

1. Einleitung

Die Migration von Zellen ist Grundlage für zahlreiche lebenswichtige und pathophysiologische Funktionen des menschlichen Organismus. Bereits in der Embryogenese kann man z. B. beobachten, wie Mesenchymzellen aus der Umgebung des Neuralrohrs in Richtung Chorda wandern und dort die Wirbelsäulenanlage bilden [6,45]. Des Weiteren spielt die aktive Fortbewegung von Zellen in der Immunabwehr, der Wundheilung und in der Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle. Während der Wundheilung wandern Granulozyten, Makrophagen und Histozyten zur Phagozytose und Bildung von Granulationsgewebe in das verletzte Gewebe ein [22].

In der Immunabwehr geschieht Ähnliches: Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten schützen den menschlichen Organismus vor eindringenden Bakterien und anderen Pathogenen, indem sie den „Eindringling“ aufspüren und beseitigen. An Infektionsherden werden verschiedene molekulare Botenstoffe gebildet, die vor allem neutrophile Granulozyten, die „Polizei der Immunabwehr“, aus dem Blut anlocken und ihre Migration in das betroffene Gewebe chemotaktisch steuern. Im Zielgebiet setzen diese nun ihrerseits chemotaktisch wirksame Interferone und Interleukine frei, phagozytieren Pathogene und bauen diese mit Hilfe von Superoxiden und ihren Enzymen ab.

Alle hier beschriebenen Vorgänge haben die aktive Fortbewegung der Zellen zur Voraussetzung. Die Zellmigration ist ein komplexer Vorgang, in dem die Anheftung an das Substrat, die Vorwärtsbewegung und das erneute Lösen vom Substrat koordiniert werden müssen [43]. Rezeptoren der Zelloberfläche, sogenannte Integrine, vermitteln die Adhesion an das Substrat [5,7,8,30]. Dabei ist die Fähigkeit zur Polarisierung der Zelle in ein deutlich unterscheidbares Vorderende, das sogenannte Lamellipodium und ein Hinterende, der Zelleib, Grundvoraussetzung für die Migration [44]. Für die Vorwärtsbewegung der Zelle werden verschiedene Mechanismen diskutiert [14]. Im Vorderende polarisierter Zellen wurden Myosin I-Moleküle entdeckt, die der kortikalen Expansion dienen sollen, während im hinteren Teil der Zelle Myosin II-Moleküle die Retraktion des Zelleibs unterstützen [13]. Als ein weiterer Motor der Migration gilt die Aktinpolymerisation, die dem Auswachsen des Lamellipodiums zu Grunde liegt. Ein kolloidosmotischer Wassereinstrom am Vorderende der Zelle unterstützt diesen Vorgang [29]. Als ein weiterer, allerdings umstrittener Migrationsmechanismus [31] wird das auf der Endo- und Exozytose basierende Rezirkulieren der Plasmamembran,

das sogenannte Lipidflußmodell, angesehen [5]. Als gesichert gilt, dass die Membran über Endo- und Exozytose rezirkuliert und damit z. B. die für die Zelladhäsion notwendigen Integrine durch Exozytose an die Führungskante des Lamellipodiums gelangen [5,30]. Es wurde allerdings in Frage gestellt, ob das Rezirkulieren der Plasmamembran die für die Vorwärtsbewegung der Zelle notwendige Kraft erzeugt.

Aus mehreren Untersuchungen zu den zellulären Migrationsmechanismen weiss man, dass neben den beschriebenen Umbauvorgängen des Zytoskeletts die Aktivität verschiedener Ionentransporter und Ionenkanäle einen entscheidenden Einfluss auf die Migration hat [17,32,56,58-60]. Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten zeigten, dass ihre chemotaktisch stimulierte Migration durch die Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers und eine gleichzeitige Zunahme des Zellvolumens vorangetrieben wird [51]. Eine Hemmung des Transporters führt dementsprechend zu einer verringerten Chemotaxis. Der Effekt des Na^+/H^+ -Austauschers auf die Migration lässt sich durch eine Änderung des Zellvolumens oder/und des intrazellulären pH-Werts, beides Regulatoren der zytoskelettalen Architektur, erklären [23,50]. Experimente mit transformierten Nierenepithelzellen (MDCK-F) zeigten, dass ihre Migration von der oszillierenden Aktivität eines Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanals und einer damit verbundenen lokalen Volumenänderung abhängig ist. Die Inaktivierung der Kanäle durch spezifische Hemmstoffe führt folglich zu einer Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit [53,58].

Von Patch-clamp-Experimenten weiß man, dass neutrophile Granulozyten wie eine Vielzahl anderer migrierender Zellen Ca^{2+} -empfindliche K^+ -Kanäle mittlerer Leitfähigkeit, sogenannte IK1-Kanäle, in ihrer Zellmembran exprimieren [15,24,64]. Einige Studien an neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten weisen bereits darauf hin, dass die Aktivität Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle wichtige Funktionen wie die Zellproliferation [25] und den „oxidative burst“, die Bildung von Sauerstoffradikalen, unterstützt [3,61]. Ausserdem korrelieren Oszillationen der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), wie sie charakteristisch für chemotaktisch stimulierte Neutrophile sind, mit der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen [34,35,39]. Da der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle vom Membranpotential abhängig ist und dieses wiederum von der Aktivität der IK1-Kanäle beeinflusst wird, ist anzunehmen, dass der intermittierenden Aktivität der IK1-Kanäle eine wichtige Rolle in der Migration zukommen kann.

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob die Migration neutrophiler Granulozyten in ähnlicher Weise wie die der transformierten Nierenepithelzellen von der Aktivität der IK1-Kanäle beeinflusst werden kann. Darüberhinaus soll der Frage nachgegangen werden, ob die Regulation des Zellvolumens möglicherweise das Bindeglied zwischen der K^+ -Kanalaktivität und der Migration der Neutrophilen darstellt. Die exakte Beschreibung der pharmakologischen Eigenschaften dieser Kanäle ermöglicht eine Beurteilung der Rolle, die IK1-Kanäle für bestimmte physiologische und pathophysiologische Vorgänge wie die Migration und Immunabwehr einnehmen. So blockieren das Skorpiongift Charybdotoxin und das Imidazolderivat Clotrimazol schon im nanomolaren Bereich spezifisch die IK1-Kanäle, während 1-ethyl-2-benzimidazol (1-EBIO) als Aktivator dient [21]. Das Skorpiongift Iberitoxin inhibiert zwar Ca^{2+} -empfindliche K^+ -Kanäle mit grosser Leitfähigkeit (BK-Kanäle), hat jedoch keinen Einfluß auf die IK1-Kanäle. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit sollen nun neutrophile Granulozyten zur Migration angeregt werden, um ihr Migrationsverhalten unter dem Einfluss der spezifischen K^+ -Kanalblocker zu beobachten und zu quantifizieren.

Nachdem die IK1-Kanäle auch in anderen Zellen des Immunsystems exprimiert werden und ihre Aktivität viele Funktionen der Immunabwehr beeinflusst, würden diese Kanäle ein potentiell therapeutisches Ziel darstellen [9,57], sollte sich auch die Migration neutrophiler Granulozyten durch Blockade der IK1-Kanäle verlangsamen lassen. In einigen klinischen Studien, die damals allerdings nicht in Korrelation mit IK1-Kanälen gebracht wurden, führte die Behandlung mit Clotrimazol zu einer Befundverbesserung bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis [10].

2.Methoden und Materialien

2.1.1 Isolation neutrophiler Granulozyten mit der Dichtegradientenzentrifugation

Freiwilligen gesunden Spendern, die über den Verwendungszweck ihres Blutes informiert waren, wurden 10 ml Blut aus der Cubitalvene entnommen. Die Gerinnungshemmung erfolgte mit Heparin. Das Blut wurde unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit 10 ml PBS vermischt. In einem zweiten 50 ml Röhrchen wurden 15 ml Ficoll (Dichtegradient 1,077; Seromed Biochrom) vorgelegt und das verdünnte Blut vorsichtig aufgetragen. Blut und Ficoll dürfen sich dabei nicht vermischen. Bei Raumtemperatur, 1500 Umdrehungen pro Minute und ausgestellter Bremse wurde nun für 20 min zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation erhielt man eine Auftrennung in folgende Phasen (Abb. 1): Serum, Monozyten, Ficoll und Erythrozyten bzw. Granulozyten. Die oberen Phasen wurden abgenommen und das Erythrozyten-Granulozytenpellet zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: Raumtemperatur, 1500 Upm, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet zu gleichen Teilen mit RPMI-Medium vermischt. 10% einer 4%igen Dextranlösung in RPMI-Medium wurden zugegeben und in ein neues Röhrchen überführt, wobei die Wandung oberhalb der Füllmenge nicht mit der Zellsuspension in Berührung kommen durfte.

Nun folgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ mit leicht aufgeschraubtem Deckel für 35 min. Erschütterungen des Brutschranks sollten vermieden werden. In diesem Dextrangradienten bildeten sich zwei Phasen, wobei sich in der oberen die Granulozyten und in der unteren die Erythrozyten befanden. Die obere Phase mit den Granulozyten wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit PBS zweimal gewaschen.

Verbleibende Erythrozyten wurden mit 3 ml sterilem, destilliertem Wasser für 10-15 Sekunden lysiert, dann mit 3 ml 1,8%iger NaCl-Lösung aufgefüllt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen.

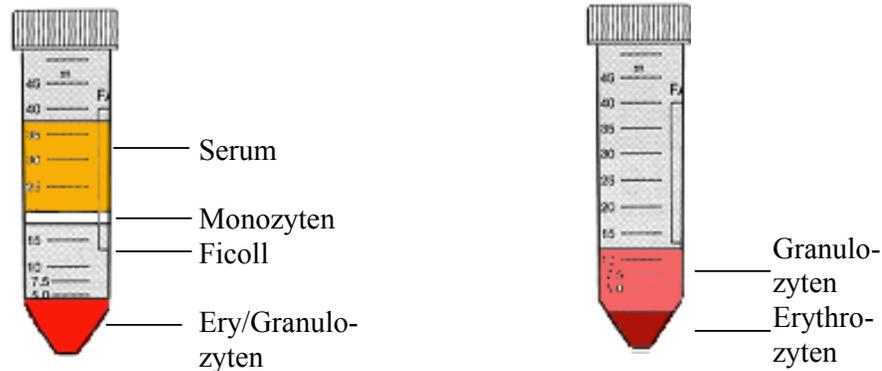


Abb.1 Dichtegradientenzentrifugation. Das erste Röhrchen zeigt die verschiedenen Phasen, die durch die Behandlung des Blutes mit dem Ficoll-Dichtegradienten entstehen. Das zweite Röhrchen zeigt die Trennung von Granulozyten und Erythrozyten mittels einer 0,4%igen Dextranlösung.

2.1.2 GIEMSA-Färbung

Um sicherzustellen, dass man mit der Dichtegradientenzentrifugation ausschliesslich Granulozyten aus dem Blut isoliert hatte, wurde eine Giemsa-Färbung angefertigt. Die Giemsa-Stammlösung wurde mit aufgekochtem Aqua bidest. im Verhältnis 1:20 verdünnt und anschliessend filtriert.

Ein Tropfen der Zellsuspension wurde auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Man fixierte die Zellen für 5 min mit 70%igem Methanol, färbte für 15 min mit der Giemsa-Gebrauchslösung und wusch die Farbe mit Aqua dest. aus. Nach dem Trocknen konnte der Ausstrich unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

2.2 RNA-Isolation

2.2.1 RNA-Isolation mit Guanidiniumisothiocyanat

Der Nachweis des hIK1-Kanals in neutrophilen Granulozyten erforderte die Isolierung der RNA aus diesen Zellen. Da die RNA durch die ubiquitär auftretenden RNAsen leicht abgebaut werden kann, mussten für eine erfolgreiche Isolation die folgenden Arbeitsschritte völlig RNase-frei durchgeführt werden. Dazu wurden alle verwendeten Gefässe und Arbeitsgeräte über mehrere Stunden bei 180°C im Wärmeschrank

ausgebacken, Wasser wurde durch die Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) RNase-frei gemacht, und es wurden nur RNase-freie Reagenzien eingesetzt.

Die neutrophilen Granulozyten aus einer Präparation von 10 ml Blut wurden in 1,9 ml denaturierendem Guanidiniumisothiocyanat (GITC) homogenisiert. Man gab 0,19 ml 2M Na-Acetat pH 4, 1,9 ml Aqua-Phenol und 0,38 ml Chloroform dazu und stellte die Mixtur 15 min auf Eis. Durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 5500 Umdrehungen pro Minute und 4°C erhielt man eine Phasentrennung mit RNA in der wässrigen oberen Phase, während DNA und Proteine in der Interphase und organischen Phase verblieben. Die RNA wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen – 20°C kaltem Isopropanol gefällt, eine Stunde bei –20°C inkubiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet in 300 µl GITC resuspendiert. Es wurden 1/10 des Gesamtvolumens 3M Na-Acetat pH 5,2 dazupipettiert und erneut mit Isopropanol gefällt. Das gewonnene Pellet wurde in 85 %igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und nach dem Verwerfen des Überstands in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

2.2.2 RNA-Isolation mit NucleoSpin

Neben der aufwendigen RNA-Isolation mit GITC wurde auch der RNA-Kit NucleoSpin von Machery-Nagel, Düren, verwendet.

Zur Lyse der neutrophilen Granulozyten gab man auf das aus der Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Zellpellet (aus 10ml Blut) 400 µl RA1-Lösung und 4 µl β-Mercaptoethanol und schüttelte kräftig. Als die Suspension aufklarte, wurden 300 µl Ethanol (96%) zugegeben und gut geschüttelt. Pro Präparation belud man eine NucleoSpin RNA-Säule mit der Suspension und zentrifugiert für 30 sec bei 10.000 Upm. Die RNA-Säule wurde auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und die Membran durch einminütiges Zentrifugieren getrocknet.

Zur Eliminierung der DNA wurden 95 µl DNase Reaktionspuffer auf die Membran der RNA-Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Die DNase-Reaktion stoppte man mit 500µl RA2-Lösung und zentrifugierte für 30 sec bei 10.000 Upm. Der Überstand wurde verworfen, zweimal mit RA3-Lösung gewaschen und die Membran durch zweiminütiges Zentrifugieren bei voller Geschwindigkeit getrocknet. Die RNA-Säule setzte man auf ein nukleasefreies Eppendorfgefäß und eluierte die RNA in 100 µl RNase-freiem Wasser.

2.2.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte in einem UV-Spektrographen (SPEKOL UV-VIS, Fa. ZEISS) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm. Die Absorption wurde nach der Formel $x = OD_{260nm} \times 40 \times \text{Verdünnung}$ in $\mu\text{g/ml}$ umgerechnet. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer RNA-Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$. Zudem gibt der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} Auskunft über die Reinheit der gewonnenen Proben, wobei Werte zwischen 1,7 und 2,0 eine saubere RNA-Präparation anzeigen.

2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese für RNA

Die Qualität der extrahierten RNA wurde mit der denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese überprüft. In der Gelelektrophorese können die geladenen Nucleinsäuren in einem Spannungsfeld wandern. Da die Ladungen der Nucleotide fast gleich sind, ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der Moleküle abhängig. Standardfragmente mit bekannter Molekülmasse, die sogenannten RNA-Marker, die in einer separaten Spur auf dem Gel aufgetragen werden, ermöglichen die Größenbestimmung der aufgetragenen Proben.

Für diesen Arbeitsschritt kam eine 60 ml Gelkammer zum Einsatz. Es wurden 0,6 g Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 51 ml DEPC-behandeltem Wasser suspendiert und in der Mikrowelle gelöst. Dann liess man die Lösung auf 55°C abkühlen, gab 6 ml 10 x MOPS (3-(N-Morpholin)-Propansulfonsäure) und 3 ml Formaldehyd zu, goss den Ansatz in die mit H_2O_2 gereinigten Gelkammer und liess das Gel bei 4°C aushärten.

6 μl RNA (1-1,5 μg) wurden mit 22 μl Ladepuffer vermischt, 10 min bei 65°C inkubiert, dann 5 min auf Eis gekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 x MOPS als Laufpuffer bei 75 Volt für etwa 90 min. Nach Beendigung der Elektrophorese konnte das Gel direkt und, da der Ladepuffer bereits Ethidiumbromid enthält, ohne weitere Anfärbung auf dem UV-Transilluminator (Biometra, Göttingen) fotografiert werden.

2.2.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Trennung der PCR-Produkte wurde die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) verwendet. Das 6%ige Gel aus 11 ml H₂O, 2,25 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien), 1,5 ml 10 x TBE Puffer, 150 µl APS (Ammoniumpersulfat, 10% w/v in H₂O) und 15 µl TEMED (Tetra-Ethyl-Methyl-Dian; Amresco, Solon, Ohio) wurde in eine senkrechte Gelkammer (Peqlab, Erlangen) gegossen und polymerisierte bei Raumtemperatur. Die Proben wurden zusammen mit einem Bromphenolblau-Marker aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V in ca. 45 min aufgetrennt. Als Lufpuffer diente 1 x TBE. Zur Grössenbestimmung der aufgetragenen DNA-Fragmente wurde auf jedes Gel ein Längenstandard (Marker X, Boehringer, Mannheim) aufgetragen. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel in einem Wasserbad mit 10µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt. Ethidiumbromid lagert sich dabei an die Doppelstränge der DNA an und fluoresziert bei UV-Bestrahlung. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators konnten die fluoreszierenden DNA-Banden dargestellt und fotografisch festgehalten werden.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion nach Reverser Transkription (RT-PCR)

Für den Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen aus den neutrophilen Granulozyten wurde die RT-PCR durchgeführt. Dazu musste die bei der RNA-Isolation gewonnene Gesamt-RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde die aus den neutrophilen Granulozyten extrahierte RNA 5 min bei 65°C denaturiert und anschliessend auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung mit einem Oligo d(T) Primer (1 µl 0,5mg/dl) unter Zugabe von 4µl 5 x Puffer, 2 µl 0,1 mM DTT und 1 µl dNTP (10 mmol/l) erfolgte für 2 min bei 37°C. Zur Herstellung der cDNA wurde anschliessend 1 µl des Reverse-Transkriptase-Enzyms SUPERScript (Gibco, BRL) zugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, 5 min auf 95°C erhitzt und schliesslich auf Eis gestellt.

Für die PCR-Amplifikation wurden 2 µl der cDNA-Lösung eingesetzt und ein Reaktionsansatz aus 5 µl 10 x Puffer, 10 µl Q-Solution, 2 µl dNTP (10 mmol/l), je 1 µl Sense- und Antisenseprimer (20 pmol/µl), 0,5 µl Taq (2,5 U) (Qiagen, Hilden) hergestellt und mit H₂O auf 50µl aufgefüllt. Ein Beschichten der Ansätze mit 40µl

Mineralöl (Sigma-Aldrich, Steinheim) sollte deren Verdampfen bei hohen Temperaturen verhindern.

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Progene, Techne, Cambridge, UK) bei folgendem Temperatur- und Zeitprofil:

94°C	5 min	Denaturierung	}	1 Zyklus
60°C	2 min	Primeranlagerung		
72°C	1,15 min	Elongation		

94°C	1 min	Denaturierung	}	30 Zyklen
60°C	1 min	Primeranlagerung		
72°C	1,15 min	Elongation		

72°C 8 min terminale Elongation

Die Annealingtemperatur (Primeranlagerung) wurde nach folgendem Schema errechnet: pro Primersequenz wurden für die Basen A und T jeweils 2°C und für C und G jeweils 4°C addiert.

Primername	Primersequenz	PCR – Produkt	Schmelztemperatur	Spezies
HKCa4 – S3	5'-GGCACCTTTCAG ACACACTTTG-3'	} 420 bp	66°C	Human
HKCa4 – A1	5'-GCAGGTCATACA GGATCATGTG-3'		} 100 bp	66°C
HKCa4 – S6	5'-TAACAAGTTCCG CCAGGTAC-3'			60°C
HbB – S1	5'-ACTCCTGAGGAG AAGTCTGC-3'	} 382 bp	62°C	Human
HbB – A1	5'-TGATAGGCAGCC TGCACTGG-3'			64°C
TCR – S1	5'-TGCCGTGTACCA GCTGAGAG-3'	} 282 bp	64°C	Human
TCR – A1	5'-CTCGACCAGCTT GACATCAC-3'			64°C

Tab.1 Sequenzen und Profile der verwendeten Primer, S = Sense, A = Antisense; HKCa4 = hIK1-Kanal, HbB = Hämoglobin B der Erythrozyten, TCR = T-Zellrezeptor der Lymphozyten

Substanzen	10x TBE-Puffer (in mmol/l)	10x PCR-Puffer (in mmol/l)
Tris-Base	890	-
Borsäure	890	-
0,5M EDTA	20	-
Tris-HCl	-	100
KCl	-	500
Triton-X	-	1%

Tab.2 Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen

2.3 Migrationsexperimente

2.3.1 Versuchsanordnung

Das Ziel der Versuche war es, die auf dem Deckglas angesäten Zellen vollständig und gleichmässig mit verschiedenen Lösungen zu überströmen und ihr Migrationsverhalten dabei zu beobachten.

Die Experimente wurden unter einem Mikroskop mit Differenzialinterferenzkontrast (Zeiss IM 35, Oberkochen) bei 400-facher Vergrößerung (40 x Objektiv) und einem Mikroskop mit Phasenkontrast (Zeiss ID 03) bei 320-facher Vergrößerung (32 x Objektiv) durchgeführt. Das Deckglas mit den angesäten Zellen wurde auf dem beheizbaren Objektisch fixiert. Die konstante Superfusion der Zellen ermöglichten ein einschwenkbarer Zulauf auf der einen und eine pumpenbetriebene Absaugpipette auf der gegenüberliegenden Seite des Objektträgers. Der Zulauf enthielt mehrere Schlauchsysteme, die über die Regulierung von Dreiwegehähnen einen schnellen Lösungswechsel gewährleisteten. Um die optimale Temperatur der Superfusionslösungen von 37,0°C zu erreichen, wurden die Lösungen in ein Wasserbad von ca. 41°C bis 45°C gestellt und das Zulaufsystem von einem dem Wasserbad angeschlossenen Schlauchmantel umgeben. Die Dokumentation der Versuche erfolgte über eine an das Mikroskop angeschlossene Videoanlage (Videokamera Panasonic TV Camera, Japan; Videorekorder HR-D430EG JVC, Deutschland), die an ein Bildverarbeitungsprogramm (JAVA, Jandel Scientific, Corte Madera, USA) gekoppelt war. Damit war es möglich, das Migrationsverhalten der Zellen während des Experiments am Bildschirm zu verfolgen und elektronisch zu dokumentieren. Die Streckenauswertung und Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit erfolgte über geeichte Videoausdrucke (Video Graphic Printer UP 850 Sony, Japan).

2.3.2 Versuchsablauf

Die Granulozyten wurden nach der Isolierung in PBS suspendiert bis zum Beginn der Migrationsexperimente im Kühlschrank bei ca. 4°C aufbewahrt. Die Deckgläser wurden für 10 min mit Polylysin vorbehandelt, zweimal mit PBS gewaschen und pro Deckglas 1 ml Ringerlösung vorgelegt. Auf ein Deckglas trug man nun 150 – 200 µl Granulozytensuspension auf und liess es zur Adhäsion der Zellen 20 – 30 min bei 37°C im Wasserbad ruhen.

Anschliessend wurde das Deckglas auf dem vorgeheizten Objektisch des Mikroskops fixiert und die Zellen mit 37°C warmer Ringerlösung überströmt. Der Bildausschnitt musste nun so eingerichtet werden, dass die Zellen während des Experiments möglichst nicht aus dem Aufnahmebereich der Videokamera wanderten. Um die Ausgangsposition zum Zeitpunkt $t = 0$ festzulegen, wurden einzelne Zellen mit dem Bildverarbeitungsprogramm markiert. Mit dem Zeitpunkt $t = 0$ min begann eine 10 bzw. 12 minütige Phase, in der die Zellen mit dem Lockstoff fMLP (10 nM) stimuliert wurden. Es folgte über weitere 10 bis 12 min eine Superfusion mit der jeweiligen Hemmstofflösung bzw. mit fMLP für die Zeitkontrolle. Zur Dokumentation des Versuchs wurde alle 2 Minuten das Bild eingefroren, die Zellmarkierung der Ausgangsposition eingeblendet und ein Videoausdruck angefertigt (Abb. 2)

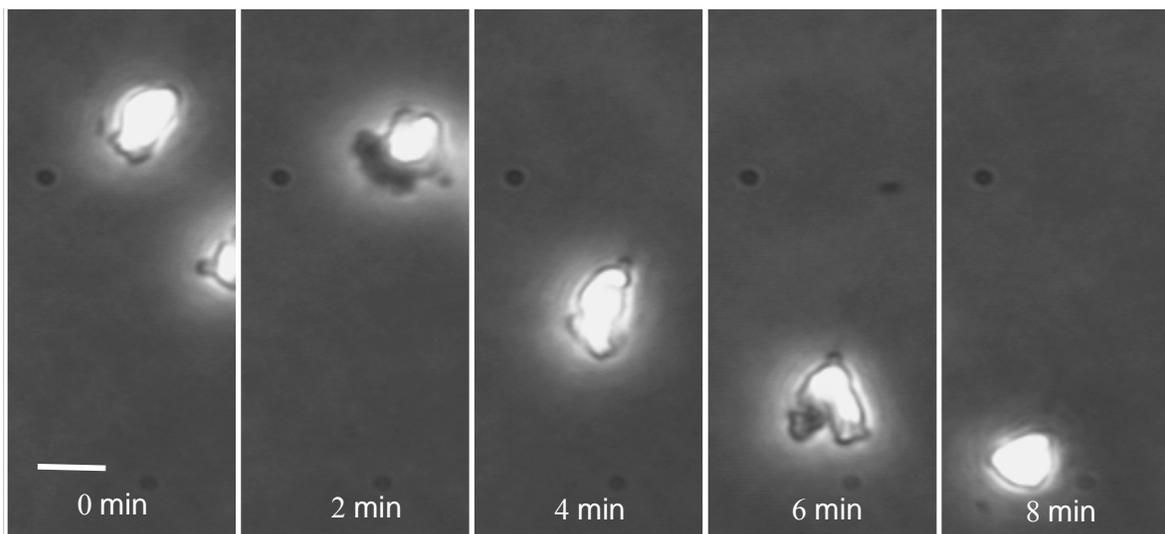


Abb.2 Videomikroskopische Aufzeichnung zur Ermittlung der Migrationsgeschwindigkeit. Der neutrophile Granulozyt legt vom Zeitpunkt 0 min bis zum Zeitpunkt 8 min eine Strecke von ca. 50µm zurück, Maßstabsbalken: 10µm

2.3.4 Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit

Als Mass für die Migrationsgeschwindigkeit diente die Verlagerung des Zellmittelpunkts pro Zeitintervall. Diese Strecke konnte direkt aus den geeichten Videoausdrucken ermittelt werden. In die Auswertung gelangten dabei nur Zellen, die eine Migrationsgeschwindigkeit von mindestens 1,5µm/min erreichten.

2.3.3 Verwendete Lösungen

Der Lockstoff fMPL (formyl-Methionin Leucin Phenylalanin, Sigma-Aldrich, Steinheim) diente zur Stimulation der Granulozyten. fMPL wurde als 2,5 mmol/l Stammlösung in Ethanol gelöst.

Die beiden verwendeten Skorpiongifte Charybdotoxin (CTX, Almone Labs Jerusalem, Israel) und Iberiotoxin (IbTX, Almone Labs) wurden unter Zugabe von 0,1% BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma-Aldrich) in Ringerlösung zu einer Stammlösung aufbereitet. Das BSA sollte dabei die Adhäsion der Toxinpeptide an Schläuche und Gefässwände verhindern.

Die Stammlösung des spezifischen K⁺-Kanallockers Clotrimazol (Clot, BayerAG Leverkusen, Deutschland) wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) angesetzt. Alle verwendeten Lösungen wurden erst kurz vor den Versuchen mit Ringerlösung in ihrer endgültigen Konzentration angesetzt.

Substanzen	Ringerlösung (mmol/l)	Hypotone Ringer- Lösung (mmol/l)	PBS Phosphate Bufferd Saline (mmol/l)
NaCl	122,5	80,0	137,0
KCl	5,4	5,4	2,7
MgCl	0,8	0,8	-
CaCl ₂	1,2	1,2	-
Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O	1,0	1,0	4,3
Glucose	5,5	5,5	-
HEPES	10,0	10,0	-
KH ₂ PO ₄	-	-	1,4
pH	7,4	7,4	7,4

Tab.3 Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösungen; die HEPES-gepufferte Ringerlösung wurde mit 1mol/l NaOH-Lösung auf pH 7,4 titriert.

2.3.5 Statistik

Die Migrationsversuche wurden als gepaarte Experimente an einzelnen neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-test für gepaarte und ungepaarte Stichproben ermittelt, wobei das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ lag.

2.4 Zellvolumenmessungen

2.4.1 Versuchsanordnung

Das Ziel dieser Versuche war es, Volumenänderungen der neutrophilen Granulozyten nach der Zugabe von fMLP und den Hemmstoffen zu registrieren.

Die Zellvolumenmessungen wurden mit einem Coulter Counter (Z2 Coulter Electronics, Miami) durchgeführt. Dieses Gerät ermöglicht die Zählung und Größenbestimmung von Zellen in Abhängigkeit von anwenderdefinierten Schwellenwerten. Für die Volumenmessungen der Neutrophilen wurde ein Größenbereich zwischen 300 und 380 fl (Femtoliter) gewählt. Die Zellen mussten für diesen Versuch in einer leitfähigen Suspension (Ringerlösung) angesetzt werden.

2.4.2 Versuchsablauf

Pro Versuchsreihe wurden drei Coulter-Messzylinder benötigt; Messzylinder **1** für die Kontrolle mit Ringerlösung, **2** für den Ansatz mit fMLP und **3** für den Ansatz mit den Hemmstoffen. 15 min vor Versuchsbeginn wurden 10 ml Ringerlösung in die Messzylinder pipettiert, die Zellen darin suspendiert und in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Nach der 15minütigen Inkubationszeit gab man zum Zeitpunkt $t = 0$ in die Messzylinder **2** und **3** fMLP und führte die erste Volumenmessung mit allen Ansätzen durch. Zu den Zeitpunkten 2 min, 5 min und 10 min folgten weitere Messungen. 10 min nach der Zugabe von fMLP wurde dem Messgefäß **3** der jeweilige Hemmstoff zugefügt und die Volumenbestimmungen zu den Zeitpunkten 12 min, 15 min, 20 min und 24 min fortgesetzt (Abb.3).

Für die Volumenmessungen im hypotonen Milieu wurden ebenfalls drei Messzylinder benötigt wobei die Zellen in Gefäß **1** in Ringerlösung, in Gefäß **2** in Ringerlösung und

fMLP und in Gefäß **3** in hypotoner Ringerlösung und fMLP angesetzt wurden. Die Messungen erfolgten zu den Zeitpunkten 0 min, 2 min, 5 min, 10 min und 15 min.

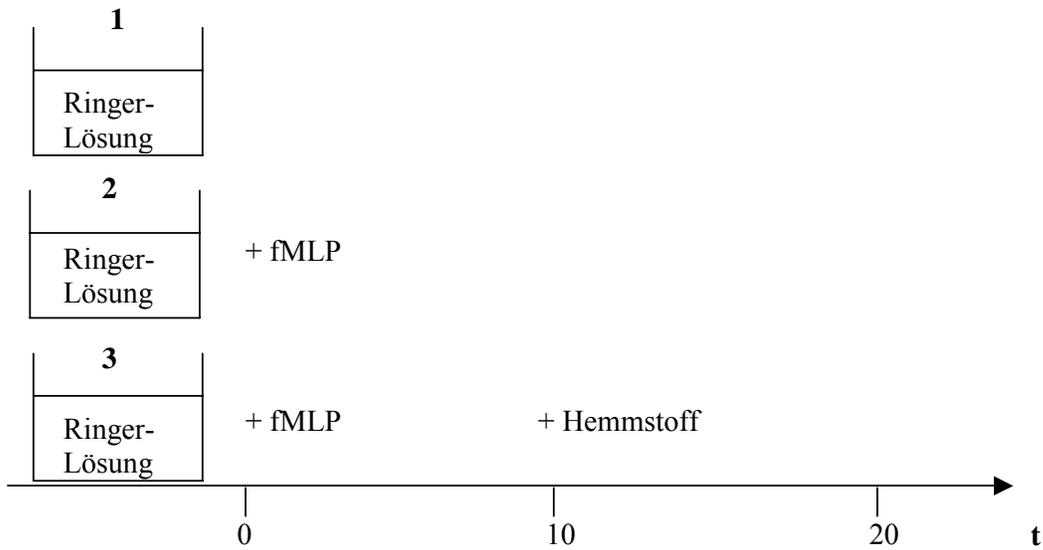


Abb. 3 Schematische Darstellung des Versuchaufbaus für die Volumenmessungen, Gefäß 1: Kontrolle mit Ringerlösung, Gefäß 2: Ansatz mit fMLP, Gefäß 3: Ansatz mit den jeweiligen Hemmstoffen Clotrimazol, Charybdotoxin, Iberiotoxin oder einer hypotonen Ringerlösung

3. Ergebnisse

3.1 Zellisolation

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation war es möglich, neutrophile Granulozyten aufgrund ihres spezifischen Gewichts aus dem Blut zu isolieren. Um die Reinheit der Granulozytenisolation zu testen, wurden die gewonnenen Zellen mit Giemsa angefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Diese Färbung mit sauren und basischen Farbstoffen ermöglichte eine optimale Differenzierung der Zellen und Zellorganellen und liess eine Klassifizierung nach Grösse, Kern-Plasma-Relation, Kernform und Kernstruktur zu. In den angefertigten Ausstrichen fanden sich neben zahlreichen stab- und segmentkernigen Granulozyten (Neutrophile) vereinzelte eosinophile und basophile Granulozyten, maximal drei Lymphozyten bzw. Monozyten pro 50 Zellen und keine Erythrozyten. Es war also eine maximale Anreicherung von Granulozyten mit einer vernachlässigbar geringen Verunreinigung (durchschnittlich 5-6%) durch Lymphozyten oder Monozyten gelungen.

Eine weitere Beurteilung der Zellisolation durch den FACSort (Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglichte die Zusammenarbeit mit dem Virologischen Institut Würzburg. Für diese Methode wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenrezeptoren CD2, CD3, CD14 und CD19 der Lymphozyten bzw. Monozyten und gegen CD45 der Granulozyten, beladen und einzeln nach ihrer Emissionsstärke (abhängig von der Antikörperbindung), Granularität und Grösse sortiert. Diese FACS-Analyse ermittelte einen Granulozytenanteil des gewonnenen Zellpellets von 93,9% bis 99,1%.

3.2 Nachweis von hIK1 mittels Reverse Transkriptase-PCR

Das Vorhandensein der humanen Isoform des IK1-Kanals (hIK1) in neutrophilen Granulozyten war die grundlegende Voraussetzung für unsere Experimente. Deren Expression in neutrophilen Granulozyten wurde mit Hilfe der Reverse Transkriptase-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen.

Die in der PCR eingesetzten spezifischen Primer wurden aus der bekannten Sequenz des hIK1-Kanals (Accession: AF022150) abgeleitet und so gewählt, dass der Sense-Primer HKCa4-S3 und der Antisense-Primer HKCa4-A1 ein Amplifikat mit einer

Länge von 420 Basenpaaren ergaben. Die Gelanalyse des PCR-Produkts zeigte Amplifikate der erwarteten Grösse (Abb. 5). Die Spezifität des Amplifikats wurde durch eine „nested PCR“ nachgewiesen, d.h. es wurde der eingerückte Sense-Primer HKCa4-S6 eingesetzt (Abb. 4). Auch hier war in der Gelanalyse ein Amplifikat der zu erwartenden Grösse von 100 Basenpaaren zu sehen.

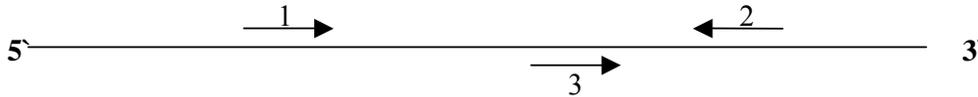


Abb. 4 PCR-Schema. 1 = Sense-Primer HKCa4-S3, 2 = Antisense-Primer HKCa4-A1 und 3 = Sense-Primer HKCa-S6 für die „nested PCR“

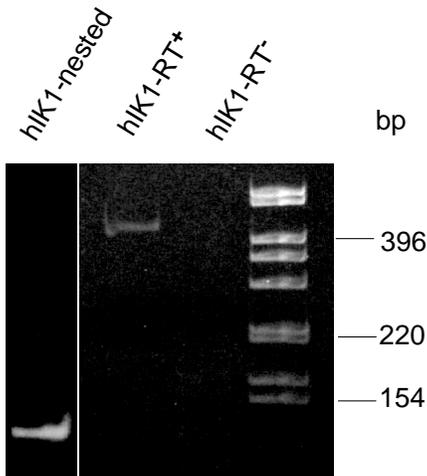


Abb.5 Die dargestellte Gelelektrophorese zeigt in der ersten Laufspuren von rechts den Längenstandard, in der zweiten ist keine Bande zu sehen, da in dem RT-Ansatz die Reverse Transkriptase fehlt, in der dritten ist ein 400 Basenpaare langes Fragment des hIK1-Kanals zu sehen, und in der vierten stellt sich das 100 Basenpaare lange Fragment der nested PCR dar.

Als Kontrolle dienten sogenannte RT⁻-Ansätze, in denen das Enzym Reverse Transkriptase fehlte und somit die RNA nicht in die für die PCR notwendige cDNA umgeschrieben werden konnte. In der Gelelektrophorese waren in diesen aufgetragenen Proben keine Banden zu sehen, d.h. die Ansätze waren frei von genomischer DNA.

Um falsch positive Ergebnisse durch die Kontamination der aus den neutrophilen Granulozyten isolierten RNA durch die in den Zellpellets möglicherweise vorhandenen Erythroblasten und Lymphozyten und deren RNA auszuschliessen, wurden zusätzliche PCR-Experimente durchgeführt da sowohl Erythroblasten als auch Lymphozyten hIK1-Kanäle exprimieren. Zum Ausschluss von Erythroblasten-RNA wurden Primer aus der bekannten Sequenz des Hämoglobin B und für die Lymphozyten-RNA Primer aus der Sequenz eines T-Zellrezeptors gewählt. In der Gelelektrophorese konnten in diesen

Kontroll-Ansätzen keine Banden nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass das hIK1-Signal der PCR aus den Granulozyten stammt.

3.3 Migrationsexperimente

Nachdem mit Hilfe der unter Punkt 3.2 beschriebenen RT-PCR gezeigt werden konnte, dass neutrophile Granulozyten hIK1-Kanäle exprimieren, sollte nun untersucht werden, ob diese K^+ -Kanäle einen Einfluss auf die Migration der Zellen haben. Dazu wurden die Neutrophilen mit dem Lockstoff fMLP stimuliert. Wenn die hIK1-Kanäle eine Rolle für die Migration der neutrophilen Granulozyten spielen, sollte ihre Inaktivierung durch spezifische Kanalblocker wie Clotrimazol und Charybdotoxin zu einer Verlangsamung der Migrationsgeschwindigkeit führen.

3.3.1 Zeitkontrollen mit Ringerlösung und fMLP

Für alle Migrationsexperimente wurde Ringerlösung als Superfusionslösung verwendet. Die neutrophilen Granulozyten erreichten in der Ringerlösung ohne Zusatzstoffe eine durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von $1,8 \pm 0,18 \mu\text{m}/\text{min}$. Als Zeitkontrolle für jede Versuchsreihe dienten die Migrationsexperimente mit dem bakteriellen Lockstoff fMLP (10 nmol/l). fMLP führte in dieser Konzentration zu einer deutlichen Stimulation der Neutrophilen. Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit lag bei $2,8 \pm 0,21 \mu\text{m}/\text{min}$, was im Vergleich zu den Werten in Ringerlösung einer Steigerung von 52,1% entspricht. Sowohl für die Zeitkontrollen in reiner Ringerlösung als auch für die mit fMLP wurden über die gesamte Dauer der Migrationsexperimente konstante Geschwindigkeiten beobachtet.

3.3.2 Migrationsexperimente mit Clotrimazol

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Clotrimazol, einem als Antimykotikum und spezifischen IK1-Kanalblocker verwendeten Imidazol, auf die Migration neutrophiler Granulozyten untersucht.

Wie die Abb.6 zeigt, führte die Inaktivierung der hIK1-Kanäle mit $1 \mu\text{mol}/\text{l}$ Clotrimazol zu einer Verlangsamung der Migration. Im Vergleich zur Kontrollgeschwindigkeit von $2,6 \mu\text{m}/\text{min}$ reduzierte sich die Migrationsgeschwindigkeit um 74,4 % auf $0,73$

$\mu\text{m}/\text{min}$. Abnehmende Konzentrationen von 200, 50 und 10 nmol/l Clotrimazol führten zu einer dosisabhängigen Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 7). Die Ergebnisse der einzelnen Konzentrationen sind in der Tab.4 zusammengefasst. Die IC_{50} (halbmaximale Hemmkonzentration) lag bei 30 – 50 nmol/l. Dieser Wert entspricht in etwa dem IC_{50} -Wert für die Hemmung des in Patch clamp-Experimenten beobachteten hIK1-Kanalstroms.

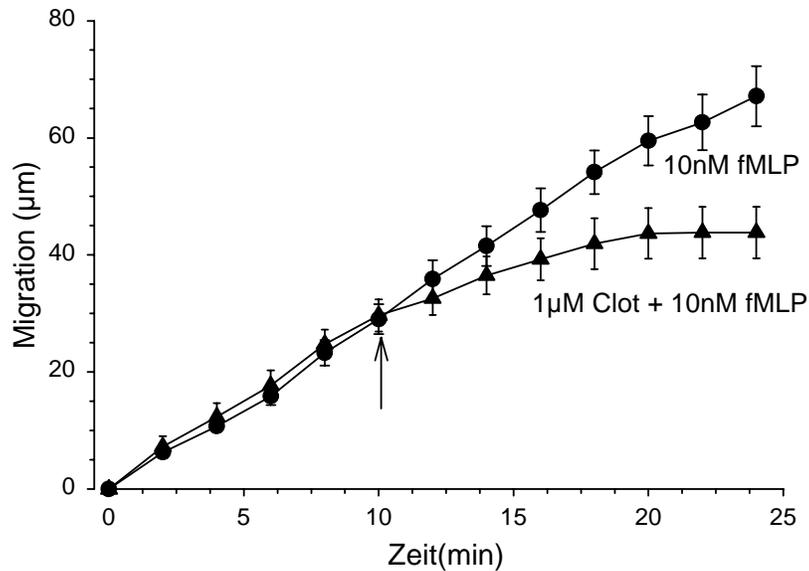


Abb.6 Migrationsexperiment mit Clotrimazol. Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit der mit fMLP vorstimulierten neutrophilen Granulozyten durch Zugabe (s. Pfeil) des spezifischen Kalium-Kanalblockers Clotrimazol (Clot)

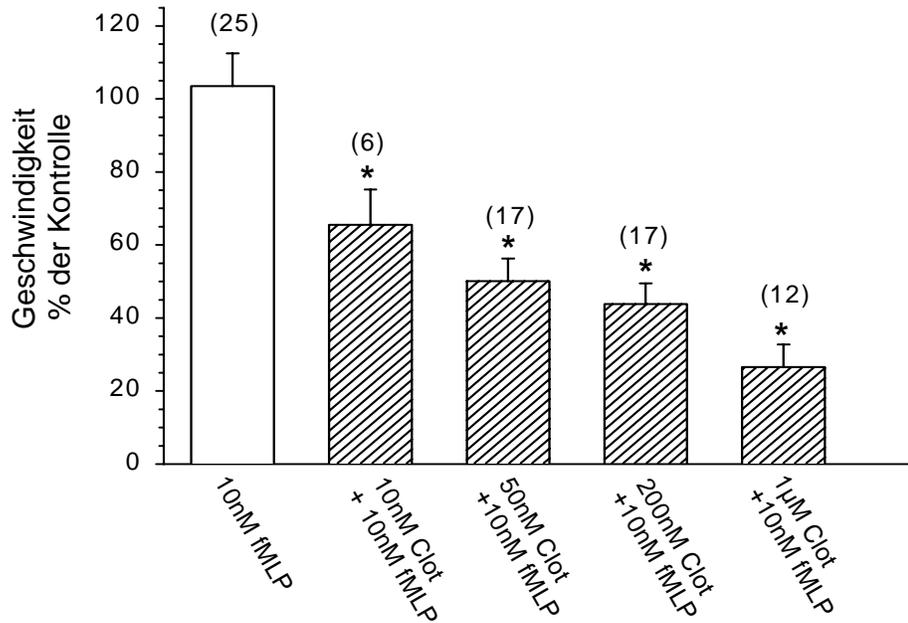


Abb.7 Migrationsexperimente mit Clotrimazol. Konzentrationsabhängige Verlangsamung der Migrationsgeschwindigkeit durch den spezifischen Kalium-Kanalblocker Clotrimazol

[Clot]	n	Migrationsgeschwindigkeit		
		Clot (µm/min)	% der Kontrolle	p<0,05
10 nmol/l	6	2,4 ± 0,35	65,5	*
50 nmol/l	17	1,5 ± 0,20	50,0	*
200 nmol/l	17	1,0 ± 0,13	42,6	*
1,0 µmol/l	12	0,7 ± 0,17	26,5	*

Tab.4 Zusammenfassung der Migrationsexperimente mit dem spezifischen hIK1-Kanalblocker Clotrimazol

3.3.3 Migrationsexperimente mit Charybdotoxin

Nachdem mit Clotrimazol eine dosisabhängige Hemmung der Migration beobachtet werden konnte, war eine ähnliche Wirkung von dem Skorpiongift Charybdotoxin, das die hIK1-Kanäle spezifisch blockiert, zu erwarten.

Abb.8 zeigt den Verlauf eines Experiments, in dem die Migration der neutrophilen Granulozyten durch 10 nmol/l Charybdotoxin deutlich gehemmt wird. Im Durchschnitt verlangsamte sich die Migrationsgeschwindigkeit von 2,8 $\mu\text{m}/\text{min}$ auf 0,9 $\mu\text{m}/\text{min}$, was einer Hemmung von 76,8 % entspricht. Der Einsatz abnehmender Konzentrationen von Charybdotoxin führte ebenfalls zu einer dosisabhängigen Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit. Die Ergebnisse der einzelnen Konzentrationen sind in der Tab. 5 aufgeführt. Der Wert für die IC_{50} lag mit 3 – 5 nmol/l auch hier in dem Bereich, der für den hIK1-Kanal bereits in Patch-clamp Messungen ermittelt werden konnte.

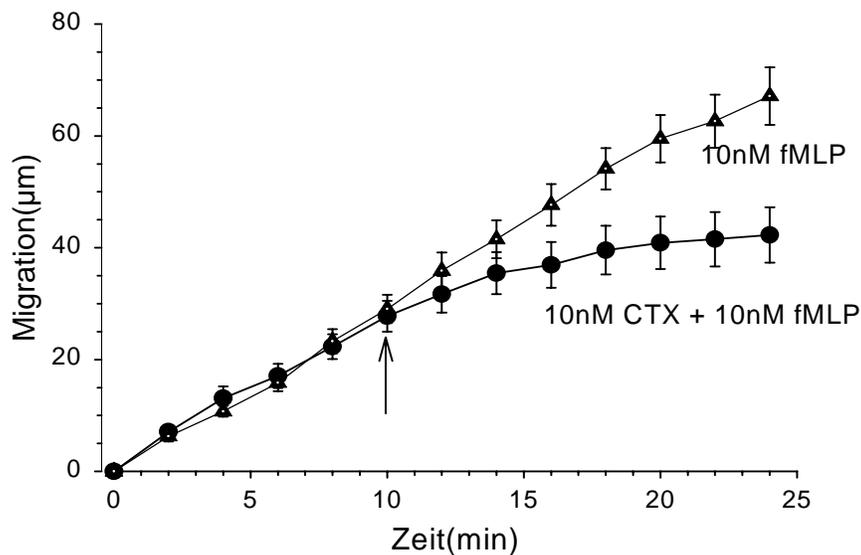


Abb.8 Migrationsexperiment mit Charybdotoxin. Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit der mit fMLP vorstimulierten neutrophilen Granulozyten durch Zugabe (s. Pfeil) des spezifischen Kalium-Kanalblockers Charybdotoxin (CTX)

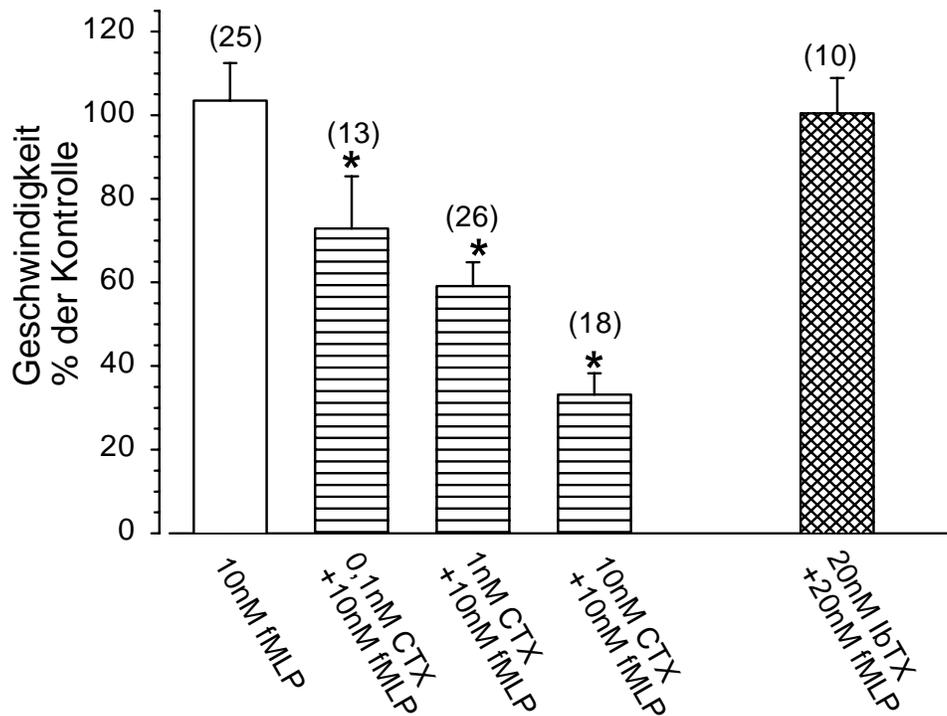


Abb.9 Konzentrationsabhängige Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit durch den spezifischen Kalium-Kanalblocker Charybdotoxin (CTX); Iberitoxin (IbTX), ein anderes Skorpiongift, das die hIK1-Kanäle nicht blockiert, zeigt keinen Einfluss auf die Migration.

[CTX]	n	Migrationsgeschwindigkeit		
		CTX ($\mu\text{m}/\text{min}$)	% der Kontrolle	P<0,05
0,1 nmol/l	18	1,8 \pm 0,25	72,8	*
1,0 nmol/l	26	1,3 \pm 0,12	59,1	*
10 nmol/l	13	0,9 \pm 0,17	33,2	*

Tab. 5 Zusammenfassung der Migrationsexperimente mit dem spezifischen hIK1-Kanalblocker Charybdotoxin (CTX)

3.3.4 Migrationsexperimente mit Iberiotoxin

Um sicherzustellen, dass die Hemmung der Migration ausschliesslich auf die Inaktivierung der hIK1-Kanäle durch die spezifischen Kanalblocker Clotrimazol und Charybdotoxin zurückzuführen ist, wurden Experimente mit dem Skorpiongift Iberiotoxin durchgeführt. Iberiotoxin hat keine Wirkung auf die hIK1-Kanäle.

Der Versuchsablauf war identisch zu dem der unter Punkt 3.3.2 und 3.3.3 beschriebenen Experimente. Iberiotoxin (20 nmol/l) zeigte keinen Einfluss auf die Migration. Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von $2,3 \pm 0,16 \mu\text{m}/\text{min}$ blieb auch nach der Zugabe von Iberiotoxin konstant (Abb. 9).

Zusammenfassend sprechen die Experimente mit Clotrimazol, Charybdotoxin und Iberiotoxin also für die Beteiligung der hIK1-Kanäle an der Migration der neutrophilen Granulozyten auf einer Polylysin-Matrix.

3.3.5 Migrationsexperimente und Volumenmessungen mit hypotoner Ringer-Lösung

Mit diesen Experimenten sollte geprüft werden, ob Veränderungen des Zellvolumens, wie sie z.B. durch anisotone Lösungen erzeugt werden können, einen Einfluss auf die Migration neutrophiler Granulozyten ausüben. Grundgedanke dieser Experimente war, dass das Zellvolumen wie auch bei anderen migrierenden Zellen als ein Bindeglied zwischen Ionentransportern und den zytoskelettalen Migrationsmechanismen angesehen wird und die hIK1-Kanäle eine wichtige Rolle in der Volumenregulation einnehmen. Wie die Volumenmessungen zeigen, führt die Blockade der hIK1-Kanäle mit Clotrimazol und Charybdotoxin zu einem Anschwellen der mit fMLP stimulierten neutrophilen Granulozyten. Besteht nun tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Volumenregulation und Migration, so sollte auch die durch eine hypotone Lösung erzeugte Zellschwellung, entsprechend der Volumenzunahme nach hIK1-Blockade, zu einer Hemmung der Migration führen.

Um eine Zellschwellung zu erreichen, wurde eine hypotone Ringerlösung (ca. 193 mosm/l) eingesetzt. Die Volumenzunahme führte zu einer Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit von $3,7 \pm 0,16 \mu\text{m}/\text{min}$ auf $0,7 \pm 0,16 \mu\text{m}/\text{min}$, was einer Hemmung von $79,1 \pm 5,46 \%$ entspricht.

In den anschließend durchgeführten Messungen des Zellvolumens am Coulter Counter wurden die neutrophilen Granulozyten in einer hypotonen Ringerlösung mit der gleichen Osmolarität wie in den Migrationsexperimenten suspendiert. Die Messungen ergaben ein durchschnittliches Zellvolumen von 403 fl, was im Vergleich zur Kontrolle mit fMLP (329 fl) einer Zellschwellung von 22,5 % entspricht.

3.4 Volumenmessungen

Wie die Ergebnisse der Migrationsexperimente mit hypotoner Ringerlösung zeigen, führte die durch die Anisotonie erzwungene Änderung des Zellvolumens zu einer fast 80 %igen Verlangsamung der Migration. Mit den in diesem Zusammenhang durchgeführten Volumenmessungen konnte eine signifikante Zellschwellung der in hypotoner Ringerlösung suspendierten neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die Blockierung der hIK1-Kanäle mittels Clotrimazol und Charybdotoxin ebenfalls zu einer messbaren Zellschwellung führt, welche die Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit erklären könnte.

Ähnlich wie bei den Migrationsexperimenten wurden die suspendierten Zellen für 10 Minuten mit fMLP stimuliert. Auffallend war hierbei, dass es nach Zugabe von fMLP zu einer initialen Zellschwellung kam, das Zellvolumen im weiteren Verlauf jedoch wieder annähernd auf das Ausgangsvolumen zurückkehrte (Abb.10). Sowohl die Zugabe von Clotrimazol als auch die von Charybdotoxin führten dosisabhängig zu einem sofortigen Anschwellen der neutrophilen Granulozyten um bis zu 8 % (Tab.6). Im Vergleich dazu hatte Iberiotoxin, das die hIK1-Kanäle nicht blockiert, keinen signifikanten Effekt auf das Zellvolumen.

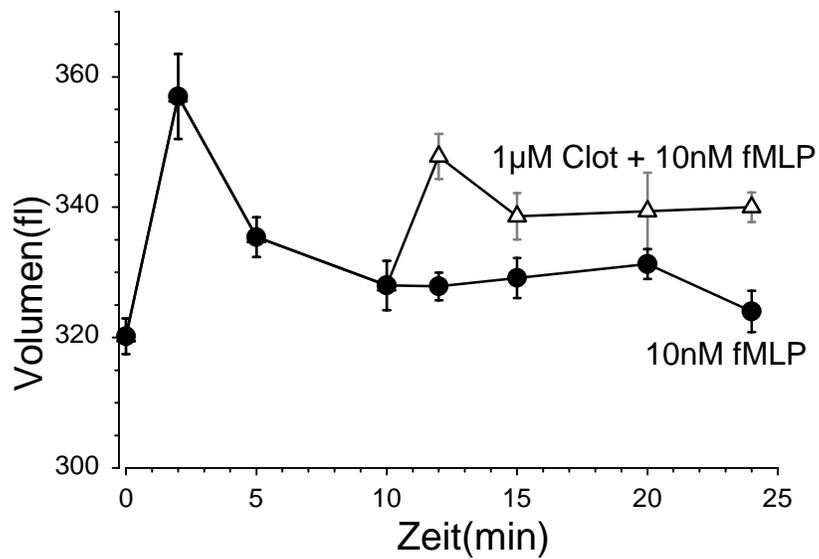


Abb.10 Volumensmessung. Die Blockade der Kalium-Kanäle mit Clotrimazol führt zum sofortigen Anschwellen der neutrophilen Granulozyten

[Clot/CTX/IbTX/ Hypotonie]	Zellvolumen		
	(fl)	% (Zell- schwellung)	p< 0,05
1,0 µmol/l Clot	350	8,3	*
10,0 nmol/l Clot	341	4,9	*
10,0 nmol CTX	347	6,1	*
0,1 nmol/l CTX	346	4,3	*
20 nmol/l IbTX	333	1,2	-
193 mosm/l	403	23,5	*

Tab. 6 Zusammenfassung der Volumenmessungen an neutrophilen Granulozyten

4. Diskussion

Die Zellmigration ist wesentlicher Bestandteil zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Prozesse des menschlichen Körpers. Betrachtet man den Vorgang Migration genauer, so wird deutlich, dass es sich dabei um ein äusserst komplexes Geschehen handelt, bei dem räumliche und zeitliche Umbauvorgänge des Zytoskeletts und Interaktionen der Zellen mit der umgebenden Matrix koordiniert werden müssen. Ein derart komplexer Vorgang kann nur durch das Zusammenspiel mehrerer Mechanismen möglich sein. Die Rolle des Ionentransports für die Migration wurde bereits an verschiedenen migrierenden Zellen untersucht. So konnte belegt werden, dass die Migration von transformierten Epithelzellen, Melanomzellen und Fibroblasten von der Aktivität der IK1-Kanäle und den Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern abhängig ist [23,55]. Die Funktion der genannten Transporter und Ionenkanäle steht in einem engen Zusammenhang mit den während der Migration stattfindenden Veränderungen des Zytoskeletts und Zellvolumens. Eine Aktivierung der verschiedenen Kanäle und Transporter führt über den Ein- oder Ausstrom von Ionen und dem osmotisch bedingt nachfolgenden Wasser zu Zellschwellung oder Zellschrumpfung. Derartige Änderungen des Zellvolumens beeinflussen ihrerseits die Polymerisation bzw. Depolymerisation der Aktinfilamente des Zytoskeletts und umgekehrt. In diesem Zusammenhang scheinen insbesondere die IK1-Kanäle eine wichtige Rolle für die Zellmigration zu übernehmen. An migrierenden Nierenepithelzellen wurde gezeigt, dass ihre oszillierende Aktivität am hinteren Pol der Zelle einen Kaliumausstrom erzeugt und das osmotisch nachfolgende Wasser nun zu einer lokalen Schrumpfung führt [53]. Die beschriebene Volumenabnahme unterstützt damit die Retraktion des Zelleibs, was für die Vorwärtsbewegung der Zelle notwendig ist.

Die Beurteilung der Rolle der IK1-Kanäle für die Zellmigration wird durch die genaue Beschreibung ihrer pharmakologischen Eigenschaften erleichtert. So sind eine Reihe von zum Teil sehr effizienten Inhibitoren, die den Kanal im niedrig nanomolaren Konzentrationsbereich blockieren, bekannt. Clotrimazol mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration (IC_{50}) von ca. 50 nmol/l, Charybdotoxin mit einer IC_{50} von ca. 3 nmol/l und Nitrendipin mit einer IC_{50} von ca. 30 nmol/l werden als Hemmstoffe eingesetzt, während 1-ethyl-2-benzimidazolone (1-EBIO) die Kanäle aktiviert. Besondere Beachtung kommt dabei dem Kanalblocker Clotrimazol zu, da für ihn bereits Erfahrungen im klinischen Bereich bestehen. So führte z. B. die Behandlung mit

Clotrimazol bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zu einer Befundverbesserung [10]. Bisher wurde jedoch nicht erforscht, ob dieser positive Effekt auf die Blockade der IK1-Kanäle in den für die rheumatoide Arthritis ursächlichen Entzündungszellen zurückzuführen ist. Die Annahme, Coltrimazol entfalte seinen antiinflammatorischen Effekt, indem es durch eine Blockade der IK1-Kanäle die Migration von Entzündungszellen hemmt, legt nahe, dass diese potentielle therapeutische Ziele sein könnten. Die gezielte Hemmung der Zellwanderung würde das Eingreifen in pathophysiologische Vorgänge, die wie die rheumatoide Arthritis oder die Metastasierung von Karzinomen mit der Migration assoziiert sind, ermöglichen.

Unter dem gerade beschriebenen Aspekt des therapeutischen Ansatzes sollte es das Ziel der vorliegenden Arbeit sein, die Rolle der IK1-Kanäle für die Migration an einem Zelltyp zu untersuchen, dessen Wanderung entscheidend für physiologische Vorgänge der Immunabwehr ist. Neutrophile Granulozyten erschienen dazu aus folgenden Gründen besonders geeignet: 1. Ihre zielgerichtete Migration zu einem Entzündungsherd ist Voraussetzung für eine effektive Immunantwort. Folglich hätte eine gezielte Steuerung der Migration sowohl Einfluss auf physiologische wie auch pathophysiologische Prozesse und somit klinische Relevanz 2. Wie Patch-clamp-Experimente zeigen, exprimieren neutrophile Granulozyten bzw. zu Granulozyten differenzierte HL60-Zellen Ca^{2+} -empfindliche K^+ -Kanäle in ihrer Plasmamembran [64] 3. Ihre Migration lässt sich durch den gut untersuchten chemischen Lockstoff fMLP stimulieren und führt zu Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [19], die eine intermittierende Aktivierung der IK1-Kanäle gewährleistet.

Meine Arbeitshypothese stellte sich nun folgendermassen dar: Exprimieren neutrophile Granulozyten IK1-Kanäle und beeinflussen diese entscheidend die Migration, so müsste die Inaktivierung dieser Kanäle mit den Hemmstoffen Clotrimazol und Charybdotoxin zu einer sichtbaren Verlangsamung der Migrationsgeschwindigkeit führen.

Entscheidend für meine Migrationsexperimente war, dass neutrophile Granulozyten IK1-Kanäle überhaupt exprimieren. Bislang wurde an diesen Zellen lediglich ein Ca^{2+} -empfindlicher K^+ -Kanal ohne Identifizierung der molekularen Struktur beschrieben. Nachdem ich mit den RT-PCR-Experimenten eine Expression der humanen Isoform des IK1-Kanals (hIK1) in neutrophilen Granulozyten auf mRNA-Ebene nachweisen konnte, begann ich mittels videomikroskopischer Migrationsexperimente die funktionelle Rolle der hIK1-Kanäle für die Migration dieser Zellen zu untersuchen. Dabei konnte ich zeigen, dass die Blockade der IK1-Kanäle sowohl mit Clotrimazol als auch mit

Charybdotoxin zu einer dosisabhängigen Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten führte, während Iberiotoxin, das die Kanäle nicht blockiert, keinen Einfluss auf die Migration hatte. Diese Ergebnisse bestätigten zunächst meine Arbeitshypothese und führten nun zu der Frage, über welchen Mechanismus die IK1-Kanäle in den Migrationsvorgang eingreifen. Untersuchungen an anderen migrierenden Zellen [17,59] weisen bereits darauf hin, dass das Zellvolumen ein mögliches Bindeglied zwischen Ionentransportern und den zytoskelettalen Umbauvorgängen darstellt. Beachtet man dabei, dass die Aktivierung der IK1-Kanäle zu einem K^+ -Ausstrom aus der Zelle und einem osmotisch bedingten Wasserverlust führt so, wird die wichtige Rolle, die diese Kanäle bei der Volumenregulation spielen, deutlich und somit das Zellvolumen als Bindeglied zwischen Ionenkanal und Migration denkbar. Die Ergebnisse der Volumenmessungen zeigten, dass die Blockade der hIK1-Kanäle mit Clotrimazol und Charybdotoxin zu einer signifikanten Zellschwellung führte. Desgleichen konnte ich in ersten Migrationsexperimenten, in denen mittels einer hypotonen Ringerlösung die Volumenzunahme der neutrophilen Granulozyten erzwungen wurden, eine Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit beobachten. Auffallend war hierbei, dass es in hypotoner Ringerlösung zu einer Zunahme des Zellvolumens um ca. 24% kam, während die Inaktivierung der hIK1-Kanäle mit Clotrimazol und Charybdotoxin lediglich zu einer maximalen Zellschwellung von ca. 8% führte. Trotz der signifikant geringeren Volumenzunahme der mit den hIK1-Kanalblockern behandelten neutrophilen Granulozyten zeigten die Migrationsexperimente eine vergleichbare Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit von ca. 80% in hypotoner Ringerlösung und maximal 72,8% mit Charybdotoxin. Dies deutet möglicherweise daraufhin, dass neben der Volumenregulation zusätzliche Mechanismen wie z. B. die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die Migration beeinflussen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse lassen sich in die folgende Vorstellung eines Migrationsmodells einfügen (Abb. 11). Befindet sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ auf einem Ruheniveau, so ist die Aktivität der hIK1-Kanäle gering. Durch die gleichzeitige Aktivität von Na^+/H^+ - und Cl^-/HCO_3^- -Austauschern wie auch dem Na^+/HCO_3^- -Kotransport nimmt das Zellvolumen schrittweise zu. Da diese Transporter vor allem am vorderen Pol migrierender Zellen gefunden werden [23], ermöglichen sie im Zusammenspiel mit einer gelosmotischen Schwellung das Auswachsen des Lamellipodiums [31]. Dieser Vorgang und die ständige Zunahme des

Zellvolumens führen nun durch die Dehnung der Zellmembran zur Öffnung mechanosensitiver Kationen-Kanäle. Ca^{2+} strömt in die Zelle ein und mit der steigenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt es zu einer Aktivierung der hIK1-Kanäle. Die nun einsetzende lokale Schrumpfung am hinteren Zellpol unterstützt ihrerseits zur Zellretraktion nötige zytoskelettale Mechanismen wie die Kontraktion des kortikalen Aktin-Myosin-Netzwerks [13] oder das Lösen von Integrinen von der extrazellulären Matrix. Nach dem Volumenverlust und der nachfolgenden Retraktion des hinteren Zellpols kommt es zu einer Inaktivierung der mechanosensitiven Kationen-Kanäle, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kehrt auf sein Ruhenniveau zurück und ein neuer Zyklus im Migrationsvorgang kann beginnen. Die Blockade der hIK1-Kanäle mit den spezifischen Hemmstoffen Clotrimazol und Charybdotoxin würde demnach durch die Störung der Volumenregulation (die Schrumpfung am hinteren Zellpol kann nicht erfolgen) die Migration hemmen.

An dem eben beschriebenen Migrationsmodell wird deutlich, dass neben der Rolle, die Ionenporter und -kanäle im Migrationsvorgang einnehmen, auch der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase in diesem Zusammenhang grosse Bedeutung zukommt. So führt z. B. die Stimulation von neutrophilen Granulozyten zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und einer nachfolgenden Aktivierung der IK1-Kanäle. Der nun einsetzende K^+ -Ausstrom erzeugt eine Hyperpolarisation des Membranpotentials, die zur Aufrechterhaltung der Zellaktivität notwendig ist [59]. Zudem konnte ich in eigenen Vorarbeiten zeigen, dass die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit fMLP einen kurzfristigen steilen Anstieg und eine nachfolgende Plateauphase der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erzeugte, während die Gabe von Clotrimazol die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf das Kontrollniveau senkte. Folglich ist es denkbar, dass die IK1-Kanäle die Migration nicht nur über eine Regulierung des Zellvolumens, die durch eine Blockade der Kanäle gestört wird, sondern auch über ihren Einfluss auf das Membranpotential und die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase steuern. Ihre Aufgabe ist es, das Membranpotential negativ zu halten und damit die Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom aufrechtzuerhalten.

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Experimente zur Migration von Zellen unterstützen das Modell eines Migrationsvorgangs, in dem Ionenkanäle und -transporter eine wichtige Rolle spielen, jedoch können zusätzliche Mechanismen nicht ausgeschlossen werden. Bei der Interpretation der vorgelegten Ergebnisse müssen vor allem zwei Faktoren, die die Migration von neutrophilen Granulozyten entscheidend beeinflussen können, beachtet werden. Die Ganzzellperfusion ist eine etablierte Methode zur videomikroskopischen Beobachtung von migrierenden Zellen. Die unter

Punkt 2.3.1 beschriebene Vorrichtung und das Anheften der Zellen am Deckglas ermöglichen mehrere Lösungswechsel pro Versuch und bieten so den Vorteil der gepaarten Experimente. Für die hier durchgeführten Migrationsexperimente gilt es zu beachten, dass das gleichmäßige Überströmen der adherierten Zellen mit der Versuchslösung zu einer Chemokinese der neutrophilen Granulozyten führt, da der für die zielgerichtete Migration (Chemotaxis) benötigte Lösungsgradient fehlt und es somit über den Beobachtungszeitraum zu mehreren Richtungswechseln der Zellen kommen kann. Es gibt Hinweise darauf, dass das Zellvolumen chemotaktisch migrierender Granulozyten größer ist als das von chemokinetisch migrierenden Zellen [51]. Ein Einfluss des unterschiedlichen Zellvolumens auf das Migrationsverhalten kann hier also nicht ausgeschlossen werden. Ausserdem spielt das Substrat, auf dem sich die Zellen bewegen, eine Rolle. In vivo migrieren neutrophile Granulozyten in einer dreidimensionalen Matrix, mit der sie über bestimmte Adhäsionsmoleküle, die sog. Integrine, Kontakt aufnehmen [36,39]. Im Vergleich dazu bietet das von mir verwendete mit Polylysin (PLL) beschichtete Deckglas unphysiologische Migrationsbedingungen, da sich die Zellen hier nur in einer Ebene bewegen können und PLL im Gegensatz zu dem ebenfalls verwendeten Fibronectin und Vitronectin, beide als Glykoproteine Bestandteil des gefässumgebenden Stromas, zudem kein in vivo vorkommender Stoff ist. Es ist bekannt, dass die Migration neutrophiler Granulozyten auf PLL-beschichteten Deckgläsern unter Zugabe von glycoproteinhaltigem Serum von Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ abhängig ist, während die Zugabe von Albumin, das die Bindungsstellen an PLL besetzt, auch eine Ca^{2+} -unabhängige Migration ermöglicht [37]. Zudem gilt es zu erwähnen, dass in weiterführenden Untersuchungen [18] die Migrationsgeschwindigkeit neutrophiler Granulozyten auf Fibronectin im Vergleich zu der auf Polylysin deutlich schneller und die Hemmung der Migration durch IK1-Kanalblocker weniger ausgeprägt war. Diese Beobachtungen sind ein Beispiel für die Komplexität des Migrationsmechanismus und machen deutlich, dass die Bedeutung der hIK1-Kanäle für die Migration neutrophiler Granulozyten offensichtlich auch von der Beschaffenheit der extrazellulären Matrix abhängt. Weiterführende Experimente müssten diese Frage nach der Bedeutung der hIK1-Kanäle für die Migration neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Extrazellulärmatrix in systematischen Versuchsreihen untersuchen und klären, ob sich ähnlich wie bei den transformierten Nierenepithelzellen (MDCK-F) eine polarisierte Verteilung der hIK1-Kanäle mit einer maximalen Aktivität am hinteren Zellpol nachweisen liesse. Dies wäre

neben der von mir beobachteten Korrelation zwischen Zellschwellung und Migrationshemmung ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der von mir untersuchten hK1-Kanäle, der Regulation des Zellvolumens und der Migration.

Die Untersuchungen zur Rolle der Ionenkanäle und –transporter in der Zellmigration befinden sich noch in einem frühen Stadium, und es bleiben viele Fragen offen. Da die Migration an zahlreichen physiologischen aber auch pathophysiologischen Prozessen entscheidend beteiligt ist, würde die Aufklärung der Migrationsmechanismen die Möglichkeit zu neuen therapeutischen Ansätzen bieten. So ist es vorstellbar, dass sich mit einer suffizienten Hemmung der Zellwanderung z. B. die von neutrophilen Granulozyten verursachten schweren Gewebeschäden bei chronisch entzündlichen Erkrankungen verringern liessen. Allein aus diesem Beispiel wird ersichtlich, wie wichtig die Erforschung der molekularen Migrationsmechanismen ist, um daraus in Zukunft auch einen Gewinn für den klinischen Bereich zu erzielen.

5. Zusammenfassung

Die Migration von Granulozyten ist wesentlicher Bestandteil einer effizienten Immunantwort. Chemotaktisch stimulierte neutrophile Granulozyten migrieren aus der Blutbahn via Diapedese in das entzündliche Gewebe, um dort eingedrungene Bakterien und andere Pathogene zu phagozytieren. Der Migrationsmechanismus ist ein komplexer Vorgang, bei dem neben den bereits gut erforschten Umbauvorgängen des Zytoskeletts und den Rezirkulationsprozessen an der Zellmembran der Aktivität bestimmter Ionenkanäle eine entscheidende Bedeutung zukommt. Es zeigt sich, dass die Aktivität von Ca^{2+} -empfindlichen K^+ -Kanälen (IK1) für die Migration von Epithelzellen erforderlich ist, da sie zur Modulation des Zytoskeletts und Zellvolumens führt. In der vorgelegten Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob auch die Migration humaner, neutrophiler Granulozyten von der Aktivität der IK1-Kanäle abhängig ist. Dazu wurden neutrophile Granulozyten aus dem Blut gesunder Spender isoliert und ihr Migrationsverhalten nach der Zugabe der IK1-spezifischen Kanalblocker Clotrimazol und Charybdotoxin videomikroskopisch beobachtet.

Da von Epithelzellen bekannt ist, dass die Aktivität der IK1-Kanäle über Änderungen des Zellvolumens deren Migration beeinflusst, sollte zudem mittels Volumenmessungen geprüft werden, ob bei den neutrophilen Granulozyten ein ähnlicher Zusammenhang zwischen IK1-Kanalaktivität und Volumenregulation besteht. Die durchgeführten Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

- Mittels RT-PCR kann gezeigt werden, dass humane neutrophile Granulozyten auf mRNA-Ebene hIK1-Kanäle exprimieren
- Die spezifischen hIK1-Kanalblocker Clotrimazol und Charybdotoxin führen zu einer dosisabhängigen Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit neutrophiler Granulozyten
- Eine Hemmung der hIK1-Kanäle mittels Clotrimazol und Charybdotoxin führt zu einer signifikanten Zellschwellung
- Die mittels Hypotonie erzwungene Zellschwellung führt zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit neutrophiler Granulozyten

Die Ergebnisse zeigen, dass die Migration humaner neutrophiler Granulozyten von der Aktivität der hIK1-Kanäle abhängig ist. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die

Inaktivierung der Kanäle zu einer Zunahme des Zellvolumens führt und somit Zellschwellung und Hemmung der Migration korrelieren.

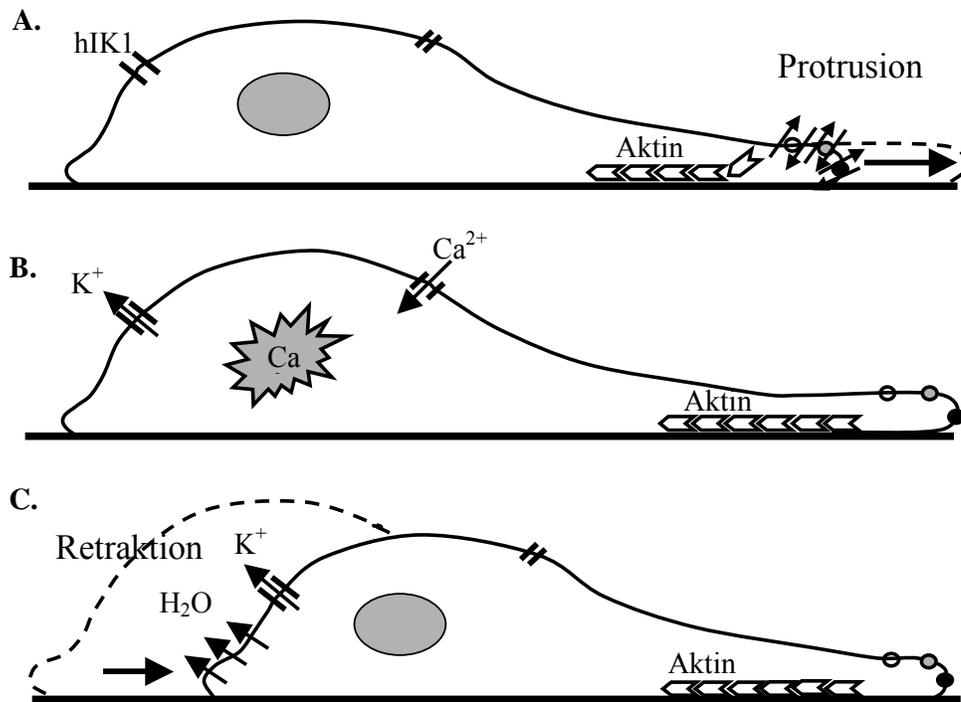


Abb.11 Schematische Darstellung eines Migrationsmodells. Abbildung A zeigt eine adhierte Zelle, an der Vorderkante werden Natrium- und Chloridionen aufgenommen, das osmotisch nachfolgende Wasser führt zur Zellschwellung. Die steigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (B) führt zu einer Aktivierung von hIK1-Kanälen, K^+ strömt aus der Zelle, und das osmotisch nachfolgende Wasser (C) führt zu einer lokalen Schrumpfung am hinteren Zellpol und erleichtert so dessen Retraktion.

6. Literaturverzeichnis

1. Aiyar J. (1998) Potassium channels in leukocytes and toxins that block them. *Perspect Drug Discovery Design* 15/16 :257-80
2. Albrecht E., Petty H. R. (1998) Cellular memory: Neutrophil orientation reverses during temporally decreasing chemoattractant concentrations. *Proc Natl Acad Sci* 95: 5039-5044
3. Baggiolini M., Boulay F., Badwey J. A., Curnutte J. T. (1993) Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J* 7:1004-1010
4. Benzaquen L.R., Brugnara C., Byers H.R., Gattoni-Celli S., Halperin J.A. (1995) Clotrimazole inhibits cell proliferation in vitro and in vivo. *Nat Med* 1:534-540
5. Bretscher M. S., Aguado-Velasco C. (1998) Membrane traffic during cell locomotion. *Cur Opin Cell Biol* 10:537-541
6. Bronner-Fraser M. (1994) Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *FASEB J* 8: 699-706
7. Condeelis J. (1992) Are all pseudopods created equal? *Cell Motil Cytoskeleton* 22: 1-6
8. Condeelis J. (1993) Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* 9: 411-444
9. Davies E.V. and Hallett M.B. (1998) Cytosolic Ca^{2+} signalling in inflammatory neutrophils: implication for rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 1:485-490
10. Dennison W., Loeser R., Turner R., Johnson J., Wells H. B. (1990) A double blind placebo controlled trial of low dose clotrimazole in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 17:1003-7
11. Di Virgilio F., Lew P.D., Andersson T., Pozzan T. (1987) Plasma membrane potential modulates chemotactic peptide-stimulated cytosolic free Ca^{2+} changes in human neutrophils. *J Biol Chem* 262:4574-79
12. Downey G., Grinstein S., Sue-A-Quan A., Czaban B., Chan C.K. (1995) Volume regulation in leukocytes: requirement for an intact cytoskeleton. *J Cell Biol* 163:96-104
13. Eddy R.J., Pierini L., Maxfield F.R. (2000) Ca^{2+} -dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *J Cell Sci* 113:1287-98
14. Egelhoff T. T., Spudich J. A. (1991) Molecular genetics of cell migration: dictyostelium as a model system. *Trends Genet* 7: 161-166
15. Gallin E.K. (1991) Ion Channels in Leukocytes. *Physiol Rev* 71: 775-811

16. Hallows K.R., Packman C., Knauf P. (1991) Acute cell volume changes in anisotonic media affect F-actin content of HL-60 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 261:C1154-C1161
17. Hendriks R., Morest DK, and Kaczmarek LK. (1999) Role in neuronal cell migration for high-threshold potassium currents in the chick hindbrain. *J Neurosci Res* 58:805-814
18. Hinkes B., Römer M., Wulf A., Dreval V., Schwab A. (2002) Migration of neutrophil granulocytes on fibronectin is potassium channel independent. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 443 Suppl: S234
19. Hoffmann E., Dunham P. (1995) Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol* 161:173-247
20. Jaconi M.E., Rivest R., Schlegel W., Wollheim C., Pittet D., Lew D. (1988) Spontaneous and chemoattractant-induced oscillations of cytosolic free calcium in single adherent human neutrophils *J Biol Chem* 263:10557-10560
21. Jensen B.S., Strobaeck D., Christophersen P., Jorgensen T., Hansen C., Olesen S.-P., Ahring P.K. (1998) Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca^{2+} activated K^{+} channel. *Am J Physiol* 275:C848-C856
22. Kirsner R. S., Eaglestein W. H. (1993) The wound healing process. *Dermatol Clin* 11:629-640
23. Klein M., Seeger P., Schuricht B., Schwab A. (2000) Polarization of Na^{+}/H^{+} and Cl/HCO_3 exchangers in migrating renal epithelial cells. *J Gen Physiol* 115:599-607
24. Krause K.-H., Welsh M. (1990) Voltage-dependent an Ca^{2+} -activated ion channels in human neutrophils. *J Clin Invest* 85:491-498
25. Kruskal B.A., Maxfield F. (1987) Cytosolic free calcium increases before and oscillates during frustrated phagocytosis in macrophages. *J Cell Biol* 105:2685-2693
26. Kuhns D., Young H., Gallin E. (1998) Ca^{2+} -dependent production and release of IL-8 in human neutrophils. *J Immunol* 161:4332-4339
27. Kuijpers T., Hoogetwerd M., Roos D. (1992) Neutrophil migration across monolayers of resting or cytokine-activated endothelial cells. *J Immunol* 148:72-77
28. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Völkl H., Waldegger S., Gulbins E., Häussinger D. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78:247-306
29. Lauffenburger D. A., Horwitz A. F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-369

30. Lawson M. A., Maxfield F. R. (1995) Ca^{2+} and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377: 75-79
31. Lee J., Gustafsson M., Magnusson K.-E., Jakobson K. (1990) The direction of membrane lipid flow in locomoting polymorphonuclear leukocytes. *Science* 247:1229-1233
32. Levite M., Cahalon L., Peretz A., Hershkovich R., Sobko A., Ariel A., Desai R., Attali B., and Lider O. (2000) Extracellular K^{+} and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell migration and functional association between Kv1.3 channels and β integrins. *J Exp Med* 191:1167-1176
33. Logsdon N.J., Kang J., Togo J., Aiyar J. (1997) A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 272:32723-32726
34. Loike J.D et al. (1999) Differential regulation of $\beta 1$ integrins by chemoattractants regulates neutrophil migration through fibrin. *J Cell Biol* 144 :1047-1056
35. Laazari K., Proto P., Simons E. (1990) Neutrophil hyperpolarization in response to a chemotactic peptide. *J Biol Chem* 265:10959-10967
36. Mandeville J., Maxfield F. R. (1997) Effects of buffering intracellular free calcium on neutrophil migration through three-dimensional matrices. *J Cell Physiol* 171:168-178
37. Mandeville J., Ghosh R.N., Maxfield F. (1995) Intracellular calcium levels correlate with speed and persistent forward motion in migrating neutrophils. *Biophys J* 68:1207-1217
38. Marks P.W., Maxfield F.R. (1990) Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J Cell Biol* 110:43-52
39. Marks P.W., Hendey B., Maxfield F.R. (1991) Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration. *J Cell Biol* 112:149-158
40. Maxfield F.R. (1993) Regulation of leukocyte locomotion by calcium. *review, Trends in Cell Biol* 3:386-371
41. Menegazzi R., Busetto S., Decleva E. (1999) Triggering of chloride ion efflux from human neutrophils as a novel function of leukocytes $\beta 2$ integrins: relationship with spreading and activation of the respiratory burst. *J Immunol* 162:423-434
42. Miller Ch. (1995) The charybdotoxin family of K^{+} channel-blocking peptides. *Neuron* 15:5-10
43. Mitchison T.J., Cramer L.P. (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84:371-379

44. Nabi I.R. (1999) The polarization of the motile cell. *J Cell Sci* 112:1803-1811
45. O'Rourke N. A., Dailey M. E., Smith S. J., McConell S. K. (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258: 299-302
46. Pettit E.J., Hallett M.B. (1996) Localised and global cytosolic Ca^{2+} changes in neutrophils during engagement of Cd11b/CD18 integrin visualised using confocal laser scanning reconstruction. *J Cell Sci* 109:1689-1694
47. Pettit E.J., Fay F.S. (1998) Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev* 78:949-967
48. Pierini L., Lawson M.A., Eddy R., Maxfield F.R. (2000) Oriented endocytic recycling of $\alpha 5\beta 1$ in motile neutrophils. *Blood* 95:2471-2481
49. Reinhardt J., Golenhofen N., Pongs O., Oberleithner H., Schwab A. (1998) Migrating transformed MDCK cells are able to structurally polarize a voltage-activated K^+ channel. *Proc Natl Acad Sci* 95:5378-5382
50. Ritter M. et al. (1998) Effect of inhibitors of Na^+/H^+ -exchange and gastric H^+/K^+ ATPase on cell volume, intracellular pH and migration of human polymorphonuclear leukocytes. *Br J Pharmacol* 124:627-638
51. Rosengren S., Henson P. M., Worthen G. S. (1994) Migration-associated volume changes in neutrophils facilitate the migratory process in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C1623-C1623
52. Rowan-Kelly B., Ferrante A., Thong Y.H. (1984) Modification of polymorphonuclear leucocyte function by imidazoles. *Int J Immunopharmacol* 6:389-393
53. Schneider S.W., Pagel P., Rotsch Ch., Danker T., Schwab A. (2000) Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic microscopy. *Pflügers Arch* 439:297-303
54. Schwab A., Wojnowski L., Gabriel K., Oberleithner H. (1994) Oscillating activity of a Ca^{2+} -sensitive K^+ channel. *J Clin Invest* 93:1631-1636
55. Schwab A., Gabriel K., Finsterwalder F., Folprecht G., Greger R., Kramer A., Oberleithner H. (1995) Polarized ion transport during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Pflügers Arch* 430:802-807
56. Schwab A., Oberleithner H. (1996) Plasticity of renal epithelial cells: the way a potassium channel supports migration. *Eur J Physiol* 432:87-93
57. Schwab A. (1998) Calcium-sensitive potassium channels of intermediate conductance: A potential therapeutic target? *Ion Channels Modulators* 3:126-130

58. Schwab A., Schuricht B., Seeger P., Reinhardt J., Dartsch P. (1999) Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K⁺ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 438:330-337
59. Schwab A., Reinhardt J., Schneider S.W. (1999) K⁺ channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cell Physiol Biochem* 9:126-132
60. Schwab A. (2001) Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:739-747
61. Schmid-Antomarchi H. et al. (1997) Extracellular ATP and UTP control generation of reactive oxygen intermediates in human macrophages through the opening of a charybdotoxin-sensitive Ca²⁺-dependent K⁺ channel. *J Immunol* 159:6209-6215
62. Simchowicz L. and Cragoe E. J. (1986) Regulation of human neutrophil chemotaxis by intracellular pH. *J Biol Chem* 261:6492-6500
63. Soroceanu L., Manning Jr T.J., Sontheimer H. (1999) Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl and K⁺ ion channel blocker. *J Neurosci* 19:5942-5954
64. Varnai P., Demarex N., Jaconi M., Schlegel W., Krause K.H. (1993) Highly cooperative Ca²⁺ activation of intermediate-conductance K⁺ channels in granulocytes from a human cell line. *J Physiol* 472:373-390
65. Zigmond S.H. (1977) Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* 75:606-616