



# **Funktionale Charakterisierung von TRPC-Kanälen bei der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Lars Otto Lindemann

geb. in Berlin

September 2011

Dekan: Prof. Dr. Dirk Prüfer

Erster Gutachter: Prof. Dr. Albrecht Schwab

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eva Liebau

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2011

Tag der Promotion: 16.12.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Zellmigration.....	10
1.2 Der funktionale Mechanismus der Zellmigration .....	10
1.3 Chemotaxis .....	13
1.4 Calcium bei der Zellmigration .....	16
1.5 Die Familie der TRP-Kanäle .....	17
1.6 TRP-Kanäle bei der Zellmigration und Chemotaxis .....	19
1.7 Neutrophile Granulozyten als Teil des Immunsystems .....	21
1.8 Die Aktivierungskaskade bei der Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten .....	22
1.9 Ziel der Arbeit.....	25
<b>2 Material &amp; Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1 Zellkultur.....	27
2.2 Tiere.....	27
2.3 Isolierung neutrophiler Granulozyten der Maus .....	27
2.4 Aseptische Peritonitis .....	29
2.5 Preparation des „Peritonitis-Cocktails“ .....	29
2.6 <i>In vitro</i> Migrations-Assays .....	30
2.6.1 3D Chemotaxis Assay .....	30
2.6.2 Datenanalyse der Migrationsexperimente.....	31
2.7 $[Ca^{2+}]_i$ Messungen .....	31
2.8 Proteinbiochemische Methoden .....	33
2.8.1 Proteinbestimmung (BCA-Biuretreaktion) .....	33
2.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	33
2.8.3 Herstellung der Proteinlysate und Probenvorbereitung .....	35

---

2.8.4 Western Blot.....	36
2.8.5 Immundetektion .....	38
2.8.6 Lösungen Western Blot .....	40
2.9 Molekularbiologische Methoden .....	40
2.9.1 Gelelektrophorese .....	40
2.9.2 Extraktion genomischer DNA aus Gewebe .....	41
2.9.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	42
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
3.1 Phänotypen der TRPC1 <sup>-/-</sup> und TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäuse .....	46
3.2 <i>In vitro</i> Analyse fMLP-vermittelter <i>end-target</i> Chemotaxis .....	46
3.3 <i>In vitro</i> Analyse eines <i>ex vivo</i> Chemokin-Cocktails als intermediäres Chemokin.....	48
3.4 <i>In vitro</i> Analyse KC-vermittelter intermediärer Chemotaxis.....	52
3.5 <i>In vivo</i> Chemotaxis bei der Casein-induzierten Peritonitis .....	54
3.6 Messungen der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> Konzentration [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	56
3.7 Biochemische Charakterisierung der CXCR2-Expression und CXCR2-vermittelter Signalkaskaden.....	58
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>60</b>
4.1 TRPC1 reguliert fMLP-induzierte Chemotaxis .....	61
4.2 TRPC1 und TRPC6 regulieren intermediäre Chemotaxis .....	64
4.3 TRPC1 und TRPC6 als Teil CXCR2-vermittelter Signalkaskaden .....	68
<b>5 Ausblick .....</b>	<b>74</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>76</b>
<b>Anhang: Verwendete Chemikalien und Geräte .....</b>	<b>78</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>99</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>100</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>101</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Regulatoren der Polarität von migrierenden Zellen .....	12
<b>Abbildung 2:</b> Polarisierung neutrophiler Granulozyten .....	14
<b>Abbildung 3:</b> Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanal Familie .....	19
<b>Abbildung 4:</b> <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> .....	21
<b>Abbildung 5:</b> Aktivierungskaskade neutrophiler Granulozyten .....	24
<b>Abbildung 6:</b> Dichtezentrifugation zur Isolierung von Granulozyten aus Knochenmark .....	28
<b>Abbildung 7:</b> Isolierung des Peritonitis-Cocktails .....	29
<b>Abbildung 8:</b> ibidi Chemotaxis-Kammer .....	30
<b>Abbildung 9:</b> ibidi $\mu$ -Slide I .....	31
<b>Abbildung 10:</b> Molekulargewichtsstandard.....	34
<b>Abbildung 11:</b> Aufbau <i>Semidry</i> Western-Blot.....	37
<b>Abbildung 12:</b> Aufbau <i>Tank</i> Western-Blot.....	38
<b>Abbildung 13:</b> DNA-Marker nach Auftrennung in einem 1% Agarosegel.....	41
<b>Abbildung 14:</b> Lage der TRPC6 <sup>-/-</sup> -Primer innerhalb der TRPC6-Gensequenz.....	43
<b>Abbildung 15:</b> <i>In vitro</i> 3D Migration in fMLP Gradienten .....	47
<b>Abbildung 16:</b> <i>In vitro</i> 3D Migration in Peritonitis-Cocktail Gradienten .....	49
<b>Abbildung 17:</b> Chemotaxis in Peritonitis Cocktail Gradienten mit SB225002 und ABT-491 .....	50
<b>Abbildung 18:</b> <i>In-vitro</i> Chemotaxis in Peritonitis Cocktail Gradienten bei Inhibition des PAFR und CXCR2 .....	51
<b>Abbildung 19:</b> <i>In-vitro</i> 3D Migration in KC Gradienten .....	53
<b>Abbildung 20:</b> Anzahl Leukozyten und Neutrophiler im Blut.....	54
<b>Abbildung 21:</b> Pappenheim Färbung von Zellen aus Peritonitis Zeitreihe mit Casein .....	55
<b>Abbildung 22:</b> Anzahl Neutrophiler bei der Casein induzierten Peritonitis.....	56
<b>Abbildung 23:</b> Messungen der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> Konzentration [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	57
<b>Abbildung 24:</b> Western Blots mit Wildtyp und TRPC6 <sup>-/-</sup> Neutrophilen.....	59
<b>Abbildung 25:</b> Modell für die FPR-vermittelte Aktivierung von TRPC1 .....	63
<b>Abbildung 26:</b> <i>In-vitro</i> 3D Migration in KC Gradienten TRPC1 <sup>-/-</sup> .....	67
<b>Abbildung 27:</b> Modell für die CXCR2-vermittelte Aktivierung von TRPC6 .....	70
<b>Abbildung 28:</b> Modell für die CXCR2-vermittelte Aktivierung von TRPC1 .....	71

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Lösungen für die $[Ca^{2+}]_i$ Messung. ....	33
<b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung SDS Gel. ....	35
<b>Tabelle 3:</b> Lösungen für die $[Ca^{2+}]_i$ Messung. ....	36
<b>Tabelle 4:</b> Erstantikörper und Verdünnungen. ....	39
<b>Tabelle 5:</b> Zweitantikörper und Verdünnungen. ....	39
<b>Tabelle 6:</b> Western Blot Pufferlösungen. ....	40
<b>Tabelle 7:</b> DNA-Gelelektrophorese-Puffer und DNA-Agarosegel. ....	41
<b>Tabelle 8:</b> DNA Extraktionspuffer. ....	42
<b>Tabelle 9:</b> Auflistung eines <i>Taq</i> Standard-PCR Ansatzes. ....	43
<b>Tabelle 10:</b> Auflistung der verwendeten Oligonukleotid- <i>Primer</i> . ....	44
<b>Tabelle 11:</b> Auflistung der verwendeten Chemikalien und Kits. ....	78
<b>Tabelle 12:</b> Auflistung der verwendeten Geräte. ....	80

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	<i>Alpha</i>
Abb.	Abbildung
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumperoxidsulfat
$\beta$	<i>Beta</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bidest.	Bidestillatus
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C5a	<i>Complement Component 5</i>
C5aR	C5a-Rezeptor
ca.	<i>circa</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	zytosolische Calcium-Konzentration
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CCR	CC-Motiv Chemokin Rezeptor
Cdc42	<i>Cell Division Control Protein 42 Homolog</i>
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadrat-Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cPLA <sub>2</sub>	zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
CRAC	<i>Calcium Release Activated Calcium Channel</i>
Cu <sup>2+</sup>	zweiwertiges Kupferion
Cu <sup>1+</sup>	einwertiges Kupferion
CXCR2	CXC-Motiv Chemokin Rezeptor 2
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdesoxycholat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNP-HSA	<i>Dinitrophenylated Human Serum Albumin</i>
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DRF	<i>Diaphanous-related Formin</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-tetraazetische Säure
Ena	<i>enabled</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESL-1	E-Selektin Ligand 1
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FKS	fötales Kälberserum
fMLP	N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin
FPR	Formyl-Peptid Rezeptor
g	Gramm
γ	<i>Gamma</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
GROα	<i>Growth-regulated Oncogene α</i>
GTP	Guanosintriphosphat
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hsp27	<i>Heat Shock Protein 27</i>



---

ICAM	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
KC	Keratinozyten-abgeleitetes Chemokin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LFA-1	<i>Lymphocyte Function Associated Antigen-1</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	<i>Knockout</i>
L	Liter
LIX	<i>Lipopolysaccharide (LPS)-induced CXC Chemokine</i>
LTB <sub>4</sub>	Leukotriene B4
m	Milli
μ	Mikro
M	Molare Masse
mA	Milliampere
MAC-1	<i>Macrophage-1 Antigen</i>
MAPK	mitogenaktivierte-Proteinkinase
min	Minute
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
μg	Mikrogramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIP-2	<i>Macrophage Inflammatory Protein 2</i>
ml	Milliliter
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
μl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MS	multiple Sklerose

---

MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
mV	Millivolt
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
nM	Nanomolar
NP-40	Nonyl-Phenoxypolyethoxyethanol
p.a.	<i>per analysis</i>
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAFR	PAF-Rezeptor
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
$\text{PLA}_2$	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMN	polymorphnukleäre Zellen
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
$\text{PIP}_2$	Phosphatidylinositol (3,4)-Bisphosphat
$\text{PIP}_3$	Phosphatidylinositol (3,4,5) Trisphosphat
PSGL-1	P-Selektin Ligand 1
PTEN	Phosphatase und Tensin Homologon
Rac	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate</i>
RhoA	<i>Ras Homolog Gene Family A</i>
RhoG	<i>Ras Homolog Growth-related</i>
Rif	Rho in Filopodien
RNA	Ribonukleinsäure
ROCE	<i>Receptor Operated Calcium Entry</i>
ROCK	<i>Rho-associated Kinase</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

---

rpm	<i>Rounds Per Minute</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error Of The Mean</i>
SHIP1	<i>Src Homology 2 Domain-containing Inositol-5-phosphatase 1</i>
SOCE	<i>Store Operated Calcium Entry</i>
sog.	so genannt
STIM1	<i>Stromal Interaction Molecule</i>
s.u.	siehe unten
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Temed	Tetramethylethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VASP	<i>Vasodilator-stimulated Phosphoprotein</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
VVO	vesikulo-vaskuläres Organell
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WAVE	WASP-Familie Verprolin-homologes Protein
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellmigration

Der Begriff der Zellmigration umschreibt den Prozess der aktiven Fortbewegung von Zellen und vereint sowohl die ungerichtete als auch die gerichtete Bewegung. So sind migrierende Zellen, die sich mittels Flagellen fortbewegen, bei den *Prokaryota* genauso wie bei den *Eukaryota* zu finden. Bei den *Eukaryota* ist die Zellmigration nicht nur auf das Reich der Tiere beschränkt, sondern findet sich auch bei Algen, die sich teilweise mithilfe von Geißeln fortbewegen, genauso wie bei Pilzen, wobei *Dictyostelium* einen sehr häufig verwendeten Modell-Organismus für die Zellmigration darstellt (49). Zellen migrieren im menschlichen Körper bereits während der frühen Embryonalentwicklung bei der Ausdifferenzierung embryonaler Stammzellen zu spezialisierten Zellen, Geweben und Organen (167). Genauso kommt es auch im adulten Organismus ständig zu einer Migration von Zellen. Hier spielt die Zellmigration zum Beispiel bei der Wundheilung und bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle. Als Teil des Immunsystems sind Leukozyten in der Lage, aus dem Blutgefäßsystem heraus in entzündliches Gewebe zu migrieren und dort Pathogene oder infizierte Zellen zu zerstören. Migration bildet aber auch einen Teil pathophysiologischer Prozesse. So ist die Zellmigration Bestandteil der Metastasierung von Tumorzellen (161) und spielt zudem bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumathoiden Arthritis oder der multiplen Sklerose (MS) eine entscheidende Rolle (68; 79). Somit ist das Verständnis grundlegender Mechanismen der Zellmigration auch für den therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Krankheiten von entscheidender Bedeutung.

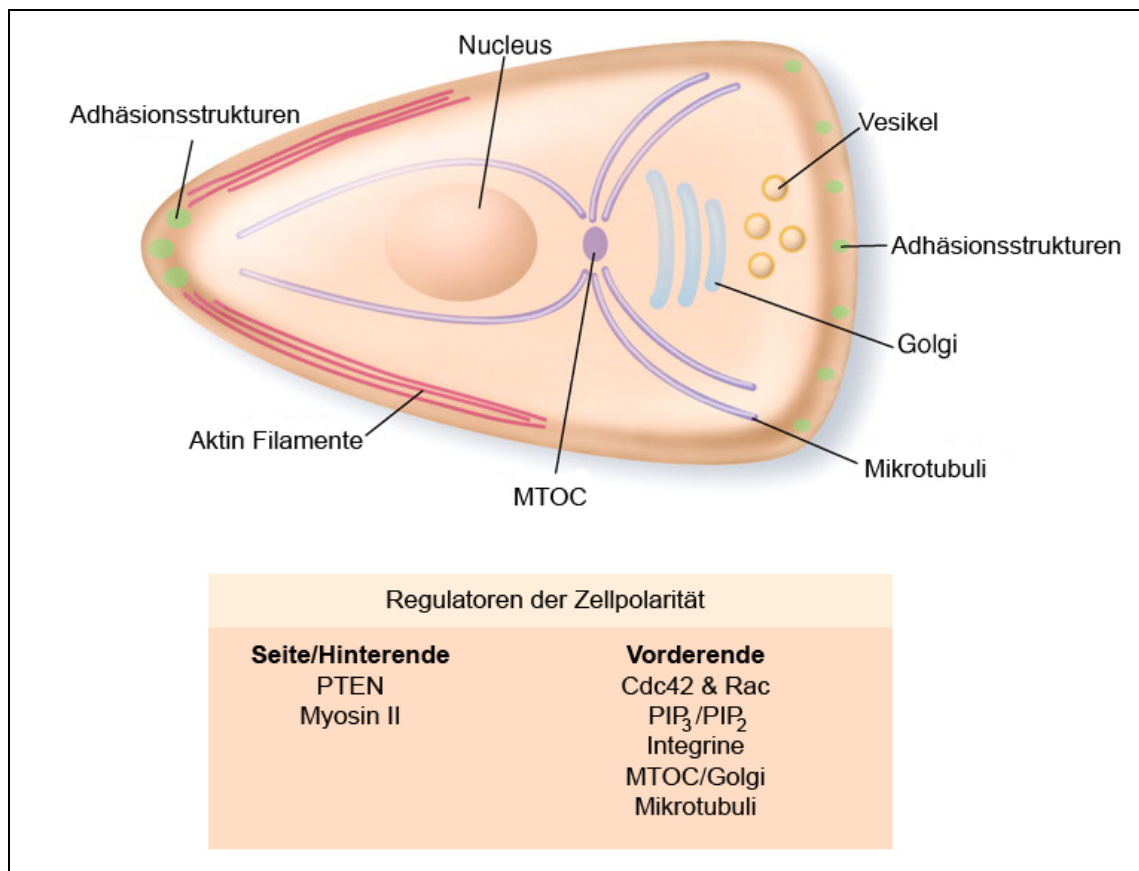
## 1.2 Der funktionale Mechanismus der Zellmigration

Ein fundamentales Attribut migratorischer Zellen ist ihre Polarität entlang der Bewegungsrichtung, wobei sich molekulare Prozesse am Vorderende der Zelle gegenüber denen am Hinterende unterscheiden (siehe Abb.1) (120; 135; 145). Das Vorderende der Zelle umschreibt einen ungefähr 200 nm dicken und nahezu Zellorganellen-freien Bereich, in dem Protrusionen in Bewegungsrichtung gebildet werden. Hier lassen sich lange, breite Lamellipodia von fadenförmigen, spitzen Filopodia unterscheiden (135; 156). Das Hinterende umfasst den Zellkern und das Uropodium (43). Grundlage für die Protrusion am Vorderende ist die Polymerisation von Aktin-Filamenten, wobei das Aktin in Filopodien in langen parallelen Bündeln von Filamenten und in Lamellipodien

eher netzwerkartig organisiert ist (183). Vermittelt wird die Aktin-Polymerisation in Lamellipodien über den Arp2/3 Komplex, der seinerseits über Mitglieder der WAVE/WASP (WASP-Familie Verprolin-homologes Protein / Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) Proteinfamilie aktiviert wird (183). In filopodialen Protrusionen scheinen dagegen Ena (*Enabled*) / VASP (*Vasodilator-stimulated Phosphoprotein*) und *Diaphanous-related* Formine (DRFs) eine wichtige Rolle zu spielen (80; 135; 156; 183). Die Familie der Rho Guanosin triphosphat (GTP) - bindenden Proteine (GTPasen) sind ebenfalls an der Bildung von Lamellipodien und Filopodien beteiligt. Forciert von RhoG (*Ras homolog Growth-related*) aktiviert Rac (*Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate*) WAVE Proteine und Cdc42 reguliert WASP Proteine, wodurch in Verbindung der Arp2/3 Komplex aktiviert wird (36; 88). Die Bildung von Filopodien wird unter anderem durch die Rho GTPasen Cdc42 (*Cell Division Control Protein 42 Homolog*) und Rif (Rho in Filopodien) reguliert (1). Cdc42 ist darüber hinaus an der Positionierung des Mikrotubuliorganisierenden Zentrums (MTOC) und des Golgi-Apparates beteiligt und beeinflusst damit zusätzlich die Richtung bei der Ausbildung von Protrusionen zum einen durch das Auswachsen von Mikrotubuli und zum anderen mit der Bildung neuen Membranmaterials sowie neuer Proteine für den Einbau am Vorderenden der migrierenden Zelle (11; 136).

Zwei weitere für die Polarisierung von migrierenden Zellen wichtige Zellbestandteile sind die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) und PTEN (Phosphatase und Tensin Homologon). Besonders bei der Chemotaxis, der gerichteten Migration entlang eines Gradienten von Chemoattraktanzien, ist es für Zellen entscheidend minimale Unterschiede bei der Chemokinkonzentration wahrnehmen zu können. Die PI3Ks spielen hier eine wichtige Rolle bei der Generierung und Verstärkung solcher Chemokin-Signale in intrazelluläre Gradienten. PI3Ks generieren Phosphatidylinositol (3,4,5) Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) aus Phosphatidylinositol (3,4)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) wogegen PTEN die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> katalysiert und so PI3K-generierte Signalkaskaden unterbricht (162; 166). Dabei ist die Aktivität von PTEN vorwiegend auf das Hinterende der Zelle beschränkt und somit tritt die Bildung von PIP<sub>3</sub>-Signalkaskaden über die PI3K vorwiegend im Lamellipodium auf (14; 71). Neben PTEN spielt die Phosphatase SHIP1 (*Src Homology 2 Domain-containing Inositol-5-phosphatase 1*) in neutrophilen Granulozyten ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Polarisierung (124). Darüber hinaus stimulieren RhoA (*Ras Homolog Gene Family A*) und die Effektor Kinase ROCK (*Rho-associated Kinase*) zusätzlich die Aktivität von PTEN am Hinterende der Zelle wodurch das PIP<sub>3</sub>-Signal zusätzlich auf das Vorderende der Zelle beschränkt wird (103; 111). PIP<sub>2</sub> initiiert auch die Aktin-Polymerisation und damit Protrusion des Lamellipodiums.

So reguliert  $\text{PIP}_2$  unter anderem die Aktivität des Arp2/3 Komplex und begünstigt damit das Auswachsen des Lamellipodiums (104; 189).



**Abbildung 1: Regulatoren der Polarität von migrierenden Zellen**

Verschiedene Zellbestandteile begünstigen die Polarität von migrierenden Zellen. Die Ausbildung eines Lamellipodiums wird unter anderem durch Rac und Cdc42 begünstigt, wobei Fokalkontakte das Festheften der Zellen am Substrat ermöglichen. So schiebt sich die migrierende Zelle bei der Vorwärtsbewegung über die Integrine. Am Hinterende werden diese Zell-Matrix-Interaktionen, katalysiert durch Calpaine, wieder gelöst und die Kontraktion des Aktomyosin-Netzwerkes ermöglicht das Nachziehen des Uropods [verändert nach (135)].

Damit eine Bewegung möglich wird, muss sich die Zelle bei Ausbildung der Protrusion am Untergrund stabilisieren. Integrine bilden die für diese Festheftung am Untergrund wichtigsten Adhäsionsstrukturen und sind hier zumeist in Fokalkontakten organisiert. Die aktivierten Integrine sind über Adapterproteine wie Talin oder Vinculin an das Zytoskelett gebunden und bilden bei Zellen die Adhäsionsanker für die Migration auf Extrazellulärer Matrix (EZM) oder benachbarten Zellen (179). Diese Adhäsionsstrukturen bilden die Ankerpunkte, über die sich die Zellen fortbewegen, bis sie sich am Hinterende der Zelle wieder von der Matrix lösen (99). Das Lösen von Zell-Matrix-Interaktion wird am Uropod von Mitgliedern der Familie der Calpaine, intrazellulären Proteasen, katalysiert (57). Die Kontraktion des Zell-Hinterendes und damit das Nachziehen des

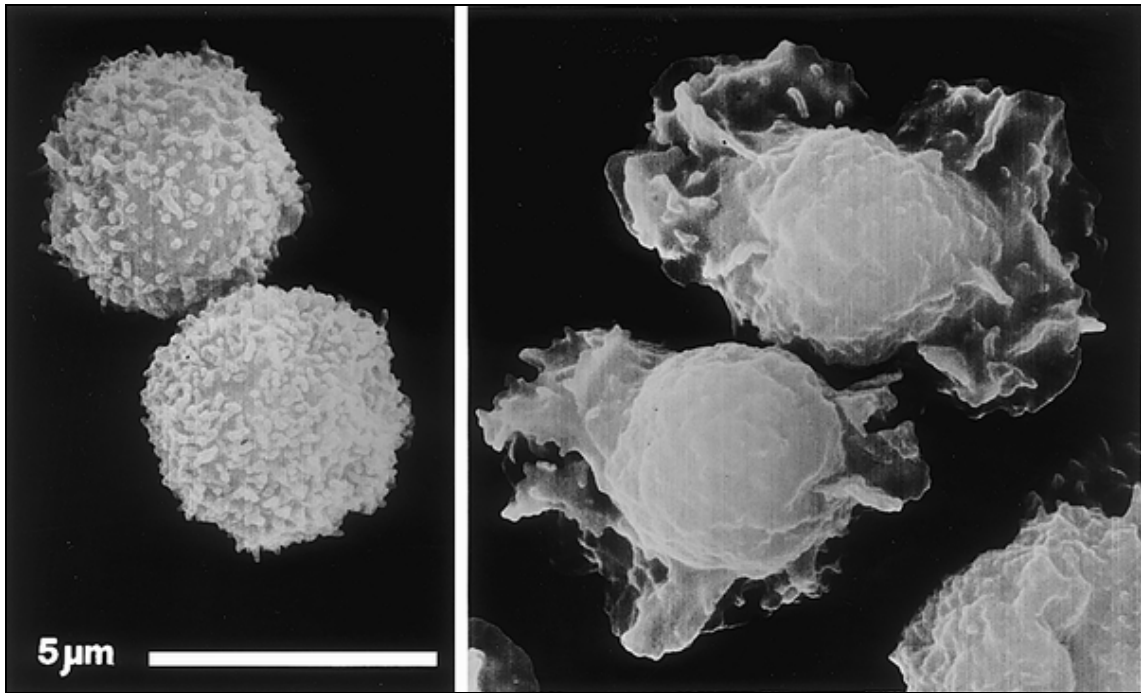
Uropods erfolgt über die Kontraktion des Aktomyosin-Netzwerkes, wobei die Aktivität von Myosin II von der Phosphorylierung der Myosin-leichten-Kette abhängt (48). Hierdurch erfolgt während des Migrationszyklus bei stetiger Protrusion und Festheftung an der Matrix am Zell-Vorderende auch eine Retraktion des Hinterendes bei gleichzeitigem Lösen der Zell-Matrix-Interaktionen.

Nicht jeder Zelltyp benötigt Integrine als Adhäsionsanker bei der Zellmigration. Für die zu den Immunzellen gehörenden neutrophilen Granulozyten wurden eine Integrin-unabhängige Migration in 3D Matrices mit enger Porengröße beschrieben (97). Hier scheint die Zugspannung am Vorderende durch Polymerisation des Aktins und damit die Bildung von Lamellipodien, die sich in der Matrix verankern, erzeugt zu werden. Die Myosin II - basierte Kontraktion des Zell-Hinterendes ermöglicht es dann, den Nucleus, das Zellorganell mit dem größten Durchmesser, durch enge Poren der Matrix zu drücken (97; 133).

### 1.3 Chemotaxis

Chemotaxis beschreibt die gerichtete Migration von Zellen entlang eines Gradienten von Chemoattraktanzien. Diese gerichtete Bewegung ermöglicht es Leukozyten, zum Herd einer Entzündung oder Infektion zu gelangen, Fibroblasten eine Wunde zu verschließen oder Neuronen synaptische Bindungspartner zu finden. Hierbei führen in jedem Fall die durch Chemoattraktantien induzierten, lokal begrenzten Signale in der Zelle zu einer Polarisierung und gerichteter Bewegung innerhalb eines Chemoattraktanz-Gradienten. Somit ist auch bei der Chemotaxis die Polarisierung von Zellen ein grundlegender Bestandteil (siehe Abb. 2). Migrierende Zellen müssen in einem Gradienten von Chemoattraktanzien minimale Änderungen der Konzentration wahrnehmen und ihre Bewegungsrichtung und damit auch Polarisierung dementsprechend ausrichten. Der Begriff Chemoattraktanzien umfasst in diesem Zusammenhang Lockstoffe verschiedener molekularer Struktur. Eine für die Chemotaxis von Immunzellen sehr wichtige Klasse innerhalb der Chemoattraktanzien umfasst die Gruppe der bakteriellen N-Formyl-Peptide. Sie werden in vivo von Bakterien sezerniert (148; 149) oder werden bei der Zersetzung von Zellen aus Mitochondrien frei (27). Hierbei bildet das N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin (fMLP) als Ligand für die Formyl-Peptid Rezeptoren (FPR) den wohl wichtigsten Vertreter aus dieser Gruppe (100; 125). Eine weitere wichtige Klasse von Chemoattraktanzien bildet die Gruppe der Chemokine. Chemokine bilden innerhalb der Zytokine eine Familie kleiner Proteine mit weitgehend homologer Struktur und werden nach dem Auftreten oder Fehlen einer Aminosäure zwischen den zwei ersten von vier konservierten Cystein-Bausteinen innerhalb der Aminosäurese-

quenz in die Gruppen der C-C- und C-X-C-Motiv Chemokine unterteilt (90; 138). Weitere Immunzellen aktivierende Klassen von Chemoattraktanzien bilden Lipidmediatoren wie Leukotriene (z.B.  $\text{LTB}_4$ ) oder der von Leukozyten sezernierte plättchenaktivierende Faktor (PAF) mit seinem Rezeptor PAFR (31; 55; 130; 139; 175) und Komplementfaktoren wie C5a (*Complement Component 5*) (40).



**Abbildung 2: Polarisierung neutrophiler Granulozyten**

Elektronenmikroskopische Aufnahme humaner neutrophiler Granulozyten vor (links) und 5 s nach Zugabe einer Chemoattraktanz (rechts) (6).

Die FPR, die C-C- und C-X-C-Rezeptoren (CCR und CXCR), der PAFR und der C5a-Rezeptor (C5aR) gehören alle zur Familie der G-Protein-gekoppelten 7 Transmembrandomänen umspannenden Rezeptoren (81; 87; 90; 125; 131; 178). Die Bindung der jeweiligen Chemoattraktanzien führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, was eine Aktivierung der G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit und Dissoziation des  $\beta\gamma$  G-Protein-Komplexes von der  $\alpha$ -Untereinheit ermöglicht. Nach Dissoziation von der  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert der  $\beta\gamma$ -Komplex die Phospholipase  $\text{C}\beta_2$  ( $\text{PLC}\beta_2$ ) und die Phosphoinositid-3-Kinase  $\gamma$  ( $\text{PI3K}\gamma$ ). Die Aktivierung der  $\text{PLC}\beta_2$  führt zu einer Hydrolyse von  $\text{PIP}_2$  zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ), was eine Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern generiert (siehe 1.4). Die Rolle der  $\text{PI3K}\gamma$  bei der Polarisierung von Zellen wurde in 1.2 bereits beschrieben. Auch in der Chemotaxis spielen die  $\text{PI3K}$  und ihre Signalprodukte eine sehr wichtige Rolle. So wurde mehrfach beschrieben, dass die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der  $\text{PI3K}$  eine Akkumulation von  $\text{PIP}_3$  am Vorderende der Zelle hervorruft (60; 69; 134). Die  $\text{PI3K}$ -vermittelten Sig-



nalkaskaden regulieren auf unterschiedlichen Wegen das Aktin-Zytoskelett. So führt die Generierung von  $\text{PIP}_3$  zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB oder Akt), die über Cofilin und Girdin die Polymerisierung von Aktin regulieren (191).  $\text{PIP}_3$  aktiviert darüber hinaus unter anderem über GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*) Rho GTPasen wie Rac und Cdc42, wodurch zusätzlich eine lokale Aktin-Polymerisation begünstigt wird (10; 59; 112). Dabei konnte aber auch gezeigt werden dass Rac und Cdc42 die Bildung von  $\text{PIP}_3$  begünstigen, was über eine positive Rückkopplungsschleife zu einer vermehrten Akkumulation von  $\text{PIP}_3$  führt und damit das Chemoattraktanz-Signal innerhalb der Zelle verstärkt wird (158; 176; 182). Allerdings ist bei der Chemotaxis von *Dictyostelium* auch eine gerichtete Migration ohne solche  $\text{PIP}_3$ -Gradienten in der Zelle möglich (75; 106). Bei neutrophilen Granulozyten konnte darüber hinaus gezeigt werden dass die Chemotaxis in fMLP-Gradienten PI3K-unabhängig ist und die Chemotaxis SHIP1-unabhängig verläuft (54; 70; 124). Hierbei wird angenommen, dass PI3K und  $\text{PIP}_3$  Gradienten in der Zelle zwar für die Motilität wichtig sind, für die fMLP-vermittelte Chemotaxis aber nicht notwendig sind (124). Dies verdeutlicht, dass es neben den PI3K- und PLC-generierten noch weitere, potentiell an der Chemotaxis beteiligte Signalwege geben muss. Auch für die Phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) konnte eine Chemoattraktanz-Rezeptor-generierte Aktivierung nachgewiesen werden (30; 32). Die  $\text{PLA}_2$  hydrolysiert Arachidonsäure aus Membranlipiden wie DAG und führt auf diesem Weg zu einer Mobilisierung von Calcium (siehe 1.4). Hierbei ist der regulatorische Mechanismus der Chemotaxis über die  $\text{PLA}_2$  allerdings noch weitgehend ungeklärt, obwohl eine direkte Beteiligung der  $\text{PLA}_2$  an der Chemotaxis bei Monozyten schon nachgewiesen werden konnte (26). Der mitogenaktivierte-Proteinkinase-(MAPK)-Weg stellt einen weiteren, bisher relativ unbeachteten, von Chemoattraktanz-Rezeptoren aktivierten Signalweg dar, der an der gerichteten Migration beteiligt ist (24). So konnte gezeigt werden dass die p38 mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK), ein Zwischenprodukt des MAPK-Weges, über das Heat-Shock Protein hsp27 unter anderem die Polymerisation von Aktin fördert und dabei selbst durch Rho-GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42 aktiviert werden kann (38; 107).

Chemoattraktanzien gliedern sich allgemein in zwei Gruppen (72): Intermediäre Chemoattraktanzien wie IL-8 werden vom Wirt selbst während einer Entzündungsreaktion produziert. Sie dienen dazu, Immunzellen zum Herd der Entzündung zu leiten und werden von Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten oder auch von Endothelzellen generiert. *End-target* Chemoattraktanzien beschreiben Lockstoffe, die aus Bakterien oder bei der Zerstörung von Zellen frei werden. Ein Beispiel hierfür ist das bakterielle fMLP. *End-target* Chemoattraktanzien leiten Immunzellen zum tatsächlichen Ursprung der Entzündung, sie sind also die finalen Lockstoffe. Hierbei

scheinen die Rezeptoren für *end-target* Chemoattraktanzien über Rezeptoren für intermediäre Chemoattraktanzien zu dominieren, wobei *end-target* Chemoattraktanzien vorwiegend den p38 MAPK-Signalweg und intermediäre Chemoattraktanzien eher den PI3K/PKB-Signalweg aktivieren (21; 56; 72). Zudem konnte hier auch eine verminderte Aktivität von Rezeptoren für intermediäre Chemoattraktanzien bei gleichzeitiger Stimulation von Rezeptoren für *end-target* Chemoattraktanzien nachgewiesen werden (154).

Die Regulation und Koordination der gerichteten Migration stellen somit einen hoch komplizierten Signalkomplex dar. Dass sich das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten je nach Zelltyp, verwendeten Chemoattraktanzien und Matrixstruktur während der Migration unterscheidet, macht es sehr schwierig, die genauen Zusammenhänge zu verstehen.

#### 1.4 Calcium bei der Zellmigration

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist einer der am häufigsten auftretenden sekundären Botenstoffe in Zellen.  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalkaskaden und Calcium-Bindungsproteine sind an nahezu allen zellulären Prozessen wie Muskelkontraktion, Genexpression, Zytokinese und Apoptose beteiligt (25). Auch Zellmigration ist ein Calcium-abhängiger Prozess. So bewirkt ein Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  die Calpain-induzierte Remodellierung Integrin-vermittelter Zell-Matrix-Interaktionen (28; 57; 64) und die Phosphorylierung der Myosin-leichten-Ketten-Kinase (MLCK) (9; 48; 94). In Kombination führt dies zu der Retraktion des Zell-Hinterendes während des Migrationszyklus. Weiterhin aktiviert ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  die Aktin-Bindungsproteine Gelsolin und Cofilin (143). Beide Proteine katalysieren die Depolymerisation von Aktinfilamenten. Aus diesen beiden Funktionen entwickelte sich ein grundlegendes Modell zu der Signalverteilung von  $\text{Ca}^{2+}$  während der Zellmigration. Hiernach etabliert sich in migrierenden Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient über die gesamte Zelle mit einer niedrigen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  am Lamellipodium und ansteigender  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  entlang des Zellkörpers mit der höchsten Konzentration am Uropod (19; 152).

Dagegen konnte aber gezeigt werden, dass auch am Vorderende der Zelle viele für die Polarisierung und Chemotaxis von Zellen wichtige Prozesse  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig sind. So begünstigt  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes Calmodulin die Clusterung von  $\text{PIP}_2$  innerhalb der Zellmembran (109).  $\text{PIP}_2$  und Cdc42 aktivieren gemeinsam WASP, was wiederum die Polymerisierung von Aktin fördert (92; 137). Die Aktivierung von Chemoattraktanz-Rezeptoren führt allgemein auch zu einer Aktivierung der  $\text{PLC}\beta_2$  und PI3K (22; 163). Die  $\text{PLC}\beta_2$  hydrolysiert  $\text{PIP}_2$  zu  $\text{IP}_3$  und DAG (126).  $\text{IP}_3$  als Spaltprodukt der  $\text{PLC}\beta_2$  führt zu einer Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (12) und

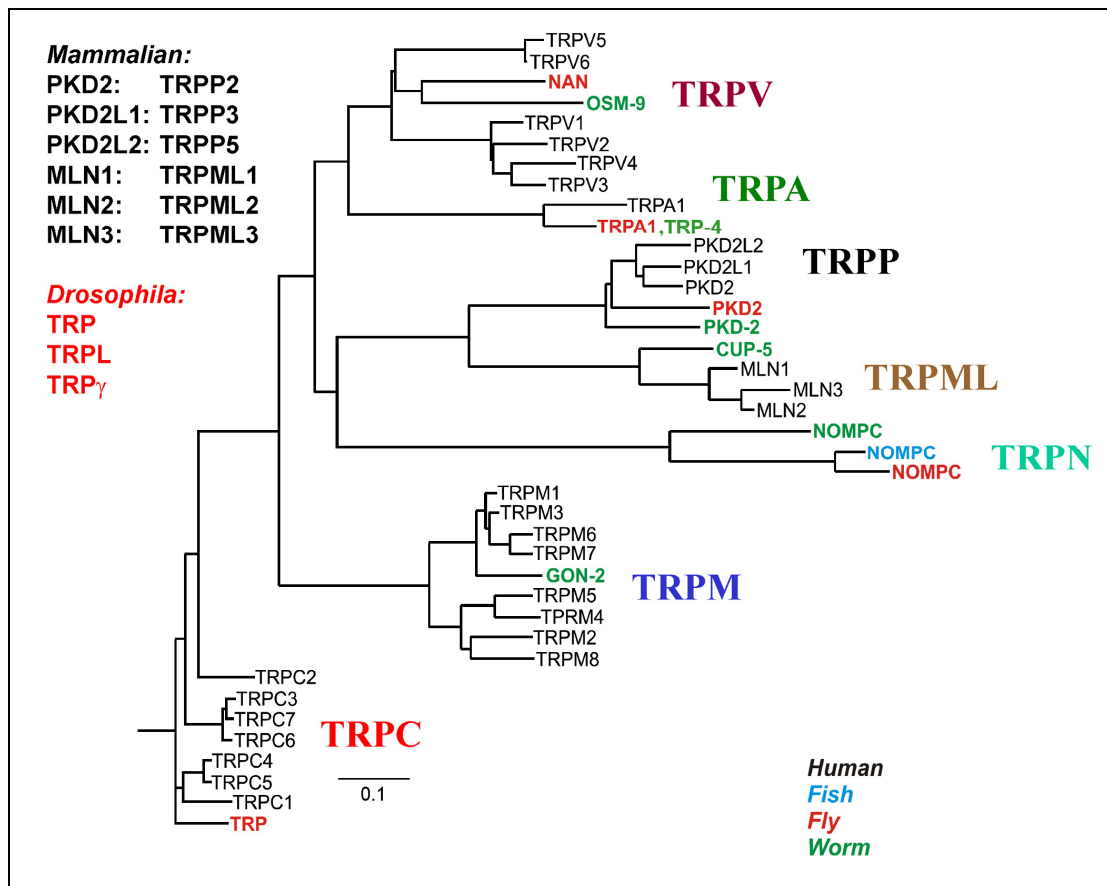
das von der PLC $\beta_2$  generierte DAG aktiviert den Einstrom von extrazellulärem Ca $^{2+}$  über Ionenkanäle (66). Diese Mobilisierung von Calcium führt zusammen mit der Bindung von DAG zu einer Aktivierung von Isoformen der Protein Kinase C (PKC) (82). Auch für PIP $_3$  konnte eine Aktivierung verschiedener PKC-Isoformen nachgewiesen werden (121; 160). Bei der Zellmigration scheint die PKC einen positiven Einfluß auf die Integrin-vermittelte Adhäsion und die Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts zu haben (13; 98). Auch die PLA $_2$  ist an der Rezeptor-vermittelten Ca $^{2+}$ -Mobilisierung beteiligt. Einige Isoformen der PLA $_2$  wie die zytosolische PLA $_2$  (cPLA $_2$ ) bewegen sich Ca $^{2+}$ -abhängig zu perinukleären Membranen des endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparates und katalysieren hier die Bildung von Arachidonsäure aus Phosphoglyceriden wie OAG (171; 186). Derivate der Arachidonsäure wie das 20-HETE (20-Hydroxyeicosatetraensäure) aktivieren Ca $^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran und begünstigen so den Einstrom von extrazellulärem Ca $^{2+}$  (8).

Aktuelle Daten weisen darauf hin, dass diese Ca $^{2+}$ -abhängigen Prozesse an der Zell-Front offensichtlich durch dynamische Mikro-Domänen von [Ca $^{2+}$ ] $_i$  mit hoher Konzentration reguliert werden, wobei Wei et. al. TRPM7 als den für diese [Ca $^{2+}$ ] $_i$  Mikro-Domänen verantwortlichen Ca $^{2+}$ -Kanal identifizieren konnten (180; 181).

## 1.5 Die Familie der TRP-Kanäle

Die Familie der *Transient Receptor Potential* (TRP) – Kanäle wurde ursprünglich 1969 von Cosens und Manning in Photorezeptorzellen von *Drosophila* entdeckt (37; 115). Die Phototransduktionskaskade von *Drosophila* wird durch Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rhodopsin-Rezeptors initiiert, was zu einer Aktivierung der PLC und einem Einstrom von Kationen in die Rezeptorzelle führt (118). Mutationen im *trp*-Lokus führten zu einer transienten Rezeptorantwort in Verbindung mit einem deutlich verminderten Ca $^{2+}$ -Einstrom. Das für diesen Effekt verantwortliche Protein wurde erst 20 Jahre später entdeckt und bildet als TRPL (TRP-*like*) den ursprünglichsten Kanal innerhalb der TRP-Kanal Familie (118). Die Familie der TRP-Kanäle gliedert sich in 7 Unterfamilien: TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML, TRPN. Mit Ausnahme der TRPN-Kanäle werden alle Familien innerhalb der Säugetiere exprimiert (174). Alle TRP-Kanäle sind homo- oder heterotetramere Proteine, wobei jede Untereinheit 6 Transmembrandomänen mit einem zytosolischen N- und C-Terminus aufweist. TRP-Kanäle vermitteln den Einstrom vorwiegend von Na $^+$  und Ca $^{2+}$  in die Zelle und spielen durch die resultierende Depolarisation der Zelle eine Rolle beim visuellen System, Tastsinn, Geschmack, Geruchssinn, Gehör sowie der Thermo- und Osmosensorik (174).

Bei der Aktivierung von TRP-Kanälen lassen sich drei Wege unterscheiden (132). (I) Die Liganden-gesteuerte Aktivierung wird über (a) kleine organische Moleküle wie Capsaicin (einem Aktivator des TRPV1), über (b) endogene Lipide oder Teile von Lipidmetabolismen wie DAG oder 20-HETE, über (c) purine Nukleotide wie Adenosin-Diphosphoribose oder über (d) anorganische Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  katalysiert. (II) Die direkte Aktivierung kann über Phosphorylierung, mechanische Aktivierung oder Hitze (TRPV1-3, TRPM8) erfolgen. (III) Die Aktivierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosinkinasen wird zumeist über die PLC vermittelt. Hierbei kann es zu einer Kanal-Aktivierung über das PLC-Spaltprodukt DAG (*Receptor Operated Calcium Entry*, ROCE) oder über die  $\text{IP}_3$ -vermittelte Entleerung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern (*Store Operated Calcium Entry*, SOCE) kommen. Beim SOCE führt die Bindung von  $\text{IP}_3$  an den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor an der ER-Membran zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom vermittelt eine Verlagerung eines weiteren ER-Membranproteins STIM1 (*Stromal Interaction Molecule*) in Plasmamembran-nahe Bereiche der ER-Membran. Hier kommt es zu einer Interaktion mit Orai-Kanalprotein-Untereinheiten, was zu der Formation eines CRAC-Kanals (*Calcium Release Activated Calcium Channel*) führt (77; 173). Bei diesem CRAC-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom spielen möglicherweise TRP-Kanäle als Untereinheiten des CRAC-Kanals eine Rolle, allerdings wird der Beitrag von TRP-Kanälen zum SOCE kontrovers diskutiert (3; 42; 129; 187; 190).



**Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanal Familie**

Die Familie der TRP-Kanäle gliedert sich in 7 Unterfamilien, davon werden 6 Familien in Säugtieren exprimiert. Die TRPC-Kanal Familie bildet die ursprünglichste Gruppe und ist am nächsten mit dem zuerst in *Drosophila* entdeckten TRP-Kanal verwandt (123).

Die Unterfamilie der klassischen oder kanonischen TRPC-Kanäle bildet die phylogenetisch ursprünglichste und mit dem von Cosens und Manning entdeckten TRP-Kanal am nächsten verwandte Gruppe innerhalb der TRP-Familie (siehe Abb. 3). Innerhalb der Unterfamilie der TRPC-Kanäle werden 7 weitere Gruppen unterschieden: TRPC1-7. Hierbei weisen der TRPC3, TRPC6 und der TRPC7 mit 70-80% die größte Sequenzhomologie auf, TRPC4 und TRPC5 sind zu 65% identisch und der TRPC1 und der TRPC2 sind nahezu einzigartig (44).

## 1.6 TRP-Kanäle bei der Zellmigration und Chemotaxis

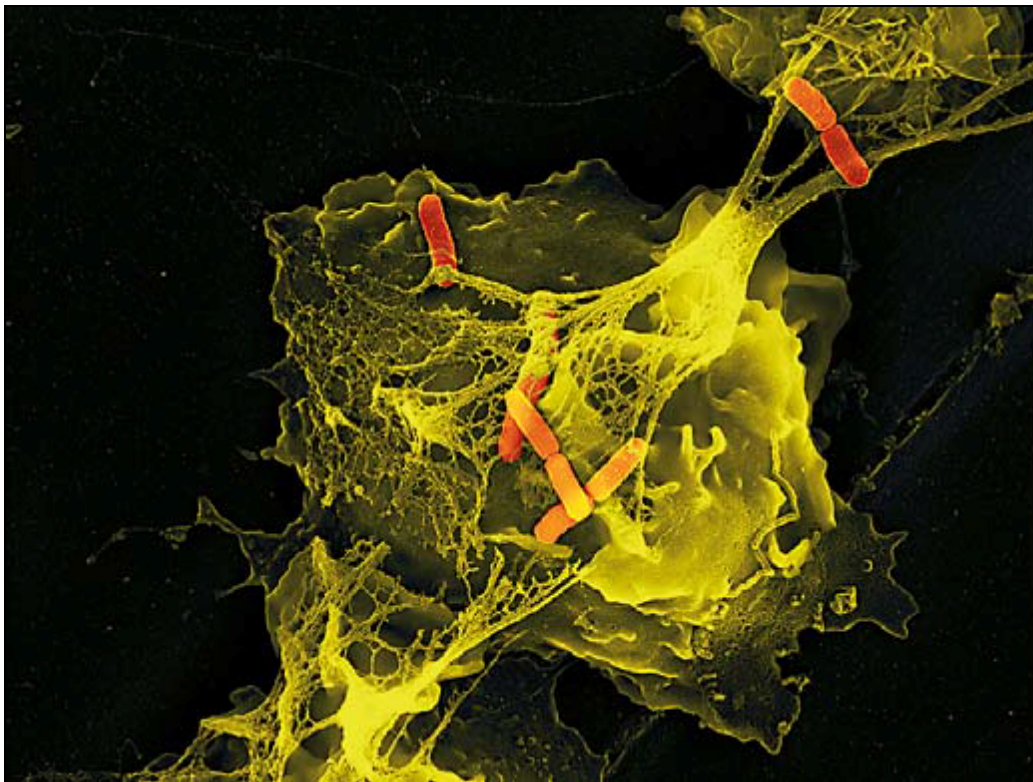
Seit den letzten Jahren gibt es eine wachsende Anzahl an Belegen für die Beteiligung von verschiedenen Mitgliedern der TRP-Kanal-Familie bei der gerichteten und ungerichteten Zellmigration. So wurde dem TRPM4 eine Beteiligung an der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Modellierung des Aktin-Zytoskeletts bei der DNP-HSA (*Dinitrophenylated Human Serum Albumin*) - stimulierten Migration von Mastzellen gezeigt (155). Auch für

den TRPM7 konnte ein Einfluss auf das Aktomyosin-Zytoskelett in N1E-115 Neuroblastomzellen gezeigt werden (35). In humanen HepG2 Hepatoblastomzellen konnte eine Rolle des TRPV1-Kanals bei der Zellmigration durch direkte Aktivierung des Kanals über Capsaicin nachgewiesen werden (177). Dagegen wurde in urotheliellen Karzinomzellen ein negativ regulatorischer Effekt des TRPV1 gezeigt (23). Für den TRPV4 konnte eine Beteiligung an der PI3K- und Rho-vermittelten zytoskeletalen Remodellierung durch mechanosensitive Aktivierung des Kanals mit einem sich anschließenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Endothelzellen nachgewiesen werden (168). Der Einfluss von TRPV1 und TRPC6 wurde auch bei der Lysophosphatidylcholin (LPS) - induzierten Migration von Monozyten gezeigt (150). Bei der Migration von Fibroblasten und Podozyten konnte eine TRPC5-vermittelte Aktivierung von Rac1 und eine TRPC6-vermittelte Aktivierung von RhoA bestätigt werden (169). Auch bei der MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein 2*) - induzierten Migration von neutrophilen Granulozyten wurde eine Beteiligung von TRPC6 gezeigt (39). Ebenso konnte für den TRPC1 mehrfach eine Rolle während der Zellmigration nachgewiesen werden. So spielt der TRPC1-Kanal beim Auswachsen von Neuronen eine wichtige Rolle (5; 73) und scheint in skelettalen Myoblasten einen Einfluss auf das Calpain-vermittelte Lösen von Fokalkontakten während der Migration zu haben (108). Darüber hinaus konnte in Glioblastom Zellen und Nierenepithelzellen auch eine Beteiligung vom TRPC1 an der Chemotaxis nachgewiesen werden (15; 52; 53). Hierbei scheinen TRPC1-Kanäle vorwiegend am Vorderende der migrierenden Zellen organisiert zu sein und einen PLC- und PI3K-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu generieren, der essentiell für eine gerichtete Migration ist (52).

Die meisten der beschriebenen Arbeiten verweisen auf eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung von TRP-Kanälen. Dies verdeutlicht, dass die Aktivierung von TRP-Kanälen bei der Zellmigration zumeist Teil einer Signalkaskade ist, die oft einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom einschließt. Die Rollen dieses Rezeptor-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms sind vielfältig und bedürfen einer weiteren Identifikation und Charakterisierung, um die regulatorischen Mechanismen der Migration von verschiedenen Zellen besser zu verstehen.

## 1.7 Neutrophile Granulozyten als Teil des Immunsystems

Neutrophile Granulozyten (kurz Neutrophile) repräsentieren 40-60% der weißen Blutkörperchen und bilden innerhalb des angeborenen Immunsystems die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene (188). Neutrophile werden im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet und besitzen im unreifen Zustand einen stabförmigen Zellkern, der während der Ausdifferenzierung einer Segmentierung unterliegt (polymorphnukleäre Zellen, PMNs) (16; 144). Reife Neutrophile zirkulieren in einem inaktivierten Zustand 1 - 4 Tage im Blutkreislaufsystem. Im Falle einer Entzündung kommt es zu einer Aktivierung der Neutrophilen, was die Zellen befähigt, einem Chemoattraktanz-Gradienten folgend durch das Gefäßendothel in das befallene Gewebe zum Entzündungsherd zu migrieren (95). Hier sind sie in der Lage, Pathogene phagozytotisch aufzunehmen, wobei die aufgenommenen Mikroorganismen durch eine Kombination aus reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) und zytotoxischen Bestandteilen der Granula abgetötet werden (67; 91). Granula als namensgebender Bestandteil von Granulozyten sind hierbei Speicher für Proteine, die den Zellen ermöglichen, Mikroorganismen zu töten oder Gewebe zu verdauen (16). Darauf gehen die Neutrophilen in Apoptose über und werden so von größeren Zellen wie Makrophagen beseitigt.



**Abbildung 4: Neutrophil Extracellular Traps**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Neutrophilen Granulozyten und durch NETs immobilisierte *Shigella flexneri* (rot) (110).

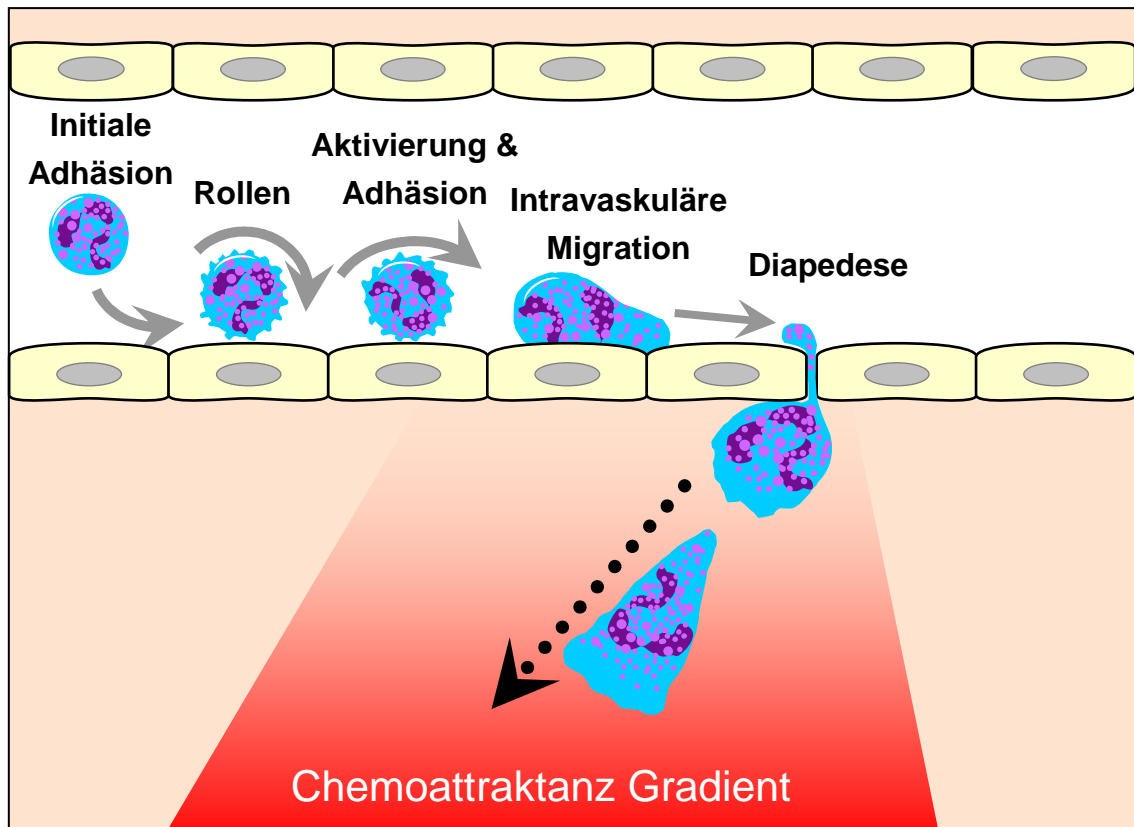
Zusätzlich zu ihrer Möglichkeit zur Phagozytose sind Neutrophile in der Lage, Mikroorganismen extrazellulär mithilfe von sogenannten *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) zu inaktivieren (96) (siehe Abb. 4). NETs werden bei einer spezifischen Form des programmierten Zelltodes von Neutrophilen gebildet und bestehen aus netzförmig organisiertem Chromatin und granulären sowie zytoplasmatischen Proteinen (110).

## 1.8 Die Aktivierungskaskade bei der Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten

Die schnelle Aktivierung von Neutrophilen und die Rekrutierung in entzündliches Gewebe ist eine fundamentale Eigenschaft des angeborenen Immunsystems. Dieser vielschichtige Prozess schließt die Mobilisierung reifer Neutrophiler aus Knochenmarkspeichern und eine beschleunigte Hämatopoese als Antwort auf chemotaktische Stimuli mit ein (95). Während einer entzündlichen Reaktion werden angrenzende Endothelzellen von Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), IL-17 oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produziert von Makrophagen oder Pathogenen, aktiviert (siehe Abb. 5). Diese Aktivierung vermittelt die Expression von Adhäsionsstrukturen wie E- und P-Selektinen, Mitgliedern der C-Typ Lektin Glykoproteine, oder Mitgliedern der Immunglobulin-Familie wie ICAMs (*Inter-Cellular Adhesion Molecules*) und VCAMs (*Vascular Cell Adhesion Molecules*) (16; 95). Diese Adhäsionsstrukturen auf der Zelloberfläche der Endothelzellen ermöglichen die Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut. Die neutrophilen Granulozyten müssen hier die Blutgefäß-Wand überqueren um zum Herd der Entzündung zu gelangen. Diese Überquerung der Endothelzell-Barriere, auch Diapedese genannt, findet vorwiegend in postkapillären Venolen statt, wo die Gefäß-Wände dünner und die Strömungen des Blutes geringer sind (16). Die initiale Adäsion der Neutrophilen an Endothelzellen erfolgt über PSGL-1 (P-Selektin Ligand 1), ESL-1 (E-Selektin Ligand 1), L-Selektine und CD44. Hierdurch wird ein Rollen der Neutrophilen entlang der Endothelzellen vermittelt, wobei PSGL-1 die Initiale Bindung an Endothelzellen ermöglicht, ESL-1 die das langsame Rollen vermittelt und die Bindung von CD44 an E-Selektine eine Umverteilung und Klusterung von PSGL-1 und L-Selektinen begünstigt (74). Die Bindung der Neutrophilen an das Endothel und das darauffolgende Rollen initialisiert die Aktivierung von Integrinen auf der Zelloberfläche von Neutrophilen. Integrine sind auch am Rollen beteiligt, vermitteln hier aber vorwiegend eine verstärkte Adhäsion. Hieran sind vor allem die  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 (*Lymphocyte Function Associated Antigen-1*) MAC-1 (*Macrophage-1 Antigen*) und ihre Liganden ICAM-1 und ICAM-2 beteiligt (16; 47).



Die durch die Entzündungsreaktion aktivierten Endothelzellen produzieren Chemokine wie IL-8 oder MIP-2 und aktivieren so die Neutrophilen (34). Die Bindung von Chemokinen an ihre Oberflächenrezeptoren vermittelt eine weitere Aktivierung von Integrinen und fördert eine stärkere Adhäsion. Zusätzlich führt die Aktivierung der Neutrophilen zu einer Polarisierung und Organisation von Strukturen die eine gerichtete Migration der Zellen ermöglichen. Die Diapedese durch die Wände der Venolen bildet den finalen Schritt der Emigration in entzündliches Gewebe. Bevor sie die Wände der poskapillären Venolen überqueren, migrieren die Neutrophilen innerhalb der Blutgefäße MAC-1- und ICAM-1-abhängig, um den geeigneten Ort für die Transmigration zu finden (127). Die sich anschließende Diapedese kann transzellulär, wobei die Neutrophilen direkt durch einzelne Endothelzellen migrieren, oder parazellulär erfolgen, wobei die Neutrophilen hier zwischen Endothelzellen transmigrieren. Die Protrusion der Zellmembran der Neutrophilen direkt in den Zellkörper der Endothelzellen oder zwischen endotheliale Zell-Kontakte wird durch die Bindung von MAC-1 an ICAM-1 erleichtert. Die Aktivierung von ICAM-1 führt innerhalb der Endothelzellen zu einem Anstieg von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  und einer Aktivierung der p38 MAPK, wodurch im Zusammenspiel die MLCK aktiviert wird, was zu einer Kontraktion von Endothelzellen sowie Separierung der interendothelialen Zellkontakte führt. Die Aktivierung von ICAM-1 führt darüber hinaus zu einer Phosphorylierung von vaskulär-endothelialen Cadherinen (VE-Cadherinen), was zusätzlich das Lösen der interendothelialen Zellkontakte begünstigt und eine Transmigration der Neutrophilen durch das verbleibende Netzwerk von Zellkontakten erleichtert (170). Die transzelluläre Migration erfolgt in dünnen Bereichen von Endothelzellen. Die Aktivierung von ICAM-1 in den Endothelzellen führt zu einer Translokation von ICAM-1 in Caveolin- und Aktin-reiche Bereiche der Zelle. Hier verbinden sich ICAM-1 enthaltende Caveolae zu vesikulo-vakuolären Organellen (VVOs), die einen transzellulären Kanal bilden, durch den die Neutrophilen migrieren können (142).



**Abbildung 5: Aktivierungskaskade neutrophiler Granulozyten**

Während einer Entzündung werden Endothelzellen durch Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$  aktiviert, was zu einer Expression von Adhäsionsstrukturen wie Selektinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Familie wie ICAM und VCAM auf der Zelloberfläche führt. Neutrophile adhären an diese Adhäsionsstrukturen, was ein Rollen der Granulozyten entlang der Endotheloberfläche ermöglicht und zu einer Aktivierung von Integrinen führt. Dies fördert eine stärkere Adhäsion, gefolgt von einer Aktivierung der Neutrophilen durch Chemoattraktanzien wie IL-8. Eine sich anschließende Polarisierung führt zu einer intravaskulären Migration mit dem Ziel der transendothelialen Migration (Diapedese). Nach dem Verlassen des Blutgefäßes werden die Neutrophilen von Chemoattraktanz-Gradienten zum tatsächlichen Herd der Entzündung geleitet.

Nach der Überwindung der endothelialen Barriere müssen die Neutrophilen, geleitet von Chemokingradienten, durch ein enges Netzwerk aus EZM, umliegendes Bindegewebe und interstitielle Matrix zum Ort der Entzündung migrieren. Sehr wahrscheinlich erfolgt die Migration hier Integrin-unabhängig durch amöboide Fortbewegung (siehe 1.2). Darüber hinaus produzieren Neutrophile eine Reihe von Proteasen wie Elastasen, Matrix-Metalloproteinase 8 (MMP8) oder MMP9 und sind so in der Lage, das enge Maschenwerk der Matrix zu durchbrechen (141). Aktivierte Neutrophile produzieren selbst eine Reihe von Chemokinen wie IL-8, *Gro $\alpha$  (*Growth-regulated Oncogene  $\alpha$* ) MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein 2*) oder auch PAF (29; 175). So sind sie neben ihrer anti-pathogenen Funktion auch befähigt, weitere Immunzellen wie Neutrophile oder Makrophagen chemotaktisch anzulocken.*

## 1.9 Ziel der Arbeit

Die Erforschung von Mechanismen und Funktionen bei der Immunabwehr gehört zu den fundamentalen Aufgaben der medizinischen Wissenschaft. Entzündungen sind hierbei komplex koordinierte biologische Antworten auf Pathogene oder zerstörtes Gewebe und Zellen. Richtig reguliert führt der Prozess der Entzündung zu einer Heilung des Organismus, wogegen eine immunregulatorische Dysfunktion zumeist pathologisch verläuft. Zellmigration und Chemotaxis spielen in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle, vor allem weil bei allen entzündlichen Reaktionen im Körper Chemoattraktanzien beteiligt sind. So wurde mehrfach gezeigt, dass bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der Multiplen Sklerose (MS) Zytokine für die chemotaktische Rekrutierung von Immunzellen Hauptauslöser für das jeweilige Krankheitsbild sind (78; 165). Pharmakologisch werden Autoimmunerkrankungen vorwiegend immunsuppressiv behandelt, wobei neben systemischen Glucocorticoiden auch vermehrt spezifischere Medikamente wie Zytokin-Inhibitoren, B-Zell Inaktivatoren oder Zellmigrations-Hemmer wie PI3K-Blocker eingesetzt werden (7). Dennoch greifen Immunsuppressiva entscheidend in regulatorische Prozesse des Immunsystems ein. Ein besseres Verständnis aller beteiligten Mechanismen liefert also möglicherweise verbesserte Therapieansätze spezifischer Krankheiten.

Bisher ist die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen bei der Chemotaxis noch unzureichend geklärt. In den letzten Jahren gab es aber mehrere Befunde, die auf eine Beteiligung einzelner Mitglieder der TRPC-Kanal-Familie an der gerichteten Zellmigration hinweisen. Schilling et. al. konnten 2009 eine Beteiligung von TRPC1 und TRPC6 an der LPC-induzierten Migration von Monozyten nachweisen (150). Damann et. al. zeigten 2008 die Beteiligung von TRPC6 an CXC-Rezeptor-vermittelten Signalkaskaden (39) und Fabian et. al. konnten 2010 eine Beteiligung des TRPC1-Kanals an der FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) stimulierten Chemotaxis von Epithelzellen nachweisen (52). Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Chemoattraktanz-Rezeptoren zu einer Aktivierung der PLC und damit Bildung von  $\text{IP}_3$  und DAG führt. Für DAG konnte dabei eine Aktivierung des TRPC6 mehrfach gezeigt werden (58; 76) und TRPC1, der als SOCE-Kanal gilt (3; 4; 193), könnte hierbei durch die  $\text{IP}_3$ -vermittelte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern aktiviert werden. Somit gibt es bereits einige Hinweise für eine Beteiligung von TRPC1 und TRPC6 an der gerichteten Migration, wobei die genaue Funktion dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle im Signalkomplex der Chemotaxis bisher nicht näher charakterisiert werden konnte.

Mithilfe dieser Arbeit sollte der Einfluss von TRPC1 und TRPC6, auf die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten untersucht werden. Zur initialen Identifikation eines

Chemotaxis-Defekts sollten Chemotaxis-Experimente mit Neutrophilen von TRPC1<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen und den entsprechenden Wildtyp (WT) Mäusen durchgeführt werden. Ein möglicher Unterschied beim Einsatz unterschiedlicher Chemoattraktanzien für die Beteiligung der beiden TRPC-Kanäle sollte durch Verwendung verschiedener *end-target* und intermediärer Chemoattraktanzien herausgestellt werden. Falls sich so ein Chemotaxis-Defekt in einem der beiden Mausmodelle erkennen lassen sollte, würde im Anschluss an die *in vitro* Chemotaxis-Experimente die Beteiligung der beiden Ca<sup>2+</sup>-Kanäle TRPC1 und TRPC6 an der Invasion von Neutrophilen während einer Entzündungsreaktion in der Maus auch *in vivo* untersucht werden. Darüber hinaus sollte durch Messung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in murinen Neutrophilen eine mögliche Beteiligung der beiden TRPC-Kanäle an der Chemoattraktanz-Rezeptor-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nachgewiesen werden. Um die Rolle der TRPC-Kanäle innerhalb der Chemattraktanz-Rezeptor-generierte Signalkaskaden weiter zu charakterisieren, sollte im Anschluss die Aktivität verschiedener Signalkaskaden nach Rezeptor-Stimulation proteinbiochemisch untersucht werden.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Zellkultur

WEHI-3B-Zellen, eine murine myeloische Leukämie-Zelllinie, produzieren IL-3 und G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) (62; 102). WEHI-3B-konditioniertes Medium wird daher zur Reifung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu neutrophilen Granulozyten genutzt. WEHI-3B-Zellen werden in Bicarbonat-gepuffertem *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM) Medium, versetzt mit 4 mM L-Glutamin, 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin, in einer 37°C warmen und humiden 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Für die Gewinnung des WEHI-3B-konditionierten Mediums werden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz noch vier weitere Tage kultiviert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und steril filtriert.

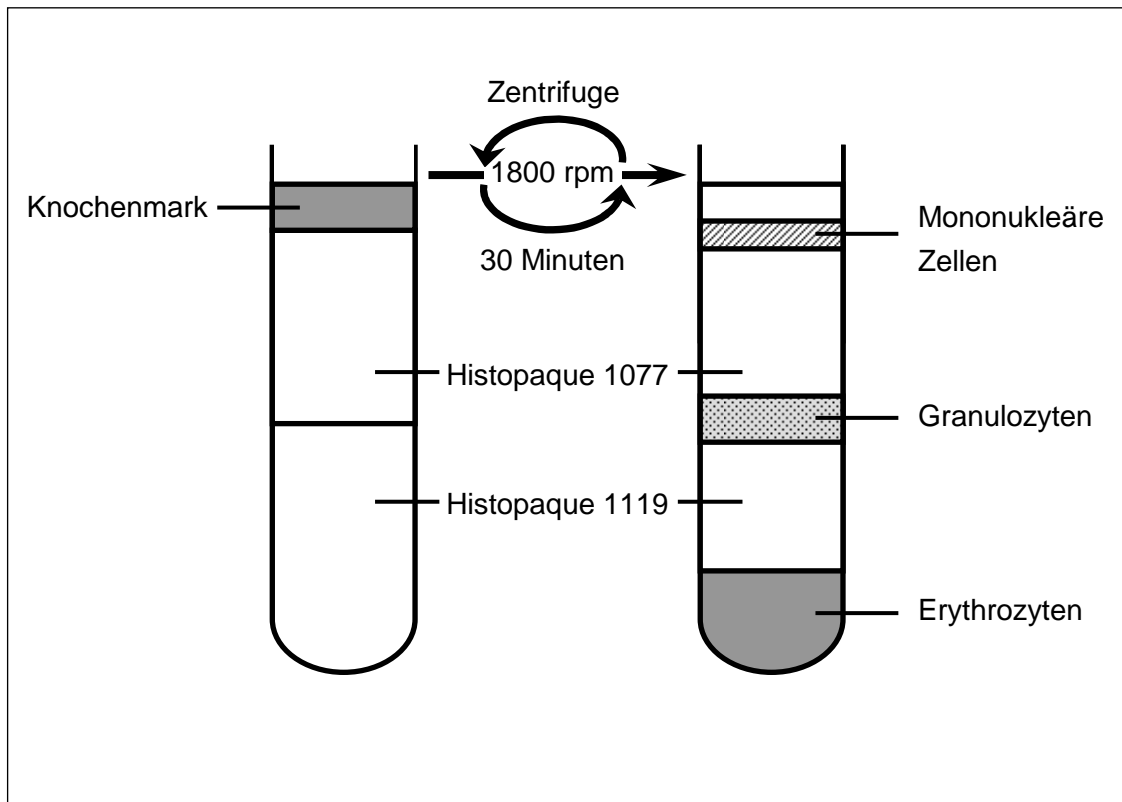
### 2.2 Tiere

Für die Experimente wurden ausschließlich neutrophile Granulozyten aus 8-10 Wochen alten C57BL/6 und 129Sv/C57BL/6J TRPC1<sup>-/-</sup> (45) sowie TRPC6<sup>-/-</sup> (46) Mäusen genutzt. Für die Experimente mit TRPC1<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen wurden nur Geschwistertiere aus heterozygoten Verpaarungen (sog. *Littermates*) verwendet. Alle Tierexperimente waren vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW genehmigt und wurden nach aktuellen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

### 2.3 Isolierung neutrophiler Granulozyten der Maus

*Femur* und *Tibia* von 8-10 Wochen alten Mäusen wurden von Gewebe befreit und anschließend entfernt. Nach Entfernung von Ober- und Unterende der einzelnen Knochen wurde das Knochenmark mit Ca<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup>-freier *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS<sup>-/-</sup>), versetzt mit 25mM HEPES und 10% FKS, unter Zuhilfenahme einer Spritze mit feiner Kanüle herausgespült. Knochenfragmente wurden aus der Knochenmarkslösung über das Spülen durch ein feines 70 µm Nylon-Sieb entfernt. Anschließend wurden die Knochenmarkszellen bei 4°C, 1000 rpm, 10 min abzentrifugiert und nach dem Resuspendieren in 1 ml HBSS<sup>-/-</sup> auf einen 5 ml Histopaque 1077 / 5 ml Histopaque 1119 Gradienten in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Histopaque 1077 und Histopaque 1119 bestehen aus einem Gemisch aus Polysaccharose (1.077 g/ml oder

1.119 g/ml Ficoll) und einem radioopaken Medium (Natriumdiatrizoat) (50). Die Granulozyten werden hier nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation von den anderen Zellen des Knochenmarks separiert (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6: Dichtezentrifugation zur Isolierung von Granulozyten aus Knochenmark**

Die unterschiedlichen Zellen des Knochenmarks werden durch den Gradienten der unterschiedlich dichten Histopaque-Lösungen nach dem Zentrifugieren der Größe nach aufgetrennt.

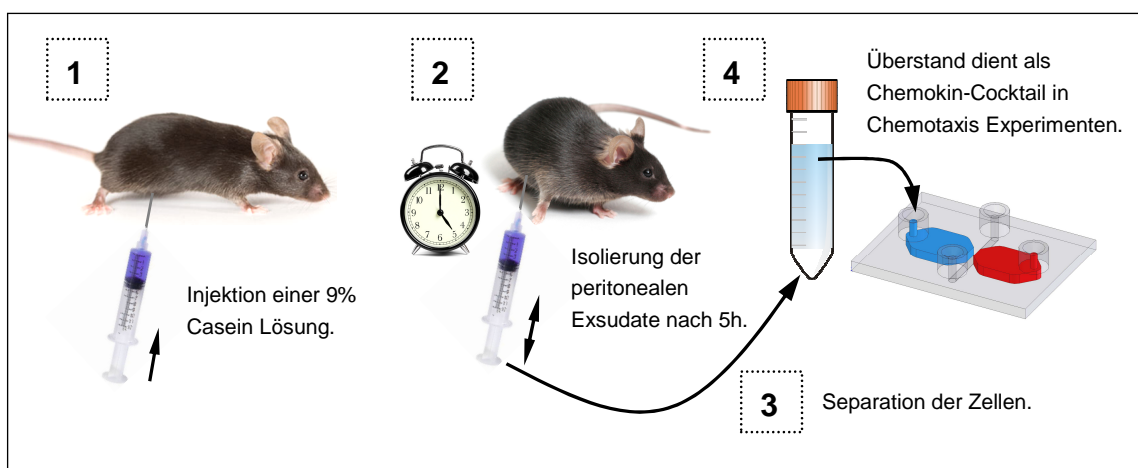
Nach der Zentrifugation bei 1800 rpm für 30 min werden die Granulozyten aus der Grenzschicht zwischen den beiden Histopaque-Lösungen entnommen und zweimal mit 20 ml HBSS<sup>-</sup> (+ 25 mM HEPES und 10% FKS) bei 4°C, 1000 rpm, 10 min gewaschen. Zur vollständigen Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark werden die isolierten Granulozyten 16 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 10% WEHI-3B-konditioniertem Medium, 10% Hitze-Inaktiviertem FKS und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin in einer 37°C warmen und humiden 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Zellen aus dieser Suspensionskultur wurden bei 4°C, 10 min und 1000 rpm abzentrifugiert, in RPMI 1640 mit 25 mM HEPES resuspendiert und bis zum Experiment bei 4°C gelagert.

## 2.4 Aseptische Peritonitis

Durch Injektion von 1 ml einer 9 %igen Casein / PBS Lösung in das Peritoneum einer Maus wurde eine aseptische Bauchfellentzündung induziert. Der detaillierte Mechanismus, wie das Milchprotein Casein zu einer Entzündung und damit zum Einwandern von Immunzellen führt, ist noch unbekannt. Allerdings konnte gezeigt werden dass, die intraperitoneale Injektion von Casein zur Produktion von Cytokinen wie IL-8 und GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) führt, welche beide einen wichtigen Teil der Aktivierungskaskade von Neutrophilen darstellen (114). Nach 5 Stunden wurden der Maus 5 ml steriles PBS intraperitoneal injiziert und anschließend die Exsudate durch einen kleinen Schnitt in der Bauchdecke mithilfe einer Multipipette isoliert. Die Gesamtzellzahl in diesem Exsudat wurde über einen CASY TT Zell-Zähler bestimmt. Der prozentuelle Anteil von neutrophilen Granulozyten in dem peritonealen Exsudat wurde über eine Pappenheim-Färbung (Hemacolor) ermittelt.

## 2.5 Preparation des „Peritonitis-Cocktails“

Wie in 2.4 beschrieben wurde mithilfe einer Casein-Lösung eine Peritonitis induziert. Peritoneale Exsudate wurden wie oben beschrieben nach 5 Stunden isoliert, die in dieser Lösung enthaltenen Zellen wurden anschließend für 10 min bei 1500 rpm pelletiert und verworfen (Siehe Abb. 7). Die Protein-Konzentration der verbliebenen Überstände wurde zur Vergleichbarkeit verschiedener Peritonitis-Exsudate ermittelt (siehe 2.8.1) und gegebenenfalls auf 4,5 mg/ml mit HBSS korrigiert. Der Peritonitis-Cocktail wurde in kleinen Aliquots für die spätere Verwendung bei -20°C gelagert.



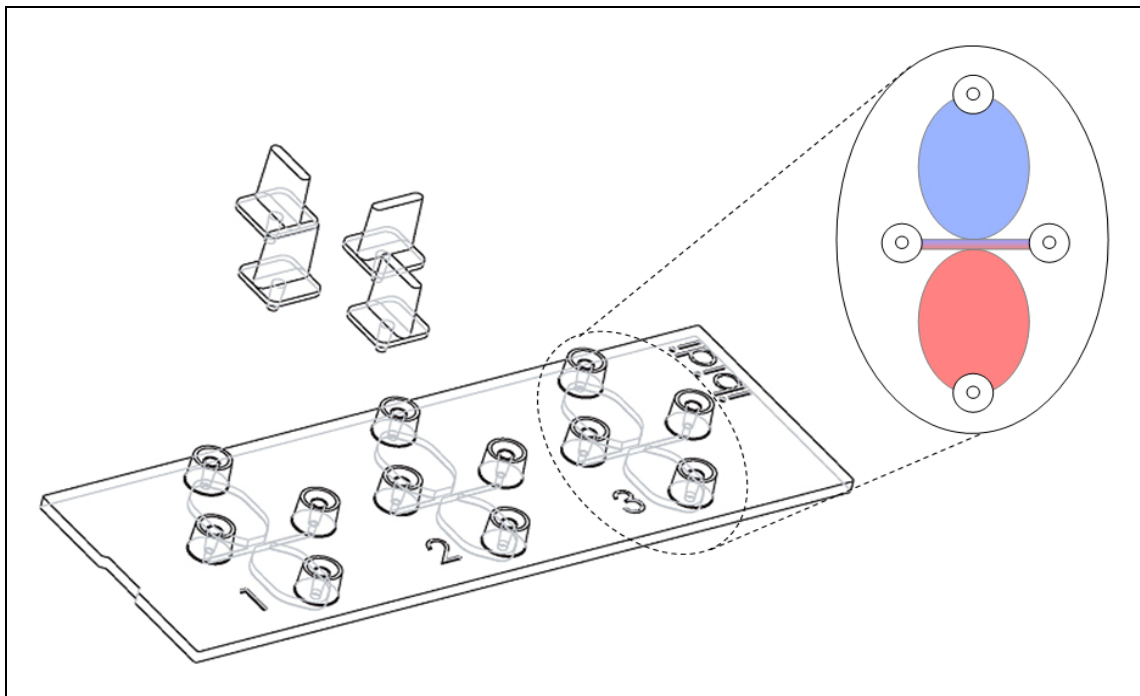
**Abbildung 7: Isolierung des Peritonitis-Cocktails**

1) Induktion einer Bauchfellentzündung mit Casein. 2) und 3) Isolierung peritonealer Exsudate und Pelletierung der enthaltenen Zellen. 4) Überstand dient als Chemokin-Cocktail in Experimenten.

## 2.6 *In vitro* Migrations-Assays

### 2.6.1 3D Chemotaxis Assay

Für 3D Chemotaxis Experimente wurden ibidi  $\mu$ -Slide Chemotaxis-Kammern verwendet (siehe Abb. 8). Die Kammern wurden zuerst 1h mit Fibronektin ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschichtet und anschließend mit HBSS befüllt. Ein Chemokin Gradient wurde durch Zugabe von fMLP (Endkonzentration  $1 \mu\text{M}$  in HBSS), KC ( Endkonzentration  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  in HBSS) oder eines Peritonitis-Cocktails ( $4,5 \text{ mg}/\text{ml}$ ) etabliert. Zur besseren Visualisierung des Gradienten wurde das jeweilige Chemokin zusätzlich mit  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  Patentblau versetzt. Nach Aufbau des Gradienten wurden ca.  $5 \times 10^5$  Neutrophile (siehe 2.3) in HBSS (pH 7.4) mit  $2,1 \text{ mg}/\text{ml}$  Kollagen direkt in den Kanal der Kammern gegeben. Je nach experimentellem Ansatz waren in allen verwendeten Lösungen noch folgende Blocker enthalten (Endkonzentrationen in Klammern): SB225002 ( $500 \text{ nM}$ ), ABT-491 ( $50 \mu\text{M}$ ). Direkt nach Polymerisation des Kollagens (ca. 10 min) wurden die Experimente bei  $37^\circ\text{C}$  gestartet.



**Abbildung 8: ibidi Chemotaxis-Kammer**

Die ibidi Chemotaxis-Slides bestehen aus drei einzelnen Kammern mit je zwei großen  $40 \mu\text{l}$  Reservoiren die über einen schmalen,  $1 \text{ mm}$  breiten und  $70 \mu\text{m}$  hohen Kanal verbunden sind. In diesen Kanal werden die Zellen ausgesät und observiert. Die Reservoirs lassen sich einzeln über eine und der Kanal über zwei Öffnungen verschließen. Erst wird die gesamte Kammer mit HBSS (hier rot dargestellt) befüllt und anschließend wird in ein Reservoir ein Chemokin gegeben (hier in blau dargestellt). Innerhalb kurzer Zeit baut sich so über den zentralen Kanal ein Chemokin-Gradient auf. Dieser bleibt für mindestens 24 Stunden stabil. (Verändert nach ibidi.de)



Die Migration der Zellen wurde videomikroskopisch 1 h bei 37°C in 5 sec Intervallen aufgenommen. Die Verarbeitung der Bildsequenzen erfolgte hierbei über die Programme HiPic oder WASABI.

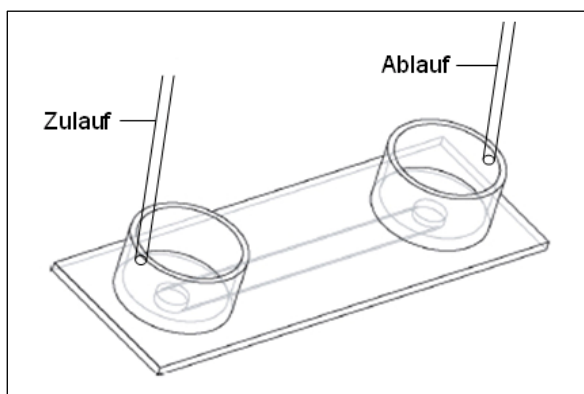
### 2.6.2 Datenanalyse der Migrationsexperimente

Zur Quantifizierung der Zellmigration und Chemotaxis wurde über die AMIRA *Imaging Software* entweder der Mittelpunkt von einzelnen Zellen oder die Zellkontur Bild für Bild über den gesamten Migrationsfilm bestimmt. Aus dieser Segmentierung ließen sich im Anschluss über ein Java-basiertes Programm in Verbindung mit der ImageJ Software weitere Parameter berechnen. Die Migration wurde hierbei als Bewegung des Zell-Mittelpunktes pro Zeiteinheit definiert, woraus sich die Geschwindigkeit als Dreipunkt-Mittelwert berechnen ließ. Die Translokation ließ sich als Start-Ziel Vektor berechnen und der Chemotaxis Index wurde als Quotient aus der reinen y-Bewegung (in Richtung des Gradienten) und der tatsächlich zurückgelegten Strecke definiert.

Für die Migrationsexperimente wurden mindestens 30 Zellen aus 3 unterschiedlichen Mäusen analysiert. Standardabweichungen wurden als Mittelwerte (SEM) und Signifikanzen über den t-Test ermittelt.

## 2.7 $[Ca^{2+}]_i$ Messungen

Die Messung der zytosolischen Calcium-Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte in Fibronectin-beschichteten ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ibidi  $\mu$ -Slide I Kammern (siehe Abb. 9) mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2-AM.



**Abbildung 9: ibidi  $\mu$ -Slide I**

Bei den ibidi  $\mu$ -Slides sind zwei große Reservoire mit einem Volumen von 1ml über einen 5 mm breiten und 0,4  $\mu\text{m}$  hohen Kanal verbunden, in den die Zellen ausgesät werden. Zu- und Ablauf eines Perfusionssystems werden auf dem Mikroskop angeschlossen. (Verändert nach ibidi.de)

Fura-2 bildet mit  $Ca^{2+}$  Chelatkomplexe und ist als Fura-2-AM an einen Acetoxymethylester (AM) gebunden, wodurch es durch passive Diffusion membrangängig wird. Innerhalb der Zelle spalten endogene Esterasen den Acetoxymethylester ab, wodurch das Fura-2 reaktiviert und die Diffusion aus der Zelle verhindert wird. Zur Messung der  $Ca^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenz wird Fura-2 mit Licht der Wellenlänge 380 nm und  $Ca^{2+}$ -

komplexiertes Fura-2 bei 340 nm angeregt. Die Fluoreszenzemissionen werden bei 500 nm gemessen, wobei sich über den Quotienten aus den Wellenlängen 340 nm / 380 nm die  $[Ca^{2+}]_i$  Konzentration berechnen lässt (s.u.).

Etwa  $6 \times 10^4$  Zellen in Suspension wurden für 20 min, unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur mit 3  $\mu$ M Fura-2-AM beladen. Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden anschließend in den ibidi Slides ausgesät und für 10 min bei 37°C adhären gelassen. Anschließend wurden die Neutrophilen sehr vorsichtig mit 2 x 1 ml Ringerlösung gewaschen, woraufhin die videomikroskopische Messung gestartet wurde. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur auf einem inversen Mikroskop (40 x Ölimmersionsobjektiv, Axiovert TV 100, Zeiss), wobei Bildsequenzen in einem Intervall von 5 s aufgenommen wurden. Monochromator, Kamera und Aufnahme der Bilder wurden über die Metaflour Software (Visitron Systems) gesteuert. Die Fluoreszenzintensität wurde über die gesamte Zellfläche gemessen, wobei diese für die Auswertung um die Eigenfluoreszenz des Hintergrundes korrigiert wurde. Das experimentelle Protokoll sah eine Kontrollphase von 5 min vor, auf die eine chemokinetische Stimulation von 10 min folgte. Hierbei wurden 1  $\mu$ M fMLP, 1  $\mu$ g/ml KC oder der Peritonitis Cocktail 1:4 in Ringerlösung (1,125 mg/ml) (siehe 2.5) appliziert. Am Ende jeder Messung erfolgte eine Eichung durch Zulauf von Ionomycin-haltigen Ringerlösungen, die entweder EGTA als Calcium-Chelator oder 5 mM  $Ca^{2+}$  enthielten. Ionomycin als Calcium-Ionophor ermöglicht hier die konzentrationsbedingte Diffusion von  $Ca^{2+}$ .

Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde durch folgende Gleichung berechnet (65; 146):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times \beta$$

$K_d$  beschreibt hier die Dissoziationskonstante für Fura-2 ( $K_d$  Fura-2 = 224 nmol/l).  $R$  definiert den Quotienten aus der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und 380 nm, wobei  $R_{min}$  der 340 nm / 380 nm Quotient für den 0  $Ca^{2+}$  Intensitätswert während der Eichung und der  $R_{max}$  der 340 nm / 380 nm Quotient für den 5 mM  $Ca^{2+}$  Intensitätswert während der Eichung steht.  $\beta$  beschreibt den Quotienten aus der 380 nm Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei 0  $Ca^{2+}$  und 5 nM  $Ca^{2+}$ .

Für die Statistik wurden pro verwendetem Chemokin mindestens 60 Zellen aus 3 unterschiedlichen Mäusen verwendet. Standardabweichungen wurden als Mittelwerte (SEM) und Signifikanzen über den t-Test ermittelt.

Tabelle 1: Lösungen für die  $[Ca^{2+}]_i$  Messung.

Ringerlösung (pH 7,4)		Eichlösung $\uparrow Ca^{2+}$ (pH 7,4)		Eichlösung 0 $Ca^{2+}$ (pH 7,4)	
NaCl	122,5 mM	NaCl	122,5 mM	NaCl	122,5 mM
KCl	5,4 mM	KCl	5,4 mM	KCl	5,4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,2 mM	CaCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	5 mM	EGTA	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,8 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,8 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,8 mM
HEPES	10 mM	HEPES	10 mM	HEPES	10 mM
Glucose	5,5 mM				

## 2.8 Proteinbiochemische Methoden

### 2.8.1 Proteinbestimmung (BCA-Biuretreaktion)

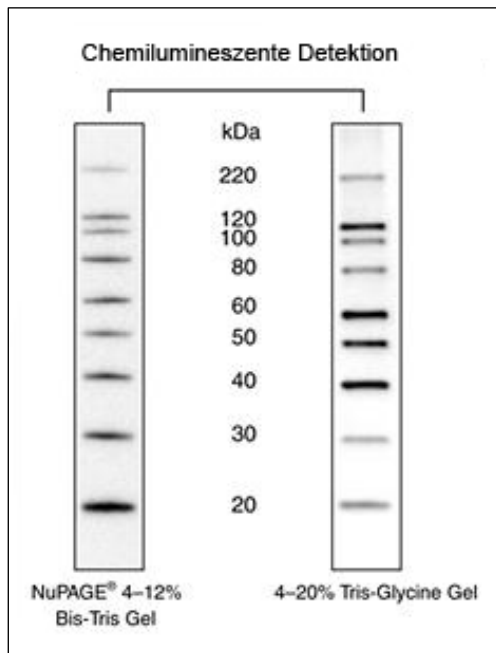
Die Proteinbestimmung erfolgte nach Protokoll colorimetrisch mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce®. Hierbei wird die Reduktion von  $Cu^{2+}$  zu  $Cu^{1+}$  in alkalischer Lösung durch die Peptidbindungen von Proteinen (Biuretreaktion) mit der Komplexbildung von zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) mit  $Cu^{1+}$  kombiniert. Durch die Reaktion von BCA mit einwertigen Kupferionen entsteht eine violette Komplexverbindung mit einer Absorption bei 562 nm, die nahezu linear mit zunehmender Proteinmenge ansteigt.

Als Referenz zu den zu bestimmenden Proben wurde die Konzentration von Rinderse-  
rumalbumin Standards (BSA, bovines Serumalbumin) mit bekannten Konzentrationen  
(2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0  $\mu\text{g/ml}$ ) bestimmt. Proben und Standards  
wurden hierbei jeweils doppelt bestimmt.

### 2.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE werden Proteine anhand des Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Proteine werden hier mit dem Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) und DTT (Dithiothreitol) bzw.  $\beta$ -Mercaptoethanol und durch Erhitzen (95  $^{\circ}\text{C}$ ) vollständig denaturiert. Das DTT spaltet dabei Disulfidbrücken der Proteinkomplexe, und das SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Hierdurch wird die Eigenladung des Proteins mit einer negativen Ladung überdeckt, und die denaturierten Proteine können somit in der Gelmatrix durch anlegen eines elektrischen Feldes nach dem Molekulargewicht

aufgetrennt werden. Neben SDS und DTT enthält der Probenpuffer zum Denaturieren der Proteine Bromphenolblau. Das Bromphenolblau wandert als sichtbarer, negativ geladener Farbstoff aufgrund seines sehr geringen Molekulargewichts immer vor der Proteinfront und zeigt so die Proteinlauf-front bei der Elektrophorese an. Neben den Proteinproben wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsstandard mit Proteinen bekannten Molekulargewichts in der PAGE verwendet, um später das Molekulargewicht detek-tierter Banden abschätzen zu können. Zudem erfolgte die SDS-Page diskontinuierlich, das heißt über das Trenngel wird ein Sammelgel gegossen um eine schärfere Ban-dentrennung zu erreichen. Die Matrix des Sammelgels besitzt größere Poren und ei-nen anderen pH-Wert als die des Trenngels. Somit wandern die Proteine schneller und ohne Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel werden die Proteine größenabhängig aufgetrennt.



**Abbildung 10: Molekulargewichtsstandard**

Der MagicMarc™ Protein Standard (Invitrogen) aus einem Mix von Proteinen mit einem Molekularge-wicht von 20 bis 220 kDa. Jedes Protein besitzt eine Antikörper-Bindungsstelle wodurch die Markerbanden ebenso wie andere Proteine detek-tiert werden können.

Tabelle 2: Zusammensetzung SDS Gel.

5% Sammelgel		7,5% Trenngel	
Aqua bidest.	1,3 ml	Aqua bidest.	1,822 ml
Rotiphorese® Gel A	357 µl	Rotiphorese® Gel A	1,215 ml
Rotiphorese® Gel B	150 µl	Rotiphorese® Gel B	503 µl
0,5 M Tris/SDS	500 µl	1,5 M Tris/SDS	1,3 ml
10% APS	25 µl	10% APS	25 µl
Temed	2,5 µl	Temed	7,5 µl
1,5 M Tris/SDS pH 8,8		0,5 M Tris/SDS pH 6,8	
Tris	1,5 M	Tris	0,5 M
SDS	0,5%	SDS	0,5%

### 2.8.3 Herstellung der Proteinlysate und Probenvorbereitung

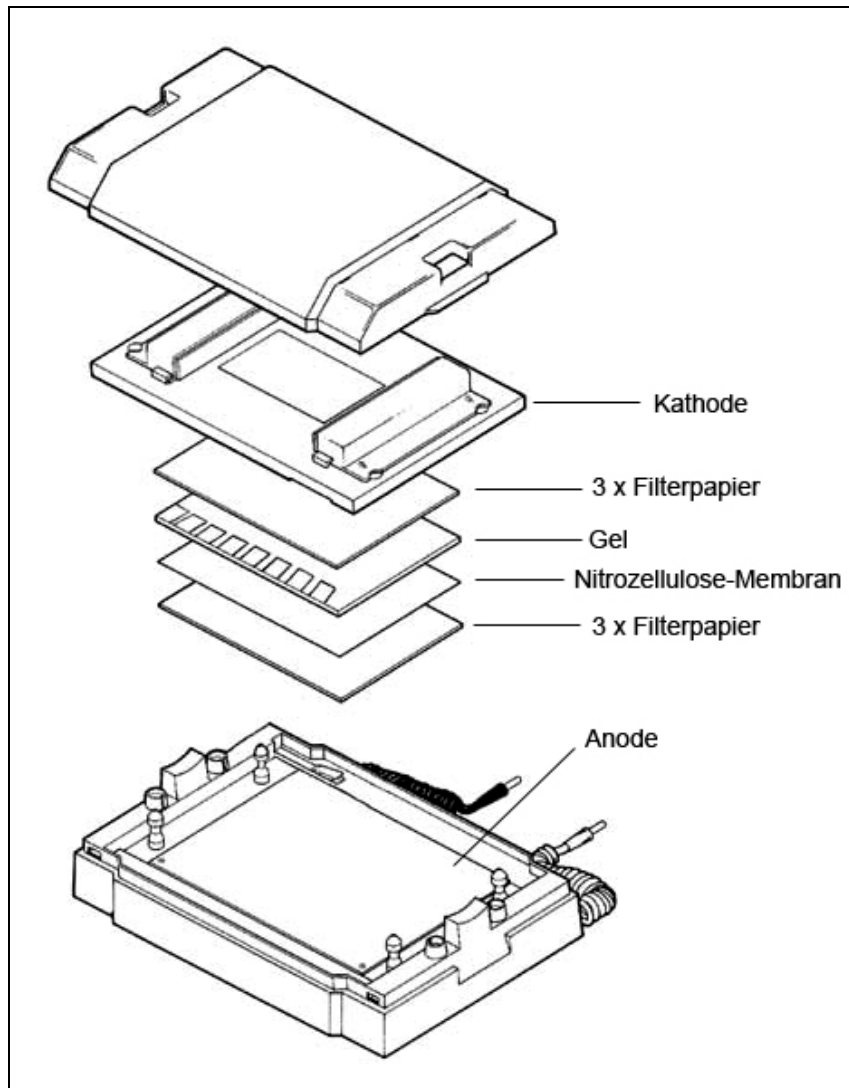
Neutrophile Granulozyten (siehe 2.3) in RPMI 1640 mit 25 mM HEPES wurden in Fibronectin-beschichteten (1 µg/ml, siehe 2.6.2) 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach 5 min Inkubation wurde das Medium gegen den Peritonits-Cocktail (siehe 2.5) oder 1 µg/ml KC in PBS zur Aktivierung der Zellen getauscht. Nach 15 min bzw. 5 min Stimulation wurde das Medium vollständig entfernt, die Zellen mit dem RIPA-(Radio-Immunopräzipitations Assay)-Lysispuffer versetzt und mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Nach Homogenisierung der Zellen durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 0,6 mm Kanüle wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden nicht vollständig gelöste Zellbestandteile 5 min bei 4°C und 13000 rpm von dem Proteinlysate separiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt (siehe 2.7.1) und dieser entweder direkt verwendet oder bei -80°C gelagert. Die Proteinproben wurden direkt vor der Verwendung 1:5 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert.

Tabelle 3: Lösungen für die  $[Ca^{2+}]_i$  Messung.

RIPA Lysispuffer		Probenpuffer	
Tris-HCl pH 7,6	50 mM	Tris-HCl pH 7,6	0,9 M
NaCl	0,15 M	SDS	8,5 %
NP-40	10 mM	Sucrose	27,5%
SDS	3,5 mM	DTT	100mM
DOC	10 %	Bromphenolblau	0,003 %
10 x PhosSTOP	1:10		
7 x Complete Mini	1 : 7		

#### 2.8.4 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss durch Anlegen einer Spannung senkrecht zum Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Hierbei wurde sowohl das *Semidry* Western Blot System als auch das *Tank* Blot System genutzt. Das Prinzip des *Semidry* Western Blots ist in Abb. 11 dargestellt. Beim *Semidry* Blot sind Membran und Gel sandwichartig von Filterpapieren umgeben, durch das Tränken mit Transferpuffer vermitteln sie so die Stromleitfähigkeit. Durch das Methanol im Transferpuffer wird das SDS aus dem Protein-Detergenz-Komplex entfernt und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Nitrozellulose-Membran erleichtert. Der Transfer erfolgte hier bei einem Gel für 30 min bei 5,5 mA/cm<sup>2</sup>.

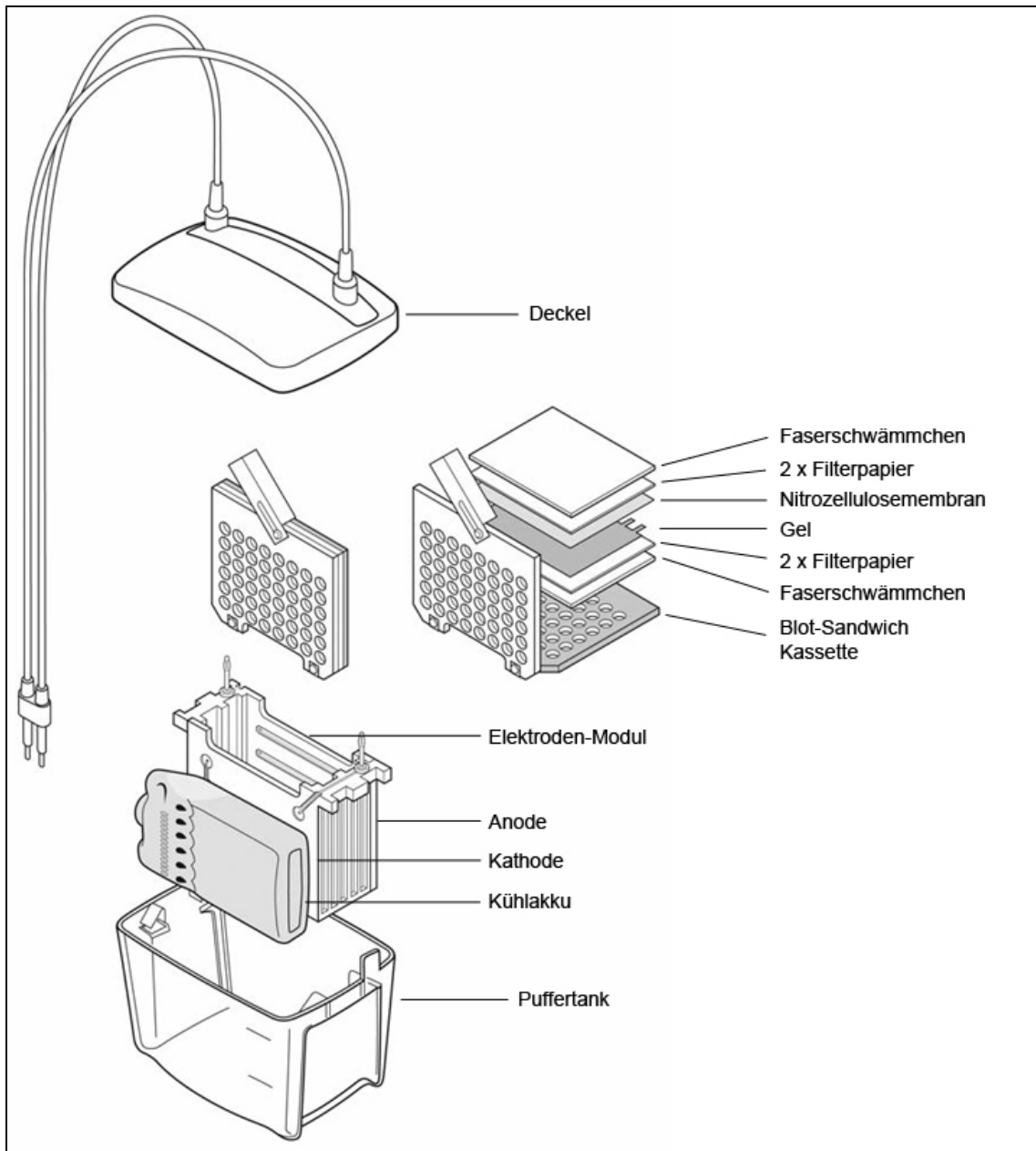


**Abbildung 11: Aufbau Semidry Western-Blot**

(verändert nach Bio-Rad Trans-Blot SD *Semi-Dry Transfer Manual*)

Prinzipiell sind *Semidry* und *Tank* Blot sehr ähnlich, allerdings erfolgt das Übertragen der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran beim *Tank* Blot Verfahren bei vollständiger Umspülung des Systems mit dem Transferpuffer. Das Prinzip des *Semidry* Blot Systems ist in Abb. 12 dargestellt. Der Transfer erfolgte hier für etwa 16 Stunden bei  $1,1 \text{ mA/cm}^2$ .

Nach dem Übertragen der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran wurde diese für eine Stunde in der *Blocking Solution* inkubiert. Diese enthielt je nach Vorgaben des Herstellers der Antikörper entweder BSA in TBST oder Magermilchpulver in PBST. Das BSA bindet genauso wie das Milchprotein an die Nitrozellulose-Membran und verhindert so das unspezifische Binden von Antikörpern.



**Abbildung 12: Aufbau *Tank* Western-Blot**

(verändert nach Bio-Rad Mini Trans-Blot *Manual*)

### 2.8.5 Immundetektion

Die Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Blocken über Nacht mit einer entsprechenden Verdünnung des ersten Antikörpers (siehe Tab. 4) bei 4°C und unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min unter Schütteln mit TBST oder PBST gewaschen und daraufhin erfolgte die Behandlung mit dem entsprechenden zweiten Antikörper (IgG-Peroxidase-Konjugat, siehe Tab. 5) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TPST oder PBST gewaschen. Der Nachweis des gebundenen zweiten Antikörpers erfolgte mithilfe des *SuperSignal® West Femto Maximum Sen-*



*sitivity Substrate Kits* (Thermo Scientific). Der chemilumineszente Nachweis beruht hier auf der Oxidation von Luminol durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase. Das Umsetzen von Luminol zu 3-Aminophthalat wird von der Emission von Licht einer Wellenlänge von 428nm begleitet. Diese Reaktion ließ sich so in dem Geldokumentationssystem (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad) nachweisen.

Die densitometrische Quantifizierung der Intensität unterschiedlicher Proteinbanden erfolgte über die ImageJ Software. Hierbei wurden Proteinbanden des zu quantifizierenden Gens in Relation zu den Proteinbanden eines *housekeeping*-Gens gesetzt. Zur statistischen Absicherung wurden Western Blots mindestens 2 x mit Proteinlysaten von unterschiedlichen Tieren durchgeführt.

**Tabelle 4: Erstantikörper und Verdünnungen**

<b>Antikörper</b>	<b>Wirtstier</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-CXCR2 (Novus Biologicals)	Kaninchen	1 : 100
anti-phospho-Akt (PKB) (Cell Signaling)	Kaninchen	1 : 500
anti-phospho-p38 MAPK (Cell Signaling)	Maus	1 : 1000
anti-beta Aktin (Sigma)	Maus	1 : 10000
anti-GAPDH (Dianova)	Maus	1 : 1000

**Tabelle 5: Zweitantikörper und Verdünnungen**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Goat anti-Rabbit POD (Sigma)	1 : 10000
Goat anti-Mouse POD (Jackson-Immuno Research)	1 : 50000

### 2.8.6 Lösungen Western Blot

Tabelle 6: Western Blot Pufferlösungen.

Laufpuffer		Transferpuffer	
SDS	1 %	Tris	10 mM
Glycin	200 mM	Glycin	100 mM
Tris	4 mM	Methanol	10 %
PBST		TBST	
NaCl	136 mM	NaCl	1,37 M
KCl	2,7 mM	Tris	200 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,3 mM	TWEEN 20	0,1 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM		
TWEEN 20	0,05 %		

## 2.9 Molekularbiologische Methoden

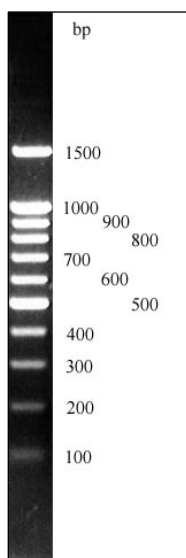
### 2.9.1 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese mithilfe eines Agarosegels stellt eine einfache Methode dar, um Nukleinsäuren verschiedener Fragmentlängen voneinander zu trennen und zu identifizieren. Das Prinzip beruht auf den Trenneigenschaften der Agarose, die den wandernden Molekülen als Matrix je nach Größe unterschiedlich viel Widerstand entgegensetzt. So wandern große Moleküle langsamer als kleine. Die Auftrennung der DNA- oder RNA-Fragmente erfolgt in einem elektrischen Feld. Hierbei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode. Sichtbar werden die Nukleinsäuren durch SYBR<sup>®</sup> Gold (Invitrogen), wobei SYBR<sup>®</sup> Gold als Cyanin-Farbstoff doppelsträngige DNA bindet. Hierdurch lassen sich Nukleinsäuren durch die Fluoreszenz von SYBR<sup>®</sup> Gold bei Anregung mit UV-Licht im Agarosegel nachweisen. Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wird parallel zu den Nukleinsäure-Proben ein Größenmarker aufgetragen.

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mithilfe eines 1,5%igen, horizontalen Agarosegels und einer Spannung zwischen 90 und 120 mV. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Der verwendete PCR-Puffer (*CoralLoad*, Quiagen) enthielt bereits den Ladepuffer, als Größenmarker wurde verdaute Plasmid-DNA verwendet (siehe Abb. 13). Eine Auflistung der verwendeten Substanzen ist Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tabelle 7: DNA-Gelelektrophorese-Puffer und DNA-Agarosegel.**

10 x TBE (pH 8,3)		1,5 % Agarosegel	
Tris/HCl	0,9 M	Agarose	3 g
Borsäure	0,9 M	0,5 x TBE	200 ml
EDTA	20 mM		



**Abbildung 13: DNA-Marker nach Auftrennung in einem 1% Agarosegel.**

Als Größenmarker wurde mit EcoR I und Hind III verdaute Plasmid DNA verwendet. (segenetic.de)

### 2.9.2 Extraktion genomischer DNA aus Gewebe

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde den Tieren bei der Ohrmarkierung ein kleines Stück Gewebe entnommen und hieraus im Anschluss die genomische DNA extrahiert. Dafür wurden die Gewebestücke zunächst mit 400 µl Lysispuffer versetzt. Neben den Detergenzien NP-40 und TWEEN 20 enthielt der Lysispuffer Proteinase K zum Verdau von Proteinen. So wurde das Gewebe über Nacht in einem Thermomixer bei 56°C und 800 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K bei 95°C für 20 min inaktiviert. Die nun die extrahierte genomische DNA enthaltende Lösung diente in der sich anschließenden PCR als *Template*.

**Tabelle 8: DNA Extraktionspuffer.**

KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Tris/HCl, pH 8.3	10 mM
NP-40	0,45 %
Tween 20	0,45 %
Proteinase K	1 mg/ml

### 2.9.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

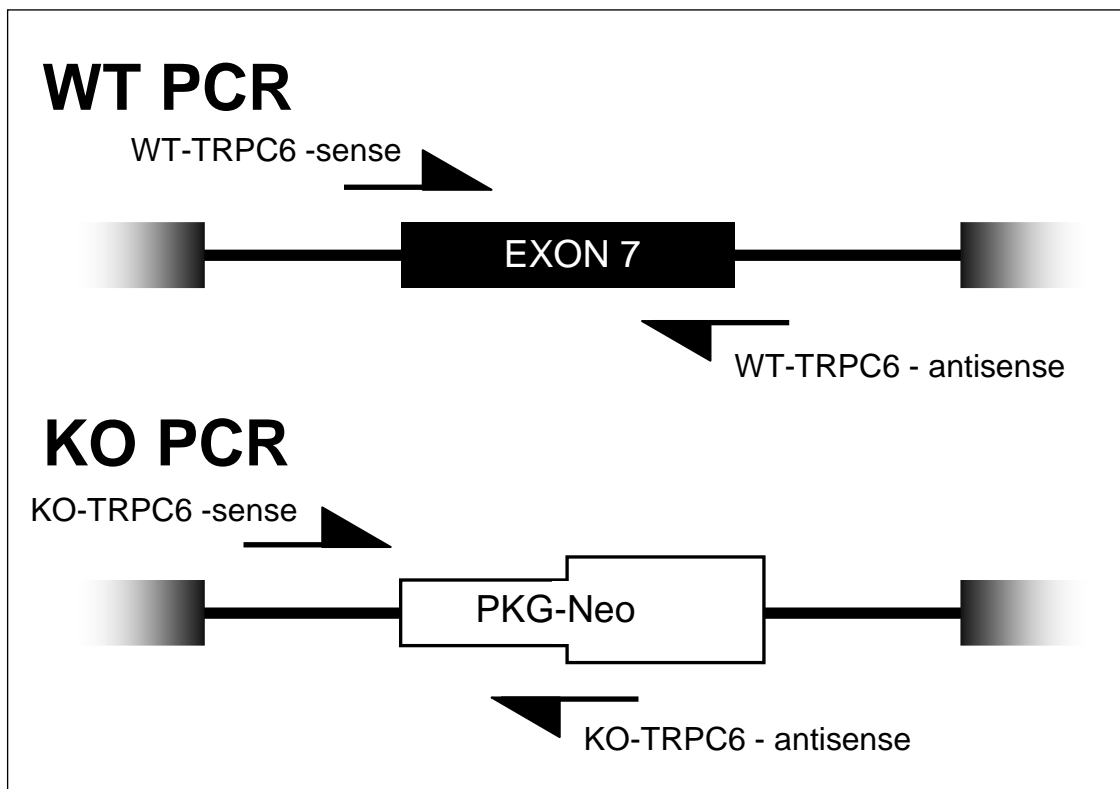
Um eine DNA-Sequenz schnell und einfach zu vervielfältigen, bedient man sich der PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hierzu benötigt man zuerst eine gewisse Menge *Template*-DNA, eine thermostabile DNA-Polymerase sowie zwei Oligonukleotid-*Primer* in Verbindung mit einem Puffer und Nukleotiden. Eine typische PCR beginnt mit einer initialen Denaturierung (94°C, 2 min) und 30-35 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (94°C, 30 s), *Annealing* (Temperatur variabel, 30 s) und Elongation (72°C, 30 s), sowie einer finalen Elongation (72°C, 10 min). Bei der Denaturierung wird das DNA-*Template* erhitzt, wodurch sich die beiden DNA-Stränge trennen. Darauf folgt das sogenannte *Annealing*, bei dem die Temperatur gesenkt wird, um eine Hybridisierung der Oligonukleotid-*Primer* mit der einzelsträngigen *Template*-DNA zu gewährleisten. Diese *Annealing*-Temperatur ist abhängig von dem verwendeten *Primer*paar und richtet sich nach der jeweiligen Schmelztemperatur. Hierauf folgt die Elongation, wobei mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase das *Primer*paar jeweils komplementär zum *Template*-Strang verlängert wird, so dass zwei neue doppelsträngige DNA-Fragmente entstehen. Die Zusammensetzung eines Standard-PCR Ansatzes für die Genotypisierung ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Als Polymerase wird sehr häufig die *Taq*-DNA-Polymerase (isoliert aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus*) verwendet, welche eine vergleichbar hohe Syntheserate aufweist.

Die Oligonukleotid-*Primer* wurden hierbei so gewählt dass beide wildtypspezifischen *Primer* innerhalb der Gensequenz lag, in die bei den *Knockout*-Tieren der Inaktivierungsvektor inseriert wurde. Dagegen lag einer der *Knockout*-spezifischen *Primer* innerhalb der Sequenz des Inaktivierungsvektors (siehe Abb. 14).

Tabelle 9: Auflistung eines *Taq* Standard-PCR Ansatzes.

Standard-PCR Ansatz	
10 x PCR-Puffer (incl. MgCl <sub>2</sub> )	3 µl
dNTPs (10 mM)	0,6 µl
Oligonukleotid- <i>Primer</i> (10 pmol/µl)	0,6 µl
DNA- <i>Template</i>	0,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase 5 u/µl	0,3 µl
steriles H <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Abbildung 14: Lage der TRPC6<sup>-/-</sup>-Primer innerhalb der TRPC6-Gensequenz.

Die Wildtyp-spezifischen Primer waren sequenzspezifisch für Exon 7 des TRPC6 Gens, wogegen die *Knockout*-spezifischen Primer sowohl im Intron-Bereich vor Exon 7 als auch im PGK *Promotor*-Bereich der inaktivierenden PGK-Neo Kasette, welche bei den *Knockout*-Tieren Exon 7 ersetzte, lokalisiert waren.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Oligonukleotid-Primer.

Name	Sequenz
WT-TRPC6-sense	5'-CAGATCATCTCTGAAGGTCTTTATGC-3'
WT-TRPC6-antisense	5'-CATCAGGACCCCGAGCACCACATAC-3'
KO-TRPC6-sense	5'-ACGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCC-3'
KO-TRPC6-antisense	5'-GGGTTTAATGTCTGTATCACTAAAGCCTCC-3'
WT-TRPC1-sense	5'-GGCAACCTTTGCCCTCAAAGTGGTGGC-3'
WT-TRPC1-antisense	5'-AGTGAATATATATATATCAGACATAGATTTGGG-3'
KO-TRPC6-sense	5'-TCTATGGCTTCTGAGGCGGA-3'
KO-TRPC6-antisense	5'-GAGTCATTTTCTTATTGGCAAATGAGG-3'

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle TRPC1 und TRPC6 bei der gerichteten Migration neutrophiler Granulozyten der Maus untersucht. Eine Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, insbesondere der Familie der TRP-Kanäle, bei der Migration verschiedenster Zellen konnte bereits mehrfach gezeigt werden (15; 39; 52; 53; 108; 150). Hierbei wurde dem TRPC1 in MDCK-F Zellen und humanen D54MG Glioma-Zellen ein Einfluss auf die Direktionalität während der Zellmigration zugewiesen (15; 52; 53). Auch für den TRPC6 konnte eine Beteiligung während der MIP-2 induzierten, chemokinetisch stimulierten Migration von murinen Neutrophilen gezeigt werden (39). Dabei blieb die funktionelle Rolle dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen bei der Chemotaxis bisher aber ungeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von TRPC1 und TRPC6 bei der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten aus TRPC1- und TRPC6-defizienten Mäusen in Gradienten verschiedener Chemoattraktanzien zu untersuchen. Hierbei wurden bei den *in vitro* Chemotaxis-Experimenten sowohl *end-target* als auch intermediäre Chemokine eingesetzt. Ein möglicher Chemotaxis-Defekt wurde *in vivo* in einem Entzündungsmodell charakterisiert. Zur Erhärtung der Befunde aus den Migrations-Experimenten wurde im Anschluss der möglicher Einfluss eines TRPC-Kanal-*Knockouts* auf Ebene des funktionalen Kanalsproteins in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen unter chemokinetischer Stimulation der Neutrophilen analysiert. Eventuelle Unterschiede bei der Aktivierung von Signalwegen nach chemokinetischer Stimulation der TRPC-defizienten Neutrophilen wurden schlussendlich auf proteinbiochemischer Ebene untersucht.

### 3.1 Phänotypen der TRPC1<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse

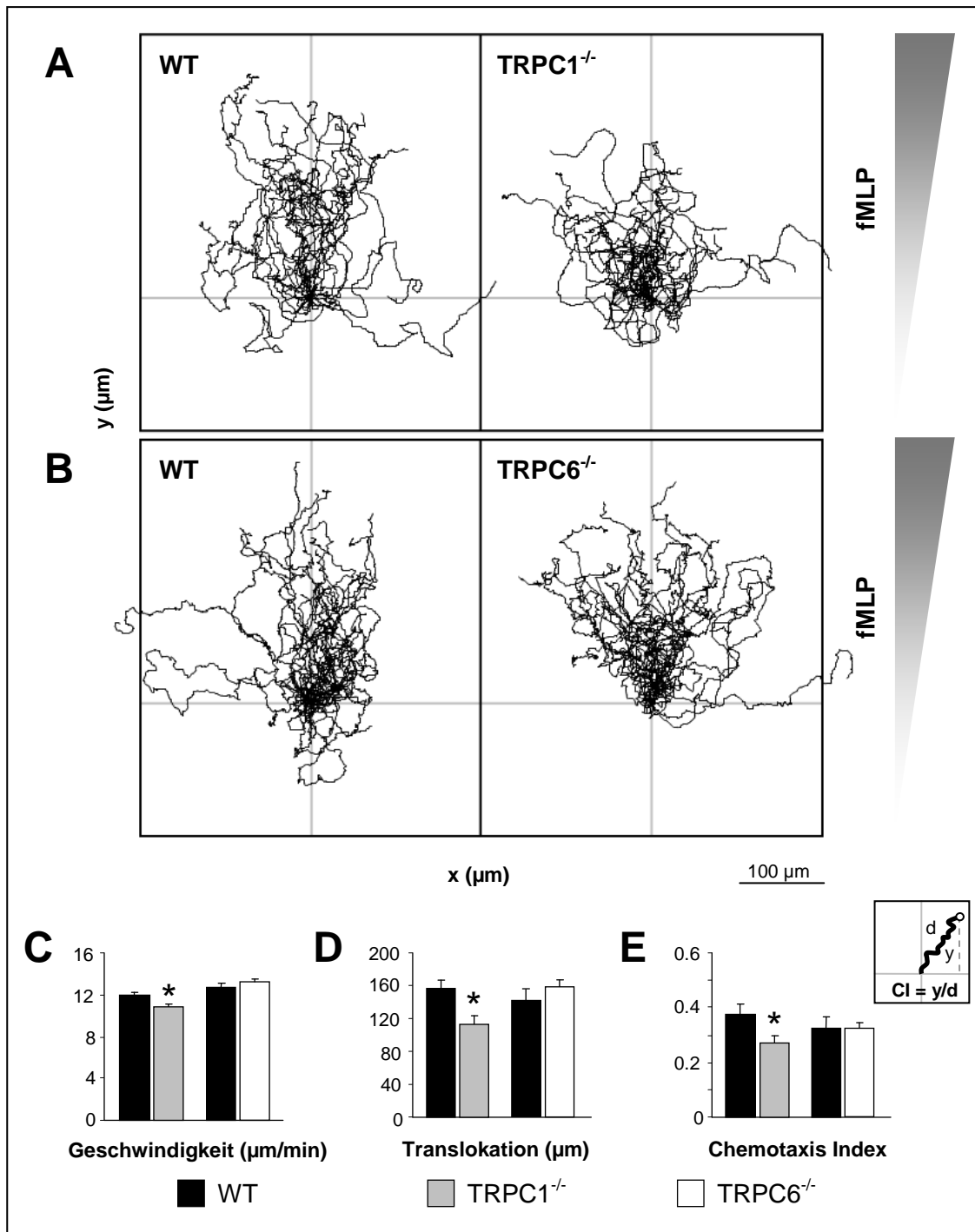
Die TRPC1<sup>-/-</sup> Mäuse sind lebensfähig und fertil mit einer normalen Lebenserwartung, wobei keine Unterschiede bezüglich der genotypischen Verteilung innerhalb der Würfe aus den heterozygoten Verpaarungen festgestellt werden konnten. Dabei waren die TRPC1<sup>-/-</sup>-Jungtiere im Vergleich zu den Wildtyp-Jungtieren etwas größer und schwerer wie vorher bereits beschrieben (45). Die TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse haben ebenso eine normale Lebenserwartung und Fertilität, wobei auch hier keine Unterschiede bezüglich der Wildtyp- zu *Knockout*-Verteilung innerhalb der Würfe aus den heterozygoten Verpaarungen nachgewiesen werden konnten. Bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Jungtieren konnten keine Auffälligkeiten bezüglich der Körpergröße und des Gewichtes festgestellt werden. Ein Vergleich der Blutbilder der TRPC6-defizienten Mäuse gegenüber den entsprechenden Wildtyp Mäuse ist in 3.5 aufgeführt.

### 3.2 *In vitro* Analyse fMLP-vermittelter *end-target* Chemotaxis

Für die *in vitro* 3D Chemotaxis-Experimente wurden ibidi  $\mu$ -Slide Chemotaxis-Kammern genutzt. Als *end-target* Chemokin wurde hier 1  $\mu$ M des bakteriell-abgeleiteten fMLP verwendet. In den 3D Chemotaxis-Experimenten zeigten die Wildtyp Neutrophilen eine Geschwindigkeit von 11,9  $\mu$ m/min, eine Translokation von 157  $\mu$ m innerhalb von 30 Minuten und einen Chemotaxis Index von 0,38 (siehe Abb. 15 A-E). Bei den TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen war die Geschwindigkeit mit 10,8  $\mu$ m/min gegenüber den Wildtyp-Zellen um 8%, die Translokation mit 113  $\mu$ m um 28% und der Chemotaxis Index mit 0,27 um 29% reduziert. Dagegen zeigte sich bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen in keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen (siehe Abb. 15 B-E).

Somit konnte für den TRPC1-Kanal ein Einfluss auf die fMLP-vermittelte Chemotaxis nachgewiesen werden, wogegen der TRPC6-Kanal nicht an der fMLP-vermittelten Chemotaxis beteiligt ist.





**Abbildung 15: In vitro 3D Migration in fMLP Gradienten**

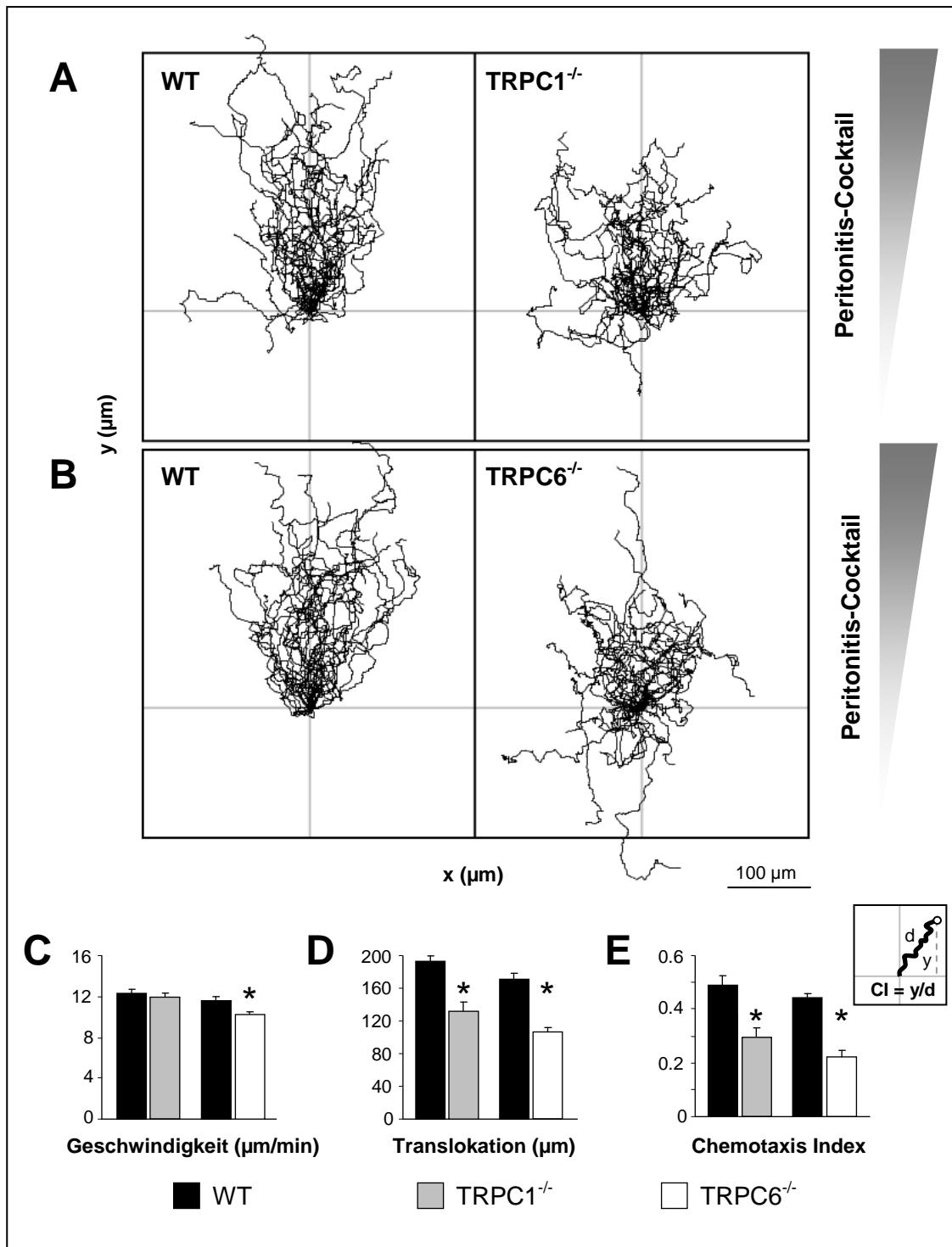
(A) Trajektorien von WT und zugehörigen TRPC1<sup>-/-</sup> oder (B) TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen. Jede Trajektorie beschreibt den zurückgelegten Weg einer einzelnen Zelle innerhalb des fMLP Gradienten. Die Konzentration vom fMLP nimmt hierbei in positiver y-Richtung zu. TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophile migrieren weniger gerichtet als zugehörige WT-Zellen. Bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Experimenten war kein Unterschied zwischen WT und *Knockout*- (KO) Zellen zu erkennen. Geschwindigkeit (C), Translokation (D) und Chemotaxis Index (E) waren in den TRPC1<sup>-/-</sup> gegenüber den WT-Experimenten vermindert, wogegen bei den TRPC6<sup>-/-</sup> kein signifikanter Unterschied zu Experimenten mit WT-Zellen zu erkennen war. Der Chemotaxis Index wurde hierbei als Quotient aus der Strecke in y-Richtung und der tatsächlich zurückgelegten Strecke d definiert. (n = 30 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. \* P < 0,05 mit Zweistichproben-t-Test.)

### 3.3 *In vitro* Analyse eines *ex vivo* Chemokin-Cocktails als intermediäres Chemokin

Um bei der Verwendung eines intermediären Chemokins in den *in vitro* Experimenten möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren, sollten diejenigen Chemokine verwendet werden, die Mäuse selbst während einer Entzündung produzieren. Hierfür wurde bei den Mäusen eine Peritonitis mit Casein induziert. Im Anschluss wurden die peritonealen Exsudate isoliert und der zellfreie Überstand als Chemokin-Cocktail in den *in vitro* 3D Chemotaxis-Experimenten verwendet. Wie in den Experimenten mit Wildtyp-Zellen in Abb. 16 A und B zu erkennen ist, stellte dieser Peritonitis-Cocktail ein sehr starkes Chemokin für die Neutrophilen dar. In den TRPC1-Experimenten zeigten die Wildtyp Neutrophilen eine Geschwindigkeit von 12,3  $\mu\text{m}/\text{min}$ , eine Translokation von 196  $\mu\text{m}$  innerhalb von 30 Minuten und einen Chemotaxis Index von 0,48 (siehe Abb. 16 C-E). Bei den TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen war die Geschwindigkeit mit 11,9  $\mu\text{m}/\text{min}$  gegenüber den Wildtyp-Zellen nicht verändert, die Translokation war dagegen aber mit 134,7  $\mu\text{m}$  um 31% und der Chemotaxis Index mit 0,29 um 40% reduziert. Ebenso war die Chemotaxis der TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen gegenüber den zugehörigen Wildtyp Zellen deutlich vermindert (siehe Abb. 16 B). Hier zeigten die Wildtyp Neutrophilen eine Geschwindigkeit von 11,6  $\mu\text{m}/\text{min}$ , eine Translokation von 170,7  $\mu\text{m}$  innerhalb von 30 Minuten und einen Chemotaxis Index von 0,44 (siehe Abb. 16 C-E). Bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen war die Geschwindigkeit mit 10,3  $\mu\text{m}/\text{min}$  gegenüber den Wildtyp-Zellen um 11%, die Translokation mit 106  $\mu\text{m}$  um 38% und der Chemotaxis Index mit 0,22 um 50% reduziert (siehe Abb. 16 C-E).

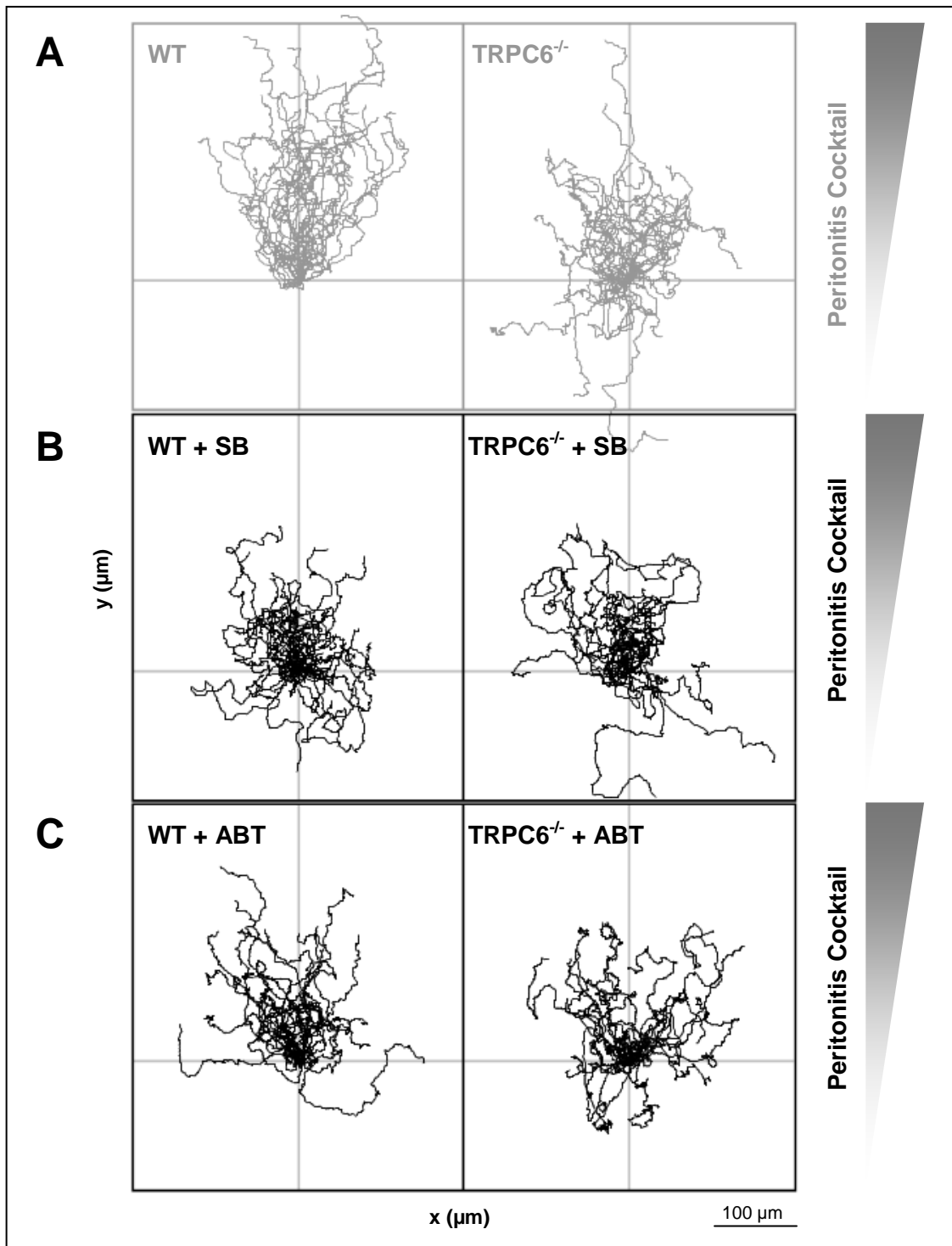
Bei der Verwendung dieses *ex vivo* Chemokin-Cocktails konnte somit sowohl für den TRPC1 als auch für den TRPC6 eine Beteiligung an der Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden.

Um zu klären, welche Chemokin-Rezeptoren bei der Chemotaxis in dem Peritonitis-Cocktail Gradienten beteiligt sind, wurden zwei wichtige Rezeptorwege für intermediäre Chemokine pharmakologisch inhibiert. CXCR2 (CXC-Motiv Chemokin Rezeptor 2) bindet eine große Zahl von Chemokinen wie KC, MIP-2 und LIX (*lipopolysaccharide (LPS)-induced CXC chemokine*) und bildet das murine Äquivalent zum humanen Interleukin-8-(IL-8)-Rezeptor (17; 140; 172). Als Inhibitor für den CXCR2 wurde SB 225002 verwendet (184). Darüber hinaus nutzen wir ABT-491, um den PAF-Rezeptor pharmakologisch zu inhibieren (89). PAF stellt einen weiteren wichtigen chemotaktisch wirksamen Entzündungsmediator dar (119; 128; 159; 196). Die Experimente mit diesen pharmakologischen Inhibitoren wurden ausschließlich an TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen und den zugehörigen Wildtyp-Zellen durchgeführt.



**Abbildung 16: *In vitro* 3D Migration in Peritonitis-Cocktail Gradienten**

(A) Trajektorien von Wildtyp und zugehörigen TRPC1<sup>-/-</sup> oder (B) TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen. TRPC1<sup>-/-</sup> und TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophile migrieren hier deutlich weniger gerichtet als zugehörige WT-Zellen. Translokation (D) und Chemotaxis Index (E) waren bei den TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen gegenüber den Experimenten mit WT-Zellen stark vermindert, bei den Experimenten mit TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen war zusätzlich die Geschwindigkeit (C) gegenüber den entsprechenden Experimenten mit WT-Zellen beeinträchtigt. (TRPC1<sup>-/-</sup>: n = 30 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten mit dem Peritonitis-Cocktail aus einer Maus. TRPC6<sup>-/-</sup>: n = 90 Zellen aus 9 unabhängigen Experimenten mit dem Peritonitis-Cocktail aus drei Mäusen. \*  $P < 0,05$  mit Zweistichproben-t-Test.)



**Abbildung 17: Chemotaxis in Peritonitis Cocktail Gradienten mit SB225002 und ABT-491**

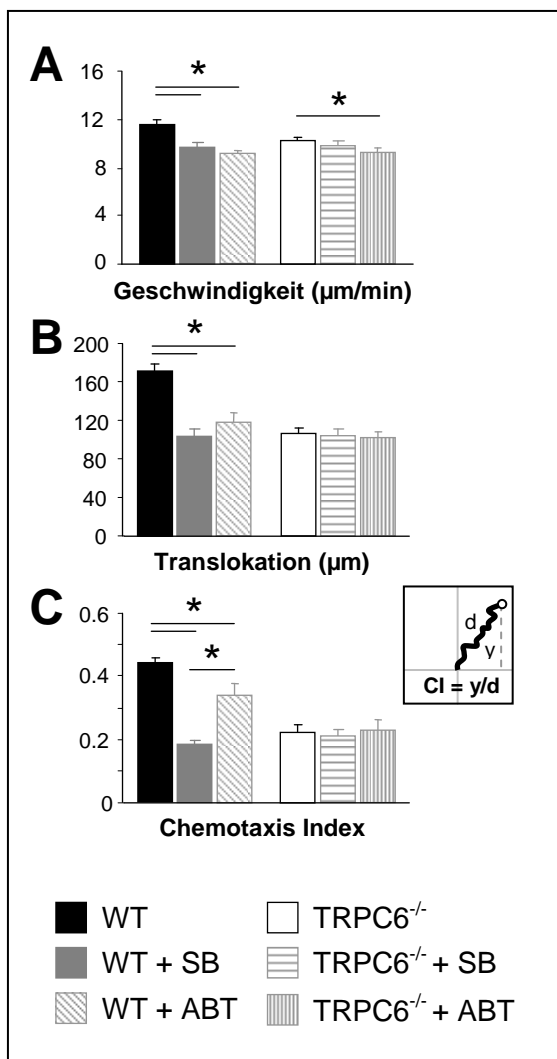
Zur Verdeutlichung des Effekts der beiden Inhibitoren sind in **(A)** erneut die Trajektorien von Wildtyp und TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen ohne Inhibition vom CXCR2 und PAFR dargestellt. Bei der Inhibition des CXCR2 durch 500 nM SB225002 **(A)** oder des PAFR durch 50 µM ABT-491 **(B)** war die Chemotaxis der Wildtyp-Zellen stark vermindert, wogegen beide Inhibitoren fast keinen zusätzlichen Effekt auf die stark verminderte Chemotaxis der TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen hatten. (n = 30 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten mit dem Peritonitis-Cocktail aus einer Maus.)

Bei Inhibition des CXCR2 durch SB225002 war die Chemotaxis auch in den Wildtyp Neutrophilen stark vermindert. Hier war die Geschwindigkeit mit  $9,7 \mu\text{m}/\text{min}$  um 16%, die Translokation mit  $94,2 \mu\text{m}$  innerhalb von 30 Minuten um 45% und der Chemotaxis Index mit  $0,18$  um 58% gegenüber den Experimenten mit Wildtyp-Zellen ohne Inhibition von CXCR2 reduziert. Dagegen führte SB225002 in den  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Zellen zu keiner weiteren Beeinträchtigung der Chemotaxis (siehe Abb. 17 und 18). Geschwindigkeit, Translokation und Chemotaxis Index waren dagegen in den Experimenten mit  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen und SB225002 gegenüber den Experimenten mit  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Zellen ohne pharmakologische Inhibition von CXCR2 nicht weiter vermindert.

Auch der PAF-Rezeptor Inhibitor ABT-491 beeinträchtigt die Chemotaxis bei den Wildtyp-Zellen. Allerdings war der Effekt hier weniger stark als bei der Inhibition vom CXCR2 (siehe Abb. 17 C). Die Geschwindigkeit war mit  $9,4 \mu\text{m}/\text{min}$  um 21%, die Translokation mit  $117,9 \mu\text{m}$  um 31% und der Chemotaxis Index mit  $0,33$  um 25% gegenüber den Experimenten mit WT-Zellen ohne Inhibition vom PAF-Rezeptor vermindert (siehe Abb. 18 A-C). ABT-491 hatte bei den  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Zellen praktisch keinen Effekt, hier war lediglich die Geschwindigkeit um 11% reduziert.

Damit wird deutlich dass der TRPC6 sowohl bei der CXCR2- als auch bei der PAFR-vermittelten Chemotaxis eine entscheidende Rolle spielt.

Geschwindigkeit (A), Translokation (B) und Chemotaxis Index (C) von unbehandelten sowie CXCR2-inhibierten (500 nM SB225002) oder PAFR-inhibierten (50  $\mu\text{M}$  ABT-491) Wildtyp und  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen. Beide Inhibitoren hatten einen stark reduzierenden Effekt auf die Chemotaxis der Wildtyp Neutrophilen, beeinflussten aber kaum die gerichtete Migration der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Zellen. (n  $\geq 30$  Zellen aus  $\geq 3$  unabhängigen Experimenten aus  $\geq 3$  Mäusen mit dem Peritonitis Cocktail aus  $\geq 2$  Mäusen. \*  $P < 0,05$  mit Zweistichproben-t-Test.)



**Abbildung 18: In-vitro Chemotaxis in Peritonitis Cocktail Gradienten bei Inhibition des PAFR und CXCR2**

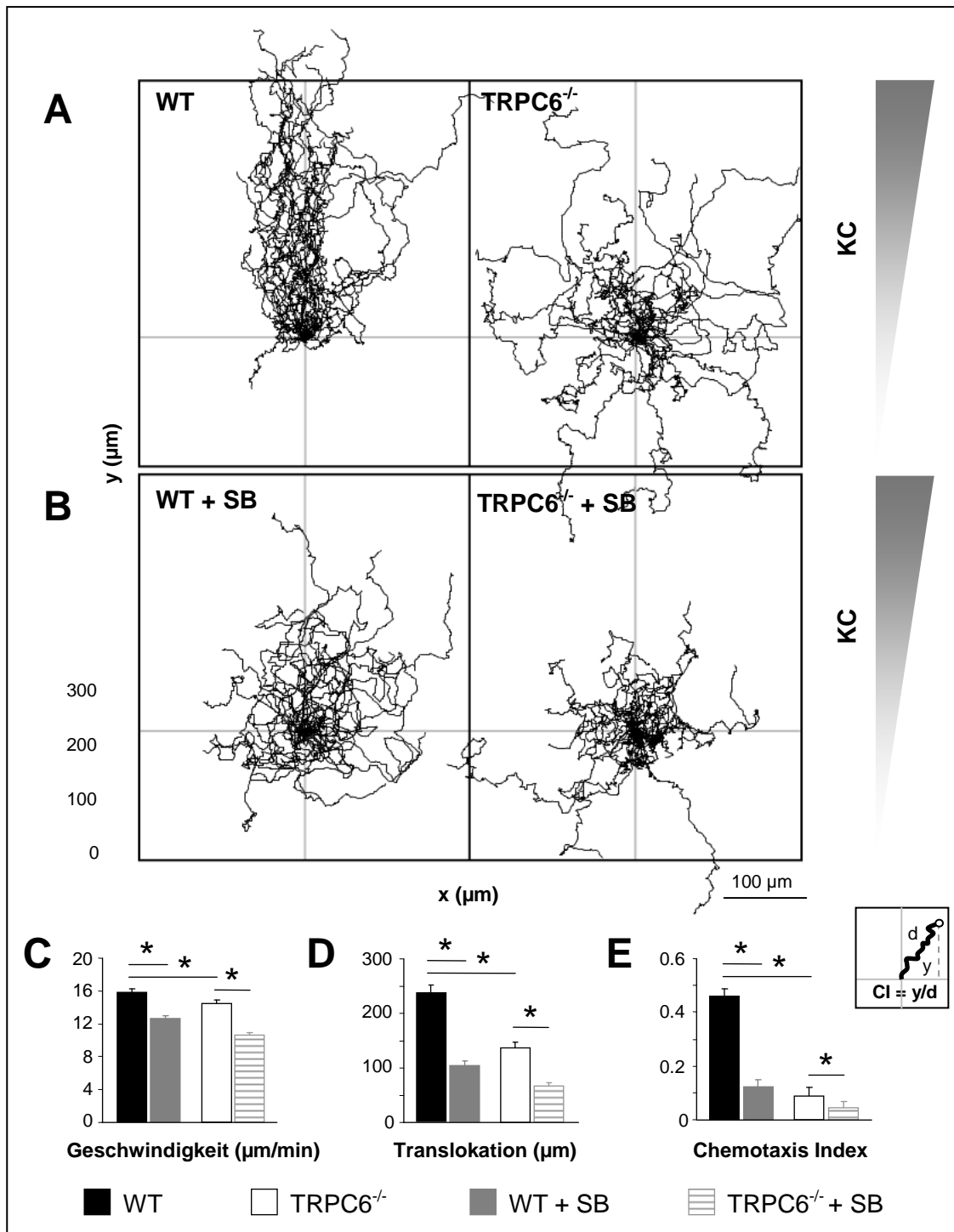
Geschwindigkeit (A), Translokation (B) und Chemotaxis Index (C) von unbehandelten sowie CXCR2-inhibierten (500 nM SB225002) oder PAFR-inhibierten (50  $\mu\text{M}$  ABT-491) Wildtyp und  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen. Beide Inhibitoren hatten einen stark reduzierenden Effekt auf die Chemotaxis der Wildtyp Neutrophilen, beeinflussten aber kaum die gerichtete Migration der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Zellen. (n  $\geq 30$  Zellen aus  $\geq 3$  unabhängigen Experimenten aus  $\geq 3$  Mäusen mit dem Peritonitis Cocktail aus  $\geq 2$  Mäusen. \*  $P < 0,05$  mit Zweistichproben-t-Test.)

### 3.4 *In vitro* Analyse KC-vermittelter intermediärer Chemotaxis

Um den Effekt bei der Chemotaxis mit dem Peritonitis-Cocktail auf ein einzelnes Chemokin einzugrenzen, wurden die *in vitro* Chemotaxis Experimente mit rekombinantem murinen KC reproduziert. KC stellt neben MIP-2 einen wichtigen Aktivator vom CXCR2 dar (172). Diese Experimente wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit ausschließlich mit TRPC6<sup>-/-</sup> und zugehörigen Wildtyp Neutrophilen durchgeführt. Allerdings konnten die Daten im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Sandra Schimmelpfennig (151) auch um die entsprechenden Experimente mit TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen erweitert werden. Diese Daten werden in der Diskussion (siehe 4.2) aufgeführt.

Die TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen in den KC Gradienten eine stark verminderte Chemotaxis (siehe Abb. 19 A). Dabei war die Geschwindigkeit der TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen gegenüber den Wildtyp Neutrophilen von 15,8 µm/min auf 14,5 µm/min um 8%, die Translokation von 235,7 µm auf 136,9 µm um 42% und der Chemotaxis Index von 0,45 auf 0,09 um 80% reduziert. Bei Inhibition des CXCR2 durch SB225002 war die Chemotaxis der Wildtyp-Zellen ebenfalls stark vermindert (siehe Abb. 19 B). Hierbei war gegenüber den unbehandelten Wildtyp-Zellen die Geschwindigkeit um 20% auf 12,6 µm/min, die Translokation um 57% und der Chemotaxis Index um 73% reduziert (siehe Abb. 19 C-E). Damit waren Geschwindigkeit und Translokation bei den SB225002-behandelten Wildtyp Neutrophilen gegenüber den unbehandelten TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen etwas stärker beeinflusst. Beim Chemotaxis Index gab es bei den CXCR2-inhibierten Wildtyp-Zellen keinen signifikanten Unterschied zu den TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen. Die Inhibition des CXCR2 bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen führte im Vergleich zu den unbehandelten TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen zu einer weiteren Reduktion der Geschwindigkeit um 16% auf 10,6 µm/min, der Translokation um 35% auf 66,5 µm und vom Chemotaxis Index um 64% auf 0,04. Damit waren die Werte dieser drei Parameter bei den CXCR2-inhibierten TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen niedriger als bei den SB225002-behandelten Wildtyp Neutrophilen. Hierbei ist aber besonders hinsichtlich des Chemotaxis Index zu beachten, dass der Effekt des CXCR2-Inhibitors SB225002 bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen viel weniger deutlich war als bei den CXCR2-inhibierten Wildtyp-Zellen. Deutlich wird hier auch, dass der Chemotaxis Index der CXCR2-inhibierten Wildtyp Neutrophilen auf einem Niveau mit dem Chemotaxis Index der unbehandelten TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen lag und die Inhibition des CXCR2 in den TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen gegenüber dem SB225002-Effekt in den Wildtyp-Zellen deutlich abgeschwächt war.

Bei der Betrachtung dieses einzelnen Rezeptorweges wird deutlich, dass die CXCR2-vermittelte Chemotaxis der Neutrophilen nahezu vollständig TRPC6-abhängig verläuft.

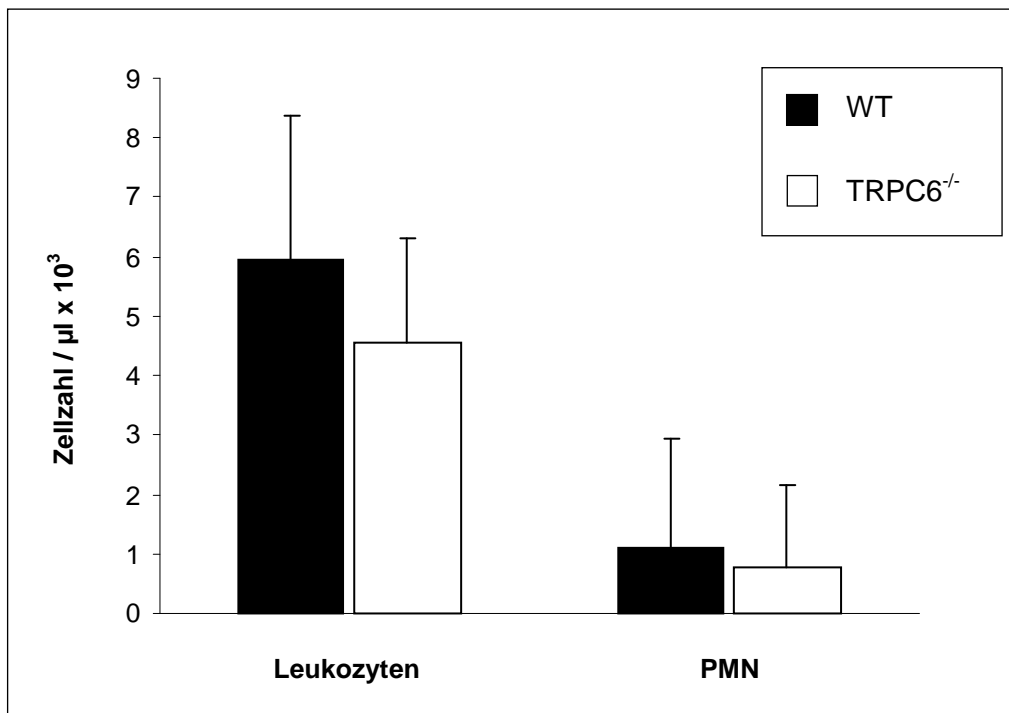


**Abbildung 19: In-vitro 3D Migration in KC Gradienten**

**(A)** Trajektorien von WT und zugehörigen TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen in 3 µg/ml KC Gradienten. TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen migrieren hier deutlich weniger gerichtet als zugehörige WT-Zellen. **(B)** Trajektorien von CXCR2-inhibierten WT und TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen. Die Chemotaxis von beiden Zelltypen war durch die Behandlung mit 500 nM SB225002 vermindert, wobei der Effekt in den WT-Zellen deutlicher war. **(C-E)** Geschwindigkeit, Translokation und Chemotaxis Index waren in den WT Neutrophilen mit SB 225002 gegenüber den WT-Zellen ohne SB225002-Behandlung stark reduziert. Die CXCR2-Inhibition beeinflusste auch die Chemotaxis der TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen, hier war der Effekt gegenüber den WT-Zellen jedoch deutlich schwächer. (n ≥ 60 Zellen aus ≥ 3 unabhängigen Experimenten. \* P < 0,05 mit Zweistichproben-t-Test.)

### 3.5 *In vivo* Chemotaxis bei der Casein-induzierten Peritonitis

Zur Reproduktion der *in vitro* Chemotaxis Daten sollte im Anschluss auch *in vivo* die Chemotaxis muriner Neutrophiler während einer peritonealen Entzündungsreaktion untersucht werden. Um im vornherein schon mögliche Unterschiede bei der Anzahl von Leukozyten und Neutrophiler Granulozyten im Blut zu erkennen, wurde In Vorbereitung auf diese *in vivo* Experimente Wildtyp und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen Blut entnommen und die enthaltene Anzahl von Leukozyten und Neutrophilen ermittelt (siehe Abb. 20). Wildtyp Mäuse hatten dabei etwa  $6 \times 10^3$  Leukozyten und  $1 \times 10^3$  Neutrophile im peripheren Blut. Die TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse hatten im Blut etwa  $4,5 \times 10^3$  Leukozyten und  $0,8 \times 10^3$  Neutrophile. Somit war die Gesamtzahl an Leukozyten im Blut der TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse leicht vermindert, die Anzahl und der relative Anteil der peripher zirkulierenden Neutrophilen waren aber gegenüber den Wildtyp Mäusen kaum verändert.



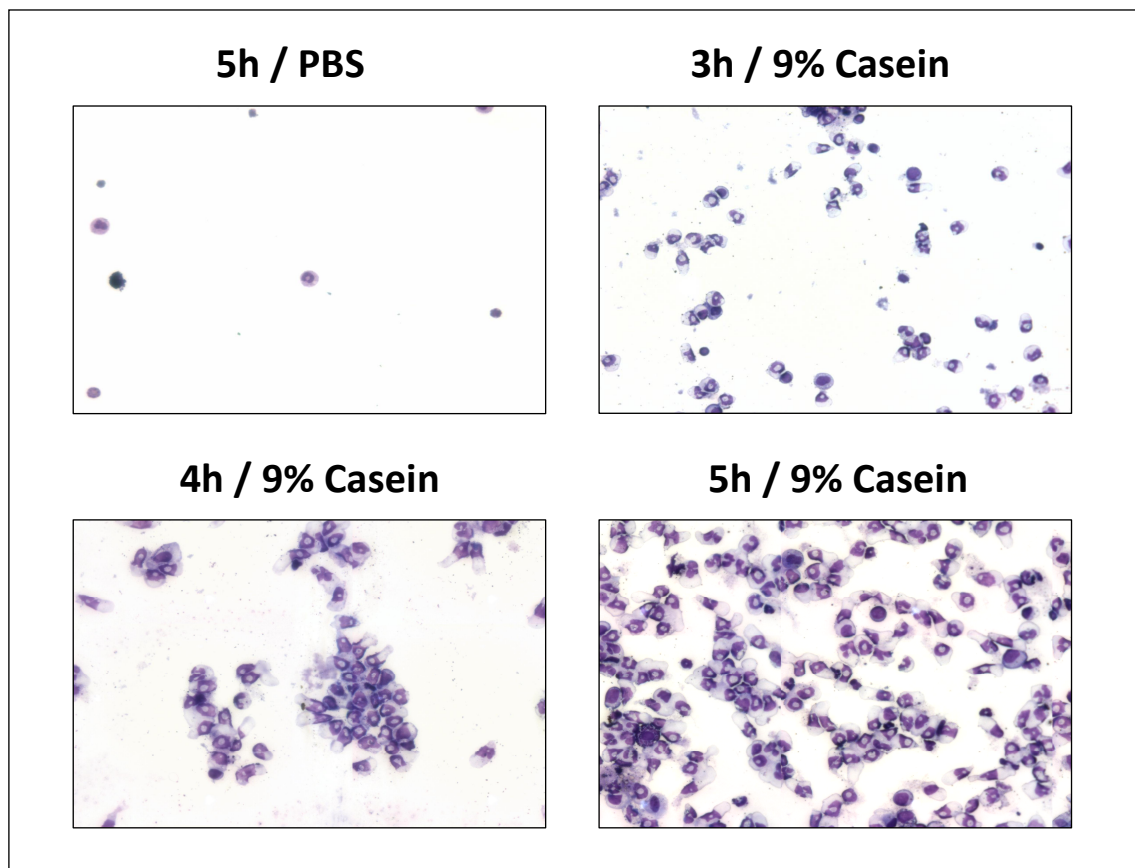
**Abbildung 20: Anzahl Leukozyten und Neutrophiler im Blut**

Die Zellzahl an Leukozyten war in den TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber den WT Mäusen leicht vermindert. Dagegen war bei der Anzahl Neutrophiler Granulozyten kein Unterschied zu erkennen. (n = 5 Mäuse)

Zur Untersuchung der *in vivo* Chemotaxis bei einer Entzündungsreaktion wurde durch Injektion einer 9%igen Casein-Lösung in das Peritoneum von Wildtyp und TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen eine aseptische Peritonitis induziert. Die in das Peritoneum eingewanderten Zellen wurden nach Einsetzen der Immunreaktion isoliert und die Gesamtzellzahl, bzw. der Anteil neutrophiler Granulozyten ermittelt. Um den idealen Zeitpunkt für eine Isola-



tion der Zellen festzustellen, wurde zunächst eine Zeitreihe mit C57BL/6 Wildtyp Mäusen gemacht (siehe Abb. 21). In Kontrollexperimenten, in denen den Mäusen nur PBS in das Peritoneum injiziert wurde, ließen sich auch nach 5 Stunden nur etwa  $3,5 \times 10^6$  Zellen im Peritoneum nachweisen, von denen lediglich  $0,04 \times 10^6$  Neutrophile waren. Nach der peritonealen Injektion der Casein-Lösung ließ sich sehr deutlich eine Zunahme der Zellzahl mit der Zeit erkennen. Hierbei wurde die größte Gesamtzellzahl nach 5 Stunden nachgewiesen ( $16,5 \times 10^6$ ). Davon entfielen etwa  $12,4 \times 10^6$  auf eingewanderte Neutrophile.

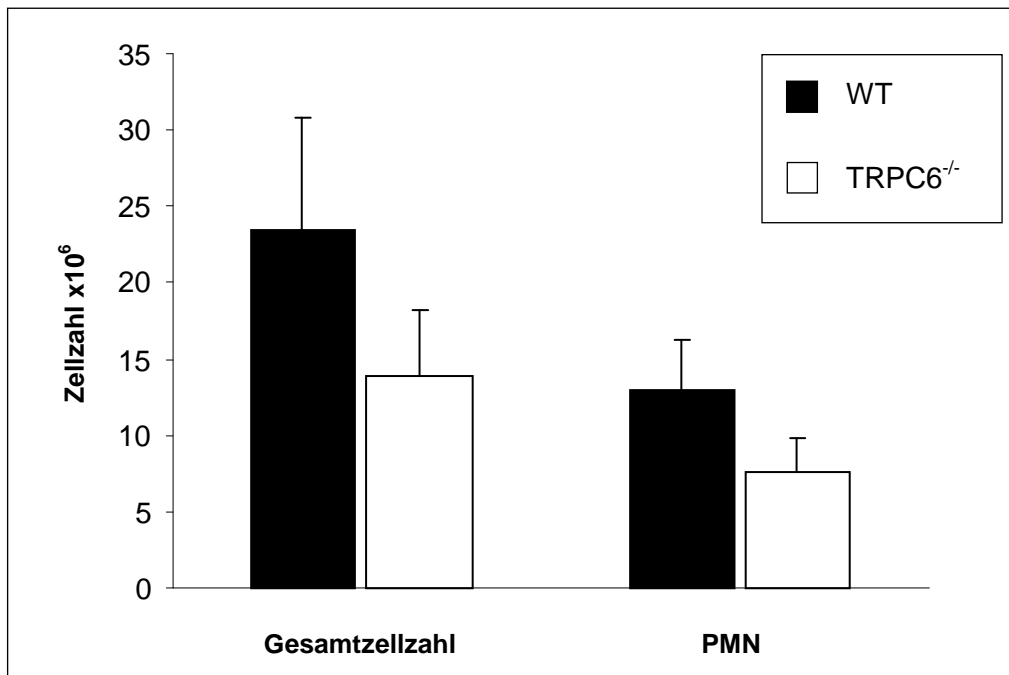


**Abbildung 21: Pappenheim Färbung von Zellen aus Peritonitis Zeitreihe mit Casein**

Wildtyp Mäusen wurde entweder nur PBS oder eine 9% Casein / PBS Lösung in das Peritoneum injiziert und die Zellen aus dem Peritoneum nach 3, 4 und 5 Stunden isoliert und quantifiziert. Nach der Injektion von Casein stieg mit der Zeit die Zellzahl, wogegen bei der PBS-Kontrolle kaum Zellen nachgewiesen werden können.

Im Anschluss wurden die Peritonitis Experimente mit TRPC6<sup>-/-</sup> und entsprechenden Wildtyp Mäusen durchgeführt. Hierbei waren sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Zahl der Neutrophilen aus den TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen immer deutlich geringer als die Zellzahlen aus den Wildtyp Mäusen (siehe Abb. 22). Somit waren nach Induktion einer aseptischen Peritonitis bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen nach 5 Stunden weniger Neutrophile in das Peritoneum eingewandert. Dieser Effekt kann nicht durch die geringere Gesamt-

zell-/Neutrophilen-Zahl im peripheren Blut der TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse erklärt werden sondern ist eine Folge der Deletion des TRPC6-Kanals.



**Abbildung 22: Anzahl Neutrophiler bei der Casein induzierten Peritonitis**

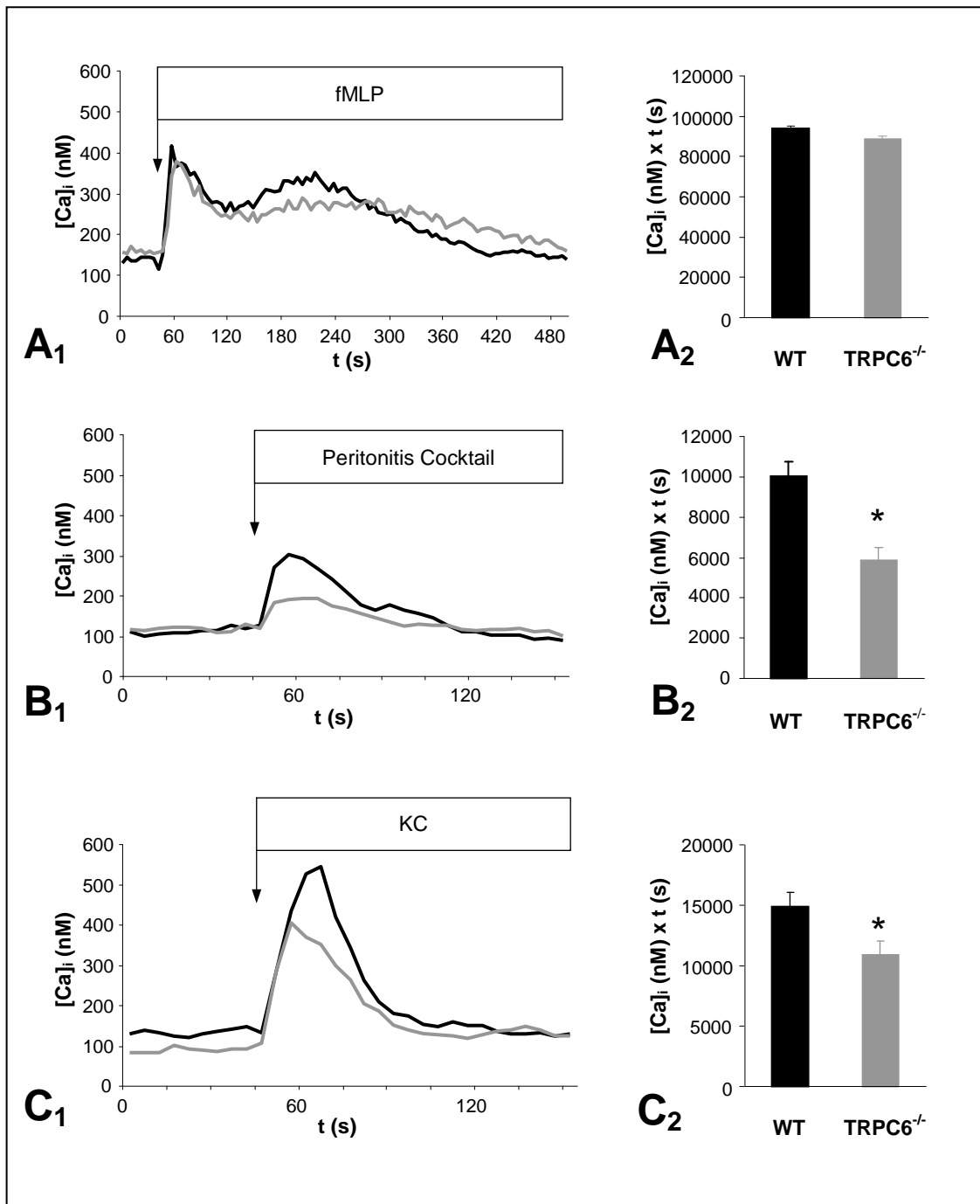
Sowohl die Gesamtzellzahl der bei der Peritonitis eingewanderten Zellen als auch die hieraus ermittelte Zahl der neutrophilen Granulozyten war bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber den Wildtyp Mäusen vermindert. (n = 4 Mäuse)

### 3.6 Messungen der zytosolischen Ca<sup>2+</sup> Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

Es konnte bereits mehrfach beschrieben werden, dass die Aktivierung von Signalkaskaden über Chemokin-Rezeptoren eine Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> mit einschließt (87; 122; 125; 131). Da die TRPC1<sup>-/-</sup> und die TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen in Abhängigkeit vom verwendeten Chemokin und damit auch in Abhängigkeit von der Aktivierung der Chemokin-Rezeptor Signalwege einen Chemotaxisdefekt aufweisen, sollte im Folgenden die TRPC-Kanal-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach chemokinetischer Stimulation der Neutrophilen untersucht werden. Um Aussagen über die Chemokin-Rezeptor-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung treffen zu können, wurde mittels Fura-2 die zytosolische Ca<sup>2+</sup> Konzentration bestimmt. Hierbei erfolgte nach einer Kontrollphase jeweils eine Applikation der bereits in den *in vitro* Chemotaxis Experimenten verwendeten Chemokine fMLP, Peritonitis-Cocktail oder KC. Diese Ca<sup>2+</sup>-Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen und den entsprechenden Wildtyp-Zellen durchgeführt.

Bei Zugabe der drei Chemoattraktanzien kam es zu einem transienten Ca<sup>2+</sup>-Signal mit steilem Aufstrich und flacher Regeneration. Das Ca<sup>2+</sup>-Signal bei Zugabe von 1µM fMLP

unterschied sich nicht in der Amplitude und nur wenig in der Länge des Signals bei den Wildtyp gegenüber den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen (siehe Abb. 23 A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>).



**Abbildung 23: Messungen der zytosolischen  $Ca^{2+}$  Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$**

(A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>) Zeitverlauf  $[Ca^{2+}]_i$  der Kontrollphase und bei Zugabe von 1  $\mu$ M fMLP, des Peritonitis-Cocktails oder 1  $\mu$ g/ml KC. Die Zeitachse in A<sub>1</sub> ist aufgrund des langen  $[Ca^{2+}]_i$ -Signals nach fMLP-Zugabe stark gestaucht dargestellt. (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>) Integrale der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Zugabe des jeweiligen Chemokins. Nach Stimulation der Zellen mit fMLP gab es keinen Unterschied im  $Ca^{2+}$  Signal von WT gegenüber TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen. Das  $Ca^{2+}$  Signal nach Zugabe des Peritonitis-Cocktails und von KC war in den TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen deutlich schwächer als in den Wildtyp Zellen. (n = 60 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0,05$  mit Zweistichproben-t-Test.)

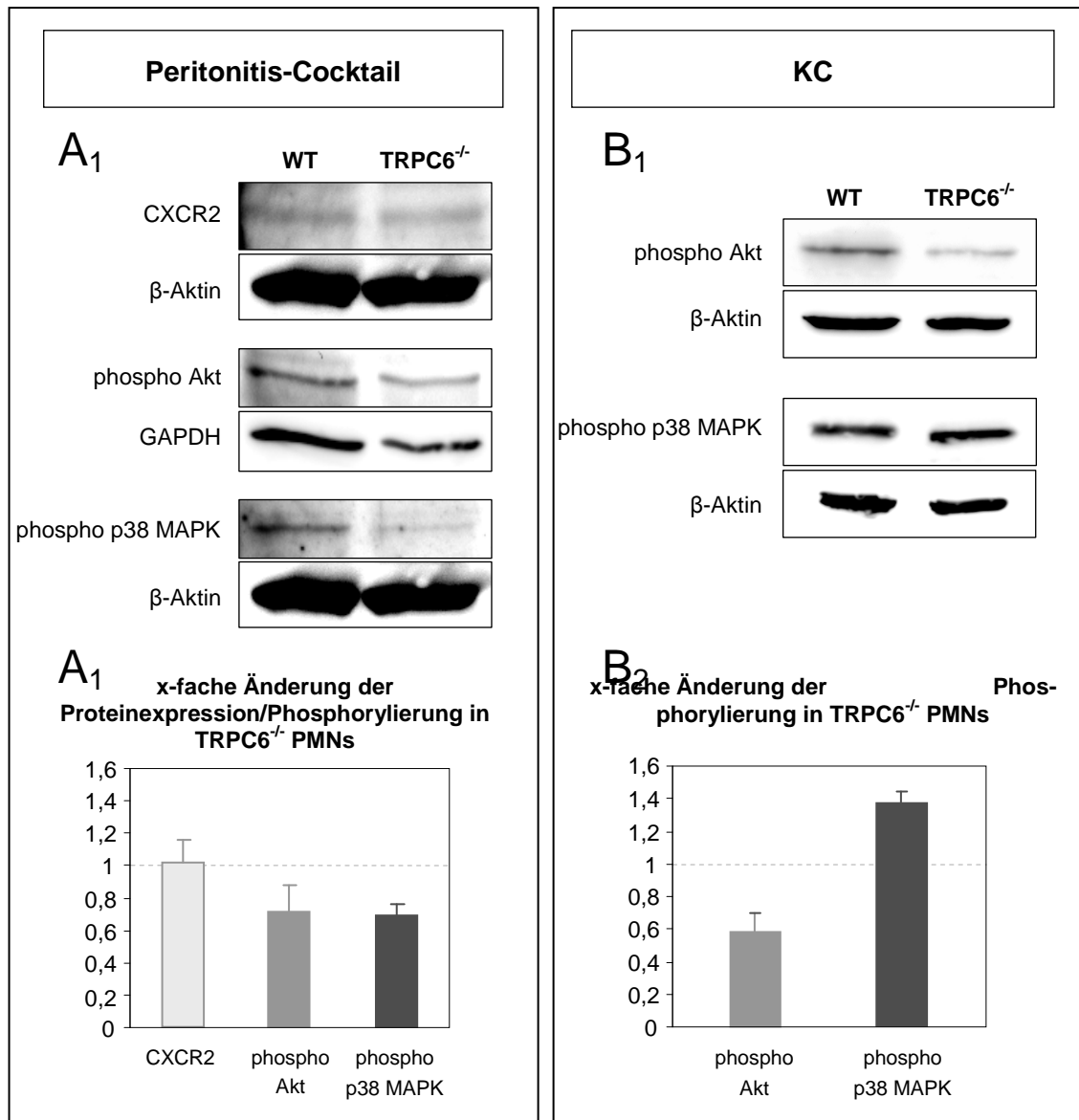
Die Applikation des Peritonitis-Cocktails in den Experimenten mit Wildtyp Zellen führte ebenso zu einem transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mit etwas kürzerer Dauer. Dieses Peritonitis-Cocktail-vermittelte Signal erfolgte auch bei den  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen, allerdings mit deutlich schwächerer Amplitude (siehe Abb. 23 B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>). Auf die Zugabe von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KC reagierten die Wildtyp Neutrophilen mit einem kurzen Signal mit großer Amplitude. Die  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen antworteten auf die Applikation von KC mit einem ähnlichen, aber deutlich schwächeren Signal (siehe Abb. 23 C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>).

Anhand der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Daten wird deutlich dass die FPR-vermittelte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  in neutrophilen Granulozyten  $\text{TRPC6}$ -unabhängig verläuft. Im Kontrast dazu ist die CXCR2-vermittelte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{TRPC6}$ -abhängig.

### 3.7 Biochemische Charakterisierung der CXCR2-Expression und CXCR2-vermittelter Signalkaskaden

Die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Migrationsdaten sowie der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Experimente wurden im Anschluss hinsichtlich der CXCR2 Expression und CXCR2-vermittelter Signalkaskaden auf proteinbiochemischer Ebene analysiert. Als Teil der CXCR2-induzierten Signalkaskaden sollte die Phosphorylierung von Akt (PKB) und der p38 MAPK quantifiziert werden. Hierfür wurden Wildtyp und  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophile entweder für 15 min mit dem Peritonitis-Cocktail oder für 1 min mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  KC stimuliert und anschließend lysiert. Im Anschluss wurde jeweils zwischen 20 und 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein mittels SDS PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Western Blot konnte die CXCR2 Expression sowie die Phosphorylierung von Akt und der p38 MAPK mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Eine semiquantitative, densitometrische Quantifizierung erfolgte über die ImageJ Software (63). Hierbei wurde zuerst die Intensität der einzelnen Banden ins Verhältnis zu den Intensitäten der zugehörigen *housekeeping*-Gen Banden gesetzt und im Anschluss die  $\text{TRPC6}^{-/-}$ -Banden im Vergleich mit den Wildtyp-Banden analysiert.

Bei den Peritonitis-Cocktail stimulierten Zellen unterschied sich die Expression vom CXCR2 nicht zwischen den Wildtyp und den  $\text{TRPC6}^{-/-}$ -defizienten Zellen (siehe Abb. 24 A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>). Dagegen konnte für die  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen gegenüber den Wildtyp Zellen eine Reduktion der Phosphorylierung sowohl von Akt als auch der p38 MAPK nachgewiesen werden. Bei den KC-stimulierten Zellen konnte in den  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen ebenso eine verminderte Phosphorylierung von Akt nachgewiesen werden (siehe Abb. 24 B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>). Die Phosphorylierung der p38 MAPK war nach KC-Stimulation dagegen in den  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen in Vergleich mit den Wildtyp Zellen erhöht.



**Abbildung 24: Western Blots mit Wildtyp und TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen**

**(A<sub>1</sub>)** Western Blots mit WT und TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen nach 15 min Stimulation mit dem Peritonitis-Cocktail. **(A<sub>2</sub>)** Semiquantitative Analyse der Proteinexpression/Phosphorylierung in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen nach 15 min Stimulation mit dem Peritonitis-Cocktail in Relation zu der jeweiligen Proteinexpression/Phosphorylierung in den WT Neutrophilen. Die Expression vom CXCR2 unterschied sich nicht in beiden Zelltypen, wogegen die Phosphorylierung von Akt und der p38 MAPK in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen vermindert waren. **(B<sub>1</sub>)** Western Blots mit WT und TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen nach 1 min Stimulation mit KC. **(B<sub>2</sub>)** Semiquantitative Analyse der Phosphorylierung in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen nach 1 min Stimulation mit KC in Relation zu der jeweiligen Phosphorylierung in den WT Neutrophilen. Die Phosphorylierung von Akt war bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen gegenüber den WT Zellen vermindert. Dagegen war die Phosphorylierung der p38 MAPK in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen gegenüber den WT Zellen erhöht. (CXCR2: n = 2, phospho Akt und phospho p38 MAPK: jeweils n = 3)

## 4 Diskussion

Die Migration von Zellen und insbesondere die Chemotaxis spielen bei einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse eine wichtige Rolle. Besonders hinsichtlich der Therapie von Krankheiten ist das grundlegende Verständnis der an der Zellmigration und Chemotaxis beteiligten Mechanismen von essentieller Bedeutung. Mechanistisch lassen sich die gerichtete und die ungerichtete Migration nicht gänzlich voneinander trennen, da einzelne Komponenten wohl an beiden Prozessen beteiligt sind. Dennoch bedarf besonders die gerichtete Migration eines feinsensorischen Signalkomplexes, der in der Lage ist, ein Chemoattraktanz-Signal zu erkennen und dieses innerhalb der Zelle in Signalkaskaden zu übersetzen, die dann eine adäquate Reaktion der Zelle bedingen. Gerade weil viele verschiedene Zellen bei unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zur Migration befähigt sind, ist es sehr schwierig, ein allgemeingültiges Modell für das Zusammenspiel der Mechanismen für die gerichtete und ungerichtete Migration zu entwickeln. Allerdings gibt es zahlreiche Hinweise für die Beteiligung einzelner Komponenten innerhalb dieses Signalkomplexes. So konnte mehrfach eine Beteiligung der PI3K und ihres Signalproduktes  $\text{PIP}_3$  sowohl für den Motor- als auch für den Kompass-Mechanismus bei der Zellmigration nachgewiesen werden (83; 112). Auch die Rho-GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42 (59) sowie die PLC,  $\text{PLA}_2$ , MAPK und PKC (122; 185) sind wichtige Bestandteile von Chemoattraktanz-Signalkaskaden. Die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  nach der Aktivierung von Chemoattraktanz-Rezeptoren gilt dabei als Schlüsselkomplex innerhalb intrazellulärer Signalkaskaden während der Chemotaxis (87; 122; 131). Wie bei vielen anderen zellphysiologischen Prozessen spielt  $\text{Ca}^{2+}$  auch bei der Chemotaxis eine wichtige regulatorische Rolle.

So fördert  $\text{Ca}^{2+}$  am Vorderende der Zelle unter anderem über den MAPK-Weg (194; 195) die Polymerisation von Aktin (38) oder begünstigt die Akkumulation von  $\text{PIP}_2$  (109) als Substrat für die PLC oder die PI3K.  $\text{Ca}^{2+}$  katalysiert darüber hinaus am Hinterende der Zelle über Calpaine das Lösen von Integrin-Matrix-Interaktionen (64) und über die Phosphorylierung der MLCK das Nachziehen des Uropods (94).

Innerhalb der letzten Jahre gab es einige Hinweise für die Beteiligung einzelner Mitglieder der TRPC-Kanal-Familie an der gerichteten Zellmigration. So konnten Schilling et. al. 2009 TRPC1 und TRPC6 als Bestandteil der LPC-induzierten Chemotaxis von Monozyten nachweisen, allerdings ohne näher auf die möglichen Mechanismen der Aktivierung dieser TRP-Kanäle einzugehen (150). Damann et. al. konnten 2008 eine

Beteiligung von TRPC6 an CXC-Rezeptor-vermittelten Signalkaskaden feststellen und dabei einen Einfluss auf die Reorganisation des Zytoskeletts nachweisen (39). Fabian et. al. beschrieben 2011 eine Beteiligung von TRPC1 an der FGF-2 stimulierten Chemotaxis von Epithelzellen (52). Hierbei konnte auch eine PLC- und PI3K-abhängige Aktivierung des TRPC1-Kanals nachgewiesen werden. Somit gibt es bereits einige Hinweise für eine Beteiligung verschiedener Mitglieder der TRP-Kanal-Familie an der gerichteten Migration, eine genaue Rolle dieser Kanäle im Signalkomplex der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten blieb aber bisher weitgehend ungeklärt.

#### 4.1 TRPC1 reguliert fMLP-induzierte Chemotaxis

Die Formyl-Peptid Rezeptoren mit fMLP als Ligand gehören zu den am häufigsten in der Literatur beschriebenen Chemoattraktanz-Rezeptoren (100; 125; 131). Das bakterielle Formyl-Peptid fMLP wird seinem Ursprung nach in die Gruppe der *end-target* Chemoattraktanzien eingeordnet und leitet Immunzellen wie die Neutrophilen Granulozyten beim Eindringen von Pathogenen direkt zum Herd einer Entzündung.

Bei den Experimenten zur fMLP-induzierten Chemotaxis mit TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen konnte klar eine Verminderung der Chemotaxis der TRPC1<sup>-/-</sup> gegenüber den Wildtyp Zellen nachgewiesen werden. Dagegen ließ sich kein Unterschied zwischen den TRPC6<sup>-/-</sup> und Wildtyp Neutrophilen bei der Chemotaxis in fMLP-Gradienten feststellen. Hieraus lässt sich schließen, dass der TRPC1 am FPR-Signalweg beteiligt ist, wogegen ein Einfluss des TRPC6-Kanals hier nicht nachgewiesen werden kann. Die Daten zur Messung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach fMLP-Stimulation bestätigen diese Interpretation. Es war im Vergleich zwischen TRPC6<sup>-/-</sup> und Wildtyp Neutrophilen kein Unterschied bei der Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> zu erkennen, so dass eine Beteiligung des TRPC6-Kanals am fMLP-Signalweg ausgeschlossen werden kann. Wie dagegen der TRPC1-Kanal in FPR-vermittelte Signalkaskaden verschaltet ist, lässt sich anhand der vorliegenden Arbeit nur schwer erklären, da in der vorliegenden Studie nur zellmigratorische Daten zu den TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen erfasst wurden. Allerdings gibt es in der Literatur einige Befunde, die zusammengenommen einen möglichen Erklärungsansatz liefern.

Der TRPC1-Kanal gilt als SOCE-Kanal (3; 4; 193), obwohl diese Theorie auch kontrovers diskutiert wird (42). In Neutrophilen ist die PI3K für die fMLP-induzierten Chemotaxis nicht essentiell. Vielmehr erfordert die effiziente Chemotaxis sehr wahrscheinlich den p38 MAPK-Signalweg (70). Heit et. al. konnten zwar in ihren Untersuchungen auch eine Rolle für die PI3Kγ bei der FPR-vermittelten Chemotaxis nachweisen, diese ist hier aber weniger an der Chemotaxis als vielmehr an der effektiven Ad-

häsion und Emigration der Neutrophilen beteiligt (70). Die Rezeptor-gesteuerte und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges konnte mehrfach und in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden (101; 194; 195). Chen et. al. zeigten darüber hinaus, dass die FPR-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK PLC-abhängig über einen Anstieg von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aus internen Speichern induziert wird (32). Garcia et. al. konnten dagegen demonstrieren, dass Arachidonsäure zur Aktivierung der p38 MAPK und Phosphorylierung von hsp27 führt (61). Hierbei könnte die lokale Polymerisation von Aktin über hsp27 gefördert werden (38; 61). Die Arachidonsäure-Produktion wird von der  $\text{PLA}_2$  katalysiert, wobei für die Aktivierung der  $\text{PLA}_2$  wiederum auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit nachgewiesen werden konnte (171; 185). Liu et. al. zeigten dabei, dass die  $\text{PLA}_2$ -generierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle die p38 MAPK aktiviert (105).

Aufgrund dieser Befunde wäre es möglich, dass die Ligandenbindung des FPR zu einer Aktivierung der PLC führt, welche  $\text{IP}_3$  und DAG aus  $\text{PIP}_2$  hydrolysiert.  $\text{IP}_3$  bindet an den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum und ruft so einen Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER hervor. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aktiviert STIM1, wodurch die Formation und Aktivierung eines CRAC-Kanals begünstigt wird und es zu einer zusätzlichen Mobilisierung von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  kommt (siehe Abb. 25). TRPC1 könnte hier möglicherweise zur Bildung und Aktivität von CRAC-Kanalproteinen in Verbindung mit Orai oder anderen TRPC-Kanälen beitragen (3; 33; 93). In den  $\text{TRPC1}^{-/-}$  Neutrophilen würde dann der TRPC1-Kanal als regulatorische Komponente der CRAC-Kanäle fehlen und es so möglicherweise nicht zu einem TRPC1 vermittelten SOCE kommen. Hierdurch würde es in den  $\text{TRPC1}^{-/-}$  Neutrophilen nach FPR-Aktivierung zu einer reduzierten Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  kommen, was möglicherweise zu einer verminderten Aktivierung von Signalkomponenten des FPR-Signalweges führen würde.

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass die verminderte Expression einer der verantwortlichen CRAC-Kanalkomponenten, Orai1, die initiale Adhäsion und Polarisierung von Neutrophilen auf Fibroblasten verlangsamt und die zugrundeliegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale abschwächt (147). Dies unterstreicht die zentrale Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten.



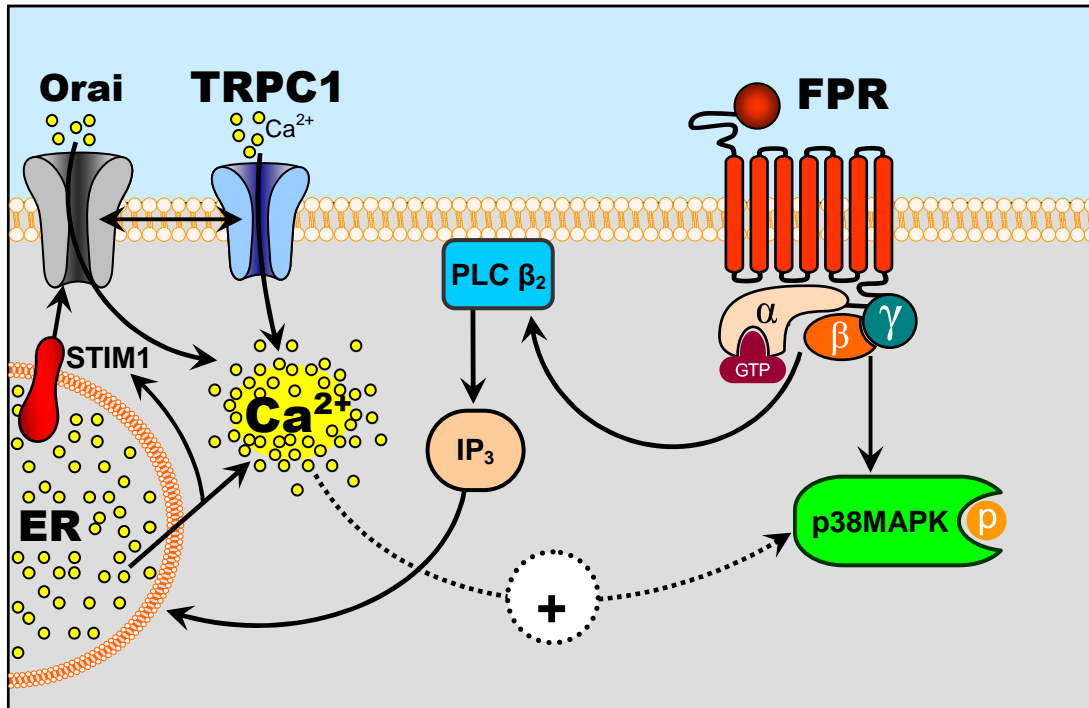


Abbildung 25: Modell für die FPR-vermittelte Aktivierung von TRPC1

Die Bindung von fMLP an den FPR führt zu einer Aktivierung der PLC und Bildung von IP<sub>3</sub>. Der durch IP<sub>3</sub> vermittelte Ca<sup>2+</sup> Ausstrom aus dem ER begünstigt eine Verlagerung von STIM1 in Zellmembran-nahe Bereiche des ER, wodurch eine Interaktion von STIM1 mit Orai ermöglicht wird. Diese Aktivierung von Orai führt zu einem CRAC-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, an dem TRPC1 möglicherweise beteiligt ist. Diese Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> begünstigt die Aktivierung anderer Signalproteine wie der p38 MAPK.

Dieses Modell für die Aktivierung von TRPC1 über den FPR bedarf noch der experimentellen Verifizierung. So ist z.B. nicht bekannt, ob sich die FPR-generierte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in den TRPC1<sup>-/-</sup> gegenüber den Wildtyp Neutrophilen unterscheidet. Also ist auch nicht bekannt, inwieweit der TRPC1-Kanal tatsächlich über einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom zu der fMLP-induzierten Chemotaxis beiträgt. Gleiches gilt für die Aktivität einzelner Bestandteile der FPR-vermittelten Signalkaskade wie z.B. der p38 MAPK in beiden Zelltypen. Dennoch sind die vorliegenden *in vitro* Chemotaxis-Daten ein erster und wichtiger Hinweis für eine spezifische Beteiligung des TRPC1 an der fMLP-induzierten Chemotaxis von murinen Neutrophilen.

## 4.2 TRPC1 und TRPC6 regulieren intermediäre Chemotaxis

Während einer pathogenen Entzündungsreaktion werden neben den *end-target* Chemoattraktanzien auch körpereigene intermediäre Chemokine gebildet, die Zellen des Immunsystems ebenfalls in Richtung des Entzündungsherds leiten und in Konkurrenz mit den pathogenen *end-target* Chemoattraktanzien treten. Heit et. al. beschrieben 2002 bei Neutrophilen eine intrazelluläre Signal-Hierarchie in entgegengesetzten Chemoattraktanz-Gradienten, wobei *end-target* Chemoattraktanzien vorwiegend den p38 MAPK Weg aktivieren und dabei den PI3K/Akt-Signalweg inhibieren, der vorwiegend von intermediären Chemoattraktanzien initiiert wird (72). Für den TRPC1-Kanal konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung an der fMLP-induzierten *end-target* Chemotaxis nachgewiesen werden, wogegen der TRPC6-Kanal an diesem FPR-Signalweg nicht beteiligt ist. Daher war es im Folgenden von Interesse, inwieweit der TRPC1 und der TRPC6 an der Chemotaxis mit intermediären Chemoattraktanzien beteiligt sind.

Bei der Verwendung des *ex vivo* Chemokin-Cocktails war die Chemotaxis sowohl der TRPC1<sup>-/-</sup> als auch der TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen stark vermindert, wobei dieses Defizit bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen stärker ausgeprägt war. Um die Beteiligung der beiden untersuchten TRPC-Kanäle an der durch diesen Chemokin-Cocktail induzierten Chemotaxis zu verstehen, war es wichtig, mögliche Komponenten und vor allem die beteiligten Rezeptoren für diesen Chemokin-Cocktail zu identifizieren. Wie genau das Milchprotein Casein zu einer Bauchfellentzündung führt, ist bisher nicht bekannt. Metcalf et. al. haben erstmals nachgewiesen, dass die intraperitoneale Injektion von Casein die Produktion von GM-CSF induziert und diese mit der Invasion von Neutrophilen korreliert (114). Sugimoto et al. konnten darüber hinaus zeigen dass Casein über Prostaglandin E<sub>2</sub> die GM-CSF Produktion bei Neutrophilen stimuliert (164). Somit scheint Casein die Produktion von Entzündungsmediatoren über peritoneale Makrophagen oder eingewanderte neutrophile Granulozyten zu stimulieren. Für beide Zelltypen ist bekannt, dass sie nicht nur in der Lage sind, Pathogene phagozytotisch zu beseitigen, sondern selbst auch verschiedene Entzündungsmediatoren zu produzieren und so weitere Immunzellen chemotaktisch zu rekrutieren. So produzieren Neutrophile neben GM-CSF unter anderem auch Chemoattraktanzien wie TNF $\alpha$ , KC, MIP-2 und PAF (29; 86; 175).

Um die möglichen Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten *ex vivo* Chemokin-Cocktails einzugrenzen, wurden bei den Experimenten mit TRPC6<sup>-/-</sup> und den entsprechenden Wildtyp Neutrophilen Inhibitoren für den CXCR2 und den PAFR eingesetzt. Der CXCR2 stellt in der Maus einen wichtigen Chemokin-Rezeptor dar, der mehrere

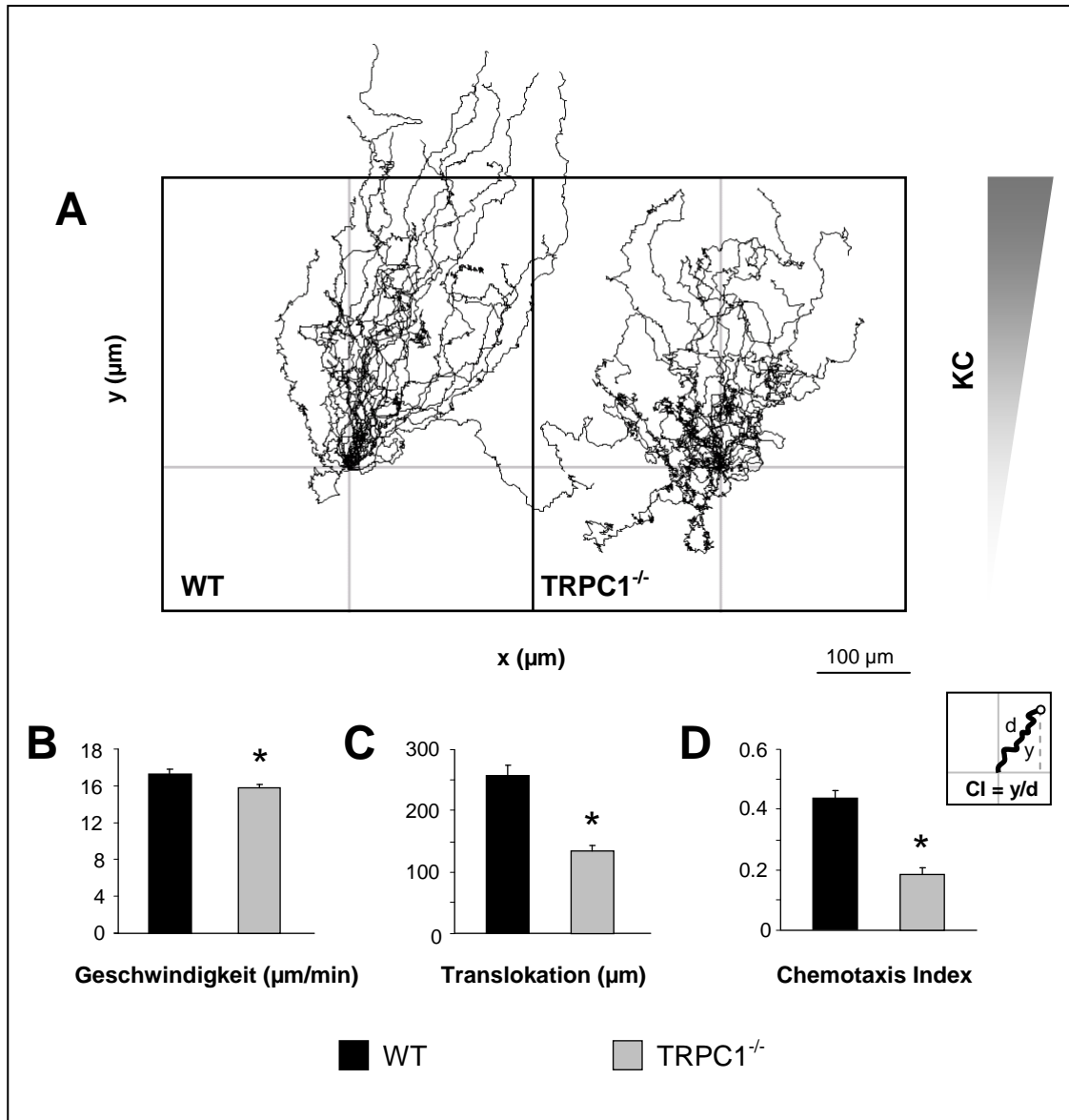
Chemokine wie KC, MIP-2 und LIX binden kann (17; 172). Die beiden eingesetzten Inhibitoren verminderten die Aktivität der Wildtyp-Zellen bezüglich Geschwindigkeit, Translokation und Chemotaxis Index, wobei sich der CXCR2-Blocker dabei als der effektivere Chemotaxis-Inhibitor erwies. Dagegen zeigten beide Rezeptor-Inhibitoren fast keinen Effekt bezüglich der Aktivität der TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen. Diese Experimente lassen den Schluss zu, dass die Effekte des Chemokin-Cocktails zumindest partiell über den CXCR2 und den PAFR vermittelt werden. Da im Gegensatz zu den Wildtyp Zellen beide Inhibitoren die Migration der TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen kaum beeinflussten, ist davon auszugehen, dass der TRPC6 am Rezeptor-Signalweg sowohl des PAFR als auch des CXCR2 beteiligt ist. Zusätzlich zeigt der quantitative Vergleich der Effekte der beiden Inhibitoren, dass CXCR2-Liganden zumindest chemotaktisch eine größere Rolle bei diesen Chemokin-Cocktail Experimenten spielen als PAF.

Um den Chemotaxis-Defekt der TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen bei der Stimulation mit dem Chemokin-Cocktail genauer zu charakterisieren, wurden die 3D *in vitro* Chemotaxis Experimente auf einen einzelnen Rezeptor und seinen spezifischen Aktivator beschränkt. KC, als muriner Verwandter des humanen GRO $\alpha$ , diente hier als direkter Aktivator des CXCR2 (18). Auch in KC Gradienten zeigten die TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen weniger Aktivität als die Wildtyp Zellen. Insbesondere die Chemotaxis war fast vollständig gehemmt und somit wesentlich stärker beeinträchtigt als bei den Chemokin-Cocktail-stimulierten TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass neben den CXCR2 Liganden in dem *ex vivo* Chemokin-Cocktail noch weitere Chemoattraktanzien enthalten waren, die über andere Rezeptorwege Lockstoffe für die Neutrophilen darstellten. Somit wären die TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen in dem Chemokin-Cocktail Gradienten von mehreren Chemoattraktanzien und damit über mehrere Chemoattraktanz-Rezeptor-Signalwege geleitet worden, wobei der TRPC6 möglicherweise nicht bei allen beteiligten Rezeptor-Signalwegen eine Rolle spielte. Dies begründet auch, dass der CXCR2-Inhibitor bei den Experimenten, bei denen ausschließlich KC als CXCR2 Ligand eingesetzt wurde, einen deutlich stärkeren Effekt erzielte als in den Experimenten, bei denen der Chemokin-Cocktail verwendet wurde.

Auffällig ist aber ein gewisser additiver Effekt zwischen dem TRPC6-*Knockout* und der CXCR2-Inhibition nach Stimulation mit KC. Dies zeigt, dass der TRPC6 nicht die alleinige regulatorische Komponente bei der CXCR2 Signaltransduktion darstellt, da man durch Inhibition des CXCR2 die Aktivität der TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen noch weiter reduzieren kann. Es ist nicht auszuschließen, dass durch das Ausschalten des TRPC6-Kanals die Regulation oder auch Expression anderer Komponenten des migratorischen oder chemotaktischen Apparates beeinflusst worden sind. Der TRPC6-*Knockout* könnte auch die Expression weiterer TRP-Kanäle in den Neutrophilen begünstigt haben,

wobei für die TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse bereits eine Überexpression des TRPC3-Kanals gezeigt werden konnte (46). Allerdings kann eine Veränderung der CXCR2-Expression durch das Ausschalten des TRPC6-Kanals ausgeschlossen werden. Es war kein Unterschied bei der Expression des CXCR2 in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen im Vergleich zu den Wildtyp Zellen zu erkennen.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Sandra Schimmelpfennig (151) konnte die Chemotaxis mit KC ebenfalls bei TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen und den entsprechenden Wildtyp Zellen analysiert werden (siehe Abb. 26). Hier war wie bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen die Chemotaxis der TRPC1<sup>-/-</sup> Zellen gegenüber den Wildtyp Neutrophilen vermindert. Dabei zeigten die Wildtyp Neutrophilen eine Geschwindigkeit von 17,3 µm/min, eine Translokation von 257 µm innerhalb von 30 Minuten und einen Chemotaxis Index von 0,44. Bei den TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen war die Geschwindigkeit mit 15,8 µm/min gegenüber den Wildtyp-Zellen um 9%, die Translokation mit 135 µm um 47% und der Chemotaxis Index mit 0,19 um 57% reduziert. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen der Chemotaxis mit KC bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen, einzig der Chemotaxis Index ist bei den TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen weniger stark reduziert als bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen. Damit wird deutlich, dass neben dem TRPC6 auch der TRPC1 eine regulatorische Rolle bei CXCR2-vermittelten Signalkaskaden spielt. Allerdings scheint der TRPC6-Kanal bei der durch intermediäre Chemokine induzierten Chemotaxis die entscheidende Rolle zu spielen.



**Abbildung 26: In-vitro 3D Migration in KC Gradienten TRPC1<sup>-/-</sup>**

**(A)** Trajektorien von WT und zugehörigen TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen in 3 µg/ml KC Gradienten. TRPC1<sup>-/-</sup> Zellen migrieren hier weniger gerichtet als zugehörige WT-Zellen. **(C-E)** Geschwindigkeit, Translokation und Chemotaxis Index waren in den TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen gegenüber den WT-Zellen reduziert. (n ≥ 60 Zellen aus ≥ 3 unabhängigen Experimenten. \* P < 0,05 mit Zweistichproben-t-Test.) [verändert nach (151)]

### 4.3 TRPC1 und TRPC6 als Teil CXCR2-vermittelter Signalkaskaden

Um einen weiteren Einblick in die Funktion des TRPC6-Kanals bei CXCR2-generierten Signalkaskaden zu bekommen, wurde die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Stimulation der Zellen mit der entsprechenden Chemoattraktanz bestimmt. Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Messungen mit den beiden intermediären Chemoattraktanzien zeigen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nach Stimulation mit dem Chemokin-Cocktail oder mit dem CXCR2-Aktivator KC bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen gegenüber den Wildtyp Zellen vermindert war. Die TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen scheinen also nach der CXCR2 Aktivierung weniger  $\text{Ca}^{2+}$  zu mobilisieren. Diese Daten verdeutlichen, dass der TRPC6 an der Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  nach CXCR2-Aktivierung beteiligt ist.

Um die funktionelle Rolle des TRPC6-Kanals innerhalb des CXCR2-Signalweges genauer zu untersuchen, wurde der Einfluss des TRPC6-*Knockouts* bei den Neutrophilen im Folgenden anhand der Aktivierung einzelner Signalkomponenten des CXCR2-Signalweges auf proteinbiochemischer Ebene untersucht. Die Ergebnisse dieser Western-Blots verdeutlichen zusätzlich, dass die verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nach CXCR2-Aktivierung bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen nicht auf die verminderte Expression des CXCR2 zurückzuführen ist. Ebenso zeigen die Ergebnisse der Western-Blots, dass die Phosphorylierung von Akt und die Phosphorylierung der p38 MAPK nach Stimulation der Zellen mit dem Chemokin-Cocktail in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen gegenüber den Wildtyp Zellen vermindert war. Damit ist anzunehmen, dass beide Signalwege über den TRPC6 reguliert werden. Um auszuschließen, dass durch den Chemokin-Cocktail mehrere Signalwege parallel aktiviert werden, wurde die Phosphorylierung von Akt und der p38 MAPK zusätzlich in Wildtyp und TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen nach Stimulation mit KC und damit alleiniger Aktivierung des CXCR2-Signalweges untersucht. Hier zeigte sich ebenso, dass in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen die Phosphorylierung von Akt im Vergleich zu den Wildtyp Zellen vermindert war. Im Gegensatz zur Stimulation mit dem Chemokin-Cocktail führte die Stimulation mit KC jedoch zu einer verstärkten Phosphorylierung der p38 MAPK in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen.

Bei oberflächlicher Betrachtung steht dies im Widerspruch zu den vorhergehenden Ergebnissen zur Aktivierung von Signalkomponenten nach Stimulation der Zellen mit dem Chemokin-Cocktail. Die Daten zur Chemotaxis der Zellen in Chemokin-Cocktail-Gradienten mit den Inhibitoren für den CXCR2 und den PAFR haben jedoch gezeigt, dass der Chemokin-Cocktail neben dem CXCR2 noch weitere Chemoattraktanz-Rezeptoren und damit auch noch weitere Signalwege aktiviert. Es ist daher bei der Aktivierung der Neutrophilen mit dem Chemokin-Cocktail nicht auszuschließen, dass Signalkomponenten wie Akt oder p38 MAPK durch die Signalwege verschiedener

Chemoattraktanz-Rezeptoren beeinflusst werden. Hierzu konnte auch mehrfach gezeigt werden, dass es bei paralleler Aktivierung von verschiedenen Chemoattraktanz-Rezeptoren zu einer Interaktion und gegenseitigen Regulation ihrer Signalwege kommt (2; 72; 157). Entsprechend könnten sich bestimmte Signalwege als dominant gegenüber anderen erweisen.

Die Stimulation der Neutrophilen mit KC und damit die alleinige Aktivierung des CXCR2-Signalweges macht es daher leichter, die Rolle des TRPC6-Kanals innerhalb dieses Signalweges zu charakterisieren. Auffällig ist hier, dass die Aktivierung des CXCR2 in den Wildtyp Neutrophilen sowohl zu einer Phosphorylierung von Akt als auch der p38 MAPK führt. In den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen ist die Aktivierung von Akt nach CXCR2 Stimulation dagegen vermindert, wogegen die Aktivierung der p38 MAPK erhöht ist. Dies lässt zum einen vermuten, dass TRPC6 in den Wildtyp Neutrophilen die Phosphorylierung von Akt begünstigt und zum anderen die Aktivierung der p38 MAPK abschwächt. Die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Messungen zeigen, dass die Aktivierung des CXCR2 in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen zu einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung führt, die offensichtlich nur eine unvollständige Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges mit sich bringt. Zwei Bestandteile des CXCR2 Signalweges bilden hierbei mögliche Kandidaten für eine CXCR2-verschaltete Aktivierung des TRPC6 (siehe Abb. 27). Für 20-HETE, einem Metabolit der Arachidonsäure und damit einem Signalprodukt der PLA<sub>2</sub>, konnte bereits eine TRPC6-Aktivierung nachgewiesen werden (8; 84). Neben der PLA<sub>2</sub> stellt die PLC über DAG einen wichtigen Aktivator des TRPC6 bei der Rezeptor-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung dar (58; 76). Somit bildet der TRPC6 einen Bestandteil der CXCR2-Signalkaskaden und ist dabei sehr wahrscheinlich an der Generierung von lokalen Ca<sup>2+</sup>-Signalen beteiligt, die eine Aktivierung weiterer Signalkomponenten wie PI3K/Akt vermitteln. Unter anderem könnte der PI3K/Akt-Signalweg über Cofilin und Girdin dann zu der Polymerisation von Aktin und damit zu der Ausbildung lokaler Protrusionen führen (191).

Wie es in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen zu einer gesteigerten Aktivierung der p38 MAPK kommt, ist dabei unklar. Es wäre aber möglich, dass die p38 MAPK hier die fehlende Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges kompensiert. Wie in 4.1 bereits beschrieben kann die Aktivierung der p38 MAPK auch Ca<sup>2+</sup> unabhängig über Arachidonsäure und damit die PLA<sub>2</sub> oder über Rho-GTPasen wie Rac1 und Cdc42 erfolgen (61). Die Polymerisation von Aktin und damit auch die Ausbildung lokaler Protrusionen könnte dabei über die p38 MAPK und hsp27 gefördert werden (38; 61).

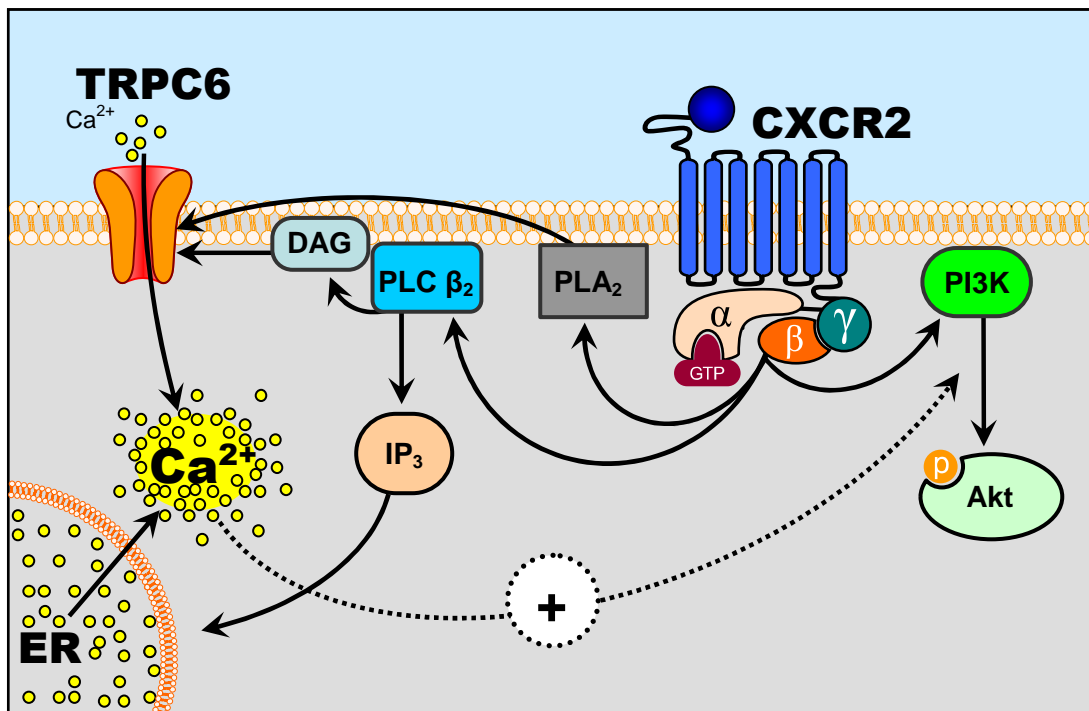


Abbildung 27: Modell für die CXCR2-vermittelte Aktivierung von TRPC6

Die Aktivierung des CXCR2 führt zu einer Aktivierung der PLC und der PLA<sub>2</sub>. Die PLC hydrolysiert aus PIP<sub>2</sub> IP<sub>3</sub> und DAG. IP<sub>3</sub> vermittelt einen Ca<sup>2+</sup> Ausstrom aus dem ER und DAG könnte direkt den TRPC6-Kanal aktivieren. Zusätzlich wäre auch eine Aktivierung des TRPC6-Kanals über 20-HETE, einem Signalprodukt der PLA<sub>2</sub> möglich. Die Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> begünstigt so die Aktivierung anderer Bestandteile des CXCR2-Signalweges wie Akt.

Da für die intermediäre Chemotaxis der TRPC1<sup>-/-</sup> Neutrophilen neben den zellmigratorischen keine weiteren Studien zur Untersuchung der Rolle des TRPC1-Kanals innerhalb des CXCR2-Signalweges vorliegen, ist es schwierig, die Funktion von TRPC1 innerhalb dieses Signalweges zu charakterisieren. Allerdings kann auch hier die Literatur einen möglichen Erklärungsansatz liefern. Wenn man wie von Heit et. al. beschrieben annimmt, dass die Signalübertragung bei diesem intermediären Chemoattraktanz-Signalweg PI3K/Akt-abhängig verläuft (72), führt die CXCR2-vermittelte Aktivierung des TRPC1-Kanals zu einer Aktivierung der PI3K, die unter anderem über Akt eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts herbeiführen könnte. Diese CXCR2-vermittelte Aktivierung des TRPC1-Kanals könnte über die Aktivierung der PLC, die Generierung von IP<sub>3</sub> und die Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher erfolgen (siehe Abb. 28). Die CXCR2-vermittelte Aktivierung von TRPC1 als SOCE-Kanal bedarf allerdings weiterer Studien, um die Rolle des TRPC1-Kanals innerhalb dieses Signalweges genauer zu charakterisieren.



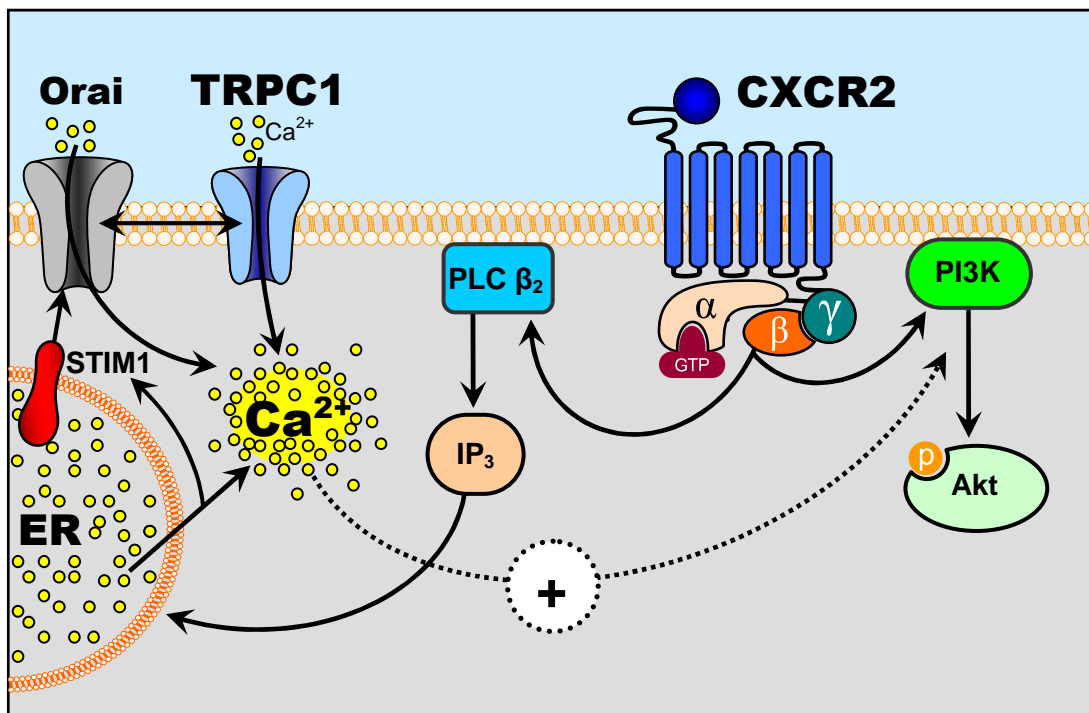


Abbildung 28: Modell für die CXCR2-vermittelte Aktivierung von TRPC1

Die Aktivierung des CXCR2 führt zu einer Aktivierung der PLC und Bildung von  $IP_3$ . Der durch  $IP_3$  vermittelte  $Ca^{2+}$  Ausstrom aus dem ER, begünstigt eine Verlagerung von STIM1 in Zellmembran-nahe Bereiche des ER, wodurch eine Interaktion von STIM1 mit Orai ermöglicht wird. Diese Aktivierung von Orai führt zu einem CRAC-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Einstrom an dem TRPC1 möglicherweise beteiligt ist. Diese Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  begünstigt die Aktivierung anderer Signalproteine wie Akt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Mobilisierung von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  am Vorderende essentiell für die Aufrechterhaltung der über die PI3K und F-Aktin gesteuerte Polarisierung von RAW264.7 Makrophagen ist (51). G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktivieren die PI3K, wodurch  $PIP_3$  aus  $PIP_2$  generiert wird.  $PIP_3$  aktiviert über GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*) wie Vav, Tiam1, PIX und p-REX die Aktivität von Rac oder Cdc42 (59). So führt die Aktivierung von Rac und Cdc42 zu einer lokalen Aktin-Polymerisation (112). Rac kann seinerseits die PI3K positiv beeinflussen und so mehr PI3K ans Vorderende der Zelle rekrutieren (59; 158). Im Sinne einer positiven Rückkopplung würde neu gebildetes  $PIP_3$  wiederum die Aktivität von Rac fördern.

Für die Rho-GTPase Rac1 konnte auch eine  $Ca^{2+}$ -abhängige Aktivierung nachgewiesen werden. Hierbei wird der Rac1-Aktivator Tiam1 über CaMKII ( $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) aktiviert (20; 85). Zusätzlich konnte für Cdc42 und Rac auch eine Aktivierung der p38 MAPK nachgewiesen werden, wodurch wiederum ein Zusammenhang zwischen der PI3K-Aktivität und dem p38 MAPK Signalweg deutlich wird (192). Für die Aktivierung der p38 MAPK konnte neben der  $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit

auch eine PKC-Abhängigkeit gezeigt werden (194). Hierbei würde die CXCR2-gesteuerte Aktivierung der PKC  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig über DAG und die PLC verlaufen. Zuletzt begünstigt auch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin die Clusterung von  $\text{PIP}_2$  innerhalb der Zellmembran (109). In Verbindung mit einem räumlich und zeitlich begrenzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal führt dies innerhalb der Zellmembran zu einer lokalen Akkumulation von  $\text{PIP}_2$ , was räumlich limitiert die Aktivität der PLC und PI3K begünstigt. Da  $\text{PIP}_2$  und Cdc42 gemeinsam WASP aktivieren und so die Polymerisation von Aktin fördern (92; 137), könnte durch ein räumlich stark begrenztes  $\text{Ca}^{2+}$  Signal zusätzlich eine lokal gesteuerte Bildung von Protrusionen begünstigt werden.

Die G-Protein-Rezeptor-stimulierte Mobilisierung von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über TRPC1 und auch TRPC6 wird somit sehr wahrscheinlich durch die PLC vermittelt. Hierbei wird TRPC1 wahrscheinlich als SOCE-Kanal über die Entleerung interner  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und STIM1 aktiviert. TRPC6 hingegen wird auf diesem Weg als ROCE-Kanal sehr wahrscheinlich direkt über DAG aktiviert. Zusätzlich wäre für den TRPC6 auch eine PLC-unabhängige Aktivierung über die  $\text{PLA}_2$  und 20-HETE möglich. Die TRPC1- und TRPC6-vermittelte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  könnte auf vielfältige Weise die lokal begrenzte Reorganisation des Zytoskeletts unterstützen, wodurch eine gerichtete Bewegung ermöglicht wird.

Die räumlich und zeitlich stark begrenzte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  spielt damit in der Chemotaxis möglicherweise eine übergeordnete Rolle. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung kann aus internen Speichern wie dem ER oder über Ionenkanäle aus dem extrazellulären Raum erfolgen. Dabei scheint sowohl die Art der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von Signalkaskaden in Abhängigkeit vom aktivierten Chemoattraktanz-Rezeptor sehr spezifisch reguliert zu werden. So ist der TRPC6-Kanal an der CXCR2-vermittelten intermediären Chemotaxis beteiligt, hat aber keinen Einfluß auf FPR-generierte Signalkaskaden. Dennoch wird deutlich, dass es für die Chemoattraktanz-Rezeptor-vermittelte lokale Polymerisation von Aktin mehrere untereinander verknüpfte Signalwege gibt, die durch Rückkopplungsschleifen in der Lage sind, das Chemotraktant-Signal innerhalb der Zelle vielfach zu verstärken. Diese Arbeit zeigt, dass sowohl der TRPC6 und wahrscheinlich auch der TRPC1 an dieser Chemoattraktanz-Rezeptor-vermittelten Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt sind. Hierbei reguliert der TRPC1 die fMLPR-vermittelte *end-target* Chemotaxis und der TRPC6 ist in CXCR2-vermittelte intermediäre Signalkaskaden involviert. Die Tatsache, dass die Chemotaxis sowohl der  $\text{TRPC1}^{-/-}$  als auch der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Neutrophilen nicht gänzlich zum Erliegen kommt, macht deutlich, dass diese beiden TRPC-Kanäle nicht die einzigen, in die jeweiligen Rezeptor-Signalkaskaden verschalteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind, hier aber eine entscheidende regulatorische Rolle spielen. Darüber hinaus zeigt die Anzahl der mögli-

chen Wege, auf denen eine lokale Polymerisation von Aktin nach Aktivierung von Chemoattraktanz-Rezeptoren erfolgen kann, wie komplex reguliert die verschiedenen, dem Chemoattraktanz-Rezeptor nachgeschalteten, Signalwege sein müssen. Somit gäbe es, wenn einzelne Komponenten eines Signalweges ausfielen, noch weitere Signalwege, welche sprichwörtlich auf einem Umweg zu einem vergleichbaren Ziel führen könnten. Die vermehrte Aktivität der p38 MAPK in den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen nach Stimulation des CXCR2 stellt möglicherweise einen solche kompensatorischen Mechanismus dar.

Zuletzt zeigte sich der *in vitro* beobachtete Chemotaxis-Defekt auch *in vivo* bei einer Entzündungsreaktion. Hierbei war bei den TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen sowohl die Gesamtzahl der eingewanderten Zellen als auch die Zahl der Neutrophilen gegenüber den Wildtyp Mäusen vermindert. Der in den die *in vitro* Experimenten identifizierte Chemotaxis-Defekt der TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen ist damit tatsächlich im intakten Organismus relevant. Die TRPC6-defizienten Mäuse weisen also eine verminderte Immunantwort auf, was Dietrich et. al. bei einer künstlich induzierten allergischen Atemwegsentzündung ebenfalls zeigen konnten (153).

Diese Arbeit macht deutlich, dass das gezielte pharmakologische Ausschalten einzelner Signalkomponenten spezifischer Chemoattraktanz-Signalwege möglicherweise ein geeignetes Mittel darstellt, um einzelne Zellen des Immunsystems wie Neutrophile Granulozyten bei der Immunantwort zu regulieren, ohne ihre Funktion jedoch gänzlich zu inhibieren. Hierbei könnten Ca<sup>2+</sup> Kanäle wie der TRPC1 oder der TRPC6 genau solche Signalkomponenten zur gezielten Behandlung von Autoimmunerkrankungen darstellen. Bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder MS (78; 165), bei denen Neutrophile symptomatisch eine Rolle spielen, muss die pharmakologische Therapie je nach Krankheitsgrad sehr spezifisch eingestellt werden. Bisher setzt man dabei jedoch noch vermehrt auf die Behandlung mit systemischen Glucocorticoiden oder die immunsuppressive Therapie, wobei beides oftmals massive Nebenwirkungen mit sich bringt. Je mehr man in Zukunft in der Lage ist, solche immunmodulatorischen Therapien spezifisch auf das Krankheitsbild auszurichten, umso besser lassen sich solche Krankheiten behandeln.

## 5 Ausblick

Zukünftige Studien bezüglich der Rolle des TRPC1-Kanals bei der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten sollten zunächst die mechanistische Charakterisierung von TRPC1 innerhalb des FPR- und CXCR2-Signalweges betreffen. Hierbei würden Messungen der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration mit TRPC1<sup>-/-</sup> und entsprechenden Wildtyp Neutrophilen nach Aktivierung des FPR oder CXCR2 Aufschluss über die funktionale Rolle des TRPC1-Kanals innerhalb des jeweiligen Signalweges geben und damit zeigen, ob der TRPC1 tatsächlich an einer Chemoattraktanz-Rezeptor-gesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung beteiligt ist. Mithilfe proteinbiochemischer Methoden ließe sich dann auch nachweisen, inwieweit die Aktivität einzelner Bestandteile von FPR- und CXCR2-generierter Signalkaskaden wie Akt oder die p38 MAPK durch das Ausschalten des TRPC1-Kanals beeinträchtigt werden. Die Aktivität einzelner Signalproteine könnte wie in der vorliegenden Arbeit über Western-Blots mit spezifischen Phosphorylierungs-Antikörpern nachgewiesen werden.

Darüber hinaus müsste der Weg der Chemoattraktanz-Rezeptor-vermittelten Aktivierung des TRPC1- und TRPC6-Kanals noch genauer charakterisiert werden. Hierbei wäre für den TRPC1 ein tatsächlicher Nachweis der Funktion als SOCE-Kanals entscheidend. Ein möglicher Ansatz wäre eine Inhibition der Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER zum Beispiel durch Xestospongine C bei gleichzeitiger Aktivierung des FPR oder CXCR2 (116). So ließe sich auf Ebene von Chemotaxis Experimente oder auch in Western Blots eine Beeinflussung der Aktivierung des TRPC1-Kanals in den Wildtyp Neutrophilen im Vergleich zu den TRPC1<sup>-/-</sup> Zellen untersuchen. In  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen wäre es dabei über die Mangan-Quench Methode möglich, zwischen einer Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus internen Speichern und aus dem Extrazellulärraum zu differenzieren. Die Mangan-Quench Methode basiert auf der Eigenschaft von  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen, durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Zellen zu gelangen und mit höherer Affinität als  $\text{Ca}^{2+}$  an Fura-2 zu binden, wodurch dessen Fluoreszenz unterbunden wird (113). Der Einstrom von  $\text{Mn}^{2+}$  in die Zelle würde sich über eine Abnahme der Fluoreszenzintensität identifizieren lassen und wäre ein Indikator für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. In Verbindung mit Xestospongine C ließe sich für den TRPC1-Kanal eine Aussage über die Beteiligung am SOCE treffen.

Über HET0016, einem Inhibitor für die Metabolisierung von 20-HETE, ließe sich dagegen einer Aktivierung des TRPC6 über die  $\text{PLA}_2$  und 20-HETE nach CXCR2-Stimulation nachweisen (117). Da es bisher keine kommerziell erhältlichen Aktivatoren für DAG-spaltende Enzyme wie die DAG-Lipase oder die DAG-Kinase gibt, ließe sich

eine Aktivierung des TRPC6 über DAG nur über eine Inhibition der PLC zum Beispiel durch U73122 verhindern. Dieser Blocker wäre aber nur wenig spezifisch für die Aktivierung von TRPC6, da eine pharmakologische Inhibition auf dieser Ebene auch andere Signalwege beeinflussen würde. Allerdings würde der Einsatz von Inhibitoren für die DAG-Kinase wie R59022 ein PLC-generiertes DAG-Signal nach einer CXCR2-Aktivierung verlängern (41) und würde damit, wenn DAG über den CXCR2-Signalweg den TRPC6-Kanal aktiviert, auch zu einer verlängerten TRPC6-Aktivität und damit zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führen. In den TRPC6<sup>-/-</sup> Neutrophilen sollte die Inhibition der DAG-Lipase dagegen keinen Effekt haben. Dieser Unterschied einer verlängerten Aktivierung des TRPC6-Kanals ließe sich in Chemotaxis Experimenten, mit Hilfe von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen und auch in Western Blots bei den Wildtyp Neutrophilen im Vergleich zu den TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen herausstellen.

Da bei  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen im Rahmen dieser Arbeit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über die ganze Zelle bestimmt wurde, lässt sich zwar eine Aussage über die zeitliche Begrenzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach chemokinetischer Stimulation der Neutrophilen treffen, eine Lokalisation dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale innerhalb der Zelle ist aber nicht möglich. Eine solche lokale Eingrenzung der Chemoattraktanz-Rezeptor-generierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ließe sich in zeitlich und räumlich sehr hoch aufgelösten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen untersuchen. Zusammen mit einer Quantifizierung der Bewegungsrichtung der Zellen bei diesen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen ließe sich möglicherweise sogar die Entstehung von Chemoattraktanz-Rezeptor-generierten, zeitlich und räumlich begrenzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen mit der lokalen Ausbildung von Protrusionen in Verbindung setzen.

Zuletzt könnte man in immunhistochemischen Studien die Lokalisation des TRPC1- und des TRPC6-Kanals innerhalb der migrierenden Neutrophilen untersuchen. Dabei würde eine Kolo-kalisation mit Chemoattraktanz-Rezeptoren wie dem CXCR2 Hinweise für eine Ausbildung von Signalkomplexen bei der Chemotaxis liefern, was wiederum einen Ansatz für die Mechanismen beim Auftreten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen bei der Chemotaxis liefern würde.

In zukünftigen Studien könnte man die Funktion verschiedener Mitglieder der TRPC-Kanal-Familie bei der Chemotaxis unterschiedlicher Zellen des Immunsystems untersuchen. Die Identifikation einzelner TRP-Kanalproteine, die abhängig vom Zelltyp ganz spezifisch die Chemotaxis über einzelne Rezeptor-Signalwege regulieren, würde es ermöglichen, sehr spezifisch in die Immunantwort einzelner Zellen einzugreifen. Damit könnte es durch die gezielte pharmakologische Inhibition von TRP-Kanälen in Zukunft möglich sein, die Therapie für bestimmte Krankheiten, die durch eine immunregulatorische Dysfunktion entstehen, patientenspezifisch auszurichten.

## 6 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten bilden als Teil des angeborenen Immunsystems die erste Abwehr gegen eingedrungene Pathogene. Dabei sind sie in der Lage, aus dem Blutgefäßsystem über das Gefäßendothel in befallenes Gewebe zu migrieren, um hier Pathogene zu beseitigen. Diese Migration erfolgt gerichtet, wobei die Zellen über einen Chemoattraktanz-Gradienten zum Ort der Entzündung geleitet werden. Der Mechanismus der Chemotaxis umfasst innerhalb der Zelle einen Signalkomplex, der den Zellen ermöglicht, das Signal von Chemoattraktanzien über spezifische Oberflächenrezeptoren innerhalb der Zelle zu verstärken und über Signalkaskaden unter anderem eine gerichtete Bewegung der Zelle einzuleiten. Ein Schlüsselement innerhalb dieses Signalkomplexes bildet  $\text{Ca}^{2+}$ . Es konnte mehrfach gezeigt werden dass die Aktivierung von Chemoattraktanz-Rezeptoren zu einer Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  innerhalb der Zelle führt. Diese Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  kann durch die Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wie dem endoplasmatischen Retikulum oder aus dem Extrazellulärraum über Ionenkanäle erfolgen. Die molekulare Identität der an der Chemotaxis beteiligten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle konnte aber bisher nicht geklärt werden. Innerhalb der letzten Jahre lieferte die Literatur einige Hinweise über eine Beteiligung vom TRPC1 und TRPC6, zwei Mitglieder einer Familie von Kationenkanälen, den klassischen *Transient Receptor Potential* (TRP) - Ionenkanälen, an der gerichteten Zellmigration. Die genaue Rolle dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanäle innerhalb der Chemotaxis wurde bisher aber nicht geklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe von *in vitro* Chemotaxisstudien die Abhängigkeit von zwei Chemoattraktanz-Rezeptor-Signalwegen von diesen beiden TRPC-Kanälen bei der Chemotaxis muriner neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden. Dabei verläuft die FPR-vermittelte *end-target* Chemotaxis ausschließlich TRPC1-abhängig, wobei der TRPC6 keinen Einfluß auf diesen Signalweg hat. Die intermediäre CXCR2-vermittelte Chemotaxis benötigt dagegen sowohl den TRPC1 als auch den TRPC6. Fehlt einer dieser beiden  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle innerhalb dieses CXCR2-vermittelten Signalweges, ist die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten stark beeinträchtigt. Dieser TRPC6-abhängige Chemotaxisdefekt konnte auch *in vivo* bei einer Entzündungsreaktion nachgewiesen werden, wo während einer Peritonitis in TRPC6-defizienten Mäusen weniger Zellen in den entzündlichen Bereich einwanderten. Mithilfe von Messungen der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation der Neutrophilen mit verschiedenen Chemoattraktanzien zeigte sich, dass die FPR-vermittelte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  gänzlich TRPC6-unabhängig verläuft. Dagegen erfolgt die Mobilisie-

rung von  $\text{Ca}^{2+}$  für den CXCR2-generierten Signalweg TRPC6-abhängig. Darüber hinaus wurde mit der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der TRPC6-Kanal tatsächlich in CXCR2-vermittelte Signalkaskaden verschaltet ist und dabei offensichtlich die Aktivierung der PI3K unterstützt. Die Ergebnisse weisen eine klare Richtung für zukünftige Studien zu einer weiteren mechanistischen Charakterisierung von TRPC1 und TRPC6 innerhalb von verschiedenen Chemoattraktanz-Signalwegen. Nur das genaue Verständnis dieser Mechanismen innerhalb der Chemotaxis von Zellen macht es zuletzt möglich, die immunsuppressive Therapie besonders von Autoimmunerkrankungen mit starker Beteiligung von neutrophilen Granulozyten wie der rheumatoiden Arthritis oder der multiplen Sklerose gezielter auf die Patienten auszurichten.

## Anhang: Verwendete Chemikalien und Geräte

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Kits.

Substanz	Firma	Firmensitz Deutschland
ABT-491	Calbiochem	Darmstadt
Agarose	Serva	Heidelberg
Albumin Bovine Fraction V	Serva	Heidelberg
anti-CXCR2 Antikörper	Novus Biologicals	Littleton (USA)
anti-phospho-Akt Antikörper	Cell Signaling	Danvers (USA)
anti-phospho-p38 MAPK Antikörper	Cell Signaling	Danvers (USA)
anti-beta Aktin Antikörper	Sigma-Aldrich	München
anti-GAPDH Antikörper	Dianova	Hamburg
APS	Sigma-Aldrich	München
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo-Scientific	Rockford (USA)
Borsäure	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt
CaCl <sub>2</sub>	Merck	Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	Merck	Darmstadt
Casein	Sigma-Aldrich	München
Collagen Typ 1 Rat Tail high. Conc.	BD Bioscience	Heidelberg
Complete Mini	Roche	Mannheim
DOC	Merck	Darmstadt
DMEM	Gibco	Darmstadt
DANN Marker 1kb Blue	Se genetic	Borken
dNTP-Mix (10mM/ dNTP)	New England Biolabs	Frankfurt
DTT	Boehringer	Ingelheim
EDTA	Serva	Heidelberg
EGTA	Sigma-Aldrich	München
FCS (Heat Inactivated, EU Approved)	Invitrogen	Darmstadt



Substanz	Firma	Firmensitz Deutschland
Fibronektin	Sigma-Aldrich	München
fMLP	Sigma-Aldrich	München
Fura-2-AM	Invitrogen	Darmstadt
Glukose	Merck	Darmstadt
Glycin	Serva	Heidelberg
Goat anti-Rabbit POD Antikörper	Sigma-Aldrich	München
Goat anti-Mouse POD Antikörper	Jackson-Immuno	Suffolk (UK)
HBSS	PAA	Pasching (Austria)
Hemacolor	Merck	Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich	München
Histopaque 1077/1119	Sigma-Aldrich	München
KC murin	PeptoTech	Hamburg
KCl	Merck	Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt
MagicMarc Protein Standard	Invitrogen	Darmstadt
Methanol	Roth	Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Merck	Darmstadt
NaCl	Roth	Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt
NP-40	Sigma-Aldrich	München
Patentblau	Chroma	Münster
PBS	PAA	Pasching (Austria)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin
PhosSTOP	Roche	Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich	München
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel A / Gel B	Roth	Karlsruhe
RPMI 1640	Biochrom	Berlin
SB 225002	Calbiochem	Darmstadt

Substanz	Firma	Firmensitz Deutschland
SDS	Merck	Darmstadt
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich	München
Sucrose	Sigma-Aldrich	München
Super Signal <sup>®</sup> Luminol Kit	Thermo-Scientific	Rockford (USA)
SYBR <sup>®</sup> Gold	Invitrogen	Darmstadt
Taq DNA Polymerase	Se genetic	Borken
Taq DNA Polymerase Buffer A+	Se genetic	Borken
Temed	Roth	Karlsruhe
Tris/SDS	Roth	Karlsruhe
TWEEN 20	Roth	Karlsruhe

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Firma	Firmensitz
Casy TT	Roche	Mannheim
ChemiDoc <sup>™</sup> XRS+ Geldokumentationssystem	Bio Rad	München
Electrophoresis Power Supply EV231	Consort	Turnhout (Belgien)
Camera XC-ST70CE	Hamamatsu	Herrsching
Camera XC-77CE	Hamamatsu	Herrsching
Heraeus Multifuge 1S-R	Heraeus	Buckinghamshire (UK)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss	Göttingen
Mikroskop Axiovert TV	Zeiss	Göttingen
Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo-Scientific	Rockford (USA)
Trans-Blot SD Semi-Dry Blot-System	Bio Rad	München
Mini Trans-Blot Blot-System	Bio Rad	München
PC-Vision Frame Grabber Boards	Hamamatsu	Herrsching
Unimax 1010 Schüttler	Heidoph	Schwabach

## Literaturverzeichnis

1. **Ahmed S, Goh WI and Bu WY.** I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21: 350-356, 2010.
2. **Ali H, Richardson RM, Haribabu B and Snyderman R.** Chemoattractant receptor cross-desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 274: 6027-6030, 1999.
3. **Ambudkar I.** TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochemical Society Transactions* 35: 96-100, 2007.
4. **Ambudkar IS, Ong HL, Liu X, Bandyopadhyay B and Cheng KT.** TRPC1: The link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium* 42: 213-223, 2007.
5. **Ariano P, Dalmazzo S, Owsianik G, Nilius B and Lovisolo D.** TRPC channels are involved in calcium-dependent migration and proliferation in immortalized GnRH neurons. *Cell Calcium* 49: 387-394, 2011.
6. **Baggiolini M.** Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565-568, 1998.
7. **Balague C, Kunkel SL and Godessart N.** Understanding autoimmune disease: new targets for drug discovery. *Drug discovery today* 14: 926-934, 2009.
8. **Basora N, Boulay G, Bilodeau L, Rousseau E and Payet MD.** 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *Journal of Biological Chemistry* 278: 31709-31716, 2003.
9. **Bastian P, Lang K, Niggemann B, Zaenker KS and Entschladen F.** Myosin regulation in the migration of tumor cells and leukocytes within a three-dimensional collagen matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 65-76, 2005.
10. **Benard V, Bohl BP and Bokoch GM.** Characterization of Rac and Cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *Journal of Biological Chemistry* 274: 13198-13204, 1999.
11. **Bergmann JE, Kupfer A and Singer SJ.** Membrane insertion at the leading-edge of motile fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 80: 1367-1371, 1983.

12. **Berridge MJ.** Inositol trisphosphate and diacylglycerol as 2nd messengers. *Biochemical Journal* 220: 345-360, 1984.
13. **Bertram A and Ley K.** Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59: 79-87, 2011.
14. **Billadeau DD.** PTEN gives neutrophils direction. *Nature Immunology* 9: 716-718, 2008.
15. **Bomben V, Turner K, Barclay T and Sontheimer H.** Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas. *Journal of Cellular Physiology* 226: 1879-1888, 2011.
16. **Borregaard N.** Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33: 657-670, 2010.
17. **Bozic CR, Gerard NP, Vonuexkullguldenband C, Kolakowski LF, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ and Gerard C.** The murine interleukin-8 type-B receptor homolog and its ligands - expression and biological characterization. *Journal of Biological Chemistry* 269: 29355-29358, 1994.
18. **Bozic CR, Kolakowski LF, Gerard NP, Garciarodriguez C, Vonuexkullguldenband C, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ and Gerard C.** Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. *Journal of Immunology* 154: 6048-6057, 1995.
19. **Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA and Fay FS.** Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* 254: 703-706, 1991.
20. **Buchanan FG, Elliot CM, Gibbs M and Exton JH.** Translocation of the Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 induced by platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry* 275: 9742-9748, 2000.
21. **Campbell JJ, Foxman EF and Butcher EC.** Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration. *European Journal of Immunology* 27: 2571-2578, 1997.
22. **Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ and Gierschik P.** Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta-2 by G-protein beta-gamma-subunits. *Nature* 360: 684-686, 1992.

23. **Caprodossi S, Amantini C, Nabissi M, Morelli MB, Farfariello V, Santoni M, Gismondi A and Santoni G.** Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells. *Carcinogenesis* 32: 686-694, 2011.
24. **Cara DC, Kaur J, Forster M, McCafferty DM and Kubes P.** Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis in vivo. *Journal of Immunology* 167: 6552-6558, 2001.
25. **Carafoli E, Santella L, Branca D and Brini M.** Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36: 107-260, 2001.
26. **Carnevale KA and Cathcart MK.** Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> is required for human monocyte chemotaxis to monocyte chemoattractant protein 1. *Journal of Immunology* 167: 3414-3421, 2001.
27. **Carp H.** Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 155: 264-275, 1982.
28. **Carragher NO and Frame MC.** Calpain: a role in cell transformation and migration. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34: 1539-1543, 2002.
29. **Cassatella MA, Gasperini S and Russo MP.** *Cytokine expression and release by neutrophils.* 1997.
30. **Cathcart MK.** Signal-activated phospholipase regulation of leukocyte chemotaxis. *Journal of Lipid Research* 50: S231-S236, 2009.
31. **Chao W and Olson MS.** Platelet-activating-factor - receptors and signal-transduction. *Biochemical Journal* 292: 617-629, 1993.
32. **Chen LW, Lin MW and Hsu CM.** Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *Journal of Biomedical Science* 12: 311-319, 2005.
33. **Cheng KT, Liu X, Ong HL, Swaim W and Ambudkar IS.** Local Ca<sup>2+</sup> entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals required for specific cell functions. *Plos Biology* 9: 2011.

34. **Cheng Q, McKeown SJ, Santos L, Santiago FS, Khachigian LM, Morand EF and Hickey MJ.** Macrophage migration inhibitory factor increases leukocyte-endothelial interactions in human endothelial cells via promotion of expression of adhesion molecules. *Journal of Immunology* 185: 1238-1247, 2010.
35. **Clark K, Langeslag M, van Leeuwen B, Ran L, Ryazanov AG, Figdor CG, Moolenaar WH, Jalink K and van Leeuwen FN.** TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *Embo Journal* 25: 290-301, 2006.
36. **Cory GOC and Ridley AJ.** Cell motility - braking WAVES. *Nature* 418: 732-733, 2002.
37. **Cosens DJ and Manning A.** Abnormal electroretinogram from a drosophila mutant. *Nature* 224: 285-&, 1969.
38. **Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P and Colombo R.** The actin cytoskeleton response to oxidants: From small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 1624-1632, 2001.
39. **Damann N, Owsianik G, Li S, Poll C and Nilius B.** The calcium-conducting ion channel transient receptor potential canonical 6 is involved in macrophage inflammatory protein-2-induced migration of mouse neutrophils. *Acta Physiologica* 195: 3-11, 2009.
40. **Damerau B, Grunefeld E and Vogt W.** Chemotactic effects of complement-derived peptide C3a, peptide C3ai and peptide C5a (classical anaphylatoxin) on rabbit and guinea-pig polymorphonuclear leukocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 305: 181-184, 1978.
41. **de Chaffoy de Courcelles DC, Roevens P and Van Belle H.** R 59 022, a diacylglycerol kinase inhibitor. Its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *The Journal of biological chemistry* 260: 15762-15770, 1985.
42. **DeHaven WI, Jones BF, Petranka JG, Smyth JT, Tomita T, Bird GS and Putney JW.** TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *Journal of Physiology-London* 587: 2275-2298, 2009.
43. **del Pozo MA, Nieto M, Serrador JM, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Martinez A and Sanchez-Madrid F.** The two poles of the lymphocyte: Specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhesion and Communication* 6: 125-+, 1998.

44. **Dietrich A, Kalwa H, Rost BR and Gudermann T.** The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 451: 72-80, 2005.
45. **Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Schnitzler MMY, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L and Gudermann T.** Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 455: 465-477, 2007.
46. **Dietrich A, Schnitzler MMY, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T and Birnbaumer L.** Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. *Molecular and Cellular Biology* 25: 6980-6989, 2005.
47. **Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL and Ley K.** Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 99: 336-341, 2002.
48. **Eddy RJ, Pierini LM, Matsumura F and Maxfield FR.** Ca<sup>2+</sup>-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *Journal of Cell Science* 113: 1287-1298, 2000.
49. **Egelhoff TT and Spudich JA.** Molecular-genetics of cell-migration - dictyostelium as a model system. *Trends in Genetics* 7: 161-166, 1991.
50. **English D and Andersen BR.** Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of Immunological Methods* 5: 249-252, 1974.
51. **Evans JH and Falke JJ.** Ca<sup>2+</sup> influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 16176-16181, 2007.
52. **Fabian A, Fortmann T, Bulk E, Bomben VC, Sontheimer H and Schwab A.** Chemotaxis of MDCK-F cells toward fibroblast growth factor-2 depends on transient receptor potential canonical channel 1. *Pflügers Arch* 461: 295-306, 2011.
53. **Fabian A, Fortmann T, Dieterich P, Riethmüller C, Schön P, Mally S, Nilius B and Schwab A.** TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 457: 475-484, 2008.

54. **Fergus GJ, Milne L, Kulkarni S, Sasaki T, Walker S, Andrews S, Crabbe T, Finan P, Jones G, Jackson S, Camps M, Rommel C, Wymann M, Hirsch E, Hawkins P and Stephens L.** PI(3)K gamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nature Cell Biology* 9: 86-U109, 2007.
55. **Fordhutchinson AW.** Regulation of leukotriene biosynthesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 13: 257-267, 1994.
56. **Foxman EF, Kunkel EJ and Butcher EC.** Integrating conflicting chemotactic signals: The role of memory in leukocyte navigation. *Journal of Cell Biology* 147: 577-587, 1999.
57. **Franco SJ and Huttenlocher A.** Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of Cell Science* 118: 3829-3838, 2005.
58. **Fuchs B, Rupp M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T, Dietrich A and Weissmann N.** Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respiratory Research* 12: 2011.
59. **Fukata M, Nakagawa M and Kaibuchi K.** Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 590-597, 2003.
60. **Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L and Firtel RA.** Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 109: 611-623, 2002.
61. **Garcia MC, Ray DM, Lackford B, Rubino M, Olden K and Roberts JD.** Arachidonic acid stimulates cell adhesion through a novel p38 MAPK-RhoA signaling pathway that involves heat shock protein 27. *Journal of Biological Chemistry* 284: 20936-20945, 2009.
62. **Garland JM, Aldridge A, Wagstaffe J and Dexter TM.** Studies on the in vivo production of a lymphokine activity, interleukin-3 (IL-3) elaborated by lymphocytes and a myeloid leukemic line invitro and the fate of IL-3 dependent cell-lines. *British Journal of Cancer* 48: 247-259, 1983.
63. **Girish V and Vijayalakshmi A.** Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer* 41: 2004.
64. **Glading A, Lauffenburger DA and Wells A.** Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends in Cell Biology* 12: 46-54, 2002.



65. **Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY.** A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260: 3440-3450, 1985.
66. **Gudermann T, Hofmann T, Schnitzler M and Dietrich A.** Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins. *No-vartis Foundation symposium* 258: 103, 2004.
67. **Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC.** Inside the neutrophil phago-some: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017, 1998.
68. **Hartgring SAY, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG and van Roon JAG.** Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65: 69-74, 2006.
69. **Haugh JM, Codazzi F, Teruel M and Meyer T.** Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3 ' phosphoinositides. *Journal of Cell Biology* 151: 1269-1279, 2000.
70. **Heit B, Liu L, Colarusso P, Puri KD and Kubes P.** PI3K accelerates, but is not required for, neutrophil chemotaxis to fMLP. *Journal of Cell Science* 121: 205-214, 2008.
71. **Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan ZW, Colarusso P, Miller BJ, Jirik FR and Kubes P.** PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nature Immunology* 9: 743-752, 2008.
72. **Heit B, Tavener S, Raharjo E and Kubes P.** An intracellular signaling hierar-chy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *Jour-nal of Cell Biology* 159: 91-102, 2002.
73. **Henle SJ, Wang G, Liang E, Wu M, Poo Mm and Henley JR.** Asymmetric PI(3,4,5)P-3 and Akt signaling mediates chemotaxis of axonal growth cones. *Journal of Neuroscience* 31: 7016-7027, 2011.
74. **Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D and Frenette PS.** Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 26: 477-489, 2007.
75. **Hoeller O and Kay RR.** Chemotaxis in the absence of PIP<sub>3</sub> gradients. *Current Biology* 17: 813-817, 2007.
76. **Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T and Schultz G.** Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacyl-glycerol. *Nature* 397: 259-263, 1999.

77. **Hogan PG and Rao A.** Dissecting I-CRAC, a store-operated calcium current. *Trends in Biochemical Sciences* 32: 235-245, 2007.
78. **Holman DW, Klein RS and Ransohoff RM.** The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1812: 220-230, 2011.
79. **Holmoy T and Vartdal F.** The immunological basis for treatment of multiple sclerosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 66: 374-382, 2007.
80. **Homem CCF and Peifer M.** Exploring the roles of diaphanous and enabled activity in shaping the balance between filopodia and lamellipodia. *Molecular Biology of the Cell* 20: 5138-5155, 2009.
81. **Honda Z, Ishii S and Shimizu T.** Platelet-activating factor receptor. *Journal of Biochemistry* 131: 773-779, 2002.
82. **Huang KP.** The mechanism of protein kinase-C activation. *Trends in Neurosciences* 12: 425-432, 1989.
83. **Iglesias PA.** Spatial regulation of PI3K signaling during chemotaxis. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Systems Biology and Medicine* 1: 247-253, 2009.
84. **Inoue R, Jensen LJ, Jian Z, Shi J, Hai L, Lurie AI, Henriksen FH, Salomonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori M, Mori Y and Ito Y.** Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/ diacylglycerol and Phospholipase A<sub>2</sub>/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circulation Research* 104: 1399-1409, 2009.
85. **Jin M, Guan CB, Jiang YA, Chen G, Zhao CT, Cui K, Song YQ, Wu CP, Poo MM and Yuan XB.** Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of Rho GTPases triggers turning of nerve growth cones. *Journal of Neuroscience* 25: 2338-2347, 2005.
86. **Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M and Kunke SL.** Neutrophil-derived cytokines: Potential therapeutic targets in inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation and Allergy* 4: 273-279, 2005.
87. **Katanaev VL.** Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochemistry-Moscow* 66: 351-368, 2001.
88. **Katoh H and Negishi M.** RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* 424: 461-464, 2003.

89. **Keating FK and Schneider DJ.** The influence of platelet activating factor on the effects of platelet agonists and antiplatelet agents in vitro. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 28: 38-45, 2009.
90. **Kelvin DJ, Michiel DF, Johnston JA, Lloyd AR, Sprenger H, Oppenheim JJ and Wang JM.** Chemokines and serpentine - the molecular-biology of chemokine receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 54: 604-612, 1993.
91. **Kennedy AD and Deleo FR.** Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic Research* 43: 25-61, 2009.
92. **Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan M, Liu GA and Rosen MK.** Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 404: 151-158, 2000.
93. **Kim MS, Zeng W, Yuan JP, Shin DM, Worley PF and Muallem S.** Native Store-operated  $Ca^{2+}$  influx requires the channel function of Orai1 and TRPC1. *Journal of Biological Chemistry* 284: 9733-9741, 2009.
94. **Kirfel G, Rigort A, Borm B and Herzog V.** Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *European Journal of Cell Biology* 83: 717-724, 2004.
95. **Kobayashi SD and Deleo FR.** Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Systems Biology and Medicine* 1: 309-333, 2009.
96. **Kumar V and Sharma A.** Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology* 10: 1325-1334, 2010.
97. **Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, Keller M, Forster R, Critchley DR, Fassler R and Sixt M.** Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453: 51-+, 2008.
98. **Larsson C.** Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cellular Signalling* 18: 276-284, 2006.
99. **Lauffenburger DA and Horwitz AF.** Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-369, 1996.
100. **Le YY, Murphy PM and Wang JM.** Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology* 23: 541-548, 2002.

101. **Lee HM, Lee CK, Lee SH, Roh HY, Bae YM, Lee KY, Lim J, Park PJ, Park TK, Lee YL, Won KJ and Kim B.** p38 mitogen-activated protein kinase contributes to angiotensin II-stimulated migration of rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 105: 74-81, 2007.
102. **Lee JC, Hapel AJ and Ihle JN.** Constitutive production of a unique lymphokine (IL-3) by the WEHI-3 cell-line. *Journal of Immunology* 128: 2393-2398, 1982.
103. **Li Z, Dong XM, Wang ZL, Liu WZ, Deng N, Ding Y, Tang LY, Hla T, Zeng R, Li L and Wu DQ.** Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nature Cell Biology* 7: 399-U42, 2005.
104. **Ling K, Schill NJ, Wagoner MP, Sun Y and Anderson RA.** Movin' on up: the role of PtdIns(4,5)P-2 in cell migration. *Trends in Cell Biology* 16: 276-284, 2006.
105. **Liu WH, Kao PH, Chiou YL, Lin Sr, Wu MJ and Chang LS.** Catalytic activity-independent pathway is involved in phospholipase A<sub>2</sub>-induced apoptotic death of human leukemia U937 cells via Ca<sup>2+</sup>-mediated p38 MAPK activation and mitochondrial depolarization. *Toxicology Letters* 185: 102-109, 2009.
106. **Loovers HM, Postma M, Keizer-Gunnink I, Huang YE, Devreotes PN and van Haastert PJM.** Distinct roles of PI(3,4,5)P-3 during chemoattractant signaling in Dictyostelium: A quantitative in vivo analysis by inhibition of PI3-kinase. *Molecular Biology of the Cell* 17: 1503-1513, 2006.
107. **Lopez-Illasaca M.** Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochemical Pharmacology* 56: 269-277, 1998.
108. **Louis M, Zanou N, Van Schoor M and Gailly P.** TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *Journal of Cell Science* 121: 3951-3959, 2008.
109. **McLaughlin S and Murray D.** Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438: 605-611, 2005.
110. **Medina E.** Neutrophil extracellular traps: A strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *Journal of Innate Immunity* 1: 176-180, 2009.
111. **Meili R, Sasaki AT and Firtel RA.** Rho rocks PTEN. *Nature Cell Biology* 7: 334-335, 2005.

112. **Merlot S and Firtel RA.** Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *Journal of Cell Science* 116: 3471-3478, 2003.
113. **Merritt JE, Jacob R and Hallam TJ.** Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human-neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 264: 1522-1527, 1989.
114. **Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S and DiRago L.** Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 88: 3755-3764, 1996.
115. **Minke B.** The history of the drosophila TRP channel: The birth of a new channel superfamily. *Journal of Neurogenetics* 24: 216-233, 2010.
116. **Miyamoto S, Izumi M, Hori M, Kobayashi M, Ozaki H and Karaki H.** Xestospingonin C, a selective and membrane-permeable inhibitor of IP<sub>3</sub> receptor, attenuates the positive inotropic effect of alpha-adrenergic stimulation in guinea-pig papillary muscle. *British Journal of Pharmacology* 130: 650-654, 2000.
117. **Miyata N, Taniguchi K, Seki T, Ishimoto T, Sato-Watanabe M, Yasuda Y, Doi M, Kametani S, Tomishima Y, Ueki T, Sato M and Kameo K.** HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. *British Journal of Pharmacology* 133: 325-329, 2001.
118. **Montell C and Rubin GM.** Molecular characterization of the drosophila TRP locus - a putative integral membrane-protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-1323, 1989.
119. **Morley J, Page CP and Paul W.** Inflammatory actions of platelet activating factor (Paf-acether) in guinea-pig skin. *British Journal of Pharmacology* 80: 503-509, 1983.
120. **Nabi IR.** The polarization of the motile cell. *Journal of Cell Science* 112: 1803-1811, 1999.
121. **Newton AC.** Lipid activation of protein kinases. *Journal of Lipid Research* 50: S266-S271, 2009.
122. **Niggli V.** Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35: 1619-1638, 2003.
123. **Nilius B and Mahieu F.** A road map for TR(I)Ps. *Molecular Cell* 22: 297-307, 2006.

124. **Nishio M, Watanabe KI, Sasaki J, Taya C, Takasuga S, Iizuka R, Balla T, Yamazaki M, Watanabe H, Itoh R, Kuroda S, Horie Y, Forster I, Mak TW, Yonekawa H, Penninger JM, Kanaho Y, Suzuki A and Sasaki T.** Control of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P-3 phosphatase SHIP1. *Nature Cell Biology* 9: 36-U40, 2007.
125. **Panaro MA, Acquafredda A, Sisto M, Lisi S, Maffione AB and Mitolo V.** Biological role of the N-formyl peptide receptors. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 28: 103-127, 2006.
126. **Park D, Jhon DY, Kriz R, Knopf J and Rhee SG.** Cloning, sequencing, expression, and Gq-independent activation of phospholipase-C-beta-2. *Journal of Biological Chemistry* 267: 16048-16055, 1992.
127. **Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM and Kubes P.** Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *Journal of Experimental Medicine* 203: 2569-2575, 2006.
128. **Pirotzky E, Pfister A and Benveniste J.** A role for Paf-acether (platelet-activating factor) in acute skin inflammation. *British Journal of Dermatology* 113: 91-94, 1985.
129. **Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Abdullaev IF, Bisailon JM, Singer HA and Trebak M.** Evidence for STIM1-and Orai1-dependent store-operated calcium influx through I(CRAC) in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *Faseb Journal* 23: 2425-2437, 2009.
130. **Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM and McIntyre TM.** Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annual Review of Biochemistry* 69: 419-445, 2000.
131. **Rabiet MJ, Huet E and Boulay F.** The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: An overview. *Biochimie* 89: 1089-1106, 2007.
132. **Ramsey IS, Delling M and Clapham DE.** An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology* 68: 619-647, 2006.
133. **Renkawitz J and Sixt M.** Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *Embo Reports* 11: 744-750, 2010.
134. **Rickert P, Weiner OD, Wang F, Bourne HR and Servant G.** Leukocytes navigate by compass: roles of PI3K gamma and its lipid products. *Trends in Cell Biology* 10: 466-473, 2000.

135. **Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT and Horwitz AR.** Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709, 2003.
136. **Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM and Waterman-Storer CM.** Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature Cell Biology* 5: 599-609, 2003.
137. **Rohatgi R, Ho HYH and Kirschner MW.** Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Journal of Cell Biology* 150: 1299-1309, 2000.
138. **Rossi D and Zlotnik A.** The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology* 18: 217-243, 2000.
139. **Roubin R, Menciahuerta JM and Benveniste J.** Release of platelet-activating factor (Paf-Acether) and leukotriene-C and leukotriene-D from inflammatory macrophages. *European Journal of Immunology* 12: 141-146, 1982.
140. **Rovai LE, Herschman HR and Smith JB.** The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology* 64: 494-502, 1998.
141. **Rowe R and Weiss SJ.** Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends in Cell Biology* 18: 560-574, 2008.
142. **Sage PT and Carman CV.** Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Frontiers in Bioscience* 14: 5066-5083, 2009.
143. **Samstag Y, Eibert SM, Klemke M and Wabnitz GH.** Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of Leukocyte Biology* 73: 30-48, 2003.
144. **Sanchez JA and Wangh LJ.** New insights into the mechanisms of nuclear segmentation in human neutrophils. *Journal of Cellular Biochemistry* 73: 1-10, 1999.
145. **Sanchez-Madrid F and del Pozo MA.** Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo Journal* 18: 501-511, 1999.
146. **Scanlon M, Williams DA and Fay FS.** A Ca<sup>2+</sup>-insensitive form of fura-2 associated with polymorphonuclear leukocytes - assessment and accurate Ca<sup>2+</sup> measurement. *Journal of Biological Chemistry* 262: 6308-6312, 1987.

147. **Schaff UY, Dixit N, Procyk E, Yamayoshi I, Tse T and Simon SI.** Orai1 regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow. *Blood* 115: 657-666, 2010.
148. **Schiffmann E, Corcoran BA and Wahl SM.** N-Formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 1059-1062, 1975.
149. **Schiffmann E, Showell HV, Corcoran BA, Ward PA, Smith E and Becker EL.** Isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from Escherichia-Coli. *Journal of Immunology* 114: 1831-1837, 1975.
150. **Schilling T and Eder C.** Non-selective cation channel activity is required for lysophosphatidylcholine-induced monocyte migration. *Journal of Cellular Physiology* 221: 325-334, 2009.
151. **Schimmelpfennig S.** TRP-Kanäle bei der gerichteten Migration neutrophiler Granulozyten. 2011. Unpublished Work
152. **Schwab A, Finsterwalder F, Kersting U, Danker T and Oberleithner H.** Intracellular  $Ca^{2+}$  distribution in migrating transformed renal epithelial cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 434: 70-76, 1997.
153. **Sel S, Rost B, Yildirim A, Sel B, Kalwa H, Fehrenbach H, Renz H, Gudermann T and Dietrich A.** Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response. *Clinical and Experimental Allergy* 38: 1548-1558, 2008.
154. **Shen WP, Li BQ, Wetzel MA, Rogers TJ, Henderson EE, Su SB, Gong WH, Le YY, Sargeant R, Dimitrov DS, Oppenheim JJ and Wang JM.** Down-regulation of the chemokine receptor CCR5 by activation of chemotactic formyl peptide receptor in human monocytes. *Blood* 96: 2887-2894, 2000.
155. **Shimizu T, Owsianik G, Freichel M, Flockerzi V, Nilius B and Vennekens R.** TRPM4 regulates migration of mast cells in mice. *Cell Calcium* 45: 226-232, 2009.
156. **Small JV, Stradal T, Vignat E and Rottner K.** The lamellipodium: where motility begins. *Trends in Cell Biology* 12: 112-120, 2002.
157. **Sogawa Y, Ohyama T, Maeda H and Hirahara K.** Formyl peptide receptor 1 and 2 dual agonist inhibits human neutrophil chemotaxis by the induction of chemoattractant receptor cross-desensitization. *Journal of Pharmacological Sciences* 115: 63-68, 2011.



158. **Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D and Bourne HR.** Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P-3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *Journal of Cell Biology* 160: 375-385, 2003.
159. **Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA and Prescott SM.** Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 40: 643-672, 2003.
160. **Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP and Farese RV.** Insulin and PIP<sub>3</sub> activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) acid autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry* 40: 249-255, 2001.
161. **Stetlerstevenson WG, Aznavoorian S and Liotta LA.** Tumor-cell interactions with the extracellular-matrix during invasion and metastasis. *Annual Review of Cell Biology* 9: 541-573, 1993.
162. **Stiles B, Groszer M, Wang SY, Jiao J and Wu H.** PTENless means more. *Developmental Biology* 273: 175-184, 2004.
163. **Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, Gierschik P, Seedorf K, Hsuan JJ, Waterfield MD and Wetzker R.** Cloning and characterization of a G-protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269: 690-693, 1995.
164. **Sugimoto Y, Fukada Y, Mori D, Tanaka S, Yamane H, Okuno Y, Deai K, Tsuchiya S, Tsujimoto G and Ichikawa A.** Prostaglandin E-2 stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via the prostanoid EP2 receptor in mouse peritoneal neutrophils. *Journal of Immunology* 175: 2606-2612, 2005.
165. **Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z and Koch AE.** Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2: 153-167, 2010.
166. **Tamguney T and Stokoe D.** New insights into PTEN. *Journal of Cell Science* 120: 4071-4079, 2007.
167. **Thiery JP, Duband JL and Tucker GC.** Cell-migration in the vertebrate embryo - role of cell-adhesion and tissue environment in pattern-formation. *Annual Review of Cell Biology* 1: 91-113, 1985.
168. **Thodeti CK, Matthews B, Ravi A, Mammoto A, Ghosh K, Bracha AL and Ingber DE.** TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling. *Circulation Research* 104: 1123-U278, 2009.

169. **Tian DQ, Jacobo SMP, Billing D, Rozkalne A, Gage SD, Anagnostou T, Pavenstaedt H, Hsu HH, Schlondorff J, Ramos A and Greka A.** Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Science Signaling* 3: 2010.
170. **Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou AP, Lampugnani MG, Gamp AC, Vestweber D, Adamson P, Dejana E and Greenwood J.** Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *Journal of Cell Science* 121: 29-37, 2008.
171. **van Rossum DB and Patterson RL.** PKC and PLA<sub>2</sub>: Probing the complexities of the calcium network. *Cell Calcium* 45: 535-545, 2009.
172. **VanDamme J, Wuyts A, Froyen G, VanCoillie E, Struyf S, Billiau A, Proost P, Wang JM and Opdenakker G.** Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. *Journal of Leukocyte Biology* 62: 563-569, 1997.
173. **Varnai P, Hunyady L and Balla T.** STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends in Pharmacological Sciences* 30: 118-128, 2009.
174. **Venkatachalam K and Montell C.** TRP channels. *Annual Review of Biochemistry* 76: 387-417, 2007.
175. **Virella G, Lopesvirella MFL, Shuler C, Sherwood T, Espinoza GA, Winocour P and Colwell JA.** Release of PAF by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by immune-complexes bound to sepharose particles and human-erythrocytes. *Immunology* 50: 43-51, 1983.
176. **Wang F, Herzmark P, Weiner OD, Srinivasan S, Servant G and Bourne HR.** Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nature Cell Biology* 4: 513-518, 2002.
177. **Waning J, J V, Owsianik G, Stuwe L, Mally S, Fabian A, Frippiat C, Nilius B and Schwab A.** Novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: Involvement in cell migration. *Cell Calcium* 42: 17-25, 2007.
178. **Waugh DJJ and Wilson C.** The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research* 14: 6735-6741, 2008.
179. **Webb DJ, Parsons JT and Horwitz AF.** Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells - over and over and over again. *Nature Cell Biology* 4: E97-E100, 2002.

180. **Wei CL, Wang XH, Chen M, Ouyang K, Song LS and Cheng HP.** Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 457: 901-905, 2009.
181. **Wei CL, Wang XH, Chen M, Ouyang KF, Zheng M and Cheng HP.** Flickering calcium microdomains signal turning of migrating cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88: 105-110, 2010.
182. **Weiner OD, Neilsen PO, Prestwich GD, Kirschner MW, Cantley LC and Bourne HR.** A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nature Cell Biology* 4: 509-512, 2002.
183. **Welch MD and Mullins RD.** Cellular control of actin nucleation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18: 247-288, 2002.
184. **White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, Griswold DE and Sarau HM.** Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *Journal of Biological Chemistry* 273: 10095-10098, 1998.
185. **Wong CH, Heit B and Kubes P.** Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovascular Research* 86: 183-191, 2010.
186. **Wooten RE, Willingham MC, Daniel LW, Leslie CC, Rogers LAC, Sergeant S and O'Flaherty JT.** Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>α fluorescent proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1783: 1544-1550, 2008.
187. **Worley PF, Zeng W, Huang GN, Yuan JP, Kim JY, Lee MG and Muallem S.** TRPC channels as STIM1 - regulated store-operated channels. *Cell Calcium* 42: 205-211, 2007.
188. **Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC and Edwards SW.** Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 49: 1618-1631, 2010.
189. **Yin HL and Janmey PA.** Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annual Review of Physiology* 65: 761-789, 2003.
190. **Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF and Muallem S.** STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature Cell Biology* 9: 636-U38, 2007.
191. **Zhang BB, Gu F, She CH, Guo H, Li WL, Niu RF, Fu L, Zhang N and Ma YJ.** Reduction of Akt2 inhibits migration and invasion of glioma cells. *International Journal of Cancer* 125: 585-595, 2009.

192. **Zhang SJ, Han JH, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ and Bokoch GM.** Rho-family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein-kinase through the downstream mediator Pak1. *Journal of Biological Chemistry* 270: 23934-23936, 1995.
193. **Zhang Z, Pan L and Zhang Z.** Functional interactions among STIM1, Orai1 and TRPC1 on the activation of SOCs in HL-7702 cells. *Amino Acids* 39: 195-204, 2010.
194. **Zhou H, Lu N, Chen ZQ, Song QL, Yu HM and Li XJ.** Osteopontin mediates dense culture-induced proliferation and adhesion of prostate tumour cells: role of protein kinase C, p38 mitogen-activated protein kinase and calcium. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 104: 164-170, 2009.
195. **Zhou S, Yuan X, Liu Q, Zhang X, Pan X, Zang L and Xu L.** BAPTA-AM, an intracellular calcium chelator, inhibits RANKL-induced bone marrow macrophages differentiation through MEK/ERK, p38 MAPK and Akt, but not JNK pathways. *Cytokine* 52: 210-214, 2010.
196. **Zhou WG, Levine BA and Olson MS.** Platelet-activating-factor - a mediator of pancreatic inflammation during cerulein hyperstimulation. *American Journal of Pathology* 142: 1504-1512, 1993.

## Danksagung

## Lebenslauf

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegt habe.

Münster, den 26.09.2011

Lars Otto Lindemann