

Aus der
Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

Radiogene Plasmamembran-Transporte in Tumorzellen

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

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

**vorgelegt von
Misovic, Milan
2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber
2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Ullrich

Tag der Disputation: 21.07.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Strahlentherapie | 1 |
| 1.2 Onkogene Transporte | 4 |
| 1.2.1 Regulation der Zellproliferation durch K ⁺ -Kanäle | 5 |
| 1.2.2 Regulation der Zellmigration durch Ionentransport | 7 |
| 1.3 Die Patch-Clamp-Technik | 9 |
| 1.3.1 Invertierender Operationsverstärker | 10 |
| 1.3.2 Patch-Clamp-Ableitmodi | 11 |
| 1.3.3 Patch-Clamp-Datenanalyse | 15 |
| 1.4 Ziele | 18 |
| 2 Material und Methoden | 19 |
| 2.1 Zellkultur | 19 |
| 2.2 Bestrahlung der Zellen | 20 |
| 2.3 Patch-Clamp-Ableitungen | 21 |
| 2.3.1 Membranpotential-Ableitungen in der Stromklemme | 25 |
| 2.3.2 Ganzzell-Stromableitungen in der Spannungsklemme | 26 |
| 2.3.3 On Cell- (Cell-attached)-Ableitungen in der Spannungsklemme | 31 |
| 2.4 Statistik | 32 |
| 3 Ergebnisse | 33 |
| 3.1 Ionen-Kanäle in der DNA-Schadensantwort von Leukämiezellen | 33 |
| 3.1.1 Chronisch Myeloische Leukämie (CML) | 33 |
| 3.1.2 Radiogene Ca ²⁺ -Ströme in der Plasmamembran von CML-Zellen..... | 34 |
| 3.1.3 K _v -Ströme in der Plasmamembran von bestrahlten CML-Zellen | 38 |
| 3.1.4 hERG-Ströme in der Plasmamembran von bestrahlten CML-Zellen..... | 42 |
| 3.1.5 T-Zell Leukämie | 45 |
| 3.1.6 Funktionelle Expression von TRPM2 in T-ALL-Zellen | 47 |
| 3.1.8 Radiogene K ⁺ -Kanäle in T-ALL-Zellen..... | 53 |
| 3.2 Radiogene Glukoseaufnahme in Karzinomzellen | 55 |

| | |
|---|-------------------------------------|
| 3.2.1 SGLT-Ko-Transporter in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzellen | 55 |
| 3.2.2 Radiogene Depolarisation des Membranpotentials von A549-Lungenadenokarzinomzellen | 56 |
| 3.2.3 Radiogene SGLT-vermittelte Depolarisation des Membranpotentials von FaDu-Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen | 60 |
| 3.3 Strahleninduzierte Aktivierung von Ionekanälen im Glioblastom..... | 62 |
| 3.3.1 Migration von Glioblastomzellen | 62 |
| 3.3.2 Strahleninduzierte Aktivierung von IK_{Ca} - und BK_{Ca} -Kanälen in Glioblastomzellen..... | 63 |
| 3.3.3 Radiogene BK_{Ca} -abhängige Aktivierung von Cl^- -Kanälen in Glioblastomzellen..... | 67 |
| 4 Diskussion | 70 |
| 4.1 Biologische Strahlenwirkung | 70 |
| 4.2 Hypoxie-Anpassung und Radioresistenz | 71 |
| 4.3 Radiogene Ca^{2+} -vermittelte $O_2^{\cdot-}$ -Bildung der Mitochondrien | 72 |
| 4.4 Ca^{2+} -vermittelter Zellzyklusarrest | 73 |
| 4.5 BK_{Ca} -vermittelte radiogene Hypermigration/-invasion von Glioblastomzellen | 77 |
| 4.6 Strahleninduziertes Glukose-„Tanken“ | 82 |
| 4.7 Schlussfolgerung und Ausblick | 84 |
| 5 Zusammenfassung..... | 86 |
| 6 Literaturverzeichnis | 88 |
| 7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift | 101 |
| 8 Anhang..... | 102 |
| 8.1 Verzeichnis der Materialien | 102 |
| 8.2 Verzeichnis der Abbildungen..... | 107 |
| 9 Danksagung..... | Error! Bookmark not defined. |
| 10 Lebenslauf | Error! Bookmark not defined. |

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

- a: Aktivität
Abb: Abbildung
ABL-1: v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ACA: n-(p-Amylcinnamyl)-Anthranilsäure
ADPR: Adenosindiphosphat-Ribose
ATP: Adenosintriphosphat
BAPTA-AM: Azetoxymethylester, N,N'-[1,2-Ethanediylobis(Oxy-2,1-Phenylen)]bis[N-[2-[(Azetyloxy)Methoxy]-2-Oxoäthyl]-1,1'-bis[(Azetyloxy)Methyl] Ester-Glyzin
Bcl-2: B-cell lymphoma 2-Protein
BCR: breakpoint cluster region protein
BDS-II: Blood depressing substance-II
BK_{Ca}: Hoch leitender Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanal
Ca²⁺: Kalziumionen
CaM: Ca²⁺/Calmodulin
CaMKII: Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase-II
Cdc: cell division cycle protein
Cdk: cyclin-dependent kinase
Chk-1: Checkpoint Kinase-1
Cl: Chloridionen
CO₂: Kohlendioxid
C_{slow}: Membrankapazität
CML: Chronisch Myeloische Leukämie
ΔΨ_m: innermitochondrialen Membranpotential
DMSO: Dimethylsulfoxid
DNA: Desoxyribonukleinsäure
DSB: DNA-Doppelstrangbruch
E: Elektrochemisches Gleichgewichtspotential
EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGTA: Ethylenglycol-bis(-Aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure
F: Faradaykonstante/Farad
FBS, FCS: fötales Rinderserum
G: Leitfähigkeit
G₀-, G₁-, G₂-Phase: Gap₀-, Gap₁-, Gap₂-Phase des Zellzyklus
Gy: Gray
HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethanesulfonsäure
HIF-1α: Hypoxia-inducible factor-1α
HNSCC: Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zellen
I: Strom
i.e.: it est
IK_{Ca}: Intermediär leitender Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanal
I_{sc}: Kurzschlussstrom
IMRT: Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
K⁺: Kaliumionen
K_v-Kanäle: spannungsaktivierte K⁺-Kanäle
M: Mitose
Na⁺: Natriumionen
Na_v-Kanäle: spannungsaktivierte Na⁺-Kanäle
NMDG⁺: N-Methyl-D-Glukamin⁺
NPPB: 5-Nitro-2-[(3-Phenylpropyl)amino]Benzoessäure
NSC: nichselektiv kationenselektiv
NSCLC: Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom-Zellen
PARP: Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
Pyk-2: Proline-rich tyrosine kinase-2
R: Widerstand/ allgemeine Gaskonstante
ROS: reaktive Sauerstoff-Spezies
RNA: Ribonukleinsäure
S-Phase: Synthese-Phase des Zellzyklus
SGLT: sodium glucose cotransporter
S: Überlebensfraktion/Siemens
SDF1: Stromal cell derived factor-1
SGLT: Sodium glucose transporter
siRNA: small interfering RNA
SZT: Stammzelltransplantation
T: Absolute Temperatur
T-ALL: T-Zell Akute Lymphatische Leukämie
TBI: Total-Body Irradiation
TKI: Tyrosin Kinase-Inhibitor
TRAM-34: 1-[(2-Chlorophenyl)Diphenylmethyl]-1H-Pyrazol
TRPM2: Melastatin-Familien-Mitglied-2 der transient receptor potential-Superfamilie von nichtselektiven Kationenkanälen
Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u: Mobilität
U: Spannung
V_{1/2-act}: halbmaximalen Aktivierungsspannung
V_{rev}: Umkehrpotential
z: Valenz

1 Einleitung

1.1 Strahlentherapie

Etwa die Hälfte aller Tumorpatienten erhält Strahlentherapie, die als definitive (alleinige) Therapie oder (neo)adjuvant zu anderen Therapiemodalitäten in kurativen oder palliativen Konzepten appliziert wird. Die Strahlentherapie verwendet dabei ionisierende Strahlung, die in der Brachytherapie über radioaktive Strahlenquellen bereitgestellt wird. Diese Strahlenquellen werden hierbei entweder im Afterloading über Katheder wiederholt kurzzeitig oberflächlich, in Körperhöhlen oder im Gewebe platziert oder in Form von Seeds in die Tumoren dauerhaft implantiert. Bei der perkutanen Bestrahlung werden ionisierende Elektronen- oder Photonen-Strahlen von einem Linearbeschleuniger erzeugt. Mit Elektronen können Zielvolumina auf der Körperoberfläche bestrahlt werden. Bei den allermeisten Indikationen erfolgt die perkutane Bestrahlung mit Photonen (6-15 MV), wenige Zentren können bei speziellen Indikationen Bestrahlung mit in einem Zyklotron generierten Protonen anbieten. Schwerionen-Bestrahlung (Partikeltherapie) wird derzeit nur an zwei Zentren in Deutschland, in Marburg und Heidelberg, durchgeführt (Joiner and Kogel, 2009, Wannemacher et al., 2013).

Die auf Bildgebung basierte Bestrahlungsplanung definiert Zielvolumina, die möglichst die zur Tumoreradikation nötige Strahlendosis im Tumor deponiert und dabei gleichzeitig das angrenzende Normalgewebes, insbesondere die angrenzenden Hochrisikoorgane, bestmöglich schont. Moderne Bestrahlungstechniken wie die Intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) erleichtern dabei komplexe Zielvolumen abzubilden und steilere Dosisabfälle zum Normalgewebe hin zu erreichen. Bei der IMRT wird aus mehreren Raumrichtungen mit veränderten Feld-Geometrien abgestrahlt. Letztere werden über die Multi-Lammellen-Blei-Kollimatoren im Beschleunigerkopf eingestellt (Joiner and Kogel, 2009, Wannemacher et al., 2013).

Neben der geometrischen Begrenzung der Zielvolumina wird bei der Bestrahlung eine Schonung des Normalgewebes durch die Fraktionierung der Strahlentherapie erreicht. Die Grundlagen dieses Phänomens werden über die 5 *R*'s - Reparatur, Radioresistenz, Redistribution, Reoxygenierung und Repopulierung - der Strahlenbiologie beschrieben. Die 5 *R*'s der Strahlentherapie umschreiben Parameter (im klassischen Sinn nur für Tumorzellen), die zur Ausarbeitung von Strahlendosis-Fraktionierungs-Regimes benötigt werden, welche effektiv Tumorzellen eradizieren und gleichzeitig das Normalgewebe maximal schonen. Dies wird erreicht, indem die fraktionierte Radiotherapie mehrere subletale Dosis-Fraktionen appliziert (zum Beispiel 60 Gy in 30 Fraktionen über 6 Wochen bei der Standard-Radiotherapie des Glioblastoms), die in Tumorzellen, nicht aber im Normalgewebe zu einer letalen Gesamtdosis akkumulieren. Dies beruht auf den Unterschieden von Tumorzellen und Normalgewebe in der intrinsischen Radioresistenz, in der Kapazität und Geschwindigkeit der DNA-Schadensreparatur und/oder in der strahleninduzierten Redistribution in einen vulnerableren Zellzyklus zwischen zwei Fraktionen. Darüber hinaus bewirkt fraktionierte Bestrahlung eine bessere Oxygenierung des Tumors und damit eine Verbesserung der Effizienz der Strahlentherapie (dies ist in Kapitel 4.1 näher beschrieben). Letztendlich wird die Dauer der fraktionierten Strahlentherapie so gewählt, dass eine mögliche akzelerierte Repopulierung des früh-antwortenden Normalgewebes strahleninduziert wird (Verringerung der Toxizität) und/oder die Therapie beendet wird, bevor eine akzelerierte Repopulierung des Tumors auftritt (welche die Wahrscheinlichkeit der lokalen Kontrolle erniedrigt). Wegen ihrer DNA-Schadensantwort sterben Zellen mit zunehmender Strahlendosis nicht monoexponentiell abfallend. Stattdessen folgt die Überlebensfraktion (*S*) und die Strahlendosis (*D*) der linearquadratischen Funktion $S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ mit den Normalgewebe-/Tumorentitäts-spezifischen Parametern α und β . Das α/β -Ratio (Einheit Gy) wird dabei verwendet, um die Sensitivität gegenüber Fraktionierung für Normalgewebe und Tumor vorherzusagen und so effektive und sichere Hypo-, Hyper- oder Normo-Fraktionierungspläne zu entwickeln. Neben der fraktionierten

Strahlentherapie werden auch letale Einzeldosen bei der stereotaktischen Radiochirurgie appliziert (Joiner and Kogel, 2009, Wannemacher et al., 2013).

Ionisierende Strahlung schädigt die DNA. DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) stellen dabei die gefährlichsten Schäden für bestrahlte, proliferierende Zellen dar. Durchlaufen Zellen mit unreparierten DNA-DSBs die Mitose, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, Chromosomen-Aberrationen auszubilden, die letztendlich zu mitotischer Katastrophe und Zelltod führen können (Toulany, 2019). Bestrahlung von normoxischem Gewebe mit MV Photonen verursacht im Schnitt 20 nukleäre DNA-DSBs pro 1 Gy (= 1 J/kg Gewebe) Energie-Deposition (Matsuya et al., 2014). DNA-DSBs lösen in der Zelle die DNA-Schadensantwort aus, die die Aktivierung der DNA-Reparatur-Maschinerie und die gleichzeitige Verzögerung des Zellzyklus mit einschließen. Mehr oder weniger stringente DNA-Schadens-Kontrollpunkte in der G₁-, S- und G₂-Phase des Zellzyklus arretieren den Zellzyklus in der G₁-Phase und am G₂/M-Übergang oder verzögern das Fortschreiten des S-Phase (Chao et al., 2017), um den Zellzyklus solange aufzuhalten bis die DNA-Reparatur abgeschlossen ist. Darüber hinaus wird am Dekatenations-, Spindel-Assemblierungs- und post-mitotischen Tetraploidie-Kontrollpunkt in der späten G₂-, (Pro)Meta- bzw. G₁-Phase die Chromosomenintegrität überwacht (Brown and Geiger, 2018). Konzeptuell versucht die Radiotherapie Tumorzellen zu eradizieren, indem sie DNA-DSBs in einer Anzahl erzeugt, die von der bestrahlten Zelle nicht mehr durch Nichthomologes Endjoining in der G₁-Phase und zusätzlich durch homologe Rekombination in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus repariert werden kann (Valerie and Povirk, 2003). Die Kapazität der DNA-Reparatur unterscheidet sich dabei zwischen den Tumorentitäten, zwischen individuellen Tumoren einer Entität und zwischen Subpopulationen des heterogenen Tumors. Dabei spielen neben intrinsischen zellulären Eigenschaften auch Faktoren der Tumor-Mikroumgebung eine Rolle. Eine zentrale Funktion hat bei Letzteren die oben schon erwähnte Tumorphoxie (siehe auch Kapitel 4.1).

1.2 Onkogene Transporte

Transporte über die Plasmamembran durch Pumpen, Transporter und Ionenkanäle schaffen und nutzen chemische und elektrische Gradienten zur pH-Homöostase, Substratversorgung und Katabolitentsorgung einer jeden Zelle. Zudem kontrollieren sie das Zellvolumen und sind deswegen übergeordnete Regulatoren von Zellproliferation, Zellmigration und Zelltod. Ionenkanäle erzeugen in erregbaren Zellen elektrische Signale. Sie steuern aber als integrale Module auch biochemische Signaltransduktionsketten, indem sie zum Beispiel in Proteinkomplexen mit Membranrezeptoren und nachgeschalteten Effektor-Proteinen physisch interagieren oder Ca^{2+} -Signale und Ca^{2+} -Effektorproteine regulieren (Arcangeli, 2005, Huber, 2013, Kunzelmann, 2005, Prevarskaya et al., 2007, Pardo and Stuhmer, 2014).

Seit mehreren Jahrzehnten summieren sich Beobachtungen einer stark veränderten Expression von Ionenkanälen und Transportern in Tumorzellen im Vergleich zu den nicht neoplastisch transformierten parentalen Zellen (Nilius and Wohlrab, 1992). Präklinische *in vitro*-Studien und Tumor-Tiermodelle konnten inzwischen nachweisen, dass diese Ionenkanäle/Transporter zu neoplastischer Transformation, Apoptose-Resistenz, Tumorwachstum, Reprogrammierung des Metabolismus und Hypoxie-Resistenz, Immunsuppression, Gewebeeinfiltration, Metastasierung, Induktion und Beibehaltung eines Tumor-Stammzellphänotyps oder Therapie-Resistenz beitragen und dabei sogar Schlüsselfunktionen in nahezu allen Bereichen der Tumorbilogie ausüben (Arcangeli, 2005, Huber, 2013, Kunzelmann, 2005, Prevarskaya et al., 2007, Pardo and Stuhmer, 2014). Einige Ionenkanäle/Transporter-Typen sind in mehreren Tumorentitäten stark über-exprimiert wie etwa die K^+ -selektiven Kanäle hK_{Ca} (K_{Ca}3.1, SK4, Gardos, *kcnh4*) (Mohr et al., 2019b), hERG1 (K_v11.1, *kcnh2*) (Arcangeli, 2005) oder hEAG1 (K_v10.1, *kcnh1*) (Pardo and Stuhmer, 2008) und scheinen eine besonders hohes „onkogenes“ Potential zu haben. Alleinige Transfektion nicht neoplastisch

transformierter Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen mit hEAG-Kanälen steigert zum Beispiel deren tumorigenes Potential (i.e. die Fähigkeit Tumoren zu bilden nach *Xenotransplantation* auf immunokompromittierte Mäuse), während eine Überexpression eines anderen K_v -Kanal-Typs dies nicht vermag (Pardo et al., 1999). Diese Einleitung möchte an zwei Beispielen - der Zellproliferation und Zellmigration - erläutern, wie Ionenkanäle/Transporter mechanistisch die Tumorbiologie steuern.

1.2.1 Regulation der Zellproliferation durch K^+ -Kanäle

Die Zellproliferation benötigt oszillierende Änderungen des Membranpotentials und des Zellvolumens, die unter anderem von den K^+ -Kanalaktivitäten in der Plasmamembran reguliert werden (Wonderlin and Strobl, 1996). Die Aktivität von K^+ -Kanaltypen, welche in einem sehr negativen Spannungsbereich operieren, „klemmen“ das Membranpotential nahe dem elektrochemischen K^+ Gleichgewichtspotential (E_K , siehe 1.3.3) auf hohe negative Potentiale. Es wird vermutet, dass diese Hyperpolarisation des Membranpotentials dazu beiträgt, terminal differenzierte Zellen in der G_0 -Phase des Zellzyklus zu arretieren. Dagegen scheint eine Depolarisation des Membranpotentials die Zellproliferation zu fördern. Schnell proliferierende Zellen oszillieren ihr Membranpotential tendenziell in einem mehr depolarisierte Spannungsbereich und benötigen dazu die Aktivitäten von K^+ -Kanälen, welche in diesen Spannungsbereichen operieren. Hierzu können Tumorzellen K^+ -Kanäle zweckentfremden, indem sie zum Beispiel in nicht transformten erregbaren Zellen zur Repolarisation des Aktionspotentials beitragen. (Arcangeli et al., 1995).

K^+ -Kanäle steuern über das Membranpotentials in sehr komplexer Weise den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. So beenden zum Beispiel depolarisationsaktivierte K_v K^+ -Kanäle oder Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle den Ca^{2+} -Einstrom über

spannungsaktivierte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, halten aber den Einstrom über speicherregulierte Ca^{2+} -Kanäle aufrecht. Das zeitliche Zusammenspiel von Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, Einstrom von Ca^{2+} über K^+ -Kanal-feinregulierte Ca^{2+} -permeable Kanäle mit Ca^{2+} -ATPasen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiportern führt zu komplexen lokalen Ca^{2+} -Signalen im Zytosol, die von anhaltenden Anstieg/Abfall bis zur Oszillation mit unterschiedlicher Amplitude und Frequenz der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reichen (Berridge et al., 2000).

Nachgeschaltet dieser K^+ -Kanal-regulierten Ca^{2+} -Signale werden Ca^{2+} -Effektorproteine angesteuert. Dies soll an einem Beispiel näher erläutert werden: Vier Gene kodieren die Isoformen (α - δ) und deren multiplen Spleißvarianten der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase-II (CaMKIIs). Durch alternatives Spleißen der CaMKII wird zum einen die frequenzabhängige Aktivierung durch Ca^{2+} -Oszillationen moduliert, zum anderen die Translokation zum Zellkern gesteuert (Bayer and Schulman, 2001, Bayer et al., 2002). Aktivierung der CaMKIIs durch Ca^{2+} -Calmodulin führt zu deren Autophosphorylierung. Die Aktivität der Phospho-CaMKII ist nun Ca^{2+} -Calmodulin-unabhängig und kann durch limitierte Proteolyse noch weiter gesteigert werden (Bayer and Schulman, 2001). Die differentielle Aktivierung der einzelnen CaMKII-Isoformen/Spleißvarianten bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Signalen deutet auf eine Regulation verschiedener zellulärer Prozesse durch die CaMKIIs hin. Tatsächlich steuern die CaMKII-Kinasen viele verschiedenen Prozesse einschließlich den Aufbau des Spindelapparates (Holmfeldt et al., 2005, Matsumoto and Maller, 2002), den Eintritt in den Zellzyklus ($G_0(G_1)/S$ -Übergang (Morris et al., 1998, Roderick and Cook, 2008), den G_2/M -Übergang (Patel et al., 1999), den Metaphase/Anaphase-Übergang (Petzelt et al., 2001), den M-Phasen-Exit (D'Angiolella et al., 2007) und den Abbau von p53 (Duan et al., 2007, Duan et al., 2004, Duan et al., 2006, Leng et al., 2003). So können die Elektrosignale der K^+ -Kanäle über die Ca^{2+} /CaM/CaMKIIs-Achse den Zellzyklus modulieren. Neben der Zellzykluskontrolle sind auch die Mechanismen, mit denen Membrantransporte

die Migration von Zellen regulieren, relativ gut verstanden. Diese werden im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

1.2.2 Regulation der Zellmigration durch Ionentransport

Migrierende Zellen sind entlang ihrer Bewegungsachse in Lamellipodium (Invadopodium) und Zell-„Heck“ polarisiert. Die Zellpolarität und die Lamellipodien entwickeln sich durch Cdc-42- und Rho-GTPasen-vermitteltes Ausbilden von Stress-Fibrillen und fokaler Adhäsionen (Teodorczyk and Martin-Villalba, 2010). Die gerichtete Bewegung wird dabei über Protonen- und Ca^{2+} -Gradienten gesteuert. Die zytosolische freie Ca^{2+} - und Protonenkonzentrationen nehmen vom Lamellipodium zum „Zellheck“ hin zu, während die Protonenkonzentration in der extrazellulären Nanoumgebung der Glykokalyx zum Lamellipodium hin zunimmt. Die Konzentrationsgradienten werden vermutlich durch Milchsäurevergärung im mitochondrienfreien Lamellipodien und dortiger Säureausscheidung durch Na^+/H^+ -Austauscher und Monocarboxylat-Transporter sowie Ca^{2+} - Aufnahme durch säuresensitive Kationenkanäle am „Heck“ aufgebaut (Stock and Schwab, 2009).

Eine gerichtete Bewegung entsteht, indem das Lamellipodium in Bewegungsrichtung hervorquillt während das Zellheck zurückgezogen wird. Das heißt, dass über die Zeit eine Nettozunahme des vorderen und eine Nettoabnahme des hinteren Polvolumens stattfindet, wodurch die Protrusion des Lamellipodiums und die Retraktion des Zellhecks betrieben wird. Diese gegenläufige Größenänderung des vorderen und hinteren Zellpols bedarf des Ausbildens und Lösens fokaler Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionen, die Umorganisation des Zytoskeletts, Aktin-Myosin-Kontraktilität sowie das Verschieben von Ionen und Wasser zwischen Extrazellulärraum und Zytosol. Die konzertierte Aktivität von

Na⁺/H⁺-Austauschern, Anionenaustauschern, Na⁺/K⁺/Cl⁻-Kotransporter und Aquaporinen bedingt dabei die lokale zelluläre Nettoaufnahme von NaCl und Wasser, das Zusammenspiel von K⁺-, Cl⁻-Kanälen, KCl-Kotransporter und Aquaporinen bedingt die lokale Nettoabgabe von KCl und Wasser. Die Hemmung der Transportprozesse am Zellheck oder Lamellipodium stoppt, zusätzliche Aktivierung beschleunigt die Migration (Schwab et al., 2007).

Unter den „Spitzenreitern“ der Zellmigration und Gewebeeinfiltration befinden sich die Zellen des Glioblastoms, einem primären Gehirntumor. Migrierende Glioblastomzellen zwingen sich durch kleinste Zellzwischenräume. Dazu müssen die Zellen zusätzlich zu der oben beschriebenen Protrusion und Retraktion von Lamellipodium bzw. Zellheck ständig lokale Zellvolumenänderungen durchführen. Zellfortsätze müssen sich verschlanken, um in Räume von wenigen µm Durchmesser eindringen zu können (Watkins and Sontheimer, 2011). Angetrieben wird die lokale Zellvolumenabnahme durch eine hohe Cl⁻-Konzentration (100 mM) (Habela et al., 2009), die analog dem Aufladen einer Batterie weit über das elektrochemische Cl⁻-Gleichgewichtspotential im Zytosol durch den Na⁺/K⁺/Cl⁻-Chlorid-Kotransporter aufgebaut wird (Sontheimer, 2008). Diese Cl⁻-Batterie ist die elektrochemische Triebkraft für die lokale Volumenabnahme durch den Efflux von Cl⁻, das als Osmolyt verwendet wird, dem Gegen-Ion K⁺ sowie dem isoosmotischen Nachfolgen von Wasser durch die Aquaporine (McCoy and Sontheimer, 2007). Der K⁺- und Cl⁻-Efflux erfolgt durch KCl-Kotransport (McCoy and Sontheimer, 2007, McCoy et al., 2010) oder über Ca²⁺-aktivierte K⁺- und volumenregulatorische Cl⁻-Kanäle (McFerrin and Sontheimer, 2006, Olsen et al., 2003, Ransom et al., 2001, Sontheimer, 2008).

Die Signifikanz dieser Prozesse für die Tumorbilogie lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass in orthotopen Tumor-Mausmodellen durch „Targeting“ von Ionenkanälen/Transportern zum Beispiel die Gehirninfiltration von Glioblastomzellen (Edalat et al., 2016) oder das Wachstum des Mammakarzinoms

(Steudel et al., 2017) gehemmt werden kann. Um den Beitrag von Membrantransporten zu zell- und tumorbiologischen Prozessen zu charakterisieren, müssen physiologische Methoden angewendet werden. Der nächste Abschnitt beschreibt eine dieser Methoden, mit der unter anderem die Aktivität einzelner Membranproteine analysiert werden kann.

1.3 Die Patch-Clamp-Technik

Elektrogene Transporte über Membranen durch Ionenkanäle und zum Beispiel Na^+ -Symporter lassen sich elektrophysiologisch beschreiben. Dabei gilt nach dem Ohmschen Gesetz die folgende Abhängigkeit der Leitfähigkeit (G) (i.e. $1/R$, also der Kehrwert des Widerstandes)- als Summe aller elektrogenen Transportprozesse in der untersuchten Membran- von der Membranspannung (U) und dem Transmembranstrom (I): $G = I/U$. Werden Spannung über oder Strom durch die Plasmamembran mit einer intrazellulär eingestochenen Elektrode im sogenannten „Open Circuit“-Modus gegen eine extrazelluläre Referenzelektrode abgeleitet, bewirkt der Stromfluss eine Änderung der Spannung und umgekehrt, so dass keine verlässlichen Aussagen über die Leitfähigkeit, also über die Aktivität elektrogenen Transportprozesse gemacht werden können. Dies geht nur, wenn die Spannung in der sogenannten Spannungsklemme „geklemmt“, also experimentell konstant gehalten wird und der Strom gemessen - oder alternativ - in der Stromklemme der Strom geklemmt und die Spannung abgeleitet wird. Mit zwei Elektrodenpaaren lässt sich eine solche Spannungsklemme verwirklichen. Eine intrazellulär platzierte Elektrode misst die Spannung gegen eine extrazelluläre Referenzelektrode. Eine zweite intrazellulär platzierte Elektrode injiziert variablen Strom in die Zelle. Dieser sogenannte Kurzschluss-Strom (Englisch Short Circuit Current, I_{sc}) wird jetzt so moduliert, dass die Spannung immer auf einem konstanten Wert gehalten wird, also geklemmt wird. In diesem „Two-Electrode Voltage-Clamp“-Modus entspricht der Betrag des injizierten Stroms I_{sc} dem des

biologischen Stroms über die abgeleitete Plasmamembran. Two-Electrode Voltage-Clamp lässt sich an Riesenzellen wie den *Xenopus laevis*-Oozyten - einem häufig verwendeten heterologen Expressionssystem - nicht aber an normal großen Zellen wie Tumorzellen durchführen.

1.3.1 Invertierender Operationsverstärker

Die Patch-Clamp-Technik (Neher and Sakmann, 1976), für deren Entwicklung Bernd Sakmann und Erwin Neher 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet wurden

(<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1991/summary/>), kann dagegen auch an kleineren Zellen oder Organellen wie Mitoplasten mit nur einem Elektroden-Paar die Spannung bzw. den Strom klemmen. Die Patch-Clamp-Elektrode verwendet dabei aus Glaskapillaren gezogene Ableitpipetten, deren Spitze (Innendurchmesser im Bereich von 1 μm) nicht in die Zelle eingestochen sondern auf die Plasmamembran aufgesetzt wird. Durch Applikation von Unterdruck auf die Elektrolyt-Lösung im Pipettenlumen wird die Plasmamembran ein Stück weit in die Pipettenspitze eingesaugt, wobei durch noch nicht verstandenen Mechanismen ein hoher Abdichtungswiderstand im Bereich von 10-100 $\text{G}\Omega$ zwischen Pipettenlösung und der Bad-Elektrolytlösung, welche die Zellen überströmt, mit einer gewissen Eintrittswahrscheinlichkeit entstehen kann. Dieses „Sealen“ (Versiegeln) der Pipettenöffnung durch die eingesaugte Plasmamembran wird „Gigaohm Seal-Formation“ genannt und ist Voraussetzung, um Ströme bis in Bereiche hinab zu wenigen pA ableiten zu können (Neher and Sakmann, 1992, Hille, 2001).

Die zumindest einige mM Cl^- -enthaltende Pipettenlösung ist über einen Ag/AgCl-Elektroden Draht leitend mit dem Patch-Clamp-Verstärker verbunden, der gegen eine geerdete Ag/AgCl-Referenzelektrode Spannung und Strom klemmt und ableitet. Die Referenzelektrode wird zumeist nicht direkt in die Badlösung platziert,

sondern über eine mit NaCl- oder KCl-Lösung gefüllte Salz- oder Agar-Brücke mit dieser leitend verbunden. Dies erlaubt auch die Superfusion von Cl⁻-freien Badlösungen, ohne dass die Wegdiffusion von Cl⁻ von der AgCl-Elektrodenoberfläche Offset-Potentiale verursacht. Die Spannungsklemme wird über einen invertierenden Operationsverstärker realisiert. Dazu ist die Ableitelektrode auf den einen und die (gegen die geerdete Referenzelektrode aufgebaute) Klemmspannung auf den anderen Eingang des Operationsverstärkers verschaltet (Abb. 1.1). Ein Potentialunterschied ΔV zwischen den beiden Eingängen wird in ein verstärktes Spannungssignal am Ausgang des Operationsverstärkers transformiert. Die Ausgangsspannung injiziert über einen invertierenden „Rückkopplungs“-Widerstand Strom auf die Ableitelektrode und gleicht so die Spannung der Ableitelektrode innerhalb von wenigen μs an die eingestellte Klemmspannung am anderen Eingang des Operationsverstärkers an. Mit dieser Messweise wird also gleichzeitig die Spannung geklemmt und der Stromfluss abgeleitet. Letzterer führt zu einer kurzzeitigen Verringerung der Spannung an der Ableitelektrode und somit zu einer Potentialdifferenz zwischen den beiden Operationsverstärker-Eingängen und einer Erhöhung der verstärkten Ausgangsspannung. Durch diese Erhöhung der Ausgangsspannung wird wiederum über den „Rückkopplungs“-Widerstand mehr Strom in die Ableitelektrode injiziert und die Ableitelektrodenspannung der eingestellten Klemmspannung nachgeführt. Gleichzeitig werden vom Verstärker die Ausgangsspannungsänderungen in Stromänderungen übersetzt, die dann in einem Oszilloskop visualisiert werden können (Abb. 1.1.).

1.3.2 Patch-Clamp-Ableitmodi

Im „On Cell-“ oder „Cell-attached“-Modus werden mit einer der intakten Zelle aufgesetzten Pipette in der Spannungsklemme die Ströme der aufgesaugten und

der durch den Seal-Ring von der restlichen Plasmamembran elektrisch isolierten Membran-Fläche („Patch“) abgeleitet. Hier ist der Eingangswiderstand so groß, dass Einzelkanal-Ereignisse aufgelöst werden können. Der Vorteil dieser Ableitkonfiguration ist die Intaktheit der Zelle, der Nachteil, dass die Spannung über die aufgesaugte Membran nicht definiert ist, da sich zu der Klemmspannung das nicht bekannte natürliche Membranpotential addiert.

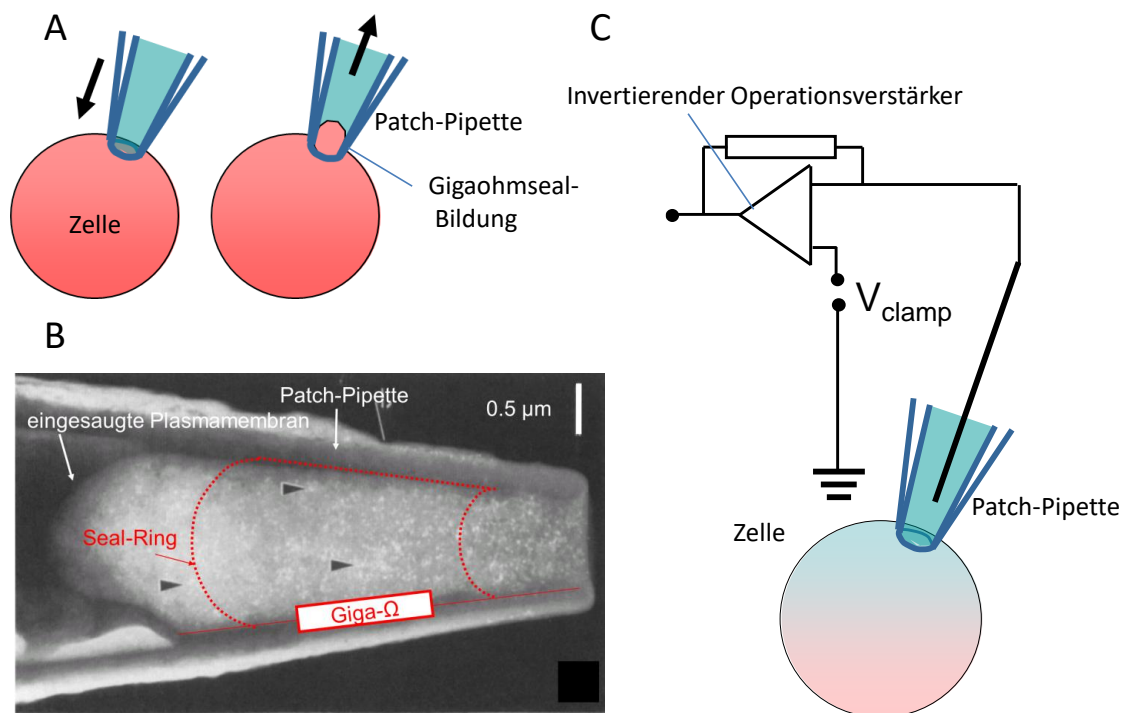


Abb. 1.1. Die Patch-Clamp-Technik. **A.** Das Ansaugen der Plasmamembran in die Spitze der Ableitpipette erzeugt mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit Abdichtungs-Widerstände zwischen Pipetten und Badlösung im Bereich mehrerer $G\Omega$ ($G\Omega$ -Seal). **B.** Transmissionselektronenmikroskopisches Bild einer Pipettenspitze mit „gesealter“ Plasmamembran (aus (Ruknudin et al., 1991), verändert). **C.** Der Schaltkreis zeigt, wie mittels invertierenden Operationsverstärkers gleichzeitig die Membranspannung geklemmt und der Membranstrom abgeleitet wird (V_{clamp} : Klemmspannung; nach (Huber et al., 2005), verändert)

Zudem fällt die Klemmspannung über zwei Membranen ab, so dass mit zunehmendem Widerstand der restlichen Plasmamembran sich die Klemmspannung über die aufgesaugte Membran zunehmend gegenüber dem

eingestellten Wert erniedrigt. Letztendlich können im On Cell-Modus die intrazellulären Ionenkonzentrationen nur abgeschätzt werden, wodurch die Interpretation der gemessenen Ströme (siehe unten) erschwert wird.

Wird im On Cell-Modus durch weiteres Ansaugen oder durch Elektroporation die angesaugte Membran rupturiert, ohne dass der Seal-Widerstand verloren geht, ermöglicht der elektrische Zugang zum Zytosol das Ableiten der Ströme über die gesamte Plasmamembran in der Spannungsklemme. Da das Zytosol in diesem Ganzzell-Modus durch die Pipettenlösung ausgetauscht wird, sind hier die intrazellulären Ionenkonzentrationen definiert. Die Plasmamembran hat eine sehr hohe Kapazität, die über eine Funktion des Verstärkers kompensiert werden kann. Dabei wird über die Zeitkonstanten der kapazitiven Ströme der Zugangswiderstand (i.e. Summe aus Pipettenwiderstand und Widerstand der Membranruptur) berechnet. Der Zugangswiderstand, über den ein Teil der Klemmspannung bereits abfallen würde, wird über eine weitere Verstärkerfunktion kompensiert, so dass im Ganzzell-Modus an der Plasmamembran die Klemmspannung anliegt, die auch tatsächlich am Verstärker eingestellt wurde. Werden physiologische intra- und extrazelluläre Lösungen für Pipetten- bzw. Badlösung verwendet, lassen sich im Ganzzell-Modus in der Stromklemme ein annähernd physiologisches Membranpotential ableiten. Neben diesen Vorteilen (Ableitung des Membranpotentials oder des Plasmamembran-Gesamtstroms, definierte intrazelluläre Ionenkonzentrationen, definierte Membranspannung) hat der Ganzzell-Modus den Nachteil, dass Signalmoleküle in die Pipette dialysieren, und Signaltransduktionswege in diesem Modus nicht mehr so einfach untersucht werden können.

Wird im Ganzzell-Modus die Ableitelektrode von der Zelle entfernt, fusionieren mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die abgerissenen Membrankanten zu einem „outside-out excised patch“, das wieder einen sehr hohen Eingangswiderstand bildet und so Einzelkanalereignisse in dem Patch auflösen lässt sowie Zugang

über die austauschbare Badlösung zu der extrazellulären Membranseite gewährleistet. Wird die Membran aus dem On Cell-Modus exzidiert entsteht wiederum durch Fusionieren des Membranabrisses ein Vesikel an der Pipettenspitze. Durch kurzzeitiges Manipulieren des Vesikels in die Luft und wieder Eintauchen in eine Ca^{2+} -freie Badlösung kann die äußere Vesikelmembran rupturiert werden und ein „inside-out excised patch“ entstehen, das über die Badlösung Zugang zur zytoplasmatischen Membranseite ermöglicht. Eine On Cell-/Ganzzell-Modus-Zwischenform stellt der „Cell-attached“-Nystatin-Modus dar, der über Ionophore in der Pipettenlösung einen hochohmigen elektrischen Zugang zu dem Zytosol ermöglicht, welcher ausreicht um das Membranpotential in der Stromklemme abzuleiten, den Eingangswiderstand aber nicht soweit erniedrigt, dass keine Einzelkanalauflösung in der aufgesaugten Membran mehr möglich ist (Neher and Sakmann, 1992, Hille, 2001) (Abb. 1.2).

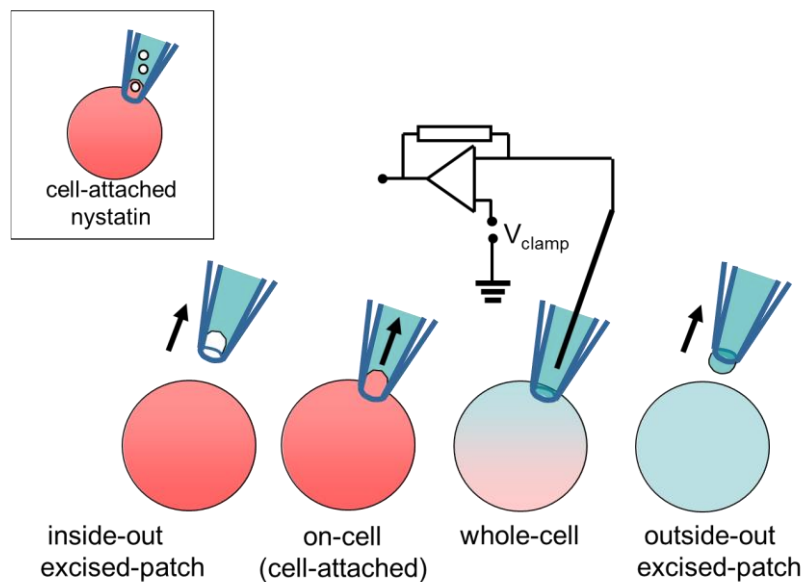


Abb. 1.2. Ableitmodi der Patch-Clamp-Technik (nach (Huber et al., 2005), verändert).

1.3.3 Patch-Clamp-Datenanalyse

Die Interpretation der in der Spannungsklemme gemessenen Ströme beruht auf folgenden Prinzipien: (1) Bis auf den On Cell- (und auch Cell-attached Nystatin)-Modus sind die Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der abgeleiteten Membran durch Pipetten- und Badlösung vorgegeben. Die elektrochemischen Gleichgewichtspotentiale (E), also die Membranspannung, an der die Nettodiffusion der Ionen null ist, können für alle beteiligten Ionenspezies und deren Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran mit der Nernst-Gleichung berechnet werden (Abb. 1.3). In der Strom/Spannungs-Beziehung der abgeleiteten Ströme müssen somit zum Beispiel durch K^+ -Ionenflüsse hervorgerufene Ströme am K^+ -Gleichgewichtspotential (E_K) ihr Umkehrpotential (V_{rev}) haben (i.e. am E_K ist ein K^+ -Strom 0 pA, bei negativeren Potentialen als E_K ist der K^+ -Strom negativ, bei positiveren Potentialen als E_K ist der K^+ -Strom positiv). In der Plasmamembran sind in der Regel immer mehrere Ionenkanal-Typen gleichzeitig aktiv, so dass V_{rev} des zum Beispiel Ganzzell-Stroms einer Zelle aus den gleichzeitigen Transmembranflüssen mehrerer Ionenspezies resultiert (Abb. 1.3).

(2) Den Anteil der dabei beteiligten „fraktionellen“ K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} -, Cl^- -, etc. Leitfähigkeiten am Gesamtstrom lässt sich durch Änderung der Badlösung (während einer Messung) oder der Pipettenlösung (in ungepaarten Experimenten) identifizieren. Durch geeignete Ionensubstitution wird das elektrochemische Gleichgewichtspotential zum Beispiel selektiv für eine Ionenspezies verschoben. Ändert sich V_{rev} des Gesamtstroms entsprechend, beweist dies die hohe fraktionelle Leitfähigkeit für diese Ionenspezies. Durch Substitution aller Kationen durch ein schlecht permeables organisches Kation lassen sich Cl^- -Ströme isolieren, durch Verwendung von einem schlecht permeablen organischen Anionen in Kombination mit permeablen Kationen lässt sich in analoger Weise der Cl^- -Strom-Anteil aus der Messung eliminieren.

(3) Durch Einwaschen mehr oder weniger spezifischer pharmakologische Modulatoren (Kanalöffner oder -blocker) lassen sich Stromkomponenten aktivieren oder blocken. Dabei ändert sich das Verhältnis der einzelnen Stromfraktionen zueinander, was sich unter Umständen in einer Verschiebung von V_{rev} des Gesamtstroms auswirkt hin zu bzw. weg von dem elektrochemischen Gleichgewichtspotential derjenigen Ionenspezies, deren Kanäle pharmakologisch aktiviert bzw. blockiert wurden. Gleiches gilt für Stromfraktionen, die über experimentelles Ansteuern von biologischen Signalwegen modulierbar sind. Für die aktivierte/inhibierte Strom-Fraktion (ΔI) lässt sich zudem das V_{rev} bestimmen und somit die Ionenselektivität bestätigen (Pharmaka) bzw. identifizieren (Signaling). Ebenso lassen sich in ungepaarten Experimenten durch molekulares Herunterregulieren oder durch Überexpression von Kanälen definierte Stromfraktionen der Zelle hemmen bzw. steigern.

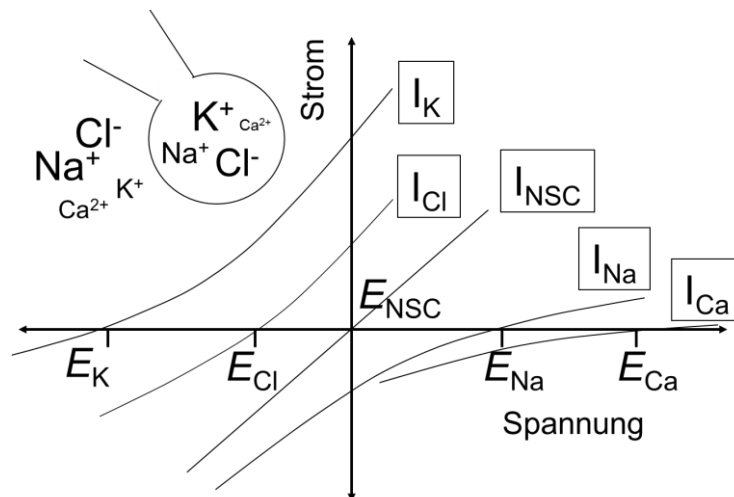


Abb. 1.3. Elektrochemische Gleichgewichtspotentiale (E), die sich bei Verwendung physiologischer intra- und extrazellulärer Ionenkonzentrationen in der Pipetten- bzw. Badlösung über die Plasmamembran einstellen. Ideale Ohm'sche Widerstände mit Selektivität für eine Ionenspezies würden die in der der Strom/Spannungs-Beziehung eingezeichneten Ströme (I) generieren (das tiefgestellte Suffix bezeichnet die Ionenselektivität). Leiten Kationen-Kanäle gleichermaßen Na^+ und K^+ (sogenannte nicht selektive Kationen (NSC)-Kanäle), liegt das Elektrochemische Gleichgewichtspotential (E_{NSC}), das sich bei Ionenfluss über diese Kanäle einstellt nahe 0 mV (nach (Huber et al., 2005), verändert).

(4) Ferner kann die spannungsabhängige Aktivierung (Abb. 1.4 A) und/oder Änderung der Leitfähigkeit (i.e. Gleichrichterfunktion oder Rektifizierung) sowie dabei auftretende zeitabhängige Aktivierung/Inaktivierung/Deaktivierung (Abb. 1.4 B) mit mehr oder weniger kanalspezifischen Zeitkonstanten vieler Ionenkanal-Typen ausgenutzt werden, um durch geeignete Pulsprotokolle die Kanäle des Interesses im Gesamtstrom-Kontext zu isolieren.

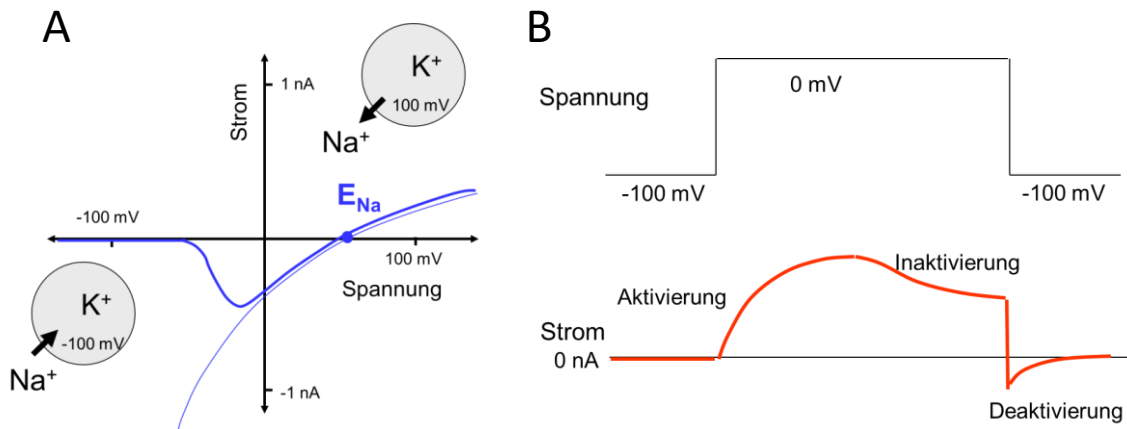


Abb. 1.4. Spannungsabhängigkeit von Ionenkanälen. **A.** Fiktive Strom/Spannungs-Beziehung spannungsaktivierter Na_v Na^+ -Kanäle in erregbaren Zellen. Werden Na_v -Kanäle im Ganzzell-Modus ausgehend von einem negativen Haltepotential (zum Beispiel -70 mV) durch depolarisierende Spannungssprünge aktiviert, so entstehen mit zunehmender Depolarisation ab Erreichen des Schwellenpotentials rasch inaktivierende Einwärtsströme (die dicke blaue Linie zeigt die Peak-Ströme). Ab einer bestimmten Stärke dieser Depolarisation (hier bei Sprüngen auf Spannungen von 0 mV und positiver) werden alle Kanäle in der Plasmamembran aktiviert und die Strom/Spannungs-Beziehung (dicke Linie) folgt derer eines idealen K^+ -selektiven Ohm'schen Widerstands (dünne blaue Linie). **B.** Fiktive zeitabhängige Aktivierung, Inaktivierung und Deaktivierung spannungsaktivierter K_v K^+ -Kanäle. Gezeigt werden Pulsprotokoll (oben) und die durch den depolarisierenden Rechteckpuls hervorgerufene Änderung der K^+ -Ströme (unten) abgeleitet im Ganzzell-Modus.

(5) Letztendlich leiten aktive Ionenkanäle nicht kontinuierlich Ionen, sondern schalten zwischen Offen- und Geschlossen Zuständen, wodurch schnelle Rechteckstromänderungen mit charakteristischen Offen- und Geschlossenzeiten oft im ms-Bereich generiert werden. Diese Stromänderungen lassen sich bis in den 1 pS-Bereich hinunter analysieren. Auf Einzelkanalebene kann so die Leitfähigkeit und die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals in Abhängigkeit der Klemmspannung charakterisiert werden.

1.4 Ziele

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass Ca^{2+} -Signale die DNA-Reparatur zum Beispiel über das Ca^{2+} -regulierte S100A11-Protein (Foertsch et al., 2016), die Aktivität der Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP1) (Bentle et al., 2006) oder der nukleären Lokalisation des Breast cancer susceptibility gene-1 (BRCA1)-Proteins (Glover-Collins and Thompson, 2008, Feng et al., 2004, Yang et al., 2003) modulieren. Zusätzlich war zu Beginn dieser Promotionsarbeit eine Studie publiziert worden, die in Karzinomzellen eine Aktivierung von K_v -Kanälen durch ionisierende Strahlung nachweisen konnte (Kuo et al., 1993). Dies führte zu der Arbeitshypothese, dass durch ionisierende Strahlung veränderte Membrantransporte zur DNA-Schadensantwort und Überleben der bestrahlten Zellen beitragen könnten. Das Ziel dieser Arbeit waren deswegen, folgende Fragen zu beantworten:

- Verändert ionisierende Strahlung in Dosen, wie sie in der Strahlentherapie am Menschen angewandt werden, die Transporte über die Plasmamembran von Tumorzellen?
- Handelt es sich dabei um singuläre Ereignisse oder um ein generelleres Phänomen, das sich bei verschiedenen Tumorentitäten beobachten lässt?
- Welche Transportprotein-Typen sind beteiligt?
- In welchen Zeitfenstern nach Bestrahlung treten radiogene Membrantransporte auf?

Diese Fragestellungen wurden mittels Patch-Clamp-Ableitungen an humanen Leukämie-, Lungenkarzinom-, Kopf-Hals-Karzinom- und Glioblastom-Zelllinien bearbeitet.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Humane K562 Chronisch Myeloische Leukämie (CML)-, humane Jurkat E6.1 T-Zell Akute Lymphatische Leukämie (T-ALL)- und humane T98G Glioblastomzellen stammen von ATCC (American Type Culture Collection, Baltimore, MD, USA). Humane A549 Lungen-Adenokarzinom (Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom, NSCLC)- und humane SAS (Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom, HNSCC)-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Klaus Dittmann, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen, die humanen U251 Glioblastomzellen von Prof. Luiz O Penalva, Department of Cell Systems and Anatomy, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas, USA, zur Verfügung gestellt. K562-, Jurkat-, T98G-, A549- und SAS-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium (2.0 NaHCO₃ g/l entwickelt am Roswell Park Memorial Institute) supplementiert mit 10% fötalen Rinderserum und L-Glutamin (FBS, FCS, alles von Gibco, Karlsruhe, Deutschland) in einer wassergesättigten 5% CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Bei den initialen Passagen der K562-Zellen wurden zudem Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml, beides Gibco) dem Zellkultur-Medium beigemischt. Im Laufe der Experimente wurden die Antibiotika weggelassen. U251-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4500 mg D-Glukose/l, 3.7g/l NaHCO₃)/10% FCS Medium (Gibco) in einer wassergesättigten 8% CO₂-Atmosphäre bei 37°C gezogen.

Zur Transfektion mit Kv3.4 siRNA und „nontargeting“ RNA (On Target SMARTpool RNA, Dharmacon, Chicago, Illinois, USA) wurden 3 x 10⁶ K562-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in niedriger Zelldichte in 300 µl Phenol-Rot-und FCS-freiem RPMI-1640-Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von siRNA und „nontargeting“ RNA (jeweils 50 nM Endkonzentration) wurden die K562-Zellen durch 5 ms lange 340 V Pulse elektroporiert (EPI2500-Electroporator, Fischer,

Heidelberg, Deutschland). Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen in 6 ml FCS-supplementierten Medium (37 °C) resuspendiert, und wie oben beschrieben weiter kultiviert. Die Effizienz der durchgeführten Transfektion wurde durch Transfizieren von grün-fluoreszierender siGLO siRNA (400 nM; Dharmacon), die Viabilität der transfizierten Zellen mittels Propidium-Iodid DNA-Färbung im Durchflußzytometer, der Knockdown von Kv3.4 mittels Immunoblotting in begleitenden, hier nicht gezeigten Experimenten des Labors Experimentelle Radioonkologie in Tübingen (Palme et al., 2020), verifiziert.

Stabile Bcl-2- bzw. mit leerem Vektor transfizierte Jurkat-Zellen stammten ursprünglich von Herrn Prof. Henning Walczak (heute Department of Cancer Biology, University College London, London, UK) und wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Justine Rudner (heute Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie im Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

2.2 Bestrahlung der Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium bei Raumtemperatur mit einem Linearbeschleuniger (LINAC SL25 Philips, Eindhoven, Niederlande) mit der Dosisleistung von 4 Gy/min mit 6 MV Photonen einfach (0-10 Gy) oder fraktioniert (5 x 0 bzw. 5 x 2 Gy) bestrahlt. Dosisaufbau und Reflexion wurde mit 1 cm bzw. 10 cm RW-3 Platten (PTW, Freiburg) oberhalb bzw. unterhalb der Zellkulturflasche/Multiloch-Platte gewährleistet. Die Dosimetrie wurde mittels Filmdosimetrie (Gafchromic 3 films; Ashland Inc., Covington, KY) von Herrn Dipl.-Ing. Savas Tsitsekidis, Medizinische Physik, Klinik für Radioonkologie, Tübingen, durchgeführt.

2.3 Patch-Clamp-Ableitungen

Die Patch-Clamp-Ableitungen wurden an einem invertierten Axiovert-100 Zeiss Mikroskop mit schwenkbarem Kondensator-Turm und einem Phasenkontrast 32x Long-Distance Objektiv durchgeführt. Das Mikroskop wurde auf einem von der Feinmechanik-Werkstatt selbstgebauten luftgelagerten Tisch mit Bleiplatte gelagert und durch einen ebenfalls selbstgebauten Faraday-Käfig abgeschirmt. Auf eine ebenfalls selbstgebaute Mikroskop-Kreuztisch-Platte wurde die 3 cm-Petrischale mit den Zellen montiert und ein ebenfalls selbstgebauter Ringeinsatz über Klemmen in der Petrischale fixiert. Neben diesen Klemmen wurden in der Kreuztischplatte auch die Halterungen für Absaug- und Salzbrücken-Glasröhrchen befestigt. In das Salzbrücken-Röhrchen wird der Referenz Ag/AgCl-Elektroden Draht platziert. Über 8 Bohrungen in den Ringeinsatz wurden die Zellen in der Mitte der Petrischale, über die Schwerkraft angetrieben, superfundiert (Abb. 2.1). Als Lösungsreservoirs wurden 50 ml-Perfusorspritzen (Kolben entfernt) etwa 40 cm über der Petrischale im Faraday-Käfig montiert und mit Silikonschläuchen (1 mm Innendurchmesser) mit dem Ringeinsatz verbunden. Das Zuschalten der Superfusate und die Regulation der Flussrate erfolgte über zwischengeschaltete Dreiwegehähne bzw. Infusionstropfenregler. Die Schläuche wurden die letzten 30 cm vor dem Ringeinsatz über Silikon-abgedichtete Y-Verbindungsstücke durch einen größeren Schlauch geführt, der im Gegenstrom mit 37°C warmen Wasser durchströmt wurde. In einer Reihenschaltung wurde das Warmwasser zuvor durch eine Aussparung des Ringeinsatzes geführt (Abb. 2.1), so dass sowohl Ringeinsatz und Petrischale als auch zuführende Lösungen auf 37°C temperiert wurden und alle Patch-Clamp-Ableitungen bei 37°C durchgeführt wurden. Durch den Ringeinsatz wurde das superfundiert Badvolumen auf etwa $\approx 200 \mu\text{l}$ verkleinert, so dass bei Superfusions-Flussraten von $\approx 0.5-1 \text{ ml/min}$ relativ schnell Blocker eingewaschen oder Badlösungen ausgetauscht wurden. Die 37°C-Temperatur des $\approx 200 \mu\text{l}$ Badvolumens während der Superfusion wurde regelmäßig mittels einem kleinen ($< 1 \text{ mm}$ Durchmesser) Thermowiderstand kontrolliert. Als

Absaugvorrichtung wurde vom Absaugrohr ein Schlauch aus dem Käfig zu einer Aquariumpumpe mit vorgeschalteter Flüssigkeitsfalle (beides außerhalb des Faraday-Käfigs) und einer elektrisch isolierenden Luftbrücke (innerhalb des Käfigs) geführt. Der Wärmekreislauf wurde von einem Wasserbad mit Umwälz-Vorrichtung angetrieben.

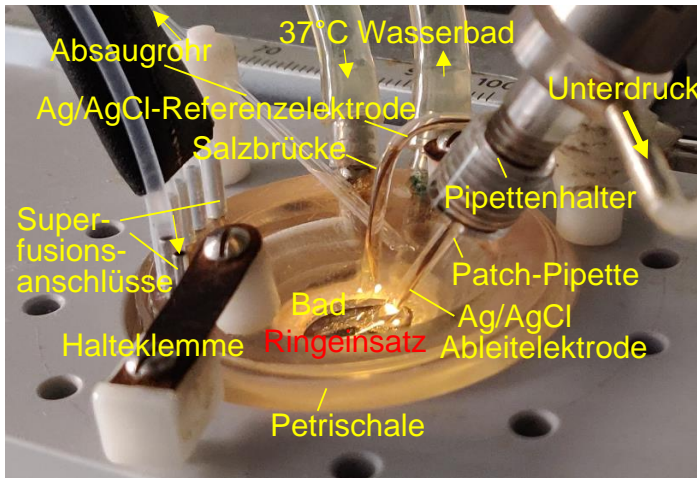


Abb. 2.1. Ringeinsatz, der zur Bad-Superfusion und Temperierung der Zellen während der Patch-Clamp-Ableitungen verwendet wurde. Petrischale mit Ringeinsatz wurden mit Klemmen auf eine Kunststoffplatte fixiert, welche in die Kreuztisch-Mechanik des inversen Mikroskops eingeklipst war.

Die Patch-Clamp-Ableit-Pipetten wurden aus Borosilikat-Glas (GC150 TF-10, Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) mittels einem Mikroprozessor-gesteuerten DMZ-Puller (Zeitz, Augsburg, Deutschland) im Mehrfachzug-Verfahren gefertigt und die Spitzen über eine Zusatzfunktion des Pullers hitzepoliert. Über die Programmierung wurde ein Pipetten-Spitzenwiderstand (mit den verwendeten Pipetten und Badlösungen) von 5 M Ω eingestellt. Die mit Pipettenlösung gefüllten Pipetten wurden im Pipettenhalter des Vorverstärkers über den Ag/AgCl-Ableitelektroden-Draht gezogen und in der Haltevorrichtung mit einer Klemmschraubung luftdicht fixiert. Über einen Schlauchzugang des Pipettenhalters wurde Unterdruck auf das Pipettenlumen zum Ansaugen der Zellmembran appliziert. Der Vorverstärker war über einen mechanischen und einem „Remote-Access“ elektrischen STM-Mikromanipulator (Lange, GmbH and Co., KG, Deutschland) am Mikroskop-Stativ fixiert.

Die Ströme über die Plasmamembran wurden im Ganzzell- und On Cell- (Cell-attached)-Modus in der Spannungsklemme, die Membranspannung im Ganzzell-Modus mit der 0 pA-Stromklemme abgeleitet. Für die Spannungsklemme wurde ausgehend von einem Haltepotential während einer Messung Rechteck-Spannungssprünge auf verschiedene Haltespannungen appliziert. Die Klemmspannungen in der Spannungsklemme und die abgeleiteten Membranpotentiale in der Stromklemme beziehen sich dabei auf die auf zytoplasmatischer Seite der Membran gemessenen gegen die geerdete extrazelluläre Referenzelektrode. An Flüssigkeitsgrenzen (Pipettenlösung gegen Badlösung vor dem Sealen der Membran oder zwischen neuer Badlösung und ursprünglicher Badlösung in der Salzbrücke nach Badlösungswechsel; die Salzbrücke ist bei Wechsel der Badlösungen mit unterschiedlichen Cl⁻-Konzentrationen notwendig, da die Ag/AgCl-Referenzelektrode bei Veränderung der umgebenen Cl⁻-Konzentration Offset-Potentiale bildet und in den Messplatz integriert) entstehen Liquid Junction-Potentiale ($E^S - E^P$) die nach (Barry and Lynch, 1991) mit folgender Gleichung abgeschätzt wurden:

$$E^S - E^P = (RT/F)S_F \ln \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i a_i^P}{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i a_i^S} \right\} \quad \text{mit} \quad S_F = \frac{\sum_{i=1}^N [(z_i u_i)(a_i^S - a_i^P)]}{\sum_{i=1}^N [z_i^2 u_i (a_i^S - a_i^P)]}$$

R , T , F sind die Gaskonstante, Absolute Temperatur und Faraday-Konstante. u , a und z repräsentieren Mobilität, Aktivität und Valenz (inklusive Vorzeichen) der Ionen-Spezies. Die hochgestellten Suffixes S und P weisen die beiden Flüssigkeitskompartimente aus. Für die Anionen Cl⁻, Glukonat⁻, HEPES⁻ (siehe unten), ATP⁴⁻, EGTA³⁻ (siehe unten) wurden die relativen Mobilitäten u von 1.0388, 0.33, 0.3, 0.22 bzw. 0.24, für die Kationen K⁺, Na⁺, TRIS⁺ (siehe unten), NMDG⁺ (siehe unten) Ca²⁺ und Mg²⁺ die relativen Mobilitäten von 1, 0.682, 0.4, 0.25, 0.488 bzw. 0.361 angenommen. Die Spannungen wurden „offline“ für die „Liquid Junction“-Potentiale korrigiert.

Die Ströme/Spannungen wurden mit einem EPC-9-Verstärker (Heka, Lambrecht, Deutschland) mit einer Aufnahme-Rate von 10 kHz und einem 3 kHz-Tiefpassfilter

aufgenommen. Die Generierung der Klemmspannung und die Datenaufnahme über einen ITC-16-AD/DA-Wandler (Instrutech, Port Washington, NY, USA) wurde mit der Pulse-Software (Heka) durchgeführt. Über die Oszilloskop- und Online-Analyse-Funktion der Pulse-Software wurden die Messdaten visualisiert. Nach Erreichen des G Ω -Seals (üblicherweise 10-100 G Ω) wurde für den Ganzzell-Modus der aufgesaugte Membranfleck durch kurze Applikation eines starken Unterdrucks rupturiert und das Einbrechen in den Ganzzell-Modus durch Erhöhung der Membran-Kapazität erkannt. Über die C_{slow}-Funktion des Verstärkers wurde die Ganzzell-Membran-Kapazität kompensiert und gleichzeitig deren Wert [pF] ermittelt. Die Ganzzell-Ströme werden als Stromdichten [pA/pF] zwischen individuellen Zellen gemittelt. Bei der Ermittlung der Ganzzell-Membran-Kapazität wird auch der Zugangswiderstand (i.e., Pipettenwiderstand + Widerstand der Membranruptur) zum Zellinneren gemessen. Dieser Zugangswiderstand ist dem Membranwiderstand vorgeschaltet, so dass die eingestellte Klemmspannung an beiden Widerständen abfällt und somit an der Membran eine niedrigere Spannung als die gewählte Klemmspannung anliegt. Der Zugangswiderstand wurde in den Ganzzell-Modus über die R_s-Funktion des Verstärkers zu 70-85% kompensiert.

Kationen-Ströme aus der Zelle bzw. Anionen-Ströme in die Zelle werden als Auswärtsströme und positive Ströme, Kationen-Ströme in die Zelle bzw. Anionen-Ströme aus der Zelle als Einwärtsströme und negative Ströme definiert. In den Original-Stromspuren werden Auswärtsströme und Einwärtsströme als Auslenkungen oberhalb bzw. unterhalb der 0 pA-Nulllinie (meist als rote Linie in den Abb. eingezeichnet) dargestellt. Bei einer Messung werden in der Regel mehrere Spannungssprünge appliziert. Die dadurch nacheinander evozierten Ströme werden in den Original-Stromspuren übereinander gelagert dargestellt.

2.3.1 Membranpotential-Ableitungen in der Stromklemme

Um strahlungsinduzierte Änderungen des Membranpotentials über die Plasmamembran in K562 CML-, A549-NSCLC- und SAS HNSCC-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen im Ganzzell-Modus in der 0 pA-Stromklemme abgeleitet. Als eine dem physiologischen intrazellulären Milieu angepasste Pipetten-Lösung wurde eine Mg/ATP-enthaltende, Na⁺- und EGTA-gepufferte Ca²⁺-freie K-Glukonat-Lösung, im weiteren Text Standard K-Glukonat Pipettenlösung genannt, mit erniedrigter Cl-Konzentration verwendet (in mM: 140 K-D-Gluconate, 5 N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethanesulfonisäure (HEPES), 5 MgCl₂, 1 K-Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)- N,N,N',N' - Tetraessigsäure (K-EGTA), 1 K-ATP, mit KOH auf pH 7.2 titriert). Die Zellen wurden mit einer, der physiologischen Extrazellulärflüssigkeit angeglichenen NaCl-Lösung, im weiteren Text als Standard-NaCl-Badlösung bezeichnet, superfundiert (in mM: 125 NaCl, 32 HEPES, 5 KCl, 5 D-Glucose, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, mit NaOH auf pH 7.4 titriert). In den Experimenten mit den A549- und SAS-Zellen wurde während kontinuierlicher Messung die extrazelluläre Glukose durch Superfusion mit einer Glukose-depletierter Standard-NaCl-Badlösung (in mM: 125 NaCl, 32 HEPES, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, mit NaOH auf pH 7.4 titriert) ausgewaschen und durch Re-perfusion mit Standard-NaCl-Badlösung wieder eingewaschen. In weiteren Experimenten an den A549-Zellen wurde während kontinuierlicher Ableitung der Glukose-Transporter-Inhibitor Phlorizin (500 µM, Sigma-Aldrich) oder EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (1 µM, Sigma-Aldrich) mit der Standard-NaCl-Badlösung ein- und wieder ausgewaschen. Am Ende eines jeden Experiments wurde zur internen Kontrolle von „Offset“-Potentialen das Membranpotential „genullt“ indem E_K durch Einwaschen einer KCl-Badlösung (in mM: 130 KCl, 32 HEPES, 5 D-Glucose, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, mit KOH auf pH 7.4 titriert) nahe 0 mV verschoben wurde. Ausgewertet wurden die Spannungen nach Einstellen eines Steady-State am Ende eines jeweiligen experimentellen Manövers, indem über ein möglichst langes Zeitintervall im

Steady-State-Bereich gemittelt wurde. Die K562 -Zellen wurden mit 5 Gy bestrahlt - eine Dosis, die unter derjenigen für Ganzkörperbestrahlung (TBI) zur Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation liegt, dafür aber noch eine gute „Sealbarkeit“ der Membran gewährleistet - und 1- 3 h nach Bestrahlung elektrophysiologisch abgeleitet. Die A549- und SAS-Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt, da diese Dosis in dem Beobachtungszeitraum nachweislich den EGFR stimuliert und EGFR-vermittelte DNA-Reparatur auslöst (Dittmann et al., 2005) und 1-6 h nach der Bestrahlung elektrophysiologisch abgeleitet.

2.3.2 Ganzzell-Stromableitungen in der Spannungsklemme

2.3.2.1 Ca^{2+} -permeable nichtselektive Kationenkanäle in CML-Zellen

Zur Analyse der relativen Ca^{2+} -Permeabilität (siehe Abb. 3.1) und des anormalen Molfraktionseffekts (siehe Abb. 3.2) des radiogenen Kationen-Stroms wurden parentale K562-Zellen 1-5 h nach Bestrahlung mit 1-10 Gy bei 37°C mit Standard-NaCl-Badlösung superfundiert (siehe 2.3.1). Nach Erreichen des GΩ-Seals und Einbrechen in den Ganzzell-Modus wurden die Zellen mit Ca-D-Gluconat₂-Badlösung (100 Ca-D-Gluconat₂, 10 HEPES, titriert mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) auf pH 7.4), mit Na-D-Gluconat-Badlösung (in mM: 150 Na-D-Gluconat, 10 HEPES, 1 Ca-D-Gluconat₂, mit NaOH auf pH 7.4 titriert) oder mit EGTA-gepufferter Ca^{2+} -freien Na-D-Gluconat-Badlösung (in mM: 150 Na-D-Gluconat, 10 HEPES, 3 EGTA, mit NaOH auf pH 7.4 titriert) in Kombination mit Standard-K-Gluconat-Pipettenlösung (in mM: 140 K-D-Gluconat, 5 HEPES, 5 MgCl_2 , 1 K_2 -EGTA, 1 K_2 -ATP, mit KOH auf pH 7.2 titriert) abgeleitet. Für die Analyse wurden die Ströme zwischen 100 und 690 ms eines jeden Spannungspulses arithmetisch gemittelt.

2.3.2.2 Kv3.4-Kanäle in CML-Zellen

Zum Nachweis von strahlungsaktivierten Kv3.4 -Kanälen wurden K562-Zellen mit Na-Glukonat-Badlösung kombiniert mit Standard K-Glukonat-Pipettenlösung (siehe 3.2.1) abgeleitet. Zur Hemmung der spannungsabhängigen Kv-Kanäle wurde BDS-II (Blood depressing substance-II, 2 μ M) mit der Na-Glukonat-Badlösung superfundiert. Die Spannungsaktivierung der Kv-Kanäle erfolgte durch depolarisierende Spannungssprünge ausgehend von -66 mV (Standard NaCl-Badlösung) bzw. -52 mV Na-Glukonat-Badlösung) Haltepotential. Ausgewertet wurden die „Peak“-Ströme der Kv-Kanäle, da bei höheren Spannungssprüngen die Kv-Ströme bereits während anhaltender Depolarisation inaktivierten.

Zur Berechnung der halbmaximalen Aktivierungsspannung ($V_{1/2-act}$, i.e. der depolarisierende Spannungswert, bei der die Hälfte der Kv-Kanäle aktivierten) wurden die biologische „Leck“-Leitfähigkeit (i.e. Gesamtheit der aktiven Kanäle, die nicht als spannungsabhängig aktivieren) über die Lineare Regression der Einwärtsstrom-Spannungs-Beziehung berechnet, die „Leck“-Ströme über den ganzen Spannungsbereich extrapoliert und diese von den Gesamtströmen subtrahiert, um die spannungsaktivierte Stromfraktion zu erlangen (siehe Abb. 3.3 G). Über jeweils drei Spannungspunkte wurde überlappend am aufsteigenden Teil dieser spannungsaktivierten Stromfraktionskurve die jeweilige Leitfähigkeit berechnet und normalisiert auf die Maximal-Leitfähigkeit (G/G_{max}) gegen die Spannung aufgetragen. Durch Anpassen die Boltzmann-Funktion ($G/G_{max} = [1 + \exp (V_{1/2-act} - V)/k]^{-1}$) wurde die halbmaximale Aktivierungsspannung ($V_{1/2-act}$) berechnet (k: Steigung der Kurve bei $V_{1/2-act}$; siehe Abb. 3.3 H).

2.3.2.3 hERG1-Kanäle in CML-Zellen

hERG1 K⁺-Kanäle aktivieren durch depolarisierende Spannungssprünge, inaktivieren aber gleichzeitig mit der Aktivierung, so dass sie während des depolarisierenden Spannungssprunges keine K⁺-Ströme leiten. Bei der Repolarisation der Klemmspannung wird die Inaktivierung schneller aufgehoben, als dass die Kanäle deaktivieren, so dass die hERG1-Kanäle nach Repolarisation kurzzeitig deaktivierende K⁺-„Tail“-Ströme leiten. Um den Effekt von ionisierende Strahlung auf diese „Tail“-Ströme in K562-Zellen zu untersuchen, wurden Ganzzell-Ableitungen 1-4 h nach Bestrahlung mit 0-5 Gy mit Standard K-Glukonat Pipetten- (siehe 2.3.1) und K-Glukonat-Badlösung (in mM: 130 K-D-Glukonat, 32 HEPES, 5 D-Glukose, 1 Mg-D-Glukonat₂, 1 Ca-D-Glukonat₂, titriert mit KOH auf pH 7.4) durchgeführt. Vor Erreichen des GΩ-Seals und Einbrechen in den Ganzzell-Modus wurden die Zellen mit Standard-NaCl-Badlösung (siehe 2.3.1) superfundiert. Zur reversiblen Hemmung der hERG1-Kanäle wurde E4031 (1 μM, Sigma-Aldrich) mit der K-Glukonat-Badlösung superfundiert. In Protokoll 1 (siehe Abb. 3.5) wurden die Rechteck-Spannungssprünge ausgehend von einem negativen (-50 mV, hERG abgeschaltet) und einem positiven (+40 mV, hERG angeschaltet aber inaktiviert) Haltepotential appliziert und die „Peak“-Ströme analysiert. In Protokoll 2 (siehe Abb. 3.6) wurde durch Prä-Pulse die Aktivität von hERG1 variiert und dann in einen Sprung auf -100 mV der „Peak“ der deaktivierenden Einwärts-„Tail“-Ströme analysiert. Die E4031-sensitive Fraktion des Einwärts-„Tail“-Stroms wurde als hERG-spezifisch definiert für bestrahlte und nicht-bestrahlte Zellen gegen die Prä-Pulse-Spannung aufgetragen, um auf eine strahleninduzierte Modifikationen der Spannungsabhängigkeit zu testen (siehe Abb. 3.6 C)

2.3.2.4 TRPM2-Ströme in T-ALL-Zellen

Um die funktionelle Expression von TRPM2 (Member-2 der Melastatin-Untergruppe der Transient Receptor Potential) nichtselektiven Kationenkanälen in T-ALL Zellen zu beschreiben (siehe Abb. 3.7) wurden parentale Jurkat-Zellen im Ganzzell-Modus mit modifizierter NaCl-Badlösung (in mM: 140 NaCl, 10 HEPES, titriert mit NaOH auf pH 7.4) und K-Glukonat/KCl-Pipettenlösung (in mM: 60 K-D-Glukonat, 80 KCl, 1 MgCl₂, 1 K-EGTA und K-ATP, 5 HEPES, titriert mit KOH auf pH 7.4) abgeleitet. Bis zum Erreichen der Ganzzell-Ableitkonfiguration wurden die Zellen mit Standard-NaCl-Badlösung (siehe 2.3.1) superfundiert. In ungepaarten Experimenten wurde der Effekt des TRPM2-Stimulators ADP-Ribose (ADPR, 0 bzw. 1 µM, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in der Pipettenlösung auf die Ganzzell-Ströme analysiert. Zur Inhibition des ADPR-stimulierten Stroms wurde der Kationenkanal-Inhibitor n-(p-Amylcinnamyl)-Anthranilsäure (ACA, 20 µM) mit der Badlösung appliziert. Nach Membran-Exzision aus dem Ganzzell-Ableitmodus wurde in einem Experiment der ADPR-stimulierte Strom (K-Glukonat/KCl-Pipetten- und modifizierte NaCl-Badlösung) auf Einzelkanalebene im Outside-out-Patch analysiert.

Die Bcl-2 (B-cell lymphoma 2-Protein)-Abhängigkeit von strahleninduzierten TRPM2-ähnlichen Strömen wurde in Bcl-2- und Kontroll-Vektor-transfizierten Jurkat-Zellen 2-6 h nach Bestrahlung mit 0 bzw. 5 Gy untersucht (siehe Abb. 3.8). Die Ganzzell-Ströme wurden wie bei den parentalen Zellen mit (ADPR-freier) K-Glukonat/KCl-Pipettenlösung und modifizierter NaCl-Badlösung vor, während und nach Bad-Applikation von ACA abgeleitet. Zur Analyse wurden die arithmetischen Mittelwerte der Ströme zwischen 100 ms und 690 ms eines jeden Spannungspulses auf die Membrankapazität normalisiert und aus den so erhaltenen Stromdichten für die Auswärtsströme in dem Spannungsbereich von -48 mV bis +12 mV die Leitfähigkeitsdichten über lineare Regression berechnet.

2.3.2.5 $I_{K_{Ca}}$ -Ströme in T-ALL-Zellen

Zur Analyse der radiogenen Aktivierung von $I_{K_{Ca}}$ K^+ -Kanälen wurden mit 0 bzw. 10 Gy bestrahlte Bcl-2- und Kontroll-Vektor-transfizierte Jurkat-Zellen (2-6 h nach Bestrahlung) mit KCl-Badlösung (in mM: 140 KCl, 10 HEPES, titriert mit KOH auf pH 7.4) und K-Glukonat/KCl-Pipettenlösung (in mM: 60 K-D-Glukonat, 80 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 K-EGTA und K-ATP, 5 HEPES, titriert mit KOH auf pH 7.4) abgeleitet. Bis zum Erreichen der Ganzzell-Ableitkonfiguration wurden die Zellen mit Standard NaCl-Badlösung (siehe 2.3.1) superfundiert. $I_{K_{Ca}}$ -Blockade wurde mit Bad-Applikation von TRAM-34 (10 μM , 1-[(2-Chlorophenyl)Diphenylmethyl]-1H-Pyrazol) durchgeführt. Zur Analyse wurden die arithmetischen Mittelwerte der Ströme zwischen 100 ms und 690 ms eines jeden Spannungspulses auf die Membrankapazität normalisiert und aus den so erhaltenen Stromdichten für die Einwärtsströme in dem Spannungsbereich von -123 mV bis -43 mV die TRAM-34-sensitiven Leitfähigkeitsdichten über lineare Regression berechnet.

2.3.2.6 Cl^- -Ströme in Glioblastomzellen

Um Cl^- -Ströme der T98G-Glioblastomzellen im Ganzzell-Modus zu isolieren (siehe Abb. 3.16), wurde als Haupt-Kation in Bad- und Pipettenlösung die impermeable schwache Base N-Methyl-D-Glukamin⁺ (NMDG⁺) verwendet, die mit HCl auf pH 7.4 titriert wurde. Die Puffersäure HEPES wurde mit NMDG auf pH 7.4 titriert. Die Pipetten-Lösung beinhaltete (in mM) 140 NMDG-Cl (pH 7.4), 40 Mannitol, 10 HEPES/NMDG (pH 7.4), 1 $MgCl_2$, 1 Mg-ATP, und 0.5 EGTA, die Badlösung (in mM) 180 NMDG-Cl (pH 7.4), 10 HEPES/NMDG (pH 7.4), 1 $CaCl_2$, und 1 $MgCl_2$ mit zusätzlich NPPB (5-Nitro-2-[(3-Phenylpropyl)amino]Benzoessäure, 0 oder 50 μM in 0.1 % DMSO, Sigma-Aldrich). Die Glioblastom-Zellen wurden mit 0 oder 2 Gy

bestrahlt. Die Bestrahlung und Nach-Inkubation (3-5 h) erfolgte im Zellkulturmedium, das entweder mit Vehikel (DMSO) oder dem BK_{Ca} K⁺-Kanalblocker Paxilline (0 oder 5 μ M in 0.1 % DMSO, Sigma-Aldrich) supplementiert war. Für die Patch-Clamp-Ableitungen wurden die Zellen mit Paxilline-freier Standard-NaCl-Badlösung (siehe 3.2.1) superfundiert. Erreichen des Giga-Ohm-Seals und Einbrechen in den Ganzzell-Modus wurde die Bad-Superfusion auf die oben beschriebene NMDG-Cl-Lösung umgestellt. Die Ströme wurden ausgehend von einem Haltepotential von -23 mV (nach Offline-Korrektur der Liquid-Junction-Potentiale) durch 9 Rechteck-Spannungssprünge auf Spannungen zwischen -93 bis + 67 mV in 20 mV Abstufungen evoziert. Zur Auswertung wurden die Ströme in dem 100-690 ms-Zeitfenster eines jeden 700 ms-Spannungssprungs gemittelt und auf die Ganzzell-Membran Kapazität normalisiert. Aus den so berechneten Stromdichten wurden für die Auswärtsströme die Leitfähigkeitsdichten durch lineare Regression zwischen -13 mV und +67 mV Klemmspannung berechnet.

2.3.3 On Cell- (Cell-attached)-Ableitungen in der Spannungsklemme

Um die strahleninduzierte Aktivierung von K⁺-Kanälen in U251-Glioblastomzellen im On Cell-Modus abzuleiten (siehe Abb. 3.15), wurde die Standard-NaCl-Badlösung (siehe 3.2.1) mit einer extrazellulären KCl-Pipettenlösung (in mM: 130 KCl, 32 HEPES, 5 D-Glucose, 1 MgCl₂, und 1 CaCl₂, titriert mit KOH auf pH 7.4) kombiniert. Die U251-Zellen wurden mit 0 bzw. 10 Gy in 5 Fraktionen über 5 Tage im Zellkulturmedium bestrahlt (5 x 0 bzw. 5 x 2 Gy) und einen Tag nach der letzten Strahlen-Fraktion elektrophysiologisch im On Cell-Modus abgeleitet. Dabei wurden, ausgehend von einem Haltepotential von +4 mV (nach Offline-Korrektur für das Liquid-Junction-Potential), einundvierzig 700 ms-lange Rechteck-Spannungssprünge auf Spannungen zwischen -96 mV und +104 mV in 5 mV

Abstufungen appliziert. Im On Cell-Modus addiert sich das physiologische Membranpotential der intakten Zelle zu den applizierten Klemmspannungen. Analysiert wurden die zwischen 100 ms und 690 ms eines jeden Spannungssprungs gemittelten makroskopischen Ströme. Über lineare Regression wurde für die makroskopischen Einwärtsströme die Leitfähigkeit zwischen -1 mV und -96 mV berechnet.

2.4 Statistik

Die Daten werden neben Original-Stromspuren als arithmetische Mittelwerte \pm Standard Fehler (SE) dargestellt. Die Signifikanz-Niveaus (Irrtumswahrscheinlichkeit, p-Wert) der beobachteten Unterschiede zwischen den Stichproben wurden für einen Paarvergleich mit zweiseitigem ungepaartem t-Test bzw. Welch-korrigiertem (Welch, 1947) t-Test bei nicht unterschiedlichen bzw. unterschiedlichen Standardabweichungen und bei mehreren Paarvergleichen mit parametrischem ANOVA und anschließendem Tuckey Post-hoc-Test bzw. nichtparametrischem ANOVA (Kruskal-Wallis-Test) abgeschätzt. Hierfür wurde das Programm InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) angewendet. In Abb. 3.9 C wurde ein Einstichproben t-Test durchgeführt und das Signifikanzniveau für die Anzahl z der in diesem Experiment durchgeführten Tests Bonferroni korrigiert, indem der p-Wert mit z multipliziert wurde. Ein p-Wert von $p \leq 0.05$ (t-Test und ANOVA) bzw. $z p \leq 0.05$ (Bonferroni-korrigierter t-Test bei multiplen Vergleichen) wurde als signifikant verschieden definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Ionen-Kanäle in der DNA-Schadensantwort von Leukämiezellen

3.1.1 Chronisch Myeloische Leukämie (CML)

Die neoplastische Transformation von hämatopoetischen Stammzellen zu chronisch myeloischen Leukämie-Zellen wird fast immer durch reziproke Translokation-vermittelte Fusion des ABL-1-Gens (v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) auf Chromosom 9 mit dem BCR-Gen (breakpoint cluster region protein) auf Chromosom 22 initiiert. Das resultierende BCR-ABL-Fusionsprotein auf dem so entstandenen Philadelphia-Chromosom ist eine konstitutiv aktive Tyrosin-Kinase, die unkontrollierte Zellproliferation und Apoptoseresistenz induziert. Tyrosin Kinase-Inhibitoren (TKI) wie zum Beispiel Imatinib (Handelsname Glivec®) sind der Goldstandard der CML Therapie (Hochhaus et al., 2017). Bei Versagen von Erst- und Zweitlinien TKI-Therapie bleibt die allogene Stammzelltransplantation (SZT) als einzige kurative Therapieoption der CML (Bornhauser et al., 2006). Die Ganzkörperbestrahlung (TBI, Total-Body Irradiation, 8-12,6 Gy Photonen) wird neben Hochdosis-Chemotherapie zur myeloablativen Konditionierung (Ablation von Leukämie und erythropoetischen Stammzellen) vor der allogenen SZT eingesetzt (Heinzelmann et al., 2006). Radioresistenzen der CML-Zellen führt bei 8-15 % der durch TBI konditionierten stammzelltransplantierten CML-Patienten zu Rezidiven (Robin et al., 2005, Uberti et al., 2011, Weisser et al., 2004).

Zur Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden insbesondere von DNA-Doppelstrangbrüchen muss der Zellzyklus arretiert werden. Dies verhindert, dass Zellen mit DNA-DSB in die Mitose eintreten. Letzteres würde zur asymmetrischen Verteilung der DNA auf die Tochterzellen und letztendlich zu mitotischen Katastrophe und Zelltod führen (Eckert et al., 2019). Der Zellzyklus aller Zellen

(siehe Einleitung) wie auch CML-Zellen wird durch Ca^{2+} -Signale reguliert (Si and Collins, 2008). Um deswegen einen möglichen Beitrag radiogener Ca^{2+} -Signale zur Radioresistenz von CML-Zellen identifizieren zu können, wurden in dieser Arbeit Ca^{2+} -selektive Ströme über die Plasmamembran von bestrahlten K562 Zellen mit der Patch-Clamp-Ganzzell-Konfiguration abgeleitet. Die K562-Zelllinie wurde ursprünglich aus einem Patient mit CML isoliert (Lozzio and Lozzio, 1975).

3.1.2 Radiogene Ca^{2+} -Ströme in der Plasmamembran von CML-Zellen

Zur Ganzzell-Ableitung wurde eine Badlösung mit Ca^{2+} -Ionen als einzige permeablen Kationen und D-Glucolat^- als sehr schlecht permeables Gegen-Anion mit einer K^+ - D-Glucolat^- (10 mM Cl^-) kombiniert, so dass Einwärtsströme ausschließlich durch Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle oder Ausstrom von Cl^- aus der Zelle generiert werden konnten. Die K562-Zellen wurden 1- 5 h nach Bestrahlung (0-10 Gy) abgeleitet. Abb. 3.1, links, zeigt das verwendete Pulsprotokoll. Zunehmende Strahlendosis induzierte dabei zunehmend größere Einwärtsströme (Abb. 3.1, A-C) bei Spannungen negativer -67 mV. Die über diese Einwärtsströme berechneten mittlere Leitfähigkeitsdichte ($\Delta I_{\text{Strom}}/\Delta V_{\text{Spannung}}$), normalisiert auf die Membrankapazität als Maß für die Membranfläche und berechnet über lineare Regression der Strom/Spannungs-Beziehung zwischen -47 und -107 mV, Abb. 3.1C), verdoppelte sich in etwa nach Bestrahlung mit 10 Gy.

Neben einer Erhöhung der Einwärtsströme stimulierten 10 Gy auch eine leichte Vergrößerung der Auswärtsströme bei Spannungen im Bereich von 0 mV (siehe Sternchen in Abb. 3.1 B), aber nicht bei höheren Spannungen. Hieraus ergibt sich zum einen eine sogenannte Einwärtsrektifizierung (Einwärtsgleichrichtung) für den Strahlen(10 Gy)-induzierte Strom (geschlossene Dreiecke minus offene Kreise in Abbildungsteil 3.1 B) und zum anderen ein Umkehrpotential (V_{rev} , die Spannung, bei der die strahleninduzierte Stromfraktion 0 ist) von etwa -35 mV. Mit den

eingangs erwähnten Ionen in Pipetten- und Badlösung liegen in der Theorie die elektrochemischen Gleichgewichtspotentiale (E) für K^+ bei $E_K = -\infty$ mV, für Ca^{2+} und Cl^- bei $E_{Ca} = +\infty$ mV und $E_{Cl} = +\infty$ mV, und für D-Glukonat im Bereich von $E_{Glukonat} = 0$ mV. Ströme durch schlecht D-Glukonat-permeable Anionenkanäle würden daher ein V_{rev} im positiven Spannungsbereich zeigen. Das beobachtete Umkehrpotential des strahlungsinduzierten Stroms in den K562 Zellen ($V_{rev} = -35$ mV; Abb. 3.1B) deutet daher darauf hin, dass ionisierende Strahlung in den K562-CML-Zellen einen nichtselektiven Kationen-Strom induziert mit einer abgeschätzten relativen Permeabilität (P) von $P_{Ca}/P_K = 0.13$ für Ca^{2+} .

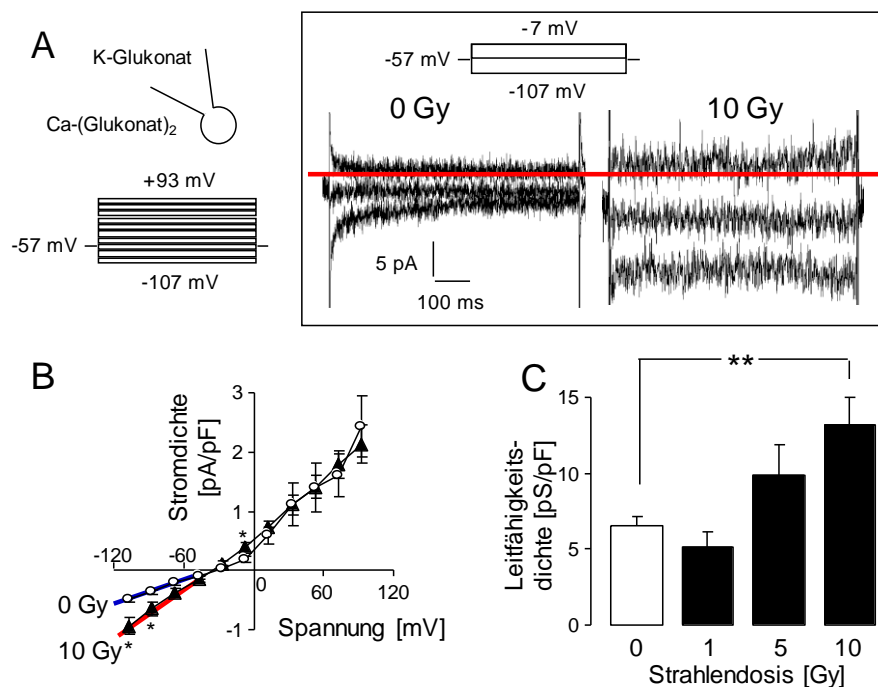


Abb. 3.1. Ionisierende Strahlung stimuliert in K562-CML-Zellen Ca^{2+} -permeable Kanäle. **A.** Stromspuren von Ganzzell-Ableitungen, die in einer Kontroll- (0 Gy, links) und einer bestrahlten (10 Gy, rechts) K562-Zelle mit K-D-Glukonat Pipetten- und Ca-D-(Glukonat)₂ Badlösung aufgenommen wurden (die rote Linie zeigt den Null-Stromwert an). Die Zeichnung (links unten) verdeutlicht das verwendete Pulsprotokoll der Spannungsklemme. Zur einfacheren Darstellung sind (rechts) nur die Stromspuren der Spannungssprünge auf -107, -57 und -7 mV gezeigt. **B.** Beziehung der gemittelten (\pm SE) Ganzzell-Stromdichte und der Spannung in Kontroll- (weiße Kreise, $n = 13$) und bestrahlten K562-Zellen (10 Gy, schwarze Dreiecke, $n = 8$). **C.** Gemittelte (\pm SE) Leitfähigkeitsdichte 1-5 h nach Bestrahlung von Kontrollzellen (0 Gy, weißer Balken, $n = 15$) und

bestrahlter K562-Zellen (1, 5, oder 10 Gy, schwarzer Balken, n = 5-8). Die Leitfähigkeitsdichte wurde für die Einwärtsströme durch lineare Regression der Strom-Werte zwischen -47 und -107 mV Spannung berechnet (wie durch die blaue und rote Linie in Teilabbildung (B) angezeigt; *: $p \leq 0.05$, Welch-korrigierter t-Test und **: $p \leq 0.01$, ANOVA; nach (Heise et al., 2010) verändert).

Ca^{2+} -permeable Kanäle zeigen häufig einen sogenannten anormalen Molfraktionseffekt. Hierbei besitzen Ca^{2+} -permeable Kationen-Kanäle in der Abwesenheit von Ca^{2+} eine deutlich höhere Einzelkanalleitfähigkeit als in dessen Anwesenheit. Zum Beispiel agieren Ca^{2+} -selektive Kanäle wie nichtselektive Kationen-Kanäle, wenn sie mit EGTA-gepufferten, Ca^{2+} -freien Lösungen abgeleitet werden. Sie diskriminieren also nicht zwischen Na^+ - und K^+ -Ionen. Aufgrund der – bezogen auf K^+ oder Na^+ – viel höheren Affinitäten der Bindungsstellen in der Kanalpore zu Ca^{2+} und der damit verbundenen langen Bindungszeiten erniedrigen schon geringe (μM) Konzentrationen von Ca^{2+} in den Ableitlösungen kompetitiv die Leitfähigkeit dieser Kanäle und verändern diese in hoch Ca^{2+} -selektive Kanäle. Das nächste Experiment analysierte den anormalen Molfraktionseffekt der strahleninduzierten Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen in den K562-CML-Zellen.

Hierzu wurden wiederum bestrahlte (0 und 10 Gy) K562-Zellen im Ganzzell-Modus abgeleitet unter Verwendung von Ca^{2+} -freiem (EGTA) K^+ -D-Glukonat⁻ (10 mM Cl⁻) in der Pipetten- und K^+ -D-Glukonat⁻ in der Badlösung sowie dem in Abb. 3.2 A, links, gezeigten Pulsprotokoll. Die Badlösung enthielt ferner entweder 1 mM Ca^{2+} -(D -Glukonat⁻)₂ oder 1 mM Na_3 -EGTA. Herausnehmen von Ca^{2+} aus dem Bad durch Umschalten von der Ca^{2+} -haltigen auf die EGTA-haltige Superfusion des Bades erhöhte reversibel die Einwärtsströme (Abb. 3.2 A). Dabei zeigte die Ca^{2+} -inhibierte Stromfraktion eine deutliche Einwärtsrektifizierung (Abb. 3.2 A, rechts). Diese war signifikant größer in 10 Gy- als in 0 Gy-vorbestrahlten Zellen (Abb. 3.2 B). Dies wird auch durch die für die Einwärtsströme berechneten mittleren Leitfähigkeitsdichten in Abb. 3.2 C verdeutlicht. Somit deuten auch die Experimente zu dem anormalen Molfraktionseffekt auf einen einwärtsrektifizierenden, nichtselektiven Ca^{2+} -permeablen Kationenkanal, der in

K562-CML-Zellen durch TBI-relevante Strahlendosen innerhalb weniger Stunden induziert wird. Diese Daten wurden in (Heise et al., 2010) publiziert.

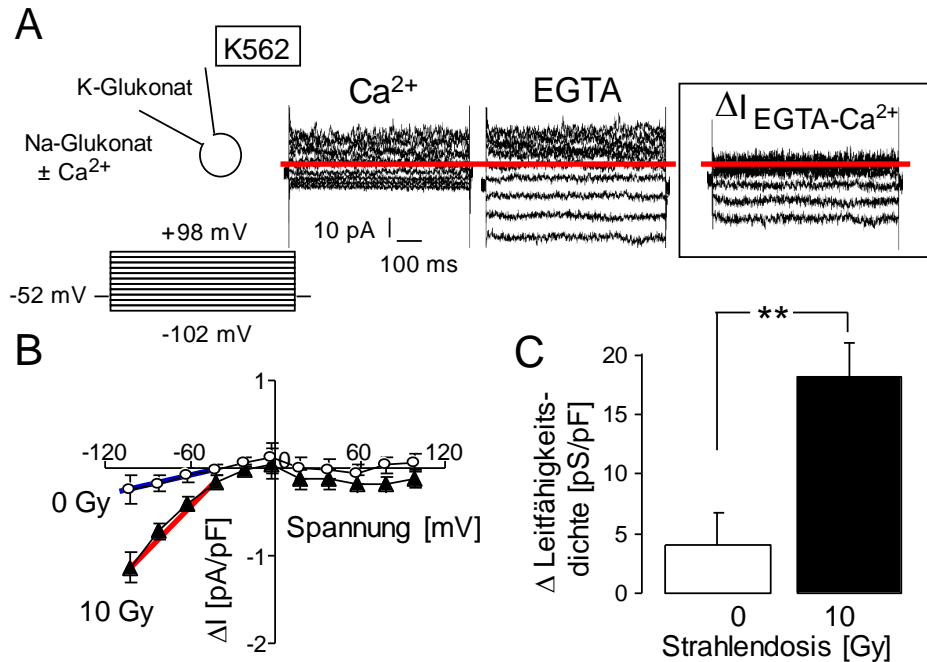


Abb. 3.2. Ionisierende Strahlung stimuliert in K562-CML-Zellen einen einwärts-gleichrichtenden nichtselektiven Kationenkanal, der durch extrazelluläres Ca^{2+} gehemmt wird. **A.** Ganzzell - Stromspuren, die von einer bestrahlten (10 Gy) K562-Zelle mit K-D-Glukonat-Pipetten- und Na-D-Glukonat-Badlösung aufgenommen wurden. Letztere enthielt zunächst 1 mM Ca^{2+} (linke Stromspuren), das dann durch Einwaschen von EGTA (3 mM)-haltiger Ca^{2+} -freier Na-D-Glukonat-Lösung aus der Badlösung entfernt wurde (mittlere Stromspuren). Der Abbildungsteil A, unten-links und die roten Linien zeigen das applizierte Pulsprotokoll bzw. den Null-Stromwert. Die berechneten rechten Stromspuren verdeutlichen die durch Ca^{2+} gehemmte Stromfraktion, die über den Differenzstrom $\Delta I = I_{\text{EGTA}} - I_{\text{Ca}}$ berechnet wurde. **B.** Spannungsabhängigkeit der gemittelten (\pm SE; $n = 6$) durch extrazelluläres Ca^{2+} gehemmten Stromdichte und **C.** daraus berechnete Leitfähigkeitsdichte in Kontroll- (0 Gy, weiß) und bestrahlte (10 Gy, 1.5-4 h nach Radiatio, schwarz) K562-Zellen. Die Leitfähigkeitsdichten wurden wie in der vorherigen Abbildung durch lineare Regression der Stromdichte-Fractionen zwischen -42 und -102 mV berechnet (rote und blaue Linie in (B)), **: $p \leq 0.01$, zweiseitiger t-Test (nach (Heise et al., 2010), verändert).

Ca^{2+} -Einstromwege der Plasmamembran sind häufig in Komplexen mit K^{+} -selektiven Kanälen. Ca^{2+} -Einstrom verursacht lokal eine starke Depolarisation des Membranpotentials, welche wiederum die elektrochemische einwärtsgerichtete

Triebkraft für Ca^{2+} abmildert. Die Ca^{2+} - oder Depolarisation-vermittelte Aktivierung vergesellschafteter K^+ -Kanäle repolarisiert bzw. stabilisiert das Membranpotential und hält so die einwärtsgerichtete elektrochemische Triebkraft für Ca^{2+} aufrecht, die zu robusten Ca^{2+} -Signalen benötigt wird. Die nächsten Experimente untersuchten deswegen die Aktivität spannungsabhängiger K^+ Kanäle in K562-CML-Zellen.

3.1.3 K_v -Ströme in der Plasmamembran von bestrahlten CML-Zellen

Spannungsaktivierte (K_v) K^+ -Kanäle lassen sich in Ganzzell-Patch-Clamp-Ableitungen durch schnelle depolarisierende Rechteck-Spannungssprünge von einem negativen Haltepotential (zum Beispiel -50 mV) aktivieren. Neben der Pharmakologie können die dabei beobachteten Zeitkonstanten der Aktivierungs-, eventuell Inaktivierungs- (bei anhaltender Depolarisation) und Deaktivierungs- (bei Repolarisation des Spannungssprungs) Kinetiken zusammen mit der Spannungsabhängigkeit (Spannung der halbmaximalen Aktivierung) zur Identifizierung der beteiligten K_v -Kanaltypen herangezogen werden. Werden physiologische Salzlösungen zur Ableitung verwendet (i.e., pH 7.2-gepufferte, EGTA-gepufferte Ca^{2+} -freie, Mg-ATP-haltige K^+ -reiche Pipettenlösung mit niedriger Cl-Konzentration, kombiniert mit einer pH 7.4-gepufferten NaCl-reichen Badlösung mit D-Glukose und 5 mM KCl), dann erzeugen K_v K^+ -Kanäle deutliche auswärtsrektifizierende Strom/Spannungs-Beziehungen, da sie erst ab einer bestimmten depolarisierenden Spannung beginnen zu aktivieren und Auswärtsströme zu generieren. Diese Abhängigkeit der K_v K^+ -Kanäle von der Spannung kann in der Zelle moduliert werden (Winklhofer et al., 2003) und somit das Schwellenpotential der Aktivierung verändert werden. Letzteres bedeutet, dass die Kanäle in anderen Spannungsfenstern aktiv sind, und dies hat wiederum Auswirkungen auf das Membranpotential.

Diese Arbeit untersuchte deswegen zunächst das Membranpotential von K562-Zellen 1-3 h nach Bestrahlung mit 0 bzw. 5 Gy (hier und in den allermeisten der nachfolgenden Experimenten wurden 5 Gy anstelle von 10 Gy als maximale Strahlendosis verwendet, da 10 Gy-bestrahlte Zellen sich extrem schwer ableiten ließen). Hierzu wurde die Membranspannung der Zellen mit physiologischen Lösungen (siehe oben) in der Ganzzell-0 pA-Stromklemme abgeleitet (Abb. 3.3 A). Durch Auswaschen der NaCl-reichen physiologischen Badlösung mit einer KCl-reichen Badlösung wird E_K von ca. -85 mV auf 0 mV experimentell verschoben. Dabei wird das Membranpotential, das ja zum Großteil ein K^+ -Diffusionspotential darstellt, genullt, wodurch im Experiment direkt gewährleistet werden kann, dass artifizielle Offset-Potentiale vernachlässigbar sind.

Bestrahlung mit 5 Gy induzierte in den K562-CML-Zellen eine Hyperpolarisation des Membranpotentials, die allerdings nicht ganz das Signifikanzniveau von $p \leq 0.05$ erreichte (Abb. 3.3 A, B). Zudem erhöhte die Bestrahlung mit 5 Gy (aber nicht mit 1 Gy) hauptsächlich die Auswärtsströme (Abb. 3.3 D, E), wenn die Zellen in der Spannungsklemme abgeleitet wurden. Die Auswärts-Stromdichte (Abb. 3.3 E, links) und die daraus berechnete Leitfähigkeitsdichte (Abb. 3.3 E, rechts) war bei den 5 Gy-bestrahlten Zellen etwa um Faktor 2 höher als bei 0 Gy- (und auch 1 Gy-) bestrahlten Zellen. Die 5 Gy-strahlungsinduzierte Stromfraktion (ΔI , graue Kurve in Abb. 3.3 D) zeigt dabei einen für K_v -Kanäle typischen (siehe oben) auswärtsrektifizierenden Spannungsverlauf mit einem V_{rev} nahe E_K . Dies weist den strahlungsinduzierten Strom als K^+ -selektiv aus. Diese Ströme aktivierten dabei spannungsabhängig mit einer Zeitkonstante von $T \approx 1$ ms (gemessen nach Spannungssprüngen auf +25 mV). Bei Spannungen > 0 mV inaktivierten die Auswärtsströme zeitabhängig (Abb. 3.3 C, rechts) mit einer Zeitkonstante von $T \approx 40$ ms (gemessen wiederum bei +25 mV). K^+ -Selektivität, spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivieren weisen die radiogenen Ströme somit als typische K_v -Ströme aus.

Zur genaueren Analyse der Spannungsabhängigkeit des radiogenen K_v -Stroms wurde die Strom/Spannungs-Abhängigkeit von 5 Gy-bestrahlten K562-Zellen nochmals mit kürzeren Spannungssprung-Intervallen (5 mV anstelle von 20 mV Inkrement, Abb. 3.3 F, Box) aufgenommen. Werden nun aus der Steigung der Strom/Spannungs-Abhängigkeit für die Einwärtsströme die biologischen „Leck“-Ströme (i.e. die Summe aller nicht- K_v -Stromfraktionen) berechnet, diese über den gesamten Spannungsbereich extrapoliert und dann die extrapolierten „Leck“-Ströme von den Gesamtströmen abgezogen, lässt sich die (normalisierte) K_v -Stromfraktion isolieren (Abb. 3.3 G). Werden nun überlappend über jeweils 3 benachbarte Spannungspunkte die nun auf den Maximalwert normalisierte Leitfähigkeit für den ansteigenden Bereich der Strom-Spannungs-Abhängigkeit berechnet (Abb. 3.3 H), lassen sich über Anpassen einer Boltzmann-Funktion an die Leitfähigkeit-Spannung-Beziehung eine halbmaximale Aktivierung bei $V_{1/2} = -44 \pm 5$ mV ($n = 5$) berechnen.

Vergleichende Expressionsanalysen in K562-Zellen zeigten eine sehr hohe $K_v3.4$ (*kcnc4*) mRNA-Abundanz (Palme et al., 2013). Inwieweit $K_v3.4$ -Kanäle zu den strahlungsinduzierten K_v -Strömen beitragen, wurde durch pharmakologische (BDS-II) Blockade bzw. RNA-Interferenz ermittelt. Hierzu wurden bestrahlte (5 Gy) K562-Zellen sowie $K_v3.4$ siRNA- bzw. nontargeting RNA-transfizierte Zellen mit dem bereits in Abb. 3.3 C beschriebenen Protokoll im Ganzzell-Modus abgeleitet. Sowohl Bad-Applikation von BDS-II (2 μ M, Abb. 3.4 A, B) als auch Knockdown von $K_v3.4$ (Abb. 3.4 C, D) erniedrigten die Ganzzell-Ströme in 5 Gy-bestrahlten K562-Zellen. Die BDS-II-sensitive und $K_v3.4$ -abhängige Stromfraktionen (ΔI , graue Kurve in Abb. 3.4 B bzw. 3.4 D) zeigten dabei eine ähnliche Spannungsabhängigkeit wie die strahleninduzierte Stromfraktion (ΔI , graue Kurve in Abb. 3.3 D), woraus geschlossen werden kann, dass $K_v3.4$ -Kanäle zu den radiogenen K_v -Strömen in K562-CML-Zellen beiträgt. Diese Daten wurden in (Palme et al., 2013) publiziert. Neben $K_v3.4$ wurden hERG1-Kanäle in CML-Zellen beschrieben.

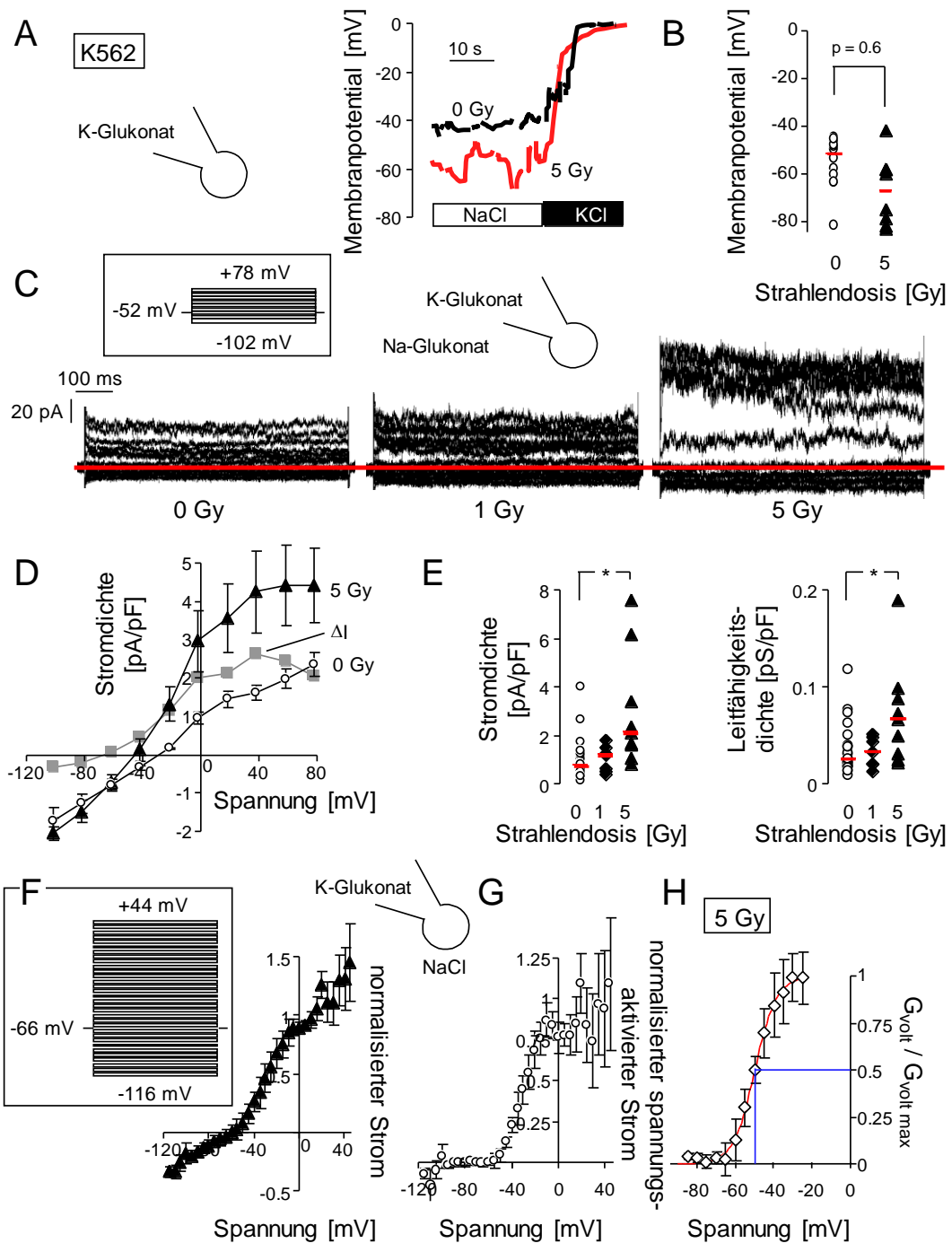


Abb. 3.3. Ionisierende Strahlung stimuliert in K562-CML-Zellen spannungsaktivierte Kv K⁺-Kanäle und hyperpolarisiert das Membranpotential. **A.** Membranspannung/Zeit-Verlauf aufgenommen im Ganzzell-0 pA-Stromklemmmodus mit K-D-Glukonat-Pipetten- und NaCl- sowie KCl-Badlösung

einer Kontroll- (0 Gy, schwarze Linie) und einer 5 Gy-bestrahlten (rote Linie) K562-Zelle. **B.** Membranpotentiale von 0 Gy- (n= 12, offene Kreise) und 5 Gy-bestrahlten (n = 8, 1.7 ± 0.2 h nach Bestrahlung, geschlossene Dreiecke) von K562-Zellen abgeleitet wie in (A) mit NaCl-Badlösung (individuelle Werte und Mediane als rote Linien). **C.** Ganzzell-Stromspuren einer K562-Kontrollzelle (0 Gy, linke Stromspuren) und Zellen, die mit 1 Gy (mittlere Stromspuren) oder 5 Gy (rechte Stromspuren) bestrahlt wurden. Die Ströme wurden mit K-D-Glukonat Pipetten- und Na-D-Glukonat-Badlösung in der Ganzzell-Spannungsklemme abgeleitet. Das Insert und die roten Linien zeigen das verwendete Pulsprotokoll bzw. den Null-Stromwert. **D.** Beziehung zwischen mittleren (± SE, n = 9-26) Spitzen-Stromdichten und der Klemmspannung von Kontroll- (0 Gy) und bestrahlten K562-Zellen (5 Gy, 2.8 ± 0.4 h nach Bestrahlung), aufgenommen in (A). Die graue Kurve (ΔI) berechnet sich aus der Stromspitzen-Dichten-Differenz zwischen 0 Gy- und 5 Gy-bestrahlten Zellen. **E.** Dichten der Auswärts-Spitzenströme (links) und der Leitfähigkeit (rechts) von Kontroll- (0 Gy, offene Kreise) und 1 Gy- (geschlossene Rauten) bzw. 5 Gy-bestrahlten (geschlossene Dreiecke) K562-Zellen. Die Stromdichten wurden nach Spannungssprüngen auf 0 mV analysiert, die Leitfähigkeiten aus den Spitzenströmen der Spannungen -42 bis -2 mV berechnet. Die Symbole und roten Linien zeigen individuelle Werte (n = 7-26) bzw. Mediane, die 3.2 ± 0.6 h und 2.8 ± 0.4 h nach Bestrahlung mit 0 Gy bzw. 5 Gy wie in (C) abgeleitet wurden. * : p ≤ 0.05, Kruskal-Wallis-Test (nicht-parametrischer ANOVA). **F, G.** Beziehung zwischen mittleren (± SE, n = 5) normalisierten Spitzenströmen (F) bzw. mittlerer spannungsaktivierte Stromfraktion (G) und der Klemmspannung von bestrahlten (5 Gy, 1.8 ± 0.6 h nach Bestrahlung) K562-Zellen, aufgenommen mit dem gekennzeichneten Pulsprotokoll mit K-D-Glukonat Pipetten- und NaCl-Badlösung. Die spannungsaktivierte Stromfraktion wurde aus (F) berechnet durch Subtraktion der extrapolierten biologischen „Leck“-Stromfraktion, die in dem Spannungsbereich zwischen -116 und -56 mV durch lineare Regression definiert wurde, vom Gesamt-Spitzenstrom. **E.** Beziehung zwischen der mittleren normalisierten Leitfähigkeit ($G_{\text{volt}} / G_{\text{volt max}}$, ± SE, n = 5) und der Klemmspannung berechnet aus den Daten in (E) mit Boltzmann-Fit (rote Linie) und halbmaximale Aktivierungsspannung ($V_{1/2}$, blaue Linie; nach (Palme et al., 2013), verändert).

3.1.4 hERG-Ströme in der Plasmamembran von bestrahlten CML-Zellen

K_v-Kanäle vom hERG1 (human ether-á-go-go-related-1, Kv11.1, *kcnh2*)-Typ aktivieren wie K_v3.4-Kanäle durch Depolarisation des Membranpotentials. Im Gegensatz zu Letzteren inaktivieren hERG-Kanäle sofort wieder vollständig und bleiben während des gesamten Depolarisationsintervalls inaktiv. Bei der Repolarisation des Membranpotentials wird die Inaktivierung aufgehoben und dies mit schnellerer Kinetik als die Repolarisation-bedingte Deaktivierung (i.e., das Abschalten) der Kanäle. Somit leiten die hERG1-Kanäle während der Repolarisation des Membranpotentials K⁺. Bei physiologischer intra-/extrazellulärer K⁺-Verteilung führt dies zu einer Beschleunigung der Repolarisation.

Elektrophysiologisch lassen sich hERG1-Kanäle nach Repolarisation von depolarisierenden Prä-Pulsen als deaktivierende „Tail“-Ströme messen. In dieser Arbeit wurden eine mögliche radiogene Aktivierung von hERG1 in K562-CML-Zellen mit zwei verschiedenen Protokollen untersucht.

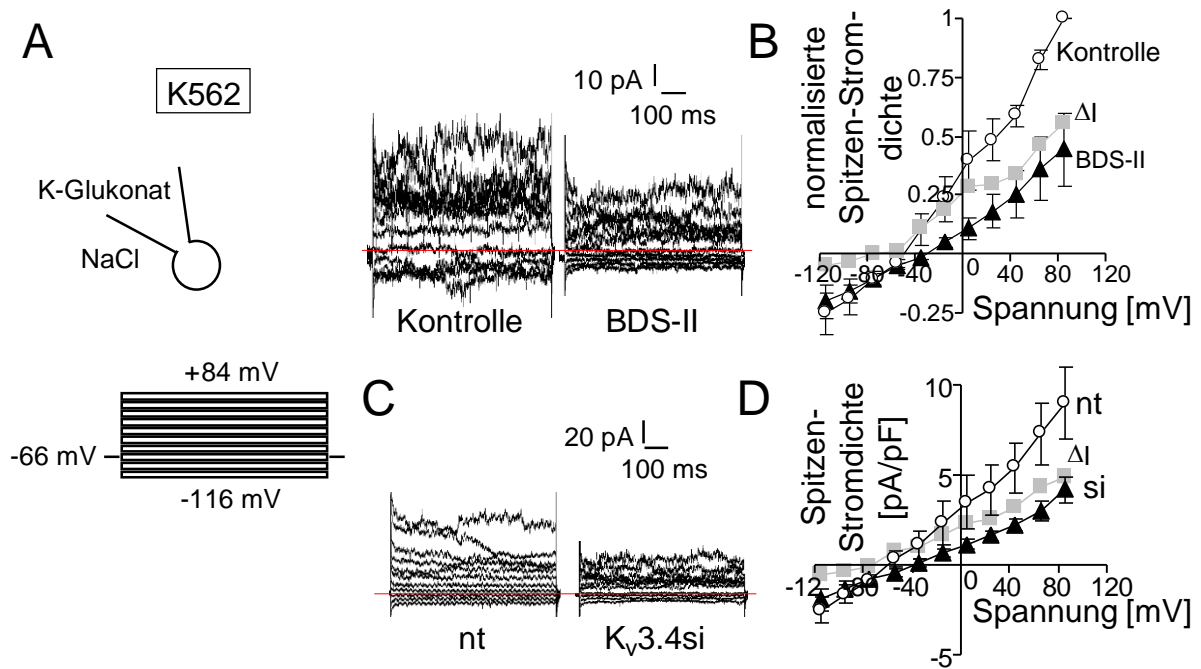


Abb. 3.4. Blockade oder Knockdown von Kv3.4 hemmt den strahlungsinduzierten auswärtsrektifizierenden Kv K⁺-Strom in K562-CML-Zellen. **A, B.** Stromspuren (A) und mittlere (\pm SE, $n = 3$) normalisierte Spitzen-Stromdichten/Spannungs-Beziehungen (B), die in gepaarten Experimenten in bestrahlten (5 Gy, 2.6 ± 0.8 h nach Bestrahlung) K562-Zellen mit K-D-Gukonat-Pipetten- und NaCl-Badlösung vor (Kontrolle, A, links, und B, offene Kreise) und während der Zugabe des Kv3.4 Inhibitors BDS-II ($2 \mu\text{M}$, A, rechts, und B, geschlossene Dreiecke) zur Badlösung aufgenommen wurden. Die graue Kurve in (B) zeigt die berechnete BDS-II-sensitive Stromfraktion ΔI . Der Abfallsteil A, unten-links, und die roten Linien zeigen das applizierte Pulsprotokoll bzw. den Null-Stromwert. **C, D.** Stromspuren (C) und mittlere (\pm SE, $n = 9-11$) Spitzen-Stromdichten/Spannungs-Beziehungen (D), die in bestrahlten (5 Gy, 2.1 ± 0.3 h nach Bestrahlung) K562-Zellen wie in (A) abgeleitet wurden. Die K562-Zellen waren entweder mit nichtkodierender (nt, A, links, und B, offene Kreise) oder mit Kv3.4 siRNA (si, A, rechts, und B, geschlossene Dreiecke) vorbehandelt. Die graue Kurve in (D) zeigt die berechnete durch Kv3.4 Knockdown geminderte Stromfraktion ΔI (nach (Palme et al., 2013), verändert).

Im ersten Protokoll wurden bestrahlte (0, 1 und 5 Gy) K562-Zellen mit K-D-Glukonat in Bad- und Pipettenlösung im Ganzzell-Modus abgeleitet. Das Pulsprotokoll (Abb. 3.5 A) wurde entweder von einem Haltepotential von -50 mV (hERG1 weitestgehend deaktiviert) oder +40 mV (hERG1 weitestgehend aktiv aber inaktiviert) ausgelöst. Nach hyperpolarisierenden Spannungssprüngen wurden die schnell deaktivierenden K⁺-Einwärtsströme (abgelesen wurden jeweils die Spitzenwerte) analysiert. Wie in den Originalströmen in Abb. 3.5 A und in der berechneten Haltepotential-abhängigen Fraktion(ΔI) der Spitzen-Strom-Dichten im Einschub von Abb. 3.5 B, rechts, zu sehen, verursacht das Umschalten von einem -50 mV auf ein +40 mV Haltepotential bei allen Strahlungsdosen deaktivierenden Einwärts-„Tail“-Ströme. In den Originalstromspuren in Abb. 3.5 A ist dies insbesondere nach Spannungssprüngen auf -60 und -80 mV (dargestellt durch die zweiten und dritten übereinandergelagerten Stromspuren von unten) zu sehen, da bei Sprüngen auf -100 mV die „Tail“-Ströme auch schon bei einem Haltepotential von -50 mV auftraten. Dies bestätigt die beschriebene (Cavarra et al., 2007) funktionelle Expression von hERG1-Kanälen in K562-Zellen. Vorbestrahlung mit 1 und 5 Gy erhöhten diese „Tail“-Ströme (Abb. 3.5 A) und die daraus berechneten Spitzen-Strom-Dichten (Abb. 3.5 B) und Spitzen-Leitfähigkeit-Dichten (Abb. 3.5 C), wobei dieses Phänomen bei 5 Gy-vorbestrahlten Zellen auch bei einem Haltepotential von -50 mV (Abb. 3.5 B,C, jeweils links) beobachtet werden konnte. Dies könnte auf eine veränderte Spannungsabhängigkeit der hERG1-Kanäle nach Bestrahlung hindeuten.

Zur genaueren Analyse der Spannungsabhängigkeit der hERG1-Kanäle mit einem zweiten Protokoll wurden 0 bzw. 5 Gy- vorbestrahlte K562-Zellen im Ganzzell-Modus wiederum mit K-D-Glukonat in Bad- und Pipettenlösung abgeleitet und die Membranspannung ausgehend von Prä-Pulsen zwischen -100 mV und +40 mV (5 mV Inkrement) auf -100 mV hyperpolarisiert (Pulsprotokoll in Abb. 3.6 A, Box) und die deaktivierenden Einwärts-„Tail“-Ströme vor (Abb. 3.6 A, links), während (Abb. 3.6 A, Mitte) und nach (Abb. 3.6 A, rechts) Bad-Applikation des hERG1-Inhibitors

E4031 (1 μM) gemessen. In Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Experiment, erhöhte Vorbestrahlung die E4031-sensitiven Einwärts-„Tail“-Ströme in den K562-Zellen (Abb. 5.6 B, C). Werden nun die E4031-sensitiven Einwärts-„Tail“-Ströme von 0 Gy- (Abb. 5.6 C, schwarz) und 5 Gy- vorbestrahlten (Abb. 5.6 C, rot) K562-Zellen übereinander gegen die Prä-Puls-Spannung aufgetragen, zeigt sich eine deutliche Verschiebung der spannungs-induzierten Aktivierung um etwa - 20 mV. Dies bedeutet, dass hERG1 ähnlich wie $K_v3.4$ durch ionisierende Strahlen in ihrer Aktivität erhöht werden. Die Daten zu hERG1 wurden in (Palme et al., 2020) veröffentlicht.

3.1.5 T-Zell Leukämie

Die T-Zell akute lymphatische (lymphoblastische) Leukämie (T-ALL) ist eine T-Zell-Vorläufer-Neoplasie, die 25% aller ALL im Erwachsenenalter zugrunde liegt (Cahu et al., 2016). Die T-ALL-Therapie beinhaltet intensive Chemotherapie mit wechselnden Zytostatika-Kombinationen und gegebenenfalls Strahlentherapie und Stammzelltransplantation. Bei Letzterer kommt auch myeloablative Konditionierung durch TBI zum Einsatz (Cahu et al., 2016). In der Jurkat-Zelllinie, die aus peripheren Blut eines 14 Jährigen mit T-ALL etabliert werden konnte (Schneider et al., 1977), wurden nicht-selektive TRPM2 (Melastatin-Familien-Mitglied-2 der transient receptor potential-Superfamilie)-Kanäle beschrieben (Sano et al., 2001). TRPM2-Kanäle sind deswegen interessant, weil sie initial als „Todeskanäle“ klassifiziert wurden (Hara et al., 2002) (Ishii et al., 2007). Mechanistisch wurde dabei eine Aktivierung der Ca^{2+} -permeablen TRPM2-Kanäle durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben, die dann Ca^{2+} -vermittelt Apoptose in den Zellen auslöste.

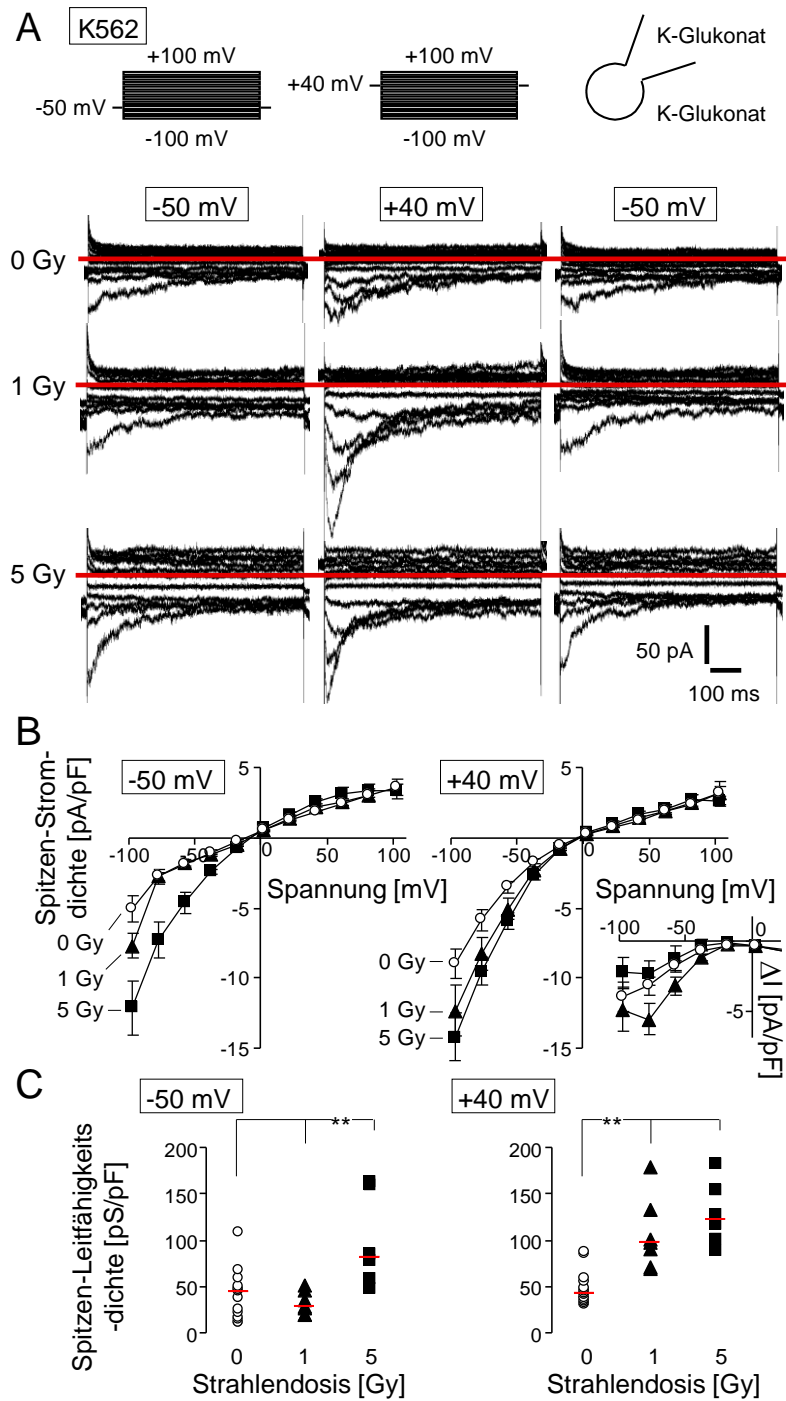


Abb. 3.5. Ionisierende Strahlung modifiziert spannungsaktivierte hERG1-ähnliche K⁺ Kanäle in K562-CML-Zellen. **A.** Stromspuren, aufgenommen mit K-D-Gluconat-Pipetten- und Badlösung im Ganzzell-Modus von einer Kontroll- (obere Spuren) und zwei mit 1 Gy- (mittlere Spuren) bzw. 5 Gy- (untere Spuren) vorbestrahlten K562-Zellen. Das Pulsprotokoll (A, oben) wurde entweder von einem Haltepotential von -50 mV (jeweils linke und rechte Spuren) oder nach Depolarisation der

Membran durch ein Haltepotential von + 40 mV (jeweils mittlere Spuren) aus appliziert. Rote Linien zeigen den Null-Stromwert. **B.** Beziehung zwischen mittlerer (\pm SE, n = 6-15) Spitzen-Stromdichte und Klemmspannung in Kontroll- (0 Gy, offene Kreise) und bestrahlten K562-Zellen (1 Gy, geschlossene Dreiecke und 5 Gy, geschlossene Rechtecke) abgeleitet wie in (A) mit -50 mV (links) und +40 mV (rechts) Haltepotential. Das Insert zeigt die berechnete mittlere (\pm SE) Haltepotential-abhängige Fraktion der Spitzenstromdichte von Kontroll- (offene Kreise), 1 Gy- (geschlossene Dreiecke) und 5 Gy- (Geschlossene Rechtecke) vorbestrahlten K562 Zellen. **C.** Spitzen-Leitfähigkeitsdichte (Symbole und rote Linien zeigen individuelle Werte bzw. Mediane, n = 6-15) in Kontroll- (0 Gy, offene Kreise) und bestrahlten K562-Zellen (1 Gy, geschlossene Dreiecke und 5 Gy, geschlossene Rechtecke) abgeleitet wie in (A) mit -50 mV (links) und +40 mV (rechts) Haltepotential. Die Leitfähigkeiten wurden aus den Daten in (B) für die Spitzen-Stromdichten im Spannungsbereich zwischen -20 und -60 mV berechnet. **: $p \leq 0.01$, ANOVA (nach (Palme et al., 2020), verändert).

Neben der direkten Radikalbildung während Energieabsorption durch vornehmlich Wasser-Moleküle in bestrahlten Zellen, verursacht ionisierende Strahlung noch Stunden nach der eigentlichen Bestrahlung die Bildung von ROS durch Mitochondrien in einem Ca^{2+} -abhängigen Prozess. Diese verspätete ROS-Bildung trägt auch zur DNA- und Zellschädigung bei (Eckert et al., 2019). Der zweite Themenkomplex dieser Arbeit untersuchte deswegen die Fragestellung, inwieweit ionisierende Strahlung Ca^{2+} -permeable TRPM2-Kanäle aktiviert, als einen möglichen initialen Schritt bei der verspäteten mitochondrialen Sauerstoffradikal-Bildung in bestrahlten Zellen. In der Arbeitsgruppe Experimentelle Radioonkologie waren neben den parentalen Jurkat T-ALL-Zellen auch Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)-überexprimierende, Apoptose-resistente Jurkat-Zellen verfügbar. Bcl-2 hemmt in der äußeren mitochondrialen Membran die Apoptose und sollte gemäß der angenommenen „Todeskanal“-Funktion von TRPM2 ein Gegenspieler des Kanals sein.

3.1.6 Funktionelle Expression von TRPM2 in T-ALL-Zellen

TRPM2-Kanäle werden vermutlich nicht direkt durch ROS, sondern indirekt über Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR) aktiviert, das C-terminal an den Kanal bindet

(Perraud et al., 2005). ADP-Ribose entsteht nach DNA-Schädigung durch die Aktivierung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen(PARPs)-Reparaturenzymen mit anschließender Freisetzung von ADP-Ribose aus den ADPR-Polymeren durch Glykohydrolasen (Eisfeld and Läckhoff, 2007, Fonfria et al., 2004). Mitochondrien stellen eine weitere Quelle von ADP-Ribose dar (Dolle et al., 2017). In dem Experiment wurden die Ganzzell-Ströme von Jurkat-Zellen mit physiologischen Bad- und Pipetten-Lösungen (wie in Abb. 3.3 A beschrieben) mit dem in Abb. 3.7 A, rechts, gezeigten Pulsprotokoll abgeleitet. Dabei wurde die Pipettenlösung entweder mit dem TRPM2-Aktivator ADP-Ribose (1 μ M) oder der entsprechenden Menge an Vehikel supplementiert. Zur pharmakologischen Hemmung der TRPM2-Kanäle wurde der Kationenkanal-Inhibitor ACA (20 μ M) im Bad appliziert.

Im Vergleich der ungepaarten Experimente waren die Ganzzell-Ströme (Abb. 3.7 A,B) und die ACA-sensitive Stromfraktion (Differenz zwischen offenen Kreisen und geschlossenen Dreiecken in Abb. 3.7, B) in den mit ADP-Ribose abgeleiteten Jurkat-Zellen (Abb. 3.7 A, 2. bis 4. Stromspur und 3.7 B, rechts) deutlich größer als die der mit Kontroll-Vehikel gemessenen Zellen (Abb. 3.7 A, 1. Stromspuren und 3.7 B, links). Die ACA-sensitive Stromfraktion in den ADPR-stimulierten Zellen (Abb. 3.7 B, rechts) zeigte ein V_{rev} im Bereich von -25 mV, ein Wert, der auf eine zu K^+ relativen Na^+ -Permeabilität von $P_{Na}/P_K = 0.4$ hindeutet. Die Analyse der Beziehung zwischen unitären Stromübergängen und Spannung (Abb. 3.7 C) ergab eine Einzelkanal-Leitfähigkeit im Bereich von 50 pS für die ADPR-stimulierbaren und ACA-inhibierbaren Kationenkanäle. Da eine Einzelkanalleitfähigkeit in diesem Bereich und eine leicht niedrigere Na^+ -Permeabilität bezogen auf K^+ für TRPM2-Kanäle beschrieben sind (Jiang et al., 2010), lassen sich aus diesen Daten eine funktionellen Expression von TRPM2-Kanälen in Jurkat T-ALL-Zellen schlussfolgern.

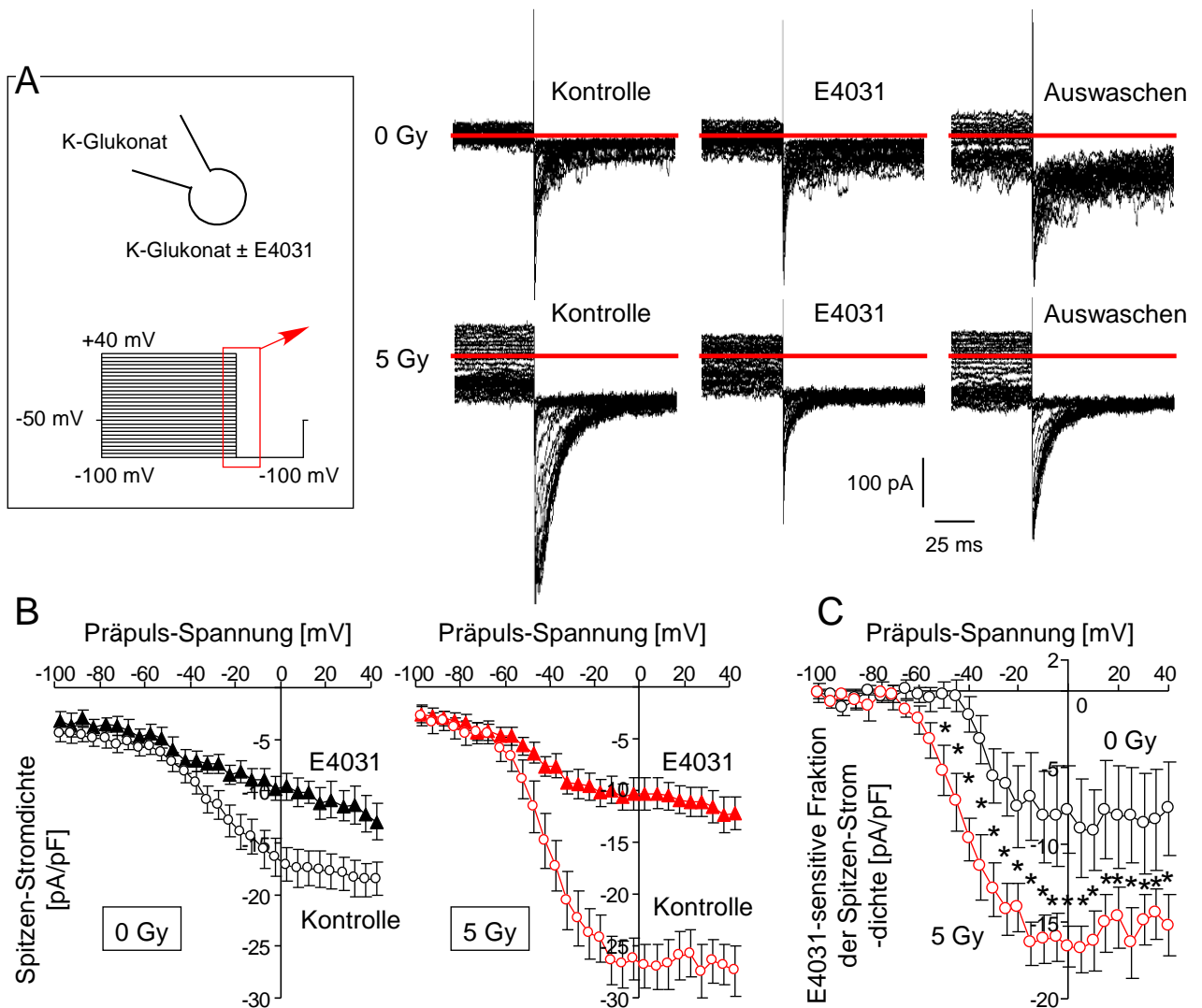


Abb. 3.6. Ionisierende Strahlung modifiziert spannungsaktivierte hERG1-ähnliche K⁺ Kanäle in K562 CML Zellen: Alternatives elektrophysiologisches Ableitprotokoll **A.** Stromspuren aufgenommen im Ganzzellmodus von einer Kontroll- (0 Gy, obere Linie) und einer 5 Gy-vorbestrahlten (untere Linie) K562 Zelle. Die Ströme wurden wie in dem Insert (A, links) dargestellt mit K-D-Glukonat Pipetten- und Badlösung während eines hyperpolarisierenden Spannungssprungs ausgehend von Prä-Pulsen zwischen -100 und +100 mV (5 mV Schritte) auf eine Klemmspannung von -100 mV aufgenommen. Die dabei hervorgerufenen deaktivierenden Einwärts-„Tail“-Ströme wurden vor (Kontrolle), während (E4031) und nach (Auswaschen) Bad Applikation des hERG1 Inhibitors E4031 (1 μ M) aufgenommen. Rote Linien zeigen den Null-Stromwert. **B.** Beziehung zwischen mittleren (\pm SE, n = 9-16) Spitzen-Stromdichte der deaktivierenden Einwärtsströme bei -100 mV Klemmspannung und Prä-Puls-Spannung Kontroll- (0 Gy, links) und 5 Gy-vorbestrahlten (rechts) K562 Zelle aufgenommen wie in (A) vor (offene Kreise) und während Applikation von E4031 (geschlossene Dreiecke). **C.** Aus (B) berechnete Beziehung zwischen mittlerer (\pm SE, n = 6-9) E4031-sensitiver Fraktion des deaktivierenden Einwärts-„Tail“-Stroms und der Prä-Puls-Spannung in Kontroll- (0 Gy, schwarz) und 5 Gy-vorbestrahlten (rot) K562 Zellen aufgenommen wie in (A). * : p \leq 0.05, zweiseitiger (Welch-korrigierter) t-Test (nach (Palme et al., 2020), verändert).

Das nächste Experiment untersuchte, inwieweit die Aktivität von TRPM2 in Jurkat-Zellen durch ionisierende Strahlung moduliert wird, und ob dies von dem Expressionslevel des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 abhängt.

3.1.7 Ionisierende Strahlung erhöht die TRPM2-ähnliche Ströme insbesondere in Bcl-2 überexprimierenden Zellen.

Der Vergleich von 0 bzw. 5 Gy bestrahlten Kontroll-Vektor mit Bcl-2-transfizierten Zellen (2-5 h nach Radiatio) zeigt eine strahlungsinduzierte ACA-sensitive Ganzzell-Stromfraktion in den Bcl-2-überexprimierenden Zellen (Abb. 3.8 A,B). In den Kontroll-Vektor transfizierten Jurkat-Zellen dagegen – das zeigen die für die Auswärtsströme berechneten Leitfähigkeitsdichten in Abb. 3.8 C – waren die basalen ACA-sensitiven Ströme größer als in den Bcl-2-überexprimierenden Zellen, wurden aber im Gegensatz zu den letzteren Zellen durch Bestrahlung mit 5 Gy nicht signifikant erhöht. Die strahlungsinduzierte Stromfraktion in den Bcl-2-überexprimierenden Zellen (Differenz zwischen geschlossenenen Dreiecken und offene Kreisen in Abb. 3.8 B) hatte ein V_{rev} , das negativer als -40 mV und damit auch deutlich negativer als das V_{rev} der ADPR-stimulierten und ACA-sensitiven TRPM2-Ströme (vergleiche Abb. 3.7 B, rechts) lag. Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass neben ACA-sensitiven TRPM2-ähnliche Strömen ionisierende Strahlung auch K^+ -selektive Ströme aktivierte, welche das V_{rev} des Gesamtstroms in Richtung E_K verschoben. Diese Möglichkeit wurde im nächsten Experiment getestet.

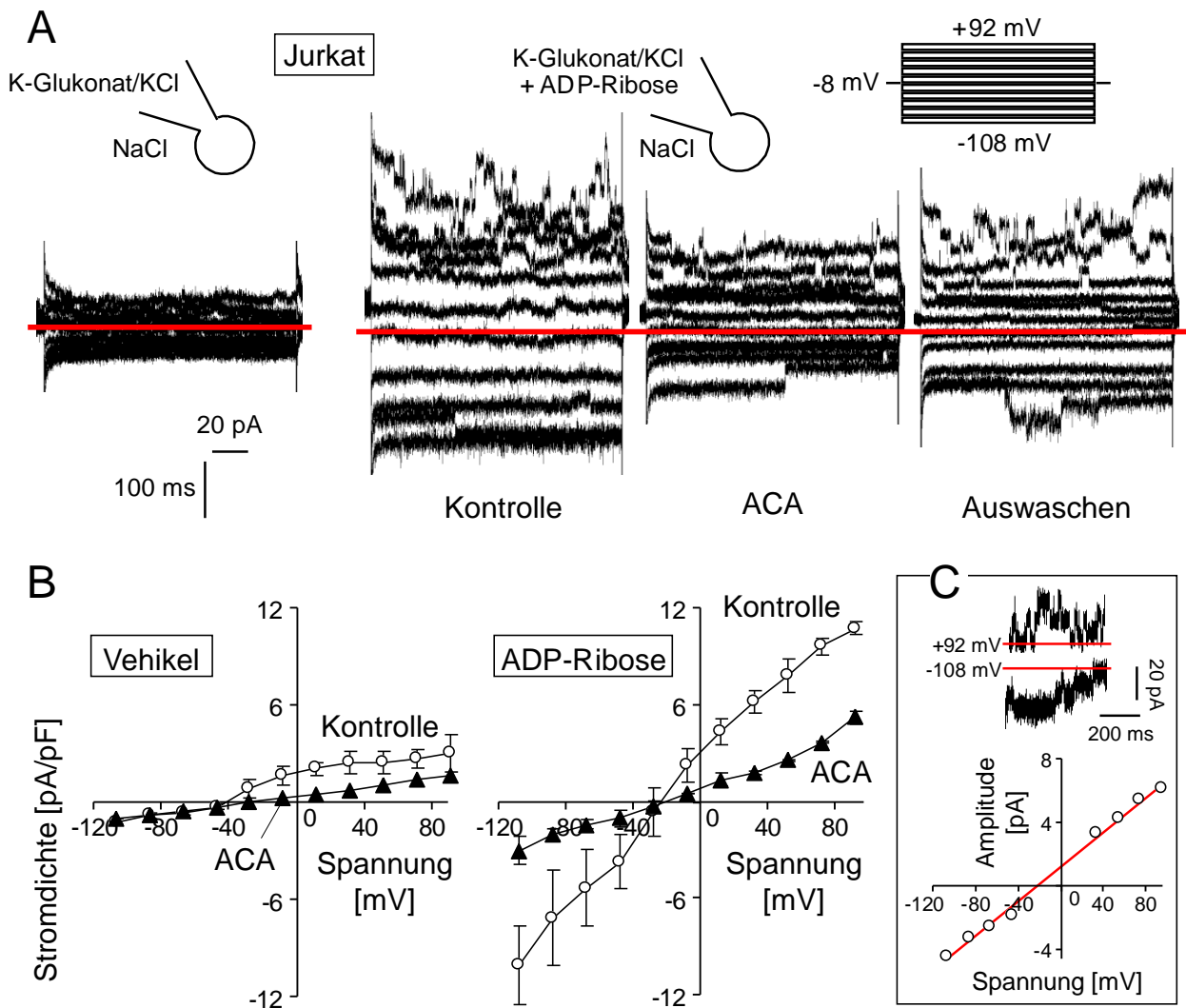


Abb. 3.7. T-Zell Leukämie-Zellen exprimieren funktionelle TRPM2-ähnliche Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle. **A.** Ganzzell-Stromspuren, abgeleitet in Bcl-2 überexprimierenden Jurkat T-ALL-Zellen mit NaCl-Bad- und K-D-Glukonat-Pipetten-Lösung (A, rechts oben, zeigt das verwendete Pulsprotokoll, die roten Linien geben den Nullwert des Stromes an). Die Ströme wurden entweder mit Vehikel (außen links) oder mit dem TRPM2-Agonisten ADPR ($1 \mu\text{M}$, Mitte links bis außen rechts) in der Pipettenlösung vor (Mitte links), während (ACA, Mitte rechts) und nach (Auswaschen, außen rechts) Bad-Applikation des Kationenkanal-Inhibitors ACA ($20 \mu\text{M}$) aufgenommen. **B.** Beziehung zwischen mittlerer (\pm SE, $n = 3$) Stromdichte und der Klemmspannung, abgeleitet wie in (A) von Bcl-2 überexprimierenden Jurkat Zellen ohne (links) und mit (rechts) TRPM2-Agonist ADPR in der Pipettenlösung vor (offene Kreise) und nach Zugabe des Kationenkanal-Inhibitors ACA (geschlossene Dreiecke). **C.** Einzelkanaleigenschaften, die wie in (A, Mitte links) mit ADPR in der Pipettenlösung im outside-out exzidiertem Patch abgeleitet wurden. Repräsentative Stromspuren bei +92 und -108 mV Klemmspannung (oben) und Kanalampplitude/Spnungs-Beziehung (unten). Letztere deutet auf eine Einzelkanalleitfähigkeit im Bereich von 50 pS (Steigung der Regressionsgeraden) hin.

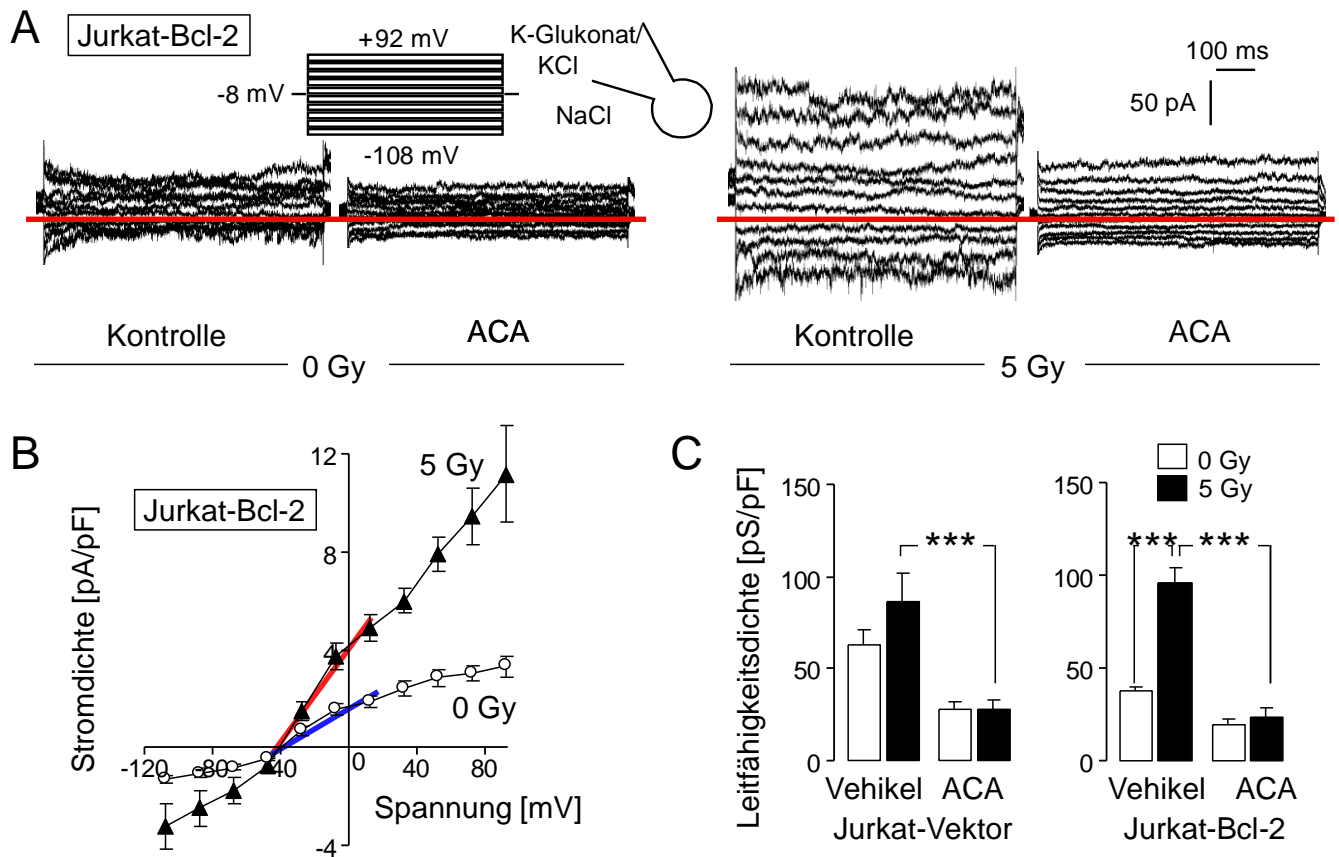


Abb. 3.8. Ionisierende Strahlung stimuliert die TRPM2-ähnlichen Kanäle in Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-T-Zell Leukämie-Zellen. **A.** Ganzzell-Ströme abgeleitet mit K-D-Glukonat-Pipetten- und NaCl-Bad-Lösung in einer 0 Gy- (erste und zweite Spuren) und einer 5 Gy-vorbestrahlten (dritte und vierte Spuren) Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zelle vor (erste und dritte Spur) und nach Einwaschen des Kationenkanal-Inhibitors ACA (20 μ M, zweite und vierte Spuren). Das verwendete Pulsprotokoll wird in (A, links oben, und die Nullstrom-Werte durch rote Linien angezeigt). **B.** Beziehung zwischen mittlerer (\pm SE, n = n = 7-10) Stromdichte und der Klemmspannung, abgeleitet wie in (A) von 0 Gy-(offene Kreise) und 5 Gy-vorbestrahlten (geschlossene Dreiecke) Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zellen. **C.** Mittlere (\pm SE, n = 6-12) Leitfähigkeitsdichten von 0 Gy- (offene Balken) und 5 Gy- (geschlossene Balken) vorbestrahlten Kontroll-Vektor transfizierten (links) und Bcl-2- (rechts) überexprimierenden Jurkat-Zellen abgeleitet vor und während Bad-Applikation von ACA. Die Leitfähigkeitsdichten wurden für die Auswärtsströme aus den Daten in (B) in dem mit der blauen und roten Linie gekennzeichneten Spannungsbereich durch lineare Regression berechnet. ***: $p \leq 0.001$, ANOVA (nach (Klumpff et al., 2016), verändert).

3.1.8 Radiogene K⁺-Kanäle in T-ALL-Zellen

Lymphozyten exprimieren intermediär leitende Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle vom IK_{Ca} (K_{Ca}3.1, SK4, Gardos, *kcnn4*)-Typ (Grgic et al., 2009)). Die Ca²⁺-Permeabilität der TRPM2-Kanäle lässt vermuten, dass ionisierende Strahlung in den Jurkat T-ALL-Zellen auch zu Aktivierung von IK_{Ca}-Kanälen führt. IK_{Ca}-Kanäle zeigen eine einwärtsrektifizierende Strom-Spannungs-Beziehung und wurden deswegen in dieser Arbeit mit physiologischer K-D-Glukonat-Pipettenlösung in Kombination mit KCl-Badlösung im Ganzzell-Modus in bestrahlten (0 bzw. 10 Gy) Bcl-2-überexprimierenden und Kontroll-Vektor transfizierten Jurkat-Zellen mit dem in Abb. 3.9 A gezeigten Pulsprotokoll abgeleitet. IK_{Ca}-Kanäle generieren aufgrund ihrer Rektifizierung in dieser Ableitkonstellation größere K⁺-Einwärts- als K⁺-Auswärtsströme. Als spezifischer IK_{Ca}-Inhibitor wurde TRAM-34 (10 µM (Brown et al., 2018)) in der Badlösung verwendet. In bestrahlte (10 Gy) Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zellen waren TRAM-34-sensitive Ganzzell-Ströme nachweisbar (Abb. 3.9 B), nicht aber in bestrahlten Kontroll-Vektor transfizierten Zellen (Abb. 3.9 C) oder in den unbestrahlten Zellen beider Genotypen. Letzteres geht aus dem Vergleich der für die TRAM-34-sensitiven Einwärtsströme berechneten Leitfähigkeitsdichten zwischen allen 4 experimentellen Bedingungen hervor (Abb. 3.9 D).

Zusammenfassend lassen sich die Befunde in den Jurkat T-ALL Zellen wie folgt interpretieren: Ionisierende Strahlung führt zur Aktivierung von ACA-sensitiven TRPM2-ähnlichen nichtselektiven Ca²⁺-permeablen Kationenkanälen und TRAM-34-sensitiven IK_{Ca}-ähnlichen Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanälen in Bcl-2-überexprimierenden Apoptose-resistenten Zellen, so dass auf eine Interaktion von Mitochondrien und Plasmamembran während der DNA-Schadensantwort geschlossen werden kann. Diese Daten wurden in (Klumpp et al., 2016) publiziert.

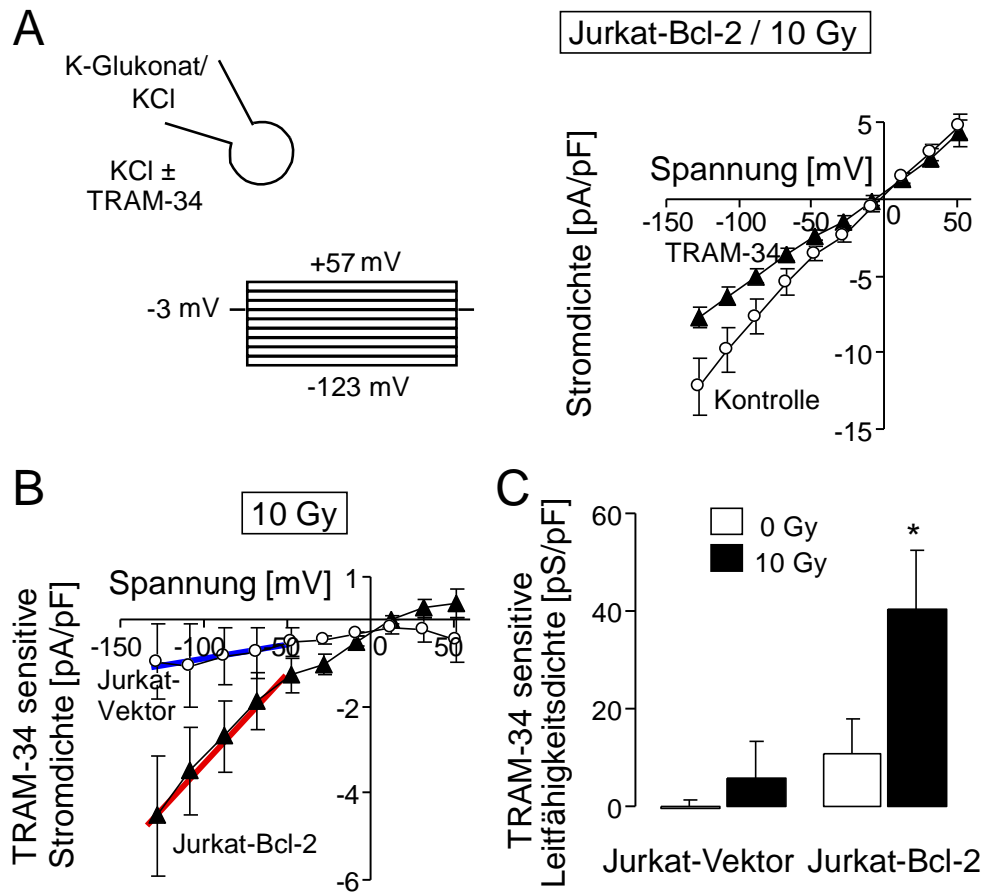


Abb. 3.9. Ionisierende Strahlung stimuliert TRAM-34-sensitive einwärtsrektifizierende IK_{Ca} -ähnliche K^+ Kanäle in Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-T-Zell Leukämie-Zellen. **A.** Beziehung zwischen mittlerer (\pm SE, $n = n$ 10) Stromdichte und der Klemmspannung, abgeleitet mit K-D-Glukonat-Pipetten- und KCl-Bad-Lösung von 10 Gy- vorbestrahlten Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zellen vor (offene Kreise) und während (geschlossene Dreiecke) Bad-Applikation des IK_{Ca} -Inhibitors TRAM-34 (10 μ M; verwendetes Pulsprotokoll siehe links unten). **B.** Mittlere (\pm SE, $n = 4$ -10) TRAM-34-sensitive Stromdichte-Fraktion in 10 Gy-vorbestrahlten Kontroll-Vektor transfizierten (offene Kreise) und Bcl-2-überexprimierenden (geschlossenen Dreiecke) Jurkat-Zellen. **C.** Mittlere (\pm SE, $n = 4$ -10) TRAM-34-sensitive Fraktion der Leitfähigkeitsdichten von 0 Gy- (offenen Balken) und 10 Gy- (geschlossene Balken) vorbestrahlten Kontroll-Vektor transfizierten (links) und Bcl-2- (rechts) überexprimierenden Jurkat-Zellen. Die Leitfähigkeitsdichten wurden für die Einwärtsströme aus den Daten in (B) in dem mit der blauen und roten Linie gekennzeichneten Spannungsbereich durch lineare Regression berechnet. * $z_p \leq 0.05$, zweiseitiger Einproben t-Test zeigt signifikanten Unterschied zu 0 pS/pF, Bonferroni-korrigiert für $z = 4$ Tests (nach (Klump et al., 2016), Suppl. Fig. B., verändert).

3.2 Radiogene Glukoseaufnahme in Karzinomzellen

3.2.1 SGLT-Ko-Transporter in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzellen

Solide Tumoren können über Na^+ -gekoppelte Glukose-Aufnahme Glukose selbst bei niedrigen interstitiellen Glukose-Konzentrationen im Zytoplasma akkumulieren. Dieser Transport wird über die einwärtsgerichtete elektrochemische Triebkraft von Na^+ angetrieben und ermöglicht Tumorzellen auch in unzureichend perfundierten, hypoxischen Arealen ihren Energiestoffwechsel über Glykolyse und Milchsäuregärung aufrechtzuerhalten. Tumorphoxie vermindert jedoch die tumorizide Wirkung ionisierender Strahlung um einen Faktor bis zu 3 und kann somit zum Verlust der lokale Tumorkontrolle während der Radiotherapie führen. Damals noch nicht veröffentlichte Aufnahme-Studien mit radioaktiver Glukose der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Dittmann in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen) deuteten auf eine strahlungsinduzierte Glukoseaufnahme von A549-Lungenadenokarzinomzellen (Lieber et al., 1976) hin. Gleichzeitig zeigte diese Arbeitsgruppe auch hohe Protein-Abundanzen des 2Na^+ /Glukose-Ko-Transporters SGLT1 (Sodium glucose transporter-1) in diesen Zellen. Inoperable, lokal fortgeschrittene nichtkleinzellige Lungenkarzinome wie Adenokarzinome werden mit Radiochemotherapie behandelt (zum Beispiel 70 Gy in 35 Fraktionen) (Osti et al., 2013) und radiogene Na^+ -gekoppelte Glukose-Aufnahme könnte dabei zur Radioresistenz beitragen. Der nächste Themenkomplex dieser Arbeit untersuchte deswegen die Modulation des SGLT-Transporters durch ionisierende Strahlung in A549-Lungenadenokarzinom-Zellen. Da die Na^+ -gekoppelte Glukose-Aufnahme einen elektrogenen Transport darstellt, der zur Depolarisation des Membranpotentials führt, kann dieser Prozess elektrophysiologisch beschrieben werden.

3.2.2 Radiogene Depolarisation des Membranpotentials von A549-Lungenadenokarzinomzellen

Wie für Abb. 3.3 A wurde das Membranpotential der apikalen Membran von bestrahlten (0 bzw. 4 Gy) A549-Zellen mit der 0 pA-Stromklemme unter Verwendung von physiologischen K-D-Glukonat-Pipetten- und D-Glukose (5 mM)-enthaltenden NaCl-Bad-Lösungen abgeleitet. Die Zellen waren hierzu zu konfluenten Monolayern in Kontaktinhibition gezüchtet. Im Monolayer sind die A549-Zellen elektrisch gekoppelt, so dass bei diesen Ableitungen das Membranpotential über die apikalen Membranen mehrerer Zellen abgegriffen wurde, woraus sehr stabile Messungen resultierten. Bestrahlung mit 4 Gy verursachte initial (etwa 40 min nach Bestrahlung) eine transiente, nicht signifikante Hyperpolarisation des Membranpotentials, die dann etwa 3 h nach Bestrahlung in eine signifikante Depolarisation um etwa 15 mV überging (Abb. 3.10).

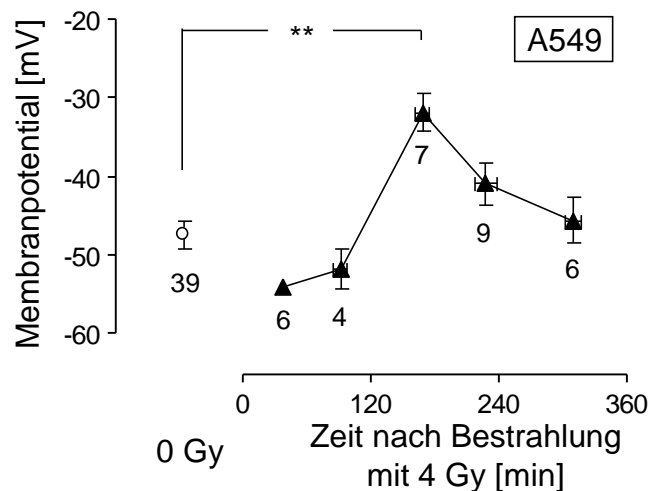


Abb. 3.10. Ionisierende Strahlung depolarisiert das Plasmamembranpotential von A549-Lungenadenokarzinom Zellen. Mittleres (\pm SE, Zellzahl wie angegeben) Membranpotential von Kontroll- (offene Kreise) und 4 Gy-bestrahlten A549-Zellen (geschlossene Dreiecke), abgeleitet in der 0 pA-Stromklemme mit D-Glukose-haltiger NaCl-Lösung im Bad und K-D-Glukonat-Lösung in der Pipette zu unterschiedlichen Zeiten nach Bestrahlung. **: $p \leq 0.01$, ANOVA (nach (Huber et al., 2012), verändert).

Im nächsten Experiment wurde die Abhängigkeit dieser radiogenen Depolarisation von der extrazellulären Glukose-Konzentration untersucht, indem das Membranpotential von 0 und 4 Gy-bestrahlter A549-Zellen wiederum mit physiologischen Pipetten- und Bad-Lösungen vor und während Wegnahme der Glukose aus der Bad-Superfusion sowie nach deren Wiederzugabe kontinuierlich abgeleitet wurde. Zum Ende des Experiments wurde wie zu Abb. 3.3 A beschrieben als interne Kontrolle die NaCl-Badlösung zum Nullen des Membranpotentials durch KCl ersetzt. Wie Abb. 3.11 A, B zeigt, haben die bestrahlten A549-Zellen in Glukose-haltiger Badlösung ein niedrigeres Membranpotential (rote Linie bzw. geschlossene Dreiecke) als die unbestrahlten Zellen (blaue Linie und offene Kreise). Glukose-Wegnahme im Superfusat hyperpolarisierte die bestrahlten wie unbestrahlten Zellen. Dabei fiel diese Hyperpolarisation in den bestrahlten Zellen signifikant größer aus als in den unbestrahlten Zellen (Abb. 3.11 C, oben), so dass sich die Membranpotentiale bestrahlter und unbestrahlter Zellen in der Abwesenheit extrazellulärer Glukose annäherten (Abb. 3.11 B, Mitte). Auffallend war auch, dass die durch Glukose-Wegnahme evozierte Hyperpolarisation des Membranpotentials in den bestrahlten Zellen signifikant später eintrat als in den unbestrahlten A549-Zellen (Abb. 3.11 A und C, unten). Interessanterweise war dieses Phänomen nicht bei der Wiederzugabe von Glukose zur Badlösung zu beobachten (Abb. 3.11 A).

Die Beobachtung, dass sich unter extrazellulärer Glukose-Depletion die Membranpotentiale bestrahlter und unbestrahlter A549-Zellen nicht mehr unterschieden, deutet auf eine SGLT-Aktivierung in den bestrahlten Zellen. Im nächsten Experiment wurde mit derselben Versuchsanordnung der Effekt des SGLT-Inhibitors Phlorizin (500 μM (Nilsson et al., 2019)) auf das Membranpotential bestrahlter und unbestrahlter A549-Zellen untersucht. Wie Abb.3.12 zeigt, hatte Phlorizin-Applikation in der Badlösung die identischen Effekte wie extrazelluläre Glukose-Wegnahme. Auch hier sprachen die bestrahlten A549-Zellen signifikant

später als die unbestrahlten Zellen auf die Zugabe, jedoch nicht auf das Auswaschen von Phlorizin an (Abb. 3.12 B, unten bzw. 3.12 A).

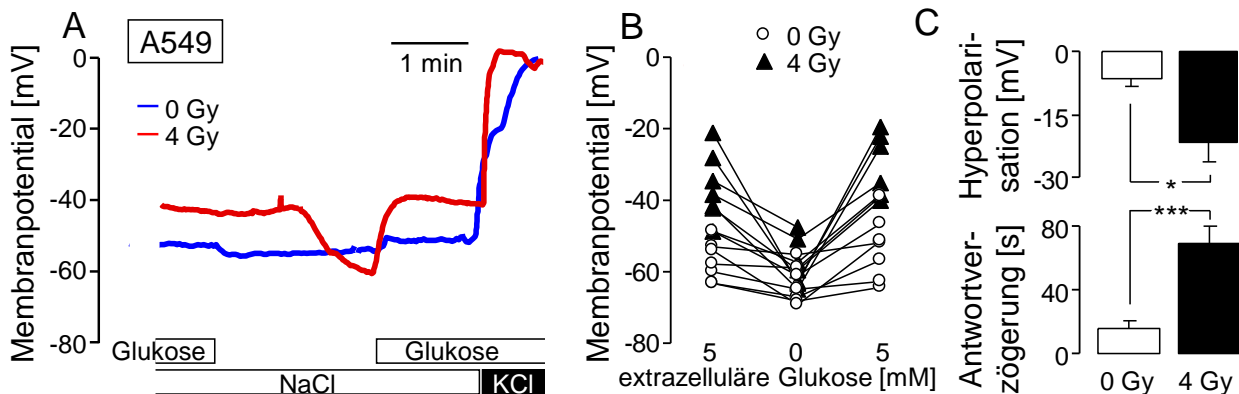


Abb. 3.11. Abhängigkeit des Plasmamembran-Potentials von der extrazellulären D-Glukose-Konzentration in Kontroll- und vorbestrahlten A549-Lungenadenokarzinom-Zellen. **A.** Zeitverlauf des Plasmamembran-Potentials vor und während der Wegnahme von D-Glukose (5 mM) aus der NaCl-Badlösung, sowie nach Wiedergabe von D-Glukose (5 mM) zur NaCl-Badlösung und nach Austausch von NaCl im Bad durch KCl (zur Nullung des Membranpotentials) in einer Kontroll- (blau) und 4 Gy-vorbestrahlten A549-Zelle (Ableitkonfiguration wie in Abb. 20). **B.** "Steady-State"-Membranpotential vor, während und nach Wegnahme der D-Glukose (5 mM) in der NaCl-Badlösung, sowie nach Wiedergabe von D-Glukose (5 mM) zur NaCl-Badlösung in Kontroll- (offene Kreise) und 4 Gy-vorbestrahlten (3.3 ± 0.2 h nach Bestrahlung, geschlossene Dreiecke) A549-Zellen (gezeigt sind individuelle Datenpunkte gepaarter Experimente). **C.** Mittlere (\pm SE, $n = 7$) Hyperpolarisation des Membranpotentials (oben) und Zeitverzögerung der Antwort (unten) nach Wegnahme der extrazellulären D-Glukose (5 mM) in Kontroll- (offene Balken) und 4 Gy-bestrahlten (geschlossene Balken) A549-Zellen. * und ***, $p \leq 0.05$ bzw. $p \leq 0.001$, Welch-korrigierter zweiseitiger t-Test (nach (Huber et al., 2012), verändert).

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus Dittmann legten nahe, dass die SGLT-Transporter in einem Komplex mit EGFR in der Plasmamembran von A549-Zellen vorliegt. EGFR wird beschriebenerweise durch ionisierende Strahlung aktiviert (Rodemann et al., 2007), so dass die Möglichkeit eine SGLT-Aktivierung über die Tyrosinkinase-Funktion aktiver EGFR-Rezeptoren besteht. Um dies zu testen, wurden analoge Experimente mit dem selektiven Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors Erolotinib (1 μ M, (Pollack et al., 1999))

durchgeführt. Erlotinib-Applikation im Superfusat hatte identische hyperpolarisierende Effekte auf das Membranpotential von bestrahlten und unbestrahlten A549-Zellen wie extrazelluläre Glukose-Wegnahme oder Phlorizin (Abb. 3.13). In der Zusammenschau deuten die Experimente somit auf eine radiogene EGFR-vermittelte Aktivierung von SGLT-Na/Glukose-Ko-Transporter in A549-Lungenadenokarzinomzellen hin, die etwa 3 h nach Bestrahlung ihr Maximum erreicht.

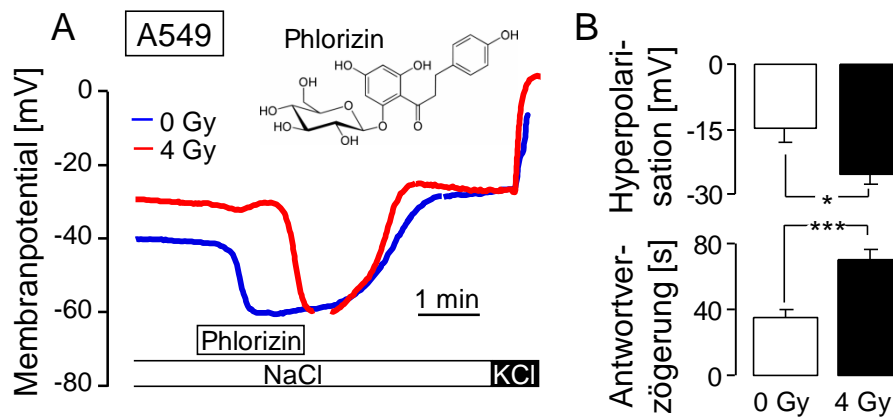


Abb. 3.12. Abhängigkeit des Plasmamembran-Potentials von der Aktivität des Phlorizin-sensitiven Na⁺/Glukose-(SGLT)-Ko-Transports in Kontroll- und vorbestrahlten A549-Lungenadenokarzinom-Zellen. **A.** Zeitverlauf des Plasmamembran-Potentials vor, während und nach Bad-Applikation des SGLT-Inhibitors Phlorizin (500 μ M), sowie nach Austausch von NaCl im Bad durch KCl (zur Nullung des Membranpotentials) in einer Kontroll- (blau) und 4 Gy-vorbestrahlten A549-Zelle (Ableitkonfiguration wie in Abb. 20). **B.** Mittlere (\pm SE, n = 8-20) Hyperpolarisation des Membranpotentials (oben) und Zeitverzögerung der Antwort (unten) nach Zugabe von Phlorizin (500 μ M) in Kontroll- (offene Balken) und 4 Gy-bestrahlten (3.4 ± 0.3 h nach Bestrahlung, geschlossene Balken) A549-Zellen. * und ***: $p \leq 0.05$ bzw. $p \leq 0.001$, Welch-korrigierter zweiseitiger t-Test (nach (Huber et al., 2012), verändert).

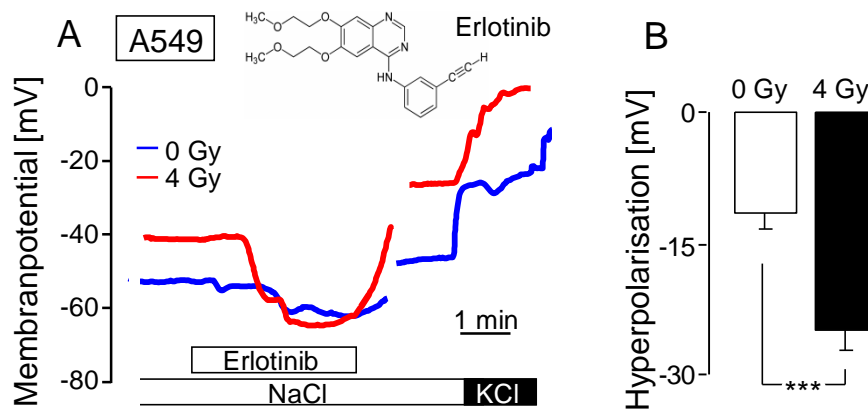


Abb. 3.13. Abhängigkeit des Plasmamembran-Potentials von der Aktivität der Erlotinib-sensitiven EGFR-Tyrosin-Kinase in Kontroll- und vorbestrahlten A549-Lungenadenokarzinom-Zellen (Ableitkonfiguration wie in Abb. 20). **A.** Zeitverlauf des Plasmamembran-Potentials vor, während und nach (Auswaschen) Bad-Applikation des EGFR-Tyrosin-Kinase-Inhibitors Erlotinib (1 μ M), sowie nach Austausch von NaCl im Bad durch KCl (zur Nullung des Membranpotentials) in einer Kontroll- (blau) und 4 Gy-vorbestrahlten A549-Zelle. **B.** Mittlere (\pm SE, $n = 7-12$) Hyperpolarisation des Membranpotentials nach Zugabe von Erlotinib (1 μ M) in Kontroll- (offene Balken) und 4 Gy-bestrahlten (geschlossene Balken) A549-Zellen. ***: $p \leq 0.001$, Welch-korrigierter zweiseitiger t-Test (nach (Huber et al., 2012), verändert).

3.2.3 Radiogene SGLT-vermittelte Depolarisation des Membranpotentials von FaDu-Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen

Um herauszufinden, ob sich die Befunde an den A549-Lungenadenokarzinom-Zellen auch auf andere Karzinom-Entitäten übertragen lassen, wurden die Glukose-Depletion/Repletions-Experimente an FaDu-Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom(HNSCC, (Giard et al., 1973))-Zellen wiederholt. Die Therapie von HNSCC beinhaltet auch Radiotherapie. So werden inoperable, lokal fortgeschrittenen HNSCC mit definitiver (alleiniger) Radiochemotherapie (zum Beispiel mit 70 Gy) behandelt (Schüttrumpf et al., 2020). Auch in den FaDu-HNSCC-Zellen bewirkte Glukose-Wegnahme eine Hyperpolarisation des Membranpotentials (Fig. 3.14 A), die signifikant höher in 4 Gy-vorbestrahlten Zellen ausfiel als in unbestrahlten FaDu-Zellen (Fig. 3.14 B).

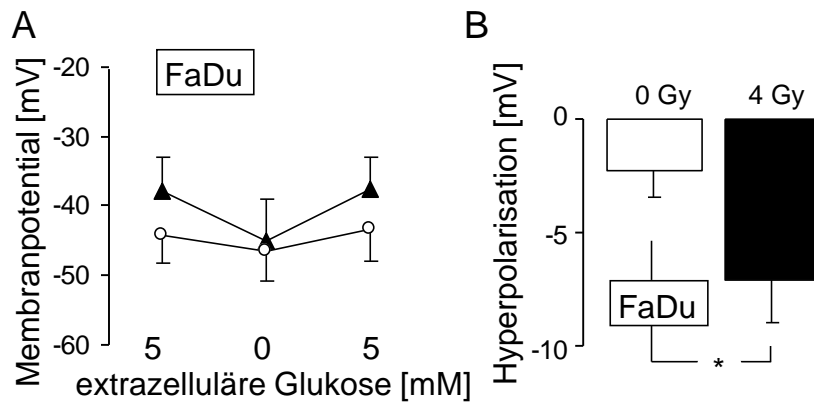


Abb. 3.14. SGLT-Aktivität und Funktion in bestrahlten FaDu-Kopf-Hals-Karzinomzellen. **A.** Mittleres (\pm SE, $n = 13-15$) Plasmamembran-Potential von Kontroll- (offene Kreise) und 4 Gy-vorbestrahlten (2.5 ± 0.3 h nach Bestrahlung, geschlossene Dreiecke) FaDu-Zellen, aufgenommen in gepaarten Experimenten (wie in Abb. 21) vor und während der Wegnahme von D-Glukose (5 mM) aus der NaCl-Badlösung, sowie nach Wiedergabe von D-Glukose (5 mM) zur NaCl-Badlösung. **B.** Mittlere (\pm SE, $n = 13-15$) Hyperpolarisation des Membranpotentials nach Wegnahme der extrazellulären D-Glukose (5 mM) in Kontroll- (offener Balken) und 4 Gy-bestrahlten (geschlossener Balken) FaDu-Zellen. *: $p \leq 0.05$, zweiseitiger t-Test (nach (Huber et al., 2012), verändert).

Diese Daten, die in (Huber et al., 2012) publiziert wurden, deuten also darauf hin, dass radiogene Hochregulation der SGLT-vermittelten Glukose-Aufnahme ein generelleres Phänomen bei Karzinomzellen sein könnte. Der letzte Themenkomplex dieser Arbeit untersucht die strahlungsinduzierte Modulation von Ionenkanälen in Glioblastom Hirntumoren.

3.3 Strahleninduzierte Aktivierung von Ionenkanälen im Glioblastom

3.3.1 Migration von Glioblastomzellen

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste primäre Hirntumor bei Erwachsenen. Die Standardtherapie beinhaltet chirurgische Resektion gefolgt von konkomitanter fraktionierter Radiotherapie (60 Gy in 30 Fraktionen), Temozolomid-Chemotherapie und anschließend 6-12 Zyklen Temozolomid-Erhaltungskemotherapie sowie optionaler Elektrotherapie. Trotz dieser tri- bzw. tetramodaler Therapie beträgt das mediane Gesamtüberleben immer noch unter 2 Jahren (Stupp et al., 2017). Eine Ursache des Therapieversagens liegt in der starken Streuung der Glioblastomzellen im Gehirn (Sontheimer, 2008) wodurch eine chirurgische Komplettresektion oder ein Erfassen aller verbliebenen Tumorzellen durch das Zielvolumen der Strahlentherapie sehr unwahrscheinlich ist.

Glioblastom-Zellen invadieren in das Gehirn, indem sie sich entlang von Blutgefäßen oder Axonbündeln durch kleinste Interzellular-Spalten zwängen. Hierzu benötigen sie eine hocheffektive Zellvolumen-Regulation (Watkins and Sontheimer, 2011). Glioblastomzellen akkumulieren hohe Cl^- -Konzentrationen im Zytosol. Diese Konzentrationen liegen weit über dem elektrochemischen Gleichgewicht zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Cl^- , so dass Cl^- als Osmolyt verwendet werden kann. Schnelle lokale Zellvolumen-Abnahmen werden durch Efflux von Cl^- und dem Gegenion K^+ sowie iso-osmotisch nachfolgendem Wasser angetrieben. (siehe 1.2). Dabei spielen Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle vom IK_{Ca} - (Ruggieri et al., 2012) und BK_{Ca} ($\text{K}_{\text{Ca}}1.1$, MaxiK, Slo1, *kcnma1*, (Sontheimer, 2008)-Typ sowie ClC-3 (*clcn3*) Cl^- Kanäle bzw. Cl^-/H^+ -Austauscher (Cuddapah et al., 2013) eine wichtige Rolle, da Hemmung dieser Proteine die Migration von Glioblastomzellen unterbindet.

3.3.2 Strahleninduzierte Aktivierung von IK_{Ca} - und BK_{Ca} -Kanälen in Glioblastomzellen.

Frühere Arbeiten aus dem Labor für Experimentelle Radioonkologie in Tübingen belegten zudem eine strahlungsinduzierte Hypermigration/-invasion von T98G- (Stein, 1979) und U-87 MG-Glioblastemzellen (Pontén and Macintyre, 1968) *in vitro* (Edalat et al., 2016, Steinle et al., 2011) bzw. in einem orthotopen Glioblastommausmodell (Edalat et al., 2016). Darüber hinaus konnte auch eine radiogene Aktivierung von IK_{Ca} -Kanälen in T98G- und U-87 MG- (Stegen et al., 2015) demonstriert werden, die zur Radioresistenz der T89G- und U-87 MG-Glioblastomzellen *in vitro* bzw. in einem ektopen Glioblastom-Mausmodell (Stegen et al., 2015) beitrugen. Der letzte Themenbereich dieser Arbeit erweiterte diese Experimente an U251-Glioblastomzellen (Vaehri et al., 1976), die über 5 Tage fraktioniert mit einer täglichen Einzeldosis von 0 bzw. 2 Gy bestrahlt wurden. 24 h nach der letzten Bestrahlung wurden die Zellen im Cell-attached (On Cell)-Modus in physiologischer NaCl-Badlösung und mit KCl-Extrazellulärlösung (1 mM $CaCl_2$, 5 mM D-Glukose) in der Pipette abgeleitet (Pulsprotokoll in Abb. 3.15 A). Beim Cell-attached-Modus bleibt die Zelle intakt und die applizierten Klemmspannungen addieren sich zu dem physiologischen Membranpotential der Plasmamembran, auf welches der Experimentierende keinen Einfluss hat (siehe 1.3.2). Ströme werden im „Cell-attached“-Modus nur durch Kanäle des in die Pipettenspitze eingesaugten und so elektrisch isolierten Membranflecks generiert, so dass die abgeleiteten „makroskopischen“ Ströme (i.e., der Gesamtstrom über den eingesaugten Membranfleck) so gering sind, dass Einzelkanalereignisse aufgelöst werden können. Abb. 3.15 B zeigt Original-Stromspuren zweier Kontrollzellen (5 x 0 Gy, links) und zweier fraktioniert bestrahlter (5 x 2 Gy) U251-Zellen (zur besseren Übersicht sind nur 5 der insgesamt 41 Stromspuren übereinandergelagert dargestellt). In den oberen linken Stromspuren sind bei der höchsten Spannung (+110 mV, oberste Stromspur) deutliche auswärts (i.e. nach oben)-gerichtete „Unitary current transitions“ (i.e., rechteckförmige Stromexkursionen) mit zwei

verschiedenen Amplituden zu erkennen. Die Stromexkursionen mit der größeren Amplitude fehlten dagegen bei der zweiten unbestrahlten U251-Zelle (Abb. 3.15 B, links unten). Hier nicht gezeigte, weiterführende Analysen identifizierten die diesen Stromexkursionen zugrundeliegende Kanäle als IK_{Ca} (kleinere Amplitude) und BK_{Ca} (größere Amplitude).

Fraktionierte Bestrahlung erhöhte die Aktivität sowohl von IK_{Ca} als auch von BK_{Ca} -Kanälen, wie in den repräsentativen Original-Stromspuren in Abb. 3.15 B, rechts, dargestellt. Auch hier sind wieder ein Membranfleck mit beiden Kanaltypen (oben) und einer mit nur IK_{Ca} -Kanälen dargestellt (unten). Da IK_{Ca} einwärtsgleichrichtend Ströme leiten, sind in der bestrahlten Zelle mit ausschließlich IK_{Ca} -Kanälen im abgeleiteten Membranfleck (Abb. 3.15 B, rechts unten) die Einwärtsströme (i.e., Ströme unterhalb der roten 0 pA Linie) gegenüber der nichtbestrahlten Zelle (Abb. 3.15 B, links unten) erhöht. In der bestrahlten Zelle mit beiden Kanaltypen im abgeleiteten Membranfleck (Abb. 3.15 B, rechts oben) sind dagegen sowohl die hauptsächlich IK_{Ca} -generierten Einwärts- als auch die hauptsächlich BK_{Ca} -generierten Auswärtsströme (i.e., Ströme oberhalb der roten 0 pA Linie) gegenüber der nichtbestrahlten Zelle mit beiden Kanaltypen (Abb. 3.15 B, links oben) erhöht aufgrund der typischerweise durch BK_{Ca} -verursachten auswärtsgleichrichtenden Strom-Spannungs-Beziehung.

Die Beziehung der gemittelten makroskopischen Ströme und der applizierten Spannung in Abb. 3.15 C fassen diese Experimente zusammen. Die makroskopischen Cell-attached Ströme von unbestrahlten (offene Kreise) und fraktioniert bestrahlten U251-Zellen (geschlossene Dreiecke) zeigen ein mittleres V_{rev} von etwa +35 mV (unbestrahlte Zellen) bzw. ein V_{rev} von etwa +45 mV (bestrahlte Zellen). Unter der Annahme, dass die makroskopischen Ströme hauptsächlich K^+ -Ströme sind, und dass sich in der Zelle eine ähnlich hohe K^+ -Konzentration wie in der KCl-Pipettenlösung befindet und somit sich ein $E_K = 0$ mV über den in die Pipettenspitze eingesaugten Membranfleck einstellt, kann das

physiologische Membranpotential der Zellen abgeschätzt werden. Unter diesen beiden Annahmen würde nämlich die Klemmspannung bei V_{rev} den negativen Wert des physiologische Membranpotentials anzeigen. Oder in anderen Worten, diese Klemmspannung wird benötigt um das physiologische Membranpotential zu nullen und somit die Gesamtspannung (physiologisches Membranpotential + Klemmspannung) auf $E_K = 0$ mV zu bringen.

Der Vergleich der makroskopischen Einwärts- (i.e., negativen) und Auswärts- (i.e., positiven) Ströme zwischen den unbestrahlten (offene Kreise in Abb. 3.15 C) und fraktioniert bestrahlten (geschlossene Dreiecke in Abb. 3.15 C) U251-Zellen bestätigt eine radiogene Aktivierung von sowohl BK_{Ca} (Erhöhung der Auswärtsströme) als auch besonders deutlich von IK_{Ca} (Erhöhung der Einwärtsströme). Die radiogene IK_{Ca} -Aktivierung wird auch noch über die für die Einwärtsströme berechneten makroskopischen Leitfähigkeiten in Abb. 3.15 D verdeutlicht. Die radiogene Aktivierung von K^+ -Kanälen erklärt auch die leichte strahlungsinduzierte Rechtsverschiebung von V_{rev} in Abb. 3.15 C, welche gemäß der oben erläuterten Argumentationslinie auf eine Hyperpolarisation des Membranpotentials hinweist. Somit lassen diese Daten darauf schließen, dass ionisierende Strahlung in Glioblastomzellen gleichzeitig die Aktivität von IK_{Ca} - und BK_{Ca} -Kanälen stimuliert. Da die beiden Kanaltypen in unterschiedlichen Spannungsfenstern arbeiten, kann spekuliert werden, dass beide Kanaltypen unterschiedliche Funktionen in der bestrahlten Glioblastomzelle ausüben.

Frühere Arbeiten des Labors Experimentelle Radioonkologie in Tübingen zeigen auch eine radiogene Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase-II-Isoformen (CaMKIIs) in Glioblastomzellen (Steinle et al., 2011). Interessanterweise benötigt diese Aktivierung funktionelle BK_{Ca} -Kanäle. Letztere scheinen also vorgeschaltet der Kinasen für die Ca^{2+} -Signale benötigt zu werden, die zur CaMKII-Aktivierung führt. Da – wie bereits in 3.3.1 beschrieben – die Migration der Glioblastomzellen CIC-3-Kanalaktivität involviert (Cuddapah et al., 2013,

Sontheimer, 2008) und CaMKIIs direkt CIC-3-Kanäle aktivieren (Cuddapah and Sontheimer, 2010), untersuchte der letzte Projektteil dieser Promotionsarbeit die radiogene Aktivierung von Cl-Kanälen in Glioblastomzellen und die Rolle der BK_{Ca}-Kanäle hierin.

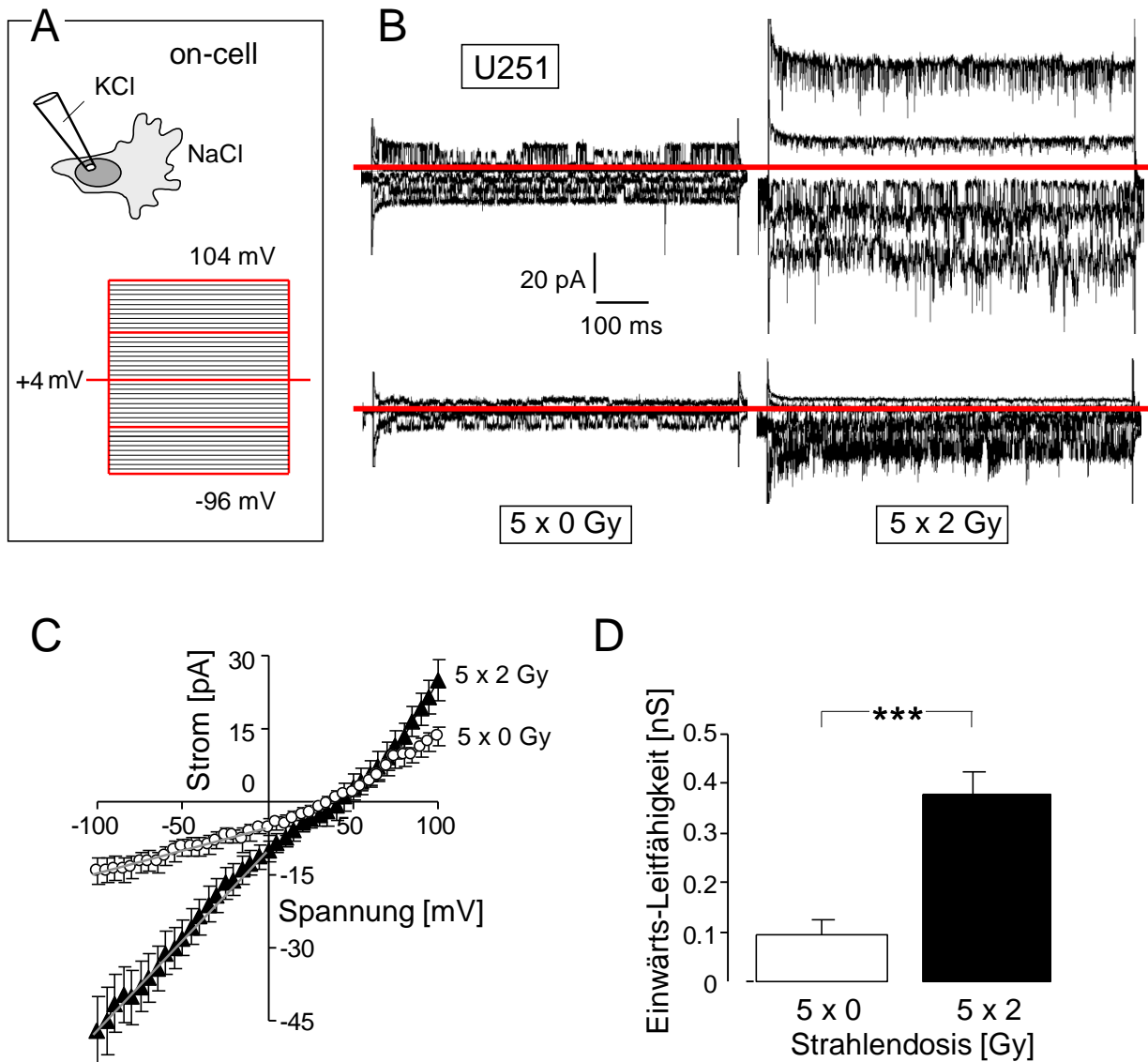


Abb. 3.15. Fraktionierte Bestrahlung induziert/selektioniert Glioblastomzellen mit hoher Expression BK_{Ca}- und IK_{Ca}-ähnlicher K⁺-Kanäle. **A, B.** Patch-Clamp-Ableitungen mit KCl in Pipette und NaCl

im Bad (A) makroskopischer Cell-attached (On Cell) Ströme von 4 humanen U251 Glioblastomzellen (B). Zur verbesserten Lesbarkeit werden nur 5 evozierten Stromspuren (B) gezeigt, welche von den in roter Farbe hervorgehobenen Klemmspannung im applizierten Spannungsprotokoll (A) evoziert wurden. Die roten Linien in den Stromspuren (B) kennzeichnen den Null-Stromwert. Zwei Kontroll-Zellen (5x0 Gy, B, links) und zwei fraktioniert-vorbestrahlte Zellen (5x2 Gy, B, rechts) werden exemplarisch gezeigt, von denen je in einer unbestrahlten und einer bestrahlten Zelle BK_{Ca}- und IK_{Ca}- (große Auswärtsstrom- und kleinere Einwärtsstrom-Einzelkanalampplituden, B, oben) bzw. nur IK_{Ca}-ähnliche Kanäle (B, unten) in dem spannungsgeklemmten Membranfleck aktiv waren. In den ungepaarten Experimenten in (B) deutet sich eine erhöhte Aktivität dieser Kanäle in den beiden bestrahlten Zellen (rechts) verglichen zu den unbestrahlten Zellen (links) an. **C.** Abhängigkeit der mittleren (\pm SE, n = 10) makroskopischen On Cell-Ströme von der applizierten Spannung in Kontroll- (5 x 0 Gy, offene Kreise) und fraktioniert vorbestrahlten (5 x 2 Gy, geschlossene Dreiecke) U251-Zellen. **D.** Mittlere On Cell-Leitfähigkeit (berechnet für die Einwärtsströme in (C)), in dem durch die graue Linie angezeigten Spannungsbereich) von Kontroll- (5 x 0 Gy, offener Balken) und fraktioniert vorbestrahlten (5 x 2 Gy, geschlossener Balken) U251-Zellen. ***: p \leq 0.001, zweiseitiger Welch-korrigierter t-Test (nach Stegen et al., 2016), verändert).

3.3.3 Radiogene BK_{Ca}-abhängige Aktivierung von Cl-Kanälen in Glioblastomzellen.

Die Modulation der Cl-Ganzzell-Ströme durch ionisierende Strahlung wurde in T98G-Zellen gemessen, für die die radiogene Aktivierung der CaMKII-Kinasen gezeigt wurde (Steinle et al., 2011). Hierzu wurde die Zellen mit 0 bzw. 2 Gy bestrahlt und dann für 1-3 h nachinkubiert im Medium, das entweder den BK_{Ca}-Kanalinh inhibitor Paxilline (5 μ M (Strøbaek et al., 1996)) oder die entsprechende Menge Vehikel enthielt, bevor sie dann elektrophysiologisch abgeleitet wurde. Diese Messungen wurden in Paxilline-freien Cl⁻ Lösungen mit dem in Abb. 3.16 A abgebildeten Pulsprotokoll durchgeführt. Als Gegenion diente das impermeable Kation N-Methyl-D-Glukamin⁺ (NMDG⁺), so dass die gemessenen Ganzzell-Ströme größtenteils durch Cl⁻-Flüsse verursacht wurden. Bestrahlung mit 2 Gy (Abb. 3.16 B, 1. und 2. Stromspuren) induzierte in den T98G-Zellen eine Erhöhung sowohl der Einwärts- (unterhalb der roten Linie) als auch Auswärtsströme (oberhalb der roten Linie). Nachinkubation mit Paxilline verhinderte diese Induktion (Abb. 3.16 B, 3. und 4. Stromspuren), woraus sich ableiten lässt, dass die radiogene Cl⁻-Kanalaktivierung funktionelle BK_{Ca}-Kanäle benötigt. Dies zeigen auch noch einmal

in der Zusammenschau aller Experimente die für die Auswärtsströme berechneten Leitfähigkeitsdichten unter allen vier experimentellen Bedingungen (Abb. 3.16 C). Die radiogenen Cl⁻-Ströme waren durch den Anionkanal-Blocker NPPB (50 μM (Hayslett et al., 1987)) hemmbar. Dies zeigen die Original-Stromspuren in Abb. 3.16 D und die für die NPPB-sensitive Stromfraktion berechneten Leitfähigkeitsdichten (ΔG_{NPPB}) in Abb. 3.16 E. Diese Experimente bestätigen somit die Cl⁻-Selektivität der mit den NMDG-Cl-Bad- und Pipettenlösung abgeleiteten strahleninduzierten und BK_{Ca}-abhängigen Ströme in den T98G-Zellen.

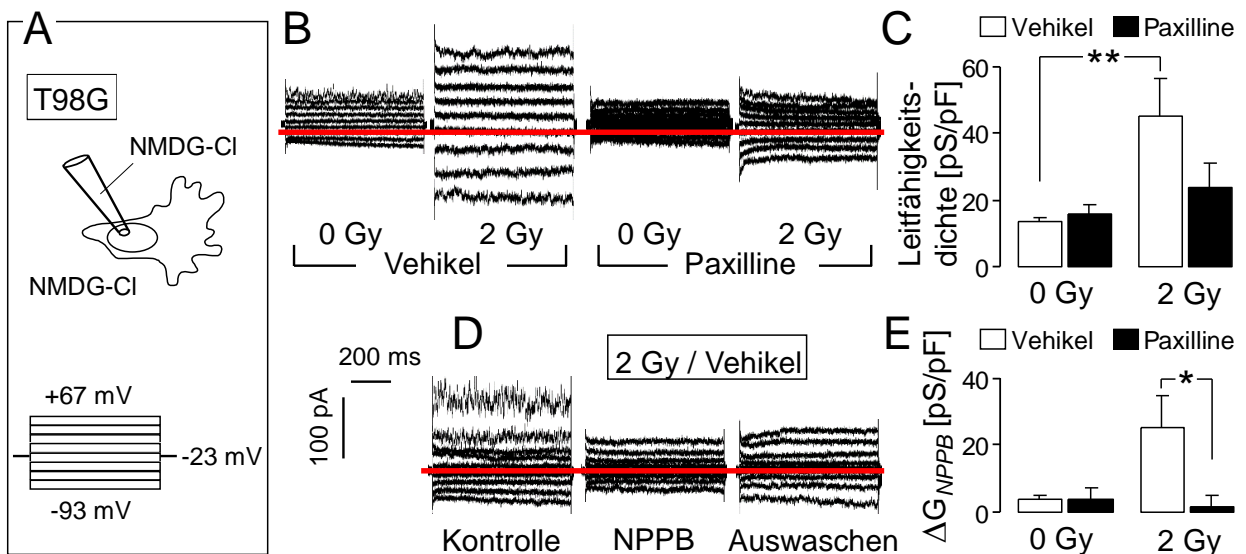


Abb. 3.16. Radiogene Aktivierung von Cl⁻-Kanälen in der Plasmamembran von Glioblastomzellen benötigt die Aktivität von Paxilline-sensitiven BK_{Ca} K⁺-Kanälen. **A.** Die Ganzzell-Ströme wurden in vorbestrahlten humanen T98G-Glioblastomzellen unter Verwendung von Cl⁻ in Bad- und Pipettenlösung abgeleitet. Als Gegenion diente in beiden Lösungen das impermeable große Kation NMDG⁺. Die Zellen wurden bestrahlt (0 bzw. 2 Gy) und 3-5 h nachinkubiert im Zellkulturmedium, welches den BK_{Ca} K⁺ Kanalblocker Paxilline (0 oder 5 μM in 0.1% DMSO) enthielt, bevor die Aufnahmen der Ganzzell-Ströme ohne Paxilline erfolgten. Der untere Abbildungsteil zeigt das verwendete Pulsprotokoll. **B.** Ganzzell-Stromspuren einer 0 Gy- (1. und 3. Spuren) und einer 2 Gy- (2. und 4. Spuren) vorbestrahlten T98G-Zelle, die mit Vehikel alleine (links) oder mit Paxilline (rechts) vorbehandelt waren (die rote Linie kennzeichnet den Null-Stromwert). **C.** Mittlere (\pm SE, n = 9-27) Leitfähigkeits-Dichten (berechnet für die Auswärtsströme zwischen -13 mV and +67 mV Klemmspannung) von 0 Gy- (links) und 2 Gy- (rechts) vorbestrahlten T98G-Zellen, die mit Vehikel alleine (offenen Balken) oder mit Paxilline (geschlossene Balken) bestrahlt und vorinkubiert wurden. **D.** Ganzzell-Stromspuren einer 2 Gy-vorbestrahlten, Vehikel-behandelten Zelle, wie in (A) vor (Kontrolle, links), während (NPPB, Mitte) und nach (Auswaschen, rechts) Bad-Applikation des Anion-Kanal-Inhibitors NPPB, (50 μM, die rote Linie kennzeichnet den Null-Stromwert). **E.** Mittlere (\pm SE, n = 7-17) NPPB-sensitive Fraktion der Leitfähigkeitsdichte (ΔG_{NPPB}) von 0 Gy- (links) und 2 Gy-

(rechts) vorbestrahlten T98G-Zellen, die mit Vehikel alleine (offenen Balken) oder mit Paxilline (geschlossene Balken) bestrahlt und vorinkubiert wurden. *, **: $p \leq 0.05$ bzw. $p \leq 0.01$, ANOVA (nach (Stegen et al., 2016), verändert).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen: ionisierende Strahlen in Dosen, wie sie bei der Ganzkörperbestrahlung (TBI) oder einzelnen Fraktion der fraktionierten Strahlentherapie Verwendung finden, moduliert die Aktivität von Ionenkanälen und Transportern in der Plasmamembran von Tumorzellen. Dies konnte in Tumoren mesenchymalen (CML, T-ALL), epithelialen (HNSCC, NSCLC) und glialen (Glioblastoma) Ursprungs beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass die beobachtete radiogene Ionenkanal/Transporter-Modulation ein generelleres Phänomen sein könnte. Die Anzahl der beteiligten Ionenkanal/Transporter-Typen (Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle, TRPM2, $\text{K}_v3.4$, hERG, BK_{Ca} , IK_{Ca} , Cl-Kanäle, SGLT) deutet zudem auf verschiedenen Funktionen, die diese Ionenkanal/Transporter-Typen in der DNA-Schadensantwort der bestrahlten Zelle ausüben. Die funktionelle Signifikanz der radiogenen Ionenkanal/Transporter-Modulation für das Überleben der bestrahlten Tumorzellen wurde in parallelen Projekten des Labors für Experimentelle Radioonkologie und der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung in Tübingen untersucht und zusammen mit Befunden anderer Labore im nächsten Abschnitt vorgestellt.

4 Diskussion

4.1 Biologische Strahlenwirkung

Das biologische Lösungsmittel Wasser ist mit einer Konzentration von fast 60 M das weitaus häufigste Molekül in einer Zelle. Die meiste Energie der ionisierenden Strahlung wird somit von Wassermolekülen absorbiert, wodurch Wasser in ein Wasserstoff-Radikal ($\text{H}\cdot$) und das zu den reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) zählenden Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$) gespalten wird. $\text{HO}\cdot$ -Radikale reagieren mit weiteren Molekülen, unter anderem mit dem DNA-Rückgrat und richten so DNA-Strangbrüche an. Ionisierende Strahlung kann mit geringerer Wahrscheinlichkeit direkt auch DNA schädigen. Inwieweit ein durch direkte Absorption der Strahlenenergie oder sekundär über $\text{HO}\cdot$ gebildete DNA-Radikal tatsächlich zu DNA-Strangbrüchen führt, hängt nun wiederum von dem „Oxidative Defense“ und Redox-Status einer Zelle ab. In hypoxischen Arealen, die sich in allen soliden Tumoren ab einer bestimmten Größe bilden, werden DNA-Radikale aufgrund des niedrigen Sauerstoffpartialdrucks nicht zu Strangbrüchen aufoxidiert, sondern „chemisch“ repariert, wodurch in diesen Arealen die Effizienz der Strahlentherapie um bis zu einem Faktor von 3 („Oxygen enhancement factor“) erniedrigt ist.

Neben diesem, aus der Absorption der Strahlenenergie resultierenden, oxidativen Stress, der während der Bestrahlung gemessen werden kann (Gibhardt et al., 2015) und die Zelle direkt schädigt, verursacht ionisierende Strahlung mit einer Zeitverzögerung von mehreren Stunden weitere Zell-Schäden, die auch in benachbarten, nicht-bestrahlten „Bystander“-Zellen auftreten können. Diese Schäden werden durch Ca^{2+} -stimulierte Bildung von Superoxid-Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in den Mitochondrien hervorgerufen, ähnlich den Reperfusionsschäden ischämischer Geweben.

4.2 Hypoxie-Anpassung und Radioresistenz

Bei den Letzteren kann eine ischämische Präkonditionierung (i.e. ein kurzes ischämisches Intervall Stunden vor dem eigentlichen ischämischen Insult) die Ischämie/Reperfusionsschäden zum Beispiel im Herzmuskel lindern. Eine wichtige Komponente dieser Präkonditionierung beinhaltet das Kurzschließen des innermitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) durch mitochondriale Uncoupling Proteine oder mitochondriale K^+ -Kanäle. Hierdurch wird einer Hyperpolarisation von $\Delta\Psi_m$ und direkt damit gekoppelt die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ abgeschwächt.

Während Hypoxie fehlt der Zelle die Energie für den Betrieb der Na^+/K^+ - und Ca^{2+} -ATPase um damit die chemischen Gradienten für Na^+ und Ca^{2+} über die Plasmamembran aufrechtzuerhalten und - daran gekoppelt - einen neutralen pH-Wert zu stabilisieren. Die unter Normoxie gedrosselte mitochondriale Atmungskette wird in Hypoxie über ein niedriges ATP/ADP-Ratio und dem zunehmenden Volllaufen der Mitochondrien mit Ca^{2+} disinhibiert. Bei der Reoxygenierung erhöht die daraus resultierende Hyperpolarisation von $\Delta\Psi_m$ die Wahrscheinlichkeit der Übertragung eines Elektrons vom Semichinon im Komplex 1 auf O_2 und damit zur Bildung von $O_2^{\cdot-}$. Interessanterweise führt die Adaptation an Hypoxie/Reoxygenierung durch Hochregulation von zum Beispiel mitochondrialen Uncoupling Proteinen auch zur Strahlenresistenz. Diese wird vermutlich durch Minderung der späten, Mitochondrien-vermittelten Strahlenschäden hervorgerufen. Zwei Mechanismen könnten somit bei an chronische oder intermittierende Hypoxie angepasste Tumorzellen zu einem Versagen der Strahlentherapie führen: die niedrige Effizienz ionisierender Strahlung in Hypoxie und eine Verminderung der späten, Mitochondrien-vermittelten Strahlenschäden in Normoxie.

4.3 Radiogene Ca^{2+} -vermittelte $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung der Mitochondrien

In dem Labor für Experimentelle Radioonkologie in Tübingen durchgeführte Experimente (Klumpp et al., 2016) zeigten, dass ionisierende Strahlung in der Jurkat-T-ALL-Zelllinie innerhalb weniger Stunden nichtselektive Ca^{2+} -permeable Kationenströme aktiviert, den Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen erhöht, die mitochondriale $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung steigert, und Zelltod induziert. Der nichtselektive Kationenkanalinhibitor (ACA) hemmte den Ca^{2+} -Einstrom und die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung. Da - wie in dieser Promotionsarbeit gezeigt (siehe Abb 3.7)- Jurkat-T-ALL-Zellen ADPR-induzierbare und ACA-inhibierbare Kationenkanäle exprimieren, wäre folgender zugrundeliegende Mechanismus denkbar: Aus der Reparatur der DNA-Strahlenschäden stammendes ADPR aktiviert Ca^{2+} -permeable TRPM2-Kanäle in der Plasmamembran, Ca^{2+} -Einstrom und Überlaufen der Mitochondrien mit Ca^{2+} führt zur $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung und damit zur zusätzlichen Schädigung der Zelle und vermehrten Zelltod. Unerwarteterweise verringerte aber der TRPM2-Inhibitor ACA den Zelltod bestrahlter Jurkat-Zellen nicht, sondern erhöhe diesen signifikant (Klumpp et al., 2016).

In Bcl-2-überexprimierenden, apoptoseresistenten Jurkat-T-ALL-Zellen war die TRPM2-Protein-Abundanz und der basale Ca^{2+} -Einstrom niedriger als in den Kontroll-Zellen (Klumpp et al., 2016). Bestrahlung erhöhte - wie die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit zeigen- die ACA-inhibierbaren Kationenströme (siehe Abb. 3.8) und den ACA-sensitiven Ca^{2+} -Einstrom (Klumpp et al., 2016) dagegen deutlich stärker in den Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zellen als in den Kontroll-Zellen. Dennoch war in den Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zellen die radiogene mitochondriale $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung und der radiogene Zelltod niedriger als in den Kontrollzellen (Klumpp et al., 2016). Dies deutet darauf hin, dass der radiogene, vermutlich TRPM2-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom gleichzeitig zur Erhöhung der mitochondrialen $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung auch zur DNA-Schadensantwort beitragen könnte, die das Überleben der bestrahlten Zelle sichert. Apoptose-resistente Bcl-2-

überexprimierende Jurkat-Zellen scheinen hierbei verglichen zu den Kontrollzellen verstärkt diese Ca^{2+} -vermittelte Überlebens-Signale zu aktivieren, ohne in die Gefahr zu geraten, durch Ca^{2+} -Überflutung zu sterben.

Die in dieser Promotionsarbeit beobachtete radiogene Aktivierung von IK_{Ca} -Kanälen (siehe Abb. 3.9) könnte dabei im Zusammenspiel mit den TRPM2-Kanälen zur DNA-Schadensantwort beitragen, da Hemmung der IK_{Ca} -Kanälen durch Clotrimazol das Überleben der bestrahlten Jurkat-Zellen ähnlich vermindert wie die Hemmung der TRPM2-Kanäle durch ACA (Klumpp et al., 2016). Einen möglichen Mechanismus, wie IK_{Ca} und TRPM2 zum Überleben der T-ALL-Zellen beitragen könnte, schildert das nächste Kapitel.

4.4 Ca^{2+} -vermittelter Zellzyklusarrest

Zur Reparatur von DNA-Schäden insbesondere von DNA-Doppelstrangbrüchen müssen bestrahlte Tumorzellen den Zellzyklus arretieren, um zu vermeiden, mit unreparierter DNA in die Mitose einzutreten (siehe Kapitel 1.2). Zellzyklusanalysen an den bestrahlten Jurkat-Zellen (Klumpp et al., 2016) zeigten, dass sowohl Hemmung von TRPM2 durch ACA als auch Inhibition von IK_{Ca} durch Clotrimazol die Anzahl der bestrahlten Zellen im G_2/M -Zellzyklusarrest vermindert. Dies deutet auf eine Beteiligung von Ca^{2+} -Signalen an der Induktion des G_2/M -Zellzyklusarrests hin. Proteinbiochemische Analysen untermauerten diese Hypothese: TRPM2-Inhibition verhinderte in Jurkat-Zellen die radiogene Aktivierung von Isoformen des Ca^{2+} -Zielproteins CaMKII und die radiogene Inhibition von Cdc-2 (Cyclin-dependent kinase-1, CDK1), eine Untereinheit des Mitose-Promoting-Faktors (Klumpp et al., 2016). Hemmung von TRPM2 scheint somit über Überschreiben des radiogenen G_2/M -Zellzyklusarrests die Überlebenswahrscheinlichkeit bestrahlter Jurkat T-ALL-Zellen zu mindern.

Ganz analoge Prozesse konnten in dieser Promotionsarbeit (siehe Abb. 3.1 bis 3.6) und in begleitenden Experimenten des Labors für Experimentelle Radioonkologie in Tübingen (Heise et al., 2010, Palme et al., 2020, Palme et al., 2013) an der K562-CML-Zelllinie beobachtet werden. Die radiogenen Aktivierung von CaMKIIs und die nachgeschaltete Phosphorylierung des CaMKII-Zielproteins Cdc-25B, einer Phosphatase, und die daraus resultierende Hemmung von Cdc-2 sowie der Mitose benötigte die Aktivierung der nichtselektiven Kationen- und K⁺-Kanäle in der Plasmamembran (Abb. 4.1)

Cdc-2 wird bei DNA-Schäden durch Phosphorylierung an Tyr15 durch die Kinase Wee1 inaktiviert und durch Cdc-25 Phosphatasen aktiviert. Bei DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert Checkpoint Kinase-1 (Chk-1) Wee-1 und inaktiviert Cdc-25 (Patil et al., 2013). Die Experimente an den bestrahlten K562-CML-Zellen zeigen, dass CaMKIIs zur Inaktivierung von Cdc-25B und nachgeschalten von Cdc-2 beitragen. Die Rolle der radiogenen Ca²⁺-Signale für diesen Signalweg wird noch einmal durch die Tatsache verdeutlicht, dass der radiogene G₂/M-Zellzyklusarrest durch intrazelluläre Ca²⁺-Komplexierung mittels BAPTA-AM (Azetoxymethylester, N,N'-[1,2-Ethanediy]bis(Oxy-2,1-Phenylen)]bis[N-[2-[(Azetyloxy)Methoxy]-2-Oxoäthyl]-1,1'-bis[(Azetyloxy)Methyl] Ester-Glyzin) in bestrahlten Zellen überschrieben werden konnte (Heise et al., 2010).

Überraschenderweise wirkten sich die in dieser Promotionsarbeit (siehe Abb. 3.3, 3.5 und 3.6) beobachteten radiogen-aktivierten K_v3.4- und hERG1-Kanäle antagonistisch auf die zytosolische freie Ca²⁺-Konzentration der K562-Zellen aus, wie begleitende Fura-2-Ca²⁺-Imaging-Experimente des Labors Experimentelle Radioonkologie in Tübingen zeigten: hERG1-Blockade erhöhte und K_v3.4-Inhibition erniedrigte die zytosolische freie Ca²⁺-Konzentration insbesondere in den bestrahlten K562-Zellen (Palme et al., 2020). Sowohl pharmakologische Blockade oder Knockdown von K_v3.4 (Palme et al., 2013) als auch pharmakologische Inhibition von hERG1 (Palme et al., 2020) radiosensibilisierte die K562-Zellen

bezüglich ihres klonogenen Überlebens in Koloniebildungstests, genauso wie dies die Hemmung der nachgeschalteten CaMKIIs hervorrief (Heise et al., 2010). Dies deutet darauf hin, dass im Zusammenspiel von mehreren Ca²⁺-Einstromwegen und K⁺-Kanälen in der Plasmamembran komplexe radiogene Ca²⁺-Signale generiert werden, die benötigt werden um Isoformen der CaMKII zu aktivieren (Abb. 4.1).

Arbeiten, die wiederum im Labor Experimentelle Radioonkologie in Tübingen durchgeführt wurden, belegten, dass ganz ähnliche Prozesse auch in bestrahlten Glioblastomzellen ablaufen. Der Kälterezeptor TRPM8, ein Ca²⁺-permeabler nichtselektiver Kationenkanal konnte hier in U251- und T98G-Glioblastomzellen als radiogen-aktivierter Ca²⁺-Einstromweg identifiziert werden, der zur CaMKII Aktivierung und nachgeschaltet zur Hemmung von Cdc-25C und Cdc-2 beiträgt und so den Zellzyklus bestrahlter Zellen moduliert (Klumpp et al., 2017). Die in dieser Promotionsschrift (siehe Abb. 3.15) beobachteten radiogenen Aktivierungen von IK_{Ca}- und BK_{Ca}-K⁺-Kanälen wirken ganz ähnlich der von K_v3.4- und hERG1-Kanälen antagonistisch auf die freie zytosolische Ca²⁺-Konzentration bestrahlter Glioblastomzellen, wie begleitende Experimente des Labors zeigten (Stegen et al., 2016). TRPM8- (Klumpp et al., 2017) oder IK_{Ca}- (Stegen et al., 2015, Stegen et al., 2016) -Inhibition bzw. -Knockdown interferieren mit der Zellzykluskontrolle bestrahlter U251-, T98G- bzw. U-87 MG-Glioblastomzellen, hemmten die DNA-Reparatur und erniedrigen das klonogene Überleben.

Die radiosensibilisierenden Effekte eines IK_{Ca}-Targetings durch systemische TRAM-34-Gabe konnte auch im ektopen U-87 M-Glioblastom-Mausmodell demonstriert werden (Stegen et al., 2015). Ähnliche radiosensibilisierende Effekte des IK_{Ca}-Targetings konnten auch in Brustkrebszellen *in vitro* und in einem syngenem orthotopischen Brustkrebs-Mausmodell gezeigt werden (Mohr et al., 2019a). Daraus lässt sich schließen, dass verschiedenen Ionenkanal-Typen in der Plasmamembran radiogene Ca²⁺-Signale ausbilden. Dieses radiogene Ca²⁺-Signaling trägt in Tumorentitäten verschiedenen Ursprungs (mesenchymal, glial

und epithelial) zur DNA-Schadensantwort bei, indem es den Zellzyklus und damit die DNA-Reparatur bestrahlter Zellen kontrolliert. Die radiogenen Ca^{2+} -Signale, welche scheinbar entitätsübergreifend die CaMKIIs als gemeinsame Ca^{2+} -Effektorproteine ansteuert, können somit als ein genereller Mechanismus in der Radiobiologie von Tumorzellen betrachtet werden.

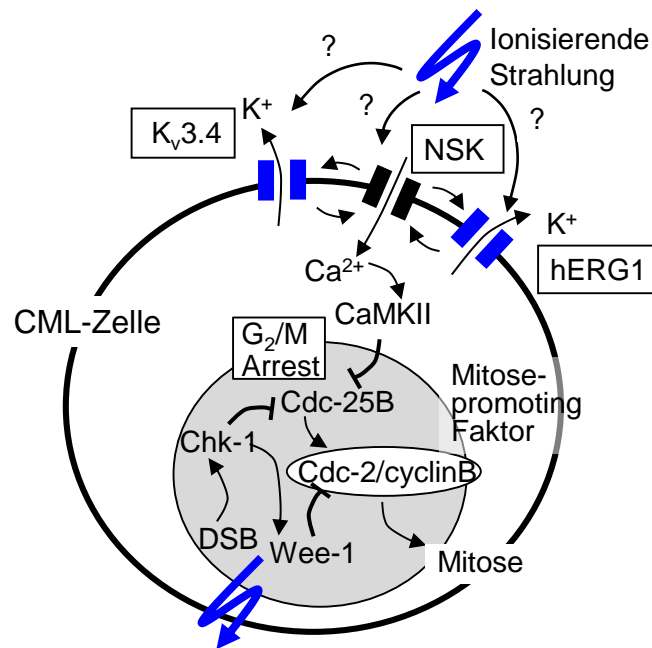


Abb. 4.1. In bestrahlten CML-Zellen erzeugen radiogen-aktivierte Ca^{2+} -permeable nichtselektive Kationen-Kanäle im Zusammenspiel mit spannungsaktivierten Kv K^{+} -Kanälen spezifische Ca^{2+} -Signale, die nukleäre Isoformen der CaMKII-Kinase aktivieren. Letztere trägt zur Inaktivierung der Phosphatase Cdc-25B bei. Als Folge kann das über Chk-1 und Wee-1 inaktivierte Cdc-2 nicht dephosphoryliert und somit aktiviert werden, womit der Zellzyklus im G_2/M -Übergang arretiert wird. DSB: DNA-Doppelstrangbruch, NSK: Nichtselektiver Ca^{2+} -permeabler Kationen-Kanal.

Befunde des Labors Experimentelle Radioonkologie in Tübingen belegen, dass in Glioblastomzellen BK_{Ca} -Kanal-Funktion zur radiogenen Aktivierung von Isoformen

der CaMKII β benötigt wird (Edalat et al., 2016, Steinle et al., 2011). Im Gegensatz zu TRPM8 und IK $_{Ca}$ radiosensibilisiert BK $_{Ca}$ -Targeting die Glioblastomzellen nicht (Edalat et al., 2016). Hieraus lässt sich auf eine abweichende Funktion des durch BK $_{Ca}$ -vermitteltem radiogenem Ca $^{2+}$ -„Signalings“ schließen.

4.5 BK $_{Ca}$ -vermittelte radiogene Hypermigration/-invasion von Glioblastomzellen

Die starke Streuung von Glioblastomzellen im Gehirn erniedrigt die Wahrscheinlichkeit einer kompletten chirurgischen Resektion des Tumors und der Erfassung aller residuellen Tumorzellen mit dem Zielvolumen der darauffolgenden fraktionierten Radiochemotherapie. Arbeiten des Labors Experimentelle Radioonkologie in Tübingen zeigten an T98G- und U-87 MG-Zellen *in vitro* (Steinle et al., 2011) und im orthotopen Glioblastom-Xenograft-Mausmodell (Edalat et al., 2016), dass die auch in dieser Promotionsarbeit (siehe Abb. 3.15) beobachtete strahleninduzierte BK $_{Ca}$ -Aktivierung die Migration bzw. Gehirninvasion der Glioblastomzellen zusätzlich verstärkt. Dabei wurde eine strahleninduzierte (vermutlich direkt über radiogene S-Nitrosylierung vermittelte) Stabilisierung des Transkriptionsfaktor Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α (Moeller et al., 2004)), eine Hochregulation des HIF-1 α Target-Chemokins Stromal cell derived factor-1 (SDF-1, CXCL12) und nachfolgendes auto/parakrines Signaling über den SDF1 Chemokinrezeptor CXCR4 und vermutlich Phospholipase-C und Inositoltrisphosphat-vermittelte Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum als ein dem BK $_{Ca}$ -Kanal vorgeschalteter Signalweg beobachtet (Edalat et al., 2016). Zudem steigern TRPM8-Agonisten die BK $_{Ca}$ -Kanal-Aktivität in Glioblastomzellen (Klumpp et al., 2017), so dass auch ein Beitrag zur BK $_{Ca}$ -Aktivierung durch radiogene TRPM8-Stimulation denkbar wäre. Letztendlich konnte eine Ca $^{2+}$ -abhängige Tyrosin-Kinase, die Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk-2, FAK-2, PTK-2b), identifiziert werden, die durch Bestrahlung stimuliert wird, über vermutlich direkte Kanal-Phosphorylierung zur radiogenen BK $_{Ca}$ -Aktivierung

beiträgt und zur radiogenen Hypermigration benötigt wird (Stegen et al., 2016). Für Pyk-2 wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von BK_{Ca} seine Ca²⁺-Sensitivität erhöht (Ling et al., 2004).

CIC-3 Cl⁻-Kanäle- bzw. Cl⁻/H⁺-Antiporter lokalisieren in nicht-Tumorzellen in intrazellulären Membranen, können aber induziert durch oxidativen Stress auch in die Plasmamembran transloziert werden (Kasinathan et al., 2007). Die hohe Plasmamembran-Expression von CIC-3 in Glioblastomzellen kann zur Glioblastom-Szintigraphie mit ¹³¹I-Chlorotoxin als Tracer verwendet werden. Der CIC-3- und Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)-Inhibitor Chlorotoxin bindet dabei hochselektiv an Glioblastomzellen (Hockaday et al., 2005). Wie bereits erwähnt, belegen funktionelle Daten, dass CIC-3 für die Volumenregulation während der Migration und Gehirninvasion von Glioblastomzellen benötigt werden (Cuddapah et al., 2013, Sontheimer, 2008) und dass CIC-3 dabei über direkte Interaktion mit CaMKIIs reguliert wird (Cuddapah and Sontheimer, 2010). In der vorliegenden Promotionsarbeit benötigte die radiogene Aktivierung von NPPB-sensitiven Cl⁻-Strömen in den bestrahlten Glioblastomzellen die Funktion von BK_{Ca}-Kanälen (siehe Abb. 3.16). Zusammen mit früheren Befunden, die eine BK_{Ca}-Abhängigkeit der radiogenen Aktivierung von Isoformen der CaMKII zeigen (Edalat et al., 2016, Steinle et al., 2011), bestätigen diese Beobachtungen die Beteiligung von BK_{Ca} an einem radiogenen Ca²⁺-Signaling. Zudem zeigen die Befunde dieser Promotionsarbeit eine strahleninduzierte Aktivierung von Cl⁻-Kanälen in der Plasmamembran von Glioblastomzellen (Abb. 4.2).

Stressfaktoren wie Tumorphoxie können beschriebenermaßen eine Änderung von einem proliferierenden „Grow“- in einen Gewebe-invadierenden bzw. metastasierenden „Go“-Phänotyp induzieren (Giese et al., 1996) und so durch Auswandern aus dem hypoxischen Areal das Überleben der Tumorzelle in einer weniger feindlichen Mikroumgebung gewährleisten. Zur Annahme dieses migrierenden/metastasierenden Phänotyps durchlaufen Karzinomzellen und

Glioblastomzellen dabei wahrscheinlich eine epithelial-mesenchymale bzw. glial-mesenchymale Transformation (Hay, 1995).

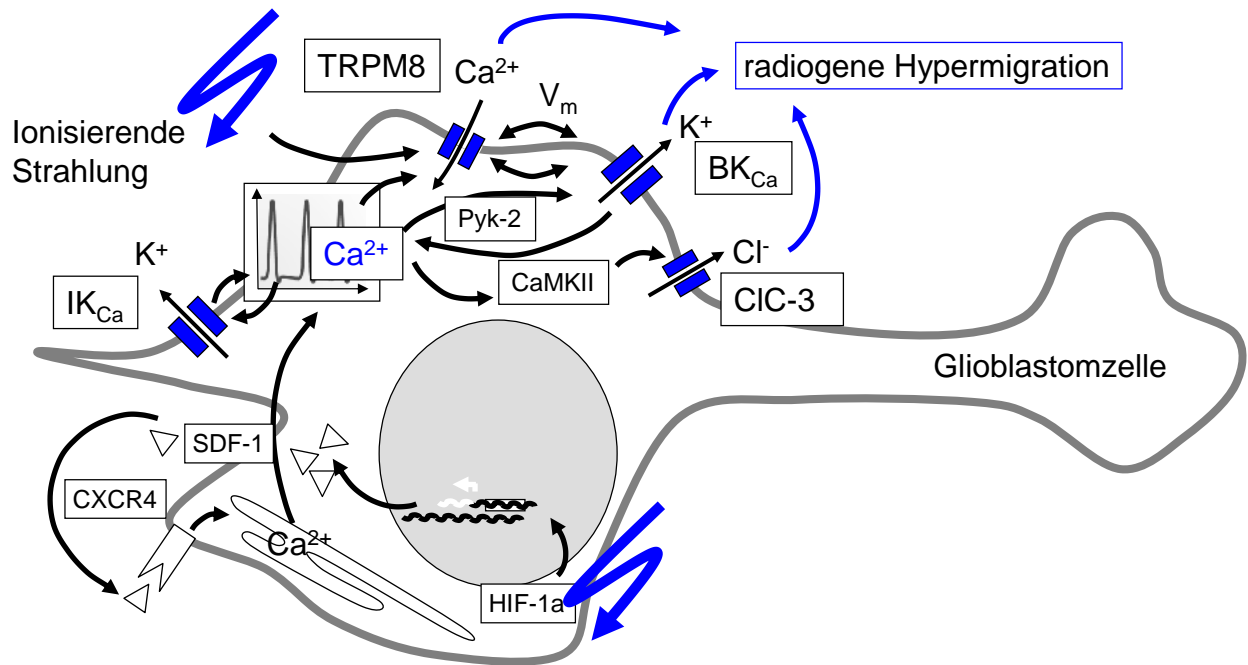


Abb. 4.2. Radiogene Hypermigration in Glioblastomzellen wird wahrscheinlich durch Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen TRPM8-Kationenkanälen und Stabilisierung von HIF-1 α ausgelöst. Hochregulation des HIF-1 α -Ziel-Gens SDF1 und auto/parakrines SDF1/CXCR4 Chemokin-Signaling führt vermutlich zu Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Ca^{2+} -Freisetzung und TRPM8-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom bilden in Zusammenspiel mit Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen vom BK_{Ca} und IK_{Ca} Typ spezifische Ca^{2+} -Signale, die nachgeschaltet Pyk-2- und CaMKII-Kinasen aktivieren, was zu einer Verstärkung der BK_{Ca} -Aktivität bzw. Aktivierung von vermutlich CIC-3- Cl^- -Kanäle in der Plasmamembran führt. Ausstrom von K^+ und Cl^- und isoosmotisches Nachfolgen von Wasser durch Aquaporine (nicht dargestellt) bewirken eine lokale Volumenabnahme, die zusammen mit Volumenzunahme am Lammellipodium (nicht dargestellt) die gerichtete Migration der Glioblastomzelle antreibt.

Der Vergleich von Transkriptomdaten aus Glioblastomresektaten vor Therapie und nach Rezidivierung deutet darauf hin, dass die molekularen Glioblastomsubgruppen (klassisch, proneural, neural und mesenchymal (Verhaak et al., 2010)) während der fraktionierten Radiochemotherapie häufig mesenchymale, proinvasive Marker hochregulieren (Phillips et al., 2006, Wang et

al., 2017). Die radiogene Hypermigration/Invasion von Glioblastomzellen und die zugrundeliegenden Aktivierung der für die Migration unerlässlichen Ionenkanalleitfähigkeiten, die außer im Labor für Experimentelle Radioonkologie in Tübingen (Edalat et al., 2016, Klumpp et al., 2017, Stegen et al., 2016, Steinle et al., 2011) auch von anderen (aber nicht allen, zum Beispiel (Eke et al., 2012)) Arbeitsgruppen *in vitro* (D'Alessandro et al., 2019) und im orthotopen Glioblastom-Mausmodell (Birch et al., 2018) beobachtet wurde, unterstreicht eine derartige Transformation zu einem migratorischen Phänotyp von Glioblastomzellen während der Bestrahlung. Auch für Sarkome (Krebs, 1929, Yamamoto, 1936) und Brustkrebs (Bouchard et al., 2017, Kaplan and Murphy, 1949, Sheldon and Fowler, 1976) wurde in ektopen *Xenograft* Maustumormodellen eine durch Bestrahlung geförderte distante Metastasierung beschrieben. Dies deutet darauf hin, dass die Radiotherapie ähnlich der Hypoxie den „Go“-Phänotyp in Tumorentitäten unterschiedlichen Ursprungs (glial, mesenchymal und epithelial) induzieren kann. Eine strahleninduzierte Hyperinvasion/Hypermastasierung könnte in der Theorie zum Abwandern bestrahlter Tumorzellen aus dem Zielvolumen während fraktionierter Strahlentherapie führen und somit zum Therapieversagen beitragen. Derzeit kann noch nicht abschließend beurteilt werden, inwieweit derartige Prozesse tatsächlich für die Strahlentherapie des Patienten eine Rolle spielen. Dagegen spricht, dass in der Klinik zum Beispiel strahleninduzierte Metastasierung von Karzinomzellen nur sehr spärlich beschrieben wurden (Jesse and Lindberg, 1975, Martin et al., 2014, Strong et al., 1978).

Neben dem HIF-1 α /SDF-1/CXCR4/Ca²⁺-Signalweg trägt möglicherweise auch EGFR-Signaling zu einer strahleninduzierten Gewebeinvasion/Metastasierung bei. EGFR wird nach Bestrahlung vermutlich über Lipidperoxidation und nachfolgender Aktivierung von Src-Kinasen aktiviert und in den Zellkern transloziert (Dittmann et al., 2008, Dittmann et al., 2009). EGFR wiederum reguliert spannungsabhängige Nav-Kanäle (Campbell et al., 2013, Gonzalez-Gonzalez et al., 2019, Mohammed et al., 2016, Uysal-Onganer and Djamgoz, 2007, Zhang et al., 2019) in

migrierenden/invadierenden Krebszellen: spannungsabhängige Nav-Kanäle wie Nav1.5 (SCN5A), Nav1.6 (SCN8A), Nav1.7 (SCN9A) oder die neonatale Splice-Variante von Nav1.5 sind in dem Lamellipodium von migrierenden Glioblastom- (Holley et al., 2014), Melanom- und Karzinom- (Lungen, Mamma- und weitere Karzinomzellen) Zellen hoch exprimiert (Djamgoz et al., 2019). Pharmakologisches Targeting oder genetischer Knockdown dieser Kanäle hemmt die Metastasierung in Brust- und Prostatakrebs-Tiermodellen (Driffort et al., 2014, Nelson et al., 2015a, Nelson et al., 2015b, Yildirim et al., 2012). Auch zeigen Patientendaten, dass die Abundanz von Nav-Kanäle in kolorektalen und Brustkrebs-Tumorgeweben mit der lokalen Tumorkontrolle, der Lymphknotenmetastasierung oder dem Patientenüberleben assoziiert sind (Fraser et al., 2005, Lin et al., 2019, Yang et al., 2012). Mechanistisch scheinen Nav-Kanäle in der Lamellipodium-Membran Na⁺/H⁺-Antiporter zu regulieren, die lokal die extrazelluläre Perimembran-Raum ansäuern und so den Verdau der extrazellulären Matrix durch Cathepsine und die Gewebsinfiltration fördern (Brisson et al., 2013, Brisson et al., 2011, Gillet et al., 2009) (siehe auch Kapitel 1.2.2). Die oben erwähnte Abhängigkeit dieser Prozesse von dem EGFR-Signaling (Campbell et al., 2013, Gonzalez-Gonzalez et al., 2019, Mohammed et al., 2016, Uysal-Onganer and Djamgoz, 2007, Zhang et al., 2019) lässt spekulieren, dass radiogene EGFR-Aktivierung zur Hypermigration/-invasion/-metastasierung von Krebszellen beitragen könnte. Gesichert sind dagegen die Bedeutung des radiogenen EGFR-Signalings für die DNA-Reparatur (Rodemann et al., 2007) sowie die metabolische Reprogrammierung. Letztere wird im nächsten Kapitel vorgestellt.

4.6 Strahleninduziertes Glukose-„Tanken“

Tumoren neigen zu einer vermehrten anaeroben Glukose-Verwertung selbst bei ausreichendem Sauerstoffpartialdruck. Dieses nach dem Erstbeschreiber Otto Warburg (Warburg, 1956) genanntes Phänomen bedingt eine stark verringerte Energieausbeute (2 mol ATP/ 1 mol Glukose durch Milchsäuregärung anstelle von 36 mol ATP/ 1 mol Glukose durch mitochondrialer oxidativer Phosphorylierung). Milchsäuregärende Tumoren benötigen daher einen viel größeren Glukoseumsatz. Es ist deswegen nicht verwunderlich, dass Tumorzellen Glukoseaufnahme-Wege wie die Glut-Uniporter (Meng et al., 2019) und/oder (2)Na⁺/Glukose-Ko-Transporter SGLTs (Wright et al., 2017) hochregulieren.

Membranpotential-Ableitungen in der vorliegenden Promotionsarbeit (siehe Abb. 3.10 bis 3.14) zeigten in Lungen-Adenokarzinomzellen eine strahleninduzierte, EGFR-Tyrosinkinase-abhängige, durch extrazelluläre Glukose-evozierte und Phlorizin-sensitive Depolarisation, die auf einen radiogenen, EGFR-regulierten Na⁺-gekoppelte Glukose-Aufnahme durch SGLTs hinwies. Diese SGLT-verursachte Depolarisation erreichte ca. 3 h nach Bestrahlung ihr Maximum. Bis etwa 1 h nach Bestrahlung hyperpolarisierte das Membranpotential jedoch leicht (siehe Abb. 3.10). Dies deutete auf eine radiogene Aktivierung von K⁺-Kanälen, deren hyperpolarisierende Wirkung auf das Membranpotential initial zu überwiegen schien. Tatsächlich wurde in A549-Zellen eine strahleninduzierte Aktivierung von IK_{Ca}-Kanälen beschrieben (Roth et al., 2015). Funktionell würde eine parallele Aktivierung von IK_{Ca} die elektrische Triebkraft für den einwärtsgerichteten (2)Na⁺/Glukose-Ko-Transport (welcher ja sehr schnell das Membranpotential lokal stark depolarisieren würde) aufrechterhalten. Bei länger anhaltender paralleler Aktivität von SGLT und IK_{Ca} würde der kontinuierliche Einstrom von Na⁺ und Ausstrom von K⁺ aber die chemischen Gradienten für Na⁺ und K⁺ über die Plasmamembran abschwächen. Einen Hinweis auf IK_{Ca}/SGLT-bedingte erhöhte intrazelluläre Na⁺- und erniedrigte intrazelluläre K⁺-Konzentrationen ergab die

Beobachtung, dass durch die Wegnahme von extrazellulärer Glukose (siehe Abb. 3.11), die Applikation von Phlorizin (siehe Abb. 3.12) oder auch Erlotinib (siehe Abb. 3.13) das Membranpotential der bestrahlten Zellen deutlich später hyperpolarisierte als das der unbestrahlten Zelle. Bei mit Na^+ -vollgelaufenen Zellen mit erniedrigter intrazellulärer K^+ -Konzentrationen verschiebt sich E_K zu depolarisierten Werten. Wird nun der Na^+ -Einstrom über SGLT gestoppt, können die Zellen nicht mehr über ihre K^+ -Leitfähigkeit das ursprüngliche (i.e. vor SGLT-Aktivierung) negative Membranpotential aufbauen. Vielmehr wird dieses über den Na^+/K^+ -Pumpstrom, der gleichzeitig die Gradienten für Na^+ und K^+ wieder restauriert in Zusammenspiel mit der K^+ -Leitfähigkeit erreicht und dies dauert viel länger, als das Aufbauen eines reinen K^+ -Diffusionspotential.

Begleitende Experimente in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung in Tübingen zeigten, dass die Hemmung von SGLT die A549-Lungen-Adenokarzinomzellen sowie zwei HNSCC-Linien radiosensibilisiert. Als Mechanismus wurde dabei der erhöhte Energie- und Azetyl-CoA-Bedarf der bestrahlten Zellen identifiziert, der über eine verstärkte SGLT-vermittelte Glukose-Aufnahme gedeckt werden muss. Azetyl-CoA wird für die Histon-Azetylierung zur DNA-Dekondensation während der Reparatur der DNA-Strahlenschäden benötigt (Dittmann et al., 2013) (Abb. 4.3).

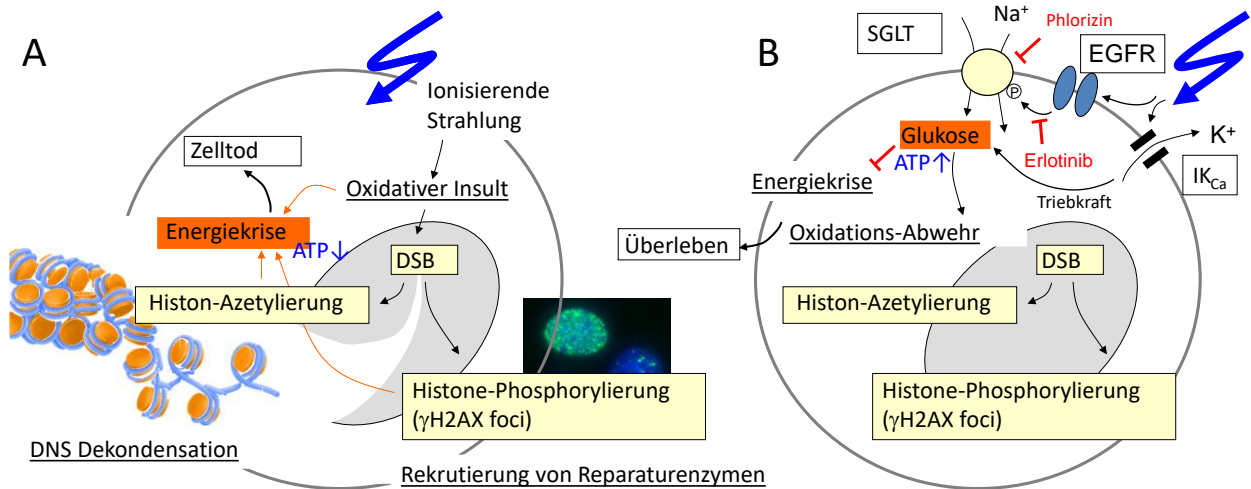


Abb. 4.3. Radiogene Glukose-Aufnahme in A549-Lungen-Adenokarzinomzellen. **A.** Bestrahlung schädigt entweder direkt oder über ROS-Bildung Zellbestandteile wie die DNA. Bestrahlte Zellen benötigen vermehrt Substrate für zum Beispiel Azetylierung von Histonen zur DNA-Dekondensierung oder ATP für die Histonen-Phosphorylierung zur Rekrutierung von Reparatur-Enzymen. Dadurch können die Zellen in eine Energiekrise geraten und sterben. **B.** Durch strahleninduzierte Verstärkung der Glukoseaufnahme über EGFR-vermittelte Aktivierung von SGLT Transportern und paralleler Aktivierung von IK_{Ca} K⁺-Kanälen kann die Zellen ausreichende Mengen an ATP und Azetyl-CoA bilden, ihre oxidative Abwehr erhöhen und die Strahlenschäden reparieren. DSB: DNA-Doppelstrangbruch.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Promotionsarbeit konnte zeigen, dass ionisierende Strahlung in Dosen, wie sie bei myeloablativer Ganzkörperbestrahlung zur Konditionierung vor allogener Knochenmarkstransplantation oder zur normofraktionierten Strahlentherapie in der Klinik angewendet werden, Ionenkanäle und Transporter in der Plasmamembran von Krebszellen stimuliert. Diese daraus resultierenden radiogenen Transporte lassen sich sowohl in mesenchymalen, epithelialen als auch glialen Tumorentitäten beobachten und scheinen somit ein generelleres Phänomen in der Radiobiologie zu sein. Diese Promotionsarbeit begleitende Experimente des Labors für Experimentelle Radioonkologie und der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, beide in Tübingen, zeigten, dass die radiogenen

Transporte zu der DNA-Schadensantwort beitragen und das klonogene Überleben der bestrahlten Krebszellen fördern, in dem sie Zellzyklus oder Metabolismus regulieren. Zudem können die radiogenen Transporte Zell-Migration fördern und somit folglich zumindest in der Theorie Gewebeinvasion und Metastasierung von Krebszellen während der Therapie fördern.

Die Identifikation der Radioresistenz-vermittelnden Eigenschaften radiogener Transporte könnte zur Entwicklung neuer Therapie-Strategien verwendet werden. Schätzungsweise mehr als ein Viertel aller bei uns zugelassener Medikamente modulieren entweder als Zielstruktur oder als „Off-Target“ Ionenkanäle bzw. Transporter. Beispiele hierfür sind Neuroleptika, Antidepressiva, Antihistaminika, Fluoroquinolon-Antibiotika, Analgetika, Antikonvulsiva, Antiarrhythmika, Antihypertensiva, und Antidiabetika (SGLT2-Inhibitoren) (Kale et al., 2015). Neue Strategien zur Radiosensibilisierung von Tumoren, die konkomitant zur fraktionierten Radiotherapie Ionenkanal/Transporter-„Targeting“ durch „Repurposing“ von zugelassenen Medikamenten verwenden, könnten daher schnell in klinische Studien translatiert werden. Hierzu müssen aber die radiophysiologischen Prozesse und der Beitrag der verschiedenen Ionenkanal/Transporter-Typen darin besser verstanden sein.

5 Zusammenfassung

Transporte über die Plasmamembran durch Pumpen, Transporter und Ionenkanäle schaffen und nutzen chemische und elektrische Gradienten zur pH-Homöostase, Substratversorgung und Kataboliten-Entsorgung einer jeden Zelle. Zudem kontrollieren sie das Zellvolumen und sind deswegen übergeordnete Regulatoren von Zellproliferation, Zellmigration und Zelltod. Ionenkanäle erzeugen in erregbaren Zellen elektrische Signale. Sie steuern aber als integrale Module auch biochemische Signaltransduktionsketten, indem sie zum Beispiel in Proteinkomplexen mit Membranrezeptoren und „downstream“ Effektor-Proteinen physisch interagieren oder Ca^{2+} -Signale und Ca^{2+} -Effektorproteine regulieren. Tumorzellen zeichnen sich durch eine aberrante Expression von Ionenkanälen/Transportern aus, welche spezifische Funktionen in der Tumorbiologie ausüben, die sich häufig von ihren ursprünglichen Funktionen in nicht-transformierten Zellen unterscheiden. Ein plakatives Beispiel dazu sind spannungsaktivierte Natrium-Kanäle, die in normalen erregbaren Zellen Aktionspotentiale aufbauen und in metastasierenden Karzinomzellen die Gewebeinvasion steuern.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war, in Tumorzellen die Modulation von Ionenkanälen/Transportern in der Plasmamembran durch therapeutisch relevante Dosen von ionisierender Strahlung zu beschreiben. Hierzu wurden in Zelllinien unterschiedlicher humaner Tumorentitäten (chronische myeloische Leukämie (CML), T-Zell akute lymphatischer Leukämie (T-ALL), Lungen-Adenokarzinom, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom und Glioblastom) nach Bestrahlung mit 0 Gy bzw. 2-10 Gy Photonen mit der Patch-Clamp-Methode elektrophysiologisch abgeleitet und in der Spannungsklemme Ganzzell- bzw. makroskopische Cell-attached-Ströme sowie in der 0 pA-Stromklemme das Membranpotential gemessen.

Dabei zeigte sich, dass innerhalb wenigen Stunden nach Bestrahlung Ca^{2+} -permeable nichtselektive Kationenkanäle (nicht näher definiert in CML-Zellen, TRPM2 in T-ALL-Zellen), K^+ -Kanäle ($\text{K}_v3.4$ und hERG1 in CML-Zellen, IK_{Ca} in T-ALL- und Glioblastomzellen, BK_{Ca} in Glioblastomzellen,) sowie Cl^- -Kanäle (Clc-3 -ähnliche Kanäle in Glioblastomzellen) aktivieren. Die radiogene Induktion der Cl^- -

Kanal-Aktivierung in den Glioblastomzellen benötigte die Aktivität der BK_{Ca}-Kanäle, wodurch die bereits bekannte Signaling-Funktion der BK_{Ca}-Kanäle bestätigt wurde.

Die Membranpotential-Ableitungen in den Lungenadenokarzinom-Zellen zeigten eine strahleninduzierte transiente Hyperpolarisation, gefolgt von einer länger anhaltenden Depolarisation des Membranpotentials, die 3 h nach Bestrahlung maximal war. Wegnahme der extrazellulären Glukose revertierte die radiogene Depolarisation, der Glukose-Transport-Hemmer Phlorizin und der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib hemmten sie. Dies lässt auf eine radiogene, EGFR-Tyrosinkinase vermittelte Aktivierung einer Phlorizin-sensitiven Na⁺-gekoppelten Glukose-Aufnahme über SGLT-Transporter schließen. Eine radiogene SGLT-Aktivierung wurde auch in den Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zellen beobachtet.

Begleitende Experimente des Labors Experimentelle Radioonkologie und der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie in Tübingen, demonstrierten, dass die radiogene Aktivierung der Ionenkanäle/Transporter zum klonogenen Überleben der Tumorzellen beitragen. Pharmakologische Hemmung oder Knockdown der Ionenkanäle/Transporter radiosensibilisiert die Tumorzellen und zeigt damit deren funktionelle Relevanz für die DNA-Schadensantwort. Als Mechanismen konnte dabei Ionenkanal-reguliertes radiogenes Ca²⁺-Signaling identifiziert werden, das in CML-, T-ALL- und Glioblastom-Zellen nachgeschaltet Isoformen von CaMKII aktiviert, wodurch über Inhibition von Cdc-25 und Cdc-2 der Zellzyklus in den bestrahlten Zellen an den Fortschritt der DNA-Reparatur angepasst wird. In den Glioblastomzellen trägt zudem die radiogene Aktivierung der BK_{Ca}- und Cl⁻-Kanäle zur verstärkten Migration und Gehirninfiltration der Zellen bei, was möglicherweise auch zum Therapieversagen beitragen kann. Mithilfe erhöhter SGLT-Aktivität erhöhen bestrahlte Karzinomzellen ihre Glukoseaufnahme, um so den durch DNA-Reparatur erhöhten Energieverbrauch ausgleichen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- ARCANGELI, A. 2005. Expression and role of hERG channels in cancer cells. *Novartis Found Symp*, 266, 225-32; discussion 232-4.
- ARCANGELI, A., BIANCHI, L., BECCHETTI, A., FARAVELLI, L., CORONNELLO, M., MINI, E., OLIVOTTO, M. & WANKE, E. 1995. A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol*, 489 (Pt 2), 455-71.
- BARRY, P. H. & LYNCH, J. W. 1991. Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol*, 121, 101-17.
- BAYER, K. U., DE KONINCK, P. & SCHULMAN, H. 2002. Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMKII to Ca(2+) oscillations. *Embo J*, 21, 3590-7.
- BAYER, K. U. & SCHULMAN, H. 2001. Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 917-23.
- BENTLE, M. S., REINICKE, K. E., BEY, E. A., SPITZ, D. R. & BOOTHMAN, D. A. 2006. Calcium-dependent modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J Biol Chem*, 281, 33684-96.
- BERRIDGE, M. J., LIPP, P. & BOOTHMAN, M. D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 11-21.
- BIRCH, J. L., STRATHDEE, K., GILMOUR, L., VALLATOS, A., MCDONALD, L., KOUZELI, A., VASAN, R., QAISI, A. H., CROFT, D. R., CRIGHTON, D., GILL, K., GRAY, C. H., KONCZAL, J., MEZNA, M., MCARTHUR, D., SCHUTTELKOPF, A. W., MCCONNELL, P., SIME, M., HOLMES, W. M., BOWER, J., MCKINNON, H. J., DRYSDALE, M., OLSON, M. F. & CHALMERS, A. J. 2018. A Novel Small-Molecule Inhibitor of MRCK Prevents Radiation-Driven Invasion in Glioblastoma. *Cancer Res*, 78, 6509-6522.
- BORNHAUSER, M., KROGER, N., SCHWERDTFEGER, R., SCHAFFER-ECKART, K., SAYER, H. G., SCHEID, C., STELLJES, M., KIENAST, J., MUNDHENK, P., FRUEHAUF, S., KIEHL, M. G., WANDT, H., THEUSER, C., EHNINGER, G. & ZANDER, A. R. 2006. Allogeneic haematopoietic cell transplantation for chronic myelogenous leukaemia in the era of imatinib: a retrospective multicentre study. *Eur J Haematol*, 76, 9-17.
- BOUCHARD, G., THERRIAULT, H., GEHA, S., BUJOLD, R., SAUCIER, C. & PAQUETTE, B. 2017. Radiation-induced lung metastasis development is MT1-MMP-dependent in a triple-negative breast cancer mouse model. *Br J Cancer*, 116, 479-488.
- BRISSON, L., DRIFFORT, V., BENOIST, L., POET, M., COUNILLON, L., ANELMI, E., RUBINO, R., BESSON, P., LABBAL, F., CHEVALIER, S., RESHKIN, S. J., GORE, J. & ROGER, S. 2013. NaV1.5 Na(+) channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci*, 126, 4835-42.
- BRISSON, L., GILLET, L., CALAGHAN, S., BESSON, P., LE GUENNEC, J. Y., ROGER, S. & GORE, J. 2011. Na(V)1.5 enhances breast cancer cell

- invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene*, 30, 2070-6.
- BROWN, A. & GEIGER, H. 2018. Chromosome integrity checkpoints in stem and progenitor cells: transitions upon differentiation, pathogenesis, and aging. *Cell Mol Life Sci*, 75, 3771-3779.
- BROWN, B. M., PRESSLEY, B. & WULFF, H. 2018. KCa3.1 Channel Modulators as Potential Therapeutic Compounds for Glioblastoma. *Curr Neuropharmacol*, 16, 618-626.
- CAHU, X., LABOPIN, M., GIEBEL, S., ALJURF, M., KYRCZ-KRZEMIEN, S., SOCIÉ, G., EDER, M., BONIFAZI, F., BUNJES, D., VIGOUROUX, S., MICHALLET, M., STELLJES, M., ZUCKERMAN, T., FINKE, J., PASSWEG, J., YAKOUB-AGHA, I., NIEDERWIESER, D., SUCAK, G., SENDELØV, H., POLGE, E., NAGLER, A., ESTEVE, J. & MOHTY, M. 2016. Impact of conditioning with TBI in adult patients with T-cell ALL who receive a myeloablative allogeneic stem cell transplantation: a report from the acute leukemia working party of EBMT. *Bone Marrow Transplant*, 51, 351-7.
- CAMPBELL, T. M., MAIN, M. J. & FITZGERALD, E. M. 2013. Functional expression of the voltage-gated Na(+)-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *J Cell Sci*, 126, 4939-49.
- CAVARRA, M. S., DEL MÓNACO, S. M., ASSEF, Y. A., IBARRA, C. & KOTSIAS, B. A. 2007. HERG1 currents in native K562 leukemic cells. *J Membr Biol*, 219, 49-61.
- CHAO, H. X., POOVEY, C. E., PRIVETTE, A. A., GRANT, G. D., CHAO, H. Y., COOK, J. G. & PURVIS, J. E. 2017. Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Syst*, 5, 445-459.e5.
- CUDDAPAH, V. A. & SONTHEIMER, H. 2010. Molecular interaction and functional regulation of CIC-3 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma. *J Biol Chem*, 285, 11188-96.
- CUDDAPAH, V. A., TURNER, K. L., SEIFERT, S. & SONTHEIMER, H. 2013. Bradykinin-induced chemotaxis of human gliomas requires the activation of KCa3.1 and CIC-3. *J Neurosci*, 33, 1427-40.
- D'ALESSANDRO, G., MONACO, L., CATACUZZENO, L., ANTONANGELI, F., SANTORO, A., ESPOSITO, V., FRANCIOLINI, F., WULFF, H. & LIMATOLA, C. 2019. Radiation Increases Functional KCa3.1 Expression and Invasiveness in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*, 11.
- D'ANGIOLELLA, V., PALAZZO, L., SANTARPIA, C., COSTANZO, V. & GRIECO, D. 2007. Role for non-proteolytic control of M-phase promoting factor activity at M-phase exit. *PLoS ONE*, 2, e247.
- DITTMANN, K., MAYER, C., FEHRENBACHER, B., SCHALLER, M., RAJU, U., MILAS, L., CHEN, D. J., KEHLBACH, R. & RODEMANN, H. P. 2005. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 280, 31182-9.

- DITTMANN, K., MAYER, C., KEHLBACH, R. & RODEMANN, H. P. 2008. Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol Cancer*, 7, 69.
- DITTMANN, K., MAYER, C., KEHLBACH, R., ROTHMUND, M. C. & PETER RODEMANN, H. 2009. Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport. *Radiother Oncol*, 92, 379-82.
- DITTMANN, K., MAYER, C., RODEMANN, H. P. & HUBER, S. M. 2013. EGFR cooperates with glucose transporter SGLT1 to enable chromatin remodeling in response to ionizing radiation. *Radiother Oncol*, 107, 247-51.
- DJAMGOZ, M. B. A., FRASER, S. P. & BRACKENBURY, W. J. 2019. In Vivo Evidence for Voltage-Gated Sodium Channel Expression in Carcinomas and Potentiation of Metastasis. *Cancers (Basel)*, 11.
- DOLLE, C., RACK, J. G. & ZIEGLER, M. 2017. NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria. *Febs J*, 280, 3530-41.
- DRIFFORT, V., GILLET, L., BON, E., MARIONNEAU-LAMBOT, S., OULLIER, T., JOULIN, V., COLLIN, C., PAGES, J. C., JOURDAN, M. L., CHEVALIER, S., BOUGNOUX, P., LE GUENNEC, J. Y., BESSON, P. & ROGER, S. 2014. Ranolazine inhibits NaV1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. *Mol Cancer*, 13, 264.
- DUAN, S., YAO, Z., HOU, D., WU, Z., ZHU, W. G. & WU, M. 2007. Phosphorylation of Pirh2 by calmodulin-dependent kinase II impairs its ability to ubiquitinate p53. *Embo J*, 26, 3062-74.
- DUAN, W., GAO, L., DRUHAN, L. J., ZHU, W. G., MORRISON, C., OTTERSON, G. A. & VILLALONA-CALERO, M. A. 2004. Expression of Pirh2, a newly identified ubiquitin protein ligase, in lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 96, 1718-21.
- DUAN, W., GAO, L., WU, X., ZHANG, Y., OTTERSON, G. A. & VILLALONA-CALERO, M. A. 2006. Differential response between the p53 ubiquitin-protein ligases Pirh2 and Mdm2 following DNA damage in human cancer cells. *Exp Cell Res*, 312, 3370-8.
- ECKERT, F., ZWIRNER, K., BOEKE, S., THORWARTH, D., ZIPS, D. & HUBER, S. M. 2019. Rationale for Combining Radiotherapy and Immune Checkpoint Inhibition for Patients With Hypoxic Tumors. *Front Immunol*, 10, 407.
- EDALAT, L., STEGEN, B., KLUMPP, L., HAEHL, E., SCHILBACH, K., LUKOWSKI, R., KUHNLE, M., BERNHARDT, G., BUSCHAUER, A., ZIPS, D., RUTH, P. & HUBER, S. M. 2016. BK K⁺ channel blockade inhibits radiation-induced migration/brain infiltration of glioblastoma cells. *Oncotarget*, 7, 14259-78.
- EISFELD, J. & LÄCKHOFF, A. 2007. TRPM2. In: FLOCKERZI, V. & NILIUS, B. (eds.) *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- EKE, I., STORCH, K., KASTNER, I., VEHLLOW, A., FAETHE, C., MUELLER-KLIESER, W., TAUCHER-SCHOLZ, G., TEMME, A., SCHACKERT, G. & CORDES, N. 2012. Three-dimensional invasion of human glioblastoma cells remains unchanged by X-ray and carbon ion irradiation in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 84, e515-23.

- FENG, Z., KACHNIC, L., ZHANG, J., POWELL, S. N. & XIA, F. 2004. DNA damage induces p53-dependent BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem*, 279, 28574-84.
- FOERTSCH, F., SZAMBOWSKA, A., WEISE, A., ZIELINSKI, A., SCHLOTT, B., KRAFT, F., MRASEK, K., BORGMANN, K., POSPIECH, H., GROSSE, F. & MELLE, C. 2016. S100A11 plays a role in homologous recombination and genome maintenance by influencing the persistence of RAD51 in DNA repair foci. *Cell Cycle*, 15, 2766-79.
- FONFRIA, E., MARSHALL, I. C., BENHAM, C. D., BOYFIELD, I., BROWN, J. D., HILL, K., HUGHES, J. P., SKAPER, S. D. & MCNULTY, S. 2004. TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Br J Pharmacol*, 143, 186-92.
- FRASER, S. P., DISS, J. K., CHIONI, A. M., MYCIELSKA, M. E., PAN, H., YAMACI, R. F., PANI, F., SIWY, Z., KRASOWSKA, M., GRZYWNA, Z., BRACKENBURY, W. J., THEODOROU, D., KOYUTURK, M., KAYA, H., BATTALOGLU, E., DE BELLA, M. T., SLADE, M. J., TOLHURST, R., PALMIERI, C., JIANG, J., LATCHMAN, D. S., COOMBES, R. C. & DJAMGOZ, M. B. 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 11, 5381-9.
- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H. & PARKS, W. P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1417-23.
- GIBHARDT, C. S., ROTH, B., SCHROEDER, I., FUCK, S., BECKER, P., JAKOB, B., FOURNIER, C., MORONI, A. & THIEL, G. 2015. X-ray irradiation activates K⁺ channels via H₂O₂ signaling. *Sci Rep*, 5, 13861.
- GIESE, A., LOO, M. A., TRAN, N., HASKETT, D., COONS, S. W. & BERENS, M. E. 1996. Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int J Cancer*, 67, 275-82.
- GILLET, L., ROGER, S., BESSON, P., LECAILLE, F., GORE, J., BOUGNOUX, P., LALMANACH, G. & LE GUENNEC, J. Y. 2009. Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem*, 284, 8680-91.
- GLOVER-COLLINS, K. & THOMPSON, M. E. 2008. Nuclear export of BRCA1 occurs during early S phase and is calcium-dependent. *Cell Signal*, 20, 958-68.
- GONZALEZ-GONZALEZ, L., GONZALEZ-RAMIREZ, R., FLORES, A., AVELINO-CRUZ, J. E., FELIX, R. & MONJARAZ, E. 2019. Epidermal Growth Factor Potentiates Migration of MDA-MB 231 Breast Cancer Cells by Increasing NaV1.5 Channel Expression. *Oncology*, 97, 373-382.
- GRGIC, I., WULFF, H., EICHLER, I., FLOTHMANN, C., KÖHLER, R. & HOYER, J. 2009. Blockade of T-lymphocyte KCa3.1 and Kv1.3 channels as novel immunosuppression strategy to prevent kidney allograft rejection. *Transplant Proc*, 41, 2601-6.

- HABELA, C. W., ERNEST, N. J., SWINDALL, A. F. & SONTHEIMER, H. 2009. Chloride accumulation drives volume dynamics underlying cell proliferation and migration. *J Neurophysiol*, 101, 750-7.
- HARA, Y., WAKAMORI, M., ISHII, M., MAENO, E., NISHIDA, M., YOSHIDA, T., YAMADA, H., SHIMIZU, S., MORI, E., KUDOH, J., SHIMIZU, N., KUROSE, H., OKADA, Y., IMOTO, K. & MORI, Y. 2002. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, 9, 163-73.
- HAY, E. D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*, 154, 8-20.
- HAYSLETT, J. P., GÖGELEIN, H., KUNZELMANN, K. & GREGER, R. 1987. Characteristics of apical chloride channels in human colOn Cells (HT29). *Pflugers Arch*, 410, 487-94.
- HEINZELMANN, F., OTTINGER, H., MULLER, C. H., ALLGAIER, S., FAUL, C., BAMBERG, M. & BELKA, C. 2006. Total-body irradiation--role and indications: results from the German Registry for Stem Cell Transplantation (DRST). *Strahlenther Onkol*, 182, 222-30.
- HEISE, N., PALME, D., MISOVIC, M., KOKA, S., RUDNER, J., LANG, F., SALIH, H. R., HUBER, S. M. & HENKE, G. 2010. Non-selective cation channel-mediated Ca²⁺-entry and activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II contribute to G2/M cell cycle arrest and survival of irradiated leukemia cells. *Cell Physiol Biochem*, 26, 597-608.
- HILLE, B. 2001. *Ion channels of excitable membranes*, Sunderland, MA, Sinauer Associates Inc.
- HOCHHAUS, A., LARSON, R. A., GUILHOT, F., RADICH, J. P., BRANFORD, S., HUGHES, T. P., BACCARANI, M., DEININGER, M. W., CERVANTES, F., FUJIHARA, S., ORTMANN, C. E., MENSSEN, H. D., KANTARJIAN, H., O'BRIEN, S. G. & DRUKER, B. J. 2017. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 376, 917-927.
- HOCKADAY, D. C., SHEN, S., FIVEASH, J., RAUBITSCHKEK, A., COLCHER, D., LIU, A., ALVAREZ, V. & MAMELAK, A. N. 2005. Imaging glioma extent with ¹³¹I-TM-601. *J Nucl Med*, 46, 580-6.
- HOLLEY, A. K., MIAO, L., ST CLAIR, D. K. & ST CLAIR, W. H. 2014. Redox-modulated phenomena and radiation therapy: the central role of superoxide dismutases. *Antioxid Redox Signal*, 20, 1567-89.
- HOLMFELDT, P., ZHANG, X., STENMARK, S., WALCZAK, C. E. & GULLBERG, M. 2005. CaMKIIgamma-mediated inactivation of the Kin I kinesin MCAK is essential for bipolar spindle formation. *Embo J*, 24, 1256-66.
- HUBER, S. M. 2013. Oncochannels. *Cell Calcium*, 53, 241-55.
- HUBER, S. M., DURANTON, C. & LANG, F. 2005. Patch-clamp analysis of the "new permeability pathways" in malaria-infected erythrocytes. *Int Rev Cytol*, 246, 59-134.
- HUBER, S. M., MISOVIC, M., MAYER, C., RODEMANN, H. P. & DITTMANN, K. 2012. EGFR-mediated stimulation of sodium/glucose cotransport promotes

- survival of irradiated human A549 lung adenocarcinoma cells. *Radiother Oncol*, 103, 373-9.
- ISHII, M., OYAMA, A., HAGIWARA, T., MIYAZAKI, A., MORI, Y., KIUCHI, Y. & SHIMIZU, S. 2007. Facilitation of H₂O₂-induced A172 human glioblastoma cell death by insertion of oxidative stress-sensitive TRPM2 channels. *Anticancer Res*, 27, 3987-92.
- JESSE, R. H. & LINDBERG, R. D. 1975. The efficacy of combining radiation therapy with a surgical procedure in patients with cervical metastasis from squamous cancer of the oropharynx and hypopharynx. *Cancer*, 35, 1163-6.
- JIANG, L. H., YANG, W., ZOU, J. & BEECH, D. J. 2010. TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 973-88.
- JOINER, M. & KOGEL, V. D., A. 2009. *Basic clinical radiobiology. Fourth edition*, London, UK, CRC Press.
- KALE, V. P., AMIN, S. G. & PANDEY, M. K. 2015. Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. *Biochim Biophys Acta*, 1848, 2747-55.
- KAPLAN, H. S. & MURPHY, E. D. 1949. The effect of local roentgen irradiation on the biological behavior of a transplantable mouse carcinoma; increased frequency of pulmonary metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 9, 407-13.
- KASINATHAN, R. S., FÖLLER, M., LANG, C., KOKA, S., LANG, F. & HUBER, S. M. 2007. Oxidation induces CIC-3-dependent anion channels in human leukaemia cells. *FEBS Lett*, 581, 5407-12.
- KLUMPP, D., FRANK, S. C., KLUMPP, L., SEZGIN, E. C., ECKERT, M., EDALAT, L., BASTMEYER, M., ZIPS, D., RUTH, P. & HUBER, S. M. 2017. TRPM8 is required for survival and radioresistance of glioblastoma cells. *Oncotarget*, 8, 95896-95913.
- KLUMPP, D., MISOVIC, M., SZTEYN, K., SHUMILINA, E., RUDNER, J. & HUBER, S. M. 2016. Targeting TRPM2 Channels Impairs Radiation-Induced Cell Cycle Arrest and Fosters Cell Death of T Cell Leukemia Cells in a Bcl-2-Dependent Manner. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 8026702.
- KREBS, C. 1929. Effect of roentgen irradiation on the interrelation between malignant tumors and their hosts. *Acta Radiol*, Supp. 8, 1-133.
- KUNZELMANN, K. 2005. Ion channels and cancer. *J Membr Biol*, 205, 159-73.
- KUO, S. S., SAAD, A. H., KOONG, A. C., HAHN, G. M. & GIACCIA, A. J. 1993. Potassium-channel activation in response to low doses of gamma-irradiation involves reactive oxygen intermediates in nonexcitatory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 908-12.
- LENG, R. P., LIN, Y., MA, W., WU, H., LEMMERS, B., CHUNG, S., PARANT, J. M., LOZANO, G., HAKEM, R. & BENCHIMOL, S. 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell*, 112, 779-91.
- LIEBER, M., SMITH, B., SZAKAL, A., NELSON-REES, W. & TODARO, G. 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*, 17, 62-70.

- LIN, S., LV, Y., XU, J., MAO, X., CHEN, Z. & LU, W. 2019. Over-expression of Nav1.6 channels is associated with lymph node metastases in colorectal cancer. *World J Surg Oncol*, 17, 175.
- LING, S., SHENG, J. Z. & BRAUN, A. P. 2004. The calcium-dependent activity of large-conductance, calcium-activated K⁺ channels is enhanced by Pyk2- and Hck-induced tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C698-706.
- LOZZIO, C. B. & LOZZIO, B. B. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45, 321-34.
- MARTIN, O. A., ANDERSON, R. L., RUSSELL, P. A., COX, R. A., IVASHKEVICH, A., SWIERCZAK, A., DOHERTY, J. P., JACOBS, D. H., SMITH, J., SIVA, S., DALY, P. E., BALL, D. L., MARTIN, R. F. & MACMANUS, M. P. 2014. Mobilization of viable tumor cells into the circulation during radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 88, 395-403.
- MATSUMOTO, Y. & MALLER, J. L. 2002. Calcium, calmodulin, and CaMKII requirement for initiation of centrosome duplication in *Xenopus* egg extracts. *Science*, 295, 499-502.
- MATSUYA, Y., OHTSUBO, Y., TSUTSUMI, K., SASAKI, K., YAMAZAKI, R. & DATE, H. 2014. Quantitative estimation of DNA damage by photon irradiation based on the microdosimetric-kinetic model. *J Radiat Res*, 55, 484-93.
- MCCOY, E. & SONTHEIMER, H. 2007. Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes. *Glia*, 55, 1034-43.
- MCCOY, E. S., HAAS, B. R. & SONTHEIMER, H. 2010. Water permeability through aquaporin-4 is regulated by protein kinase C and becomes rate-limiting for glioma invasion. *Neuroscience*, 168, 971-81.
- MCFERRIN, M. B. & SONTHEIMER, H. 2006. A role for ion channels in glioma cell invasion. *Neuron Glia Biol*, 2, 39-49.
- MENG, Y., XU, X., LUAN, H., LI, L., DAI, W., LI, Z. & BIAN, J. 2019. The progress and development of GLUT1 inhibitors targeting cancer energy metabolism. *Future Med Chem*, 11, 2333-2352.
- MOELLER, B. J., CAO, Y., LI, C. Y. & DEWHIRST, M. W. 2004. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*, 5, 429-41.
- MOHAMMED, F. H., KHAJAH, M. A., YANG, M., BRACKENBURY, W. J. & LUQMANI, Y. A. 2016. Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells. *Int J Oncol*, 48, 73-83.
- MOHR, C. J., GROSS, D., SEZGIN, E. C., STEUDEL, F. A., RUTH, P., HUBER, S. M. & LUKOWSKI, R. 2019a. K(Ca)_{3.1} Channels Confer Radioresistance to Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 11.
- MOHR, C. J., STEUDEL, F. A., GROSS, D., RUTH, P., LO, W. Y., HOPPE, R., SCHROTH, W., BRAUCH, H., HUBER, S. M. & LUKOWSKI, R. 2019b. Cancer-Associated Intermediate Conductance Ca(2+)-Activated K⁺ Channel K(Ca)_{3.1}. *Cancers (Basel)*, 11.

- MORRIS, T. A., DELORENZO, R. J. & TOMBES, R. M. 1998. CaMK-II inhibition reduces cyclin D1 levels and enhances the association of p27kip1 with Cdk2 to cause G1 arrest in NIH 3T3 cells. *Exp Cell Res*, 240, 218-27.
- NEHER, E. & SAKMANN, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260, 799-802.
- NEHER, E. & SAKMANN, B. 1992. The patch clamp technique. *Sci Am*, 266, 44-51.
- NELSON, M., YANG, M., DOWLE, A. A., THOMAS, J. R. & BRACKENBURY, W. J. 2015a. The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis. *Mol Cancer*, 14, 13.
- NELSON, M., YANG, M., MILLICAN-SLATER, R. & BRACKENBURY, W. J. 2015b. Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget*, 6, 32914-29.
- NILIUS, B. & WOHLRAB, W. 1992. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol*, 445, 537-48.
- NILSSON, L. M., ZHANG, L., BONDAR, A., SVENSSON, D., WERNERSON, A., BRISMAR, H., SCOTT, L. & APERIA, A. 2019. Prompt apoptotic response to high glucose in SGLT-expressing renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 316, F1078-f1089.
- OLSEN, M. L., SCHADE, S., LYONS, S. A., AMARAL, M. D. & SONTHEIMER, H. 2003. Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *J Neurosci*, 23, 5572-82.
- OSTI, M. F., AGOLLI, L., VALERIANI, M., FALCO, T., BRACCI, S., DE SANCTIS, V. & ENRICI, R. M. 2013. Image guided hypofractionated 3-dimensional radiation therapy in patients with inoperable advanced stage non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 85, e157-63.
- PALME, D., MISOVIC, M., GANSER, K., KLUMPP, L., SALIH, H. R., ZIPS, D. & HUBER, S. M. 2020. hERG K(+) Channels Promote Survival of Irradiated Leukemia Cells. *Front Pharmacol*, 11, 489.
- PALME, D., MISOVIC, M., SCHMID, E., KLUMPP, D., SALIH, H. R., RUDNER, J. & HUBER, S. M. 2013. Kv3.4 potassium channel-mediated electrosignaling controls cell cycle and survival of irradiated leukemia cells. *Pflugers Arch*, 465, 1209-21.
- PARDO, L. A., DEL CAMINO, D., SANCHEZ, A., ALVES, F., BRUGGEMANN, A., BECKH, S. & STUHMER, W. 1999. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *Embo J*, 18, 5540-7.
- PARDO, L. A. & STUHMER, W. 2008. Eag1: an emerging oncological target. *Cancer Res*, 68, 1611-3.
- PARDO, L. A. & STUHMER, W. 2014. The roles of K(+) channels in cancer. *Nat Rev Cancer*, 14, 39-48.
- PATEL, R., HOLT, M., PHILIPOVA, R., MOSS, S., SCHULMAN, H., HIDAKA, H. & WHITAKER, M. 1999. Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells. *J Biol Chem*, 274, 7958-68.

- PATIL, M., PABLA, N. & DONG, Z. 2013. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci*, 70, 4009-21.
- PERRAUD, A. L., TAKANISHI, C. L., SHEN, B., KANG, S., SMITH, M. K., SCHMITZ, C., KNOWLES, H. M., FERRARIS, D., LI, W., ZHANG, J., STODDARD, B. L. & SCHARENBERG, A. M. 2005. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem*, 280, 6138-48.
- PETZELT, C. P., KODIROV, S., TASCHEBERGER, G. & KOX, W. J. 2001. Participation of the Ca(2+)-calmodulin-activated Kinase II in the control of metaphase-anaphase transition in human cells. *Cell Biol Int*, 25, 403-9.
- PHILLIPS, H. S., KHARBANDA, S., CHEN, R., FORREST, W. F., SORIANO, R. H., WU, T. D., MISRA, A., NIGRO, J. M., COLMAN, H., SOROCEANU, L., WILLIAMS, P. M., MODRUSAN, Z., FEUERSTEIN, B. G. & ALDAPE, K. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9, 157-73.
- POLLACK, V. A., SAVAGE, D. M., BAKER, D. A., TSAPARIKOS, K. E., SLOAN, D. E., MOYER, J. D., BARBACCI, E. G., PUSTILNIK, L. R., SMOLAREK, T. A., DAVIS, J. A., VAIDYA, M. P., ARNOLD, L. D., DOTY, J. L., IWATA, K. K. & MORIN, M. J. 1999. Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 291, 739-48.
- PONTÉN, J. & MACINTYRE, E. H. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 74, 465-86.
- PREVARSKAYA, N., SKRYMA, R., BIDAUX, G., FLOURAKIS, M. & SHUBA, Y. 2007. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ*, 14, 1295-304.
- RANSOM, C. B., O'NEAL, J. T. & SONTHEIMER, H. 2001. Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells. *J Neurosci*, 21, 7674-83.
- ROBIN, M., GUARDIOLA, P., DEVERGIE, A., YESHURUN, M., SHAPIRO, S., ESPEROU, H., RIBAUD, P., ROCHA, V., GLUCKMAN, E. & SOCIE, G. 2005. A 10-year median follow-up study after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in chronic phase from HLA-identical sibling donors. *Leukemia*, 19, 1613-20.
- RODEMANN, H. P., DITTMANN, K. & TOULANY, M. 2007. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int J Radiat Biol*, 83, 781-91.
- RODERICK, H. L. & COOK, S. J. 2008. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*, 8, 361-75.
- ROTH, B., GIBHARDT, C. S., BECKER, P., GEBHARDT, M., KNOOP, J., FOURNIER, C., MORONI, A. & THIEL, G. 2015. Low-dose photon irradiation

- alters cell differentiation via activation of hK channels. *Pflugers Arch*, 467, 1835-49.
- RUGGIERI, P., MANGINO, G., FIORETTI, B., CATACUZZENO, L., PUCA, R., PONTI, D., MISCUSI, M., FRANCIOLINI, F., RAGONA, G. & CALOGERO, A. 2012. The inhibition of KCa3.1 channels activity reduces cell motility in glioblastoma derived cancer stem cells. *PLoS One*, 7, e47825.
- RUKNUDIN, A., SONG, M. J. & SACHS, F. 1991. The ultrastructure of patch-clamped membranes: a study using high voltage electron microscopy. *J Cell Biol*, 112, 125-34.
- SANO, Y., INAMURA, K., MIYAKE, A., MOCHIZUKI, S., YOKOI, H., MATSUSHIME, H. & FURUICHI, K. 2001. Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science*, 293, 1327-30.
- SCHNEIDER, U., SCHWENK, H. U. & BORNKAMM, G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19, 621-6.
- SCHÜTTRUMPF, L., MARSCHNER, S., SCHEU, K., HESS, J., RIETZLER, S., WALCH, A., BAUMEISTER, P., KIRCHNER, T., GANSWINDT, U., ZITZELSBERGER, H., BELKA, C. & MAIHOEFER, C. 2020. Definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell cancers of the head and neck - results from an unselected cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiat Oncol*, 15, 7.
- SCHWAB, A., NECHYPORUK-ZLOY, V., FABIAN, A. & STOCK, C. 2007. Cells move when ions and water flow. *Pflugers Arch*, 453, 421-32.
- SHELDON, P. W. & FOWLER, J. F. 1976. The effect of low-dose pre-operative X-irradiation of implanted mouse mammary carcinomas on local recurrence and metastasis. *Br J Cancer*, 34, 401-7.
- SI, J. & COLLINS, S. J. 2008. Activated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIγ is a critical regulator of myeloid leukemia cell proliferation. *Cancer Res*, 68, 3733-42.
- SONTHEIMER, H. 2008. An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233, 779-91.
- STEGEN, B., BUTZ, L., KLUMPP, L., ZIPS, D., DITTMANN, K., RUTH, P. & HUBER, S. M. 2015. Ca²⁺-Activated IK K⁺ Channel Blockade Radiosensitizes Glioblastoma Cells. *Mol Cancer Res*, 13, 1283-95.
- STEGEN, B., KLUMPP, L., MISOVIC, M., EDALAT, L., ECKERT, M., KLUMPP, D., RUTH, P. & HUBER, S. M. 2016. K(+) channel signaling in irradiated tumor cells. *Eur Biophys J*, 45, 585-598.
- STEIN, G. H. 1979. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol*, 99, 43-54.
- STEINLE, M., PALME, D., MISOVIC, M., RUDNER, J., DITTMANN, K., LUKOWSKI, R., RUTH, P. & HUBER, S. M. 2011. Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels. *Radiother Oncol*, 101, 122-6.

- STEUDEL, F. A., MOHR, C. J., STEGEN, B., NGUYEN, H. Y., BARNERT, A., STEINLE, M., BEER-HAMMER, S., KOCH, P., LO, W. Y., SCHROTH, W., HOPPE, R., BRAUCH, H., RUTH, P., HUBER, S. M. & LUKOWSKI, R. 2017. SK4 channels modulate Ca(2+) signalling and cell cycle progression in murine breast cancer. *Mol Oncol*, 11, 1172-1188.
- STOCK, C. & SCHWAB, A. 2009. Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Arch*, 458, 981-92.
- STRØBAEK, D., CHRISTOPHERSEN, P., HOLM, N. R., MOLDT, P., AHRING, P. K., JOHANSEN, T. E. & OLESEN, S. P. 1996. Modulation of the Ca(2+)-dependent K⁺ channel, hsl_o, by the substituted diphenylurea NS 1608, paxilline and internal Ca²⁺. *Neuropharmacology*, 35, 903-14.
- STRONG, M. S., VAUGHAN, C. W., KAYNE, H. L., ARAL, I. M., UCMAKLI, A., FELDMAN, M. & HEALY, G. B. 1978. A randomized trial of preoperative radiotherapy in cancer of the oropharynx and hypopharynx. *Am J Surg*, 136, 494-500.
- STUPP, R., TAILLIBERT, S., KANNER, A., READ, W., STEINBERG, D., LHERMITTE, B., TOMS, S., IDBAIH, A., AHLUWALIA, M. S., FINK, K., DI MECO, F., LIEBERMAN, F., ZHU, J. J., STRAGLIOTTO, G., TRAN, D., BREM, S., HOTTINGER, A., KIRSON, E. D., LAVY-SHAHAF, G., WEINBERG, U., KIM, C. Y., PAEK, S. H., NICHOLAS, G., BRUNA, J., HIRTE, H., WELLER, M., PALTU, Y., HEGI, M. E. & RAM, Z. 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 318, 2306-2316.
- TEODORCZYK, M. & MARTIN-VILLALBA, A. 2010. Sensing invasion: cell surface receptors driving spreading of glioblastoma. *J Cell Physiol*, 222, 1-10.
- TOULANY, M. 2019. Targeting DNA Double-Strand Break Repair Pathways to Improve Radiotherapy Response. *Genes (Basel)*, 10.
- UBERTI, J. P., AGOVI, M. A., TARIMA, S., HAAGENSON, M., GANDHAM, S., ANASETTI, C., BAKER, K. S., BOLWELL, B. J., BORNHAUSER, M., CHAN, K. W., COPELAN, E., DAVIES, S. M., FINKE, J., HALE, G. A., KOLLMAN, C., MCCARTHY, P. L., RATANATHARATHORN, V., RINGDEN, O., WEISDORF, D. J. & RIZZO, J. D. 2011. Comparative analysis of BU and CY versus CY and TBI in full intensity unrelated marrow donor transplantation for AML, CML and myelodysplasia. *Bone Marrow Transplant*, 46, 34-43.
- UYSAL-ONGANER, P. & DJAMGOZ, M. B. 2007. Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel. *Mol Cancer*, 6, 76.
- VAHERI, A., RUOSLAHTI, E., WESTERMARK, B. & PONTEN, J. 1976. A common Cell-type specific surface antigen in cultured human glial cells and fibroblasts: loss in malignant cells. *J Exp Med*, 143, 64-72.
- VALERIE, K. & POVIRK, L. F. 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, 22, 5792-812.
- VERHAAK, R. G., HOADLEY, K. A., PURDOM, E., WANG, V., QI, Y., WILKERSON, M. D., MILLER, C. R., DING, L., GOLUB, T., MESIROV, J. P.,

- ALEXE, G., LAWRENCE, M., O'KELLY, M., TAMAYO, P., WEIR, B. A., GABRIEL, S., WINCKLER, W., GUPTA, S., JAKKULA, L., FEILER, H. S., HODGSON, J. G., JAMES, C. D., SARKARIA, J. N., BRENNAN, C., KAHN, A., SPELLMAN, P. T., WILSON, R. K., SPEED, T. P., GRAY, J. W., MEYERSON, M., GETZ, G., PEROU, C. M. & HAYES, D. N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17, 98-110.
- WANG, Q., HU, B., HU, X., KIM, H., SQUATRITO, M., SCARPACE, L., DECARVALHO, A. C., LYU, S., LI, P., LI, Y., BARTHEL, F., CHO, H. J., LIN, Y. H., SATANI, N., MARTINEZ-LEDESMA, E., ZHENG, S., CHANG, E., SAUVÉ, C. G., OLAR, A., LAN, Z. D., FINOCCHIARO, G., PHILLIPS, J. J., BERGER, M. S., GABRUSIEWICZ, K. R., WANG, G., ESKILSSON, E., HU, J., MIKKELSEN, T., DEPINHO, R. A., MULLER, F., HEIMBERGER, A. B., SULMAN, E. P., NAM, D. H. & VERHAAK, R. G. W. 2017. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*, 32, 42-56.e6.
- WANNENMACHER, M., WENZ, F. & DEBUS, J. 2013. *Strahlentherapie. 2. Auflage*, Heidelberg, Deutschland, Springer Verlag.
- WARBURG, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-70.
- WATKINS, S. & SONTHEIMER, H. 2011. Hydrodynamic cellular volume changes enable glioma cell invasion. *J Neurosci*, 31, 17250-9.
- WEISSER, M., SCHLEUNING, M., LEDDEROSE, G., ROLF, B., SCHNITTGER, S., SCHOCH, C., SCHWERDTFEGGER, R. & KOLB, H. J. 2004. Reduced-intensity conditioning using TBI (8 Gy), fludarabine, cyclophosphamide and ATG in elderly CML patients provides excellent results especially when performed in the early course of the disease. *Bone Marrow Transplant*, 34, 1083-8.
- WELCH, B. L. 1947. The generalisation of student's problems when several different population variances are involved. *Biometrika*, 34, 28-35.
- WINKLHOFER, M., MATTHIAS, K., SEIFERT, G., STOCKER, M., SEWING, S., HERGET, T., STEINHÄUSER, C. & SAALER-REINHARDT, S. 2003. Analysis of phosphorylation-dependent modulation of Kv1.1 potassium channels. *Neuropharmacology*, 44, 829-42.
- WONDERLIN, W. F. & STROBL, J. S. 1996. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol*, 154, 91-107.
- WRIGHT, E. M., GHEZZI, C. & LOO, D. D. F. 2017. Novel and Unexpected Functions of SGLTs. *Physiology (Bethesda)*, 32, 435-443.
- YAMAMOTO, T. 1936. Experimental study on effect of x-ray on metastasis of malignant tumor, especially in bones. *Jap J Obst & Gynec*, 19, 559-569.
- YANG, B. F., XIAO, C., ROA, W. H., KRAMMER, P. H. & HAO, C. 2003. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of c-FLIP expression and phosphorylation in modulation of Fas-mediated signaling in malignant glioma cells. *J Biol Chem*, 278, 7043-50.
- YANG, M., KOZMINSKI, D. J., WOLD, L. A., MODAK, R., CALHOUN, J. D., ISOM, L. L. & BRACKENBURY, W. J. 2012. Therapeutic potential for phenytoin:

targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 134, 603-15.

YILDIRIM, S., ALTUN, S., GUMUSHAN, H., PATEL, A. & DJAMGOZ, M. B. 2012. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer Lett*, 323, 58-61.

ZHANG, J., MAO, W., DAI, Y., QIAN, C., DONG, Y., CHEN, Z., MENG, L., JIANG, Z., HUANG, T., HU, J., LUO, P., KORNER, H., JIANG, Y. & YING, S. 2019. Voltage-gated sodium channel Nav1.5 promotes proliferation, migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 51, 562-570.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Diese Promotionsarbeit wurde in der Klinik für Radioonkologie unter Betreuung von Apl.Prof. Dr. Stephan Huber, Leiter des Labors Experimentelle Radioonkologie, durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Huber und mir in Zusammenarbeit mit Apl.Prof. Dr. Klaus Dittmann, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Huber eigenständig mit Unterstützung durch Frau Heidrun Faltin (Technische Assistentin des Labors Experimentelle Radioonkologie) durchgeführt. Der Knockdown der Kv3.4-Kanäle in den K562-Zellen wurde von Frau Daniela Palme (damals naturwissenschaftliche Doktorandin im Labor Experimentelle Radioonkologie) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich nach Anleitung durch Herrn Huber. Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung und Rechtschreib- und Grammatik-Korrektur durch Herrn Huber sowie finaler Rechtschreibkorrektur durch Frau Dr. Anke Sibbersen verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die in der Promotionsarbeit gezeigten bzw. diskutierten Daten wurden in nachstehenden Originalpublikationen mit mir als Ko-Autor veröffentlicht.

Bayreuth, den 16. März 2021

Publikationen, die Daten dieser Promotionsarbeit beinhalten

- HEISE, N., PALME, D., **MISOVIC, M.**, KOKA, S., RUDNER, J., LANG, F., SALIH, H. R., HUBER, S. M. & HENKE, G. 2010. Non-selective cation channel-mediated Ca²⁺-entry and activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II contribute to G2/M cell cycle arrest and survival of irradiated leukemia cells. *Cell Physiol Biochem*, 26, 597-608.
- HUBER, S. M., **MISOVIC, M.**, MAYER, C., RODEMANN, H. P. & DITTMANN, K. 2012. EGFR-mediated stimulation of sodium/glucose cotransport promotes survival of irradiated human A549 lung adenocarcinoma cells. *Radiother Oncol*, 103, 373-9.
- KLUMPP, D., **MISOVIC, M.**, SZTEYN, K., SHUMILINA, E., RUDNER, J. & HUBER, S. M. 2016. Targeting TRPM2 Channels Impairs Radiation-Induced Cell Cycle Arrest and Fosters Cell Death of T Cell Leukemia Cells in a Bcl-2-Dependent Manner. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 8026702.
- PALME, D., **MISOVIC, M.**, GANSER, K., KLUMPP, L., SALIH, H. R., ZIPS, D. & HUBER, S. M. 2020. hERG K(+) Channels Promote Survival of Irradiated Leukemia Cells. *Front Pharmacol*, 11, 489.
- PALME, D., **MISOVIC, M.**, SCHMID, E., KLUMPP, D., SALIH, H. R., RUDNER, J. & HUBER, S. M. 2013. Kv3.4 potassium channel-mediated electrosignaling controls cell cycle and survival of irradiated leukemia cells. *Pflugers Arch*, 465, 1209-21.
- STEGEN, B., KLUMPP, L., **MISOVIC, M.**, EDALAT, L., ECKERT, M., KLUMPP, D., RUTH, P. & HUBER, S. M. 2016. K(+) channel signaling in irradiated tumor cells. *Eur Biophys J*, 45, 585-598.
- STEINLE, M., PALME, D., **MISOVIC, M.**, RUDNER, J., DITTMANN, K., LUKOWSKI, R., RUTH, P. & HUBER, S. M. 2011. Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels. *Radiother Oncol*, 101, 122-6

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der Materialien

8.1.2 Zellkulturen:

1. Humane K562 -Zellen, chronisch myeloische Leukämie (CML), ATCC, Baltimore, MD, USA.
2. Humane Jurkat E6.1 -Zellen, akute T-lymphatische Leukämie (T-ALL), ATCC, Baltimore, MD, USA.
3. Humane T98G -Zellen, ATCC, Baltimore, MD, USA.
4. Humane U251 -Zellen, Glioblastomzellen, freundlicherweise von Prof. Luiz O Penalva, Department of Cell Systems and Anatomy, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas, USA, zur Verfügung gestellt.
5. Humane A549 -Zellen, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, NSCLC, freundlicherweise von Prof. Klaus Dittmann, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.
6. Humane SAS -Zellen, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom, HNSCC, freundlicherweise von Prof. Klaus Dittmann, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

7. Stabile Bcl-2- bzw. mit leerem Vektor transfizierte Jurkat-Zellen
(ursprünglich von Prof. Henning Walczak, Department of Cancer Biology,
University College London, London, UK) freundlicherweise von Frau PD Dr.
Justine Rudner, Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie im Institut für
Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt.

8.1.2 Substanzen und Lösungen:

1. RPMI-1640-Medium, 2.0 g/l NaHCO₃, Roswell Park Memorial Institute,
Gibco, Karlsruhe, Deutschland.
2. Phenol-Rot-und FCS-freies RPMI-1640-Medium, Roswell Park Memorial
Institute, Gibco, Karlsruhe, Deutschland.
3. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 4500 mg D-Glukose/l, 3.7g/l
NaHCO₃, Gibco, Karlsruhe, Deutschland.
4. 10%-es fötales Rinderserum mit L-Glutamin; FBS, FCS, Gibco, Karlsruhe,
Deutschland.
5. Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml, Gibco. Karlsruhe,
Deutschland.
6. Kv3.4 siRNA und „nontargeting“ RNA, On Target SMARTpool RNA,
Dharmacon, Chicago, Illinois, USA.
7. Grün-fluoreszierende siGLO siRNA, 400 nM; Dharmacon, Chicago, Illinois,
USA.
8. K-Glukonat Pipettenlösung, in mM: 140 K-D-Gluconate, 5 N-2-
Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethanesulfonisäure (HEPES), 5 MgCl₂, 1 K-

- Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)- N,N,N',N' - Tetraessigsäure (K-EGTA),
1 K-ATP, mit KOH auf pH 7.4 titriert.
9. NaCl-Badlösung, in mM: 125 NaCl, 32 HEPES, 5 KCl, 5 D-Glucose, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, mit NaOH auf pH 7.4 titriert.
 10. Glukose-Transporter-Inhibitor Phlorizin, 500 µM, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland.
 11. EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase) - Inhibitor – Erlotinib, 1 µM, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland.
 12. KCl-Badlösung, in mM: 130 KCl, 32 HEPES, 5 D-Glucose, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, mit KOH auf pH 7.4 titriert.
 13. Ca-D-Gluconat₂ Badlösung, in mM: 100 Ca-D-Gluconat₂, 10 HEPES, titriert mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) auf pH 7.4.
 14. Na-D-Gluconat-Badlösung, in mM: 150 Na-D-Gluconat, 10 HEPES, 1 Ca-D-Gluconat₂, mit NaOH auf pH 7.2 titriert.
 15. EGTA-gepufferte Ca²⁺-freie Na-D-Gluconat-Badlösung, in mM: 150 Na-D-Gluconat, 10 HEPES, 3 EGTA, mit NaOH auf pH 7.4 titriert.
 16. K-Gluconat Pipettellösung, in mM: 140 K-D-Gluconat, 5 HEPES, 5 MgCl₂, 1 K₂-EGTA, 1 K₂-ATP, mit KOH auf pH 7.2 titriert.
 17. K-Gluconat Badlösung, in mM: 130 K-D-Gluconat, 32 HEPES, 5 D-Glucose, 1 Mg-D-Gluconat₂, 1 Ca-D-Gluconat₂, mit KOH auf pH 7.4 titriert.
 18. Inhibitor der hERG1-Kanäle - E4031, 1 µM, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland.
 19. ADP-Ribose, ADPR, 0 bzw. 1µM, Sigma, Taufkirchen, Deutschland.

20. Kationenkanal-Inhibitor n-(p-Amylcinnamyl)-Anthranilsäure, ACA, 20 μ M, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland.
21. TRAM-34, 10 μ M, 1-[(2-Chlorophenyl)Diphenylmethyl]-1H-Pyrazol, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland.
22. NMDG-Pipetten-Lösung beinhaltetete, in mM: 140 NMDG-Cl, 40 Mannitol, 10 HEPES/NMDG, 1 MgCl₂, 1 Mg-ATP, und 0.5 EGTA, mit NaCl auf pH 7.4 titriert.
23. NMDG-Badlösung, in mM: 180 NMDG-Cl, 10 HEPES/NMDG, 1 CaCl₂, und 1 MgCl₂ mit zusätzlich NPPB, mit NaCl auf pH 7.4 titriert.
24. NPPB, 5-Nitro-2-[(3-Phenylpropyl)amino]Benzoessäure, 0 oder 50 μ M in 0.1 % DMSO, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland.
25. Paxilline, 0 or 5 μ M im 0.1 % DMSO, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland.
26. KCl-Pipettenlösung, in mM: 130 KCl, 32 HEPES, 5 D-Glucose, 1 MgCl₂, und 1 CaCl₂, titriert mit KOH auf pH 7.4.

8.1.3 Geräte, Materialien und Software:

1. EPI2500-Electroporator, Fischer, Heidelberg, Deutschland.
2. Linearbeschleuniger, LINAC SL25 Philips, Eindhoven, Niederlande.
3. Borosilikat-Glas, GC150 TF-10, Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland.
4. DMZ-Puller, Zeitz, Augsburg, Deutschland.

5. Das invertierte Axiovert-100 Zeiss Mikroskop, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland.
6. STM-Mikromanipulator, Lange, GmbH and Co., KG, Deutschland.
7. EPC-9-Verstärker, Heka, Lambrecht, Deutschland.
8. ITC-16-AD/DA-Wandler, Instrutech, Port Washington, NY, USA.
9. Das InStat-Programm, GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA.

8.2 Verzeichnis der Abbildungen

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1. Die Patch-Clamp-Technik. | 12 |
| Abb. 1.2. Ableitmodi der Patch-Clamp-Technik. | 14 |
| Abb. 1.3. Elektrochemische Gleichgewichtspotentiale (E)..... | 16 |
| Abb. 1.4. Spannungsabhängigkeit von Ionenkanälen..... | 17 |
| Abb. 2.1. Ringeinsatz für Patch-Clamp-Ableitungen..... | 22 |
| Abb. 3.1. Ionisierende Strahlung stimuliert in K562-CML-Zellen Ca ²⁺ -permeable Kanäle..... | 35 |
| Abb. 3.2. Ionisierende Strahlung stimuliert in K562-CML-Zellen einen einwärts- gleichrichtenden nichtselektiven Kationenkanal, der durch extrazelluläres Ca ²⁺ gehemmt wird. | 37 |
| Abb. 3.3. Ionisierende Strahlung stimuliert in K562-CML-Zellen spannungsaktivierte Kv K ⁺ -Kanäle und hyperpolarisiert das Membranpotential. | 41 |
| Abb. 3.4. Blockade oder Knockdown von Kv3.4 hemmt den strahlungsinduzierten auswärtsrektifizierenden Kv K ⁺ -Strom in K562-CML-Zellen. | 43 |
| Abb. 3.5. Ionisierende Strahlung modifiziert spannungsaktivierte hERG1- ähnliche K ⁺ Kanäle in K562-CML-Zellen. | 46 |
| Abb. 3.6. Ionisierende Strahlung modifiziert spannungsaktivierte hERG1- ähnliche K ⁺ Kanäle in K562 CML Zellen: Alternatives elektrophysiologisches Ableitprotokoll | 49 |
| Abb. 3.7. T-Zell Leukämie-Zellen exprimieren funktionelle TRPM2-ähnliche Ca ²⁺ -permeable Kationenkanäle..... | 51 |
| Abb. 3.8. Ionisierende Strahlung stimuliert die TRPM2-ähnlichen Kanäle in Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-T-Zell Leukämie-Zellen..... | 52 |
| Abb. 3.9. Ionisierende Strahlung stimuliert TRAM-34-sensitive einwärtsrektifizierende IKCa-ähnliche K ⁺ Kanäle in Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-T-Zell Leukämie-Zellen. | 54 |
| Abb. 3.10. Ionisierende Strahlung depolarisiert das Plasmamembranpotential von A549-Lungenadenokarzinom Zellen..... | 56 |

| | |
|---|----|
| Abb. 3.11. Abhängigkeit des Plasmamembran-Potentials von der extrazellulären d-Glukose-Konzentration in Kontroll- und vorbestrahlten A549-Lungenadenokarzinom-Zellen..... | 58 |
| Abb. 3.12. Abhängigkeit des Plasmamembran-Potentials von der Aktivität des Phlorizin-sensitiven Na ⁺ /Glukose-(SGLT)-Ko-Transports in Kontroll- und vorbestrahlten A549-Lungenadenokarzinom-Zellen..... | 59 |
| Abb. 3.13. Abhängigkeit des Plasmamembran-Potentials von der Aktivität der Erlotinib-sensitiven EGFR-Tyrosin-Kinase in Kontroll- und vorbestrahlten A549-Lungenadenokarzinom-Zellen..... | 60 |
| Abb. 3.14. SGLT-Aktivität und Funktion in bestrahlten FaDu-Kopf-Hals-Karzinomzellen..... | 61 |
| Abb. 3.15. Fraktionierte Bestrahlung induziert/selektioniert Glioblastomzellen mit hoher Expression BKCa- und IKCa-ähnlicher K ⁺ -Kanäle. | 66 |
| Abb. 3.16. Radiogene Aktivierung von Cl ⁻ -Kanälen in der Plasmamembran von Glioblastomzellen benötigt die Aktivität von Paxilline-sensitiven BKCa K ⁺ -Kanälen..... | 68 |
| Abb. 4.1. In bestrahlten CML-Zellen erzeugen radiogen-aktivierte Ca ²⁺ -permeable nichtselektive Kationen-Kanäle im Zusammenspiel mit spannungsaktivierten Kv K ⁺ -Kanälen spezifische Ca ²⁺ -Signale, die nukleäre Isoformen der CaMKII-Kinase aktivieren..... | 76 |
| Abb. 4.2. Radiogene Hypermigration in Glioblastomzellen wird wahrscheinlich durch Aktivierung von Ca ²⁺ -permeablen TRPM8-Kationenkanälen und Stabilisierung von HIF-1 α ausgelöst. | 79 |
| Abb. 4.3. Radiogene Glukose-Aufnahme in A549-Lungen-Adenokarzinomzellen. | 84 |