

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II (vegetative Physiologie)
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans Oberleithner –

Der pH-abhängige Einfluss des TRPV1-Kanals auf die Migration
von Hepatoblastomzellen (HepG2)

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Ostendorf, Philipp

aus Warendorf

2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Albrecht Schwab
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eberhard Schlatter

Tag der mündlichen Prüfung: 15.08.2012

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II (vegetative Physiologie)

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. Albrecht Schwab

Korreferent: Prof. Dr. Eberhard Schlatter

ZUSAMMENFASSUNG

Der pH-abhängige Einfluss des TRPV1-Kanals auf
die Migration von Hepatoblastomzellen (HepG2)

Ostendorf, Philipp

Zellmigration spielt eine bedeutende Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie der Embryogenese, der Immunabwehr oder der Metastasierung. Sie ist ein durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration koordinierter und durch Zell-Matrix-Kontakte und das Zytoskelett angetriebener Vorgang.

Die Migration von HepG2 Zellen kann durch Aktivierung des TRPV1-Kanals mit Capsaicin erhöht werden. Der TRPV1-Kanal kann zudem durch eine Abnahme des extrazellulären pH (pH_e) aktiviert werden. Eine Kanalaktivierung führt zu Einstrom von Ca^{2+} und beeinflusst das Mikrotubulusskelett.

Ziel dieser Arbeit ist, die Rolle des TRPV1-Kanals in der Migration näher zu beleuchten. In Migrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der stimulierende Effekt der TRPV1-Kanalaktivierung durch Capsaicin auf die Zellmigration von HepG2 Zellen vom pH_e abhängt. Bei pH_e 6,5 führt eine durch das niedrige pH_e verstärkte Integrinbindung zu einer deutlichen Abnahme des Wanderungsverhaltens der Zelle, bei zunehmendem pH_e 7,0 und pH_e 7,5 nimmt dann der zunehmende Kalziumeinstrom in die Zelle durch die vermehrte Kanalstimulation entscheidenden Einfluss auf die Stimulation der Migration.

Der TRPV1-Kanal kann verschiedene Stimuli verarbeiten und abhängig davon die Migration modulieren.

Zudem zeigten Immunfluoreszenz-Darstellungen des Mikrotubulusskeletts, dass der TRPV1-Kanal abhängig von Kanalstimulation und pH_e das Mikrotubulusskelett modifiziert. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der TRPV1-Kanal auch über eine Mikrotubulusdepolymerisation Einfluss die Migration von HepG2 Zellen nehmen kann. Gerade die durch Kanalaktivierung hervorgerufenen Veränderungen des Zytoskeletts zeigen ein lohnendes Feld zukünftiger Forschung im Bereich der Zellmigration auf.

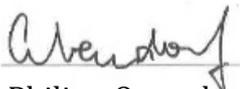
Tag der mündlichen Prüfung: 15.08.2012

Erklärung:

Hiermit gebe ich die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:
„Der pH-abhängige Einfluss des TRPV1-Kanals auf die Migration von
Hepatoblastomzellen (HepG2)“ im Institut für Physiologie II (Vegetative Physiologie)
unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Schwab

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Bezug 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, den 31.1.2012


Philipp Ostendorf

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	2
2.1	Migration	2
2.1.1	Grundlagen der Migration	3
2.1.1.1	Polarität	4
2.1.1.2	Zytoskelett	5
2.1.1.3	Aktin	5
2.1.1.4	Mikrotubuli	6
2.1.1.5	Interaktion mit der extrazellulären Matrix	10
2.1.2	Ionenkanäle und intrazelluläre Kalziumkonzentration	11
2.2	TRPV1	14
2.2.1	Die Familie der TRP-Kanäle und der TRPV1-Kanal	14
2.2.2	Der TRPV1-Kanal mag´s scharf, heiß und sauer!	15
2.2.3	TRPV1 und das Zytoskelett	16
2.2.3.1	TRPV1 bindet Mikrotubuli und stabilisiert sie somit	16
2.2.3.2	Aktivierung des TRPV1-Kanals führt zum Abbau dynamischer Mikrotubuli	18
2.2.4	TRPV1 und Migration	19
2.2.5	Der extrazelluläre pH-Wert (pH_e)	20
	Fragestellung	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Zellen und Zellkultur	23
3.2	Migrationsversuche	24
3.2.1	Versuchsvorbereitung	24
3.2.2	Videomikroskopie	25
3.3	Immunfluoreszenz Mikroskopie	27
3.4	Western Blot	29
3.5	Statistik	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Migrationsexperimente	31
4.1.1	Translokation	31
4.1.2	Geschwindigkeit	35
4.1.3	Fläche	37
4.1.4	Strukturindex	38
4.2	Polymerisationsgrad der Mikrotubuli	39
4.2.1	Fluoreszenzmikroskopie	39
4.2.2	Western Blot	42
5	Diskussion	45
5.1	Stimulation über Modulation des Zytoskelettes	45
5.2	Verminderte Zellmobilität bei extrazellulärer Azidose: Sind Integrine und HGF verantwortlich?	53
5.3	Veränderungen der Kanalsensibilität durch einen niedrigen pH_e	54
6	Literaturverzeichnis	57

2 Einleitung

2.1 Migration

Die aktive Fortbewegung einzelner Zellen in einem Gewebe findet während der gesamten Lebensspanne des menschlichen Organismus statt und wird als „Migration“ bezeichnet. Sie spielt eine entscheidende Rolle in vielen physiologischen und auch pathophysiologischen Prozessen. Die Bedeutung der Migration ist zu erkennen an der großen Vielfalt an unterschiedlichen Zelltypen, die migratorische Prozesse vornehmen; ein Großteil der Zellen unseres Organismus „wandert“ im Laufe des Lebens:

Schon zu Beginn des Lebens während der Embryogenese erreichen viele spezialisierte Zellen durch Migration den Ort ihrer endgültigen Bestimmung und bilden dort Zellverbände und schließlich Organe (KUROSAKA & KASHINA 2008). Fibroblasten und Epithelzellen wandern von den Rändern einer Wunde in Wundgewebe ein und schließen entstandene Lücken. Unsere Immunabwehr fußt auf der Einwanderung von Leukozyten in entzündetes, infiziertes oder entartetes Gewebe. Auch „sprossen“ zum Beispiel Nervenzellen während des Lebens an ihren Axonen Wachstumskegel aus, um immer wieder neue Kontakte und Synapsen zu bilden. Wenn auch in diesem Fall der Zellkörper statisch bleibt, so ist die Ausbildung der Wachstumskegel doch als Teil oder Sonderform der Migration zu betrachten (HENLEY & POO 2004).

Die Migration ist somit erforderlich, um viele physiologische Vorgänge in unserem Organismus aufrecht zu erhalten und ein essentieller Prozess für alle multizellulären Organismen. Aber Bedeutung kommt ihr auch in pathophysiologischer Hinsicht zu. Ein entscheidendes Kriterium für die Bösartigkeit eines Tumors ist seine Fähigkeit, Metastasen zu setzen. Damit wird die Fähigkeit der einzelnen Tumorzelle beschrieben, sich aus dem ursprünglichen Zellverband zu lösen und -nach Weiterleitung zum Beispiel über die Blutbahn- an einem anderen Ort in Gewebe einzuwandern, sich festzusetzen und zu vermehren. Auch müssen in einem wachsenden Tumor neue Gefäße gebildet werden, ein Prozess, den man

Neoangiogenese nennt. Diese Beispiele zeigen, dass im Rahmen der Metastasierung und Neoangiogenese von Tumoren die Migration eine wichtige Rolle spielt (YAMAGUCHI *et. al.* 2005).

Ein für den Organismus und sein Fortbestehen so entscheidender Prozess wie die Migration ist hoch komplex und fein reguliert. Nichtsdestotrotz gibt es aber einige bei allen Zelltypen auftretende Grundlagen, die diesen Prozess der Interaktion der verschiedenen Zellbestandteile untereinander und mit der Umgebung der Zelle charakterisieren (SCHWAB *et. al.* 2007). Diese „Regeln“, denen die zellulären Mechanismen der Migration unterstellt sind, werden im ersten Abschnitt der Einleitung kurz umrissen. Im Folgenden wird dann das Augenmerk auf einzelne und für dieses Projekt bedeutende Bestandteile und Regulatoren dieser Migrationsmaschinerie und ihre Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Milieu eingegangen.

Der TRPV1-Kanal wird mit seinen Eigenschaften und mit seinem Einfluss auf eben diese „Hotspots“ der Migrationsmaschinerie als Forschungsobjekt dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielen.

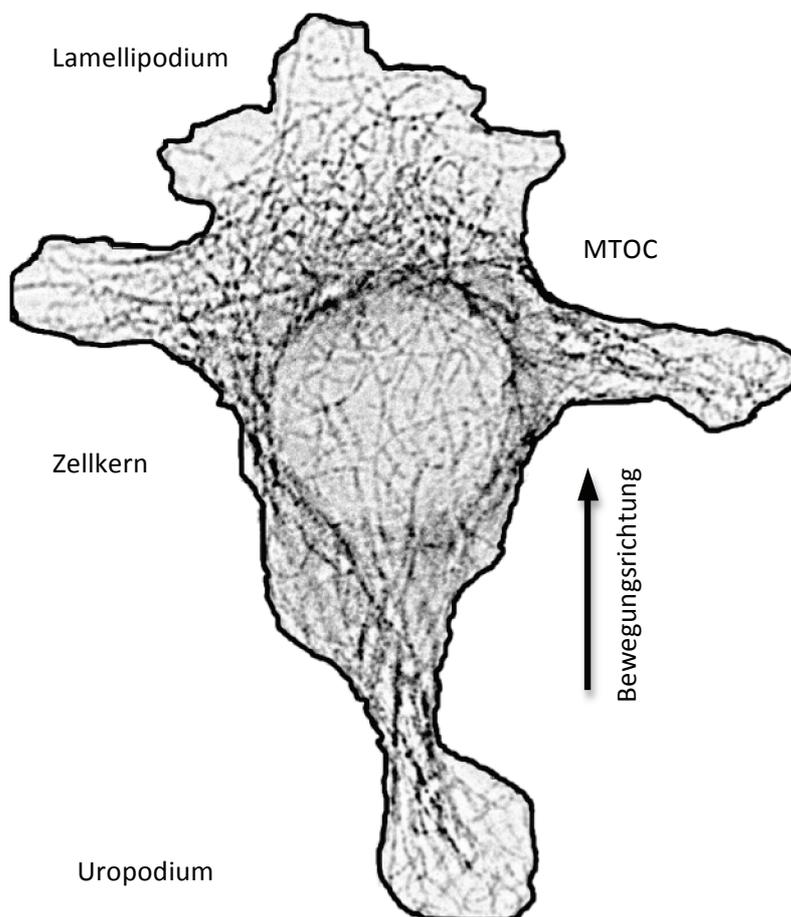
2.1.1 Grundlagen der Migration

Informationen über die Migration werden vornehmlich an Hand von Beobachtungen im zweidimensionalen Raum gesammelt. Die folgenden, dabei gefundenen Grundlagen und Regeln zeigen sich bei nahezu allen beobachteten Zelltypen: Migrierende Zellen sind polarisiert, sie weisen ein Zytoskelett auf, das als Motor der Migration fungiert, und sie gehen differenzierte Interaktionen mit der umgebenden Matrix ein. Der Migrationsprozess wird zusätzlich durch intrazelluläre Proteine und Ionenkanäle in der Plasmamembran gesteuert und ist unter anderem abhängig vom extrazellulären pH-Milieu. In den folgenden Abschnitten sollen diese Eigenheiten der Migration näher betrachtet werden.

2.1.1.1 Polarität

Migrierende Zellen weisen in Bewegungsrichtung eine Polarität auf. Diese spiegelt sich sowohl äußerlich als auch im Inneren der Zelle morphologisch und funktionell in einer Bewegungsachse wider. In Bewegungsrichtung kommt es vorne zu einer Protrusion, hinten zu einer Retraktion des Zellkörpers. Im Inneren zeigt sich diese Polarität zum einen in einer asymmetrischen Verteilung der mobilen Komponenten der Migrationsmaschinerie (zum Beispiel regulatorischen Molekülen) und zum anderen in einer orientierten Organisation der zytoskelettalen Filamente entlang der Zellachse (LI & GUNDERSEN 2008).

Abbildung 1 Migrierende Zelle



Mikrotubulusskelett einer wandernden Zelle. Vor dem Zellkern gelegen ist das MTOC (zu erkennen an der deutlichen Mikrotubulanreicherung vor dem Zellkern), im Bereich des Lamellipodiums sieht man Zellausläufer, dort ist nur ein geringer Gehalt an Mikrotubuli aufzufinden

Im führenden, vorderen Teil der Zelle bildet sich ein Leitsaum aus, der als „Lamellipodium“ bezeichnet wird. Es folgt der Zellkörper mit dem Zellkern und den

Organellen und schließlich wird der Hintersaum der Zelle „Uropodium“ genannt. Das Lamellipodium ist ein dünner, organellenfreier Saum, in dessen Inneren ein engmaschiges Aktinnetzwerk ausgebildet wird. Die Polymerisation der Aktinfilamente beispielsweise führt zur Protrusion der Plasmamembran (MOGLINER

& OSTER 2003 und WANG 1985). Es bilden sich durch Auswüchse von Aktinfilamenten kleine Zellfüßchen aus, die man Filopodien nennt. Dem Zellkern ist in Bewegungsrichtung meist ein sogenanntes Mikrotubulus-Organisierendes Zentrum (MTOC) vorgelagert, von dem aus sich das Mikrotubulusskelett mit seinen einzelnen Filamenten in die Zellperipherie ausbreitet.

Das Uropodium der Zelle ist bei den meisten Zelltypen eine lang auslaufende Struktur, hier werden Zell-Matrix-Kontakte gelöst, und es wird durch die Kontraktion von Stressfasern (bestehend aus Aktin und Myosin) an den Zellkörper herangezogen.

2.1.1.2 Zytoskelett

Das Zytoskelett als Motor der Migration besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Den beiden erstgenannten wird eine entscheidende Rolle in der Fortbewegung einzelner Zellen zugeordnet. Sie weisen während des Migrationsprozesses einen polarisierten Aufbau auf mit unterschiedlicher Dynamik in den verschiedenen räumlichen Abschnitten der Zelle. Die Koordination und Kooperation dieser beiden hochdynamischen zytoskelettalen Elemente unterliegt einer Reihe interagierender Proteine, Interaktionen mit der umgebenden Matrix und auch dem direkten Einfluss, den diese beiden Elemente auf sich ausüben (ETIENNE-MANNEVILLE 2004).

Aktin und Mikrotubuli sind jeweils polarisierte Polymere, die durch ihre asymmetrische Organisation innerhalb der Zelle, durch die Dynamik ihrer Polymerisation und durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen (zum Beispiel Motorproteinen wie Myosin, Kinesin oder Dynein) der Zelle eine innere Polarität und die Fähigkeit zur Migration verschaffen (LI & GUNDERSEN 2008). Die beiden Komponenten des Zytoskelettes sollen kurz dargestellt werden.

2.1.1.3 Aktin

Als Motor der Migration kann das Aktinnetzwerk gesehen werden. Die entscheidenden Prozesse der Protrusion, der Adhäsion und der Retraktion werden

direkt durch das Aktinnetzwerk in räumlich spezifischer Weise beeinflusst (SMALL *et. al.* 2002). Durch die Polymerisation des Aktins wird die Vorwärtsbewegung angetrieben.

Die Bildung von Aktinfilamenten wird durch kleine G-Proteine wie Rho, Rac und Cdc 42 (HALL 2009) gesteuert.

Nicht nur am Lamellipodium ist Aktin ein Schlüsselspieler der Migration. Ein wichtiger Bestandteil der Zellmotilität ist die Fähigkeit der Zelle, einzelne periphere Regionen bzw. den gesamten Zellkörper zu kontrahieren. Vor allem für die Retraktion des Hinterendes ist dies ein entscheidender Prozess. Die Kontraktion basiert auf zwei essentiellen Strukturen: Auf der einen Seite Stressfasern, bestehend aus Aktinfilamenten und MyosinII-Motoren, und Zelladhäsionspunkte auf der anderen Seite, an welchen die Stressfasern verankert sind. Unter anderen die GTPase RhoA veranlasst die Bildung von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen, was zu einer erhöhten Kontraktilität führt (VINCENTE-MANZANARES *et. al.* 2005).

2.1.1.4 Mikrotubuli

In dieser Arbeit wird der Einfluss des TRPV1-Kanals auf die Migration betrachtet. Deshalb soll das Hauptaugenmerk im Weiteren insbesondere auf zwei Komponenten der Migrationsmaschinerie gelenkt werden, die durch den TRPV1-Kanal beeinflusst werden: Das Mikrotubulusskelett und die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$).

Um den Einfluss der Mikrotubuli auf die Migration genauer einordnen zu können, gehen wir zunächst auf den Aufbau, ihre Dynamik und ihre Verteilung ein, ehe ihr Einfluss auf Zellpolarität, Zellmigration und dessen Koordinierung beschrieben wird.

- Aufbau eines Mikrotubulus

Mikrotubuli bilden sich aus heterodimeren Untereinheiten, die aus einem Alpha- und einem Betatubulin bestehen. Ebenso wie diese dimeren Untereinheiten ist auch der gesamte Mikrotubulus polar. Die so entstehenden zwei Pole eines Mikrotubulus werden als Plus- und Minusende bezeichnet. Die Minusenden sind meist verankert

am „Zentromer“ oder auch „microtubule-organizing centre“ (MTOC, siehe Abbildung 1). Hier verankerte Mikrotubuli bestehen aus Gamma-Tubulin und erweisen sich als stabile Mikrotubuli. Von diesem Zentrum aus wachsen die Mikrotubuli auch in polarisierten Zellen symmetrisch in die Zellperipherie aus (SALAYCIK *et. al.* 2005). Durch posttranslationale Modifikationen kann die Funktion der Mikrotubuli spezifiziert werden, so führt eine Detyrosinierung beispielsweise zu einer Stabilisierung eines Mikrotubulus (WESTERMANN & WEBER 2003).

- Dynamik eines Mikrotubulus

Durch die Koordination von Wachstum und Schrumpfung wird eine für die Funktion der Mikrotubuli entscheidende Dynamik entwickelt. An die freien Tubulindimere ist GTP gebunden, in dieser Form kann der Dimer an das Ende eines entstehenden Mikrotubulus andocken.

Das schnelle Auseinanderfallen eines Mikrotubulus wird als „Shrinking“, der Übergang vom Wachstum („Growing“) zum Shrinking als „Catastrophe“ bezeichnet. Die Beendigung der Catastrophe und der erneute Übergang zum Wachstum wird „Rescue“ genannt. Schnelle Auflösung und langsame Verlängerung wechseln sich ab, dieses wird als „dynamische Instabilität“ eines Mikrotubulus bezeichnet. Neben Wachstum und Schrumpfung werden zudem stabile Phasen („Pause“) beobachtet (NOGALES 1999).

Als weiteres dynamisches Phänomen ist das „Treadmilling“ beschrieben, auch als „Flux“ bezeichnet: Die Masse an Polymeren eines (stabilen) Mikrotubulus wird als relativ konstant beschrieben, aber durch kontinuierlichen Abbau am Minusende und Aufbau am Plusende kommt es zu einem „Fluss“ des Filamentes in Richtung Minusende (HONORE *et. al.* 2005). Während die Wachstumsraten einzelner Mikrotubuli gleich sind, wird die Dynamik der Mikrotubuli in unterschiedlichen subzellulären Regionen einer migrierenden Zelle unterschiedlich reguliert. Am führenden Pol neigen Mikrotubuli dazu, im Wachstum zu verweilen, während im Zellkörper und am Zellschweif die Mikrotubuli länger in Pausen und Verkürzungen verweilen, auch ist die Katastrophenrate dort höher. Mikrotubuli sind am vorderen Zellpol stabiler als am Zellende (SALAYCIK *et. al.* 2005).

Die Dynamik der Mikrotubuli wird unter anderem gesteuert durch Proteinkinasen und Phosphatasen und kann somit räumlich und zeitlich moduliert werden (WATANABE *et. al.* 2005). Proteine binden spezifisch an verschiedene Stellen der Mikrotubuli, insbesondere ans Plusende (diese Proteine nennt man +TIPS) (LANSBERGEN & AKHMANOVA 2006). Häufig werden durch Faktoren im Zellkortex Mikrotubuli eingefangen („capture“) und dadurch stabilisiert, so können zum Beispiel mit der Interaktion mit Motorproteinen auch Zugkräfte generiert werden (GUNDERSEN *et. al.* 2004). In migrierenden Zellen ist ein Gradient in der mikrotubulären dynamischen Instabilität vom hinteren zum vorderen Zellpol zu beobachten mit einem deutlich höheren Ausmaß der Dynamik am hinteren Ende als am vorderen (HONORE *et. al.* 2005). Dies führt zu einer asymmetrischen Verteilung der Mikrotubuli in einer gerichtet wandernden Zelle mit erhöhter Anzahl von Mikrotubuli im nach vorne gewandten Teil der Zelle.

- Einflussfaktoren der Mikrotubuli auf die Migrationsmaschinerie

Das MTOC ist in vielen migrierenden Zellen in Bewegungsrichtung vor dem Nukleus gelegen (ETIENNE-MANNEVILLE *et. al.* 2005, PALAZZO *et. al.* 2001 und SOLECKI *et. al.* 2004).

Neben der Orientierung des MTOC scheint auch die selektive Stabilisierung einzelner Mikrotubuli im führenden Teil der Zelle für die Migration von Bedeutung zu sein (GUNDERSEN & BULLINSKI 1988). Fokale Adhäsionen und Integrinbindung veranlassen die Bildung von stabilen detyrosinisierten Mikrotubuli (PALAZZO *et. al.* 2004). Durch Zentromerverschiebung und Mikrotubulusstabilisierung werden auch der nahe dem Zentromer gelegene Golgiapparat in die Nähe des führenden Teiles der Zelle gebracht. Durch kinesinabhängigen Transport von Membranvesikeln kann das Lamellipodium somit mit Membranvorläufern versorgt werden (LI & GUNDERSEN 2008).

- Mikrotubuli beeinflussen die Kontraktilität einer Zelle

Obwohl nicht direkt involviert in die Kontraktionsmaschinerie, ist das mikrotubuläre System ebenfalls in die Zellkontraktion während der Migration (BALLESTREM *et. al.* 2000) und in den epithelialen Wundverschluss verwickelt. Eine

globale Zerstörung der Mikrotubuli zum Beispiel durch Nocodazol oder Colchizin führt über Freisetzung von an polymerisierte Mikrotubuli angelagertes Rho GEF-H1 zu einer Aktivierung von Rho (KRENDEL *et. al.* 2002) und zu einer erhöhten Kontraktibilität der Zelle über eine vermehrte Phosphorylierung der Myosin-Leichte Ketten Kinase (ENOMOTO 1996 und REN *et. al.* 1999).

- Mikrotubuläres Wachstum unterstützt die Auflösung fokaler Adhäsionen.

Die Bedeutung des Mikrotubulusskeletts für die Migration ist abhängig vom Zelltyp und von der Geschwindigkeit, mit der sich eine Zelle auf dem Substrat bewegt. Diese Abhängigkeit von Mikrotubuli für die Lokomotion bestimmter Zelltypen korreliert mit der Anwesenheit fokaler Adhäsionen.

Zellen, die fokale Komplex-Typ Adhäsionen bilden, sie aber nicht in fokale Adhäsionen umwandeln, können fast unabhängig von Mikrotubuli migrieren. Dies sind in der Regel schnell wandernde Zellen wie Neutrophile oder Keratinozyten, die amöboid vornehmlich über Protrusion wandern. In diesen Zellen führt die Zerstörung von Mikrotubuli zur Auflösung einer Polarität migrierender Zellen und ermöglicht somit Zellmigration (XU *et. al.* 2005).

Hingegen sind Zellen, die Mikrotubuli zur Migration benötigen, gut fixierte Zellen, die typische fokale Adhäsionen zusätzlich zu den fokalen Komplexen vorweisen (HONORE *et. al.* 2005).

Zerstörung des Mikrotubulusskeletts führt zur Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen (ENOMOTO 1996). Dies ist zu erklären mit der Beteiligung der Mikrotubuli am Turnover fokaler Adhäsionen:

Wachsende dynamische Mikrotubuli „zielen“ auf fokale Adhäsionen, dies führt zu ihrer Lockerung vom Substrat (dies wird am hintern Zellpol beobachtet) und zur Auflösung (KAVERINA *et. al.* 1999 und SMALL *et. al.* 2002). Fokale Adhäsionen befinden sich vornehmlich im führenden Teil der Zelle, hier findet dieser Prozess ihrer Lockerung und Auflösung seltener statt. Dynamische Mikrotubuli haben somit einen Einfluss auf die Zellpolarisation. Dies kann erklären, warum eine Verminderung dynamischer Mikrotubuli zu einer Reduzierung der Geschwindigkeit migrierender Zellen führt (LI & GUNDERSEN 2008 und LIAO *et. al.* 1995).

Aktin initiiert also vornehmlich die Polarität und treibt die Migration an, das mikrotubuläre System baut und erhält diese Polarität. Dabei beeinflussen sie sich gegenseitig über verschiedene Signalwege.

2.1.1.5 Interaktion mit der extrazellulären Matrix

Die durch den Migrationsmotor aufgebauten Kräfte werden mittels spezieller Zell-Matrix-Kontakte auf die Strukturen des Extrazellulärtraumes übertragen (WEBB *et al.* 2002). In den unterschiedlichen Regionen der Zelle haben diese Kontakte verschiedene Bedeutung: Im vorderen Anteil der Zelle werden fokale Kontakte („fokale Komplexe“) neu angelegt. Sie verbinden die extrazelluläre Matrix mit dem intrazellulären Aktinnetzwerk (BRAKEBUSCH & FÄSSLER 2003). Diese Adhäsionspunkte wandeln sich im Verlauf der Migration und lösen sich entweder auf oder finden sich als verstärkte und stabilisierte „Fokale Adhäsionen“ im Bereich des Zellkörpers. Diese Verstärkung der Adhäsion ist erneut Rho-vermittelt (ROTTNER *et al.* 1999). Ihre Lösung am hinteren Pol der Zelle schließlich wird unter anderem durch Mikrotubuli beeinflusst (EZRATTY *et al.* 2005).

Die Steuerung fokaler Adhäsionen scheint unter anderem das Ergebnis eines „Wettkampfes“ zwischen dem Aktinnetzwerk und dem Mikrotubulusskelett zu sein. Aktin führt zu einer positiven Feedbackschleife mit Bildung einer kontraktilen Kraft durch Stressfasern, sowie Generierung von Fokalen Adhäsionen und somit Verankerung an das Substrat. Mikrotubuli führen zu negativer Feed-back-Schleife mit einer Relaxation der Adhäsionen. Umgekehrt führt die Bildung von fokalen Adhäsionen zu Bindung von stabilen Mikrotubuli und auch Stressfasern, so dass die gegensätzlichen zytoskelettalen Elemente der Zelle eine schnelle und sensitive Steuermöglichkeit über die fokalen Adhäsionen geben.

In den vorangehenden Abschnitten sind die zellskelettalen Anteile als Mitspieler der Migration aufgeführt worden. Sie finden sich auch bei Beobachtungen von migrierenden Zellen im dreidimensionalen Raum, auch wenn die Gewichtung der einzelnen Bestandteile der Migration hier u.U. stärker, als man bisher annahm, variiert (FRIEDL & WOLF 2003).

Migration kann als eine periodische Wiederholungssequenz verschiedener Ereignisse angesehen werden, die die Bildung lamellipodiale Protrusionen, die Befestigung der Zelle am Substrat, die Translokation des Zellkörpers in Richtung der neuen Adhäsionsstelle und die Lösung am Hinterende vom Substrat beinhalten (LAUFFENBURGER & HORWITZ 1996). Die Adhäsion der Zellen am Substrat wird dabei unter anderem auch über Kalziumstrom in die Zelle gesteuert (DOYLE & LEE 2005). Auf die Bedeutung von Ionenkanälen und Kalziumverschiebungen im Besonderen soll nun eingegangen werden:

2.1.2 Ionenkanäle und intrazelluläre Kalziumkonzentration

Die Steuerung der im Voraus beschriebenen Migrationsprozesse unterliegt unter anderem Ionenkanälen und Ionentransportern (SCHWAB *et. al.* 2007). Die Ionenkanäle können ihren Einfluss auf die Migrationsmaschinerie mittels unterschiedlicher Mechanismen ausüben. Die direkte Interaktion mit Komponenten der Migrationsmaschinerie zum Beispiel ist für verschiedene Kanäle beschrieben (CLARK *et. al.* 2006), so unter anderem auch für die Interaktion mit der extrazellulären Matrix (STOCK *et. al.* 2008). Ionenkanäle können das Zellvolumen regulieren und somit lokal die Ausbildung des Lamellipodiums oder auch die Schrumpfung des hinteren Endens der Zelle unterstützen (STOCK & SCHWAB 2006). Zudem kontrollieren Ionenkanäle die intrazelluläre Konzentration verschiedener Ionen. Auch hier ist die regionale Verteilung und regionale Aktivierung der Kanäle und Transporter, die die einzelnen Komponenten des Migrationsprozesses steuern (SCHWAB *et. al.* 2006), von entscheidender Bedeutung. Eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Migration kommt dabei der intrazellulären Kalziumkonzentration zu, die gesteuert wird durch Ionenkanäle und -transporter.

Ionenkanäle wirken somit als Vermittler unterschiedlicher Reize, denen die Zelle ausgeliefert ist und setzen diese in migratorische Aktivität um. Zum Beispiel können Ionenkanäle als „Messstationen“ oder „Antennen“ verstanden werden, die die Wanderung von Zellen an Hand von elektrischen Feldern in eine bestimmte Richtung leiten (MYCIELSKA & DJYMGÓZ 2004). Andere Ionenkanäle werden wiederum durch mechanischen Stress aktiviert, wenn also beispielsweise Zugkräfte auf die

Zellmembran wirken (MUNEVAR *et. al.* 2004 und FABIAN *et. al.* 2008).

Ionenkanäle unterstützen durch lokale Volumenveränderungen in bestimmten Zellabschnitten die Fortbewegung einer Zelle (SCHWAB *et. al.* 2007).

- Zellmigration ist kalziumabhängig

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration steuert die Migration, sie ist dabei sowohl räumlich als auch zeitlich wohl organisiert und fein reguliert (KOMURO & KUMADA 2005, PETTIT & FAY 1998). Innerhalb vieler migrierender Zelltypen besteht ein Gradient der intrazellulären Kalziumkonzentration (SCHWAB *et. al.* 1997 und BRUNDAGE *et. al.* 1991). Dabei wird am führenden Teil der Zelle eine niedrige Konzentration von Kalziumionen gemessen, die in Richtung des Hinterendes der Zelle ansteigt. Zudem oszilliert die intrazelluläre Kalziumkonzentration (PETTIT & FAY 1998, WEI *et. al.* 2009).

Die Kalziumkonzentration wird einerseits mittels Einstrom aus dem Extrazellulärraum, Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum und mittels Export von Kalziumionen aus dem Zytoplasma in den Extrazellulärraum und in intrazelluläre Speicher reguliert. Die hierfür zuständigen Kanäle in der Plasmamembran können durch verschiedenste Stimuli wie zum Beispiel Liganden aktiviert werden. Die Kanäle des Endoplasmatischen Retikulums werden vornehmlich durch second Messenger geöffnet (PETTIT & FAY 1998). Auch kann der Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern triggern (BERRIDGE *et. al.* 2003). Ausgeschleust aus dem Zytoplasma wird Kalzium über Energie verbrauchende Pumpen (ATPasen) oder Austauscher wie dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (CARAFOLI 2002). Dieser spielt im Rahmen der Migration eine herausragende Rolle (DREVAL *et. al.* 2005).

Zeitlich und lokal begrenzte sehr fein regulierte Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration beeinflussen die Migrationsmaschinerie über verschiedene Signalkaskaden wie zum Beispiel die PIP3 Kaskade (PRICE *et. al.* 2003 und WEINER *et. al.* 2002) oder einen dazu parallelen Phospholipase-A2 vermittelten Signalweg (VAN HAASTERT *et. al.* 2007). Am Lamellipodium der Zelle wird unter anderem

zytoskelettale Dynamik wie Aktinpolymerisation und das Aktinremodeling (STOSSEL *et. al.* 2006) aber auch die Steuerung der Dynamik fokaler Adhäsionen (FRANCO *et. al.* 2004) gelenkt.

In Makrophagen unterhält der lokale Einstrom von Kalzium an der Zellfront das Membranruffling, die Aktinpolymerisierung und die PIP3-Signalgebung (EVANS & FALKE 2007).

Der Einstrom von Kalzium in die Zelle induziert die Kontraktion des hinteren Anteiles der Zelle in Fibroblasten. Als Effektoren des Kalziums dienen in diesem Fall Calmodulin und die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK), die zu einer Phosphorylierung der Myosin-Leichten-Ketten führt (LEE *et. al.* 1999 und YANG & HUANG 2005).

Durch mechanosensitive Kalziumkanäle wird die Adhäsion von Keratinozyten an die extrazelluläre Matrix und somit die Migrationsgeschwindigkeit reguliert (DOYLE & LEE 2005).

Eine neue Studie vermittelt, wie der TRPM7 Kanal über Kalziueinstrom Zellmigration steuern kann (WEI *et. al.* 2009): Es zeigte sich, dass es kleine Funken von Kalzium oder Mikrodomänen mit einer hohen Kalziumkonzentration - sogenannte „Calcium flickers“- in verschiedenen migrierenden Zelltypen gibt. Die Verteilung dieser „Calcium flickers“ ist dem vorbeschriebenen Kalziumgradienten überlagert: Am Lamellipodium sind sie häufiger (4:1) zu beobachten als am Uropodium. „Calcium flickers“ wurden nur in Zellen mit typischer migratorischer Morphologie beobachtet. Bei statischen Fibroblasten gab es weniger Flimmern und einen geringeren Flimmergradienten. Es wird durch TRPM7 Kanäle hervorgerufen, die durch mechanischen Stress aktiviert werden, also auf die Zellmembran einwirkende Zug- und Scherkräfte. Diese TRPM7 Kanäle finden sich in der Nähe von fokalen Adhäsionen, dort also, wo vornehmlich Zugkräfte auftreten. Wurden die Zellmembran Scherkräften ausgesetzt, kam es zu einer lokalen Erhöhung dieser Flimmeraktivität.

Der Effekt von in die Zelle einströmendem Kalzium wird deutlich verstärkt durch kalziuminduzierte Freisetzung von Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Dadurch können viele lokale kalziumabhängige Signalkaskaden, die für Polarität und Bewegung der Zelle verantwortlich sind, aktiviert werden. Das

Chemoattraktant PDGF (Platelet-derived Growth Factor) stimuliert Migration von Epithelzellen in der Wundheilung. Es konnte gezeigt werden, dass ein Gradient von PDGF zu einer asymmetrischen „Flicker“-aktivität im Lamellipodium und zur Richtungsänderung in Richtung des Gradienten führte (WEI *et. al.* 2009).

Am Beispiel des TRPM7-Kanals wird deutlich, welche herausragende Rolle Kalziumkanäle für die Steuerung der Migrationsmaschinerie haben. Es ist wahrscheinlich, dass auch andere Kalziumkanäle mit ähnlichen Prozessen an der Steuerung der Migration beteiligt sind.

2.2 TRPV1

2.2.1 Die Familie der TRP-Kanäle und der TRPV1-Kanal

1977 beschrieb Minke erstmalig eine *Drosophila*-Mutante, deren Photorezeptoren im Auge ein transientes Rezeptorpotential (*trp*) als Antwort auf Licht generierten (MINKE 1977). Nach diesem „*Drosophila melanogaster trp mutant*“ ist eine große Familie von inzwischen über 28 Kationenkanälen (Vergleiche hierzu: <http://www.iuphar-db.org> STAND 05.10.11) benannt (NILIUS & VOETS 2005). Viele sind mit unterschiedlicher Selektivität kalziumpermeabel, zum Teil sind sie auch in der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern beteiligt (TURNER *et. al.* 2003). Ihnen gemeinsam ist eine ähnliche Aminosäuresequenz. Vier Monomere mit jeweils 6 Transmembranregionen schließen sich zu Tetrameren zusammen, die dadurch eine kationenpermeable Pore bilden.

Sowohl N- als auch C-Terminus der Kanäle liegen zytoplasmatisch und haben für den jeweiligen Kanal spezifische Domänen. Allen gemeinsam ist eine sogenannte TRP-Box. Bei den Säugetieren wird die TRP-Familie in sechs Subfamilien unterteilt: TRP canonical (TRPC), TRP vanilloid (TRPV), TRP melastatin (TRPM), TRP polycystin (TRPP), TRP mucolipin (TRPML), und TRP ankayrin (TRPA) Ionenkanäle (NILIUS & VOETS 2005).

2.2.2 Der TRPV1-Kanal mag's scharf, heiß und sauer!

Der TRPV1-Kanal – ein Mitglied der Vanilloid-Subfamilie der TRP-Kanäle – wurde bisher vor allem auf Grund seiner Beteiligung in der Schmerzweiterleitung erforscht (CATERINA *et. al.* 1997). TRPV1 ist ein nichtselektiver Kationenkanal mit hoher Permeabilität für Ca^{2+} . Er besitzt sowohl einige endogene Agonisten (zum Beispiel N-arachidonoyl-dopamin) (HUANG *et. al.* 2002) als auch exogene Stimuli, wie zum Beispiel Hitze ($>42^\circ\text{C}$), einen sauren extrazellulären pH-Wert und schließlich Capsaicin.

Dieses Capsaicin ist die den Chili schärfende Substanz (TOMINAGA & TOMINAGA 2005). Auf Grund seiner polymodalen Aktivierungsmöglichkeiten, die sich gegenseitig beeinflussen und verstärken können, kann der TRPV1 als Integrator verschiedener Signale dienen (TOMINAGA *et. al.* 1998). So führt die Aktivierung durch Protonen erst ab einem pH-Wert von unter 6,0 zu einem Kalziueinfluss. Bei einem sauren extrazellulären pH-Wert ist die für eine Aktivierung nötige Konzentration an Capsaicin deutlich erniedrigt und auch seine Empfindlichkeit gegenüber anderen Stimuli ist erhöht (CATERINA *et. al.* 1997).

Der TRPV1-Kanal ist nicht nur in der Plasmamembran sondern auch in intrazellulären Membranen lokalisiert (JAHNEL *et. al.* 2001). In Neuronen kann seine Stimulation über verschiedene Mechanismen zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führen: Direkt über den Einstrom von Kalzium durch den TRPV1-Kanal aus dem Extrazellulärraum (TRPV1-Kanäle in der Plasmamembran) und aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum (dort lokalisierte TRPV1-Kanäle), sowie die gegenseitige Aktivierung dieser sich beeinflussenden Freisetzungswege: Kalzium-induzierte-Kalziumfreisetzung (Calcium-induced Calcium release) und speichergesteuerter Kalziueinstrom (store-operated calcium entry) (KARAI *et. al.* 2004).

Sowohl kalziumabhängige als auch kalziumunabhängige Mechanismen beeinflussen den TRPV1-Kanal in seiner Aktivität. Eine Desensibilisierung des Kanals kann hervorgerufen werden durch Kalziueinstrom in die Zelle durch den Kanal selber und wird ausgelöst durch eine Phosphorylierung (LISHKOV *et. al.* 2007) des TRPV1-Kanals, aber auch durch eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion mit Calmodulin am C-

Terminus von TRPV1 (MANDADI *et. al.* 2004, MOHAPATRA & NAU 2003 und 2005, ZHU 2005 und ROSENBAUM *et. al.* 2004)

Der TRPV1-Kanal spielt in einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge eine Rolle. So ist er an der Wahrnehmung verschiedener Reize, wie zum Beispiel Hitze, scharfen Speisen, Schmerz und auch der Dehnung der Blasenwand beteiligt. Dementsprechend ist auch seine weitreichende pathophysiologische Bedeutung zu erklären: Es wird vermutet, dass der TRPV1-Kanal involviert ist in die thermale Hyperalgesie, die Allodynie (also der Schmerzempfindung ohne ausreichenden Schmerzreiz), in funktionelle und entzündliche Blasenkrankungen, aber auch in Erkrankungen wie der Vulvodynie, Osteoarthritis, Pankreatitis, in der gastroöphagelalen Refluxkrankheit, Asthma, Migräne, Schizophrenie und der Schmerzwahrnehmung im Allgemeinen (NILIUS *et. al.* 2007). Auch für die Krebsforschung ist die Bedeutung des TRPV1-Kanals erkannt worden (PREVARSKAYA *et. al.* 2007). So ist beispielsweise eine hohe Kanalexpression mit einer Tumorsuppression in Verbindung gebracht worden (MIAO *et. al.* 2008), seine chronische Blockade kann über eine fehlende Downregulation von EGFR zu einem erhöhten Risiko für Karzinogenese führen (BODE *et. al.* 2009).

Auf Grund des Einflusses, den TRP-Kanäle in pathophysiologischer Hinsicht ausüben, wurde in den letzten Jahren die Bezeichnung „TRPpathies“ oder auch „channelopathies“ eingeführt (KISELYOV *et. al.* 2007). Aktivatoren des TRPV1-Kanals werden bereits therapeutisch genutzt: die Retraktion und Degeneration vor allem TRPV1-exprimierender sensorischer Neurone formt die Basis für den analgetischen Effekt von Capsaicinsalben (MCMAHON *et. al.* 1991). Klinischen Einsatzmöglichkeiten von spezifischen Agonisten für TRP Kanäle könnten sich auch als effektive und potente Chemotherapeutika herausstellen.

2.2.3 TRPV1 und das Zytoskelett

2.2.3.1 TRPV1 bindet Mikrotubuli und stabilisiert sie somit

Es wurde eine direkte Interaktion des TRPV1-Kanals mit Tubulin, nicht aber mit anderen Komponenten des Zytoskeletts wie Aktin oder Neurofilamenten,

nachgewiesen (GOSWAMI *et. al.* 2004 und GOSWAMI & HUCHO 2008). Diese Interaktion findet am C-Terminus des TRPV1-Kanals statt (GOSWAMI *et. al.* 2007). TRPV1 bindet vor allem an β -Tubulin, in geringerem Maße auch an α -Tubulin. Es erfolgt eine stärkere Bindung an das Plusende eines Mikrotubulus, da dieses mit β -Tubulin verziert ist. TRPV1 kann somit als ein an das Plus-Ende des Mikrotubulus angebundenes Protein (+TIP) bezeichnet werden (LANBERGEN & AKHMANOVA 2006). TRPV1-Kanäle interagieren dabei nicht nur mit löslichem Tubulin sondern auch mit zusammengefügt Mikrotubuli unterschiedlicher dynamischer Zustände. Modifiziert wird diese Tubulinbindung an den TRPV1-Kanal durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration im Sinne einer positiven Verstärkung: Bei steigender intrazellulärer Kalziumkonzentration verstärkt sich die Bindung des Tubulins an den Kanal.

Über die einfache Bindung an einen Mikrotubulus hinaus hat der TRPV1 zudem auch einen stark stabilisierenden Effekt auf den Mikrotubulus. Auf Grund seiner Eigenschaft, an das am Plusende exponierte β -Tubulin zu binden, stabilisiert der TRPV1-Kanal diejenigen Mikrotubuli, die die Plasmamembran erreichen. Zum Beispiel werden im Bereich des Lamellipodiums einzelne „bahnbrechende“ Mikrotubuli gefunden, die das Aktinnetzwerk an dieser Stelle durchbrochen haben und somit an die Plasmamembran stoßen und durch den Kanal stabilisiert werden können.

Diese Stabilisierung führt *in vivo* zu starken Veränderungen der zellulären Morphologie, und es kommt zu einer massiven Induktion von filopodialen Strukturen, wie Goswami und Hucho herausfanden. Dies wird nicht nur in neuronalen, sondern auch in nichtneuronalen Zellen wie zum Beispiel menschlichen embryotischen Nierenzellen beobachtet – für HepG2 Zellen ist dies allerdings bisher nicht beschrieben (GOSWAMI & HUCHO 2007). Dieser Prozess ist unabhängig von der Aktivität der TRPV1-Kanäle. Zellen mit erhöhter Expression von TRPV1-Kanälen zeigten eine deutlich erhöhte Anzahl und Länge filopodialer Strukturen, die vornehmlich in Richtung benachbarter Zellen auswachsen. Dabei wurde eine enge Kollokalisierung zwischen Tubulin (in Form stabiler Mikrotubuli) und dem TRPV1-Kanal sowohl an der Spitze als auch an den Seitenrändern der Filopodien nachgewiesen. Eine Aktivierung des TRPV1-Kanals führt zu Abknicken und Abbau

der filopodialen Strukturen.

Die Regulation des Zytoskeletts mittels Beeinflussung von Myosin durch TRP Kanäle ist beschrieben (CLARK *et. al.* 2006). Die Aufgabe des TRPV1-Kanals könnte sein, über stabile Mikrotubuli ein schnelles Transportsystem in die o.g. Filopodien zu etablieren. Auch kann TRPV1 Teil eines Signalkomplexes in diesen Strukturen sein.

Der TRPV1-Kanal ist also – wohl unabhängig von seiner Kanalfunktion und seiner Aktivierung – an der Initiierung des Ausbaus filopodiale Strukturen beteiligt.

2.2.3.2 Aktivierung des TRPV1-Kanals führt zum Abbau dynamischer Mikrotubuli

Im Gegensatz zu seiner stabilisierenden Wirkung auf die Mikrotubuli im Ruhezustand führt die Aktivierung des TRPV1-Kanals zu einer raschen Auflösung stabiler Mikrotubuli (GOSWAMI *et. al.* 2006). Betroffen sind hiervon vornehmlich die peripher gelegenen Mikrotubuli, intakt bleiben Mikrotubuli die dem MTOC nahe liegen. Andere zytoskelettale Strukturen wie Aktin und Neurofilamente werden durch TRPV1-Aktivierung nicht betroffen. Eventuell scheint aber eine TRPV1 Aktivierung zu einem Anstieg der Menge an polymerisiertem Aktin zu führen (WANG *et. al.* 2005).

Der Mechanismus dieser Destabilisierung peripherer dynamischer Mikrotubuli ist bisher unklar. Goswami und Hucho (GOSWAMI & HUCHO 2007) diskutieren hierfür verschiedene Erklärungsmöglichkeiten :

Auch wenn große Veränderungen der Kalziumkonzentration keinen direkten Einfluss auf den Abbau der Mikrotubuli nach TRPV1 Aktivierung haben (GOSWAMI *et. al.* 2006 und 2007), könnten hierfür lokale Änderungen der Kalziumkonzentrationen verantwortlich sein. Tatsächlich werden durch hohe Kalziumkonzentrationen Mikrotubuli *in vivo* und *in vitro* depolymerisiert (KARR *et. al.* 1980 und JOB *et. al.* 1981), sowohl durch eine dynamische Destabilisierung –also einem direkten Effekt des Kalziums auf die Mikrotubuli– als auch indirekt durch eine Calmodulin-induzierte, Signalkaskaden-abhängige Depolymerisation (LIEUVIN *et. al.* 1994). Kleine Mengen an Calmodulin in der Anwesenheit von katalytischen Mengen von Kalzium können massive Mikrotubulus-Depolymerisation hervorrufen

Auch eine TRPV1 vermittelte Inhibition von Proteinsynthese und auch die Fragmentierung des endoplasmatischen Retikulums kann Einfluss auf die Integrität der Mikrotubuli haben (HAN *et. al.* 2007).

2.2.4 TRPV1 und Migration

Es konnte gezeigt werden, dass der TRPV1-Kanal die Migration von HepG2 Zellen (VRIENS *et. al.* 2004) stimuliert, ebenso hat er starken Einfluss auf die Neuritogenese (JIN *et. al.* 2004).

In HepG2-Zellen, die in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden, wird der TRPV1-Kanal exprimiert. Als nicht selektiver Ionenkanal ist er vor allem für den Kalziumhaushalt einer Zelle ein wichtiger Mitspieler. Er ist vor allem für den Einstrom von Kalziumionen in diese Zellen aus dem Extrazellulärraum verantwortlich (WANING *et. al.* 2007). Dieser Einstrom wird durch seine Aktivierung initiiert und ist deutlich erhöht bei Zellen, die eine Migrationsmorphologie aufweisen. Der Kalziumeinstrom über den TRPV1-Kanal ist also mit den Mechanismen der Zellmigration gekoppelt. HepG2-Zellen bilden nach dem Zusatz von hepatozytärem Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor, im Folgenden: HGF) diese für migrierende Zellen typische Morphologie mit Lamellipodium und Schweif aus. Das Transmembranpotential und die extrazelluläre Kalziumkonzentration bestimmen das Ausmaß des Einstroms von Kalzium in die Zelle nach Aktivierung des TRPV1-Kanals (VRIENS *et. al.* 2004).

Die Aktivierung des TRPV1-Kanals führt auch zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Capsaicin wird intrazellulär gebunden, Anstieg und Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Stimulierung durch Capsaicin gehen deshalb langsam vonstatten (VRIENS *et. al.* 2004).

Diese Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin haben Auswirkungen auf die Migration von HepG2 Zellen. Die Kanalaktivierung durch Capsaicin führt dosisabhängig zu einer erhöhten migratorischen Aktivität von HGF-vorbehandelten HepG2 Zellen (WANING *et. al.* 2007). Die Aktivität des TRPV1-Kanals ist Voraussetzung für Migration von HepG2 Zellen, Blockade des Kanals mit Capsazepin (einem Antagonisten des TRPV1-

Kanals) führt zu einer nahezu aufgehobenen Migrationsaktivität. Eine Depolarisation der Zellmembran hebt dem entsprechend den stimulierenden Effekt von Capsaicin auf die Migration auf.

Der Einfluss, den HGF auf die Stimulation der Migration durch Aktivierung des TRPV1-Kanals hat, ist bisher ungeklärt, zumindest die Anzahl der exprimierten TRPV1-Kanäle ist nicht erhöht.

Möglich ist, dass es zu einer Aktivitätserhöhung von Kaliumkanälen durch HGF kommt, die zu einer Hyperpolarisation der Zelle als treibende Kraft für den Kalziueinstrom führt. Auch wird eine erhöhte Menge an $\alpha_2\beta_1$ Integrinen als HGF-vermittelter Einflussfaktor für die TRPV1-stimulierte Migration diskutiert (WANING *et. al.* 2007).

2.2.5 Der extrazelluläre pH-Wert (pH_e)

In verschiedenen pathophysiologisch bedeutenden Prozessen wie der Entzündungsreaktion und auch im Zentrum eines Tumors ist ein erniedrigtes extrazelluläres pH zu beobachten. Im Tumor kann es zu einer Umkehr des pH-Gradienten zwischen Extra- und Intrazellularraum kommen, mit einem höheren pH_i von $>7,4$ und einem erniedrigten pH_e von $6,7-7,1$ (WEBB *et. al.* 2011), wobei sowohl das extrazelluläre als auch das intrazelluläre pH räumliche Unterschiede aufweist (STOCK *et. al.* 2007 und MARTIN *et. al.* 2011). Das extrazelluläre pH beeinflusst die Migrationseigenschaften einer Zelle (STOCK & SCHWAB 2009). Er wirkt sich auf verschiedene Mitspieler in der Migrationsmaschinerie wie unter anderem die Zelladhäsion aus.

So wurde gezeigt, dass die Interaktion mit der extrazellulären Matrix über Integrine abhängig vom extrazellulären pH ist (STOCK *et. al.* 2005). In der Studie von Stock zeigte sich bei saurem pH-Wert eine erhöhte Bindung von $\alpha_2\beta_1$ -Integrin an Kollagen 1; je alkalischer der extrazelluläre pH-Wert, desto schwächer wird die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix. Dies führte zu einer Verminderung der migratorischen Aktivität von Melanomzellen bei pH_e 6,5 und pH_e 7,5 mit einem Optimum bei pH_e 7,0. Auch in Osteoklasten haben die Bindungskräfte zwischen

Integrinen und extrazellulären Liganden ein Maximum bei pH_e 6,5 (LEHENKARI & HORTON 1999).

Dabei spielt nicht nur der pH-Wert in einem Gewebe, sondern insbesondere auch das pH-Milieu der Außenseite einer Zelle innerhalb ihrer Glykokalix und die Aufrechterhaltung desselben durch Transportproteine wie dem NHE1 (STOCK *et. al.* 2005 und 2008, STÜWE *et. al.* 2007 und KRÄHLING *et. al.* 2009) eine entscheidende Rolle. Abhängig von der Aktivität des NHE1 ist die perizelluläre Protonenkonzentration am Lamellipodium höher als am Hinterende (STOCK *et. al.* 2007). Das extrazelluläre pH kann auch durch Protonensensoren wie die G-Proteingekoppelten Rezeptoren OR G1 oder GPR4 über intrazelluläre Kalziumsignale und folgende Signalkaskaden auf die Migration einwirken (Vergleiche hierzu STOCK & SCHWAB 2009).

Gerade hier ist es natürlich auch denkbar, dass das extrazelluläre pH über die Modulation der Aktivierung von Ionen-Kanälen –wie zum Beispiel dem TRPV1-Kanal– Einfluss auf die Migrationsmaschinerie betreffende intrazelluläre Signalkaskaden nimmt.

- Fragestellung

Die Migration ist also ein durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration koordinierter und durch Zell-Matrix-Kontakte und das Zytoskelett angetriebener Vorgang. Viele Faktoren haben lokal und zeitlich fein abgestimmte Einflüsse auf diesen hochkomplexen Ablauf. Verschiedene Einflüsse und auf die Zelle einströmende „Informationen“ müssen dabei integriert und „abgewogen“ werden. Der TRPV1-Kanal „misst“ verschiedene für die Migration bedeutende Signale wie den extrazellulären pH-Wert und verschiedene endogene und exogene Signalstoffe und wird von ihnen in unterschiedlichem Maß stimuliert. Zudem hat er Einfluss auf einige die Migration bestimmende Parameter wie den intrazellulären Kalziumgehalt und auch die Mikrotubuli als Teil des Zytoskeletts. Dass der Kanal und seine Aktivierung die Migration antreiben, ist in den oben genannten Studien von WANING und VRIENS herausgefunden worden und lässt den naheliegenden Schluss zu, dass er

als Integrator verschiedener Stimuli die Migration moduliert. Im Entzündungs- und Tumorgewebe besteht ein erniedrigtes extrazelluläres pH und gerade in diesen Geweben spielt die Migration eine entscheidende (patho-) physiologische Bedeutung. So ist die Hypothese naheliegend, dass die Stimulation der Migration von HepG2 Zellen mittels TRPV1-Aktivierung über Capsaicin durch den extrazellulären pH-Wert beeinflusst wird. Könnte eine gesteigerte Aktivierung des TRPV1-Kanals bei erniedrigtem extrazellulärem pH beispielsweise in zentralen Anteilen eines Tumors zu forcierter migratorischer Aktivität führen?

Zudem ist weiterhin offen, auf welche Art und Weise der TRPV1-Kanal seine Auswirkung auf die Migration ausübt. Moduliert er die Migrationseigenschaften einer Zelle über eine Beeinflussung des Mikrotubulusskeletts? Und wäre auch dieses abhängig vom extrazellulären pH-Wert?

3 Material und Methoden

3.1 Zellen und Zellkultur

Alle Experimente wurden mit der Hepatoblastomzell-Zelllinie HepG2 (KNOWLES *et. al.* 1980) durchgeführt. Als Nährmedium diente HCO_3^- -gepuffertes Dulbecco's Minimal Essential Medium (Gibco, Karlsruhe). Dem DMEM-Medium wurden 2% Glutamax, 1% Aminosäuren (MEM-Non-Essential-Amino-Acids, Gibco, Karlsruhe), und 1% Natrium-Pyruvat hinzugefügt. Dem für die Kultur der Zellen vorgesehenen DMEM wurde 10% fetales Kälberserum (FKS, Biochrom AG, Berlin, Germany) beigefügt, es wurde dann als DMEM+ bezeichnet. Die Versuchsdurchführung erfolgte in der Regel mit FKS-freiem DMEM. Der pH-Wert des Mediums (pH_e) wurde variiert durch die Zugabe von NaHCO_3 , die nach der Henderson-Hasselbach-Gleichung berechnet wurde:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log_{10} \frac{\text{HCO}_3^-}{\text{CO}_2}$$

Da die CO_2 Konzentration in dem geschlossenen System in der Atmosphäre des Brutschrankes bei konstant 5% gehalten wurde bildet sich bei Verbrauch der Pufferbase (HCO_3^-) die gleiche Menge an Puffersäure (CO_2). Für DMEM gilt, dass sich bei 5%-iger CO_2 -Atmosphäre und einer NaHCO_3 -Konzentration von 3,7 g/l ein pH von 7,6 einstellt. Nach Henderson-Hasselbalch ergibt sich also folgende Tabelle:

pH	6,5	6,8	7,0	7,2	7,5
[NaHCO_3] in g/l	0,294	0,55	0,88	1,4	2,68
[NaHCO_3] in mmol/l	3,5	6,58	10,43	16,53	31,88

Tabelle 1 NaHCO_3 Zugabe zum Einstellen des pH-Wertes des Mediums

Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen in 10 cm Petrischalen (Falcon, Wiesbaden) bei 37°C im Brutschrank (Hera-Cell 150, Heraeus, Germany) in befeuchteter, 5%-iger CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Bildete sich nach einigen Tagen durch Zellteilung auf dem Schalenboden ein konfluenter Zellrasen, wurden die

Zellen unter sterilen Bedingungen von einer Schale auf eine andere überführt („passagiert“) oder auf mehrere Schalen verteilt („gesplittet“). Für diesen Vorgang wurden die Zellen nach Entfernen des Wachstumsmediums mit etwa 3 ml einer EDTA-Lösung bedeckt, welches extrazelluläres Calcium bindet. Nach 5 Minuten wurde die EDTA-Lösung abgesaugt und durch 1 ml Trypsin 0,05% in EDTA-Lösung ersetzt. Das Trypsin wurde ca. eine Minute auf den Zellen belassen. Es bewirkt – unterstützt durch leichte manuelle Stoßbewegungen gegen den Schalenboden – die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale. Der Erfolg dieses Prozesses wurde am Mikroskop (Axiovert 40c, Zeiss, Germany) überprüft und durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium gestoppt. Durch leichtes Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension wurden Zellverbände gelöst und die Zellen vereinzelt. Abhängig von der Zelldichte wurden ca. 0,5 ml der so erhaltenen Zellsuspension in eine mit 10 ml DMEM+ gefüllte Schale überführt zum weiteren Wachstum im Brutschrank inkubiert.

3.2 Migrationsversuche

An Hand der Migrationsversuche wurde die zweidimensionale Bewegung der HepG2-Zellen unter verschiedenen Zusammensetzungen des Mediums in einem Zeitraum von 5 Stunden quantifiziert.

3.2.1 Versuchsvorbereitung

Die Zellen wurden für die Migrationsexperimente in 12,5 ml Flaschen (Falcon, Wiesbaden) angesäht. Auf den Flaschenboden wurde am Vortag der Versuchsdurchführung ein gleichmäßiger Kollagenfilm aufgetragen. Dazu wurde Kollagen I im Verhältnis 1:10 mit sterilem Ampuwa gemischt und 200 µl dieser Mischung mit einer sterilen Pipette so auf dem Flaschenboden verteilt, dass ein durchgehender Flüssigkeitsfilm entstand. Nachdem sich das Kollagen eine Stunde lang im Brutschrank auf dem Flaschenboden absetzen konnte, wurde der Flüssigkeitsüberstand abgesaugt. Bis zur Versuchsdurchführung wurden die Flaschen mit leicht geöffnetem Verschluss im Brutschrank aufbewahrt, so dass noch vorhandene Flüssigkeit verdunsten konnte.

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das mit FKS angereicherte DMEM+-Kulturmedium der Zellen durch FKS-freies DMEM-Medium ersetzt, um die Anzahl der Mitosen während der Versuchsdurchführung möglichst gering zu halten.

Diesem DMEM-Medium wurde Hepatocyte Growth Factor (Research Diagnostics, Concord, MA, USA) beigefügt, so dass in dem Medium HGF in einer Konzentration von 20 ng/ml vorhanden war.

Bis zur Versuchsdurchführung wurden die Schalen im Brutschrank aufbewahrt. Am Versuchstag wurde in den am Vortag mit Kollagen versehenen 12,5 ml Flaschen 2 ml mit HGF in einer Konzentration von 20 ng/ml angereichertes DMEM-Medium vorgelegt. Der pH-Wert des Versuchsmediums wurde wie unter 2.1 beschrieben eingestellt und variierte in den verschiedenen Versuchen. Je nachdem wie stark die am Vortag vorbehandelten Schalen mit den Versuchszellen bewachsen waren wurden 2-5 Tropfen der gelösten Zellen in DMEM wie unter 2.1. beschrieben in die Kollagenschalen passagiert, so dass die HepG2-Zellen sich gleichmäßig und einzeln liegend auf dem Flaschenboden verteilten. Die Flaschen wurden für weitere 3 ½ Stunden in den Brutschrank gestellt. In dieser Zeit setzten sich die Zellen auf dem Kollagen fest, und das Kulturmedium äquilibrierte mit dem im Brutschrank vorgegebenen CO₂. Schließlich wurden den Zellen Capsaicin ((E)-Capsaicin, Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland) in für die verschiedenen Versuche festgelegten Konzentrationen zugefügt. Da das Capsaicin in Ethanol gelöst wird, wurde in Kontrollversuchen eine entsprechende Menge (0,02%) EtOH dem Medium zugefügt. Bevor das Migrationsverhalten der Zellen videomikroskopisch untersucht wurde, inkubierten die Zellen noch einmal 15 Minuten im Brutschrank.

3.2.2 Videomikroskopie

Die 12,5 ml Flaschen mit den vorbereiteten Versuchszellen wurden in eine auf 37°C temperierte Experimentierkammer (Eigenbau aus den feinmechanischen und elektrischen Werkstätten des Institutes) eingesetzt. Diese Wärmekammern waren auf den Tischen von invertierten Phasenkontrastmikroskopen (Axiovert 40c und Axiovert 20, Zeiss, Deutschland) fixiert. Die Bildausschnitte wurden so gewählt, dass vornehmlich vereinzelt liegende Zellen aufgenommen wurden, um eine möglichst

störungsfreie Beobachtung der Migration zu gewährleisten. Vor Versuchsbeginn und nach Einsetzen in die Kammer wurden den Zellen noch einmal 15 Minuten in Ruhe belassen. Die einzelnen Versuche erstreckten sich auf einen Zeitraum von je 300 Minuten, in denen alle 10 Minuten von einer in das Mikroskop eingebauten Videokamera (Modell XC-ST70CE Hamamatsu/Sony, Japan) ein Bild von den Zellen aufgenommen wurde. Gesteuert und durchgeführt wurde diese digitale Aufzeichnung der Bilder durch die Software HiPic32 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching Germany). Die erhaltenen Bilder wurden mit der Software AMIRA (TGS Inc., San Diego, CA, USA) weiter bearbeitet. Nach Markierung der Zellgrenzen und an Hand der dadurch bestimmten Zellkontur wurden zur Analyse der Migrationsaktivität verschiedene Parameter bestimmt. Ausgewertet wurden alle im Bildausschnitt vorgefundenen Zellen, die sich nicht in der Mitose befanden, sich mit anderen Zellen überlappten oder während des gesamten Versuches mit ihren Zellkonturen nicht den Bildausschnitt verließen. Die mit AMIRA bearbeiteten Bilder wurden unter Zuhilfenahme der Software IMAGE J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), die durch selbstgeschriebene Plug Ins ergänzt wurde, weiter bearbeitet und die Parameter Zellfläche, Translokation, Migrationsgeschwindigkeit und der Strukturindex (SI) bestimmt. Dabei wurde als Translokation die Strecke gewertet, die der vom Programm errechnete Zellmittelpunkt während des Experimentes zurückgelegt hat. Die Geschwindigkeit ergibt sich als Funktion der Zeit. Die Zellfläche wurde über die Anzahl der von der Zelle eingenommenen digitalen Bildpunkte („Pixel“) errechnet. Die Länge eines Pixels ist im voraus für jedes Mikroskop anhand eines Maßstabes ermittelt worden und entsprach für das Mikroskop Axiovert 40c $0,56 \mu\text{m}$ (20x Objektiv), für das Mikroskop Axiovert 25 $0,675 \mu\text{m}$ (32x Objektiv).

Der Strukturindex (SI) beschreibt die Morphologie der Zelle. Er wird an Hand der Formel: $SI = (4 \pi A) / p^2$ berechnet. A bezeichnet hierbei die projizierte Zellfläche in der Aufsicht, p beschreibt den Zellumfang. Der Strukturindex kann Werte von 0 bis 1 erlangen, wobei ein Strukturindex mit der Größe eins einer runden Zelle entspricht, ein gegen null tendierender Wert beschreibt eine zunehmende dendritische Morphologie der Zelle mit vielen Zellausläufern.

3.3 Immunfluoreszenz Mikroskopie

Um den Einfluss der TRPV1-Aktivierung auf das Mikrotubulus-Skelett zu beurteilen, wurden die Mikrotubuli für die Immunfluoreszenz Mikroskopie angefärbt und der Polymerisationsgrad der Mikrotubuli an Hand der Fluoreszenzintensität verglichen (LIAO *et. al.* 1995).

Dafür wurden α -Tubulin durch den selektiven Primärantikörper Anti- α -Tubulin (Maus IgG1 Isotyp, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) in der Verdünnung 1:25.000 markiert, dieser wurde wiederum mit einem Cy3 markiertem Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories inc., Pennsylvania, USA) mit der Verdünnung 1:800 sichtbar gemacht.

Die HepG2-Zellen wurden –analog zu den Migrationsversuchen– für 24 Stunden in mit HGF versetztem DMEM-Medium vorbereitet und anschließend auf kollagenbedeckte Objektträger in mit HGF versetztem DMEM-Medium unterschiedlichen pH-Wertes gesetzt. Nachdem sich die Zellen 3 ½ Stunden auf dem Kollagen absetzen konnten, wurden dem Medium Capsaicin (100 nM), eine Ethanol-Kontrollösung oder Nocodazol (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) (10nM) hinzugesetzt und die Zellen für weitere 2 Stunden inkubiert. Diese Inkubationszeit gewährleistet, dass der Mikrotubulusgehalt der Zellen in einem Stadium bestimmt wird, in dem in den Migrationsexperimenten ein eindeutiger Unterschied der migratorischen Aktivität der einzelnen Gruppen (Capsaicin, Nocodazol und die Kontrollgruppe) nachgewiesen wurde.

Nach einem Waschschrift in kaltem PBS wurden die Objektträger für eine Stunde bei 4°C in 3,5% Paraformaldehyd fixiert. Daraufhin erfolgten zwei weitere dreiminütige Waschschrift in PBS. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4°C in PBS aufgehoben. Am Folgetag wurden die Objektträger für 10 Minuten in 100 mM Glycin / PBS inkubiert und dreimalig für 3 Minuten in PBS gewaschen. Durch ein Inkubation in 0,1% Triton / 1% SDS / PBS wurde die Zellmembran der HepG2-Zellen permeabilisiert, um die Bindung der Antikörper an die intrazellulär gelegenen Mikrotubuli zu gewährleisten. Es folgten drei Waschschrift für drei Minuten in PBS. Um eine Anlagerung des Primärantikörpers an unspezifische freie

Bindungsstellen zu vermeiden, wurden die Zellen mit 10 % Ziegennormalserum (ZNS) beschichtet und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer, die eine Austrocknung der Präparate verhinderte, inkubiert. Hierauf folgte die Beschichtung der Zellen mit dem Primärantikörper Anti- α -Tubulin in einer Verdünnung 1:25.000 in 10 % ZNS und die Inkubation für 60 Minuten in der feuchten Kammer. Die Inkubationszeit wurde durch fünfmaliges Waschen für drei Minuten in PBS beendet. Der daraufhin in einer Verdünnung von 1:800 in 10 % ZNS aufgetragene Sekundärantikörper Cy3 mouse-anti-rabbit verblieb für 45 Minuten in der feuchten Kammer auf den Zellen. Ungebundener Sekundärantikörper wurde durch einen erneuten fünffachen PBS-Waschschritt entfernt. Als nächster Schritt erfolgte eine zehnmünütige Nachfixierung der Zellen auf den Objektträgern in 3,5 % Paraformaldehyd. Zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes vor zu schnellem Ausbleichen („Bleaching“) wurden die Zellen abschließend mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) bedeckt und mit Deckgläsern versiegelt.

Im Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Germany) wurden in den Proben einzeln liegende Zellen im Durchlicht ausgewählt und mit gefiltertem Licht der Wellenlänge 488 nm bestrahlt. Alle Bilder wurden in der gleichen Intensität und Zeit (100 ms) den Strahlen ausgesetzt. Diese Bilder wurden mit einer am Mikroskop angebrachten Digitalkamera (RT-SE-Spot, Visitron, Germany; Meta-View-Software, Universal Imaging Corporation, USA) aufgenommen. Die erhaltenen Bilder wurden unter Zuhilfenahme der Image J Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ausgewertet. Es wurden die Zellfläche sowie die minimalen, mittleren und maximalen Grauwerte innerhalb der als Zelle definierten Fläche als Maß für die Fluoreszenzintensität erhoben. Von dieser Intensität wurde die mittlere Hintergrundfluoreszenz, gemessen an drei gewählten zellfreien Arealen des Bildausschnittes, abgezogen. Da depolymerisierte und somit freie Mikrotubuli bei den Färbeschritten durch die permeabilisierte Zellmembran ausgewaschen werden, werden nur polymerisierte Mikrotubuli angefärbt. Der mittlere Grauwert pro Fläche der Zellen ist damit ein indirektes Maß für die Menge an polymerisierten Mikrotubuli.

3.4 Western Blot

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde der Gehalt an Mikrotubuli nach Stimulation mit Capsaicin und im Vergleich dazu auch nach Gabe von Nocodazol und Ethanol mittels Western Blot quantifiziert.

Die Anlage und Vorbereitung der Zellkulturen sowie die Inkubation mit HGF erfolgte analog zu der Versuchsanordnung für die Immunfluoreszenz, beschrieben unter 2.3. Die Versuche wurden bei einem extrazellulären pH 6,5 und pH 7,0 durchgeführt.

Es erfolgte das vorsichtige Abkratzen der Zellen mittels eines Schabers zur vorsichtigen Sammlung der Zellen mittels Zentrifugation. Die Zellen wurden mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) aufgenommen und über 5 Minuten inkubiert mit den entsprechenden Versuchsmedien: Nocodazol (20µmol/l) und Capsaicin (200nmol/l) sowie einer entsprechenden Ethanol- und Leerkontrolle.

Anschließend erfolgte die Inkubation über eine Minute mit 0,25ml Permeabilisierungspuffer und die Zentrifugation bei 150g über 5 Minuten unter Raumtemperatur. Die Experimente wurden sowohl mit digitoninhaltigem und -freiem Permeabilisierungspuffer durchgeführt.

100 mM	Pipes (pH 6,8)
2 mM	EGTA
0,4 mM	MgCl ₂
20%	Glycerol 20%
100µg/ml	Digitonin
2x	Complete Protease Inhibitor Cocktail™ (Roche)

Tabelle 2 Zusammensetzung des Permeabilitätspuffers

Sowohl der Überstand als auch das Pellet konnten in gleichen Proteinnengen aufgetragen und im Westernblot analysiert und mit α Mikrotubulin 1:25.000 als Erstantikörper und Goat- Anti Mouse 1:50.000 als Zweitantikörper gefärbt werden.

Da depolymerisierte und somit freie Mikrotubuli durch die permeabilisierte Zellmembran ausgewaschen und im Überstand nachgewiesen werden, ist damit die

Tubulinmenge dort ein indirektes Maß für den Polymerisationsgrad der Mikrotubuli. Somit lässt eine hohe Tubulinmenge im Überstand auf eine hohe Menge freien Tubulins in der Zelle schließen, es liegt ein geringer Polymerisationsgrad vor. Umgekehrt führt eine hohe Mikrotubuluspolymerisation zu einer geringen Menge Tubulin im Überstand und einer schmalen Bande im Western Blot.

3.5 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) des Mittelwertes angegeben. Zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse wurde der Student t-Test verwendet. Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ % angesehen und sind in den Abbildungen gekennzeichnet (*). Die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen einer Versuchsreihe ist jeweils angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Migrationsexperimente

Das Wanderungsverhalten migrierender HepG2-Zellen wurde über 5 Stunden videomikroskopisch aufgezeichnet. Die zurückgelegte Strecke des Zellmittelpunktes und die Geschwindigkeit dieser Translokation wurde als Maß für die Migration bestimmt. Um den Effekt des Capsaicins auf die Migration zu erfassen, wurde Capsaicin in einer Konzentration von 100nmol/l zugegeben. Diese Experimente wurden mit Umgebungsmedien unterschiedlichen pH-Wertes wiederholt. Ziel der Versuchsreihe war es, die Abhängigkeit der Stimulation der Migration durch Capsaicin vom extrazellulären pH-Wert darzustellen.

4.1.1 Translokation

Die Strecke, die der Zellmittelpunkt im Verlauf des gesamten Experimentes zurücklegt, wird als Translokation bezeichnet. Die Translokation von HepG2-Zellen ist pH_e -abhängig. Dies zeigte sich in den durchgeführten Experimenten: Unabhängig von der Zugabe von Capsaicin fällt die Translokation der Zellen bei einem extrazellulären pH 6,5 wesentlich geringer aus als bei den höheren pH-Werten. Bei pH_e 7,5 ist eine deutliche Steigerung der migratorischen Aktivität um mehr als den Faktor drei im Vergleich zur Translokation bei pH_e 6,5 festzustellen.

Die Zugabe von Capsaicin zeigt einen eindeutigen Effekt auf die Translokation der Zellen. Unabhängig vom pH-Wert wird die Translokation stimuliert. Das Ausmaß dieser Stimulation ist allerdings eindeutig abhängig vom pH-Wert des Umgebungsmilieus.

An Hand von Trajektorien ist diese Stimulation der Migration durch Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin gut zu verdeutlichen. Dabei zeichnet die „Trajektorie“ die Bewegungslinie des Zellmittelpunktes über die Untersuchungsfläche im Verlauf eines Experimentes nach. In der folgenden Grafik sind die gesamten Trajekturen einer Untersuchung dargestellt:

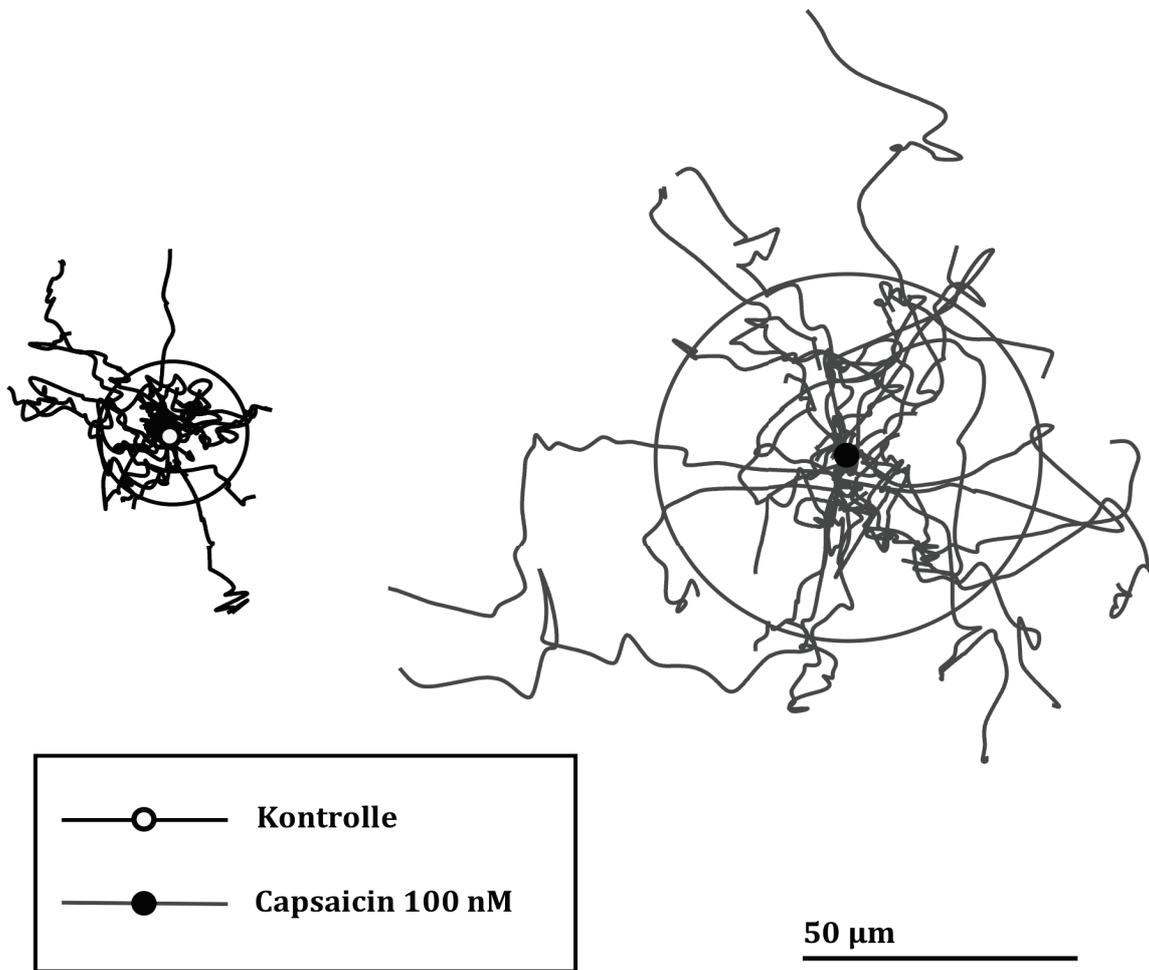


Abbildung 1 Trajektorien migrierender HepG2 Zellen.

Durch Capsaicinstimulation erhöht sich die zurückgelegte Strecke der migrierenden Zellen. Der Radius der Kreise zeigt je die mittlere in 5h zurückgelegte Translokation an. Der Beginn aller Trajektorien wird dann auf einen gemeinsamen Startpunkt verschoben. Als Beispiel aufgeführt sind Trajektorien bei einem extrazellulären pH_e 7,0.

Eindeutig ist die deutlich weitere Translokationsstrecke der durch Capsaicin stimulierten Zellen zu erkennen.

Im Weiteren sind exemplarisch die Trajektorien einer einzelnen Zelle dargestellt.

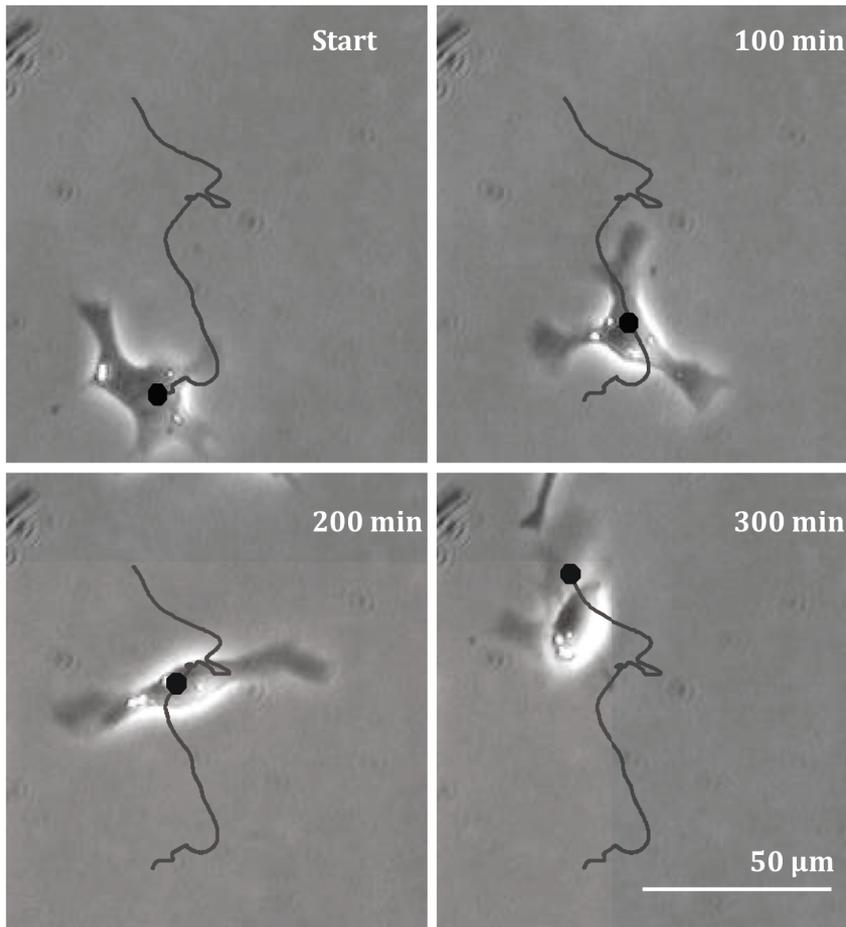


Abbildung 2
Migrierende HepG2
Zelle mit eingezeich-
netem Trajektor nach
Kanalaktivierung
durch Capsaicin

Abgebildet ist eine HepG2- Zelle zum Startpunkt des Experimentes sowie nach 100, 200 und 300 Minuten. Der Mittelpunkt der Zelle ist durch einen Punkt markiert. Alle zehn Minuten wurde ein Bild erstellt. Die von diesem Mittelpunkt über die Zeit zurückgelegte Strecke ist als Trajektor eingezeichnet. Die hier abgebildeten Experimente wurden bei einem extra-zellulären pH_e 7,0 durchgeführt.

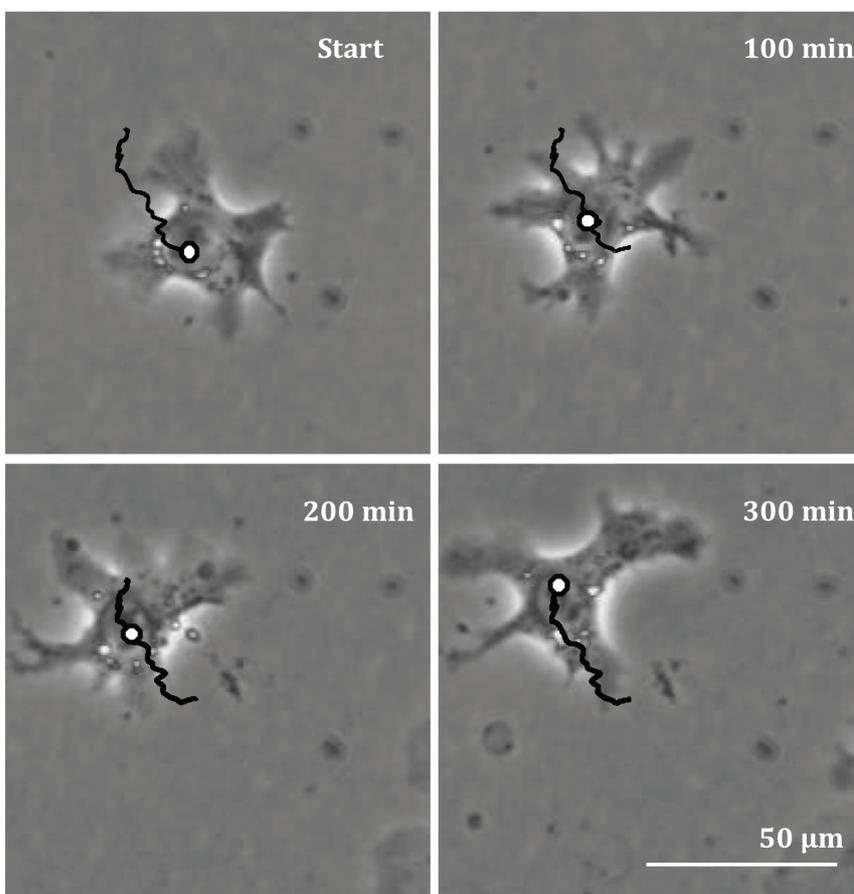


Abbildung 3
Migrierende HepG2
Zelle mit eingezeich-
netem Trajektor,
Kontrollzelle ohne
Kanalaktivierung

Analog zu Abbildung 2 durchgeführte Darstellung.

Die Translokationsmaße sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

	Kontrolle	SEM	Capsaicin 100nm	SEM	Differenz
pH _e 6,5	6,4	1,5	8,6	1,2	2,2
pH _e 6,8*	18,6	2,0	27,7	4,3	9,1
pH _e 7,0*	12,4	1,9	23,6	3,7	11,2
pH _e 7,2 (#)	15,7	1,7	30,3	4,4	14,6
pH _e 7,5	22,3	0,7	23,7	3,1	1,4

Tabelle Translokation in μm

(#) Die Migrationsexperimente für pH_e 7,2 wurden unter den gleichen Untersuchungsbedingungen durch Judith Waning durchgeführt, Vergleiche hierzu: WANING *et. al.* 2007

Der stimulierende Effekt des Capsaicin ist bei pH_e 7,2 mit einem Zuwachs der Translokation von durchschnittlich 14,6 μm über 5 Stunden am deutlichsten und ebenso bei pH_e 6,8 (9,1 μm) und pH_e 7,0 (11,2 μm) zu erkennen und weist eine gewisse Konstanz auf. Mit einer Zunahme der Translokation von 2,2 μm bei pH_e 6,5 und 1,4 μm bei pH_e 7,5 ist der Effekt in diesen Umgebungsmilieus nicht signifikant zu erkennen.

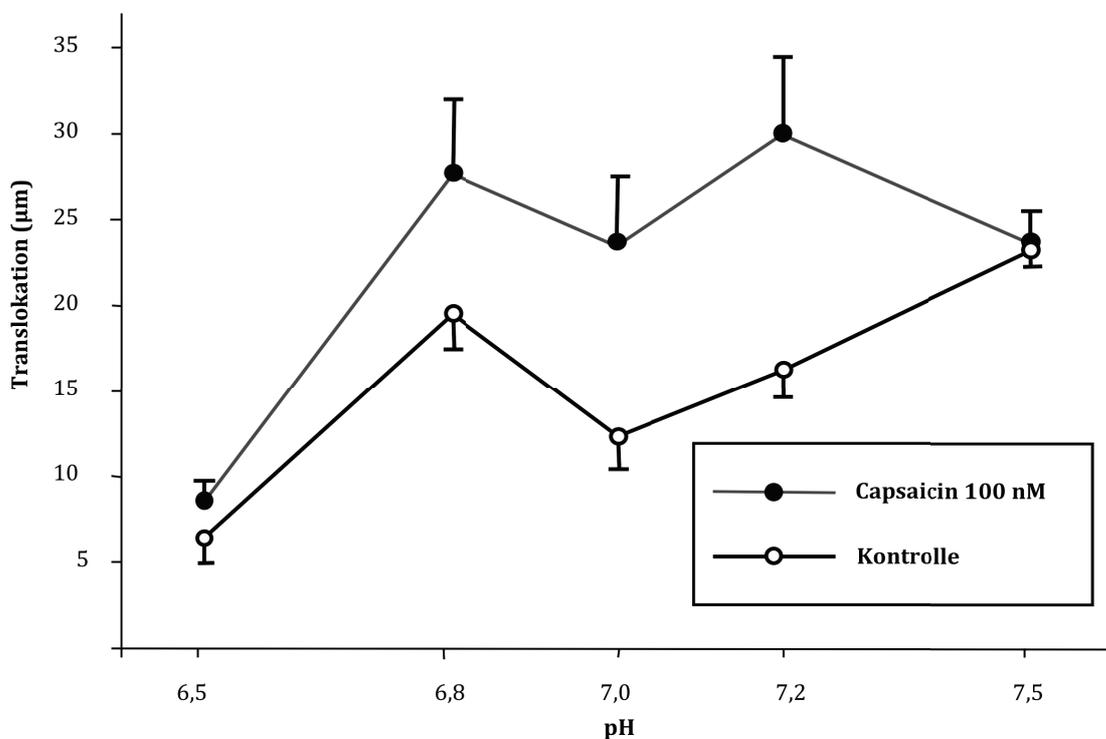


Abbildung 4 Translokation abhängig von pH_e ohne und mit Stimulation des TRPV1-Kanals.

Bei pH_e 6,5 ist die Translokation sowohl der Kontrollzellen als auch die der capsaicin-stimulierten Zellen mit $6,4\mu\text{m}$ bzw. mit $8,6\mu\text{m}$ deutlich erniedrigt. Bei pH_e 7,5 ist auf schon relativ hohem Translokationsniveau der Kontrollzellen mit $22,3\mu\text{m}$ eine signifikante Steigerung der Translokation durch Zugabe von Capsaicin (auf $23,7\mu\text{m}$) nicht mehr möglich.

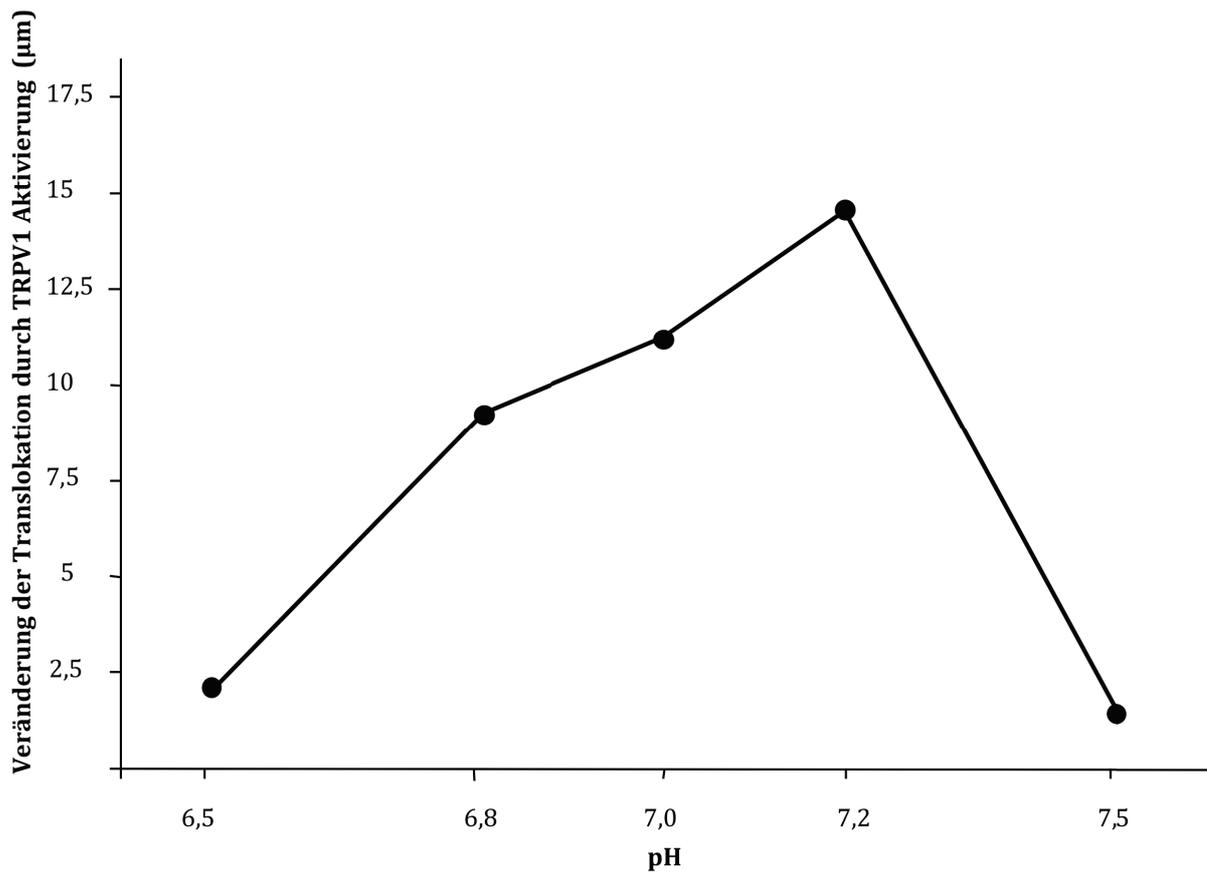


Abbildung 5 Zunahme der Translokation

4.1.2 Geschwindigkeit

Ein ähnlicher Effekt sowohl des extrazellulären pH als auch der Stimulation des TRPV1-Kanals durch Capsaicin ist bei der Geschwindigkeit zu beobachten. Hierbei wird zwischen den einzelnen Bildern, die im Abstand von zehn Minuten gemacht werden, die Geschwindigkeit des Zellmittelpunktes in Mikrometer pro Minute berechnet. Anders als bei der Translokation, bei der nur Start- und Endpunkt der Migration beurteilt werden, wird somit bei der Geschwindigkeit jede Zellbewegung in die Berechnung mit einbezogen. Somit werden auch kleinere Bewegungen,

Richtungsänderungen und „Zittern“, also Bewegungen um einen Punkt herum, der Zellen feiner beurteilt.

	Kontrolle	SEM	Capsaicin 100nM	SEM	Differenz
pH _e 6,5	0,05	0,01	0,07	0,01	0,02
pH _e 6,8	0,15	0,01	0,17	0,02	0,02
pH _e 7,0*	0,11	0,01	0,17	0,02	0,06*
pH _e 7,2* (#)	0,13	0,01	0,19	0,02	0,06*
pH _e 7,5	0,2	0,01	0,18	0,02	-0,02

Tabelle 3 Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$

(#) Die Migrationsexperimente für pH_e 7,2 wurden unter den gleichen Untersuchungsbedingungen durch Judith Waning durchgeführt, Vergleiche hierzu: WANING *et. al.* 2007

Auch hier ist eine herabgesetzte migratorische Aktivität bei pH_e 6,5 zu beobachten.

Im Gegensatz zur Translokation ist bei pH_e 6,5, 6,8 und 7,5 keine signifikante Beeinflussung der Geschwindigkeit durch Capsaicin zu beobachten. Bei pH_e 7,0 und pH_e 7,2 mit je einer Zunahme von durchschnittlich $0,06\mu\text{m}/\text{min}$ die Geschwindigkeit der Zellen durch die Zugabe von Capsaicin signifikant erhöht.

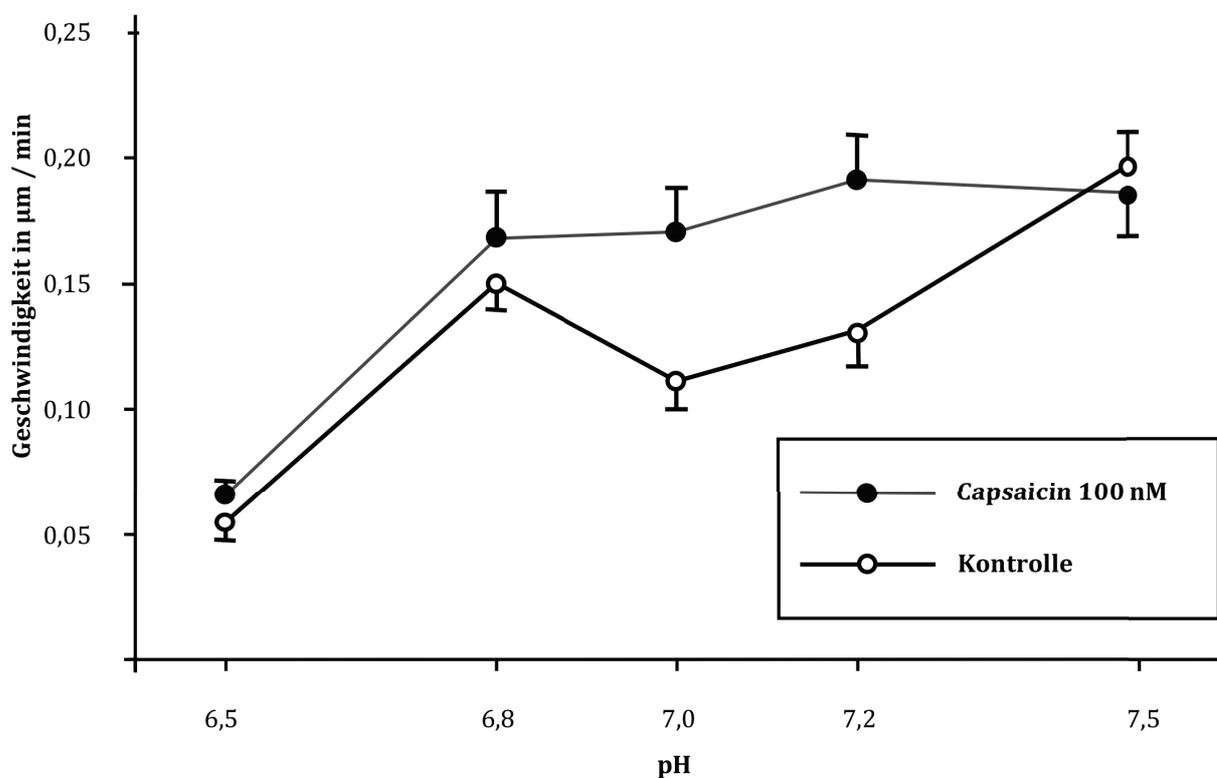


Abbildung 6 Geschwindigkeit abhängig von pH ohne und mit Stimulation des TRPV1-Kanals.

4.1.3 Fläche

Durch die erhobenen Parameter ist auch die projizierte Zellfläche in der Aufsicht betrachtet worden. Hier ergab sich ein signifikanter Unterschied lediglich bei pH_e 7,5 zwischen den Capsaicin ausgesetzten Zellen und den Kontrollzellen. Durch den Einfluss von Capsaicin werden die Zellen bei pH_e 7,5 signifikant größer als die Vergleichszellen.

	Kontrolle		Capsaicin 100nM	
pH_e 6,5	685	59	761	58
pH_e 6,8	645	47	743	60
pH_e 7,0	1014	69	828	75
pH_e 7,5*	593	52	757	58

Tabelle 4 Auflagefläche der Zellen in μm^2

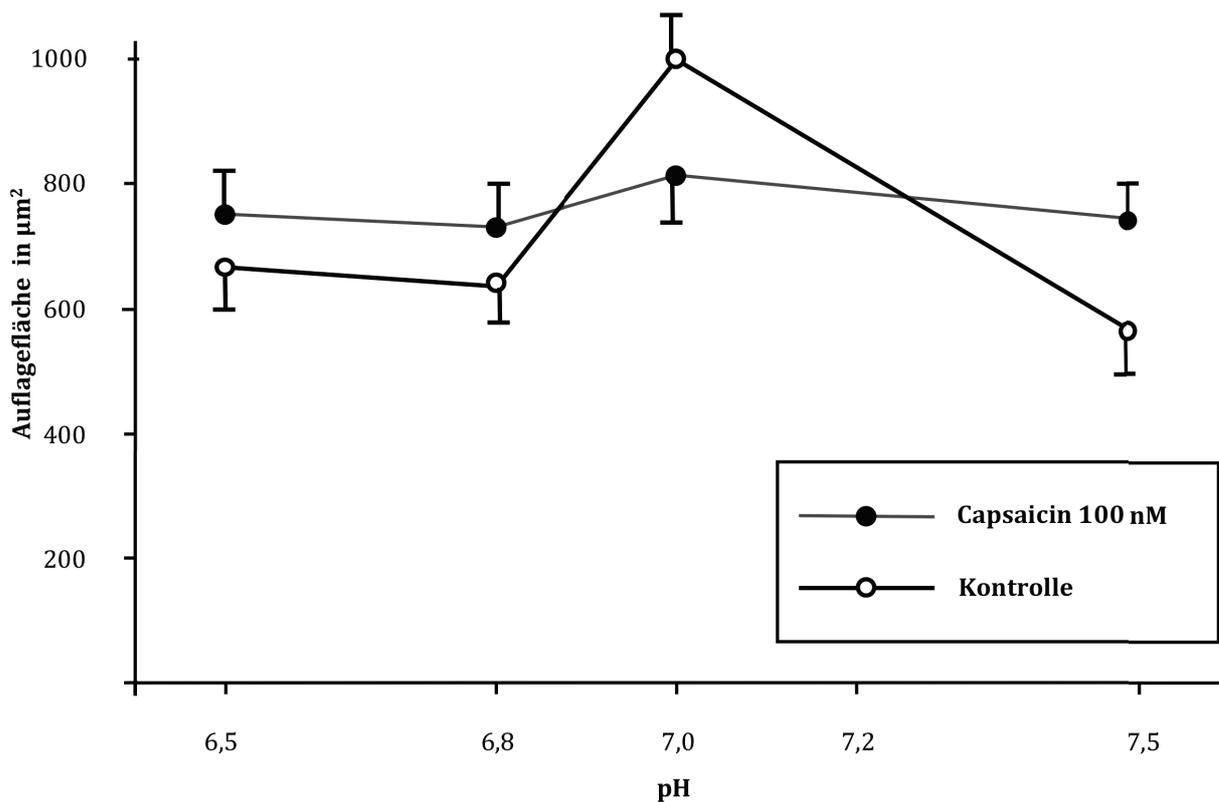


Abbildung 7 Auflagefläche

4.1.4 Strukturindex

Mittels des Strukturindexes wird die Form der Zellen näherungsweise beschrieben. Hierbei bedeutet ein Strukturindex, der sich der Zahl 1 annähert, eine zunehmend kreisförmige Zellform, ein Strukturindex, der sich der Zahl 0 annähert, beschreibt eine eher dendritische Form der Zelle. Somit kann der Strukturindex unter anderem eine Aussage über die Ausprägung von Lamellipodien oder Filopodien treffen.

In den durchgeführten Experimenten konnte den Strukturindex betreffend kein signifikanter Unterschied durch eine Stimulation des TRPV1-Kanals beobachtet werden. Weder der extrazelluläre pH-Wert noch die Stimulation des TRPV1-Kanals führt zu der Ausbildung von Zellausläufern und beeinflusst somit die Morphologie der Zelle – soweit mit dem Strukturindex beurteilbar – nicht.

4.2 Polymerisationsgrad der Mikrotubuli

Durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität angefärbter Mikrotubuli und durch Western Blot-Analyse wird im folgenden Abschnitt der Gehalt an polymerisierten Mikrotubuli in caspsaicin-stimulierten Zellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe und im Vergleich zu einer Nocodazol-Gruppe bestimmt. Nocodazol führt zu einer Depolymerisation des Mikrotubulus Zytoskeletts (LIAO *et. al.* 1995). Eine Veränderung des Gehaltes an polymerisierten Mikrotubuli kann als Hinweis gelten, dass der TRPV1-Kanal über eine Depolymerisation der Mikrotubuli Einfluss auf die migratorische Aktivität der HepG2-Zellen nimmt. Die Veränderung des Polymerisationsgrades der Mikrotubuli kann also einen möglichen Wirkmechanismus der TRPV1-Kanäle auf die Migration der HepG2-Zellen darstellen.

4.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

In den im Folgenden beschriebenen fluoreszenzmikroskopischen Experimenten wird der Gehalt an polymerisierten Mikrotubuli an Hand der Mikrotubulus-assoziierten Fluoreszenzintensität verglichen. Dabei wurden die Zellen unter dem gleichen Regime wie bei den Migrationsexperimenten bei pH_e 6,5, pH_e 7,0 und pH_e 7,5 entweder mit Ethanol als Kontrollgruppe oder mit Capsaicin behandelt. Zudem wurden die Zellen einer Versuchsreihe bei pH_e 7,0 Nocodazol ausgesetzt. Nocodazol führt zu einer deutlichen Herabsetzung des Turnovers der dynamischen Mikrotubuli mit einer deutlichen Depolymerisation (VASQUEZ *et. al.* 1997). Der mittlere Grauwert der Zelle wurde ermittelt und als Indikator für die Fluoreszenzintensität und somit den Gehalt an polymerisierten Mikrotubuli gewertet.

	Kontrolle	Capsaicin 100 nM	Nocodazol 10 nM
pH_e 6,5*	0,024	0,045	
pH_e 7,0*	0,037	0,027	0,017
pH_e 7,5	0,033	0,025	

Tabelle 5 Fluoreszenzintensität abhängig von extrazellulärem pH, Kanalaktivierung und Kontrolle mit Nocodazol

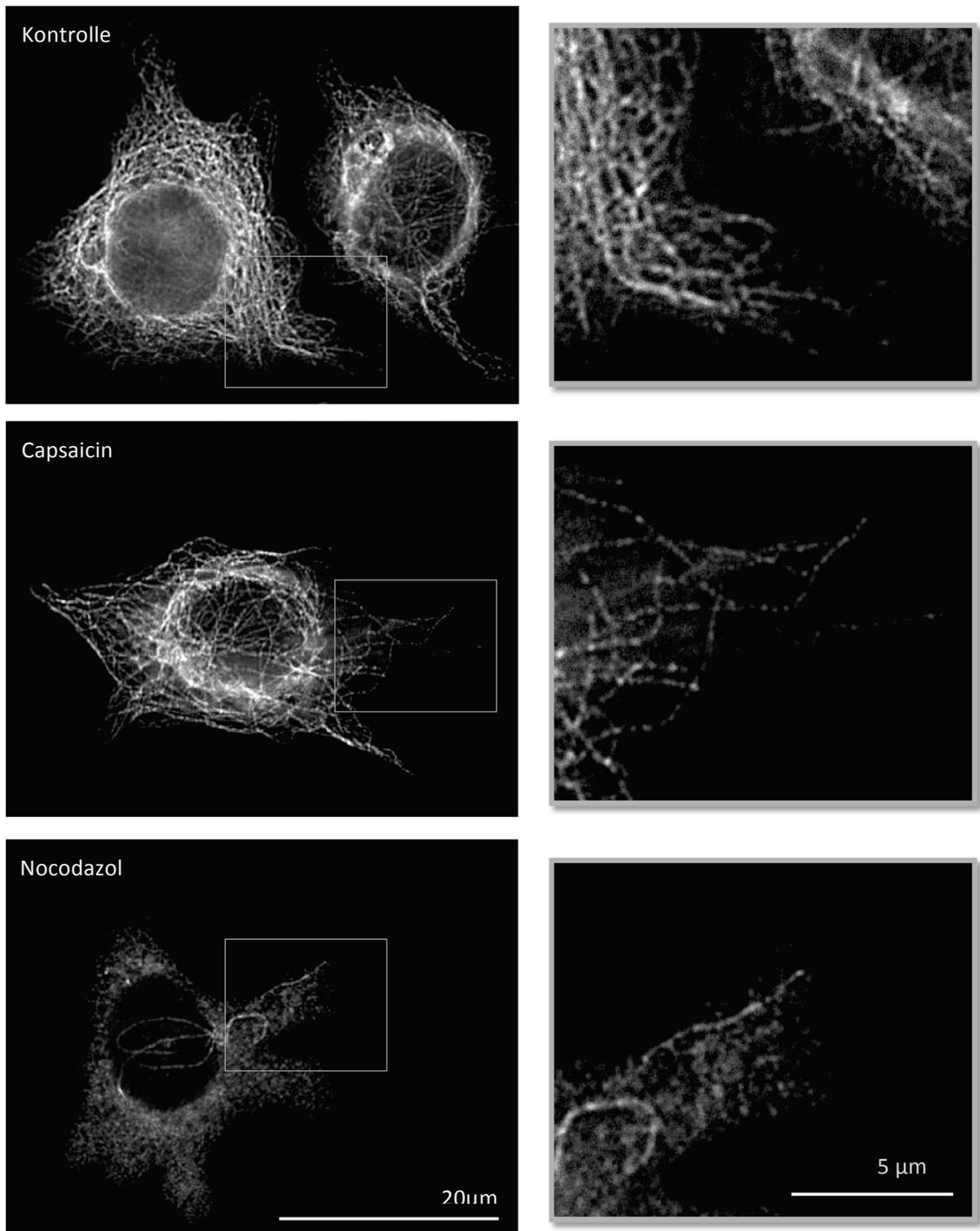


Abbildung 7 Polymerisationsgrad der Mikrotubuli bei pH_e 7,0

Mikrotubulusfärbungen bei pH_e 7,0 von Zellen ohne Stimulation des TRPV1-Kanals (oben), nach Stimulation mit Capsaicin (mitte) und nach Mikrotubulisdepolymerisation durch Nocodazol (unten) bei gleicher Belichtungsintensität und –dauer. Links sind die gesamten Zellen abgebildet, rechts die entsprechenden, vergrößerten Ausschnitte.

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied des Gehaltes an polymerisierten Mikrotubuli mit einem hohen Gehalt bei den Kontrollzellen, einer Abnahme bei den mit Capsaicin stimulierten Zellen bis zu lediglich vereinzelt sichtbaren Mikrotubuli bei den Nocodazolzellen.

Die Stimulation des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin hat einen Effekt auf den Gehalt der polymerisierten Mikrotubuli einer HepG2-Zelle. Dieser Effekt ist abhängig vom extrazellulären pH.

Im sauren Milieu bei pH_e 6,5 führt eine Stimulation des TRPV1-Kanals zu einer Zunahme des Gehaltes an Mikrotubuli. Der mittlere Grauwert nahm nach Stimulation mit 100nM Capsaicin von 0,024 auf 0,045 zu. Bei pH_e 7,0 kommt es nach Stimulation des TRPV1-Kanals jedoch zu einem gegenteiligen Effekt, der mittlere Grauwert nimmt von 0,037 auf 0,027 ab. Der Depolymerisationsgrad durch TRPV1-Kanalaktivierung ist allerdings geringer ausgeprägt als der Depolymerisationsgrad durch Nocodazol. Bei pH_e 7,5 ist kein signifikanter Unterschied im Gehalt an Mikrotubuli zu erkennen.

Folgende Grafik verdeutlicht die oben genannten Ergebnisse:

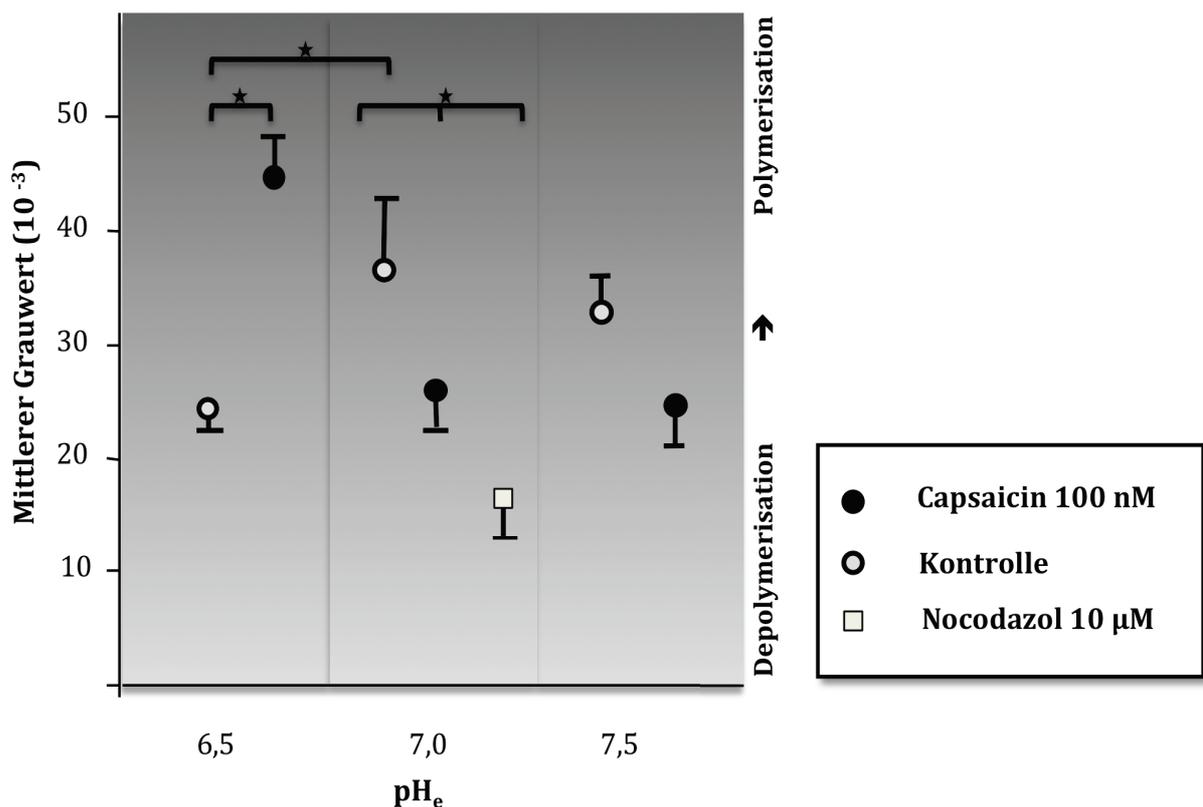


Abbildung 8 Polymerisation und Depolymerisation von Mikrotubuli nach TRPV1-Stimulation

Der pH-Wert des Mediums variiert in den verschiedenen Versuchen. Bei pH_e 7,0 und pH_e 7,5 führt die Stimulation des TRPV1 durch Capsaicin zu einer Mikrotubulus-Depolymerisation und somit zu einer Abnahme des mittleren Grauwertes, bei pH_e 6,5 führt TRPV1-Aktivierung zu einer Mikrotubulus-Polymerisation.

Die Stimulation des TRPV1-Kanals beeinflusst den Polymerisationsgrad von Mikrotubuli, die von Goswami et al. gewonnenen Erkenntnisse konnten also bestätigt werden. Allerdings beeinflusst der extrazelluläre pH-Wert diesen Prozess und zwar sogar so weit, dass der TRPV1-Kanal seinen Einfluss auf das Mikrotubuluskelett umkehrt und es bei pH_e 6,5 nach Kanalaktivierung zu vermehrter Polymerisation kommt. Der TRPV1-Kanal integriert hier also verschiedene auf die Zelle einfließende Informationen (Ligandenabhängige Kanalaktivierung und extrazelluläres pH) und wandelt diese in intrazelluläre Modifikation des Zytoskelettes um.

4.2.2 Western Blot

Diese Daten wurden mittels Western Blot-Analyse überprüft. Die Depolymerisation der Mikrotubuli in der Zelle führt zu vielen freigesetzten Mikrotubulus-Monomeren im Zytosol. Diese finden sich als lösliche Proteine im Überstand wieder, die entsprechende Bande im Westernblot zeigt sich bei zunehmendem Depolymerisationsgrad prominent. Der Westernblot kann somit als semiquantitativer Vergleich zur Bewertung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Darstellung hinzugezogen werden.

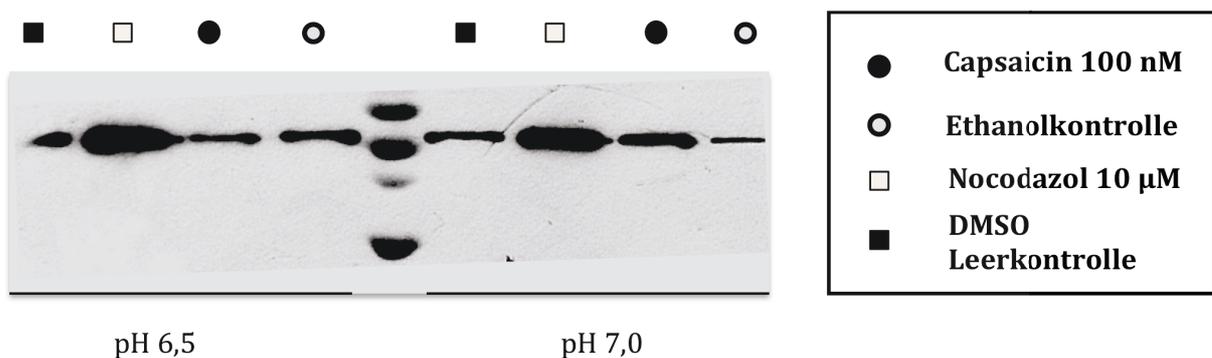


Abbildung 9 Western Blot

Zu erkennen ist dies an den beiden Nocodazol-Banden. Die Depolymerisation der Mikrotubuli durch Nocodazol führt zu vielen Mikrotubulusmonomeren, die aus der Zelle gelöst werden können und in einer breiten Bande im Westernblot erscheinen. Dies ist unabhängig vom extrazellulären pH-Wert.

Bei pH_e 7,0 zeigt sich die Bande der mit Capsaicin behandelten Zellen im

Westernblot deutlich verbreitert im Vergleich zur Ethanolkontrolle. Capsaicin führt also bei pH_e 7,0 zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli.

Bei pH_e 6,5 zeigt sich ein umgekehrter Effekt: Mit Capsaicin stimulierte Zellen weisen einen höheren Polymerisationsgrad der Mikrotubuli auf als die Ethanol-Vergleichszellen, die Bande im Western Blot erscheint dezenter.

Im Vergleich der beiden Capsaicin Banden ist die Bande bei pH_e 7,0, im Vergleich der Ethanol-Kontrollgruppen ist die Bande bei pH_e 6,5 deutlicher ausgeprägt, dies spricht jeweils für einen geringeren Polymerisationsgrad.

Zusammengefasst führt die Stimulation mit Capsaicin bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,5 zu einem erhöhten Polymerisationsgrad und bei pH_e 7,0 zu einem niedrigeren Polymerisationsgrad als in den entsprechenden Kontrollzellen. Der Depolymerisations-grad von Nocodazol ist deutlich höher. Auch die Unterschiede im Polymerisationsgrad zwischen den jeweiligen Ethanol- und Capsaicin-Versuchsreihen finden sich im Western Blot analog zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Darstellung. Somit werden die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Darstellung durch die Western Blot Analyse bestätigt.

Folgende Grafik soll den Polymerisationsgrad der Mikrotubuli – abgelesen an der Balkendicke im Western Blot – vermitteln:

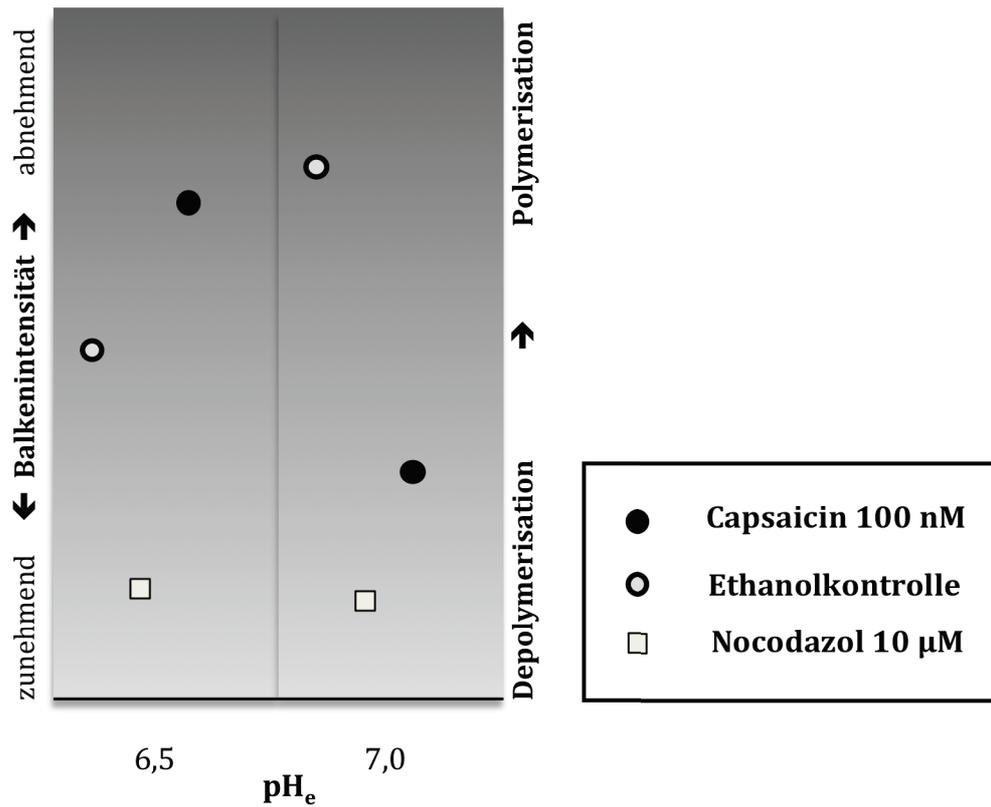


Abbildung 10 Graphische Annäherung an die Mikrotubulus-Protein-Quantifizierung im Überstand und somit den Polymerisationsgrad abhängig von extrazellulärem pH-Wert, Kanalaktivierung und Kontrolle mit Nocodazol.

Der Polymerisationsgrad ist an Hand der im Western Blot ermittelten Balkenintensität aufgezeichnet. Die Intensität des Western Blots ist nicht quantitativ auf der y-Achse abgebildet. Je dünner der Western Blot-Balken, desto mehr Mikrotubuli sind in der Zelle polymerisiert. Die Grafik zeigt im Vergleich zu Abbildung 9 die Bestätigung der Immunfluoreszenz-Ergebnisse durch den Western Blot.

5 Diskussion

In den durchgeführten Untersuchungen zeigt sich eine Abhängigkeit der Migration von der Stimulation des TRPV1-Kanals, die durch das extrazelluläre pH modifiziert wird. Der TRPV1-Kanal verändert im Rahmen seiner Aktivierung – ebenfalls abhängig vom extrazellulären pH – den Polymerisationsgrad der Mikrotubuli. Über welche Mechanismen die Kanalaktivierung Einfluss auf das Migrationsverhalten von HepG2 Zellen nimmt, ist bisher unklar, es sollen im Folgenden einige mögliche Mechanismen dargestellt werden.

5.1 Stimulation über Modulation des Zytoskelettes

Die Vermutung ist naheliegend, dass auch das Zytoskelett als Bestandteil der Migrationsmaschinerie und im Besonderen das mikrotubuläre System, dessen Dynamik ja durch den TRPV1-Kanal beeinflusst wird, hier modulierend wirkt.

In der Immunfluoreszenz-Darstellung und im Western Blot konnte gezeigt werden, dass der extrazelluläre pH-Wert die Veränderungen des Polymerisationsgrades der Mikrotubuli nach Kanalaktivierung bestimmt. Bei pH_e 6,5 kommt es durch Kanalaktivierung zu einem deutlich erhöhten Polymerisationsgrad der Mikrotubuli – gleichzeitig kann in den entsprechenden Migrationsexperimenten keine Beeinflussung der Translokation und der Geschwindigkeit nachgewiesen werden. Bei pH_e 7,0 kommt es hingegen – bei deutlich vermindertem Polymerisationsgrad der Mikrotubuli – zu einer eindeutigen Stimulation der Migration. Bei pH_e 7,5 kann durch Capsaicin weder eine signifikante Modulation der Migrationsmaße noch des Polymerisationsgrades der Mikrotubuli beobachtet werden, jedoch scheinen die bei pH_e 7,0 beobachteten Veränderungen tendenziell vermindert vorgefunden zu werden.

Auf den Punkt gebracht würde daraus folgen: Abhängig von extrazellulärem pH und Kanalaktivierung führt eine Mikrotubuluspolymerisation zu Migrationsinhibition, eine Depolymerisation zu Migrationssteigerung.

Bereits in der Einleitung ist umfassend auf die Beeinflussung der Migration durch das Mikrotubulusskelett hingewiesen und eine umgekehrte Abhängigkeit der Migrationseigenschaften vom Polymerisationsgrad der Mikrotubuli proklamiert worden: in der Mehrzahl der Zelltypen ist Migration abhängig von der Polymerisation der Mikrotubuli (VASILEV *et. al.* 1970), sie sind entscheidend für die Aufrechterhaltung einer Polarität (LI & GUNDERSEN 2008). Diesen Einfluss üben die Mikrotubuli –noch einmal kurzgefasst– über verschiedene Bereiche der Migrationsmaschinerie aus: So haben die Mikrotubuli Einfluss auf den Turnover der Fokalen Adhäsionen. Durch dynamische Mikrotubuli wird das „Sliding“ und die Auflösung fokaler Adhäsionen am hinteren Ende der Zelle kontrolliert (KAVERINA *et. al.* 1999).

Zerstörung der Mikrotubuli führt über globale Aktivierung von Rho zu einer Aufhebung der Zellpolarität. Rho modifiziert die protrusiven Eigenschaften des Aktinnetzwerkes in der Zellfront und kontrolliert die kontraktile Eigenschaften der Stressfasern am hinteren Teil der Zelle (ENOMOTO 1996 und REN *et. al.* 1999).

Die Auflösung der Mikrotubuli führt Rho- und GEFh1-vermittelt zu einer vermehrten Kontraktilität der Stressfasern – dies könnte Bedeutung in der Retraktion des Zellschweifes haben – und zur Stabilisierung von fokalen Adhäsionen (BERSHADSKY *et. al.* 1996), letzteres ist wichtig an der Basis des Lamellipodiums und der in Migrationsrichtung nachfolgenden Zellregion.

In vielen motilen Zellen ist eine Stimulation der Mobilität eher durch Mikrotubuluspolymerisation zu beobachten. Die Abhängigkeit der Migration von Mikrotubuli ist vermindert bei schnell wandernden Zellen, die nur geringe fokale Adhäsionen aufweisen. In schnell migrierenden Neutrophilen ist durch eine Rho-vermittelte Erhöhung der Kontraktilität nach Zerstörung des Mikrotubulusskelettes sogar eine vermehrte Migration zu beobachten (NIGGLI 2003). Einzelne Bestandteile der Migrationsmaschinerie, die durch Mikrotubulusdepolymerisation aktiviert werden, scheinen also die Migration zu stimulieren.

- Migrationsstimulation über vermehrte Kontraktilität

Es ist gut möglich, dass die hier beobachtete migrationsstimulierende Eigenschaft einer Mikrotubulusdepolymerisation im Sinne einer erhöhten Kontraktilität auch in

langsamer wandernden Zellen eine Rolle spielt. Die durch Nocodazol hervorgerufene Depolymerisation der Mikrotubuli in langsamer wandernden Zellen scheint vor allem durch eine verminderte Lösung fokaler Adhäsionen das Migrationsverhalten zu reduzieren.

Wie in der Immunfluoreszenz-Darstellung und im Western Blot gezeigt, ist der Depolymerisationsgrad durch die Aktivierung des TRPV1-Kanals nicht so ausgeprägt wie die Depolymerisation durch Nocodazol. Das heißt, es kommt nicht zu einer vollständigen Depolymerisation der Mikrotubuli. Es ist nicht bekannt, ob ein bestimmter Schwellenwert der Depolymerisation für die einzelnen Elemente der Migrationsmaschinerie besteht und ob dieser sich bei den einzelnen Elementen der Migrationsmaschinerie unterscheidet. So könnte eine Überlegung sein, dass der quantitative Unterschied im Polymerisationsgrad bereits promigratorische Stimuli – wie die gesteigerte Kontraktilität – aktivieren kann, die Depolymerisation aber noch nicht ausreichend ist, um durch eine Stabilisierung von Fokalen Adhäsionen die Migration zu vermindern. Allerdings sprechen von Liao et al. durchgeführte Experimente gegen diese Vermutung: So konnte in Fibroblasten eine geringe, den Gehalt an Mikrotubuli noch nicht reduzierende Menge an Nocodazol bereits das Migrationsausmaß verringern (LIAO *et. al.* 1995). Eine verminderte Depolymerisation im Vergleich zu Nocodazol scheint also die Migrationssteigerung durch TRPV1 nicht zu erklären.

Gegebenenfalls ist auch nur eine lokale Depolymerisation der Mikrotubuli in Betracht zu ziehen, sollte der TRPV1-Kanal einer bestimmten Verteilung in HepG2 Zellen unterliegen. So ist es möglich, dass der TRPV1-Kanal nach Aktivierung die Mikrotubulodynamik nur moduliert oder Zellregion-spezifisch reguliert. Aus diesem Grund ist die Betrachtung der Verteilung des TRPV1-Kanals interessant und könnte ein Feld zukünftiger Untersuchungen sein.

- Lokale Aktivierung des TRPV1-Kanals

Stock et al. beschrieben bei Melanomzellen einen perizellulären pH Gradienten an der Zelloberfläche von Melanomzellen mit einem niedrigeren pH_e am führenden Pol der Zelle und einem erhöhtem pH_e am hintern Ende (STOCK *et. al.* 2007).

Sollte auch bei HepG2-Zellen ein ähnlicher perizellulärer pH-Gradient vorgefunden werden, so ist es möglich, dass der TRPV1-Kanal nur an bestimmten Regionen der migrierenden Zelle eine Wirkung auf die Migrationsmaschinerie hat oder weiter noch, dass er an unterschiedlichen Regionen auch eine unterschiedliche Wirkung hat.

Postuliert man einen zellregionspezifischen Einfluss des TRPV1-Kanals auf unterschiedliche Teilhaber der Migrationsmaschinerie, so ergäbe sich folgendes Zellmodell:

Am vorderen Pol der Zelle ist die extrazelluläre Protonenkonzentration erhöht. Hier könnte eine Kanalaktivierung also – entsprechend der Ergebnisse der Immunfluoreszenzversuche – zu einem vermehrten Polymerisationsgrad der Mikrotubuli führen. Wie eingangs beschrieben, ist die Protrusion und Lamellipodienbildung vornehmlich durch Aktin vermittelt. Hier spielen die Mikrotubuli eine untergeordnete Rolle, sie finden sich in einer geringeren Konzentration und mit verminderter Dynamik. Allerdings existieren tatsächlich auch in diesem Bereich der Zelle einzelne stabilisierte Mikrotubuli (GUNDERSEN & BULINSKI 1988), und es werden einige, die Bildung eines Lamellipodiums unterstützende Faktoren diskutiert (SMALL *et. al.* 2002):

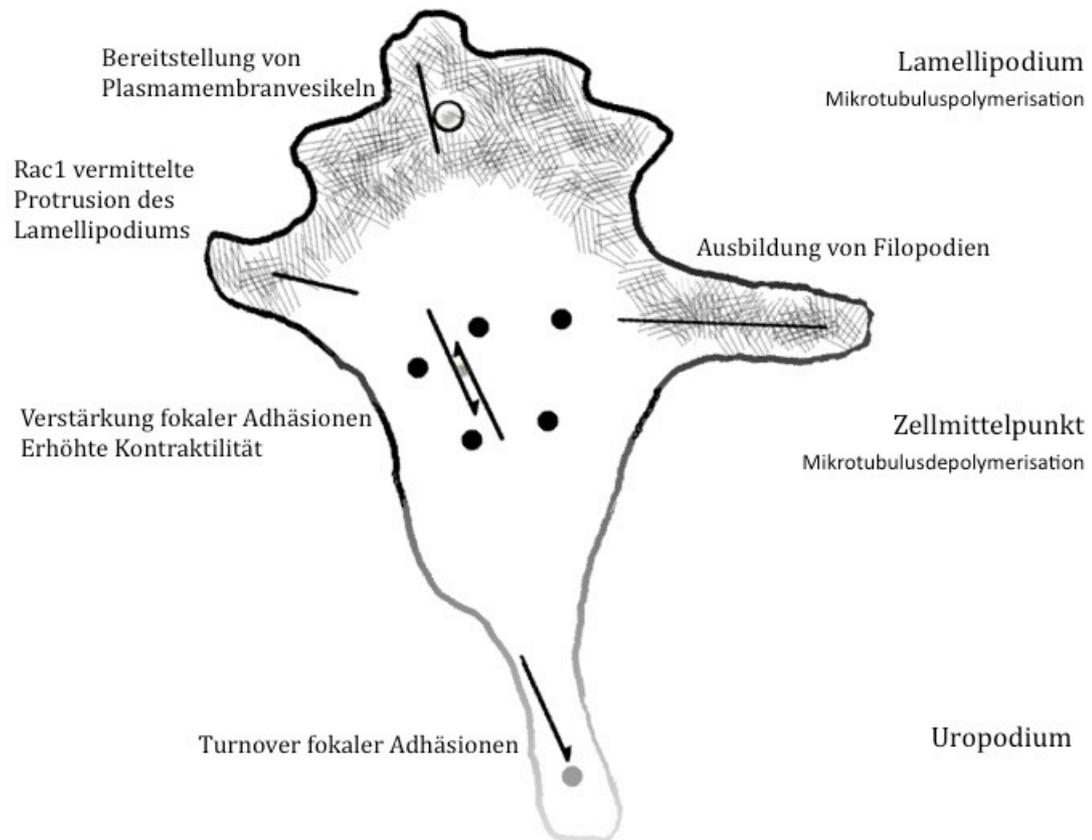


Abbildung 11 Modell einer Zelle mit pH Gradienten in der Nanoumgebung.

Der pH-Wert in der direkten Nanoumgebung der Zelle nimmt vom Lamellipodium bis zum Uropodium zu (je dunkler die Zellumrandung, desto geringer der pH-Wert). Daraufhin führt am Lamellipodium eine TRPV1-Kanalaktivierung zu Mikrotubuluspolymerisation (Mikrotubuli sind als dicke Linien gezeichnet). Dies führt am Lamellipodium Rac 1-vermittelt zu dessen Protrusion (Aktinnetzwerk grau eingezeichnet), zur Ausbildung von Filopodien, zudem fungieren die Mikrotubuli als Leitbahnen für den Transport von Membranvesikeln zum Lamellipodium. Im Bereich der Zellmitte kommt auf Grund des erhöhten pH-Wertes in der Nanoumgebung zu einer Mikrotubuluspolymerisation mit Verstärkung der fokalen Adhäsionen und einer erhöhten Kontraktilität. Am Uropodium begünstigen Mikrotubuli den Turnover fokaler Adhäsionen.

Zum einen ist die Lamellipodienbildung abhängig von der Versorgung des Lamellipodiums mit Plasmamembran, in der Bereitstellung dieser spielen Mikrotubuli eine entscheidende Rolle (TOOMRE *et. al.* 1999). Zum anderen stimuliert die Mikrotubuluspolymerisation Rac1, dadurch wiederum wird die Protrusion des Lamellipodiums gestärkt (WATERMAN-STORER *et. al.* 1999).

Wie in der Einleitung beschrieben ist der TRPV1-Kanal unabhängig von seiner Kanalfunktion und seiner Aktivierung an der Initiierung des Ausbaus filopodialer Strukturen beteiligt. Die Überexprimierung des TRPV1-Kanals führt in Neuronen zu

einem vermehrten Ausbau filopodiale Strukturen (GOSWAMI & HUCHO 2007). Durch Kanalaktivierung kommt es im Rahmen der Mikrotubulusdepolymerisation zum Abknicken und zur Auflösung filopodiale Strukturen, wie Goswami et al.

beobachteten. Gerade im Bereich des Lamellipodiums könnte bei einem niedrigen extrazellulären pH und vermehrtem Polymerisationsgrad der Mikrotubuli aber ein gegenteiliger Effekt mit einer Stabilisierung der Mikrotubuli denkbar sein. Somit könnte die Stabilität filopodiale Strukturen an der Zellfront begünstigt werden.

Im Bereich des Zellkörpers nimmt das extrazelluläre pH zu; es kommt zu vermehrter Mikrotubulusdepolymerisation. Diese führt – wie oben angeführt – zu vermehrter Kontraktilität und einer Verstärkung und Vergrößerung fokaler Adhäsionen. Zwei für die Migration elementare Prozesse also, die zu einer Stimulation der Migration führen.

Am Zellschweif ist der pH-Wert zunehmend alkalisch, hier ist der Einfluss der Kanalaktivierung auf den Polymerisationsgrad der Mikrotubuli nur gering. Die für die Migration so wichtige Lösung fokaler Kontakte durch Mikrotubuluspolymerisation wäre an dieser Stelle durch den TRPV1-Kanal also nicht beeinflusst, vor allem aber auch nicht verhindert.

Die Bestätigung dieses grob gezeichneten Modells ist allerdings ausstehend, viele Faktoren sind noch nicht eingehend betrachtet: Der pH-Gradient an der Zelloberfläche fiel in den Untersuchungen von Stock et al. bei Melanomzellen wesentlich geringer aus als die pH-Unterschiede in den durchgeführten Experimenten. Es ist nicht klar, ob und in welcher Ausprägung ein solcher pH-Unterschied überhaupt bei HepG2-Zellen zu beobachten ist. Auch ist die Verteilung des TRPV1-Kanals auf der Zelloberfläche von HepG2-Zellen nicht bekannt. Schließlich ist nicht klar, in welchem pH-Bereich und wie sensibel der Umschwung von einer Polymerisation der Mikrotubuli zu einer Depolymerisation nach TRPV1-Aktivierung stattfindet.

- Vom mesenchymalen zum amöboiden Migrationstypus – Veränderung des Migrationsverhaltens

Nichtsdestotrotz existieren Beobachtungen, die die Hypothese unterstützen, dass die TRPV1-Kanalaktivierung über eine Depolymerisation der Mikrotubuli die

Migrationsaktivität verstärkt. Stathmin (auch OncoProtein 18 (OP18) oder Metablastin) wird in vielen Tumoren ausgeschüttet und führt in diesen über eine Depolymerisation des Mikrotubulusskeletts zu einer deutlich vermehrten Migration mit einer zunehmenden Abrundung der Zelle (BELLETTI *et. al.* 2008). Die genauen zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch nicht bekannt. Jedoch scheint die Überexprimierung von Stathmin die Malignität eines Tumors deutlich zu erhöhen und kann demnach als prognostischer Faktor dienen (CURMI *et. al.* 2000 und BELLETTI *et. al.* 2008).

Es zeigte sich, dass vor allem die Migration im dreidimensionalen Raum durch Mikrotubulusdepolymerisation gesteigert wird (BELLETTI *et. al.* 2008). Für das Wanderungsverhalten in einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix ist ein vermehrt „amöboides“ Wanderungsverhalten zuträglich (FRIEDL & WOLF 2003 und SAHAI & MARSHALL 2003), dieses könnte durch Mikrotubulusdepolymerisation und die oben genannte „Abrundung der Zelle“ hervorgerufen werden.

Auch in T-Zellen verändert die Depolymerisation von Mikrotubuli das Migrationsverhalten. Jüngst konnte gezeigt werden, dass sich durch Depolymerisation der Mikrotubuli der migratorische Phänotyp der T-Zellen weg von einem Phänotyp mit Lamellipodium und Uropodium und stabiler Richtung hin zu einem Phänotyp mit runderer „amöboiden“ Zellform, vermehrtem „Blebbing“ und vermehrter Richtungsänderung wandelt (TAKESONO *et. al.* 2010). Ähnliche Ergebnisse konnten zuvor bei Neuronen aufgezeigt werden (BAUDOIN *et. al.* 2008).

Friedl und Wolf (FRIEDL & WOLF 2010) etablierten ein „multiscale tuning model“, das diese Veränderungen beschreibt. Laut diesem Konzept kontrollieren Dimension, Dichte, Steifheit und Orientierung der extrazellulären Matrix gemeinsam mit Zelldeterminanten wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, zytoskelettaler Polarität und Rigidität und die perizelluläre Proteolyse abhängig voneinander den Modus der Migration einer Zelle und die Ausprägung der Migration.

Unterschieden werden bei einzeln wandernden Zellen auf der einen Seite eine amöboide Migrationsmorphologie mit verminderten Zell-Matrix-Kontakten und deutlich ausgebildetem propulsiven Migrationsmodus, verbunden mit einer eher runden Zellform mit nur wenigen Ausläufern, jedoch der deutlichen Ausbildung

eines Lamellipodiums mit Filopodien. Als Beispiel sind hier schnell wandernde Leukozyten anzubringen.

Auf der anderen Seite wird eine mesenchymale Migrationsmorphologie beschrieben. Typischerweise findet man dieses Migrationsverhalten beispielsweise bei Fibroblasten und undifferenzierten Tumorzellen, die Migrationsgeschwindigkeit ist deutlich geringer als die des amöboiden Migrationstypus. Charakteristika sind eine höhere Bindung an die extrazelluläre Matrix und eine stärker ausgeprägte Zellkontraktilität, morphologisch sind diese Zellen elongiert und weisen deutliche Zellextensionen auf.

Auch wird Bildung von Zellprotrusionen durch die Stabilität der Mikrotubuli kontrolliert. Eine vermehrte Stabilität der Mikrotubuli ist eher mit einem mesenchymalen Migrationstyp verbunden, eine verminderte Stabilität mit einer höheren Depolymerisationsbereitschaft der Mikrotubuli – zum Beispiel durch Stathmin verursacht – unterstützt eher einen amöboiden Migrationsmodus.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass auch der TRPV1-Kanal durch eine Depolymerisation der Mikrotubuli die Migration stimuliert. Eine signifikante Veränderung des Strukturindex konnte in den Experimenten zwar nicht erwiesen werden, allerdings konnte durch Kanalaktivierung bei besonders rasch migrierenden Zellen eine oben beschriebene amöboide Zellmorphologie beobachtet werden. Der TRPV1-Kanal könnte somit auf eine ganz ähnliche Weise wie Stathmin wirken und über eine Mikrotubulusdepolymerisation das Wanderungsverhalten der HepG2-Zellen von einem typischen mesenchymalen Migrationstypus zu einem eher pseudopodial amöboiden Migrationstypus modulieren.

Hingewiesen sei an dieser Stelle auch auf die bereits in der Einleitung erwähnten Arbeit von GOSWAMI & HUCHO (2007), die ähnliche Beobachtungen bei neuronalen und nicht-neuronalen Zellen machten und diese These unterstützen: Die vermehrte Expression von TRPV1 führte zu einer deutlich erhöhten Anzahl und Länge filopodiale Strukturen mit einer signifikanten Kollokalisierung der stabilen Mikrotubuli und der TRPV1-Kanäle. Es konnte ein vermehrtes Abknicken und Abbau der filopodiale Strukturen nach Kanalaktivierung nachgewiesen werden.

Die Experimente in dieser Arbeit wurden auf einem dünnen Collagen1 und somit im zweidimensionalen Raum durchgeführt. In zukünftigen Arbeiten könnte die Stimulation der Migration im dreidimensionalen Extrazellulärraum eingegangen werden. Insgesamt ist die Parallelität in der Stimulation der Migration zwischen Stathmin und auch der Aktivierung des TRPV1-Kanals augenscheinlich und ein interessantes Feld für weitergehende Untersuchungen.

Diese Parallelität weist auch neue Bedeutungen auf, die dem TRPV1-Kanal im Rahmen der Migration und der Metastasierung von Tumorzellen zukommt. So ist es denkbar, dass auch die Expression und die Aktivität des TRPV1-Kanals ähnlich dem Stathmin als prognostischer Faktor betrachtet werden könnte. Sollten sich die Vermutungen bestätigen, bietet der TRPV1-Kanal ein Feld für die Erforschung weiterer onkologischer Therapeutika.

5.2 Verminderte Zellmobilität bei extrazellulärer Azidose: Sind Integrine und HGF verantwortlich?

Ähnlich wie bei anderen Zellen, zeigt sich in dieser Arbeit auch bei HepG2-Zellen eine Abhängigkeit der migratorischen Aktivität von der extrazellulären Protonenkonzentration mit einer deutlichen Verminderung bei pH_e 6,5. Dies ist unabhängig von der Stimulation des TRPV1-Kanals zu beobachten.

Die bei saurem pH gemessene Abnahme der migratorischen Aktivität könnte bei HepG2-Zellen mit einer verstärkten Bindung an die extrazelluläre Matrix über $\alpha 2\beta 1$ -Integrine erklärt werden. In den von Waning (WANING *et. al.* 2007) durchgeführten Experimenten zeigte sich die durch TRPV1-Aktivierung stimulierte Migration der HepG2-Zellen abhängig von der Anwesenheit von HGF. Die Rolle, die das durch Endothelzellen ausgeschüttete Zytokin HGF dabei spielt, ist bisher unklar. Diskutiert werden zum einen eine Aktivitätssteigerung von Kaliumkanälen, die über eine hyperpolarisiertes Membranpotential zu einem vermehrten Einstrom von (positiv geladenen) Kalziumionen führen. Außerdem durch eine durch HGF hervorgerufene vermehrte Expression von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin in HepG2-Zellen. Diese führt über eine vermehrte Bindung an Kollagen I zu einer Abnahme des Wanderungsverhaltens der Zellen (KAWAKAMI-KIMURA *et. al.* 1997). Die Bindung von

$\alpha 2\beta 1$ -Integrin an Kollagen I weist eine Abhängigkeit vom extrazellulären pH auf (EBLE & TUCKWELL 2003). Gerade bei niedrigem extrazellulärem pH-Wert, wie in den Experimenten bei pH_e 6,5, scheint diese verstärkte Bindung einen maßgeblicheren Einfluss auf das Migrationsverhalten haben, als die möglichen stimulierenden Effekte durch die TRPV1-Kanal-Aktivierung. Somit kann der fehlende stimulierende Effekt der Kanalaktivierung auf die Migration bei pH_e 6,5 erklärt werden.

Diese Interpretation wird durch Beobachtungen an Melanomzellen gestützt, bei denen ebenfalls eine pH_e -abhängige, $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-vermittelte Migration gezeigt wurde (STOCK *et. al.* 2005). Hier ist insbesondere die Ähnlichkeit auffällig, die die Translokations- und Geschwindigkeitskurven abhängig vom extrazellulären pH-Wert aufweisen.

5.3 Veränderungen der Kanalsensibilität durch einen niedrigen pH_e

Die von Waning *et al.* beschriebene Stimulation des Migrationsverhaltens von HepG2-Zellen durch Aktivierung des TRPV1-Kanals mittels Capsaicin konnte in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden. Ich konnte in meinen Experimenten zeigen, dass der stimulierende Effekt der TRPV1-Kanalaktivierung auf die Migration vom extrazellulären pH abhängig ist. Der TRPV1-Kanal kann somit verschiedene auf die Zelle einfließende Stimuli – wie eine Ligandenbindung und den extrazellulären pH-Wert – in abgestufte migratorische Aktivität umsetzen.

Die Kanalaktivierung durch den Liganden Capsaicin beeinflusst die Migrationsmaschinerie einer Zelle über den Einstrom von Kalzium. Eine zunehmende Azidose des Extrazellulärraumes erniedrigt die für eine Aktivierung des Kanals nötige Konzentration an Capsaicin deutlich, die Sensibilität des Kanals wird erhöht (TOMINAGA *et. al.* 1998 und CATERINA *et. al.* 1997). Eine Verminderung des extrazellulären pH von 7,5 auf 7,2 könnte somit zu einer vermehrten Kanalaktivierung und einem vermehrtem Einstrom von Kalziumionen in die Zelle mit einer folgenden Stimulation der Migration mit sich bringen. Bei weiter sinkendem extrazellulärem pH vermindert sich allerdings die Zunahme der

Translokation im Vergleich zu den Kontrollzellen, sie ist bereits bei pHe 7,2 maximal.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht endgültig geklärt werden, über welche Einflussfaktoren und Effektoren die TRPV1-Aktivierung Zellmigration stimuliert. Auch in Zusammenhang mit den in unserem Institut zuvor erfolgten Arbeiten zeigt sich in dieser Arbeit jedoch, dass gerade die letztgenannten Einflussfaktoren pH_e -abhängige Integrinbindung und Kanalsensibilisierung das Migrationsverhalten entscheidend modulieren. Bei pH_e 6,5 scheint eine durch das niedrige pH_e verstärkte Integrinbindung zu einer deutlichen Abnahme des Wanderungsverhaltens der Zelle zu führen, bei zunehmendem pH_e 7,0 und pH_e 7,2 nimmt dann am ehesten der zunehmende Kalziumeinstrom in die Zelle durch die vermehrte Kanalstimulation entscheidenden Einfluss auf die Stimulation der Migration. Der TRPV1-Kanal ist in der Lage, verschiedene Stimuli verarbeiten zu können und abhängig davon die Migration zu modulieren.

Die in der Arbeit gefundenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der TRPV1-Kanal über die Modifikation des Mikrotubulusskeletts Einfluss auf das Migrationsverhalten und die Migrationsmorphologie von HepG2 Zellen nehmen kann. Gerade durch Kanalaktivierung hervorgerufene Veränderungen der Migrationsmorphologie und die Bedeutung filopodiale Strukturen zeigen in diesem Bereich ein spannendes Feld zukünftiger Forschungen.

6 Literaturverzeichnis

01. Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Hinz B, Inhof BA (2000) Actin dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control directed cell migration. *Mol Biol Cell* **11**, 2999-3012.
02. Baudoin JP, Alvarez C, Gaspar P, Métin C (2008) Nocodazole-induced changes in microtubule dynamics impair the morphology and directionality of migrating medial ganglionic eminence cells. *Dev Neurosci* **30 (1-3)**, 132-143.
03. Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Berton S, Lovat F, Wolf K, Canzonieri V, D'Andrea S, Zucchetto A, Friedl P, Colombatti A, Baldassarre G (2008) Stathmin Activity Influences Sarcoma Cell Shape, Motility, and Metastatic Potential.. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 2003-2013.
04. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 517-529.
05. Bershadsky A, Chausovsky A, Becker E, Lyubimova A & Geiger B (1996) Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol* **6**, 1279-1289.
06. Bode AM, Cho YY, Zheng D, Zhu F, Ericson ME, Ma WY, Yao K, Dong Z (2009) Transient receptor potential type vanilloid 1 suppresses skin carcinogenesis. *Cancer Res* **69**, 905-913.
07. Brakebusch C & Fässler R (2003) The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J* **22**, 2324-2333.
08. Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA, Fay FS (1991) Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* **254**, 703-706.
09. Carafoli E (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**,1115-1122.
10. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD & Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824.
11. Cheng H, Lederer WJ (2008) Calcium sparks. *Physiol Rev* **88**, 1491-1545.

12. Clark K, Langeslag M, van Leeuwen B, Ran L, Ryazanov AG, Figdor CG, Moolenaar WH, Jálínk K & van Leeuwen FN (2006) TRPM7, a novel regulator of actinomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO J* **25**, 290-301.
13. Curmi PA, Noguès C, Lachkar S, Carelle N, Gonthier MP, Sobel A, Lidereau R, Bièche I (2000) Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours. *Br J Cancer* **82 - 1**, 142-150.
14. Doyle AD, Lee J (2005) Cyclic changes in keratocyte speed and traction stress arise from Ca²⁺-dependent regulation of cell adhesiveness. *Jour Cell Sci* **118 (2)**, 369-379.
15. Dreval V, Dieterich P, Stock C, Schwab A (2005) The role of Ca²⁺ transport across the plasma mebrane for cell migration. *Cell Physiol Biochem* **16**, 119-126.
16. Eble JA, Tuckwell DS (2003) The alpha2beta1 integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin alpha2 subunit proximal to the collagen-binding site. *Biochem J* **376**, 77-85.
17. Enomoto T (1996) Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct Funct* **21**, 317-326.
18. Etienne-Manneville S (2004) Actin and microtubules in cell motility: Which one is under control? . *Traffic* **5**, 470-477.
19. Etienne-Manneville S, Manneville JB, Nicholls S, Ferenczi MA, Hall A (2005) Cdc42 and Par6-PKCz regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *Journal of Cell biology* **170**, 895-901.
20. Evans JH & Falke JJ (2007) Ca²⁺ influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 16176-16181.
21. Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG (2005) Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* **7**, 581-590.
22. Fabian A, Fortmann T, Dieterich P, Riethmÿller C, Schšn P, Mally S, Nilius B, Schwab A (2008) TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells. *Pflugers Arch* **457**, 475-484.

23. Franco SJ et al (2004) Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature Cell Biol* **6**, 977-983.
24. Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362-374.
25. Friedl P, Wolf K (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* **188 - 1**, 11-19.
26. Goswami C, Dreger M, Janel R, Bogen O, Gillen C & Hucho F (2004) Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *J Neurochem* **91**, 1092-1103.
27. Goswami C, Dreger M, Otto H, Schwappach B & Hucho F (2006) Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *J Neurochem* **96**, 254-266.
28. Goswami C, Hucho T (2008) Submembrane microtubule cytoskeleton: biochemical and functional interplay of TRP channels with the cytoskeleton. *FEBS Jour* **275**, 4684-4699.
29. Goswami C, Hucho T (2007) TRPV1 expression-dependent initiation and regulation of filopodia. *J Neurochem* **103**, 1319-1333.
30. Goswami C, Hucho TB & Hucho F (2007) Identification and characterisation of novel tubulin-binding motifs located within the C-terminus of TRPV1. *J Neurochem* **101**, 250-262.
31. Goswami C, Schmidt H & Hucho F (2007) TRPV1 at nerve endings regulates growth cone morphology and movement through cytoskeleton reorganization. *FEBS J* **274**, 760-772.
32. Gundersen GG & Bullinski JC (1988) Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 5946-5950.
33. Gundersen GG, Gomes ER & Wen Y (2004) Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 106-112.
34. Hall A (2009) The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **1 - 2**, 5-14.
35. Han P, Mc Donald HA, Bianchi BR, Kouhen RE, Vos MH, Jarvis MF, Faltynek CR & Moreland RB (2007) Capsaicin causes protein synthesis inhibition and

- microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochem Pharmacol* **73**, 1635-1645.
36. Henley J, Poo MM (2004) Guiding neuronal growth cones using Ca²⁺ signals. *Trends Cell Biol* **14**, 320-330.
37. Honore S, Pasquier E, Braguer D (2005) Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* **62**, 3039-3056.
38. [http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=78\(Stand 05.10.11\)](http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=78(Stand 05.10.11)).
39. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Ch CJ, et al (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 8400-8405.
40. Jahnel R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurreck J & Hucho F (2001) Biochemical characterizations of the vanilloid receptor I in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur J Biochem* **268**, 5489-5496.
41. Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J & Greenberg DA (2004) Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **66**, 204-208.
42. Job D, Fischer EH & Margolis RL (1981) Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 4679-4682.
43. Karai LJ, Russell JT, Iadarola MJ, Olah Z (2004) Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons. *J Biol Chem* **279**, 16377-16378.
44. Karr TL, Kristofferson D & Purich DL (1980) Mechanism of microtubule depolymerisation. Correlation of rapid induced disassembly experiments with a kinetic model for endwise depolymerisation. *J Biol Chem* **255**, 8560-8566.
45. Kaverina I, Krylyshkina O & Small JV (1999) Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* **146**, 1033-1044.
46. Kawakami-Kimura N, Narita T, Ohmori K, Yoneda T, Matsumoto K, Nakamura T, Kannagi R (1997) Involvement of hepatocyte growth factor in increased integrin expression on HepG2 cells triggered by adhesion to endothelial cells. *Br J Cancer* **75 - 1**, 47-53.

-
47. Kiselyov K, Soyombo A & Muallem S (2007) TRP-pathies. *J Physiol* **578**, 641-653.
 48. Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**, 497-499.
 49. Komuro H, Kumada T (2005) Ca²⁺ transients control cns neuronal migration. *Cell calcium* **37**, 387-393.
 50. Krendel M, Zenke FT & Bokoch GM (2002) Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nature Cell Biol* **4**, 294-301.
 51. Krähling H, Mally S, Schwab A, Stock C (2009) Relevance of N-glycosidic linkages of the glycocalyx for cell migration. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **458**, 1069–1083.
 52. Kurosaka S, Kashina A (2008) Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Res C Embryo Today* **84**, 102-122.
 53. Lanbergen G & Akhmanova A (2006) Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic* **7**, 499-507.
 54. Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-369.
 55. Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B & Jacobson K (1999) Regulation of cell movements is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* **400**, 382-386.
 56. Lehenkari PP, Horton MA (1999) Single integrin molecule adhesion forces in intact cells measured by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 645-650.
 57. Li R, Gundersen GG (2008) Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 860-873.
 58. Liao G, Nagasaki T, Gundersen G (1995) Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci* **108**, 3473-3483.
 59. Lieuvain A, Labbé JC, Dorée M & Job D (1994) Intrinsic microtubule stability in interphase cells. *J Cell Biol* **124**, 985-996.

-
60. Lishko PV, Procko E, Jin X, Phlebs CD & Gaudet R (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**, 905-918.
 61. Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ & Roufogalis BD (2004) Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* **35**, C490-C495.
 62. Martin C, Pedersen SF, Schwab A, Stock C (2011) Intracellular pH gradients in migration cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, 471-478
 63. McMahon SB, Lewin G & Bloom SR (1991) The consequences of long-term topical capsaicin application in the rat. *Pain* **44**, 301-310.
 64. Miao X, Liu G, Xu X, Xie C, Sun F, Yang Y, Zhang T, Hua S, Fan W, Li Q, Huang S, Wang Q, Liu G, Zhong D (2008) High expression of vanilloid receptor-1 is associated with better prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **186**, 25-32.
 65. Minke B (1977) *Drosophila* mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* **3**, 59-64.
 66. Mogliner A, Oster G (2003) Polymer motors: pushing out the front and pulling up the back. *Curr Biol* **13**, R712-R733.
 67. Mohapatra DP & Nau C (2005) Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **280**, 13424-13432.
 68. Mohapatra DP & Nau C (2003) Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem* **278**, 50080-50090.
 69. Munevar S, Wang YL, Dembo M (2004) Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated Ca²⁺-entry. *J Cell Sci* **117**, 85-92.
 70. Mycielska ME, Djymgoz MB (2004) Cellular mechanisms of direct current electric field effects: galvanotaxis & metastatic disease. *J Cell Sci* **117**, 1631-1639.
 71. Niggli V (2003) Microtubule-disruption-induced and chemotactic-peptide-induced migration of human neutrophils: implications for differential sets of signalling pathways. *J Cell Sci* **5**, 813-822.

-
72. Nilius B, Owsianik G, Voets T & Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* **87**, 165-217.
 73. Nilius B, Voets T (2005) TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* **451**, 1-10.
 74. Nogales E (1999) A structural view of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* **56**, 133-142.
 75. Palazzo AF et al (2001) Cdc42, dynein and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol* **11**, 1536-1541.
 76. Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Macrantonio EE, Gundersen GG (2004) Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signalling. *Science* **303**, 836-839.
 77. Pettit E, Fay FS (1998) Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leucocyte chemotaxis. *Physiol Rev* **78**, 949-967.
 78. Prevarskaya N, Zhang L & Barritt G (2007) TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 937-946.
 79. Price LS et al (2003) Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J Biol Chem* **278**, 39413-39421.
 80. Ren XD, Kiosses WB, Schwarzt MA (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* **18**, 578-585.
 81. Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M & Gordon SE (2004) Ca²⁺ / calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* **123**, 53-62.
 82. Rottner K, Hall A, Small JV (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* **9**, 640-648.
 83. Sahai E, Marshall C J (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**, 711-719.
 84. Salaycik KJ, Fagerstrom CJ, Murthy K, Tulu US, Wadsworth P (2005) Quantification of microtubular nucleation, growth and dynamics in wound edge cells. *J Cell Sci* **118**, 5691-5698.

-
85. Schwab A, Finsterwalder F, Kersting U, Danker T, Oberleithner H (1997) Intracellular Ca²⁺-distribution in migration transformed epithelial cells. *Pflugers Arch* **434**, 70-76.
86. Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, Stock C (2007) Cells move when ions and water flow. *Pflugers Arch* **453**, 421-432.
87. Schwab A, Wulf A, Schulz C, Kessler W, Nechyporuk-Zloy V, Ršmer M, Reinhardt J, Weinhold D, Dieterich P, Stock C, Hebert SC (2006) Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *J Cell Physiol* **206**, 86-94.
88. Small JV, Geiger B, Kaverina I, Bershadsky A (2002) How do microtubules guide migrating cells?. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 957-964.
89. Solecki DJ, Model L, Gaetz J, Kapoor TM & Hatten ME (2004) Par6alpha signalling controls glia guided neuronal migration. *Nature Neurosci* **7**, 1195-1203.
90. 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.
91. 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.
92. Stock C, Mueller M, Kraehling H, Mally S, Noel J, Eder C, Schwab A (2007) pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells. *Cell Physiol Biochem* **20**, 679-686.
93. Stock C, Schwab A (2009) Protons make tumor cells move like clockwork. *Eur J Physiol* **458**, 981-992.
94. Stock C, Schwab A (2006) Role of the Na/H exchanger NHE1 in cell migration. *Acta Physiol* **187**, 149-157.
95. Stossel TP, Fenteany G & Hartwig JH (2006) Cell surface actin remodeling. *J Cell Sci* **119**, 3261-3264.
96. Stüwe L, Muller M, Fabian A, Waning J, Mally S, Noel 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.

-
97. Takesono A, Heasman SJ, Wojciak-Stothard B, Garg R, Ridley AJ (2010) Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. *PLoS One* **5 - 1**, e8774.
98. Tominaga M & T (2005) Structure and function of TRPV1. *Eur J Physiol* **451**, 143-150.
99. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531-543.
100. Toomre D, Keller P, White J, Olivo JC & Simons K (1999) Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* **112**, 21-33.
101. Turner H, Fleig A, Stokes A, Kinet JP, Penner R (2003) Discriminating of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 release channel activity. *Biochem J* **371**, 341-350.
102. Van Haastert PJ, Keizer-Gunnink I & Kortholt A (2007) Essential role of PI3-Kinase and phospholipase A2 in *Dictyostelium discoideum* chemotaxis. *J Cell Biol* **177**, 809-816.
103. Vasilev JM, Gelfand IM, Domnina LV, Ivanova OY, Komm SG & Olshevskaja LV (1970) Effect of colcemid on the locomotory behavior of fibroblasts. *J Embr Exp Morphol* **24**, 625-640.
104. Vasquez RJ, Howell B, Yvon AM, Wadsworth P, Cassimeris L (1997) Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* **8 - 6**, 973-985.
105. Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR (2005) Cell migration at a glance. *Jour Cell Sci* **118**, 4917-4919.
106. Vriens J, Janssens A, Prenen J, Nilius B, Wondergem R (2004) TRPV channels and modulation by hepatocyte growth factor/ scatter factor in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Cell Calcium* **36**, 19-28.
107. Wang JP, Tseng CS, Sun SP, Chen YS, Tsai CR & Hsu MF (2005) Capsaicin stimulates the non-store-operated Ca²⁺ entry but inhibits the store-operated Ca²⁺ entry in neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* **209**, 134-144.

108. Wang YL (1985) Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol* **101**, 597-602.
109. Waning J, Vriens J, Owsianik G, Stüwe L, Mally S, Fabian A, Frippiat C, Nilius B, Schwab A (2007) A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium* **42 - 1**, 17-25.
110. Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K (2005) Regulation of microtubules in cell migration. *Trends in Cell Biol* **15**, 76-83.
111. Waterman-Storer CM, Worthylake RA, Liu BP, Burridge K & Salmon ED (1999) Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* **1**, 45-50.
112. Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells: over and over and over again. *Nat Cell Biol* **4**, E97-E100.
113. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL (2011) Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Can* **11**, 671-677.
114. Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song LS, Cheng H (2009) Calcium flickers steer cell migration. *Nature* **457**, 901-905.
115. Weiner OD, et al (2002) A PIP3 an Rho GTPase-mediated positive feedback-loop regulates neutrophil polarity. *Nature Cell Biol* **4**, 509-513.
116. Westermann S & Weber K (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Net Rev Mol Cell Biol* **4**, 938-947.
117. Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Rentel M & Bourne HR (2005) Neutrophil microtubules suppress polarity and enhance directional migration. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 6884-6889.
118. Yamaguchi H, Wyckhoff J, Condeelis J (2005) Cell migration in tumors. *A Curr Opin Cell Biol* **17**, 559-564.
119. Yang S, Huang XY (2005) Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem* **280**, 27130-27137.
120. Zhu MX (2005) Multiple roles of calmodulin and other Ca²⁺-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch* **451**, 105-115.

