel et al. 1989) und die pH-Werte um die Blutgefäße herum recht genau denen im hier verwendeten Gradienten entsprechen (Martin und Jain 1994). Daher ist eine gute Korrelation des neu etablierten in vitro Modelles mit der pathophysiologischen in vivo Situation zu erwarten.

Für neutrophile Granulozyten ist bekannt, dass sie bei der Chemotaxis Konzentrationsunterschiede des Chemokins von nur 1 % über ihre Zelllänge wahrnehmen und in gerichtete Migration umsetzen können (Zigmond 1977). In unserem Modellsystem wurde ein Konzentrationsunterschied $\Delta[\text{H}^+]$ von 41 %⁴ über die Kanalbreite erreicht, so dass bei einem analogen Mechanismus der Gradient für MV3 Zellen mit einer Größe von ca. 60 μm (Stüwe et al. 2007, vgl. 3.2.1) bei einer Kanalbreite von 1 mm (Zengel et al. 2011) durchaus wahrnehmbar sein sollte.

In derselben Arbeit (Zigmond 1977) wird zwar ein Konzentrationsunterschied von 10 % über die Zelllänge als optimal beschrieben. Ein solch steiler pH-Gradient ist allerdings mit den verwendeten Kammern nicht zu erzeugen:

⁴ Berechnet nach $[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$ mit gemessenen pH-Werten von 6,7 bzw. 6,85 an den Enden des Kanals (vgl. 3.4.3):

$$\Delta[\text{H}^+] [\%] = (10^{-6,7}/10^{-6,85} - 1) \cdot 100\% \cong 41 \%$$

4. Diskussion

Die Werte von pH_1 und pH_2 müssten weit vom physiologischen Bereich entfernt liegen. Da allerdings auch die Adhäsion der untersuchten Zellen in der Lösung mit pH_1 erfolgen muss (vgl. Abb. 2, A), ist dieses Vorgehen nicht praktikabel.

Auch die Tatsache, dass die Messung in RPMI 1640 Medium durch Luftblasenbildung zu gewissen messtechnischen Schwierigkeiten und damit zu wenig sauber erscheinenden Messkurven führte (Abb. 22), kann nicht als grundlegendes methodisches Problem aufgefasst werden. Dafür gibt es zwei Gründe: Erstens trat die Luftblasenbildung vor allem beim Öffnen des μ -Slides zur Aufzeichnung des zweiten Eichpunktes nach der eigentlichen Gradientenmessung auf (vgl. Abb. 6, D). Dieser Schritt kommt bei den Migrationsversuchen nicht vor, so dass die zu erwartende Störung durch Luftblasen hier deutlich geringer ausfallen sollte. Dies bestätigte sich auch in der Praxis, wo während der Migrationsversuche nur selten Luftblasen beobachtet wurden. Zweitens wurde die Stabilität und Linearität des Gradienten in den μ -Slides für Alexa 488 Farbstoffe für bis zu 48 Stunden gezeigt (Zengel et al. 2011). Auch wenn Protonen und Puffermoleküle andere Diffusionseigenschaften aufweisen, ist im Grundsatz nicht davon auszugehen, dass sich ein pH-Gradient wesentlich anders verhalten sollte als die bekannten Chemokingradienten.

Weiterhin erschöpfen sich die Möglichkeiten des entwickelten Modellsystems nicht mit den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen und Ergebnissen. Eine Anwendbarkeit mit einer Vielzahl von Zelllinien ist denkbar, so dass in Zukunft durch genetische Manipulation oder pharmakologische Blockade die Rolle einzelner Rezeptoren und Strukturen bei der pH-Taxis weiter untersucht werden kann.

Auch wären systematische Untersuchungen mit Zellen des Immunsystems aufschlussreich. Zum einen zeigen beispielsweise neutrophile Granulozyten regelhaft Chemotaxis und sind als Zellen der schnellen Immunabwehr auf gute Migrationseigenschaften angewiesen (Kolaczowska und Kubes 2013). Zum anderen findet sich in entzündlich verändertem Gewebe oft ein Energiemangel, der der metabolischen Situation in einem schnell

4. Diskussion

wachsenden Tumor nicht unähnlich ist und aus dem ebenfalls eine Azidose resultiert (Kominsky et al. 2010). Daher könnten nicht nur neoplastische Zellen einen extrazellulären pH-Gradienten zur Orientierung bei der Migration nutzen. Es wäre aus diesem Grunde zu untersuchen, ob neben Chemotaxis auch pH-Taxis eine Rolle bei Abwehrvorgängen spielt.

Um keine zusätzlichen Proteinpuffer in das System einzuführen und den pH-Gradienten damit so gut wie möglich reproduzieren zu können, wurde in unseren Versuchen keine Beschichtung des Untergrundes verwendet, wie diese bei Migrationsversuchen mit MV3 Zellen sonst üblich ist (Stock et al. 2005). Es sind vom Hersteller jedoch vorbeschichtete μ -Slide erhältlich. Außerdem kann, wie in dieser Arbeit unter Punkt 2.9 angewendet, eine Beschichtung selbst ausgeführt werden (http://ibidi.com/fileadmin/support/application_notes/AN14_Chemotaxis.pdf, Punkt 4). Der Einfluss einer solchen Beschichtung auf den pH-Gradienten bliebe zu untersuchen, jedoch ist auf diese Art in Zukunft wahrscheinlich eine weitere Annäherung an das physiologische Milieu möglich.

Die strenge Verdunkelung, die bei den Migrationsversuchen in HEPES-gepuffertem RPMI 1640 Medium angewendet wurde, hat sich für die erfolgreiche Durchführung als essentiell erwiesen.

Ohne diese Maßnahme kam es bereits nach wenigen Stunden zum Absterben der MV3 Zellen. Da dieser Effekt durch Senkung der HEPES-Konzentration von 20 mmol/l auf 10 mmol/l deutlich reduziert und durch konsequenten Lichtschutz sowohl für die gelagerten Medien als auch für die eigentlichen Versuche ganz abgestellt werden konnte, ist hier vom Auftreten zytotoxischer Effekte, vermutlich zumindest teilweise durch H_2O_2 bedingt, im belichteten RPMI 1640 Medium auszugehen (Zigler et al. 1985; Grzelak et al. 2001). Dieser Effekt trat weder in HEPES-gepuffertem Ringerlösung noch in Bikarbonat-gepuffertem RPMI 1640 Medium auf, da Riboflavin (als Komponente des RPMI 1640 Mediums) und HEPES zusammen belichtet werden müssen (Zigler et al. 1985), um den oben beschriebenen Effekt auszulösen.

Die Tatsache, dass in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich Migrationsversuche von MV3 Zellen in HEPES-gepuffertem RPMI 1640 Medium durchgeführt wurden (Stock et al. 2005; Stüwe et al. 2007; Krähling et al. 2009), ohne dass sich dabei zytotoxische Effekte beobachten ließen, liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die in diesen Versuchen verwendeten Zellkulturflaschen ein deutlich größeres Gesamtvolumen als die μ -Slides haben und sich außerdem nicht vollständig im Lichtweg des Mikroskops befinden. Daher kommt es nicht im gesamten vorhandenen Medium zur Bildung zytotoxischer Substanzen und Verdünnungseffekte können zum Tragen kommen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das neu etablierte in vitro Modell eines extrazellulären pH-Gradienten zusammen mit dem beschriebenen Protokoll für die Migrationsversuche eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten bietet und zur Aufklärung diverser physiologischer und pathologischer Phänomene genutzt werden kann.

4.2 Ergebnisse der pH-Taxis Versuche

Es ist eindeutig erkennbar, dass die Richtung der Migration von MV3 Zellen im gewählten pH-Gradienten in den sauren Bereich orientiert ist. Außerdem nimmt die Komponente der Migrationsbewegung, die entlang des Gradienten gerichtet ist, im Verhältnis zur Migration senkrecht zum Gradienten stetig zu (vgl. 3.5.3). Beide Beobachtungen sprechen deutlich für einen Einfluss des pH-Gradienten auf die Richtung der Migration und gegen einen Zufallseffekt. Damit konnte das postulierte Phänomen der pH-Taxis bei MV3 Zellen gezeigt werden, die Hypothese dieser Arbeit wird folglich angenommen.

Die von den MV3 Zellen in unseren Versuchen zurückgelegten Strecken sind relativ klein. Dies ist wahrscheinlich zum einen dadurch zu erklären, dass der gewählte pH-Wert der Lösung leicht unter dem für die Migration optimalen pH-Wert von 7,0 (Stock et al. 2005) lag. Dieser pH-Bereich ist allerdings durchaus in Tumoren zu erwarten (Martin und Jain 1994; Vaupel et al. 1989). Zum anderen war aus den unter 4.1 beschriebenen Gründen keine

Kollagenmatrix für die Migration vorhanden, was ebenfalls eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit erklären könnte.

Die gewisse Langsamkeit, mit der sich der Effekt der pH-Taxis bemerkbar macht, sollte jedoch unter physiologischen Gesichtspunkten betrachtet werden: Zum einen sind MV3 Zellen nicht auf gerichtete Migration spezialisiert. Daher wäre eine schnelle Reaktion auf einen entsprechenden Stimulus, wie sie z.B. bei Neutrophilen während der Chemotaxis gefunden wird (Kolaczowska und Kubes 2013), nicht unbedingt zu erwarten. Zum anderen ist die Geschwindigkeit der pH-Taxis möglicherweise weniger relevant als die der eben erwähnten Chemotaxis von Abwehrzellen. Es kommt also, sehr einfach ausgedrückt, eher darauf an, dass die Tumorzellen ihre Migrationsrichtung überhaupt finden und dass sie ihr Ziel erreichen, als darauf, wie schnell sie dies tun.

4.3 Richtung der pH-Taxis

Die Richtung der pH-Taxis zeigte sich im angelegten pH-Gradienten eindeutig ins Saure gerichtet. Dies mag unter zwei Gesichtspunkten zunächst überraschend erscheinen: Erstens könnte vermutet werden, dass jede Zelle (also sowohl maligne entartete als auch nicht pathologisch veränderte) stets die Migration in Richtung eines möglichst physiologischen Milieus anstrebt. Zweitens wäre für die Metastasierung die Loslösung der Tumorzelle aus dem Primärtumor (Gupta und Massagué 2006) und damit eine Migration in die entgegengesetzte Richtung erforderlich.

Es ist jedoch bekannt, dass Tumorzellen spezielle Mechanismen entwickelt haben, um sich an einen sauren extrazellulären pH-Wert anzupassen. Diese Mechanismen beinhalten beispielsweise die Expression der Protonenexporter NHE1, MCT1, MCT4 und der H⁺-ATPase (Swietach et al. 2014). Die daraus resultierende Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes bedingt für die Tumorzelle vorteilhafte Reaktionen wie eine gesteigerte Proliferation und eine niedrigere Apoptoserate (Webb et al. 2011). Eine Exposition gegenüber einer Laktatazidose führt weiterhin zu einem effizienteren Glukosemetabolismus und zu einem deutlich verlängerten Zellüberleben (Wu et al. 2012).

Im speziellen Kontext von Melanomzellen ist bekannt, dass extrazelluläre Ansäuerung sowohl invasive und resistente Phänotypen selektiert (Moellering et al. 2008) als auch das Metastasierungspotential der Melanomzellen erhöht (Rofstad et al. 2006). Unter Zusammenschau dieser Aspekte kann vermutet werden, dass auch die Migration in Richtung des sauren Milieus, an das die Tumorzellen hervorragend adaptiert sind, als eine besondere Art der Anpassungsreaktion verstanden werden kann. Auch könnte angedacht werden, ob durch das Aufsuchen des sauren Milieus die oben beschriebenen, vorteilhaften Selektionsvorgänge aktiv gefördert werden. Damit wäre die Fähigkeit zur pH-Taxis ein eigener Schritt hin zur Entstehung von besonders resistenten und metastasierungsfähigen Tumorzellen.

Es konnte durch eine spätere Studie gezeigt werden, dass auch nicht neoplastische Zellen (hier Gefäßendothelzellen) eine pH-Taxis in Richtung des sauren Milieus zeigen (Paradise et al. 2013). Jedoch bleibt zu prüfen, ob auch andere nicht maligne entartete Zellen dieses Phänomen beobachten lassen und inwieweit die pH-Taxis der Melanomzellen damit tatsächlich als Anpassungs- und Abgrenzungsprozess zu verstehen ist. Weiterhin ist zu klären, wie der Vorgang der Metastasierung mit der hier beobachteten Richtung der pH-Taxis zu vereinbaren ist.

4.4 Erklärung der pH-Taxis und Rolle der GPCR

Die Migration ins Saure wäre sowohl mit einer Beteiligung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren als auch mit einer Manipulation des zelleigenen pH-Nanomilieus vereinbar (vgl. 1.2).

Alle nachgewiesenen protonensensitiven G-Protein gekoppelten Rezeptoren werden durch steigende Protonenkonzentrationen aktiviert (Ludwig et al. 2003; Wang et al. 2004), ähnlich wie die G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Chemotaxis durch das Chemokin aktiviert werden (Jin 2013).

Hier konnte gezeigt werden, dass MV3 Zellen OGR1, GPR4 und TDAG8 exprimieren (vgl. 3.1 und 3.2) und dass sie auf extrazelluläre Ansäuerung mit

4. Diskussion

einem Kalziumsignal reagieren können (vgl. 3.3). Nimmt man nun an, dass die nachgewiesenen GPCR eine ähnliche Rolle wie die G-Protein gekoppelten Rezeptoren bei der Signaltransduktion der Chemotaxis einnehmen, wäre damit ein möglicher Erklärungsansatz bereits gefunden (vgl. 1.2.1).

Allerdings erzeugen MV3 Zellen auch einen eigenen extrazellulären pH-Gradienten, dessen saures Ende an der Vorderseite der Zelle lokalisiert ist (Stock et al. 2007). Daher ist eine weitere mögliche Erklärung der Migration ins saure Milieu, dass sich dieselben Mechanismen der durch sauren pH verstärkten (bzw. durch alkalischen pH abgeschwächten) Integrinbindung, die auch bei der ungerichteten Migration von MV3 Zellen auftreten (Stock und Schwab 2009), auch bei der pH-Taxis abspielen (vgl. 1.2.2). In diesem Falle wäre der pH-Gradient aber nicht von der Zelle selbst durch geordnete Verteilung von NHE1 erzeugt (Stock et al. 2007) sondern von außen vorgegeben. So ist aus in vivo Versuchen bekannt, dass murine Melanomzellen (B16), wenn pharmakologisch ihre NHE1 Aktivität gehemmt wird, bevorzugt in die Lunge metastasieren (Vahle et al. 2014), wo extravaskulär ein relativ saurer pH-Wert vorherrscht (Effros und Chinard 1969). Es kann also spekuliert werden, dass diese Zellen, wenn sie durch die NHE1 Blockade keinen eigenen pH-Gradienten mehr an ihrer Oberfläche aufbauen können, in ihrer Migrationsrichtung stärker durch einen von außen vorgegebenen Gradienten beeinflusst werden können.

Wie unter 1.2.3 dargelegt gibt es auch eine große Zahl anderer Moleküle, die in ihrer Funktion potentiell vom extrazellulären pH-Wert abhängig sind. Auch wenn ihre Beteiligung an der pH-Taxis zunächst nicht allzu naheliegend erscheint, können sie, bis die zugrundeliegenden Mechanismen schlüssig erklärt sind, als Beteiligte auch nicht ausgeschlossen werden.

Ob am Ende eines der hier dargestellten Konzepte, eine Kombination aus ihnen, oder aber ein völlig anderer Mechanismus das Phänomen pH-Taxis erklärt, kann in dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden.

4.5 Ausblick

In Zukunft wird es darauf ankommen, das Phänomen der pH-Taxis bei weiteren Zelllinien nachzuweisen. Dafür kommen aus den oben beschriebenen Gründen vorrangig stabilisierte Zelllinien aus diversen Tumoren und aus dem Kontext der Immunabwehr in Betracht. Weiterhin ist methodisch auch die Verwendung von Primärkulturen möglich und könnte weitere Einblicke in die physiologische Rolle der pH-Taxis bieten.

Dabei könnte eine weitere Annäherung an die *in vivo* Situation sowohl durch Wahl einer passenden Matrix für die Migration (vgl. 4.1) als auch durch eine weitergehende Optimierung des pH-Gradienten erfolgen.

In einem weiteren Schritt gilt es, die zellulären Mechanismen der pH-Taxis schlüssig aufzuklären. Während in dieser Arbeit eine Beteiligung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren nur vermutet werden konnte, kann diese Frage in Zukunft durch die Verwendung von siRNA-Technik oder von Knock-Out Mäusen (Für OGR1 beschrieben in: Mohebbi et al. 2012) weiter nachgegangen werden. Auch der Einsatz pharmakologischer Inhibitoren ist durchaus denkbar. Beispielsweise ist bekannt, dass Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) die Funktion von OGR1 blockieren können (Ludwig et al. 2003; Pereverzev et al. 2008). Dieser Ansatz kann zumindest unter *in vitro* Bedingungen genutzt und die Entwicklung von *in vivo* anwendbaren Inhibitoren könnte angestrebt werden.

Sollte sich die pH-Taxis als ein an Tumorwachstum oder Metastasierung entscheidend beteiligter Schritt herausstellen, könnte sich ihre Inhibition auch als lohnenswerter therapeutischer Ansatzpunkt erweisen.

Literatur: Artikel

- Bartel P, Ludwig FT, Schwab A, Stock C (2012): pH-Taxis: Directional Tumor Cell Migration along pH-gradients. *Acta Physiol* Vol 204 Suppl 689 P113
- Boron WF (2004): Regulation of intracellular pH. *Adv Physiol Educ* 28, 160–179
- Choi JW, Lee SY, Choi Y (1996): Identification of a putative G protein-coupled receptor induced during activation-induced apoptosis of T cells. *Cell Immunol* 168, 78–84
- Chu S, Schubert ML (2012): Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 28, 587–593
- Condeelis J, Singer RH, Segall JE (2005): The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 695–718
- Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS (2006): The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TipB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol* 188, 2656–2665
- Effros RM, Chinard FP (1969): The in vivo pH of the extravascular space of the lung. *J Clin Invest* 48, 1983–1996
- Fontana JA, Wright DG, Schiffman E, Corcoran BA, Deisseroth AB (1980): Development of chemotactic responsiveness in myeloid precursor cells: studies with a human leukemia cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3664–3668
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54, 713–733
- Gatenby RA, Gawlinski ET (1996): A reaction-diffusion model of cancer invasion. *Cancer Res* 56, 5745–5753
- Grzelak A, Rychlik B, Bartosz G (2001): Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. *Free Radic Biol Med* 30, 1418–1425
- Gupta GP, Massagué J (2006): Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679–695
- Hauert AB, Martinelli S, Marone C, Niggli V (2002): Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 838–854

- Heiber M, Docherty JM, Shah G, Nguyen T, Cheng R, Heng HH, Marchese A, Tsui LC, Shi X, George SR (1995): Isolation of three novel human genes encoding G protein-coupled receptors. *DNA Cell Biol* 14, 25–35
- Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, Forbes NS, Jain RK (2002): Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 8, 1284–1291
- Ichimonji I, Tomura H, Mogi C, Sato K, Aoki H, Hisada T, Dobashi K, Ishizuka T, Mori M, Okajima F (2010): Extracellular acidification stimulates IL-6 production and Ca(2+) mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299, L567–577
- Ihara Y, Kihara Y, Hamano F, Yanagida K, Morishita Y, Kunita A, Yamori T, Fukayama M, Aburatani H, Shimizu T, Ishii S (2010): The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17309–17314
- Jin T (2013): Gradient sensing during chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol* 25, 532–537
- Jin T, Xu X, Hereld D (2008): Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 44, 1–8
- Justus CR, Dong L, Yang LV (2013): Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol* 4, 354
- Kolaczowska E, Kubes P (2013): Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13, 159–175
- Kominsky DJ, Campbell EL, Colgan SP (2010): Metabolic shifts in immunity and inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950* 184, 4062–4068
- Krähling H, Mally S, Eble JA, Noël J, Schwab A, Stock C (2009): The glycocalyx maintains a cell surface pH nanoenvironment crucial for integrin-mediated migration of human melanoma cells. *Pflüg Arch Eur J Physiol* 458, 1069–1083
- Kyaw H, Zeng Z, Su K, Fan P, Shell BK, Carter KC, Li Y (1998): Cloning, characterization, and mapping of human homolog of mouse T-cell death-associated gene. *DNA Cell Biol* 17, 493–500
- Ludwig FT, Schwab A, Stock C (2013): The Na⁺ /H⁺ -exchanger (NHE1) generates pH nanodomains at focal adhesions. *J Cell Physiol* 228, 1351–1358
- Ludwig M-G, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K (2003): Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425, 93–98

- Mahadevan MS, Baird S, Bailly JE, Shutler GG, Sabourin LA, Tsilfidis C, Neville CE, Narang M, Korneluk RG (1995): Isolation of a novel G protein-coupled receptor (GPR4) localized to chromosome 19q13.3. *Genomics* 30, 84–88
- Martin C, Pedersen SF, Schwab A, Stock C (2011): Intracellular pH gradients in migrating cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C490–495
- Martin GR, Jain RK (1994): Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res* 54, 5670–5674
- Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M, Gatenby RA, Gillies RJ (2008): Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis* 25, 411–425
- Mohebbi N, Benabbas C, Vidal S, Daryadel A, Bourgeois S, Velic A, Ludwig M-G, Seuwen K, Wagner CA (2012): The proton-activated G protein coupled receptor OGR1 acutely regulates the activity of epithelial proton transport proteins. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 29, 313–324
- Van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ (1991): Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer J Int Cancer* 48, 85–91
- Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T (2004): G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 279, 42484–42491
- Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A (Hrsg.): IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book. 2.1.0 Auflage; IUPAC, Research Triangle Park, NC 2009, <http://goldbook.iupac.org> [06.07.2014]
- Paradise RK, Lauffenburger DA, Van Vliet KJ (2011): Acidic extracellular pH promotes activation of integrin $\alpha(v)\beta(3)$. *PloS One* 6, e15746
- Paradise RK, Whitfield MJ, Lauffenburger DA, Van Vliet KJ (2013): Directional cell migration in an extracellular pH gradient: a model study with an engineered cell line and primary microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 319, 487–497
- Pereverzev A, Komarova SV, Korcok J, Armstrong S, Tremblay GB, Dixon SJ, Sims SM (2008): Extracellular acidification enhances osteoclast survival through an NFAT-independent, protein kinase C-dependent pathway. *Bone* 42, 150–161
- Plopper GE, McNamee HP, Dike LE, Bojanowski K, Ingber DE (1995): Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell* 6, 1349–1365

- Radu CG, Nijagal A, McLaughlin J, Wang L, Witte ON (2005): Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1632–1637
- Ren J, Zhang L (2011): Effects of ovarian cancer G protein coupled receptor 1 on the proliferation, migration, and adhesion of human ovarian cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 124, 1327–1332
- Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K (2006): Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 66, 6699–6707
- Schwab A, Stock C (2014): Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130102
- Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, Stock C (2007): Cells move when ions and water flow. *Pflüg Arch Eur J Physiol* 453, 421–432
- Seymour FW, Doetsch RN (1973): Chemotactic responses by motile bacteria. *J Gen Microbiol* 78, 287–296
- Sin WC, Zhang Y, Zhong W, Adhikarakunnathu S, Powers S, Hoey T, An S, Yang J (2004): G protein-coupled receptors GPR4 and TDAG8 are oncogenic and overexpressed in human cancers. *Oncogene* 23, 6299–6303
- Singh LS, Berk M, Oates R, Zhao Z, Tan H, Jiang Y, Zhou A, Kirmani K, Steinmetz R, Lindner D, Xu Y (2007): Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1, a new metastasis suppressor gene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 99, 1313–1327
- Stock C, Schwab A (2009): Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflüg Arch Eur J Physiol* 458, 981–992
- Stock C, Gassner B, Hauck CR, Arnold H, Mally S, Eble JA, Dieterich P, Schwab A (2005): Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *J Physiol* 567, 225–238
- Stock C, Mueller M, Kraehling H, Mally S, Noël J, Eder C, Schwab A (2007): pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 20, 679–686
- Stock C, Cardone RA, Busco G, Krähling H, Schwab A, Reshkin SJ (2008): Protons extruded by NHE1: digestive or glue? *Eur J Cell Biol* 87, 591–599
- Stüwe L, Müller M, Fabian A, Waning J, Mally S, Noël J, Schwab A, Stock C (2007): pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. *J Physiol* 585, 351–360

- Swaney KF, Huang C-H, Devreotes PN (2010): Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. *Annu Rev Biophys* 39, 265–289
- Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL, Hulikova A (2014): The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130099
- Tresguerres M, Buck J, Levin LR (2010): Physiological carbon dioxide, bicarbonate, and pH sensing. *Pflüg Arch Eur J Physiol* 460, 953–964
- Vahle A-K, Domikowsky B, Schwöppe C, Krähling H, Mally S, Schäfers M, Hermann S, Shahin V, Haier J, Schwab A, Stock C (2014): Extracellular matrix composition and interstitial pH modulate NHE1-mediated melanoma cell motility. *Int J Oncol* 44, 78–90
- Vaupel P, Harrison L (2004): Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist* 9 Suppl 5, 4–9
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989): Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49, 6449–6465
- Wang J-Q, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, Komachi M, Malchinkhuu E, Murata N, Kimura T, et al. (2004): TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 279, 45626–45633
- Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL (2011): Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* 11, 671–677
- Weng Z, Fluckiger AC, Nisitani S, Wahl MI, Le LQ, Hunter CA, Fernal AA, Le Beau MM, Witte ON (1998): A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12334–12339
- Wu H, Ding Z, Hu D, Sun F, Dai C, Xie J, Hu X (2012): Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J Pathol* 227, 189–199
- Xu Y, Casey G (1996): Identification of human OGR1, a novel G protein-coupled receptor that maps to chromosome 14. *Genomics* 35, 397–402
- Xu Y, Zhu K, Hong G, Wu W, Baudhuin LM, Xiao Y, Damron DS (2000): Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1. *Nat Cell Biol* 2, 261–267
- Yang M, Mailhot G, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Odgren PR (2006): Expression of and role for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) during osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 281, 23598–23605

- Zaslavsky A, Singh LS, Tan H, Ding H, Liang Z, Xu Y (2006): Homo- and hetero-dimerization of LPA/S1P receptors, OGR1 and GPR4. *Biochim Biophys Acta* 1761, 1200–1212
- Zengel P, Nguyen-Hoang A, Schildhammer C, Zantl R, Kahl V, Horn E (2011): μ -Slide Chemotaxis: a new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biol* 12, 21
- Zhu K, Baudhuin LM, Hong G, Williams FS, Cristina KL, Kabarowski JH, Witte ON, Xu Y (2001): Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J Biol Chem* 276, 41325–41335
- Zigler JS Jr, Lepe-Zuniga JL, Vistica B, Gery I (1985): Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *Vitro Cell Dev Biol J Tissue Cult Assoc* 21, 282–287
- Zigmond SH (1977): Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* 75, 606–616

Literatur: Webseiten

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 29.06.2014

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, 29.06.2014

<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp01150.pdf>,
29.06.2014

<http://rsbweb.nih.gov/ij>, 29.06.2014

http://ibidi.com/fileadmin/support/application_notes/AN14_Chemotaxis.pdf,
24.06.2014

<http://www.ptb.de/cms/fileadmin/internet/publikationen/DasInternationaleEinheitsensystem.pdf>, 17.07.2014

http://www.iupac.org/fileadmin/user_upload/news/IUPAC_Periodic_Table-1Jun12.pdf, 17.07.2014

Abkürzungen

SI-Einheiten und direkt daraus abgeleitete Einheiten sowie die dezimalen SI-Vorsätze werden entsprechend der Norm verwendet und sind hier folglich nicht aufgeführt

(<http://www.ptb.de/cms/fileadmin/internet/publikationen/DasInternationaleEinheitensystem.pdf>).

Textliche Verweise

et al.	„und andere“, weitere Autoren vorhanden
Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle

Zelllinien

MV3	humane Melanomzellen
HL-60	humane Leukämiezellen

Rezeptoren / Transporter

ASICs	acid-sensing ion channels
G2A	für G ₂ accumulation
GPCR	G-protein coupled receptor = G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPR4	G-protein coupled receptor 4
H ⁺ -ATPase	primär aktiver Säureexporter
H ⁺ /K ⁺ -ATPase	primär aktiver Protonen-Kalium Austauscher
MCT1, MCT4	Monocarboxylat Transporter 1 / 4
NHE1	Natrium-Protonen Austauscher 1
OGR1	Ovarian cancer G-protein coupled receptor 1
TDAG8	T-cell death associated gene 8

Abkürzungen

Maßeinheiten / Größen

bp	Basenpaare
kD	Kilodalton
pH	Maß für den Säuregehalt einer Lösung (vgl. 1.4)
pH ₁ , pH ₂ ,...	pH-Werte in der Reihenfolge ihrer Verwendung
pH _e , pH _i	extra- bzw. intrazellulärer pH-Wert
[X]	Konzentration des Stoffes X
[X] _i	intrazelluläre Konzentration des Stoffes X
M	Molarität: 1M \cong 1 mol/l
n	Anzahl untersuchter Zellen
N	Anzahl unabhängiger Versuche
T _m	Schmelztemperatur (PCR-Primer)
t	Zeit
SEM	Standardfehler

Technische und biologische Bezeichnungen

G _q	Phospholipase C gekoppeltes G-Protein
G _s	stimulierendes G-Protein
IP ₃	Inositoltrisphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
siRNA	Small interfering RNA = kurze RNA-Stücke, zur Interferenz genutzt
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Alexa 488	Fluoreszenzfarbstoff, Eigenname

Chemikalien

Chemische Elemente und deren Ionen werden nach dem IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) Periodensystem der Elemente benannt und sind hier entsprechend nicht aufgeführt (http://www.iupac.org/fileadmin/user_upload/news/IUPAC_Periodic_Table-1Jun12.pdf).

Agarose	Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose
BCECF-Acid	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
Fibronectin	Glykoprotein, verwendet als Beschichtung
FURA-2	kalziumsensitiver Fluoreszenzfarbstoff, Eigenname
Glycin	Aminosäure mit der Formel COOH-CH ₂ -NH ₂
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ PO ₄ ⁻	Dihydrogenphosphat-Anion
Ionomycin	Ionophor aus <i>Streptomyces globatus</i>
Kollagen G	Lösung mit Kollagen Typ I, Eigenname
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat = Bikarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Oligo-dT	Primer mit mehreren Desoxythymidinen
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Chemikalien

Red-Safe	DNA-Fluoreszenzfarbstoff, Eigenname
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer
RPMI 1640	Zellkulturmedium, Eigenname
SDS	sodium dodecyl sulfate, englisch für Natriumlaurylsulfat
SYBR Gold	DNA-Fluoreszenzfarbstoff, Eigenname
Taq	thermostabile DNA-Polymerase (UniProt: P19821)
TBE	Trometamol-Borat-EDTA
Triton	Detergens aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate
Trypsin	proteolytisches Enzym
ZNS	Ziegennormalserum (vgl. 2.4)

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: OGR1 PCR.....	12
Tab. 2: GPR4 PCR	12
Tab. 3: TDAG8 PCR	13

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: μ -Slide Chemotaxis 2D (Ibidi)	17
Abb. 2: Befüllen der μ -Slides für die Zellmigration	18
Abb. 3: Fluoreszenz von BCECF	18
Abb. 4: Messregionen pH-Messung	20
Abb. 5: Messregionen pH-Gradient.....	23
Abb. 6: Messung des pH-Gradienten.....	23
Abb. 7: PCR mit OGR1-Primern	28
Abb. 8: PCR mit GPR4-Primern.....	29
Abb. 9: PCR mit TDAG8-Primern.....	29
Abb. 10: OGR1 Immunfluoreszenz	30
Abb. 11: OGR1 Immunfluoreszenz – Negativkontrolle.....	30
Abb. 12: GPR4 Immunfluoreszenz.....	31
Abb. 13: GPR4 Immunfluoreszenz – Negativkontrolle	31
Abb. 14: Western Blot	33
Abb. 15: Intrazelluläre Kalziumkonzentration	34
Abb. 16: Ratio über Zeit in HEPES-gepufferter Ringerlösung.....	36
Abb. 17: Mittelwert der Ratio über pH in HEPES-gepufferter Ringerlösung. 36	
Abb. 18: Ratio über Zeit in RPMI 1640 Medium.....	37
Abb. 19: Mittelwert der Ratio über pH in RPMI 1640 Medium.....	38
Abb. 20: pH-Gradient mit $pH_1=7,0$ und $pH_2=8,0$ in HEPES-gepufferter Ringerlösung.....	39
Abb. 21: pH-Gradient mit $pH_1=6,8$ und $pH_2=7,8$ in HEPES-gepufferter Ringerlösung.....	40
Abb. 22: pH-Gradient mit $pH_1=7,0$ und $pH_2=6,4$ in RPMI 1640 Medium	42
Abb. 23: MV3 Migration in HEPES-gepufferter Ringerlösung	44
Abb. 24: Durchschnittliche Migration in HEPES-gepufferter Ringerlösung ..	45
Abb. 25: Durchschnittliche Migration (alkalisches Viertel).....	46
Abb. 26: MV3 Migration in RPMI 1640 Medium	48
Abb. 27: Durchschnittliche Migration in RPMI 1640 Medium	49
Abb. 28: Relativer Einfluss des pH-Gradienten.....	50

Lebenslauf

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Christian Stock, für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung der Arbeit und für die freundschaftliche Unterstützung. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Florian Ludwig für die praktische Anleitung, die vielen kreativen Ideen und die wertvollen Diskussionen der Ergebnisse. Herrn Prof. Dr. Hans Oberleithner und Herrn Prof. Dr. Albrecht Schwab danke ich für die Unterstützung und konstruktive Kritik.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Eberhard Schlatter herzlich.

Vielen Dank für Diskussionen und Anregungen an Dr. Otto Lindemann, PD Dr. Peter Hanley, Markus Horsthemke, Franziska Jung, Dr. Etmar Bulk, Dr. Katrin Kliche, Sandra Schimmelpfennig, Philipp Bruns, Benedikt Hild und Hannah Storck.

Für die Konstruktion des Systems zum manuellen Lösungswechsel bei den Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration danke ich Herrn Andreas Kolkmann. Für die ausgezeichnete technische Unterstützung danke ich Sabine Mally, Sarah Sargin, Susanne Greese, Barbara Windoffer, Marianne Wilhelmi und Mike Wälte.

Mein Dank gilt weiterhin der International Society for Proton Dynamics in Cancer, die mir die Präsentation meiner Ergebnisse im Herbst 2011 in Nizza ermöglichte, und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, der diese Kongressreise finanziell gefördert hat.

Abschließend danke ich meiner Familie, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.