

**Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen**

**- Abteilung Experimentelle Embryologie -**

**Abteilungsleiter: Prof. Dr. Ulrich Drews**

**„Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren im menschlichen  
Melanom - Modulation der Chemotaxis“**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Andreas Boss**

**aus  
Ebingen, jetzt Albstadt**

**- 2005 -**

Dekan: Prof. Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Drews

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Garbe

## ***I. Inhaltsverzeichnis***

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b>	2
<b>II. Abbildungen und Tabellen</b>	4
<b>1. Zusammenfassung</b>	6
<b>2. Einleitung</b>	9
<b>3. Material und Methoden</b>	12
<b>3.1 Polymorphkernige Granulozyten</b>	12
3.1.1 Immunhistochemische Methoden	12
3.1.2 Gewinnung von PMN aus venösem Blut	13
3.1.3 Fluorometrische Kalziummessung	13
3.1.4 FACS-Analyse	14
3.1.5 Western-Blot	14
<b>3.2 Die Melanomzelllinie SK-Mel 28</b>	15
3.2.1 Zellkultur	15
3.2.2 Immunzytochemische Methoden	15
3.2.3 Fluorometrische Kalziummessungen	15
3.2.4 Mikroskopische Kalziummessungen	16
3.2.5 Western-Blot	17
3.2.6 Isolierung der RNA	17
3.2.7 RT-PCR	18
3.2.8 Chemotaxis Assay	19
<b>4. Ergebnisse</b>	20
<b>4.1 Polymorphkernige Granulozyten</b>	20
4.1.1 Immunhistochemie im humanen Melanom	20
4.1.2 FACS-Analyse	22
4.1.3 Western-Blot	22
4.1.4 Fluorometrische Kalziummessung	23

<b>4.2 Die Melanomzelllinie SK-Mel 28</b>	25
<b>4.2.1 Immunzytochemie</b>	25
<b>4.2.2 Fluorometrische Kalziummessung</b>	26
▪ (A) Fluorometrische Messung an Zellsuspensionen	
▪ (B) Mikroskop-basierte Kalzium-Messung	
<b>4.2.3 Western-blot</b>	31
<b>4.2.4 RT-PCR</b>	33
<b>4.2.5 Chemotaxis-Assay</b>	34
<b>5. Diskussion</b>	38
<b>6. Danksagung</b>	42
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	43
<b>8. Anhang</b>	
• Chemotaxis-Experimente 1 – 4	47
<b>9. Lebenslauf</b>	53

## **II. Abbildungen und Tabellen**

<b>Abbildung 1A:</b> Immunhistochemische Färbung eines malignen Melanoms mit dem anti-M3-mAChR-Antikörper.	20
<b>Abbildung 1B:</b> Fluoreszenzdoppelfärbung der Granulozyten im Melanom mit anti-CD15-Antikörpern und anti-M3-Antikörpern.	21
<b>Abbildung 2:</b> Fluoreszenz-(FACS)-Analyse an polymorphkernigen Granulozyten.	22
<b>Abbildung 3:</b> Western-Blot von PMN, gefärbt mit M35-Antikörpern und M3-Subtyp-spezifischen Antikörpern.	23
<b>Abbildung 4:</b> Fluorometrische Kalzium-Messung an polymorphkernigen Granulozyten.	24
<b>Abbildung 5:</b> Immunzytochemische Färbung der SK-Mel 28-Zellkultur mit dem monoklonalen Antikörper M35.	25
<b>Abbildung 6:</b> Fluorometrische Messung der intrazellulären Kalziummobilisation an SK-Mel 28-Zellen.	27
<b>Abbildung 7:</b> Zusätzliche Kalziumausschüttung bei Gabe von Carbachol und anschließend Fibronectin.	28
<b>Abbildung 8: A</b> Mikroskopische Kalziummessung an einzelnen SK-Mel 28-Zellen. <b>B</b> Zugehöriges Phasen-Kontrast-Bild.	29
<b>Abbildung 9: A</b> Weitere Aufnahme einer mikroskopische Kalziummessung an SK-Mel 28-Zellen. <b>B</b> Zugehöriges Phasen-Kontrast-Bild.	30
<b>Abbildung 10:</b> Western-Blots von Zellhomogenaten der SK-Mel 28-Zellkultur, gefärbt mit dem anti-M3-mAChR-Antikörper und dem M35-Antikörper.	32

- Abbildung 11:** RT-PCR Experiment mit für den M3- und M5-Subtyp spezifischen Primern. 34
- Abbildung 12:** Konzentrationsabhängige Migration im Boyden-Migrations-Assay auf den Lockstoff Fibronectin. Modulation durch Carbachol. 36
- Abbildung 13:** Effekt des spezifischen muskarinischen Inhibitors Atropin auf die cholinerge Stimulation. 37

## 1. Zusammenfassung

Primäre oder metastatische humane Melanomzellen exprimieren muskarinische Rezeptoren. Die pharmakologische Charakterisierung von Zellsuspensionen an der humanen Melanomzelllinie SK-Mel 28 weist auf eine Expression des Subtyps M3 mit einem  $K_D$  von ungefähr  $2 \times 10^{-6}$  M. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein embryologischer Charakterzug, der an der Morphogenese beteiligt ist, in einem malignen oder vor-malignen Zustand reaktiviert wird und die Zellbewegung beim invasiven Wachstum vermittelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, einen Zusammenhang zwischen der Expression muskarinischer Rezeptoren und der Zellmigration aufzuzeigen. In einer immunhistochemischen Studie des muskarinischen Rezeptors im menschlichen Melanom, färbten sich neben den Melanomzellen polymorphkernige Granulozyten (PMN) intensiv an. Um diese Beobachtung aufzuklären und um möglicherweise ein einfach zugängliches Modell des muskarinischen Systems in migrierenden Zellen zu finden, wurden zunächst PMN aus menschlichem peripherem Venenblut untersucht.

Bei einer FACS-Analyse wurden die aus venösem Blut gewonnenen PMN zu 100 % mit einem Antikörper gegen den muskarinischen Rezeptor (M35) angefärbt. In einer Fluoreszenzfärbung reagierten die PMN mit einem für den M3-Subtyp spezifischen Antikörper. Die Kopplung des muskarinischen Rezeptors an den Signaltransduktionsweg wurde mit einer fluorometrischen Kalzium-Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM untersucht. Mit dem Chemotaktikum Interleukin-8 konnte eine Kalzium-Mobilisation ausgelöst werden, jedoch nicht mit Carbachol. Das Molekulargewicht des muskarinischen Rezeptors auf den PMN wurde mit einem Western-Blot bei 63 kDa bestimmt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin,

dass die PMN zwar an der Oberfläche ein Protein besitzen, das spezifische Antikörper für den M3-Subtyp des muskarinischen Rezeptors bindet. Jedoch ist dieses Protein nicht funktionell aktiv.

Als nächstes wurde die Melanomzelllinie SK-Mel 28 untersucht. Das Molekulargewicht des muskarinischen Rezeptors auf den SK-Mel 28-Zellen wurde durch Western-Blots mit dem monoklonalen Antikörper M35 bestimmt. Es zeigte sich eine starke Linie bei 66 kDa und eine schwache Linie bei 63 kDa. Ein Western-Blot mit M3-Subtyp-spezifischen Antikörpern reproduzierte die Linie bei 66 kDa. Durch RT-PCR wurde die Existenz von mRNA für die Subtypen M3 und M5 nachgewiesen. Diese Daten weisen darauf hin, dass SK-Mel 28-Zellen eine große Anzahl M3- und eine kleinere Anzahl M5-Rezeptoren exprimieren.

Bei Chemotaxis-Assays mit Boden-Kammern wurde nach der Applikation von Carbachol in das obere Kompartiment eine Zunahme der Migrationsbewegung in Richtung des chemotaktischen Faktors Fibronectin gefunden. Carbachol allein zeigte keinen Effekt. Dies spricht für einen modulatorischen Effekt des muskarinischen cholinergen Systems auf die Zellbewegung. Immunhistochemie des mAChR in Melanomen färbt vor allem Tumorzellen im Bereich der Invasionszone. Die Auslösung einer Kalziumausschüttung und die Modulation der Chemotaxis in der humanen Melanomzelllinie SK-Mel 28 nach cholinenger Stimulation weisen auf eine indirekte Funktion des muskarinischen Rezeptors bei der gerichteten Zellbewegung hin.



## 2. Einleitung

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) findet man nicht nur in neuronalen Zellen und Zielgeweben des parasympathischen Nervensystems, sondern auch in vielen anderen nicht-neuronalen Zellen und Geweben sowie in embryonalen Zellen während der Morphogenese (Oettling et al, 1988).

Fünf verschiedene Subtypen des mAChR (M1-M5) sind durch Klonierung identifiziert worden. Zwei unterschiedliche Effektormechanismen sind bisher bekannt. Eine Gruppe, die Subtypen M1, M3 und M5-mAChR aktivieren Phosphoinositol-Hydrolyse über  $G_q$ -Proteine und stimulieren dadurch die Ausschüttung von intrazellulärem Kalzium. Die M2- und M4-Subtypen inhibieren die Adenylatzyklase-Aktivität über  $G_i$ -Proteine und reduzieren cAMP (Review von Hulme, Birdsall und Buckley, 1990).

Zellen, die den muskarinischen Rezeptor exprimieren, findet man auch in menschlicher Haut. Keratinozyten von normaler menschlicher Haut exprimieren die Subtypen M1, M3, M4 und M5 (Ndoye et al, 1998). Die Stimulation des muskarinischen Rezeptors in menschlichen Keratinozyten führt zu starken Effekten bei der Proliferation, Migration und Differentiation (Grando and Horton, 1997).

In einer früheren Studie hat unsere Arbeitsgruppe muskarinische Rezeptoren in Naevi, primären und metastatischen Melanomen durch Immunhistochemie an Kryostat-Schnitten nachgewiesen. Im Gegensatz dazu besitzen differenzierte Melanozyten normaler menschlicher Haut keine muskarinischen Rezeptoren (Grando et al, 1995, Lammerding-Köppel et al, 1997).

Zur Fortführung dieser Arbeit wurden in Paraffin eingebettete Melanome bei hoher Auflösung mit Subtypen-spezifischen Antikörpern für den muskarinischen Rezeptor untersucht. Die Melanomzellen zeigten eine große Breite unterschiedlicher Bindungsintensitäten mit dem polyklonalen anti-M3-mAChR-Antikörper. Zusätzlich zu den Melanomzellen zeigten die infiltrierenden polymorphkernigen Granulozyten (PMN) eine starke gleichmäßig verteilte zytoplasmatische Reaktion mit den Antikörpern.

Bei einer Literatursuche fanden sich verschiedene Studien über den muskarinischen Rezeptor auf PMN. Jedoch wird darin über sich widersprechende Daten berichtet. Dulis (Dulis, Gordon and Wilson, 1979) stellte ungefähr  $5 \times 10^4$  und Lopker (Lopker et al., 1980)  $8 \times 10^4$  Bindungsstellen für  $^3\text{H}$ -QNB je PMN fest. Dulis beobachtete einen Anstieg der Ausschüttung lysosomaler Enzyme nach cholinergem Stimulation. Estensen (Estensen et al., 1973) berichtete über einen Anstieg der chemotaktischen Aktivität nach einer Stimulation mit Acetylcholin. Meurs (Meurs et al., 1993) konnte keine Bindungsstelle für  $^3\text{H}$ -NMS auf den PMN finden, und auch keinen biologischen Effekt nach Stimulation.

Es ist bekannt, dass Melanomzellen für PMN chemotaktische Faktoren exprimieren (Ijland 1999, Westphal 2000, Schaber 1994), beispielsweise Interleukin-8. Außerdem wurde beschrieben, dass der cytokine granulocyte-macrophage colony stimulation factor (GM-CSF), der die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Leukozyten fördert, auch die Migration von Melanomzellen stimuliert (Kohn et al., 1993). Der Faktor melanoma growth stimulatory activity (MGSA) ist ein Zytokin, das eine erhebliche Ähnlichkeit zu den entzündlichen Zytokinen, wie etwa Interleukin-8, aufweist. MGSA ist ein potenter Entzündungsfaktor für PMN (Moser et al., 1990). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass PMN von Melanomzellen durch Chemotaxis angelockt werden.

Um die Funktion der mAChR auf den infiltrierenden PMN in menschlichen Melanomen zu untersuchen, wurde der Rezeptor auf den PMN aus peripherem Venenblut durch FACS-Analyse, fluorometrische Kalzium-Messung und Western-Blot näher charakterisiert.

Die SK-Mel 28 Melanom-Zelllinie wurde durch das Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York von einem menschlichen primären Melanom etabliert (Carey et al. 1979). Die pharmakologische Charakterisierung der Kalzium-Mobilisation durch Dosis-Wirkungs-Kurven nach der Stimulation mit Acetylcholin weist auf eine Expression des M3-Subtyps in der SK-Mel 28-Zellkultur hin (Noda et al, 1998). Das pharmakologische Profil war identisch mit dem von embryonalen Zellen (Oettling, Gotz and Drews, 1992).

Im Embryo erscheinen muskarinische Rezeptoren temporär während der Phase der Morphogenese (Schmidt, 1981). Der muskarinische Rezeptor in embryonalen Zellen verschwindet, sobald der Prozess der Organformation beendet ist (Oettling et al, 1988). Während der embryonalen Entwicklung wandern Vorläufer von Melanozyten von der Neuralleiste zur differenzierenden Epidermis. Wandernde Neuralleistenzellen besitzen vorübergehend mAChR (Lammerding-Köppel and Drews, 1993). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein embryonaler Charakterzug, der an der Morphogenese beteiligt ist, in einem malignen oder vor-malignen Zustand reaktiviert wird und die Zellbewegung beim invasiven Wachstum vermittelt. Die Stimulation des muskarinischen Rezeptors der SK-Mel 28-Zellen mit Acetylcholin und Carbachol induziert Kontraktionen und eine Änderung der Zellform (Sailer, Oppitz and Drews, 2000). In Neuroblastom-Zellen können Lamellen-Ausläufer durch Acetylcholin und Carbachol induziert werden (Rosner, Vacun and Rebhan, 2000).

Um die Funktion des mAChR in humanen Melanomzellen zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit der mAChR in der humanen Melanomzelllinie SK-Mel 28 durch mikroskopische Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, Western-Blot und RT-PCR charakterisiert.

Weiterhin wurde der Einfluss der Stimulation des mAChR auf humane Melanomzellen durch Experimente mit Boyden-Kammern untersucht. Carbachol alleine hatte in den Chemotaxis-Versuchen keinen Einfluss auf die Migration der SK-Mel 28-Zellen. Es wurde daher der Migrationsassay mit Fibronectin etabliert und die Wirkung des Carbachols auf den Fibronectin-Effekt studiert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Polymorphkernige Granulozyten

##### 3.1.1 Immunhistochemische Methoden

Paraffinblöcke mit Malignen Melanomen wurden von der Hautklinik der Universität Tübingen besorgt. Vier Melanome des nodulären Typs, fünf superfiziell spreitende Melanome (SSM), zwei akrolentiginöse Melanome (ALM) sowie vier verschiedene Arten von Naevi wurden untersucht. Die Melanome wurden entsprechend pathologischer Standardverfahren charakterisiert, die die Bestimmung des Typs, der Eindringtiefe (Clark) und die Tumorgroße (Breslov) einschlossen. Die Diagnose wurde freundlicherweise von Dr. A. Horny, Institut für Pathologie, oder Dr. Garbe, Universitäts-Hautklinik, gestellt.

Für die Anfärbung des M3-Subtyps des muskarinischen Rezeptors wurden 5 µm dicke Schnitte mit dem polyklonalen anti-M3-Antikörper (Biotrend, Cologne, Germany, 1:4000) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Präparate wurden mit Biotin-konjugiertem anti-rabbit IgG (Dako) in einer Verdünnung von 1:500 für 60 min bedeckt. Danach wurden die Schnitte mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (Dako, 1:500) für 60 min inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Entwicklung mit DAB-verstärktem blauem Färbereagenz entwickelt (HistoMark TrueBlue, KPL, Gaithersburg, USA).

Für die Kolokalisation von PMN-Antigen und M3-muskarinischem Rezeptor durch Immunfluoreszenz, wurden zwei in Paraffin eingebettete Melanome des nodulären Typs benutzt. Aus den Schnitten wurde das Paraffin herausgelöst. Danach wurden sie in 0,1 M Zitratpuffer pH 6.0 aufgenommen. Nach einer Hitze-Behandlung im Mikrowellenofen (600 W) über 2 min wurden die Gewebe mit einem anti-CD15-IgG (Dako, Germany, 1:50) über Nacht inkubiert. Ein FITC-gekoppelter rabbit anti-mouse IgM (Dako) wurde als zweiter Inkubations-

schritt benutzt. Um den muskarinischen Rezeptor anzufärben, wurde der polyklonale anti-M3 IgG 1:2000 nach einer Präinkubation mit 5 % normal-rabbit-Serum angewendet. Der TRITC-konjugierte zweite Antikörper (Dako) 1:400 wurde über 60 min appliziert. Die Doppelfluoreszenzfärbung der PMN im Melanomschnitt wurde durch ein Fluoreszenzmikroskop (Axio-plan 1, Zeiss, Oberkochen, Germany) ausgewertet.

### 3.1.2 Gewinnung von PMN aus venösem Blut

Menschliche PMN wurden aus heparinisiertem venösem Blut von gesunden Freiwilligen durch isopyknische Zentrifugation in einem Sucrose-Gradienten (PolymorphPrep, Nycomed Pharma, Torshov, Norway) gewonnen. Die PMN wurden in Dulbecco's PBS mit 0,1 % BSA (bovine serum albumin) gewaschen. Übriggebliebene Erythrozyten wurden durch die Addition von Lyse-Puffer entfernt (0,83 % Ammoniumchlorid, 0,1 % Kaliumhydrogencarbonat, 0,0037 % EGTA). Danach wurden die PMN erneut gewaschen und die Lebendrate mit Trypan-Blau-Test geprüft. In allen Experimenten war die Prozentzahl der ungefärbten PMN nicht unter 98 %.

### 3.1.3 Fluorometrische Kalzium-Messung

Siehe *Material und Methoden* im Abschnitt 3.2.3.

#### 3.1.4 FACS-Analyse

100 µl Zellsuspension ( $4 \times 10^5$  Zellen in PBS mit 0,1 % BSA) wurden mit dem monoklonalen Antikörper M35 (12 µg/ml) für den muskarinischen Rezeptor oder dem RII115 (2 µg/ml) gegen den CXC Chemokin-Rezeptor Typ 2 inkubiert. M35 wurde von Argene Biosoft, Varilhes, France bezogen, der RII115 wurde freundlicherweise von Dr. Ludwig, Forschungszentrum Borstel, Deutschland [Ludwig, et al, Blood 90, 1997] zur Verfügung gestellt. Eine zweite Inkubation über 60 min wurde mit einem FITC-konjugierten goat anti-mouse IgM auf Eis durchgeführt. Die Analyse wurde in einem Flusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) durchgeführt. Die Hintergrund-Fluoreszenz wurde mit einer Isotyp-Kontrolle gemessen: einem IgM, der an keinem Epitip der PMN bindet.

#### 3.1.5 Western-Blot

Siehe *Material und Methoden* im Abschnitt 3.2.5.

## 3.2 Die Melanomzelllinie SK-Mel 28

### 3.2.1 Zellkultur

Die humane Melanom-Zelllinie SK-Mel 28 wurde wie beschrieben kultiviert (Noda et al, 1998). In Kürze: Die Zellen wurden als Monolayer in Plastikflaschen mit RPMI 1640-Medium, das 10 % Hitze-inaktiviertes FCS, 100 U/ml Penizillin, 100 µl/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin enthielt, in 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C gezüchtet. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst.

### 3.2.2 Immunzytochemische Methoden

Die Immunfärbung von Zellkulturen wurde durch die Inkubation von 40 000 Zellen in 2 ml RPMI-Medium, das 10 % fötales Kälberserum enthielt, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch 3,7 % Formaldehyd für 10 min fixiert. Die Präinkubation wurde über 45 min mit 0.1 % bovinem Serumalbumin durchgeführt. Der monoklonale Antikörper M35 (Argene Biosoft, Varilhes, France), der gegen alle Subtypen des muskarinischen Rezeptors gerichtet ist, wurde in einer Verdünnung von 1:500 als erster Antikörper genutzt. Als zweiter Antikörper wurde ein Cy3 konjugierter rabbit anti-mouse Antikörper (Rockland, Gilbertsville, USA, 1:200) über 120 min angewendet. Für die Fixierung wurde DAPI-Farbstoff-enthaltendes Vectashield Eindeckungsmedium (Vector, Burlingame, USA) benutzt.

### 3.2.3 Fluorometrische Kalziummessungen

Zellsuspensionen ( $2 \times 10^6$  Zellen in 1 ml modified Hanks solution) wurden über 30 min bei 37 °C mit 2 µM fura-2/AM inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in modified Hanks solution (ohne NaHCO<sub>3</sub>, Zusatz von 20 mM HEPES, eingestellt auf pH 7,3) gewaschen. Die Fluoreszenzintensität wurde in einem Jobin Yvon Spektrofluorometer JY 3D, das



mit einer temperaturkonstanten Küvettenhalterung und einem magnetischen Rührer ausgestattet ist, gemessen. Die Anregungswellenlänge wurde auf 380 nm und die Emissionswellenlänge auf 500 nm gesetzt. Vor der Messung wurde Physostigmin in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt. Nach 3 min Basisfluoreszenz wurden zur Stimulation des muskarinischen Rezeptors Acetylcholin oder Carbachol zugegeben, wodurch ein Abfall der Fluoreszenzintensität ausgelöst wird.

#### 3.2.4 Mikroskopische Kalziummessungen

40 000 Zellen in 2 ml RPMI Medium, das 10 % fötales Kälberserum enthielt, wurden für 2 Tage in 6 cm Greiner-Schalen angezchtet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2  $\mu$ M fura-2/AM über 30 min bei 37 °C gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen und mit 2 ml neuem Medium versorgt. Ein Olympus Invers-Mikroskop IX 50 (Olympus Optical Co., Ltd., Japan) und AnalySIS Auswertungssoftware (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) wurden zur Messung des Kalziumsignals benutzt. Alle zehn Sekunden nahm eine mit einem fura-2-Filter ausgestattete Digitalkamera (F-View, Soft Imaging System GmbH) ein Bild auf, das in einer Datenbank gespeichert wurde. Um Carbachol oder Atropin zu applizieren, wurden die Substanzen in 500  $\mu$ l Medium in der entsprechenden Konzentration aufgenommen und zu dem Medium in der Greiner-Schale gegeben. Zur Analyse des Kalziumsignals wurde eine Region of Interest (ROI), die eine einzelne Zelle enthielt, definiert. In dieser ROI wurde die zeitliche Veränderung des mittleren Intensitätswertes aufgezeichnet. Nach der Messung des Kalziumsignals wurde ein Phasen-Kontrast-Bild der Zellen aufgenommen.

### 3.2.5 Western-Blot

Die Zellen wurden in Lyse-Puffer aufgelöst (versetzt mit 10 % SDS) und 1 min denaturiert bei 100 °C. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE in 10 % N,N'-Bis-Methylen-Acrylamide-Gel in einer Mini-Protean II Kammer (BioRad, München, Deutschland) über 60 min bei 200 V aufgetrennt. Danach wurden die Proteine über 90 min bei 100 V auf Nitrozellulose geblottet. Der Nitrozellulose-Filter wurde in Streifen geschnitten. Die Präinkubation wurde mit 5 % fettarmem Milchpulver durchgeführt, dem eine einstündige Inkubation mit dem polyklonalen anti-M3-mAChR-Antikörper (Biotrend, Köln, Deutschland, 1:1000) oder mit dem monoklonalen anti-muskarinischer-Rezeptor Antikörper M35 (Argene Biosoft, Varilhes, Frankreich, 1:500) folgte. In einem weiteren Inkubationsschritt wurde der biotinylierte zweite goat anti-rabbit Antikörper oder rabbit anti-mouse Antikörper 1:500 über eine Stunde appliziert. Nach einer Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wurde die Reaktion mit DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sichtbar gemacht.

### 3.2.6 Isolierung der RNA

Eine nahezu konfluent gewachsene Monolayer-Kultur der humanen Melanomzelllinie SK-Mel 28 (ca. 75 cm<sup>2</sup>) wurde trypsinisiert, gewaschen, und gezählt. Die gesamte in 100 µl konzentrierter Zellsuspension ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/µl) enthaltene DNA wurde durch die GITC-Membran-Extraktions-Methode (RNeasy Mini Protokoll, Quiagen, Germany) extrahiert. Um kontaminierende genomische DNA zu entfernen, wurden die Proben mit einer Endkonzentration von 0,1 µg RNA/µl über 30 min bei 37 °C in einer Lösung aus 10 U RNase-freier Dnase I (Amersham Biosciences, Schweden), 40 U RNase-Inhibitor-Mix (Promega, USA), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 40 mM Tris-HCl bei pH 8,4 inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 mM EDTA gestoppt. Die vollständige Inaktivierung der DNase I wurde durch das Erhitzen der Proben auf 65 °C über 10 min sichergestellt.

### 3.2.7 RT-PCR mit Subtypen-spezifischen Primern für M3 und M5

Die mit DNase behandelten 1- $\mu$ g-RNA enthaltenden Proben wurden revers transkribiert (RT) in einer 50  $\mu$ l Lösung aus 200 U RNase-freier Moloney-Murine-Leukemia-Virus-Reverse Transkriptase (Promega, USA), 40 U RNase-Inhibitor-Mix, 10  $\mu$ M Random-Hexamer-Primer (Promega, USA), einem Nukleotid-Mix (Promega, USA) mit dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils in einer Endkonzentration von 0,2 mM, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT and 50 mM Tris-HCl bei pH 8.3. Die Synthese von cDNA wurde über 60 min bei 40 °C durchgeführt. Die Amplifikation wurde durch die folgenden von NDoye (Ndoeye et al, 1998) entwickelten sense- und anti-sense-Primer erreicht: 5' - GAC AGA AAA CTT TGT CCA CCC CAC - 3' and 5' - AGA AGT CTT AGC TGT GTC CAC GGC - 3' für M3 (496 bp), 5' - CTC ACC ACC TGT AGC AGC TAC CC - 3' und 5' - CTC TCT TTC GTT TGG TCA TTT GAT G - 3' für M5 (397 bp) (MWG-Biotech AG, Deutschland).

Sense- und anti-sense-Primer für  $\beta$ -Actin wurden zur semi-quantitativen Kontrolle der Vielfältigkeit der cDNA durch die PCR benutzt. Die bei der PCR benutzten Proben enthielten 100  $\mu$ l des RT-Reaktionsgemisches mit 2 ng/ml cDNA, 0,025 U/ $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (Promega, USA), 0,5 nmol/ $\mu$ l sense-Primer, 0,5 nmol/ $\mu$ l anti-sense-Primer, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega,USA), 50 mM KCl, 0,1 % Triton<sup>®</sup>X-100 und 10 mM Tris-HCl bei pH 9,0. Die Proben wurden in einen vorgeheizten Thermocycler eingelegt und für 5 min bei 94 °C belassen. Das Cycling bestand aus Denaturierung bei 94 °C über 30 s, gefolgt von einer Annealing-Phase bei 55 °C und 30 s und einer Elongationsphase bei 72 °C und 120 s während der ersten 20 Zyklen, danach 150 s. Insgesamt wurden 35 Zyklen durchgeführt, um auch kleine Mengen von cDNA-Transkript zu verstärken. Der letzte Zyklus enthielt einen zusätzlichen 10-minütigen Schritt bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden dann durch E-

lektrophorese in einem 2%igen Agarosegel, das 0,5 µl/ml Ethidiumbromid enthielt, analysiert. Als Standard wurde ein 100-bp-DNA-Mix (Gibco, Life Technologies, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese lief über 40 min bei 130 V Spannung. Die Gele wurden mittels UV-Fluoreszenz visualisiert und photographiert.

Als Kontrolle für die Qualität der PCR Primer wurden nicht-DNase-behandelte Proben mit genomischer DNA als Positiv-Kontrolle verwendet. Um eine mögliche Kontamination der DNase-behandelten Proben durch residuelle genomische DNA zu kontrollieren, wurde der RT-Schritt ausgelassen (Negativkontrolle I). Um schließlich eine Kontamination durch fremde RNA bei einem Zwischenschritt der PCR auszuschließen, wurde DEPC-Wasser als Probe (Negativkontrolle II) verwendet.

### 3.2.8 Chemotaxis Assay

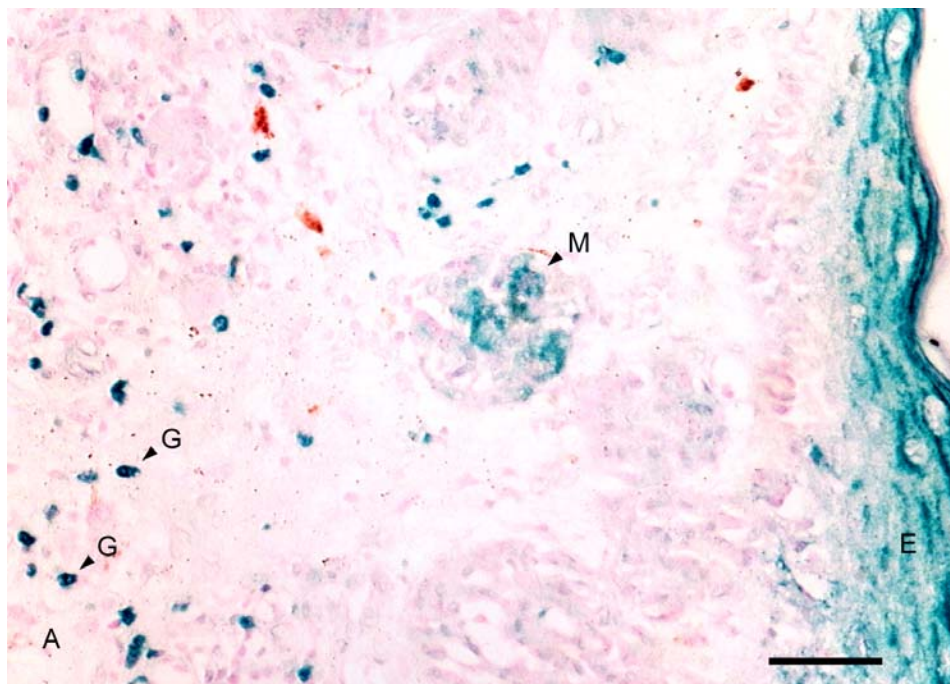
Der Migrationsassay wurde mit dem BD Falcon 24-well-Migrationssystem (Zellkultur-Inserts 353097, BD Biosciences). 50 000 Zellen pro Insert (8 µm Porengröße) wurden über 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen im oberen Kompartiment wurden in 500 µl Medium mit 10 % fötalem Kälberserum aufgenommen. Das Chemotaktikum Fibronectin (Fibronectin aus humanem Plasma, F-0895, Sigma) des unteren Kompartiments wurde in 600 µl RPMI-Medium aufgenommen. Cholinerge Stimulation wurde durch die Addition des cholinergen Agonisten Carbachol zum oberen Kompartiment der Chemotaxis-Kammer erreicht. Nach der Inkubation wurde der Polyethylene-Terephthalat-Filter des Falcon-Inserts fixiert und mit Coomassie-Blue gefärbt. Die Zellen wurden mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer und einem Olympus Invers-Mikroskop IX 50 mit AnalySIS Auswerte-Software gezählt. Bei jedem Filter wurden sechs Quadrate der Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgewertet. Mittelwert und Standardabweichung jedes Inserts wurden separat berechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Polymorphkernige Granulozyten

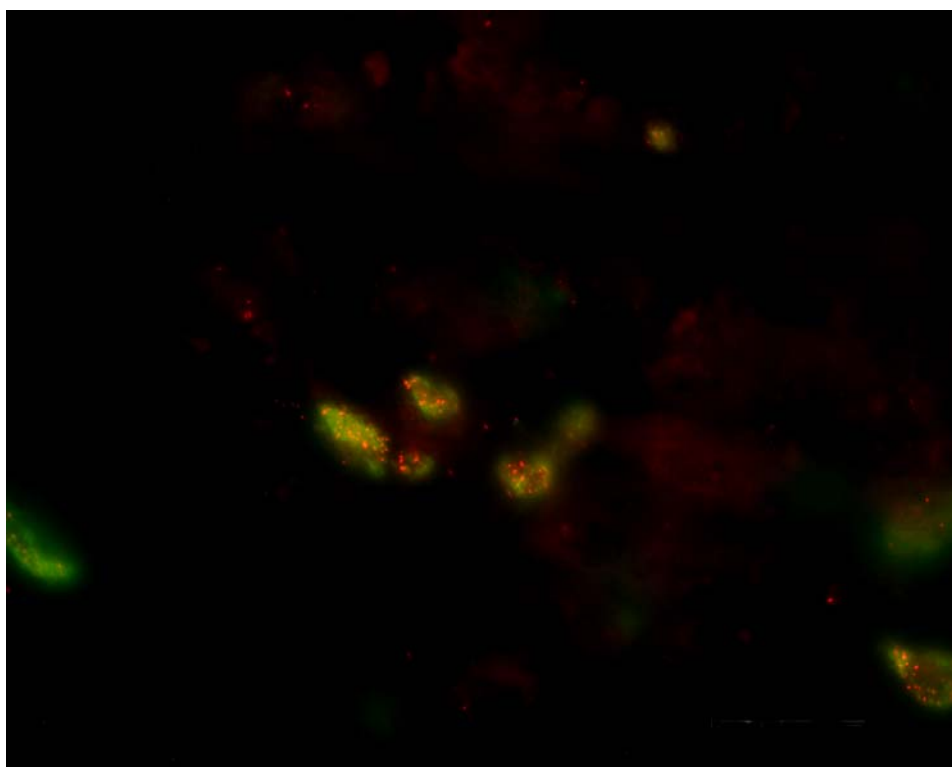
#### 4.1.1 Immunhistochemie des muskarinischen Rezeptors im humanen Melanom

Paraffinschnitte von Melanomen wurden mit dem anti-M3-mAChR-Antikörper gefärbt und mit Peroxidase-True Blue-Reaktion visualisiert. Es wurden 4 noduläre Melanome, 5 superficiell spreitende Melanome, 2 akro-lentiginöse Melanome und 4 verschiedene Arten von Naevi untersucht. In allen betrachteten Melanomen zeigte sich zusätzlich zu der Reaktivität der Melanomzellen eine starke Immunreaktivität der infiltrierenden PMN. Die Melanomzellen zeigten eine große Breite unterschiedlicher Färbungsintensitäten. Immunreaktive Punkte waren ungleichmäßig im Zytoplasma der positiv reagierenden Melanomzellen verteilt (Abb. 1A).



**Abbildung 1A:** Immunhistochemische Färbung eines malignen Melanoms (nodulärer Typ) mit dem anti-M3-mAChR-Antikörper, Visualisierung mit True Blue. M: Melanomzellen, G: Granulozyten, E: Epidermis. Die Melanomzellen zeigen eine große Variation der Immunreaktivität, wohingegen die Granulozyten eine starke gleichmäßige Anfärbung aufweisen. Der Balken entspricht 50 µm.

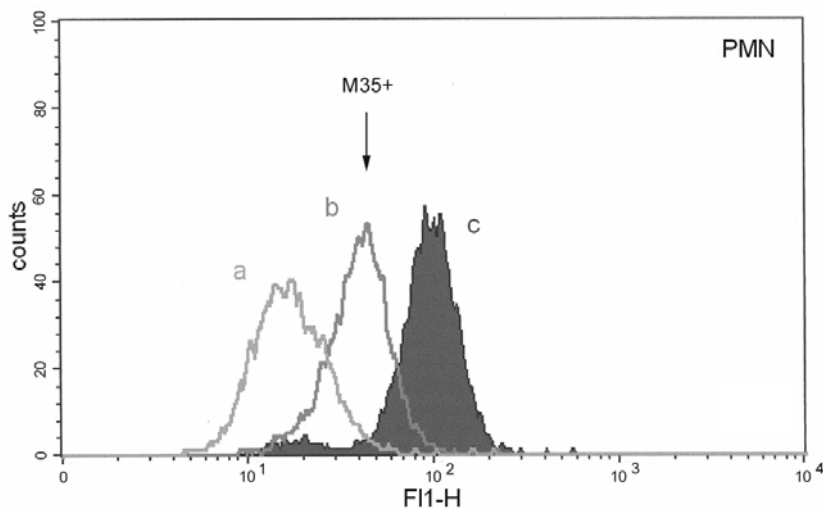
Die PMN waren im Melanom und umgebenden Gewebe verteilt. Die Konzentration der PMN war am höchsten in der Nähe von Tumorgefäßen. Die Granulozyten zeigten eine starke gleichmäßige zytoplasmatische Reaktion mit M3-spezifischen Antikörpern. Um zu überprüfen, ob alle PMN im Melanomschnitt gefärbt waren, wurde eine Kolo-kalisation durch Doppelfärbung des M3-mAChR und eines für PMN spezifischen Antigens (CD15, Lewis-Antigen) durchgeführt. CD15 wurde mit FITC-konjugierten und M3-mAChR mit TRITC-konjugierten Sekundärantikörpern visualisiert. Die Doppelfärbung zeigte, dass alle CD15-positiven PMN auch mit dem M3-mAChR-Antikörper reagierten (Abb. 1B).



**Abbildung 1B:** Fluoreszenzdoppelfärbung der Granulozyten im Melanom mit anti-CD15-Antikörpern (FITC, grün) und anti-M3-Antikörpern (TRITC, rot). Alle CD15-positiven Granulozyten zeigten auch Immunoreaktivität für den M3-muskarinischen Rezeptor.

#### 4.1.2 FACS-Analyse

In der flusszytometrischen Analyse zeigten die PMN aus peripherem Venenblut eine spezifische Bindung für Antikörper gegen den muskarinischen Rezeptor (M35) im Vergleich zu einer Isotyp-Kontrolle, die nicht spezifisch an ein Epitop der PMN bindet (Abb. II). Als Positivkontrolle wurden die PMN mit einem anti-CXC-R2-Antikörper statt des M35 inkubiert. Die Flusszytometrie bewies, dass die M35- und anti-CXC-R2-Antikörper homogen mit der PMN-Population reagieren.

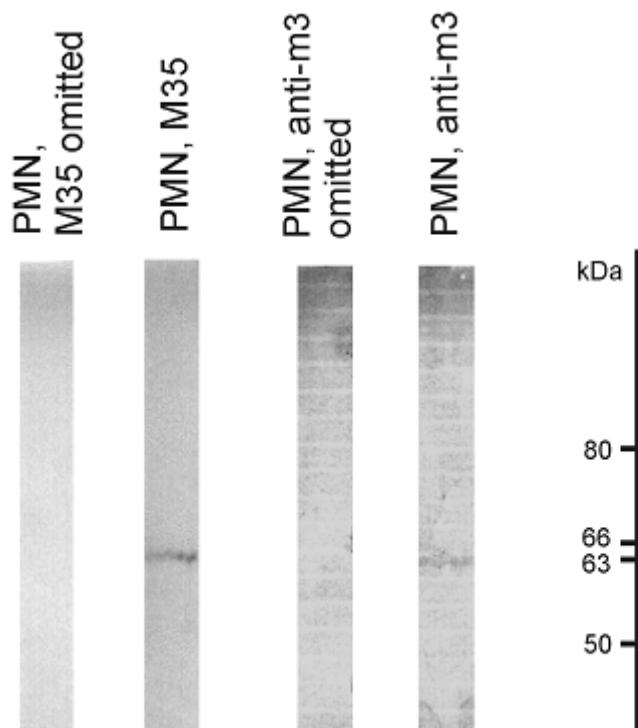


**Abbildung 2:** FACS-Analyse an PMN. a: Isotyp-Kontrolle, b: M35 anti-mAChR-Antikörper, c: anti-CXC-R2-Antikörper. Die PMN zeigen eine homogene Anfärbung mit einem Antikörper gegen muskarinische Rezeptoren.

#### 4.1.3 Western-Blot

Das Molekulargewicht wurde durch SDS-PAGE und anschließenden Western-Blot von Zellhomogenaten untersucht. Das Protein des muskarinischen Rezeptor wurde mit dem polyklonalen anti-M3-Subtyp-Antikörper sowie dem monoklonalen M35-Antikörper, der gegen die

Ligandenbindungsstelle des mAChR gerichtet ist und deswegen unabhängig vom Subtyp bindet [10], detektiert. Bei den PMN wurde durch beide Antikörper eine schwache Bande bei ungefähr 63 kDa nachgewiesen.

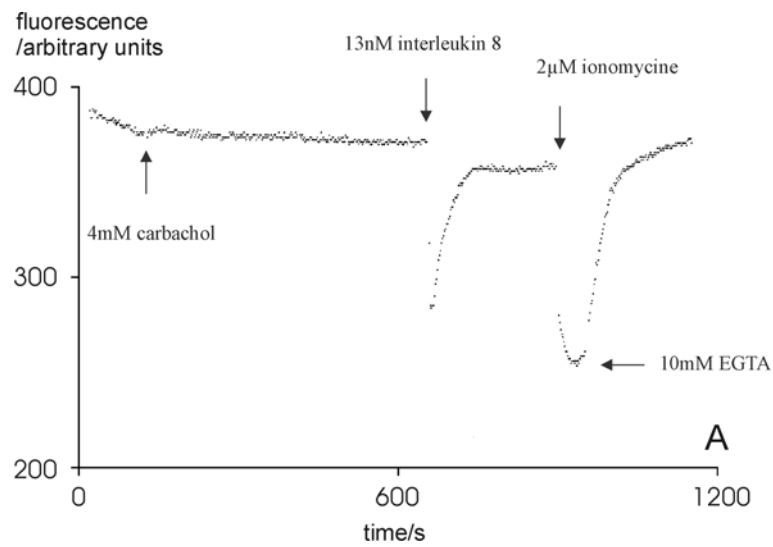


**Abbildung 3:** Western-Blot von PMN, gefärbt mit M35-Antikörpern und M3-Subtyp-spezifischen Antikörpern. Bei 63 kDa zeigte sich bei beiden Antikörpern eine spezifische Bande.

#### 4.1.4 Fluorometrische Kalzium-Messung

Bei der PMN-Stimulation durch Acetylcholin oder Carbachol zeigte sich kein Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Als Positivkontrolle wurden die PMN anschließend mit einer äquivalenten Dosis der chemotaktischen Substanz Interleukin-8 (Il-8) stimuliert, deren Wirkung über den CXC-Rezeptor vermittelt wird. Nach der Stimulation mit Il-8 zeigte sich ein klarer Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration in den PMN.



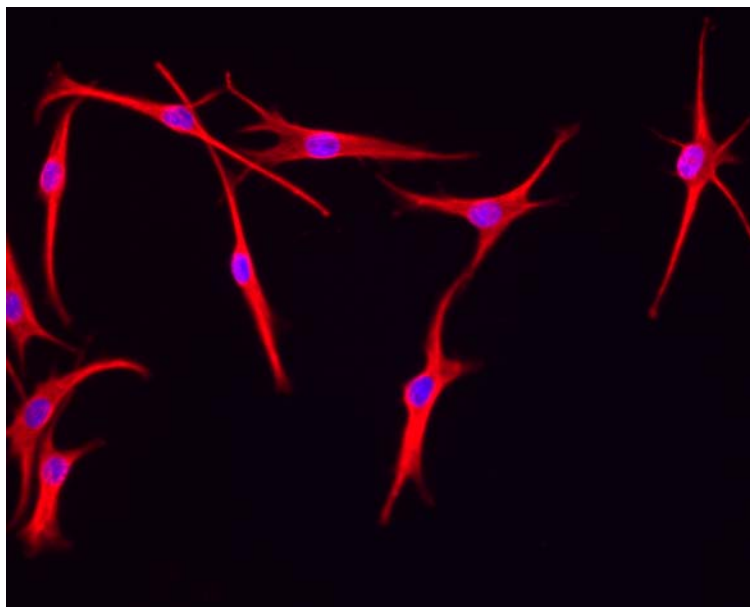


**Abbildung 4:** Fluorometrische Kalzium-Messung an PMN. Cholinerge Stimulation mit 4 mM Carbachol zeigt keine Wirkung, wohingegen 13 nM Interleukin-8 als Positivkontrolle einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt.

## 4.2 Die Melanomzelllinie SK-Mel 28

### 4.2.1 Immunzytochemie des muskarinischen Rezeptors in der Melanom-Zellkultur

Immunzytochemische Färbung der SK-Mel 28-Zellkulturen mit dem monoklonalen Antikörper M35 (Abb. 5) zeigte, dass alle Zellen den muskarinischen Rezeptor exprimieren und damit ein leicht zugängliches Modell für die Untersuchung des Einflusses des muskarinischen Rezeptors auf die Migration darstellen (im Rahmen eines Boyden-Kammer-Experiments). Der Rezeptor auf den SK-Mel 28-Zellen wurde durch zellbiologische Untersuchungen näher charakterisiert.



**Abb. 5:** Immunzytochemische Färbung der SK-Mel 28-Zellkultur mit dem monoklonalen Antikörper M35. Die Zellen zeigen eine einheitliche Anfärbung in der Zellkultur.

#### 4.2.2 Fluorometrische Kalziummessung

Messungen an Zellsuspensionen (A) wurden mit Mikroskop-basierten Messungen an einzelnen Zellen (B) verglichen.

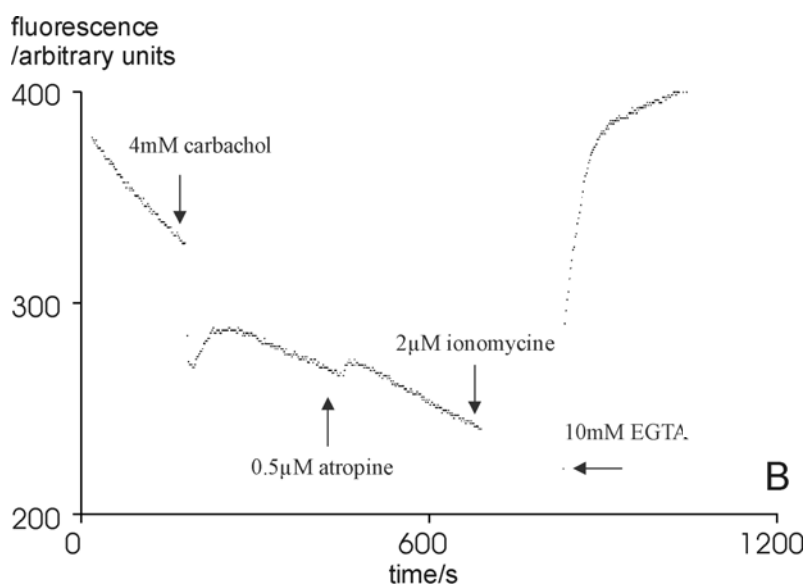
##### (A) Fluorometrische Messung an Zellsuspensionen

Der Funktionszustand des muskarinischen Rezeptors wurde durch die fluorometrische Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Zellsuspensionen der SK-Mel 28-Zelllinie untersucht. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff fura-2/AM gefärbt. Die Fluoreszenz wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Bei 380 nm Anregungswellenlänge führte ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität.

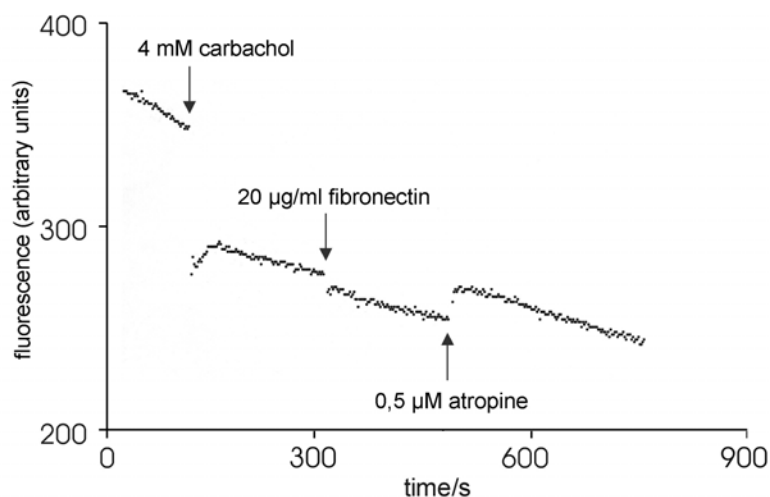
Abb. 6 zeigt die Kalzium-Mobilisation in Zellsuspensionen. Die Zellen reagieren durch Kalzium-Mobilisation auf eine Stimulation mit cholinergen Agonisten. Man kann eine schnelle Mobilisation (Peak-Phase) von einem verzögerten Einstrom extrazellulären Kalziums (Plateau-Phase) – wie von Oettling gezeigt (Oettlin, Gotz and Drews, 1992) – unterscheiden. Der konstante Abfall der Fluoreszenzintensität wurde durch das Ausströmen des Fluoreszenzfarbstoffs aus den Zellen verursacht. Die Zugabe von Atropin vor der cholinergen Stimulation verhinderte den Effekt der cholinergen Agonisten (Daten nicht gezeigt). Zugabe von Atropin nach der Stimulation mit Carbachol oder Acetylcholin resultierte in einer Rückstellung der Plateau-Phase. Dies weist darauf hin, dass eine Blockierung des muskarinischen Rezeptors den Einstrom extrazellulären Kalziums unterbricht.

Am Ende des Experiments wurde durch Ionomycin, ein Ionophor, das Kalziumkanäle öffnet, ein maximaler Einstrom extrazellulären Kalziums erreicht. Die Zugabe von EGTA bewirkte einen maximalen Anstieg der Fluoreszenzintensität. In einem weiteren Experiment (Abbil-

dung 7) wurde nach einer Stimulation mit Carbachol ein weiterer Anstieg der Kalziumkonzentration durch die Gabe von 20  $\mu\text{g/ml}$  Fibronektin ausgelöst, der sich zum Kalziumsignal des Carbachols addiert.



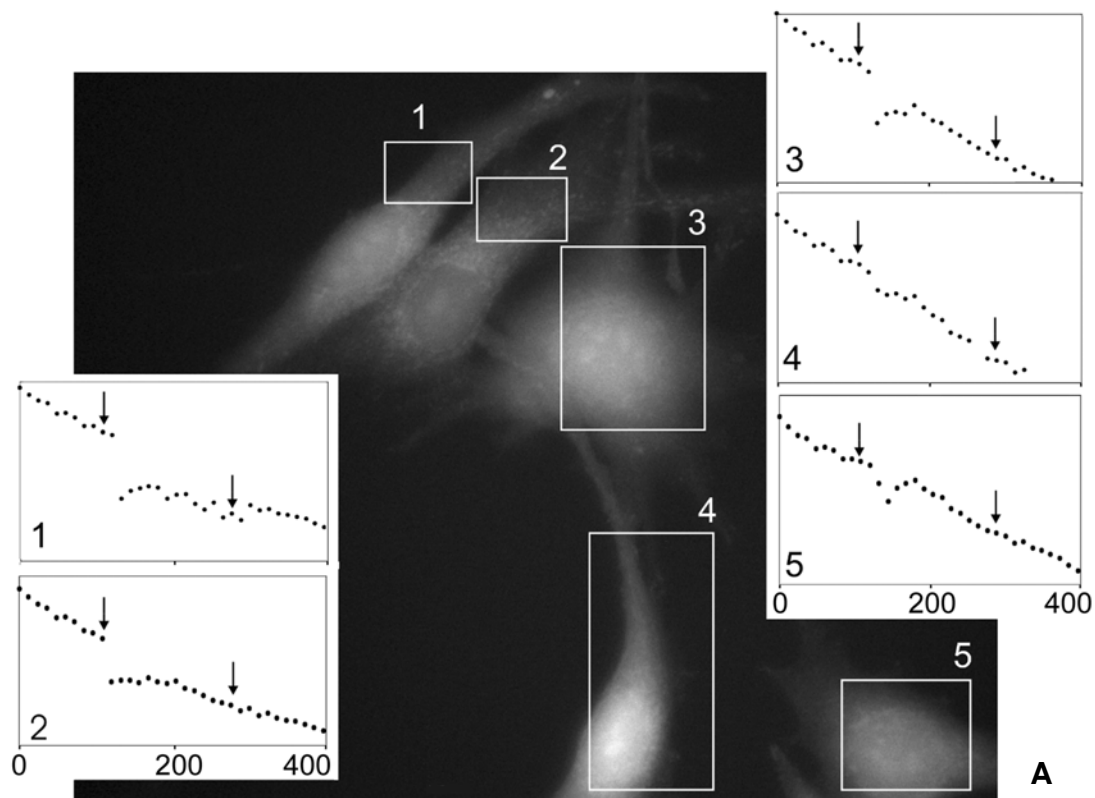
**Abb. 6:** Fluorometrische Messung der intrazellulären Kalziummobilisation an Zellsuspensionen. Die SK-Mel 28-Zellen zeigen eine starke Reaktion auf die Stimulation mit 4 mM Carbachol. Die Addition von 0,5  $\mu\text{M}$  Atropin stellt die Plateau-Phase zurück. Der exponentielle Abfall der Fluoreszenzaktivität ist auf das Herausdiffundieren des Farbstoffs Fura-2 aus den Zellen zurückzuführen. Das Signal wurde mit Ionomycin, einem Ionophor, das zum Kalziumeinstrom in die Zelle führt, sowie dem Kalziumbinder EGTA beendet.



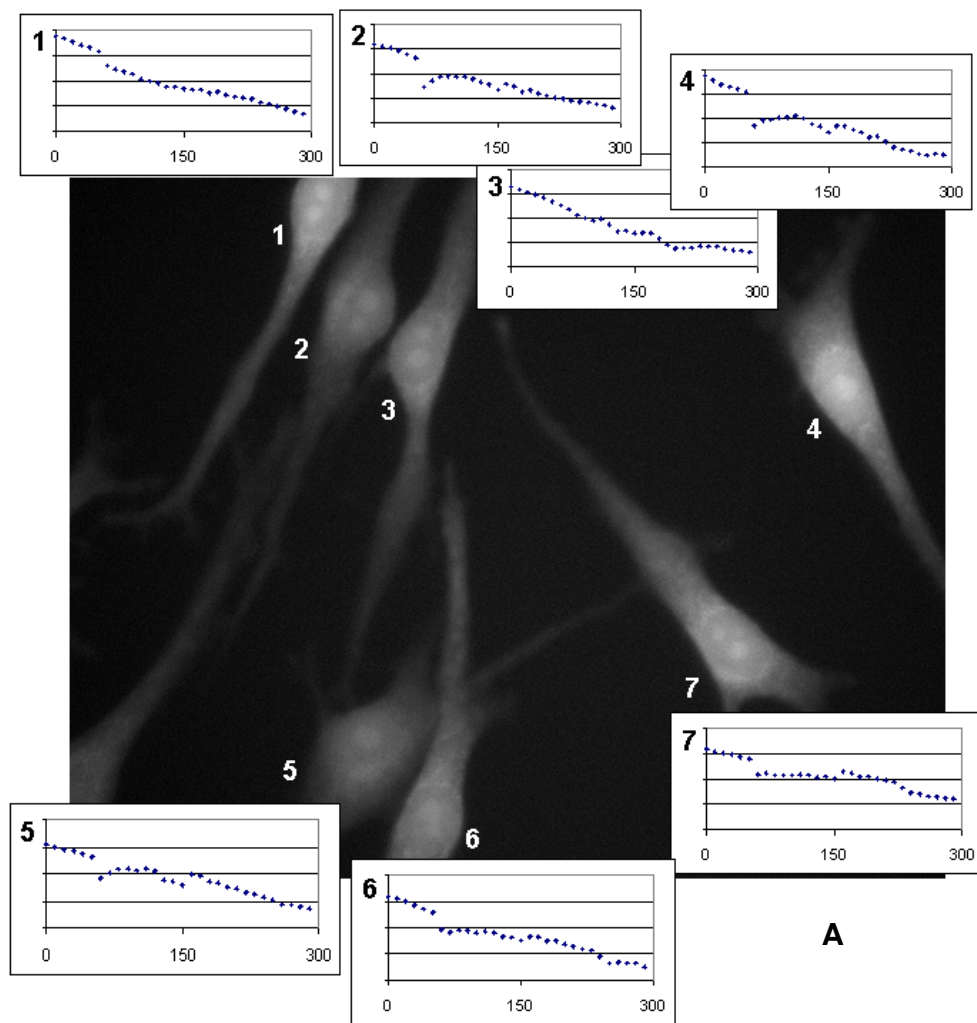
**Abb. 7:** Fluorometrische Messung der intrazellulären Kalziummobilisation. Zuerst wurden die SK-Mel 28-Zellen mit 4 mM Carbachol stimuliert, anschließend mit 20 µg/ml Fibronectin. Fibronectin bewirkt einen zusätzlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, der sich zu dem Carbachol-Signal addiert. Das Signal kann erneut durch die Gabe von Atropin beendet werden.

### (B) Mikroskop-basierte Kalzium-Messung

Das fluorometrische Kalziumsignal ist ein integrales Signal bestehend aus den Einzelsignalen von vier Millionen Zellen. Um zu klären, ob alle SK-Mel 28-Zellen auf die selbe Art auf eine cholinerge Stimulation reagieren, wurde eine mikroskopische Messung des Kalziumsignals einzelner SK-Mel 28-Zellen durchgeführt. Abb. 8A zeigt ein typisches Bild des Kalziumsignals einiger SK-Mel 28-Zellen. Alle beobachteten Zellen reagieren mit dem selben Kalziumsignal auf eine cholinerge Stimulation mit 1 mM Carbachol. Ebenso zeigen sie die selbe Reaktion auf die anschließende Applikation vom 2 µM Atropin. Diese Ergebnisse zeigen, dass die SK-Mel 28-Zellkultur eine homogene Expression des muskarinischen Rezeptors in allen Zellen aufweist.



**Abb. 8:** **A** Mikroskopische Kalziummessung an einzelnen SK-Mel 28-Zellen. Alle Zellen zeigen das selbe Muster der Kalziummobilisation auf cholinerge Stimulation mit Carbachol (1. Pfeil) und Inhibition mit Atropin (2. Pfeil) . Die unten-mittig gelegene Zelle zeigt nur einen geringen Signalausschlag. Im Phasenbild ist zu sehen, dass sie dabei ist, sich von der Greiner-Schale abzulösen. Sie ist nur noch eingeschränkt funktionstüchtig. Zeitachse 0 bis 400 sec. **B** Zugehöriges Phasen-Kontrast-Bild.



A



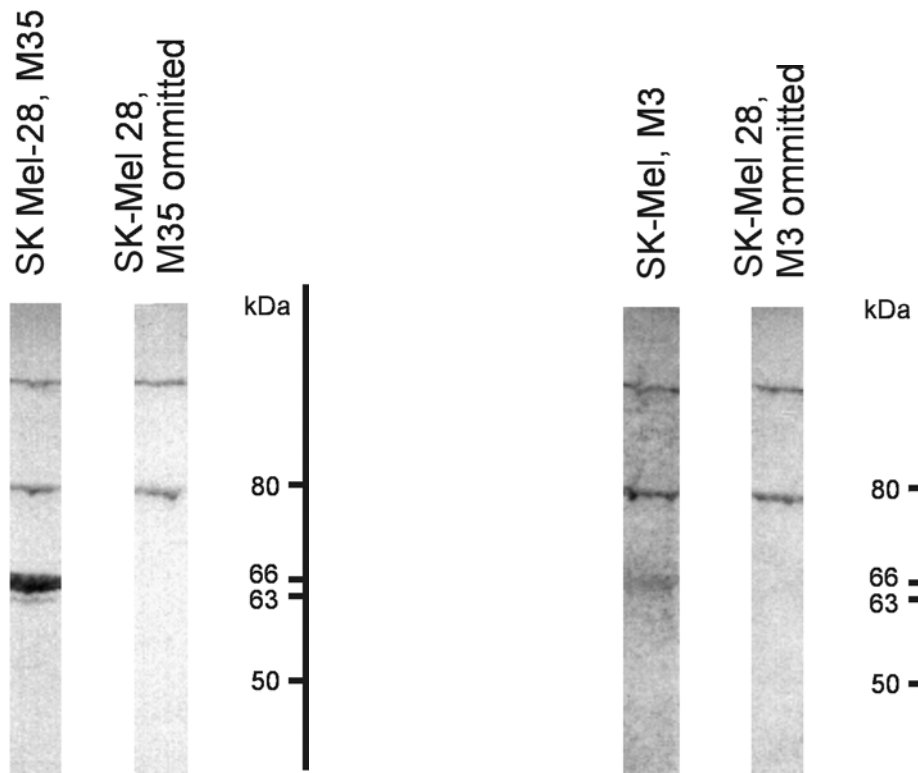
B

**Abb. 9:** **A** Weitere Aufnahme einer mikroskopische Kalziummessung an SK-Mel 28-Zellen. Zeitachse 0 bis 300 sec. **B** Zugehöriges Phasen-Kontrast-Bild.

#### 4.2.3 Western-Blot

Das Molekulargewicht des muskarinischen Rezeptors wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot von Zellhomogenaten untersucht. Das Protein des muskarinischen Rezeptors wurde durch den polyklonalen anti-M3-Subtyp-Antikörper und den monoklonalen M35-Antikörper, der gegen die Ligandenbindungsstelle gerichtet ist und somit unabhängig vom Subtyp bindet (André et al, 1984), detektiert. Mit beiden Antikörpern wurde das selbe spezifische Muster erhalten. Durch den M35-Antikörper wurde eine starke Bande bei 66 kDa nachgewiesen (Abb. 10, Linie 1), die mit publizierten Daten für den M3-Subtyp übereinstimmt (Peralta et al, 1987). Die Bande bei 66 kDa konnte durch den M3-Subtypen-spezifischen Antikörper reproduziert werden (Abb. 10, Linie 3). Zusätzlich zu der starken Bande bei 66 kDa, wurde eine weitere Bande bei 63 kDa durch den M35-Antikörper nachgewiesen. Dieses Resultat weist darauf hin, dass die SK-Mel 28-Zellen einen weiteren Subtyp zusätzlich zum M3-Rezeptor exprimieren.

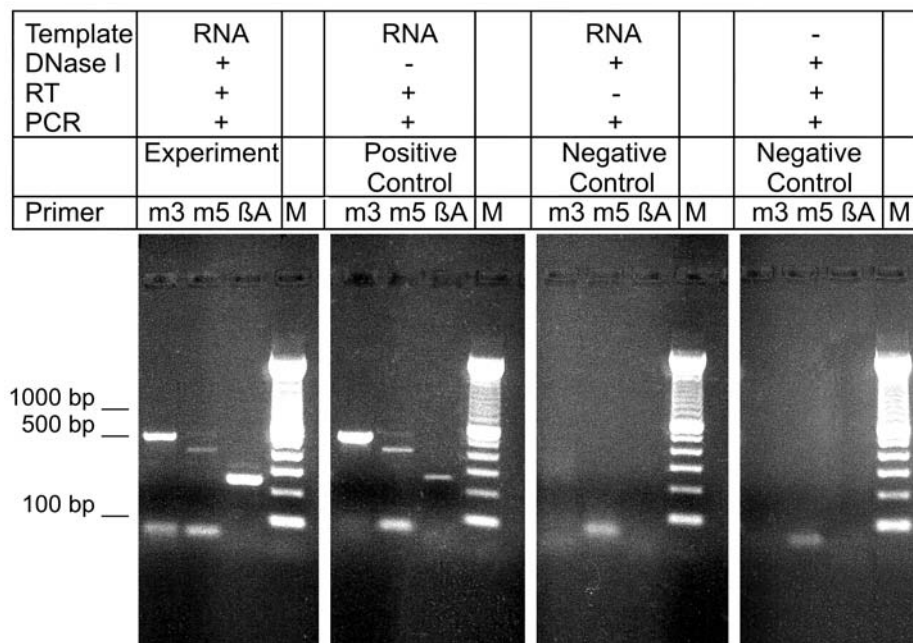




**Abb. 10:** Western-Blots von Zellhomogenaten der SK-Mel 28-Zellkultur gefärbt mit dem anti-M3-mAChR-Antikörper und dem M35-Antikörper. Linie 1: SK-Mel 28 gefärbt mit M35, Linie 2: SK-Mel 28-Kontrolle (M35 weggelassen), Linie 3: SK-Mel 28 gefärbt mit M3-spezifischem Antikörper, Linie 4: SK-Mel 28-Kontrolle (anti-M3 weggelassen). Die mit M35 gefärbte Linie 3 zeigt eine starke Bande bei 66 kDa und eine schwache Bande bei 63 kDa. Dies weist auf eine starke Expression des M3-Subtyps und eine schwache Expression des M5-Subtyps. Bei dem M3-Subtypen-spezifischen Antikörper konnte die starke Bande bei 66 kDa reproduziert werden (Linie 3). Die SK-Mel 28-Zellen zeigen 2 Banden, die durch endogene Peroxidasen hervorgerufen werden. Das Proteingewicht der Banden wurde durch Vergleich mit den Banden eines Low-Molecular-Weight-Markers (Pharmacia, Taunusstein, Germany) bestimmt.

#### 4.2.4 Reverse Transkriptase – Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Menschliche Melanomzellen der Zelllinie SK-Mel 28 enthalten mRNA des Subtyps M3 und M5. Die Expression der für den M3-, den M5-Rezeptor und der für  $\beta$ -Actin kodierenden Gene wurde durch Analyse von RNA aus nahezu konfluent wachsenden Zellschichten gewonnen. Wie in Abb. 11 dargestellt, enthielt jedes PCR-Experiment eine Positiv- und zwei Negativkontrollen. Die Positivkontrolle überprüfte die Qualität der verwendeten Primerpaare. Negativkontrolle I zeigte, dass die PCR Produkte von einer durch die Reverse Transkriptase umgeschriebenen DNA stammt und nicht von residueller genomischer DNA. Diese erste Negativkontrolle war notwendig, da die genomischen DNA-Sequenzen aller mAChR-Subtypen keine Introns enthalten (Peralta et al, 1987; Bonner et al, 1988), und deswegen nicht durch ihre Länge von der umgeschriebenen cDNA unterschieden werden kann. Negativkontrolle II zeigt, dass keine Kontamination durch fremde RNA vorhanden war. Die Größe der durch die PCR produzierten DNA-Fragmente stimmte mit den aus den DNA-Sequenzen berechneten Werten überein.



**Abb. 11:** RT-PCR Experiment mit für den M3- und M5-Subtyp spezifischen Primern. Das Experiment sowie eine Positivkontrolle und zwei Negativkontrollen sind gezeigt (nähere Erklärung der Kontrollen im Text). Das Experiment zeigt eine Bande von ungefähr 500 Basenpaaren für den M3- und eine schwächere Bande von ungefähr 400 Basen für den M5-Rezeptor.

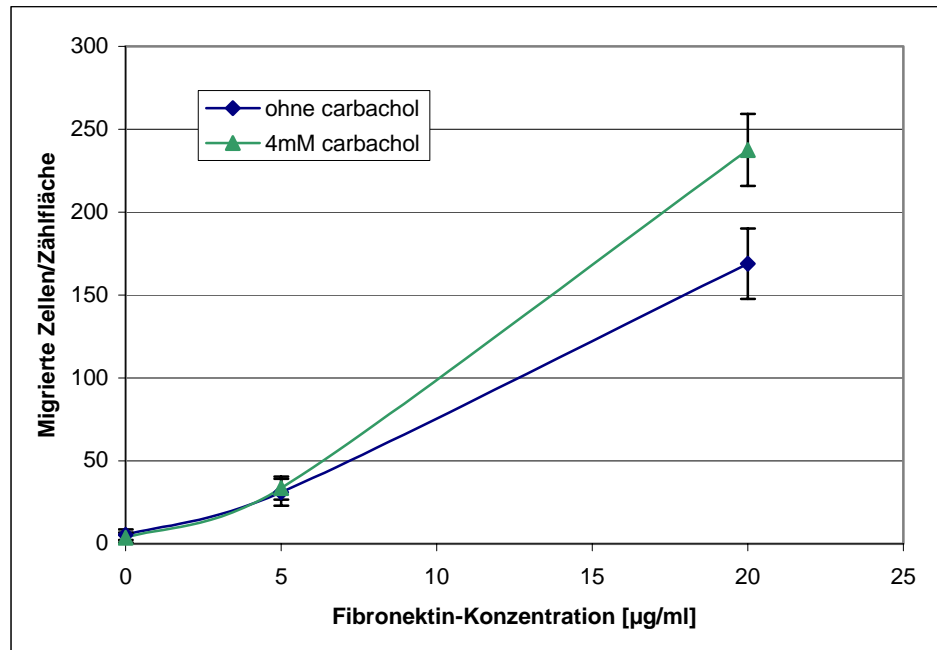
#### 4.2.5 Chemotaxis-Assay

Nach der Publikation von Wach (Wach et al., 1996), ist Fibronectin der für SK-Mel 28-Zellen effektivste Lockstoff. Fibronectin wurde in löslicher Form verwendet. Es wirkte als chemotaktisches, nicht als haptotaktisches Agens. Drei unterschiedliche Konzentrationen wurden verwendet (0 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml). Um den Effekt der cholinergen Stimulation aufzuzeigen, wurde der cholinerge Agonist Carbachol in einer Sättigungskonzentration von 4 mM zu der Zellsuspension hinzugegeben. Danach wurden die Zellen in das obere Kompartiment der Chemotaxis-Kammer eingebracht. Durch Carbachol wurde die Wanderung in dem 20 µg/ml Fibronectin-Gradienten um ungefähr 30 % verstärkt, verglichen mit der Chemotaxis auf Fibronectin ohne Carbachol. Ein typisches Experiment zeigt Abbildung 6 (sowie

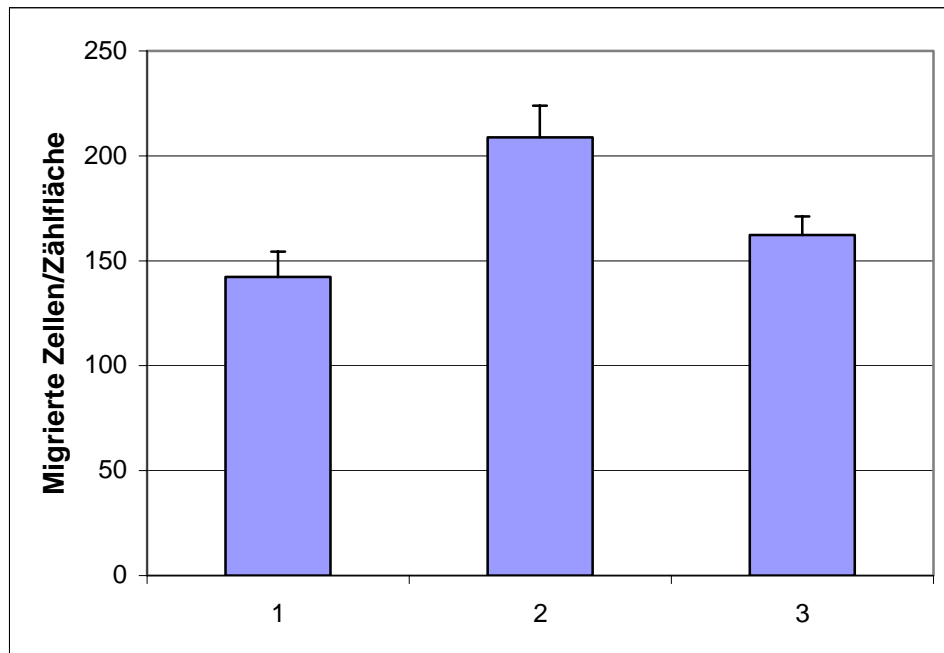
Anhang A, Tabelle 1). Die Daten für ein weiteres Experiment finden sich in ebenfalls in Anhang A. Die Standardabweichungen der Messwerte betragen jeweils weniger als die Hälfte des Unterschieds zwischen den beiden Ansätzen mit und ohne Carbachol bei 20 µg/ml Fibronectin. Die Messungen bei 0 µg/ml Fibronectin zeigen die Basis-Migration ohne chemotaktische Stimulation. Bei 5 µg/ml wurde ein schwacher, bei 20 µg/ml ein deutlicher Effekt der cholinergen Stimulation beobachtet. Unter den Bedingungen des Experiments formte nur Fibronectin einen Gradienten über die Membran, wohingegen das kleine Molekül Carbachol durch eine schnelle Diffusion über den Filter in der selben Sättigungskonzentration im oberen und unteren Kompartiment verteilt war. Die Diffusion von kleinen Molekülen wurde durch die – fast sofortige - Diffusion von Eosin (MW 692) über die Membran abgeschätzt.

Die Ergebnisse eines Experiments, das den Effekt des spezifischen muskarinischen Inhibitors Atropin auf die cholinerge Stimulation untersucht, zeigt Abbildung 7 (sowie Anhang A, Tabelle 3). Ein weiteres Experiment findet sich in Anhang A. Die SK-Mel 28 wurden durch 20 µg/ml Fibronectin angelockt. Die Migration ohne cholinerge Stimulation ist durch die linke Säule dargestellt. Cholinerge Stimulation mit 4 mM Carbachol im oberen Kompartiment erhöhte die chemotaktische Aktivität um ungefähr 30 % (mittlere Säule). Atropin wurde in einer Sättigungskonzentration von 1 µM der Zellsuspension im oberen Kompartiment noch vor der Addition von Carbachol zugegeben. Die Anwendung des Atropins zusätzlich zu der 4 mM Carbachol-Konzentration im oberen Kompartiment blockierte den cholinergen Effekt bei der Migration (rechte Säule). Dies beweist, dass der muskarinische Rezeptor und nicht der nikotinische Rezeptor, für den Stimulationseffekt verantwortlich ist. In den Experimenten waren die Standardabweichungen jeweils kleiner als die Hälfte des Messwertunterschieds.

Bei Verwendung von Carbachol alleine als Chemoattraktor konnte in den Boyden-Kammer-Versuchen keine Zunahme der Migration festgestellt werden. Dies kann einerseits durch den fehlenden Gradienten des Carbachols über die Membran, andererseits aber auch durch fehlende chemotaktische Eigenschaften des Carbachols auf SK-Mel 28-Zellen erklärt werden.



**Abb. 12:** Im Boyden-Migrations-Assay zeigen die SK-Mel 28-Zellen eine konzentrationsabhängige Migration auf den Lockstoff Fibronectin. Drei unterschiedliche Konzentrationen wurden benutzt (0 µg/ml, 4 µg/ml and 20 µg/ml). Bei einer Stimulation mit 4 mM Carbachol im oberen Kompartiment und einer Konzentration von 20 µg/ml Fibronectin im unteren Kompartiment, zeigten die Zellen eine zusätzliche Migration von ungefähr 30 % verglichen zu der Wanderung ohne Carbachol-Stimulation. Aufgrund der niedrigen Zellzahl ist es nicht möglich, bei 4 mg/ml Fibronectin mit Sicherheit eine zusätzliche Stimulation durch Carbachol nachzuweisen. Die Messung bei 0 µg/ml Fibronectin zeigt die ungerichtete nicht-chemotaktische Wanderung der Zellen an.



**Abb. 13:** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines Experiments, das den Effekt des spezifischen muskarinischen Inhibitors Atropin auf die cholinerge Stimulation aufzeigt. Die linke Säule zeigt die Anzahl der pro Auswertungsfläche gewanderten Zellen bei einer Konzentration von 20 µg/ml Fibronectin. Cholinerge Stimulation mit 4 mM Carbachol im oberen Kompartiment erhöhte die chemotaktische Aktivität um ungefähr 30 % (mittlere Säule). Atropin in einer Konzentration von 10 µM zusammen mit 4 mM Carbachol im oberen Kompartiment blockierte den cholinergen Effekt auf die Migration. Dies beweist, dass der muskarinische Rezeptor für die erhöhte Wanderungsaktivität verantwortlich ist (rechte Säule).

## 5. Diskussion

Im menschlichen Melanom wurde die Anwesenheit von muskarinischen Rezeptoren auf Melanomzellen und den infiltrierenden polymorphkernigen Granulozyten beobachtet. Die Frage war, ob es sich bei dem Rezeptor auf den Melanomzellen um den selben Subtyp wie bei den Blutzellen handelt.

Durch andere Gruppen waren widersprüchliche Daten über die Präsenz und Funktionalität des muskarinischen Rezeptors auf den PMN berichtet worden (Dulis 1979, Lopker 1980, Estensen 1973, Meurs 1993). Unsere Resultate der Immunhistochemie und der FACS-Analyse bestätigen das Vorhandensein muskarinischer Rezeptoren auf den PMN. Das Molekulargewicht dieses Proteins wurde zu ca. 63 kDa bestimmt.

Im Gegensatz zu den Melanomzellen zeigten die PMN keinen Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration nach cholinergem Stimulation obwohl eine deutliche Reaktion bei einer anschließenden Stimulation mit IL-8 sichtbar war. Die Abwesenheit einer Kalzium-Mobilisation bei muskarinischer Stimulation weist darauf hin, dass der muskarinische Rezeptor bei den PMN nicht funktional ist.

Das Fehlen eines Anstiegs der zytosolischen Kalzium-Konzentration bei muskarinischer Stimulation bestätigt damit das negative Resultat von Meurs (Meurs et al., 1993), der bei einer Stimulation mit Metacholin keinen Anstieg der Inositol-3-Phosphat-Konzentration nachweisen konnte. Es handelt sich bei dem mAChR auf den aus peripherem Blut gewonnenen PMN möglicherweise um eine inaktivierte Form dieser Rezeptors. Eine Aktivierung des Rezeptors

durch im Gewebe wirksame Stoffe kann durch die durchgeführten Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.

Muskarinische Rezeptoren sind bei Leukozyten jedoch nicht nur auf PMN vorhanden. In einer Sublinie der Jurkat-Zellen wurde über positive biologische Effekte nach muskarinischer Stimulation berichtet. Dieses System ist möglicherweise ein gutes Modell, um die Wirkung des muskarinischen Rezeptors in Leukozyten zu untersuchen.

Muskarinische Rezeptoren werden vorübergehend exprimiert während der Proliferation, Morphogenese und Differenzierung. Dies wurde im Embryo beobachtet (Schmidt, 1981) und auch bei Keratinozyten, die die Stammzellpopulation zur normalen Differenzierung oder Wundheilung verlassen (Grando et al., 1993). Muskarinische AChR treten auch beim malignen Wachstum auf und finden sich bei vielen Tumorzelllinien. Hier wurde die SK-Mel 28-Zellkultur verwendet, um zu testen, ob sich die gerichtete Zellbewegung durch cholinerge Behandlung beeinflussen lässt. Die Ergebnisse der RT-PCR und des Western-Blots wiesen darauf hin, dass die SK-Mel 28-Zellen eine große Menge des M3-Subtyps und eine kleinere Menge des M5-Subtyps des muskarinischen Rezeptors exprimieren. Es wurde gezeigt, dass die Chemotaxis auf Fibronectin konzentrationsabhängig stattfindet. Muskarinisch-cholinerge Stimulation erhöht die chemotaktische Aktivität durch Fibronectin um ungefähr 30 %.

Die Boyden-Kammer wurde ursprünglich entwickelt worden, um eine große Anzahl einzelner, schnell wandernder Zellen, wie etwa Leukozyten, zu studieren. Der Vorteil des Chemotaxis-Versuchs gegenüber der video-basierten Zellbeobachtung ist die hohe Zellzahl und Reproduzierbarkeit. Fibronectin wurde in löslicher Form als Chemotaktikum im unteren Kompartiment verwendet, um chemotaktische und nicht haptotaktische Migration zu messen. Car-



bachol wurde in Sättigungskonzentration zusammen mit der Zellsuspension dem oberen Kompartiment der Chemotaxis-Kammer zugegeben. In der Boyden-Kammer bildet sich bei chemotaktischen Faktoren, die ein hohes Molekulargewicht besitzen, ein Konzentrationsgradient über die Dicke der Membran aus. Kleine Moleküle, wie etwa Carbachol, durchqueren die Membran mit 8 µm Porengröße mit Leichtigkeit und bilden so rasch eine gleichmäßige Verteilung in beiden Kompartimenten aus, die während der fünfstündigen Inkubationszeit beibehalten wird. Dies wurde durch die Addition der niedermolekularen Substanz Eosin zum oberen Kompartiment geprüft.. Eosin löste sich sehr rasch und erreichte sofort eine Gleichgewichtskonzentration in beiden Kompartimenten. Aus diesem Grund konnte die direkte Chemotaxis auf cholinerge Agonisten im Boyden-Kammer-Versuch nicht getestet werden. Der indirekte Ansatz zeigte jedoch, dass Fibronectin-induzierte Chemotaxis moduliert werden kann durch eine permanente cholinerge Stimulation.

Während des invasiven Wachstums adhären Melanomzellen an der extrazellulären Matrix und wandern durch sie hindurch. Diese Prozesse werden durch Rezeptoren der Integrin-Familie vermittelt. Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheit bestehen (Hynes, 1992). Verschiedene Studien zeigten eine Korrelation zwischen Integrin-Expression und invasivem Wachstum bei malignen Erkrankungen (Zheng et al., 1999; Seftor et al., 1992). Verschiedene chemotaktische Faktoren, die durch Bindung an Integrine wirken, sind bekannt. Der potenteste chemotaktische Faktor für SK-Mel 28-Zellen stellt Fibronectin dar (Wach et al, 1997).

Beide Rezeptoren, Integrin-Rezeptoren und muskarinische cholinerge Rezeptoren (Noda et al, 1998) zeigen in deren Signaltransduktionsweg eine Kopplung an intrazelluläres Kalzium. Die Kalziummessung in Zellsuspensionen zeigt, dass die permanente muskarinisch-

cholinerge Stimulation während des Assays zu einem permanenten Einstrom extrazellulären Kalziums führt. Dieser Effekt ist additiv zu dem durch Fibronectin bewirkten Einstrom. Diese Beobachtungen des *in-vitro*-Systems weisen darauf hin, dass die Bewegung von Melanomzellen in Richtung eines Gradienten des Matrix-Proteins Fibronectin durch den muskarinischen Rezeptor mittels Einstrom extrazellulären Kalziums moduliert wird.

Bei der Chemotaxis von einzelnen Zellen wird der äußere Gradient des chemotaktischen Agens durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in einen steilen intrazellulären Gradienten transformiert – unter Beiteiligung des second messengers IP3 (Gilbert et al., 1994). Dadurch formt sich eine führende Seite mit Pseudopodien aus und eine nachfolgende Seite mit einem sich kontrahierenden Aktin-Myosin-Netz. In time-lapse-Studien mit SK-Mel 28-Zellen demonstrierte Sailer (Sailer et al., 2000), dass eine Perfusion mit muskarinischen Agonisten Kontraktionen des Aktin-Myosin-Netzes auslöst. Die undulierende Membran der Pseudopodien wurde dabei nicht beeinflusst.

*In-vivo* bildet Fibronectin keinen Gradienten aus wie im Falle der Boyden-Kammer. Das Boyden-Kammer-System war jedoch auch in weiterer Hinsicht limitiert. Das Setting konnte offensichtlich nicht das autokrine System, das im lebenden Gewebe vermutet wird und in dem es möglicherweise zu einem alternierenden Auftreten von Acetylcholin-Sekretion und Rezeptor-Expression kommt, repräsentieren. Aus diesem Grund sind noch weitere Studien über den Beitrag des Gewebes erforderlich.

Zusammenfassend wurde ein *in-vitro*-Modell für die Modulation des chemotaktischen Verhaltens durch muskarinische Rezeptoren entwickelt. Im Chemotaxis-Versuch mit Boyden-Kammern wurde bei permanenter Stimulation des muskarinischen Rezeptors mit Carbachol

ein Anstieg der Bewegung in Richtung des chemotaktischen Faktors Fibronectin gefunden. Dies weist auf einen synergistischen modulatorischen Effekt des muskarinisch cholinergen Systems bei der Regulation der Zellbewegung durch Melanomzellen-spezifische chemotaktische Faktoren hin.

## 6. Danksagung

Für die freundliche Zur-Verfügung-Stellung der Melanome und der zugehörigen Diagnosen danke ich Herrn Prof. Dr. med. Claus Garbe der Sektion Dermatologische Onkologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Herrn Dr. Andreas Ludwig vom Forschungszentrum Borstel danke ich für die Anleitung zur Gewinnung von Leukozyten sowie die Einarbeitung in die FACS-Analyse.

Frau Johanna Scheindt, Frau Brigitta Bodden-Kamps und Frau Leokardia Macher danke ich für die freundliche und kompetente technische Unterstützung im Labor.

Herrn Gerardo Lippert danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der RT-PCR.

Herrn Dr. med. Matthias Oppitz danke ich für die vielen hilfreichen Hinweise und Anleitungen.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Drews für seine immer-währende Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen.

## 6. Literaturliste

Andre, C., Guillet, J. G., De Backer, J. P., Vanderheyden, P., Hoebeke, J. and Strosberg, A. D. (1984). Monoclonal antibodies against the native or denatured forms of muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* 3, 17-21.

Bonner, T.I., Young, A.C., Brann, M.R., Buckley, N.J. (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1(5):403-10

Carey, T.E., Lloyd, K.O., Takahashi, T., Travassos, L.R., Old, L.J. (1979). AU cell-surface antigen of human malignant melanoma: solubilization and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(6):2898-902

Dulis, B. H., Gordon, M. A. and Wilson, I. B. (1979). Identification of muscarinic binding sites in human neutrophils by direct binding. *Mol. Pharmacol.* 15, 28-34.

Estensen, R. D., Hill, H. R., Quie, P. G., Gogan, N. and Goldberg, N. D. (1973). Cyclic GMP and cell movement. *Nature* 245, 458-460.

Gilbert S.H., Perry K., Fay F.S. (1994). Mediation of chemoattractant-induced changes in [CA2+] and cell shape, polarity, and locomotion by InsP3, DAG, and protein kinase C in newt eosinophils. *J Cell Biol* 127: 489-503

Grando, S.A. and Horton, R.M. (1997). The keratinocyte cholinergic system with acetylcholine as an epidermal cytotransmitter. *Curr Opin Dermatol*, 4, 262 268

Grando, S.A. (1997) Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2(1):41-8

Hulme, E. C., Birdsall, N. J. and Buckley, N. J. (1990). Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 633-673.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 3;69(1):11-25

- Ijland, S. A., Jager, M.J., Heijdra, B. M., Westphal, J.R. and Peek, R. (1999). Expression of angiogenic and immunosuppressive factors by uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 9, 445-50.
- Kohn, E. C., Hollister, G. H., DiPersio, J. D., Wahl, S., Liotta, L. A. and Schiffmann, E. (1993). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces human melanoma-cell migration. *Int. J. Cancer* 53, 968-72.
- Lammerding-Koppel, M. and Drews, U. (1993). Neural crest cells exhibit a muscarinic cholinergic system during migration. *Annals of Anatomy* 175 suppl., 19.
- Lammerding-Koppel, M., Noda, S., Blum, A., Schaumburg-Lever, G., Rassner, G. and Drews, U. (1997). Immunohistochemical localization of muscarinic acetylcholine receptors in primary and metastatic malignant melanomas. *J. Cutan. Pathol.* 24, 137-144.
- Lopker, A., Abood, L. G., Hoss, W. and Lionetti, F. J. (1980). Stereoselective muscarinic acetylcholine and opiate receptors in human phagocytic leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 29, 1361-1365.
- Ndoye, A., Buchli, R., Greenberg, B., Nguyen, V.T., Zia, S., Rodriguez, J.G., Webber, R.J., Lawry, M.A., Grando, S.A. (1998). Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol* 111(3):410-6
- Meurs, H., Timmermans, A., de Monchy, J. G., Zaagsma, J. and Kauffman, H. F. (1993). Lack of coupling of muscarinic receptors to phosphoinositide metabolism and adenylyl cyclase in human lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes: studies in healthy subjects and allergic asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 100, 19-27.
- Moser, B., Clark-Lewis, I., Zwahlen, R. and Baggiolini, M. (1990). Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J. Exp. Med.* 171, 1797-802.
- Noda, S., Lammerding-Koppel, M., Oetting, G. and Drews, U. (1998). Characterization of muscarinic receptors in the human melanoma cell line SK-Mel-28 via calcium mobilization. *Cancer Lett.* 133, 107-114.

Oettling, G., Schmidt, H. and Drews, U. (1985). The muscarinic receptor of chick embryo cells: correlation between ligand binding and calcium mobilization. *J. Cell Biol.* 100, 1073-1081.

Oettling, G., Schmidt, H., Show-Klett, A. and Drews, U. (1988). Expression of the  $Ca^{2+}$  mobilizing muscarinic system in the chick embryo correlates with morphogenesis. *Cell Differ.* 23, 77-86.

Oettling G, Gotz U, Drews U. (1992). Characterization of the  $Ca^{2+}$  influx into embryonic cells after stimulation of the embryonic muscarinic receptor. *J Dev Physiol.* 17:147-55.

Peralta, E. G., Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Smith, D. H., Ramachandran, J. and Capon, D. J. (1987). Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* 6, 3923-3929.

Rosner, H., Vacun, G. and Rebhan, M. (1995). Muscarinic receptor-mediated induction of actin-driven lamellar protrusions in neuroblastoma cell somata and growth cones. Involvement of protein kinase C. *Eur. J. Cell Biol.* 66, 324-334.

Sailer, M., Oppitz, M., and Drews, U. (2000). Induction of cellular contractions in the human melanoma cell line SK-mel 28 after muscarinic cholinergic stimulation. *Anatomy and Embryology* 201, 27-37.

Schaber, B., Bruchelt, G., Meyle, J., Jeschke, B., Handgretinger, R., Niethammer, D. Mayer, P., Rassner, G. And Fierlbeck, G. (1994). Chemotactic activity of substances derived from antibody-loaded tumor cells on granulocytes. *Immunol. Lett.* 41, 67-71.

Schmidt, H. (1981). Muscarinic acetylcholine receptor in chick limb bud during morphogenesis. *Histochemistry* 71, 89-98.

Seftor, R.E., Seftor, E.A., Gehlsen, K.R., Stetler-Stevenson, W.G., Brown, P.D., Ruoslahti, E., Hendrix, M.J. (1992). Role of the  $\alpha v \beta 3$  integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1;89(5):1557-61

Wach, F., Eyrich, A.M., Wustrow, T., Krieg, T., Hein, R. (1996). Comparison of migration and invasiveness of epithelial tumor and melanoma cells in vitro. *J Dermatol Sci* 12(2):118-26

Westphal, J. R., Van't Hullenaar, R., Peek, R., Willems, R. W., Crickard, U. Askaa, J. Clemmensen, I., Ruiter, D. J. and De Waal, R.M. (2000). Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo. *Int. J. Cancer* 86, 768-76.

Zheng, D.Q., Woodard, A.S., Fornaro, M., Tallini, G., Languino, L.R. (1999). Prostatic carcinoma cell migration via alpha(v)beta3 integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Res* 1;59(7):1655-64

Zia, S., Ndoye, A., Lee, T.X., Webber, R.J., Grando, S.A. (2000) Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 293(3):973-81



## 7. Anhang

### Experiment 1

ohne Carbachol			mit Carbachol		
0 µg/ml F	5 µg/ml F	20 µg/ml F	0 µg/ml F	5 µg/ml F	20 µg/ml F
7	24	179	5	43	223
1	38	165	0	34	227
8	30	204	7	41	233
6	23	150	3	29	229
	21	186		32	235
	33	163		36	211
	36	126		33	214
	44	166		21	226
		158			253
		155			250
		194			264
		181			285

#### Mittelwerte

##### ohne Carbachol

0 µg/ml F	5,5
5 µg/ml F	31,1
20 µg/ml F	168,9

#### Standardabweichung

0 µg/ml F	3,1
5 µg/ml F	8,1
20 µg/ml F	21,3

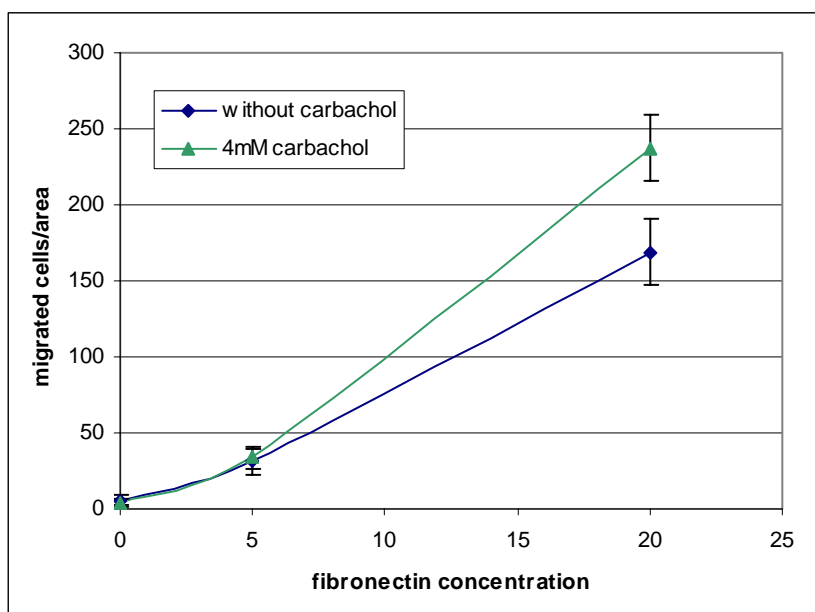
#### Mittelwerte

##### mit Carbachol

0 µg/ml F	3,8
5 µg/ml F	33,6
20 µg/ml F	237,5

#### Standardabweichung

0 µg/ml F	3,0
5 µg/ml F	6,9
20 µg/ml F	21,7



## Experiment 2

## ohne Carbachol

0 µg/ml F	5 µg/ml F	20 µg/ml F
0	3	33
1	3	52
0	2	46
0	2	53
	2	53
	3	59
	1	45
	2	37
		66
		60
		50
		59

## mit Carbachol

0 µg/ml F	5 µg/ml F	20 µg/ml F
0	1	66
0	1	71
0	4	55
0	1	85
	2	76
	0	68
	2	72
	1	68
		69
		90
		81
		78

## Mittelwerte

## ohne Carbachol

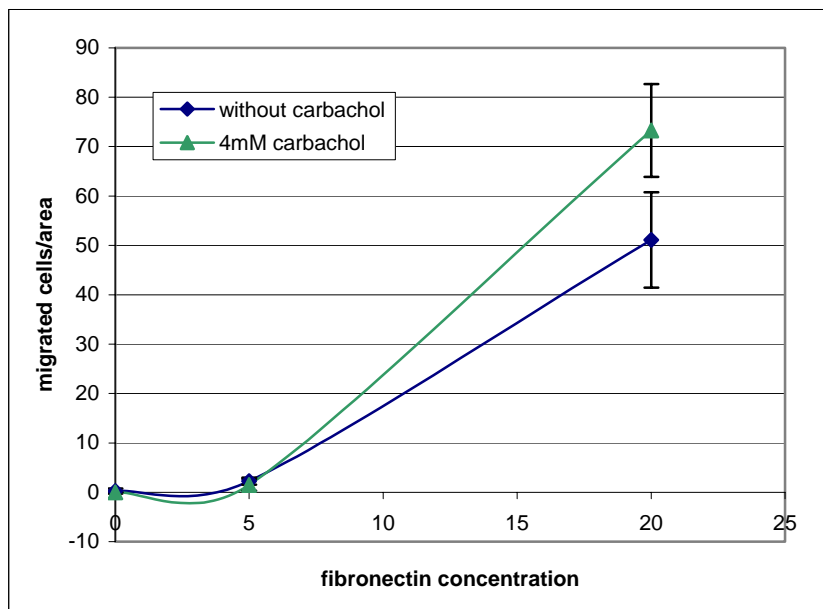
0 µg/ml F	0,3	0,5
5 µg/ml F	2,3	0,7
20 µg/ml F	51,1	9,7

## Standardabweichung

## Mittelwerte

## mit Carbachol

0 µg/ml F	0	0
5 µg/ml F	1,5	1,2
20 µg/ml F	73,3	9,4



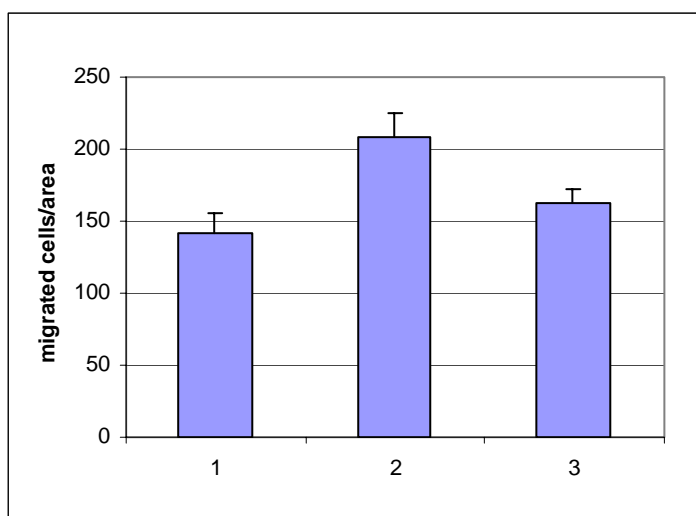
### Experiment 3

ohne Carbachol	mit Carbachol	mit Carbachol und Atropin
137	210	153
131	231	162
125	217	164
162	236	156
131	211	169
121	183	158
154	196	169
140	226	159
162	227	158
148	220	162
143	197	173
137	198	172
147	195	159
165	220	165
135	197	179
142	202	173
151	206	145
131	186	145

**Mittelwerte**                      **Standardabweichung**  
**ohne Carbachol**  
 142,3                                      12,9

**Mittelwerte**                      **Standardabweichung**  
**mit Carbachol**  
 208,8                                      15,7

**Mittelwerte**                      **Standardabweichung**  
**mit Carbachol und Atropin**  
 162,3                                      9,3



## Experiment 4

## ohne Carbachol

92  
78  
75  
65  
88  
90  
  
108  
109  
106  
123  
123  
109  
  
123  
122  
118  
72  
72  
83

## mit Carbachol

151  
156  
152  
159  
177  
158  
  
203  
194  
204  
218  
221  
191  
  
212  
202  
214  
203  
224  
212

## mit Carbachol und Atropin

143  
121  
108  
122  
132  
143  
  
106  
119  
134  
132  
96  
114  
  
100  
97  
112  
126  
139  
144

**Mittelwerte  
ohne Carbachol**  
97,6

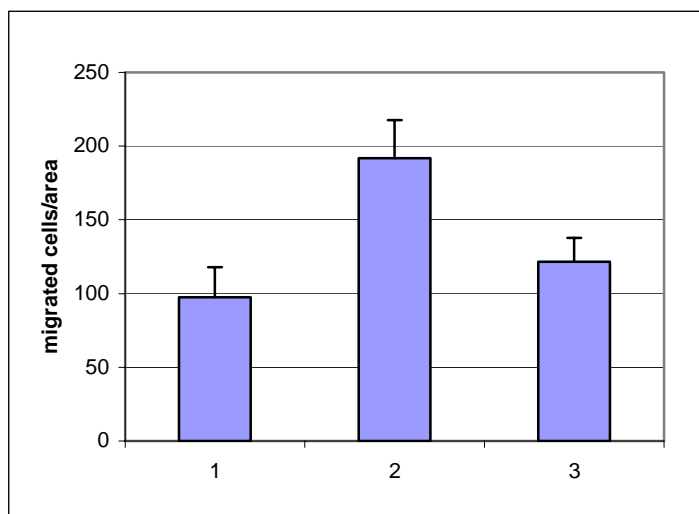
**Standardabweichung**  
20,4

**Mittelwerte  
mit Carbachol**  
191,7

**Standardabweichung**  
25,9

**Mittelwerte  
mit Carbachol und Atropin**  
121,6

**Standardabweichung**  
16,1



- Assistenzarzt
- seit Juni 2003 Assistenzarzt in der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen
- Vollapprobation
- Oktober 2004
- Medizinstudium
- 1997 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Tübingen
  - März 1999 Physikum
  - März 2000 Erstes Staatsexamen
  - März 2002 Zweites Staatsexamen
  - Mai 2003 Drittes Staatsexamen
- Dissertation in der Medizin
- April 1999 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. Ulrich Drews, Experimentelle Embryologie, Anatomisches Institut, Universität Tübingen
- Physikstudium
- 1992 – 1997 Studium der Physik an der Universität Tübingen
  - Diplomarbeit über das Thema „Monte-Carlo-Simulation von Mehrfachstreuungseffekten beim Durchgang spinpolarisierter Elektronen durch dünne Folien“
  - Dezember 1997 Diplom-Abschluss
- Schulbildung
- 1979 – 1983 Schillerschule Albstadt-Onstmettingen
  - 1983 – 1989 Progymnasium Albstadt-Tailfingen
  - 1989 – 1992 Gymnasium Albstadt-Ebingen