

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik
Tübingen

**Ionisierende Strahlung induziert die Migration von
Glioblastomzellen über die Aktivierung von BK K⁺ Kanälen**

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

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

vorgelegt von

Steinle, Marc

2020

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber
2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Naumann
3. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Tabatabai

Tag der Disputation: 27.01.2020

1. <u>EINLEITUNG</u>	5
1.1. HISTOLOGIE UND GENETIK DER DIFFUSEN GLIOME	5
1.2. THERAPIESTRATEGIEN BEI GLIOBLASTOM	6
1.3. GRUNDSÄTZE DER STRAHLENPHYSIK UND STRAHLENBIOLOGIE	8
1.4. INVASION UND MIGRATION AUF ZELLULÄRE UND MOLEKULÄRE EBENE	10
1.5. MIGATIONS MASCHINERIE - KANÄLE IN DER PLASMA MEMBRAN	11
1.6. MOLEKULARE STRUKTUR DER KALIUMKANÄLE	13
1.7. MOLEKULARE STRUKTUR, AKTIVIERBARKEIT UND EXPRESSION DES BK KANALS	14
1.8. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	18
2. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	19
2.1. MIGRATIONSANALYSE MITTELS "REAL-TIME CELL ANALYZER" (RTCA)	20
2.2. ELEKTROPHYSIOLOGIE	22
GRUNDLAGEN	22
VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFÜHRUNG	24
2.3. EXPRESSIONSANALYSEN	25
2.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG	26
2.5. LIMITATIONEN DER METHODEN	26
2.6. ABKÜRZUNGEN	29
3. <u>ERGEBNISSE</u>	32
3.1. GLIOBLASTOMZELLEN EXPRIEMIEREN FUNKTIONALE BK KANÄLE	32
3.2. IONISIERENDE STRAHLUNG INDUZIERT EINE ERHÖHTE BK KANALAKTIVITÄT	36
3.3. STRAHLUNG INDUZIERT MIGRATION IN ABHÄNGIGKEIT DER BK KANALAKTIVITÄT	41
3.4. BK KANAL-ABHÄNGIGE MIGRATION WIRD DURCH DIE CAMKII VERMITTELT	44
4. <u>DISKUSSION</u>	48
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	52
6. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	54
7. <u>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL</u>	62

1. Einleitung

1.1. Histologie und Genetik der diffusen Gliome

Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 500.000 Menschen an Krebs. Mit etwas mehr als 220.000 Todesfällen pro Jahr ist Krebs die zweithäufigste Todesursache laut statistischem Bundesamt. Im Rahmen der Krebstherapie nimmt die Strahlentherapie neben Operation und Chemotherapie eine zentrale Rolle ein. Bei fünfzig Prozent aller Krebspatienten kommt im Laufe der Erkrankung eine Strahlentherapie zum Einsatz (Deutsche Krebsgesellschaft).

Die Inzidenz für maligne Tumore des ZNS beträgt in Deutschland circa 7.000 pro Jahr und etwa 5.000 Patienten versterben pro Jahr (Robert Koch-Institut). Unter den malignen hirneigenen Tumoren bilden die Gliome mit einem Anteil von dreißig bis vierzig Prozent den größten Anteil [1]. Die Einteilung erfolgt entsprechend der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahre 2016 vorgestellten Klassifikation. Die bisherige WHO Einteilung nach Grad I-IV erfolgte anhand histologischer Kriterien und wird jetzt erstmals unter Berücksichtigung molekularer Marker ergänzt. Die Kombination aus Phänotyp und Genotyp ermöglicht eine genauere Gruppierung genetisch, biologisch und prognostisch ähnlicher Entitäten. Die Einteilung der diffusen Gliome erfolgt zunächst anhand histologischer Kriterien in Astrozytome (WHO II und III), Oligodendrogliome (WHO II und III) und Glioblastome (WHO IV). Auf genetischer Ebene wird die weitere Unterteilung über die Analyse des Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) Status vorgenommen. Inaktivierende Mutationen im Alpha-Thalassämie-X-chromosomale Intelligenzminderung-Syndrom (ATRX) Gen, sowie Mutationen im TP53 Gen und 1p/19q Kodeletionen werden für weitere Unterteilungen herangezogen [2].

Bei Erwachsenen handelt es sich in etwa der Hälfte der Gliome um Glioblastome [1]. Die primäre Prognose für Patienten mit Glioblastom ist entscheidend vom IDH-Status abhängig, wobei das Vorliegen einer IDH-Mutation mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert ist. Das durchschnittliche Gesamtüberleben beträgt bei Patienten ohne IDH-Mutation etwa 15 Monate im Vergleich zu 31 Monaten beim Vorliegen einer Mutation im IDH Gen [3, 4]. In neunzig Prozent der Fälle

liegt allerdings keine Mutation vor, meist sind die Patienten über 55 Jahre und der Tumor entsteht de novo [2].

1.2. Therapiestrategien bei Glioblastom

Das Glioblastom stellt eine besondere therapeutische Herausforderung dar, da hier auch bei vermeintlich unifokalem Auftreten bereits eine diffuse Infiltration des Hirnparenchyms vorliegt, was eine klare Abgrenzung zwischen Hirngewebe und Tumor nahezu unmöglich macht [5]. Die starke Invasion in das angrenzende Parenchym und das netzartige, in der Bildgebung schlecht darstellbare und abzugrenzende Ausbreiten der Glioblastomzellen machen daher eine vollständige chirurgische Resektion oft unmöglich [6].

Entsprechend der aktuellen S2k Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neurologie wird für die Standardtherapie des Glioblastoms eine weitest mögliche Resektion oder Biopsie, gefolgt von der Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion und der konkomitanten sowie adjuvanten Chemotherapie mit 6 Zyklen Temozolomid empfohlen [4].

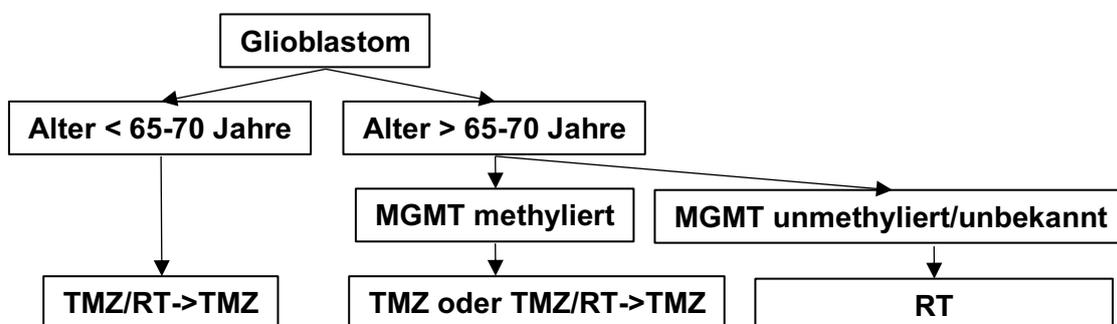


Abbildung 1: Therapieempfehlung bei Glioblastom (verändert nach [7]).
Abkürzungen: RT, Radiotherapie; TMZ, Temozolomid; TMZ/RT->TMZ, Radiotherapie mit konkomitanter und adjuvanter TMZ-Gabe.

Die Indikation und Durchführung der Strahlentherapie orientieren sich zunächst an der WHO-Klassifikation für diffuse Gliome und an Prognoseparametern wie Radikalität der Operation, Alter und Karnofsky-Index (Abbildung) [7-9]. Bei

Patienten über 65 Jahren konnte gezeigt werden, dass dem O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promoter Status eine entscheidende prognostische Relevanz zukommt. Patienten mit methyliertem MGMT-Promoter profitieren signifikant von einer Therapie mit Temozolomid, wohingegen die Radiatio keine Abhängigkeit vom Methylierungsstatus zeigt [10, 11]. Ergänzend ist zu erwähnen, dass eine hypofraktionierte Radiotherapie mit begleitender und anschließender Temozolomid-Chemotherapie einen Überlebensvorteil in der Gruppe der älteren Glioblastom-Patienten gezeigt hat, und dies unabhängig vom MGMT-Methylierungsstatus [12].

Die Radiatio erfolgt als „involved field“ mittels konventioneller dreidimensionaler konformaler Technik oder mittels intensitätsmodulierter Technik (IMRT) in besonders komplexen Situationen. Anhand der Überlagerung von Planungs-CT mit postoperativer T1 beziehungsweise T2 FLAIR Bildgebung erfolgt die Zielvolumendefinition unter Einschluss der Resektionshöhle mit etwaigem makroskopische Resttumor [13]. Das CTV („clinical target volume“) wird durch Erweiterung des GTV („gross tumor volume“) um zwei Zentimeter generiert. Die Rationale hierfür besteht darin, dass achzig Prozent der Rezidive in einem zwei Zentimeter messenden Saum um die ermittelte Läsion auftreten [14-16]. Die Festlegung des optimalen Zielvolumens ist entscheidend abhängig von der Balance zwischen behandlungsassoziierten Toxizitäten und optimaler Tumorkontrolle. Die Einhaltung der Dosisgrenzwerte für Risikoorgane wie Hirnstamm und Sehbahn orientiert sich an den QUANTEC Parametern.

Entsprechend der Vorgaben der ICRU („International Commission on Radiation Units and Measurements“) 50 beziehungsweise 83 wird eine normofraktionierte Strahlentherapie mit einer Zielvolumendosis (ZVD) von 60 Gy angestrebt. Aufgrund großer Zielvolumina beziehungsweise ausgedehnter Erfassung von Risikoorganen kann es nötig sein, dass die Gesamtdosis in diesen Fällen auf 54 Gy abgesenkt werden muss.

Simultan zur Radiatio wird Temozolomid in einer täglichen Dosierung von 75 mg/m² Körperoberfläche verabreicht. Im Abstand von vier Wochen zum Ende der Radiatio schließen sich bis zu sechs Zyklen Temozolomid in einer Dosierung von 150-200 mg/m² Körperoberfläche an [4]. Bei älteren Patienten

sollte allerdings beachtet werden, dass eine kombinierte Therapie schlechter toleriert wird und mit einer hohen Rate von Grad 3 und 4 Toxizitäten einhergeht [17].

Nach der chirurgischen Resektion und der Radiochemotherapie treten die meisten Rezidive innerhalb des CTV auf. In etwa zwanzig Prozent der Patienten entwickeln sich Rezidive jedoch in unmittelbarer Nähe der Feldgrenzen [14]. Paradoxe Weise steigern sublethale Strahlendosen, wie sie bei der fraktionierten Radiotherapie zur Anwendung kommen die Migration als auch die Invasivität der Glioblastomzellen [18, 19]. Es ist also durchaus denkbar, dass durch fraktionierte Radiatio die Glioblastomzellen zum Auswandern aus dem CTV angeregt werden, und die ausgewanderten Zellen nach Ende der Strahlentherapie das ursprüngliche Tumorgebiet wieder besiedeln. Zusätzlich würde die Streustrahlung auch die Migration von Tumorzellen außerhalb des Zielvolumens im Gehirn erhöhen, was besonders im Rahmen der IMRT durch das sogenannte „low dose bath“ besondere Bedeutung erlangen könnte. Somit besteht aktuell das führende Ziel dieser multidisziplinären Therapie in der Steigerung der lokalen Kontrolle, da eine Kuration nur in Ausnahmen gelingt.

1.3. Grundsätze der Strahlenphysik und Strahlenbiologie

Die mittels Linearbeschleuniger durchgeführte perkutane Strahlentherapie basiert auf Nutzung von Elektronen beziehungsweise Photonen, die durch Ablenkung der Elektronen auf eine Schwermetallanode in Form von Bremsstrahlung erzeugt werden. Im Wesentlichen unterscheiden sich Elektronen und Photonen durch ihren Tiefendosisverlauf, wobei Elektronen einen steileren Dosisabfall in der Tiefe aufweisen. Physikalische Grundlage der Strahlentherapie ist die Energieübertragung an das bestrahlte Gewebe, wodurch die Hauptwirkung durch Ionisation und Anregung von Atomen und Molekülen vermittelt wird. Hierbei wird zwischen primärer Ionisation und sekundärer Ionisation unterschieden, die auf Hydroxiradikalen beruht, welche durch Radiolyse von Wassermolekülen entstehen. Die Energiedosis in Gray

(Gy) entspricht dem Quotienten aus absorbierter Strahlungsenergie und Masse des Materials, welches die Energie aufnimmt.

Die biologische Wirkung ionisierender Strahlung spiegelt sich auf zellulärer Ebene durch Veränderungen an der DNA, Enzymen und Membranbestandteilen wider. Das klonogene Zellüberleben nach ionisierender Bestrahlung wird hauptsächlich durch die Anzahl der DNA Doppelstrangbrüche und der Reparaturkapazität einer Zelle bestimmt.

Das therapeutische Verhältnis beschreibt die Abhängigkeit zwischen der dosisabhängigen Tumorvernichtung und der Toleranz des gesunden Gewebes.

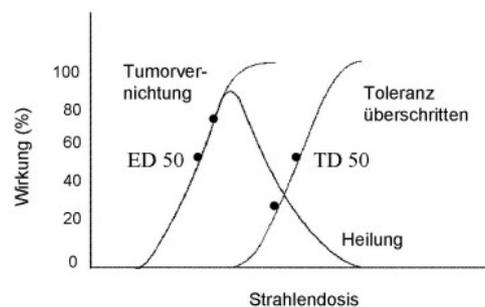


Abbildung 2: Das therapeutische Verhältnis. Tumorheilung in Abhängigkeit der Strahlendosis dargestellt als Resultante zwischen der dosisabhängigen Tumorvernichtung und der Toleranz des gesunden Gewebes. ED=Effektdosis, TD=Toleranzdosis (modifiziert nach Holthusen, 1936)

Zur Optimierung des therapeutischen Verhältnisses der Strahlentherapie wird die Gesamtdosis in mehrere Einzeldosen aufgeteilt, die sogenannte Fraktionierung. Die grundlegenden Überlegungen zur Rationale der Fraktionierung lässt sich mit den vier wesentlichen Mechanismen Reparatur [20], Reoxygenierung [20, 21], Redistribution [22, 23] und Repopulation [24] beschreiben. In Abhängigkeit von Tumor und Fraktionierungsschema tragen diese Mechanismen teilweise in entgegengesetzter Weise zur Wirkung der Fraktionierung bei. Reparatur und Repopulation können hier zum einen zur Normalgewebeschonung beitragen, andererseits aber auch zu einem erneuten Wachstum der Tumorzellen führen [25]. Hypoxische Tumoreale werden durch Reduktion der Tumormasse im Laufe der Therapie reoxygeniert, wodurch es zu

Radikalbildung und somit Zellschäden kommt [20, 21]. Die einzelnen Abschnitte im Zellzyklus sind unterschiedlich sensibel in Bezug auf ionisierende Strahlung, wobei die M-Phase recht empfindlich und die S-Phase sehr unempfindlich ist [22]. Die Redistribution beschreibt also, die Akkumulation der Tumorzellen in einer eher vulnerablen Phase durch Fraktionierung [22]. Die Fraktionierung soll somit zum einen die Tumorzellen für die Bestrahlung sensibilisieren und gleichzeitig das Normalgewebe möglichst optimal schonen. Es gilt allerdings zu beachten, dass durch Fraktionierung sublethale Strahlendosen in Bezug auf den Gesamttumor appliziert werden. Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen und Tiermodellen legen nahe, dass sublethale Dosierungen möglicherweise Migration und Invasion von Tumorzellen triggern. Wie bereits erwähnt könnte dieser Mechanismus speziell im Rahmen der Strahlentherapie bei Glioblastom zur Entstehung von Rezidiven beitragen.

1.4. Invasion und Migration auf zellulärer und molekularer Ebene

Die zentrale Voraussetzung für die Migration ist die Aufrechterhaltung der Polarität der Zelle. Entlang der Bewegungsachse findet eine Polarisierung in Leitsaum mit Lamellipodium (Invadopodium) und Zellende statt. Die Zellpolarität und die Lamellipodien entwickeln sich durch Cdc42 und Rho GTPasen-vermitteltes Ausbilden von Mikrotubuli und fokaler Adhäsionen [6]. Die gerichtete Bewegung wird dabei über Protonen- und Kalzium-Gradienten gesteuert. Die freie zytosolische Kalzium- und Protonenkonzentrationen nimmt vom Lamellipodium in Richtung Zellende zu, während die Protonenkonzentration in der extrazellulären Nanoumgebung der Glykokalyx zum Lamellipodium gegenläufig zunimmt. Die Konzentrationsgradienten werden vermutlich durch anaeroben Abbau von Glukose zu Lactat, in mitochondrienfreien Lamellipodien mit dortiger Säureausscheidung durch Na^+/H^+ -Austauscher und Monokarboxylat-Transporter, sowie Kalziumaufnahme durch säuresensitive Kationenkanäle am Zellende aufgebaut [26].

Eine gerichtete Bewegung entsteht durch den ständigen Auf- und Abbau der Mikrotubuli innerhalb des Lamellipodiums in Bewegungsrichtung, während das Zellende seine Adhäsion sukzessive abbaut. 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 Zellendes 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-Kontraktibilität, sowie das Verschieben von Ionen und Wasser zwischen Extrazellulärraum und Zytosol. Die konzertierte Aktivität von Na^+/H^+ -Austauschern, Anionenaustauschern $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter und Aquaporinen bedingt dabei die lokale zelluläre Nettoaufnahme von NaCl und Wasser. Das Zusammenspiel von K^+ -, Cl^- -Kanälen, KCl -Kotransporter und Aquaporinen die lokale Nettoabgabe von KCl und Wasser. Die Hemmung der Transportsprozesse am Zellende oder Lamellipodium stoppt, wobei zusätzliche Aktivierung die Migration beschleunigt [27].

1.5. Migationsmaschinerie - Kanäle in der Plasmamembran

Migrierende Glioblastomzellen zwingen sich durch Zellzwischenräume. Dazu müssen die Zellen zusätzlich zu der oben beschriebenen Protusion und Retraktion von Lamellipodium und Zellende ständig lokale Zellvolumenänderungen durchführen. Zellfortsätze müssen sich verschlanken, um in Räume von wenigen μm Durchmesser eindringen zu können. Angetrieben wird die lokale Zellvolumenabnahme durch eine hohe Cl^- -Konzentration (100 mM) [28], die analog dem Aufladen einer Batterie weit über das elektrochemische Cl^- -Gleichgewichtspotential im Zytosol durch den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Chlorid-Kotransporter aufgebaut wird [29]. Diese Cl^- -Batterie ist die elektrochemische Triebkraft für die lokale Volumenabnahme durch den Efflux von Cl^- , dem Gegen-Ion K^+ sowie dem isoosmotischen Nachfolgen von Wasser durch die Aquaporine 1 und 4 [30]. K^+ und Cl^- -Efflux erfolgt am Invadipodium durch KCl -Kotransport [30, 31] oder über Ca^{2+} -aktivierte K^+ Kanäle und volumenregulatorische ClC-3 Cl^- -Kanäle [29, 32-34].

Der Ca^{2+} und spannungsaktivierte BK K^+ Kanal ist an der lokalen Volumenabnahme beteiligt [35]. Glioblastomzellen exprimieren ebenfalls niedrig (SK, [36]) und intermediär leitende, Ca^{2+} -aktivierte K^+ Kanäle (IK, SK4 oder KCa3.1

[36-38]). Letztere gehören ebenfalls zur Migrationsmaschinerie der Glioblastomzellen. Allerdings scheinen KCa3.1 Kanäle über andere Signalwege als die BK Kanäle aktiviert zu werden: So verwendet die CXC Chemokin-Ligand 12 (CXCL12) gesteuerte, nicht aber die, EGF-stimulierte Migration IK Kanäle [39].

Ionisierende Strahlen fördern die Migration und Invasion von Glioblastomzellen. Subletale Dosen ionisierender Strahlung beschleunigen die *in vivo* Metastasierung von primären Lewis Lungenkarzinom [40]. Ähnliche Effekte wurden für die Migration/Invasion von Pankreaskarzinomzellen [41] und Glioblastomzellen *in vitro* [18, 19] und im *Xenotransplantat-Nacktmausmodell* gezeigt [42]. Dabei interferieren ionisierende Strahlen mit verschiedenen migrationsstimulierenden Signalwegen. So verstärken sie die Matrixmetalloproteinase-2-Sekretion und die Invasion von Glioblastomzellen über Src-Tyrosinkinase, EGFR, PI3K und p38, AKT, und mTOR [18]. Die Matrixmetalloproteinase-2-Aktivität wiederum hängt von der funktionellen Integrin β_1 - und β_3 -Expression ab, die ihrerseits durch ionisierende Strahlen hochreguliert wird [43]. Darüber hinaus stimulieren ionisierende Strahlen in Glioblastomzellen auch die Expression beziehungsweise Expression und Aktivität von Integrin alpha, Matrixmetalloproteinase-9-, und Membrane Type 1 Matrixmetalloproteinase und regulieren diejenige von TIMP-2 herunter [19]. In A549 Lungen-Adenokarzinomzellen wurde die strahlungsinduzierte Bildung von Lipidperoxide in der Plasmamembran gezeigt. Die Lipidperoxide binden kovalent an die c-Src Tyrosinkinase, wodurch die Kinaseaktivität erhöht wird [44].

Neben dem EGFR-Signalweg erhöhen ionisierende Strahlen in verschiedenen Tumorklinien [45] [46], aber nicht allen Glioblastomlinien [47], die p53-abhängig die Expression von CD95 und CD95-Ligand. Bindung von CD95 und CD95-Ligand wiederum rekrutiert in Glioblastomzellen das Src Familienmitglied Yes und die p85 Untereinheit der PI3K zu CD95, wodurch über den Akt-Glycogen-Synthase-Kinase-3- β -Catenin-Weg die Expression von Matrixmetalloproteinasen gefördert wird [48]. Auch konnte in Nicht-Glioblastoma-Tumorklinien gezeigt werden, dass Ligierung von CD95 die

Invasion und Migration über drei unabhängige Wege (NKfκB, Erk1/2 und Caspase-8) stimuliert [49].

Ferner bewirken ionisierende Strahlen in Glioblastomzellen die Sekretion von TGF-β [42, 50-52] TGF-β als starker Induktor der Invasion [53, 54] stimuliert über Phosphorylierung von SMAD die Expression von Laminin, Integrinen, Matrixmetalloproteinasen und inhibiert die Produktion von TIMP-2 [6]. Erwartungsgemäß hemmt daher RNAi-basiertes TGF-β-Silencing die Invasion von Glioblastomzellen [55].

1.6. Molekulare Struktur der Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind eine der größten und heterogensten Proteinfamilien im Rahmen der Ionenkanäle. Bis heute wurden über 75 verschiedene Gene identifiziert und sequenziert, die für Kaliumkanaluntereinheiten [56] kodieren. In ihrer Funktion als Ionenkanäle haben sie eine entscheidende Bedeutung für die Generierung, Aufrechterhaltung und Wiederherstellung des Membranpotentials. Sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen sind Kaliumkanäle ein wichtiger Bestandteil in der Vermittlung vieler zellulärer Prozesse und Signalwege. Spezifische pharmakologische Modulationen von Kaliumkanälen könnten somit eine große Relevanz bei verschiedensten pathologischen Prozessen, einschließlich der Proliferation verschiedener Tumorentitäten, haben.

Allen Kaliumkanälen gemeinsam ist die porenformende Untereinheit mit ihrem Selektivitätsfilter, welcher sich aus einer hoch konservierten Abfolge von fünf Aminosäuren (TVGYG: Threonin, Valin, Glycin, Tyrosin, Glycin) zusammensetzt [57]. Der Selektivitätsfilter liegt im inneren der Kanalpore und gewährleistet an ihrer engsten Stelle die absolute Selektivität für Kalium. Dieser Filtermechanismus beruht auf einer transienten Dehydratisierung der Kaliumionen, wobei die Hydrathülle der Ionen durch die Sauerstoffatome des Selektivitätsfilters imitiert wird. Die Selektivität für Kalium ergibt sich daraus, dass die transiente Dehydratisierung für andere Ionen energetisch weit ungünstiger ist, als für Kalium. Die Untereinheit eines Kanals kann sowohl als Homo- oder Heteromer vorliegen und darüber hinaus Di- oder Tetramere bilden. In Ergänzung zu der porenformenden α-Untereinheit besitzen einige

Kanäle akzessorische β -Untereinheiten, die modulierend auf die Kanaleigenschaften wirken [56].

Die Einteilung der Kaliumkanäle in Hauptfamilien erfolgt dabei in erster Linie auf der Basis von Anzahl und Homologie der Transmembrandomänen ihrer porenbildenden Untereinheit(en). Es werden drei Hauptfamilien unterschieden, mit zwei, vier oder sechs Transmembrandomänen, wobei hier eine etwa 65 prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen besteht [58]. Die Einteilung der Ca^{2+} aktivierbaren Kaliumkanäle erfolgt auf Grund ihrer Leitfähigkeit. Es werden demnach, „small-conductance (SKCa)“ Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit (KCa2.1, 2.2, 2.3) [59], der „intermediate-conductance (IKCa)“ Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit (KCa3.1/KCNN4/IKCa1/SK4) [60, 61] und der „big-conductance (BKCa)“ Kanal mit großer Leitfähigkeit (KCa1.1/KCNMA1/Slo1/BK) unterschieden [58].

1.7. Molekulare Struktur, Aktivierbarkeit und Expression des BK Kanals

Die Unterfamilie der Ca^{2+} aktivierbaren Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit wird durch nur einen Vertreter repräsentiert, den KCa1.1 (Synonyme: BK, MaxiK, KCNMA1, mSlo1). Der BK-Kanal weist im Hinblick auf seine Aktivierbarkeit eine Besonderheit auf, da er zusätzlich zu seiner Kalziumaktivierbarkeit durch Spannungsänderungen aktivierbar ist. Intrazelluläre Kalziumkonzentrationen im Bereich von 0,5 μM bis 5 mM führt zum Öffnen des BK-Kanals [62]. Die Leitfähigkeit für Kaliumionen liegt im Vergleich zu den anderen Subfamilien der Ca^{2+} aktivierbaren Kaliumkanäle mit bis zu 260 pS weitaus höher [63]. Ein weiteres Charakteristikum des BK-Kanals ist seine spezifische Blockierbarkeit durch Iberiotoxin [64, 65] und Paxilline [66]. Der generelle Aufbau orientiert sich an dem der Kanäle mit sechs Transmembrandomänen. Ergänzend zu der porenbildenden α -Untereinheit [65] ist die Interaktion mit bis zu vier akzessorischer β -Untereinheiten möglich, die modulierende Einflüsse auf die Leitfähigkeit des Kanals haben [67]. Jede α -Untereinheit ist aus einem Homotetramer aufgebaut, wobei jede Untereinheit einen Spannungssensor und zwei hochaffine Bindungsstellen für Kalzium trägt. Strukturelle [68] und funktionelle Analysen, bei denen gezeigt werden konnte, dass es auch in praktischer Abwesenheit von Kalzium zu einer nahezu

maximalen Öffnung des BK Kanals kommt [62] legen eine enge strukturelle und funktionelle Verwandtschaft zu spannungsabhängigen Kaliumkanälen (KV) nahe. Der strukturelle Aufbau der α -Untereinheit unterscheidet sich am N- und C-Terminus von dem der KV Kanäle mit sechs transmembranären Domänen (S1-S6). Im N-Terminus ist eine zusätzliche transmembranäre Domäne (S0) lokalisiert. Der N-Terminus liegt infolgedessen extrazellulär vor und vermittelt die Interaktion mit den akzessorischen β -Untereinheiten [63]. Der mehrere hundert Aminosäuren lange zytoplasmatische C-Terminus enthält vier weitere hydrophobe Abschnitte (S7-S10). Innerhalb des C-Terminus sind zwei hochaffine Bindungsstellen für Kalzium, welche innerhalb zweier Regulatordomänen für die Kaliumleitfähigkeit (RCK1 und RCK2) lokalisiert sind. Die Segmente S9 und S10 bilden die RCK2 innerhalb derer sich die sogenannte „Ca²⁺ bowl“ befindet [69]. Als „Ca²⁺ bowl“ werden eine Serie negativ geladener Aspartate bezeichnet, die sich unmittelbar vor S10 befinden [70] und vermutlich für die Kalziumsensitivität des BK Kanals verantwortlich sind [71]. Die zweite potentiell für die Kalziumsensitivität regulatorische Domäne, innerhalb des C-Terminus, befindet sich 400 Aminosäuren oberhalb der „Ca²⁺ bowl“ in den transmembranären Segmenten S7-S8 und wird als RCK1 bezeichnet [72]. Die beiden für Kalzium hochaffinen Bindungsstellen bilden einen funktionellen Komplex der die Energie der Kalziumbindung an die mechanische Arbeit der Kanalöffnung koppelt [69]. In Ergänzung zu der kalziumabhängigen Aktivierbarkeit des BK Kanals kann es unabhängig von Kalzium durch Magnesiumionen vermittelt zu einer Öffnung des Kanals kommen. Magnesium bindet innerhalb der RCK1 und interagiert mit Arginin 213 des transmembranären Segment S4, welches als Spannungssensor fungiert [73]. Es kommt zu einer elektrostatischen Interaktion zwischen gebundenem Magnesium und S4 und in Folge zur Öffnung des BK Kanals in Abhängigkeit der Kanalaktivität [73]. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK Kanals wird zudem durch eine Oxidation von Methionin innerhalb der RCK1 signifikant erhöht, dies erfolgt interessanterweise bei einer relativ geringen intrazellulären Kalziumkonzentration [74]. Phosphorylierungen des intrazellulären C-Terminus durch die Proteinkinasen A, G und C führen in Abhängigkeit des Gewebes und

des physiologischen Zustandes zu einer Modulation der Kanalaktivität [75, 76]. Die Phosphorylierung mittels cAMP-Kinase und cGMP-Kinase führen in der Regel zu einer Verschiebung der Kanalaktivierbarkeit hin zu negativeren Potentialen [75]. In HEK293T Zellen konnte gezeigt werden, dass eine direkte Phosphorylierung der α -Untereinheit des BK Kanals durch die Tyrosinkinase c-Src, zu einer Inaktivierung führt [77]. Darüber hinaus sind noch weitere die Kanaleigenschaft modulierende intrazelluläre Liganden identifiziert worden. Eine weitere Komponente, die zur Diversität der Kanalaktivierung beiträgt ist die Expression verschiedener Spleißvarianten des BK Kanals. Das Vorhandensein von unterschiedlichen Spleißvarianten des BK Kanals wirkt sich besonders im Hinblick auf Phosphorylierungen mittels cAMP-Kinase und cGMP-Kinase aus [75]. In Ergänzung zu den intrazellulären Liganden werden die Kanaleigenschaften über akzessorische β -Untereinheiten moduliert, welche über das transmembranäre S0 Segment mit der porenbildenden α -Untereinheit interagieren [63]. Je nach Gewebe werden unterschiedliche β -Untereinheiten exprimiert, gemein ist allen der Aufbau aus zwei transmembranären Segmenten, die über eine extrazelluläre Schleife verbunden sind [78]. Stresshormone (z.B. Epinephrine und Glukokortikoide) haben Einfluss auf die Expression unterschiedlicher Spleißvarianten des BK Kanals [79]. Die β 1-Untereinheit, ist die am besten untersuchte Untereinheit, sie setzt die Aktivierungsschwelle und die Spannungsabhängigkeit des Kanals herab und führt zu einer leicht veränderten Kalziumsensitivität, die sich jedoch als funktionell bedeutsam herausstellt [80]. Darüber hinaus sind selektive extrazelluläre Liganden identifiziert worden, die zur pharmakologischen Charakterisierung des BK Kanals genutzt werden und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommen sind. Ein spezifischer Blocker des BK Kanals ist Iberiotoxin, das als wichtigstes Toxin des roten indischen *Skorpions* (*Buthus tamulus*) identifiziert wurde [64, 81]. Dem BK Kanal kommt nicht nur in Folge seiner sehr vielseitigen Aktivierbarkeit eine enorme Bedeutung zu. Er zeigt eine sehr breite Gewebeverteilung. Die Expression des BK Kanals wurde im Gehirn in einer Reihe distinkter Regionen nachgewiesen. Die Porenbildende α -Untereinheit wurde im

Cerebellum, in Pyramidenzellen des Hippocampus und im Neocortex sowie dem Bulbus olfactorius detektiert [82]. Funktional ist der BK Kanal in Neuronen entscheidend an der schnellen Nach-Hyperpolarisation beteiligt, die im Anschluss an ein Aktionspotential messbar ist [83]. Des Weiteren moduliert er die Neurotransmitter-Ausschüttung [84] in den synaptischen Endigungen. Beide Eigenschaften machen ihn somit zu einer bedeutenden Komponente für die Aufrechterhaltung neuronaler Funktionen. In BK-KO Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass sich ein Fehlen des BK Kanals drastisch auf die zerebellare Funktion auswirkt und in einer Ataxie resultiert, das heißt die Tiere zeigen anormal konditionierte Liedschlussreflexe, Lokomotionsstörungen und Defizite in räumlicher Koordination [83]. Eine Fehlfunktion der Haarsinneszellen führt in diesen Tieren zu einem progressiven Hörverlust [85]. Die Expression des Kanals in glattmuskulären Geweben, wie der Harnblase, Atemwegen und Gefäßen [86-88] führt in den BK-Knockout Tieren zu Reizblasensymptomatik, Inkontinenz, Asthma und Bluthochdruck [89].

Neben der physiologischen Expression des BK Kanals konnte diese in verschiedenen Tumorentitäten sowohl auf mRNA Ebene, als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden [90, 91]. Im Speziellen konnte anhand von Biopsien gezeigt werden, dass bei Gliomen eine spezifische Überexpression des BK Kanals vorliegt, im Vergleich zu nichtmalignem kortikalem Hirnparenchym. Darüber hinaus besteht eine positive Korrelation zwischen der BK Kanalexpression und der Malignität innerhalb der Gliome. In einigen Glioblastomzelllinien und Biopsien konnte eine spezielle Variante des BK Kanals isoliert werden, welche eine weitaus höhere Kalziumsensitivität zeigt. [92]

1.8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die multimodale und interdisziplinäre Therapie durch Neurochirurgie, Neuroonkologie, Neuropathologie und Radioonkologie hat in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte in der Therapie des Glioblastoms erzielt. Allerdings ist die Prognose für Patienten mit Glioblastom weiterhin sehr eingeschränkt. Wesentliche Gründe für die schlechte Prognose ist das infiltrative Wachstum und die regelmäßig auftretenden Rezidive. Rezidive treten vor allem in unmittelbarer Nähe zum Rand des Bestrahlungsfelds auf und innerhalb der Resektionshöhle. Es stellt sich also die Frage, wie ist es den Glioblastomzellen möglich sich der Bestrahlung zu entziehen und erneut zu proliferieren. Die Migration von Zellen wird entscheidend durch Ionenkanäle beeinflusst. Die Zellen müssen in der Lage sein ihr Volumen zu reduzieren beziehungsweise ihr Zytoskelet während der Migration ständig umzubauen. Auf zellulärer Ebene spielt die Modulation des Kalziumhaushalts und der kalziumabhängigen Signalwege eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Migration. Eine Verbindung zwischen Ionenkanälen und intrazellulärem Kalziumhaushalt stellen die Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle dar, welche in Glioblastomzellen überexprimiert werden. Darüber hinaus werden Kalzium abhängige Signalkaskaden über die CaMKII vermittelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die *in vitro* Untersuchung der strahlungsinduzierten Migration von Glioblastomzellen. Hierbei soll im Speziellen die funktionale Relevanz des Ca^{2+} -abhängigen K^+ Kanals mit hoher Leitfähigkeit, dem sogenannten BK Kanal, untersucht werden. Elektrophysiologische Verfahren sollen zeigen welche Auswirkung ionisierende Strahlung auf die Aktivität des Kanals hat. Migrationsexperimente mit gezielter Blockade des BK Kanals dienen zur Klärung der Relevanz in Bezug auf das migratorische Potential. Darüber hinaus soll untersucht werden inwiefern CaMKII vermittelte Signalkaskaden nach Bestrahlung Einfluss auf die Migration nehmen. Diese Arbeit soll im Weiteren zeigen, inwieweit eine gezielte pharmakologische Blockade von Ionenkanälen beziehungsweise ihrer nachgeschalteten Signalkaskaden potentielle Zielstrukturen im Rahmen der Strahlentherapie bei Glioblastomen darstellen könnten.

2. Material und Methoden

Alle Experimente werden an den beiden humanen Glioblastom-Zelllinien T98G und U87MG durchgeführt. Die Zellen wurden von ATCC bezogen und in niedrigen Passagen in der Flüssigstickstoff-Gasphase vor Verwendung gelagert. Eine weiterführende Charakterisierung der Zellen erfolgte nicht, jedoch stimmt die außergewöhnlich hohe funktionelle Expression von BK Kanälen mit den beschriebenen Eigenschaften von Glioblastomzellen überein [93]. Für die Kultur der Zellen wird das Nährmedium RPMI 1640 mit 10% FCS Zusatz verwendet. Die Zelllinien werden je nach Experiment entweder adhärent in Zellkulturflaschen (für Migrationsuntersuchungen) oder auf Petrischalen mit drei Zentimeter Durchmesser (für elektrophysiologische Untersuchungen) bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Mittels Linearbeschleuniger (Elekta, 6 MV-Photonen, Dosisleistung von 4 Gy/min) erfolgt die Bestrahlung der Zellen mit Photonen. Die Zellbestrahlung erfolgt je nach Experiment entweder adhärent semikonfluent in Zellkulturflaschen, auf Petrischalen oder nach Ablösen durch Trypsinverdau im Zellpellet mit Einzeldosen von 0-2 Gy. Die Analyse der Zellen erfolgt je nach Protokoll 0.25, 1, 2, 8 und 16 h nach Bestrahlung.

Produkt	Bezeichnung	Bezugsquelle
Paxilline	57186-25-1	Tocris Bioscience
KN-93	1188890-41-6	Tocris Bioscience
Ionomycin	56092-82-1	Sigma-Aldrich

Tabelle 1: Bezeichnung und Bezugsquelle der verwendeten Kanalmodulatoren

2.1. Migrationsanalyse mittels “Real-Time Cell Analyzer” (RTCA)

Das hier verwendete xCELLigence-System[®] bietet die Möglichkeit Veränderungen des Zellstatus, in Hinblick auf Zellzahl, Viabilität, Morphologie und Adhärenz in Echtzeit zu quantifizieren.

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
RTCA Analyzer	05228972001	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
RTCA DP Station	05229057001	
RTCA Control Unit	05454417001	
RTCA Software	1.0.0.0805	
CIM-Plate 16	05232368001	

Tabelle 2: Komponenten und Bezugsquelle der RTCA-Einheit.

Das Messprinzip basiert auf Änderung der Impedanz über Mikroelektroden, die im Boden der Messkammern einer sogenannten “CIM-Plate 16“ eingearbeitet sind. Das xCELLigence-System[®] besteht aus vier Komponenten dem “RTCA Analyzer“, der “RTCA DP Station“, der “RTCA Control Unit“ und der „CIM-Plate 16“. Die Größe der “CIM-Plate 16“ entspricht der Standardabmessung einer 16-Loch Kulturplatte. Der Boden der “CIM-Plate 16“ ist zu 80% mit perlschnurartigen Goldelektroden bedeckt, wobei hier perlenartige Verdickungen mit 90 µm Durchmesser durch schnurartige Abstandhalter mit 30 µm Breite getrennt sind. Der Abstand zwischen zwei perlenartigen Verdickungen beträgt 110 µm. Der Aufbau entspricht der klassischen “Boyden-Chamber“. Das maximale Füllungsvolumen einer Kammer des oberen Teils beträgt 200±5 µl, der Durchmesser des Bodens beträgt 5±0,05 mm, die Impedanz beträgt pro Kammer 17±5 Ω (unter Standardbedingungen gemessen in 1x PBS bei 10 kHz). Die unteren Kammern besitzen ein Füllungsvolumen von 160±5 µl. Die “CIM-Plate 16“ wird zur Analyse der Zellen in die “RTCA DP Station“ eingelegt um einen elektrischer Kontakt mit dieser herzustellen. Während der Echtzeitmessung befindet sich die “RTCA DP Station“ in einem Inkubator und ist über eine Kabelverbindung mit dem “RTCA Analyzer“

verbunden, welcher die Daten an die "RTCA Control Unit" überträgt. Mittels der "RTCA Software" werden die Daten analysiert und grafisch dargestellt.

Zur Quantifizierung der Änderungen des Zellstatus, ausgedrückt durch Veränderung der Impedanz, wird der sogenannte „Cell index“ (CI) als Parameter verwendet. Die Impedanz beschreibt den Quotienten aus Wechselspannung und Wechselstrom, womit die Impedanz abhängig von der Frequenz ist. Der CI berechnet sich somit nachfolgender Formel:

$$CI = \max_{i=1, \dots, N} \left[\frac{R_{\text{cell}}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right]$$

$R_b(f_i)$ und $R_{\text{cell}}(f_i)$ sind frequenz-abhängige Widerstände der Elektroden, die davon abhängig sind, ob Zellen vorhanden sind und bei welcher Frequenz die Messung vorgenommen wird. N ist die Anzahl der Frequenzpunkte zu denen die Impedanz bestimmt wird. In der vorliegenden Arbeit ist $N=3$, dementsprechend wurde bei 10 kHz, 25 kHz und 50 kHz gemessen. Der im Folgenden dargestellte CI bezieht sich immer auf die Impedanzmessung bei 10 kHz. Die Messung erfolgt für jede Frequenz jeweils über einen Zeitraum von 100 ms pro Kammer [94]. Das Messprinzip beruht auf der Grundlage, dass Zellen nachdem sie durch die Öffnungen am Boden der oberen Kammer gewandert sind, auf den Goldelektroden adhärieren und somit zu einer Erhöhung der Impedanz und hierdurch des CI führen. Befinden sich keine Zellen, oder nur sehr schwach adhärerte Zellen auf den Elektroden ist $R_{\text{cell}}(f_i) = R_b(f_i)$, wodurch $CI=0$ ist. Adhärieren mehr Zellen auf den Elektroden, adhärieren stärker oder vergrößert sich ihre Oberfläche steigt der CI. Eine Abnahme der Zelldichte durch zum Beispiel lösen der Zellen von den Elektroden führt umgekehrt zu einer Reduktion des CI [95].

Die Durchführung der Versuche am RTCA beinhaltet mehrere Phasen (Prä-Inkubation, Kalibrierung, basale Impedanzmessung und Impedanzmessung nach Zugabe der Testsubstanzen) die grundsätzlich in einer festen Reihenfolge nacheinander durchgeführt werden.

Alle Messungen werden bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator durchgeführt. Zur Kalibrierung des Systems werden pro Kammer der "CIM-Plate 16" der unteren Platte mit 160 µl zehnpotentigem FCS Medium gefüllt, wobei die Kammern der oberen Platte mit 100 µl FCS-freiem Medium und dem jeweiligen Inhibitor beziehungsweise Lösungsmittel befüllt werden. Vor der Durchführung der Kalibrierungsmessung, wird die "CIM-Plate 16" für 30 min in die "RTCA SP Station" eingelegt um eine Äquilibration des Mediums und der "CIM-Plate 16" zu gewährleisten. Die Kalibrierung erfolgt dann bei 10 kHz für 100 ms pro Kammer.

Für die Migrationsanalyse werden semikonfluent gewachsene Zellen mittels Trypsin vereinzelt und in zwei Prozent FCS haltigem RPMI 1640 Medium aufgenommen. Entsprechend der einzelnen Versuchsanordnungen enthält das Medium zusätzlich Paxilline (0,5 µM-10 µM), KN-93 (3 µM) oder Lösungsmittel (DMSO) alleine. Die einzelnen Zellsuspensionen werden nun entsprechend der Versuchsgruppen aliquotiert und ionisierender Strahlung ausgesetzt. Eine Stunde nach Bestrahlung werden in die obere Platte pro Kammer 4×10^4 Zellen in 100 µl des jeweiligen Mediums ausgebracht, wonach die "CIM-Plate 16" wiederum in die „RTCA DP Station“ eingelegt wird. Die Impedanzmessungen erfolgen alle 15 Minuten für insgesamt 12 Stunden. Die einzelnen Versuchskonditionen werden als Triplets angesetzt und vermessen.

2.2. Elektrophysiologie

Grundlagen

Die „Patch-Clamp“ Technik wurde von Neher und Sakmann 1976 erstmals vorgestellt. Diese Methode erlaubt die Messung von Ionen-Strömen über der Plasmamembran. Prinzipiell sind zwei grundlegenden Ableit-Modi möglich, zum einen die Spannungsklemme und zum anderen die Stromklemme. Die Spannungsklemme dient zur Messung der spezifischen Ionen-Kanalaktivität, wobei mittels der Stromklemme die Änderung des Membranpotentials nach einem Strompuls registriert wird. Abbildung 3 zeigt den invertierenden (1) Operationsverstärker (2), hier in der Spannungsklemme (Vclamp) und einer mit

der Arbeitselektrode (3) verbundenen Glaskapillare (4), welche auf der Zelle (5) aufliegt.

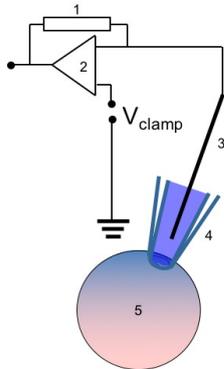


Abbildung 3: Patch-Clamp Ableitungskonfiguration in der Spannungsklemme (für Details siehe Text).

Die Ableitung erfolgt über eine ausgezogene Glaskapillare (Patch-Pipette) die mittels Mikromanipulator, auf einem schwingungsgedämpften Tisch, unter mikroskopischer Kontrolle der Zelle angenähert wird. Der gesamte Versuchsaufbau ist zur elektrischen Isolierung von einem Faradayschen-Käfig umgeben.

Nach Kontakt der Kapillare mit der Plasmamembran wird ein leichter Unterdruck angelegt und es bildet sich ein Kontakt zwischen Glaswand und Plasmamembran aus. Hier werden Isolationswiderstände im Gigaohm Bereich erreicht, weshalb diese Verbindung als Gigaseal bezeichnet wird. Diese Technik ermöglicht verschiedene Ableitkonfigurationen (siehe Abbildung 4). Die Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich auf die „on-cell“ und „whole-cell“ Konfiguration. Die „on-cell“ Konfiguration wird durch das Aufsetzen der Glaskapillare nach Ausbildung des Gigaseals erreicht. Die „whole-cell“ Konfiguration kann durch das Anlegen eines höheren Unterdrucks erreicht werden, wobei die Ruptur des in die Kapillare eingesaugten Membranflecks und so ein direkter elektrischer Zugang zum Zytosol erreicht wird.

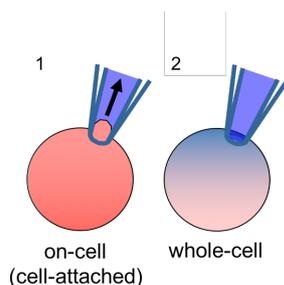


Abbildung 4: (1) „on-cell“ Konfiguration: der Pfeil symbolisiert den angelegten Unterdruck. Die Plasmamembran ist intakt, es besteht kein direkter Zugang zum Zytosol. (2) „whole-cell“ Konfiguration: es besteht eine direkte Verbindung zwischen Kapillare

und Zytoplasma, es kommt zu einem Austausch des Großteils der zytosolischen Ionen mit derer der Pipettenlösung. Hier werden extra und intrazelluläre Ionenkonzentrationen genau definiert und die Ströme über die gesamte Plamamembran („whole-cell“) gemessen.

Die Glaskapillare wird entsprechend der Untersuchungsbedingungen mit einer zur Analyse von Kaliumkanälen geeigneten Pipettenlösung befüllt (siehe Tabelle 3). Die Zellen werden während der Messungen mit der jeweils angegebenen Badlösung superfundiert (siehe Tabelle 3).

Pipettenlösung	Badlösung	
	NaCl	KCl
140 mM K-D-Glukonat	125 mM NaCl	130 mM NaCl
	5 mM KCl	
5 mM HEPES	32 mM HEPES	32 mM HEPES
1 mM ATP	5 mM D-Glukose	5 mM D-Glukose
5 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂
1 mM EGTA	1 mM CaCl ₂	1 mM CaCl ₂
pH 7,4 (titriert mit KOH)	pH 7,4 (titriert mit NaOH)	pH 7,4 (titriert mit KOH)

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Pipettenlösung und Badlösungen. Die Badlösungen sind auf 37°C temperiert.

Versuchsaufbau und Durchführung

Die strahleninduzierte Änderung der BK Einzelkanal- und Ganzzellströme werden mittels Patch-Clamp Ableitungen in der Spannungsklemme gemessen und die BK-Stromfraktionen wie beschrieben [96-98] bestimmt. Die Kanalaktivitäten bestrahlter und unbestrahlter migrierender Glioblastomzellen werden miteinander verglichen.

Die Offenwahrscheinlichkeit der Ca^{2+} -aktivierten BK Kanäle wird mit einer K-D-Gluconate/KCl Pipettenlösung und einer physiologischen NaCl-Badlösung im „on-cell“ Modus an dem dem Leitsaum entgegengesetzten Zellende migrierenden Zellen bestimmt. BK Kanäle lassen sich dabei über Ihre depolarisationsinduzierte Aktivierung und ihrer hohen Leitfähigkeit (>200 pS) identifizieren. Superfusion von KCl Bad-Lösung setzt das endogene Membranpotential auf 0 mV. Die Verschiebung der Kanalampplitude-Spannungsbeziehungen zwischen physiologischer NaCl und KCl Badlösung wird verwendet, um das endogene Membranpotential der Zellen zu berechnen. Durch Ca^{2+} -Permeabilisierung der Plasmamembran ($4 \mu\text{M}$ Ionomycin) in NaCl-Badlösung kann die Anzahl der maximal aktivierbaren BK Kanäle im Patch abgeschätzt werden. Im Ganzzellmodus („whole-cell“) werden (mit 1 mM EGTA-gepufferter freier Ca^{2+} -Konzentration von ~ 150 nM in der K-D-Gluconate/KCl Pipettenlösung) die Paxillin (500 nM) sensitiven, Depolarisations-aktivierten und auswärtsgerichtenden BK K^+ -Ströme zwischen bestrahlten und unbestrahlten, migrierenden und stationären Glioblastomzellen verglichen. Analysiert wird neben den absoluten Stromdichten, die $V_{1/2}$ der spannungsinduzierten Aktivierung (BK) und nach Ca^{2+} -Permeabilisierung die maximal aktivierbaren BK-Stromdichten.

2.3. Expressionsanalysen

Die Proteinabundanz von phospho-CaMKII, CaMKII, und β -Aktin wird mittels Immunoblot (SDS-PAGE) in Ganzzelllysaten von bestrahlten und unbestrahlten Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung gemessen. Bestimmung der Proteinexpression in T98G Zellen erfolgte, nach Präinkubation (15 min), Bestrahlung (0 oder 2 Gy) und Postinkubation (2 h), jeweils mit BK Kanalinhistor Paxillin ($2 \mu\text{M}$) oder ohne (Vehikel-Kontrolle). Im Anschluss erfolgte die Zelllyse mittels Lysepuffer (Zusammensetzung in mM: 50 HEPES pH 7,5, 150 NaCl, 1 EDTA, 10 Natriumpyrophosphat, 10 NaF, 2 Na_3VO_4 , 1 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) mit zusätzlich 1% Triton X-100, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin und 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung mittels „SDS-PAGE“. Nach Auftrennung der

Proteine werden diese auf PVDF Membranen geblottet (Roth, Karlsruhe, Germany). Die Membranen wurden mittels Inkubation in TBS Puffer (0,05% Tween 20 und 5% Milchpulver) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Zur Antikörperbindung erfolgte die Inkubation der Membranen über Nacht bei 4°C mit folgenden Antikörpern: "rabbit anti-phospho-CaMKII (Thr286) antibody (Cell Signaling #3361, New England Biolabs, Frankfurt, Germany, 1:1000), rabbit anti-CaMKII (pan) antibody (Cell Signaling #3362, 1:1000)". Antikörperbindung wurde nach Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur mit "horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit IgG antibody" (Cell Signaling # 7074; 1:1000 - 1:2000 verdünnt in TBS-Tween / 5% Milchpulver) mittels "Enhanced chemoluminescence" (ECL Western blotting analysis system, GE Healthcare/Amersham-Biosciences, Freiburg, Germany). Antikörperdetektion des "housekeeping-protein" β -Aktin (mouse anti- β -actin antibody, clone AC-74, Sigma #A2228 1:20.000) dient zum Nachweis der gleichmäßigen Gelbeladung. Antikörperbindung wurde mittels Röntgenfilm detektiert.

2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte bei multiplen Paarvergleichen mittels one-way ANOVA und Bonferroni-post hoc Test beziehungsweise bei nur einem Paarvergleich mittels Welch-corrected t-Test. Eine Signifikanz wird ab einem alpha Fehler von 5% ($p \leq 0,05$) angenommen. In den Abbildungen sind die Signifikanzen mit * gekennzeichnet, wobei gilt, dass *, **, ***: $p \leq 0,05$; 0,01 und 0,001. Die jeweils verwendete Testmethode ist bei den einzelnen Abbildungslegenden angegeben.

2.5. Limitationen der Methoden

Die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Methoden sind für die Beantwortung der initialen Fragestellung nach dem Einfluss der Bestrahlung auf die Migration von Glioblastomzellen insbesondere im Hinblick auf die Rolle des BK Kanals, trotz der im Folgenden beschriebenen Limitationen, prinzipiell geeignet. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass strahlungsabhängige sowie BK Kanal-abhängige Prozesse in einer logischen Sequenz darstellbar waren.

Spezifische Limitationen ergeben sich sowohl bei den verwendeten Zelllinien als auch bei den angewendeten Methoden an sich.

Langjährig verwendete Gliomzelllinien wie die U87MG und die T98G wurden initial aus Glioblastom-Patienten isoliert. Wobei hiermit letztlich durch die Verwendung dieser Zellen diese individuellen Tumoren charakterisiert werden. Die Ergebnisse lassen sich nur bedingt verallgemeinern. Darüber hinaus ist die generelle Übertragung von *in vitro* Daten auf die *in vivo* Situation aufgrund der sehr spezifischen und artifiziellen *in vitro* Bedingungen in Hinblick auf Mikro- und Makroenvironment limitiert. Darüber hinaus führt die Kultur der Zellen an sich zu einer gewissen molekularen Adaptation, Selektion und (De-)Differenzierung im Laufe der Kulturzeit.

Die hier verwendete Methode der Migrationsanalyse ermöglicht zum ersten Mal die kontinuierliche Analyse der Zellmigration über eine Änderung der Impedanz. Einschränkend ist zu erwähnen, dass eine Impedanzänderung sowohl durch Migration im eigentlichen Sinne, als auch durch eine Ausdehnung oder Proliferation der Zellen erzeugt wird. Die Auswertung erfolgte in einem engen Zeitraum, um diese Effekte auf die Impedanzänderung möglichst gering zu halten. Die Zellvereinzlung mittels Trypsin lässt einen gewissen Einfluss auf Oberflächenproteine nicht ausschließen. Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass die Zellen möglichst kurz dem Trypsin ausgesetzt waren und stets eine gewisse Erholungsphase vor Versuchsdurchführung bestand. Eine vollständiger turn over der Kanalproteine ist allerdings in dieser Zeitspanne nicht zu erwarten.

Die Patch-Clamp-Ableitungen erfolgen an einzelnen Zellen und hier an einem nur in bedingtem Maße frei wählbaren Membranabschnitt. Die mechanische Belastung sowie die höchst artifiziellen Versuchsbedingungen stellen vor allem in der „whole-cell“ Konfiguration eine entscheidende Veränderung der *in vivo* Bedingungen dar. Hier kommt es zu einer völligen Äquilibration des Zytosols mit der Pipettenlösung, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden hochgradig beeinflusst werden können, insbesondere die freie Kalziumkonzentration.

Immunoblots erlauben semiquantitative Aussagen über die Abundanz eines gewissen Proteins, vermittelt über die Bindung eines mehr oder weniger

spezifischen Antikörpers. Die Antikörperbindung richtet sich hier nie gegen das gesamte Protein, sondern lediglich gegen spezifische Abschnitte (Epitope). Im konkreten Fall lassen die verwendeten pan-phosphokinase und pan-kinase-Antikörper keine Differenzierung der CaMKII-Isoformen zu. Die Ergebnisse der Immunoblots erlauben Aussagen über chemische Modifikationen von Proteinen, wobei dies nicht zwangsläufig mit Proteinaktivität gleichgesetzt werden können.

In Kenntnis der Limitationen jeder einzelnen Methode ermöglicht letztlich nur die Zusammenschau eine Aussage über die Belastbarkeit der einzelnen Ergebnisse.

2.6. Abkürzungen

1p/19q	kurzer Arm Chromosom 1/langer Arm Chromosom 19
ATRX	“alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked”
BK	“big conductance“
c-Src	“ <u>c</u> ellular <u>sar</u> coma”
Ca²⁺	Kalziumion
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-abhängige Protein Kinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD95	“cluster of differentiation 95”
Cdc 42	“cell division control protein 42 homolog”
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cl⁻	Chloridion
ClC-3	Chloridkanal
CTV	“clinical target volume”
CXCL 12	“C-X-C motif chemokine 12”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED₅₀	mittlere effektive Dosis
EGF	“epidermal growth factor”
EGFR	“epidermal growth factor receptor”
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
E_K	Kalium-Gleichgewichtspotential
Erk	“extracellular-signal regulated kinase”
FLAIR	“fluid-attenuated inversion recovery”
GTP	Guanosintriphosphat
GTV	“gross tumor volume“
Gy	Gray, SI-Einheit
H⁺	Wasserstoffion
HEK293T	"Human Embryonic Kidney"
I	Strom
ICRU	“International Commission on Radiation Units and Measurements“

IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IK	“intermediate conductance“
IMRT	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
K⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
KN-93	Ca ²⁺ /calmodulin-abhängiger Protein Kinase II Inhibitor
M-Phase	Mitose-Phase
m²	Quadratmeter
mg	Milligramm
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
min	Minuten
mM	millimolar
mRNA	“messenger ribonucleic acid“
mTOR	“mechanistic Target of Rapamycin“
mV	Millivolt
n.s.	nicht signifikant
Na⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	“nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“
pA	pico Ampere
pA/pF	Stromdichte
pCaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-abhängige Protein Kinase II phosphoryliert
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pS	pico Siemens
QUANTEC	“Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic“
Ras	“rat sarcoma“
RCK	“regulator of Conductance of K ⁺ “
Rho	“ras homology“
RNA	“ribonucleic acid“
RNAi	“ribonucleic acid interference“

RT	Radiotherapie
SDS-PAGE	"sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
S-Phase	Synthese-Phase
SE	"standard error"
SK4	"small conductance 4"
SMAD	"small body size" & "mothers against decapentaplegic"
Src	" <u>sar</u> coma"
T	"time"
TBS	"Tris buffered saline"
TD₅₀	mittlere Toleranzdosis
TGF-β	"transforming growth factor β"
TIMP	"tissue inhibitor of metalloproteinases"
TMZ	Temozolomid
TP53	"tumor protein 53"
V	Spannung
WHO	World Health Organization
Z	Impedanz
ZNS	Zentralnervensystem
ZVD	Zielvolumendosis
μM	Mikromol

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in folgender Arbeit veröffentlicht:

Marc Steinle, Daniela Palme, Milan Misovic, Justine Rudner, Klaus Dittmann, Robert Lukowski, Peter Ruth, Stephan M. Huber.

Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K⁺ channels. Radiotherapy and Oncology 101 (2011) 122–126

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss ionisierender Strahlung auf die Migration von Glioblastomzellen. Im Besonderen mit Hinblick auf die Aktivierung der BK K⁺ Kanäle durch ionisierende Strahlung. Alle Untersuchungen erfolgten *in vitro* an den humanen Glioblastomzelllinien T98G und U87MG. Die Inhibition der BK Kanalaktivität erfolgte pharmakologisch mittels Paxillin. Der Versuchsaufbau ist so gewählt, dass zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen, sowie mit und ohne BK Kanalhemmung verglichen werden kann. Die Charakterisierung der Effekte ionisierender Strahlung auf zellulärer Ebene erfolgt mittels elektrophysiologischer Methoden, durch Proteinanalyse und Migrationsexperimente. Darüber hinaus wird, ebenfalls mittels pharmakologischer Inhibition durch KN-93, die Funktion der CaMKII im Rahmen der strahlungsinduzierten Migration untersucht.

3.1. Glioblastomzellen exprimieren funktionale BK Kanäle

Die für den Nachweis, der BK Kanal-abhängigen strahlungsinduzierten Migration, entscheidende und grundlegende Charakterisierung der Glioblastomzellen liegt im Nachweis der funktionalen Expression des BK Kanals. Diese elektrophysiologische Charakterisierung erfolgt mittels „Patch-Clamp“ Untersuchungen [99] an migrierenden T98G Glioblastomzellen. Wie eingangs ausführlich beschrieben unterscheidet sich der BK Kanal von den übrigen Kaliumkanälen seiner Familie durch entscheidende Merkmale. Zur Charakterisierung wird zum einen seine typische Strom-/Spannungskennlinie, seine Kalziumaktivierbarkeit und seine hohe Leitfähigkeit herangezogen. Darüber hinaus ist die spezifische pharmakologische Blockade durch Paxillin ein weiteres Charakteristikum und zu gleich ein wichtiger Nachweis der

funktionalen Blockade des Kanals und somit seines Einflusses auf das Membranpotential.

Die Membranströme einzelner migrierender T98G Zellen werden im „whole-cell“ Modus [100] unter annähernd physiologischen Kontrollbedingungen mit K⁺-reicher Pipettenlösung und Na⁺-reicher Badlösung durchgeführt. In allen untersuchten T98G Zellen sind durch depolarisierende Spannungssprünge zu Potentialen bis +100 mV nahezu keine auswärtsrektifizierenden Kaliumströme aktivierbar, welche typisch für eine BK Kanalaktivität wären (Abbildung 5 und 6A). Für den Nachweis der charakteristischen kalziumabhängigen Aktivierung der BK Kanäle wird mittels Ionomycin (4 μ M) die Plasmamembran für Kalziumionen permeabilisiert [101]. Die Messungen erfolgen wiederum in Na⁺-reicher Badlösung und K⁺-reicher Pipettenlösung. Nach Zugabe von Ionomycin zur Badlösung lassen sich mittels desselben Spannungsprotokolls ausgeprägte auswärtsrektifizierenden Kaliumströme detektieren (Abbildung 5 und 6A). Nach Zugabe von Paxillin (500 nM) zur Badlösung werden die Ionomycin-induzierten Ströme bei gleichem Spannungsprotokoll deutlich reduziert und nähern sich den Kontrollbedingungen an (Abbildung 5 und 6A). Bei Erreichen des Kaliumgleichgewichtspotentials von etwa -90 mV kommt es zu einer Stromumkehr der Ionomycin-induzierten Ströme (Abbildung 6A und 6B). Wird die NaCl- Badlösung durch KCl ausgetauscht, so verschiebt sich das Umkehrpotential des Stroms in Richtung des jetzt bestehenden Kaliumgleichgewichtspotentials von 0 mV (Abbildung 6A und 6B). Hiermit wurde gezeigt, dass es sich bei den durch Kalzium aktivierten Ströme um kaliumselektive Ströme handelt. Unter experimentellen Bedingungen mit K⁺-reicher Pipettenlösung und K⁺-reicher Badlösung zeigen sich eine für BK Kanäle typische Strom/Spannungsbeziehung mit einer ausgeprägten auswärtsgleichrichtenden Komponente (Abbildung 6A Rauten). Dies und die Tatsache, dass diese kalziumaktivierten Kaliumströme durch Paxillin gehemmt werden können, legen nahe, dass BK Kanäle für diese Ströme verantwortlich sind und somit funktional in den untersuchten T98G Zellen exprimiert werden. Der “on-cell” Modus ermöglicht die Ableitung einzelner Kanäle im Bereich der Pipette ohne die Zellintegrität zu beeinträchtigen. Mittels “on-cell” Messungen, im

Bereich des Zellheck migrierender T98G Zellen, können durch depolarisierende Spannungssprünge Leitfähigkeiten von nahezu 200 pS registriert werden (Abbildung 7A und 7B). In der Literatur werden Leitfähigkeiten von 200 pS typischer Weise für den BK Kanal beschrieben, was somit einen weiteren Hinweis für die funktionale Expression dieses Kanals in den untersuchten Zellen liefert. Legt man diese Leitfähigkeit zugrunde, so kann man, in Hinblick auf die durch Ionomycin induzierten Auswärtsströme (Abbildung 5, Mitte), von ungefähr 350 funktional exprimierten BK Kanälen pro Zelle ausgehen.

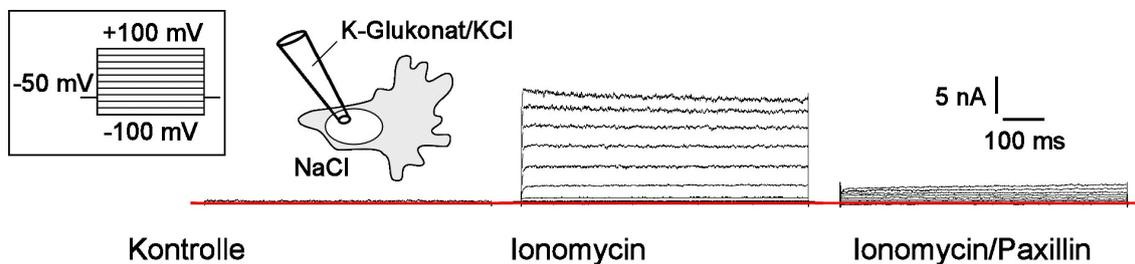


Abbildung 5: Exemplarische “whole-cell” Stromkurven einer repräsentativen T98G Zelle bei klassischem Spannungsprotokoll von -100 mV bis 100 mV Klemmspannung in 20 mV Schritten und 500 ms Dauer. Die Messungen erfolgten unter Kontrollbedingungen bei K⁺-reicher Pipettenlösung und Na⁺-reicher Badlösung mit anschließender Superfusion der Badlösung durch Ionomycin (4 μM) und letztlich der parallelen Applikation von Ionomycin (4 μM) und Paxillin (500 nM) zur Badlösung. Angabe der Stromstärke in nA und Zeit in ms. (modifiziert nach [102])

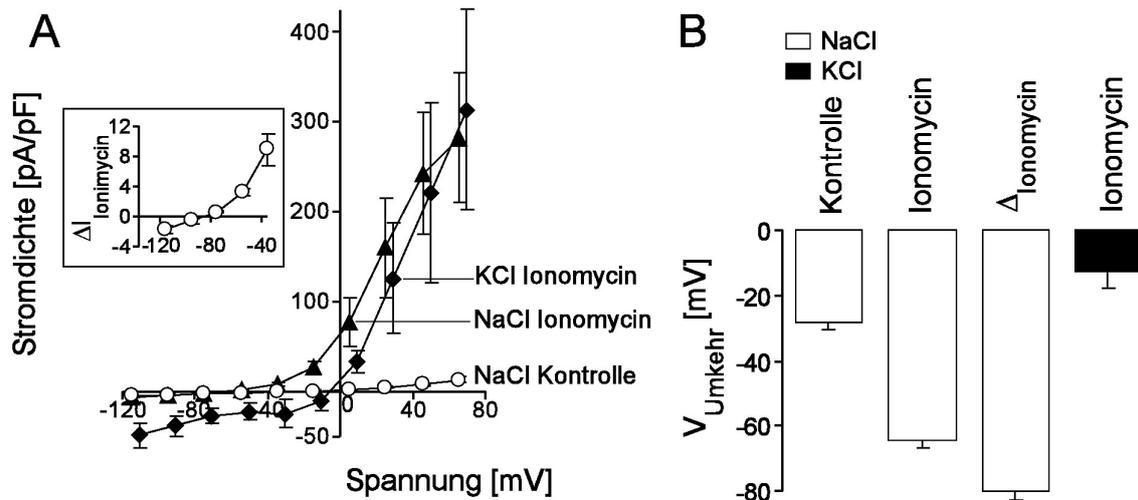


Abbildung 6 A und B: Ableitungen im „whole-cell“ Modus an T98G Zellen (\pm SE; $n=7-24$; das Spannungsprotokoll entspricht der Darstellung in Abbildung 3). **(A)** Mittlere Stromdichte/Spannungsbeziehung unter Kontrollbedingungen (offene Kreise), nach Superfusion mit Ionomycin ($4 \mu\text{M}$) (geschlossene Dreiecke) und nach Austausch der Badlösung durch KCl, ebenfalls Ionomycin ($4 \mu\text{M}$) enthaltend (geschlossene Rauten). **(B)** Mittlere Stromumkehrpotentiale unter Kontrollbedingungen (erster Balken), nach Superfusion mit Ionomycin ($4 \mu\text{M}$) in NaCl-Badlösung (zweiter Balken) beziehungsweise KCl-Badlösung (vierter Balken). Umkehrpotential der isolierten Ionomycin-induzierten Stromfraktion in NaCl-Badlösung entspricht dem dritten Balken. (modifiziert nach [102])

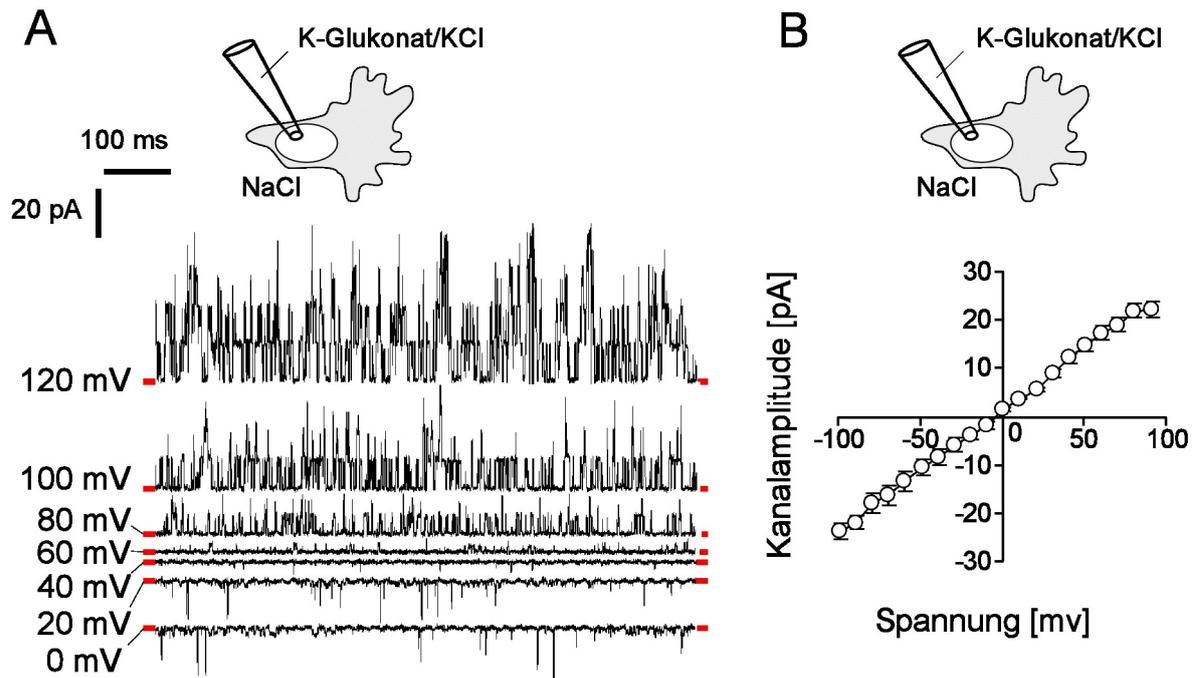


Abbildung 7 A und B: Ableitungen im „cell-attached“ Modus an T98G Zellen (\pm SE; $n=5-12$). **(A)** Exemplarische „cell-attached“ Stromkurven einer repräsentativen T98G Zelle bei einem Spannungsprotokoll von 0 mV bis 120 mV Klemmspannung in 20 mV Schritten und 500 ms Dauer.

(B) Mittlere Strom/Spannungsbeziehung der Messungen aus (A). Die angelegten Spannungen wurden um die physiologischen Membranpotentiale korrigiert. Die individuellen Membranpotentiale wurden über das Umkehrpotential der jeweiligen Kanalampplituden abgeschätzt. Alle Messungen erfolgten unter Kontrollbedingungen bei K^+ -reicher Pipettenlösung und Na^+ -reicher Badlösung. (modifiziert nach [102])

3.2. Ionisierende Strahlung induziert eine erhöhte BK Kanalaktivität

Die Beurteilung der durch ionisierende Strahlung induzierten BK Kanalaktivität erfolgt im „on-cell“ Modus im Vergleich zwischen T98G Zellen unter Kontrollbedingungen und nach einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy. Der „on-cell“ Modus wird gewählt, da hierbei die Zellintegrität erhalten bleibt und es zu keiner Beeinflussung des zellulären Kalziumsignaling kommt. Unter

Kontrollbedingungen ist lediglich bei depolarisierenden Spannungspulsen eine Aktivität der BK Kanäle zu detektieren (Abbildung 8A links). Im Gegensatz dazu ist nach Bestrahlung der T98G Zellen ein Öffnen des BK Kanals über das gesamte Spannungsprotokoll zu detektieren (Abbildung 8A rechts). Die Offenwahrscheinlichkeit (Abbildung 8B), ausgedrückt als Aktivität des BK Kanals, ist auffallend gesteigert nach Bestrahlung und weist auf substantielle BK Kanalaktivität im Bereich des physiologischen Ruhemembranpotentials hin. Die Höhe des Ruhemembranpotentials von etwa -40 mV leitet sich vom Umkehrpotential bestrahlter T98G Zellen ab (Abbildung 9D).

Für die nähere Charakterisierung der beobachteten Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit des BK Kanals erfolgt die Ableitung der Ströme im „whole-cell“ Modus, wiederum an T98G Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Bestrahlung mit 2 Gy. Im Gegensatz zum „on-cell“ Modus wird im „whole-cell“ Modus nahezu das gesamte zytosolische Kalzium durch EGTA der Pipettenlösung gepuffert. Hiermit ist es möglich zu unterscheiden, ob die Steigerung der Aktivität eine Folge der Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration, einer veränderten Kalzium- oder aber Spannungsabhängigkeit des BK Kanals darstellt. Unter diesen Bedingungen, mit gepuffertem zytosolischem Kalzium, ist kein substantieller Unterschied, in Bezug auf die abgeleiteten Ströme, zwischen T98G Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Bestrahlung auszumachen (Abbildung 9A und 9B). Dies legt nahe, dass die Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit der BK Kanäle, nach Bestrahlung, in der lokalen Zunahme der zytosolischen Kalziumkonzentration begründet ist. Allerdings kommt es nach Bestrahlung bei mäßig negativen Potentialen zu einem strahlungsinduzierten „whole-cell“ Kaliumausstrom (Abbildung 9A-C), was zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials zu etwa -10 mV, in Richtung Kaliumgleichgewichtspotential, führt (Abbildung 9B-D). Eine anschließend, durch Ionomycin (4 μ M) induzierte, Erhöhung des zytosolischen freien Kalziums führt zu einer vergleichbaren Aktivierung von BK „whole-cell“ Strömen, sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch in bestrahlten T98G Zellen (Abbildung 10A-C). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse der „whole-cell“ Untersuchungen, dass Bestrahlung keinen

Effekt auf die absolute Anzahl der aktivierbaren Kanäle hat. Die durch ionisierende Strahlung induzierte Verschiebung des Umkehrpotentials in Richtung Kaliumgleichgewichtspotential gibt den Anhalt um von einer strahlungsinduzierten Linksverschiebung der spannungsabhängigen BK Kanalaktivität auszugehen, was wiederum auf eine Aktivität des BK Kanals bei physiologischem Membranpotential hindeutet.

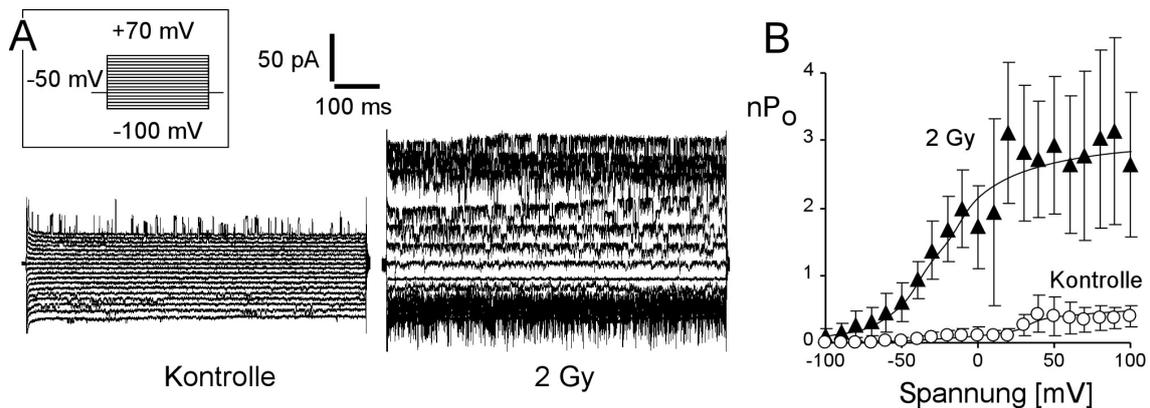


Abbildung 8 A: Exemplarische Stromkurve einer migrierenden T98G Zelle (Spannungsprotokoll (links oben) von -100 mV bis +120 mV in 20 mV Schritten mit jeweils einer Dauer von 800 ms) im “on-cell” Modus abgeleitet. Die Ableitungen erfolgen am Zellheck von T98G Zellen unter Kontrollbedingungen (links) und nach 2 Gy Strahlungs-dosis (rechts) jeweils mit K^+ -reicher Pipettenlösung und Na^+ -reicher Badlösung. (modifiziert nach [102]; Fig. 2 A)

(B) Abhängigkeit der mittleren Einzelkanal-Offenwahrscheinlichkeit ($\pm SE$, $n=4-8$) vom Haltepotential unter Kontrollbedingungen (offene Symbole) und nach 2 Gy Strahlungs-dosis (geschlossene Symbole; 4.3 ± 0.4 h nach Bestrahlung) in T98G Zellen. (modifiziert nach [102]; Fig. 2 B)

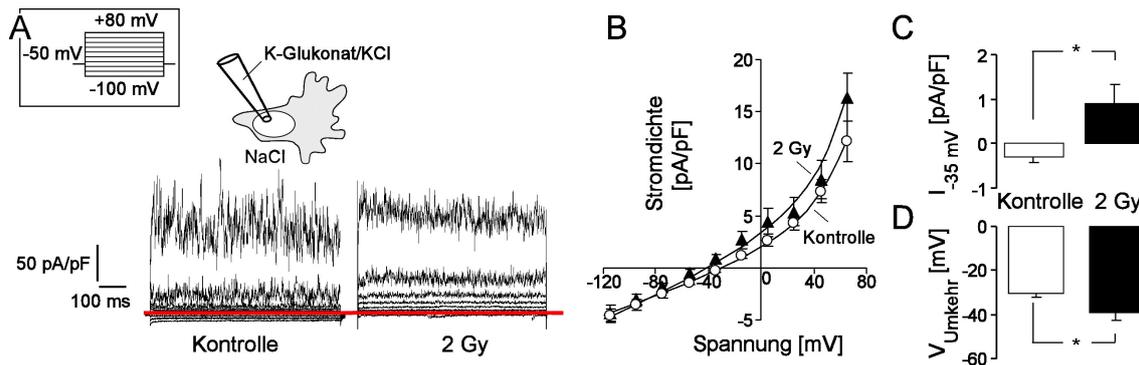


Abbildung 9 A, B, C und D

(A) Exemplarische Stromkurve einer migrierenden T98G Zelle (Spannungsprotokoll (links oben) von -100 mV bis +80 mV in 20 mV Schritten mit jeweils einer Dauer von 800 ms) im „whole-cell“ Modus abgeleitet. Die Ableitungen erfolgen am Zellheck von T98G Zellen unter Kontrollbedingungen (links) und nach 2 Gy Strahlungs dosis (rechts). (modifiziert nach [102]; Fig. 2 C)

(B) Mittlere Stromdichte/Spannungsbeziehung unter Kontrollbedingungen (offene Symbole) und nach 2 Gy Bestrahlung (geschlossene Symbole) abgeleitet von T98G Zellen im „whole-cell“ Modus. (modifiziert nach [102]; Fig. 2 D)

(C) Mittlere Stromdichte/Spannungsbeziehung bei -35 mV Haltepotential unter Kontrollbedingungen (offene Symbole) und nach 2 Gy Bestrahlung (geschlossene Symbole) abgeleitet von T98G Zellen im „whole-cell“ Modus (*: $p \leq 0.05$, Welch-corrected t-test). (modifiziert nach [102]; Fig. 2 E)

(D) Mittleres Umkehrpotential unter Kontrollbedingungen (offene Symbole) und nach 2 Gy Bestrahlung (geschlossene Symbole) abgeleitet von T98G Zellen im „whole-cell“ Modus (*: $p \leq 0.05$, Welch-corrected t-test). (modifiziert nach [102]; Fig. 2 F)

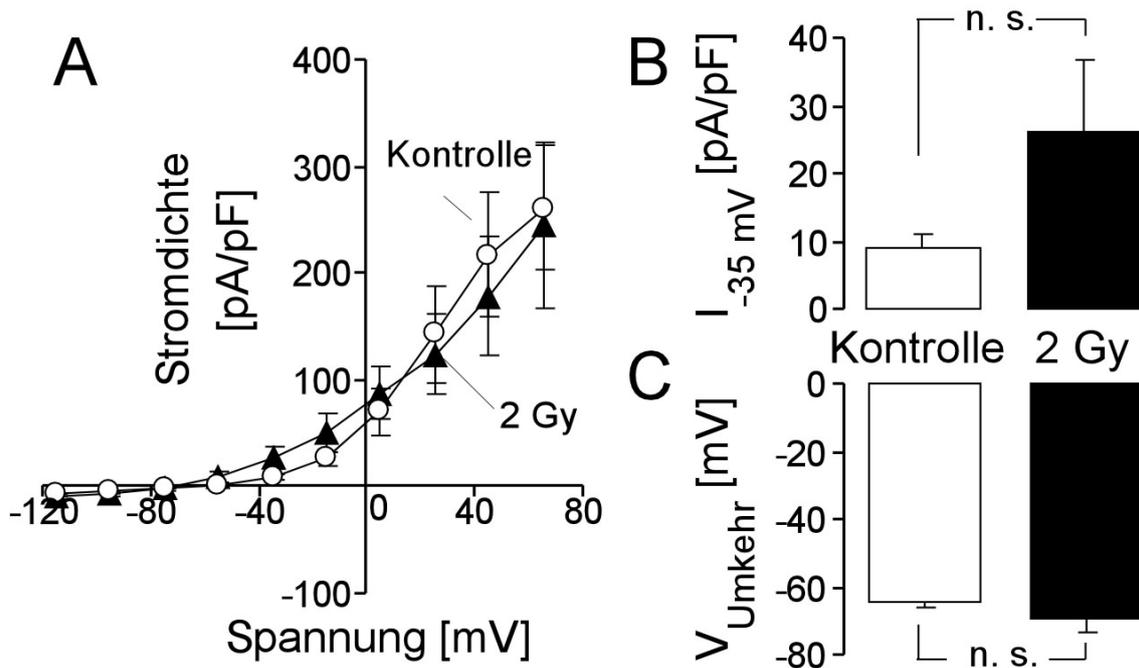


Abbildung 10 A, B und C

(A) Mittlere Stromdichte/Spannungsbeziehung unter Kontrollbedingungen (offene Symbole) und nach 2 Gy Bestrahlung (geschlossene Symbole) abgeleitet von T98G Zellen im „whole-cell“ Modus nach Zugabe von Ionomycin (4 μM). (modifiziert nach [102]; Fig. 2 G)

(B) Mittlere Stromdichte/Spannungsbeziehung bei -35 mV Haltepotential unter Kontrollbedingungen (offene Symbole) und nach 2 Gy Bestrahlung (geschlossene Symbole) abgeleitet von T98G Zellen im „whole-cell“ Modus nach Zugabe von Ionomycin (4 μM). (modifiziert nach [102]; Fig. 2 H)

(C) Mittleres Umkehrpotential unter Kontrollbedingungen (offene Symbole) und nach 2 Gy Bestrahlung (geschlossene Symbole) abgeleitet von T98G Zellen im „whole-cell“ Modus nach Zugabe von Ionomycin (4 μM). (modifiziert nach [102]; Fig. 2 I)

Ableitungen im “whole-cell” Modus erfolgen jeweils mit K^+ -reicher Pipettenlösung und Na^+ -reicher Badlösung (C-F, $n=22-24$) und nach Zugabe von Ionomycin (4 μM ; G-I; $n=11$). Die Messung der bestrahlten Zellen erfolgt 7.0 ± 1.3 Stunden nach der Bestrahlung. (*: $p \leq 0.05$, Welch-corrected t-test)

3.3. Strahlung induziert Migration in Abhängigkeit der BK Kanalaktivität

Die grundsätzlichen Untersuchungen zu Migration nach Bestrahlung und unter spezifischer pharmakologischer Blockade des BK Kanals werden mittels automatisiertem Transfiltermigrations-Verfahren durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen ist die Analyse der Migration der beiden untersuchten Glioblastomzelllinien, U87MG und T98G, im kontinuierlichen zeitlichen Verlauf möglich. Beide Zelllinien zeigen unter Kontrollbedingungen ein vergleichbares migratorisches Potential (Abbildung 11). Nach einer für Fraktionierungsschemata typischen Dosis von 2 Gy ist eine signifikante Zunahme der Migration beider Zelllinien zu beobachten (Abbildung 11). Ausgewertet wurde die Anstiegssteilheit der Impedanz (z)-Zunahme über die Zeit (Z Steigung) als Maß für die mittlere Migrationsgeschwindigkeit aller Zellen. Bei T98G Zellen zeigt sich darüber hinaus bereits bei einer Dosis von 0,5 Gy eine Zunahme der Migration im Vergleich zu den Bedingungen vor der Bestrahlung. Ab einer Dosis von 1 Gy wird die Zunahme der Migration bei T98G Zellen signifikant gesteigert im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12). Im zeitlichen Verlauf ist deutlich zu erkennen, dass die Zunahme der Migration nach Bestrahlung erst nach einer gewissen Zeit erfolgt. Innerhalb der ersten 80 Minuten kann kein Unterschied in der Migration der U87MG Zellen beobachtet werden. Anhand des Weiteren zeitlichen Verlaufs wird deutlich, dass die U87MG Zellen nach Bestrahlung schneller zur Migration angeregt werden (Abbildung 13). Die Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy steigert die Migration beider Zelllinien um 30 bis 50 Prozent. Die spezifische pharmakologische Blockierung des BK Kanals durch Paxillin führt in T98G und U87MG Zellen zu einer Reduktion der Migration (Abbildung 11). Zu beachten ist, dass die spezifische Blockierung des BK Kanals lediglich die, durch die Bestrahlung induzierte, gesteigerte Migration beider Zelllinien signifikant inhibiert. Paxillin zeigt in einer Konzentration von 5 μ M keinen Einfluss auf die basale Migration. Hiermit ergibt sich für die Hemmung der, durch 2 Gy induzierten, Migration von T98G Zellen ein IC_{50} für Paxillin von 1 μ M (Abbildung 14).

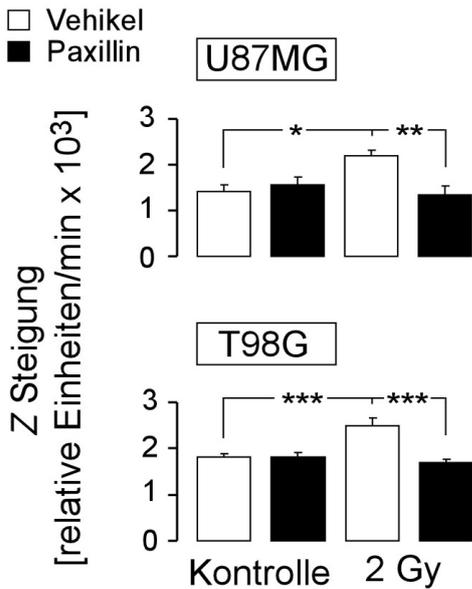


Abbildung 11: Die Migration von Glioblastomzelllinien ist durch ionisierende Strahlung stimulierbar und kann durch pharmakologische Blockade des BK Kanals gehemmt werden. Darstellung der mittleren (\pm SE) strahlungsinduzierten (2 Gy) Zunahme der Impedanz (Z slope) von U87MG (n=6-8, oben) und T98G Zellen (n=8-15, unten) ohne (offene Balken) und unter Zugabe von Paxillin (5 μ M, geschlossene Balken). (*; **; ***: $p \leq 0,05$; 0,01 und 0,001; ANOVA). (modifiziert nach [102]; Fig.1B)

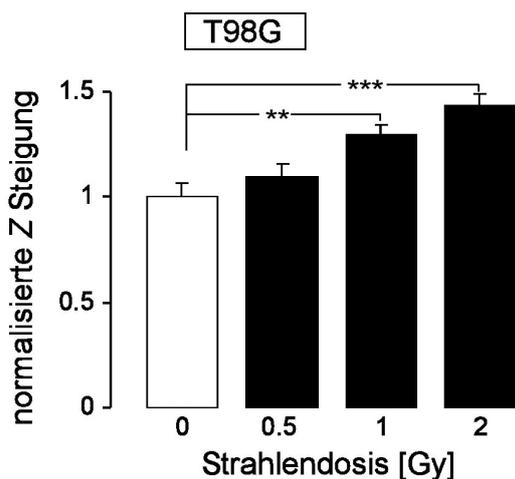


Abbildung 12: Die Migration von Glioblastomzellen ist durch ionisierende Strahlung dosisabhängig stimulierbar. Abhängigkeit der Zunahme der

Impedanz (Z Steigung normalisiert auf die nichtbestrahlte Kontrolle) von der Dosis der ionisierenden Strahlung (n=9-12). (*; **; ***: $p \leq 0,05$; 0,01 und 0,001; ANOVA). (modifiziert nach [102]; Fig.1C)

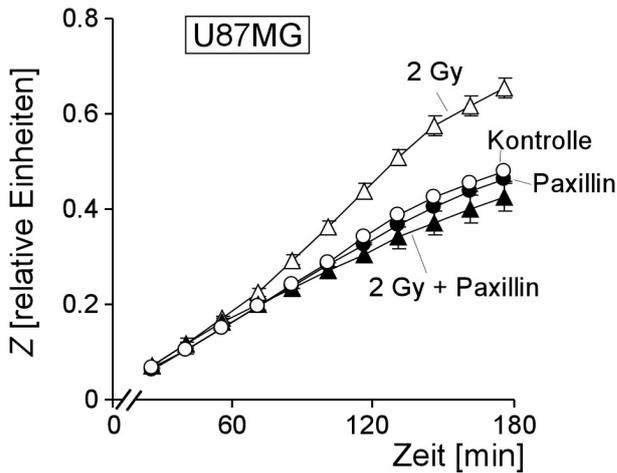


Abbildung 13: Die Migration von Glioblastomzellen ist durch ionisierende Strahlung stimulierbar und kann durch pharmakologische Blockade des BK Kanals gehemmt werden. Zeitlicher Verlauf der mittleren Impedanz (\pm SE, n=3-4) von U87MG Zellen unter Kontrollbedingungen (Kreise) und nach ionisierender Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy (Dreiecke) ohne (offene Symbole) und mit Zusatz von Paxillin (5 μ M, geschlossene Symbole). (modifiziert nach [102]; Fig.1A)

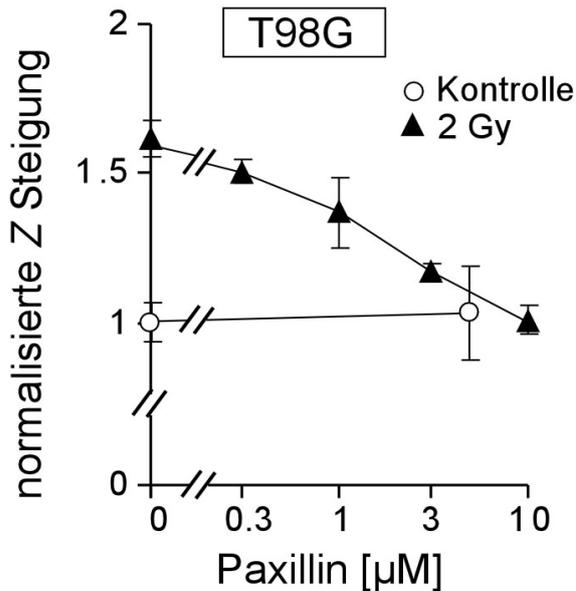


Abbildung 14: Die strahlungsinduzierte Migration kann durch pharmakologische Blockade des BK Kanals gehemmt werden. Konzentrationsabhängige Hemmung der normalisierten Impedanzänderung (\pm SE, n=3-4) bei steigender Konzentration von Paxillin (0,3 bis 10 μ M). U87MG Zellen unter Kontrollbedingungen (Kreise) und nach ionisierender Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy (Dreiecke). (modifiziert nach [102]; Fig.1D)

3.4. BK Kanal-abhängige Migration wird durch die CaMKII vermittelt

Ein für die Migration entscheidender intrazellulärer Schritt der Signaltransduktion nach ionisierender Bestrahlung besteht in der Aktivierung der Ca^{2+} /calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) (Abbildung 15 und 16). Die strahlungsinduzierte Aktivierung der CaMKII, die durch Autophosphorylierung an Thr286 angezeigt wird [103], ist BK Kanal-abhängig und zwingende Voraussetzung für die strahlungsinduzierte Migration. Diese Daten sind die konsequente Ergänzung zu den bereits erläuterten Ergebnissen, die zeigen, dass ionisierende Strahlung in typischer Dosierung die Aktivität der BK Kanäle erhöht und es hierdurch zu einer Steigerung der Migration der Glioblastomzellen kommt. Die strahlungsinduzierte BK Kanalaktivität führt zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran und hierdurch zu einer Modulation der zytosolischen Kalziumkonzentration [104], wobei der genaue Mechanismus

dieser Modulation noch geklärt werden muss. Die Aktivierung der CaMKII durch zytosolisches Ca^{2+} und ihr hierdurch vermittelter Einfluss auf die Migration wurde bereits gezeigt [105]. In Zellen der T98G Glioblastomzelllinie kann eine deutliche basale Proteinexpression von CaMKII nachgewiesen werden. Die absolute Proteinkonzentration von CaMKII ist nach Bestrahlung mit 2 Gy Einzeldosis vergleichbar mit der Konzentration unter Kontrollbedingungen ohne Bestrahlung (Abbildung 15). Die Blockade des BK Kanals durch Paxillin hat ebenfalls weder unter Kontrollbedingungen noch nach 2 Gy Einzeldosis einen Einfluss auf die Proteinkonzentration der CaMKII (Abbildung 15). Darüber hinaus kann gezeigt werden, dass es nach Bestrahlung mit 2 Gy Einzeldosis zu einer Phosphorylierung des Threonin 286 (Thr 286) der CaMKII kommt, wobei diese Phosphorylierung mit der Aktivierung der CaMKII gleichzusetzen ist [103]. Unter Kontrollbedingungen kann in keinem Fall eine Phosphorylierung an Thr 286 nachgewiesen werden (Abbildung 15). Entscheidend ist hierbei, dass die selektive pharmakologische Blockierung des BK Kanals mit Paxillin die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der CaMKII nach Bestrahlung mit 2 Gy Einzeldosis komplett verhindert (Abbildung 15). Transfilter-Migrationsanalysen zeigen die funktionelle Relevanz der BK Kanal-abhängigen CaMKII Aktivierung für die strahlungsinduzierte Migration der Glioblastomzellen. Im zeitlichen Verlauf ist deutlich zu erkennen, dass die Zunahme der Migration nach Bestrahlung erst nach einer gewissen Zeit erfolgt. Innerhalb der ersten 30 Minuten kann kein signifikanter Unterschied in der Migration der T98G Zellen beobachtet werden. Anhand des Weiteren zeitlichen Verlaufs wird deutlich, dass die T98G Zellen nach Bestrahlung zu einer initial beschleunigten Migration angeregt werden (Abbildung 16A). Die spezifische pharmakologische Inhibition der Phosphorylierung und somit der Aktivierung der CaMKII durch KN-93 führt in T98G Zellen zu einer Reduktion der Migration (Abbildung 16A). Zu beachten ist, dass die spezifische Blockierung ausschließlich die durch die Bestrahlung induzierte gesteigerte Migration signifikant inhibiert (Abbildung 16A und B). Die basale Migration der T98G Zellen bleibt von der KN-93 vermittelten CaMKII Inhibition unbeeinflusst (Abbildung 16A und B).

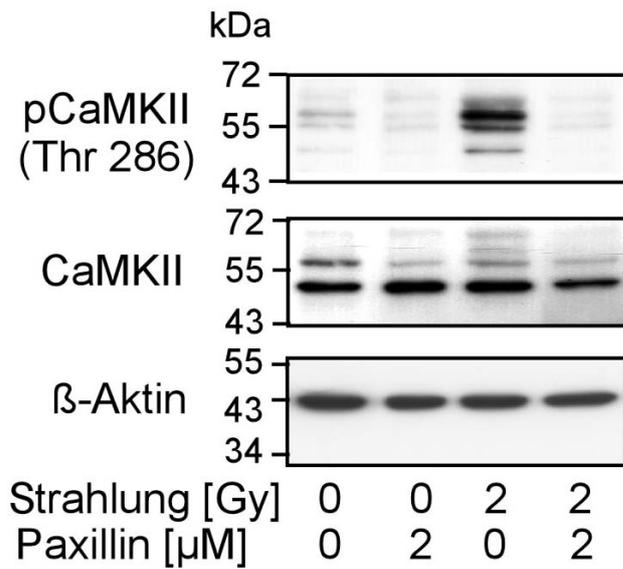


Abbildung 15: Die strahlungsinduzierte Aktivierung der CaMKII ist abhängig von der BK Kanalaktivität. Gezeigt sind T98G-Ganzzelllysate ohne Bestrahlung (Reihe 1 und 2) und nach 2 Gy Einzeldosisbestrahlung (Reihe 3 und 4) jeweils mit (Reihe 2 und 4) und ohne Paxillin (Reihe 1 und 3). Reihe 1 und 3 stellt die Paxillin-Vehikel-Kontrolle dar. Die Detektion der Proteinkonzentrationen erfolgt mittels Antikörper gegen phospho-CaMKII (Thr 286) (oben), Gesamt CaMKII (Mitte) und β-Aktin (unten). (modifiziert nach [102]; Fig.3A)

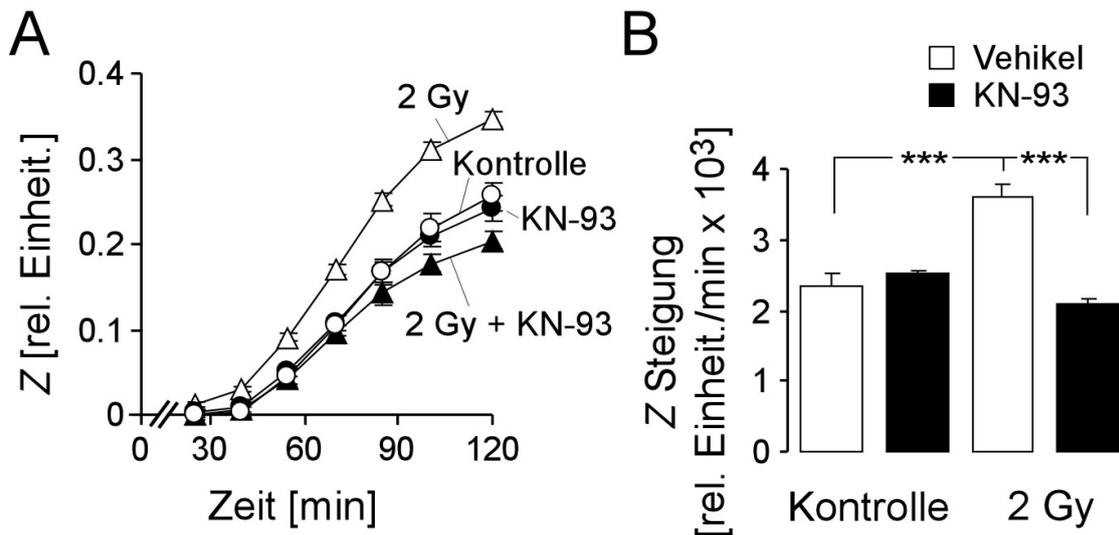


Abbildung 16: Die strahlungsinduzierte Migration von Glioblastomzellen ist abhängig von der BK-Kanal-abhängigen Aktivierung der CaMKII. **(A)** Zeitlicher Verlauf der mittleren Impedanz (\pm SE, $n=3-8$) von T98G Zellen unter Kontrollbedingungen (Kreise) und nach ionisierender Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy (Dreiecke) ohne (offene Symbole) und mit Zusatz von KN-93 (3 μ M, geschlossene Symbole). **(B)** Darstellung der mittleren (\pm SE) strahlungsinduzierten (2 Gy) Zunahme der Impedanz (Z slope) von T98G Zellen ($n = 3-8$) ohne (offene Balken) und unter Zugabe von KN-93 (3 μ M, geschlossene Balken). (***: $p \leq 0,001$; ANOVA). (modifiziert nach [102]; Fig.3B, C)

4. Diskussion

Das Glioblastom zeichnet sich charakteristischer Weise durch eine diffuse Infiltration des Gehirns aus und stellt hierdurch eine entscheidende Herausforderung für die Therapie dar. In Hinblick auf die sehr hohen Rezidivraten ergeben sich noch viele offene Fragen zur optimalen Therapie beziehungsweise Therapieführung. Die strahlungsinduzierte Migration stellt ein kontrovers diskutiertes Thema dar. Einerseits trägt die Strahlentherapie im Rahmen der Therapie des Glioblastoms neben der Neurochirurgie und medikamentöser Therapien entscheidend zu einer Verlängerung des Überlebens bei. In Übereinstimmung mit Untersuchungen anderer [18, 19] konnte mit dieser Arbeit allerdings gezeigt werden, dass es durch Strahlentherapie möglicherweise zu einer weiteren Unterstützung der diffusen Infiltration des Hirnparenchyms kommen kann. Die meisten Rezidive nach Resektion und Strahlentherapie entstehen innerhalb des CTV, allerdings entsteht bei etwa zwanzig Prozent der Patienten ein Rezidiv innerhalb des Sicherheitssaums beziehungsweise weiter entfernt. Somit liegt es nahe, dass strahlungsinduzierte Migration aus dem CTV zu diesem Phänomen beitragen könnte. Eine aktuelle Arbeit konnte zeigen, dass eine pharmakologische Inhibition von Kv1.3 *in vitro* zur Apoptose von Glioblastomzellen führt, wobei dies im othotopen Tumormausmodell nicht reproduzierbar war [106].

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass strahlungsinduzierte Migration in Abhängigkeit der BK Kanalaktivität stattfindet. Ionenkanäle der Plasmamembran sind nachgewiesenermaßen Zielstrukturen, welche durch ionisierende Strahlung in ihren Kanaleigenschaften modifiziert werden [107]. Ionisierende Strahlung führt zu Lipidperoxidation welche über die Bildung von Hydroxynonenal zu einer Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase c-Src beiträgt [44], welche über Phosphorylierung der alpha- beziehungsweise beta-Untereinheiten modulierend auf den BK Kanal und seine Leitungseigenschaften einwirkt [77, 108, 109]. Dieser Signalweg stellt einen möglichen Mechanismus dar, wie es durch ionisierende Strahlung zu der in dieser Arbeit gezeigten Steigerung der BK Kanalaktivität der Glioblastomzellen kommt.

Es wurde bereits gezeigt, dass ein nachhaltiger Kalziumeinstrom über sogenannte „store-operated“ Kalziumkanäle, wie beispielsweise CRAC, sehr stark von der parallelen Aktivität kalziumabhängiger Kaliumkanäle abhängt, welche als Gegenspieler zu der durch den Kalziumeinstrom vermittelten Depolarisation agieren [110]. Andererseits bedingt die, durch Kaliumkanäle vermittelte, Hyperpolarisation der Plasmamembran möglicherweise einen verminderten Einstrom von Kalzium über Transmembrankanäle wie TRPM8, welche ihre größte Aktivität bei eher depolarisierten Membranpotentialen aufweisen [111]. Die Expression des TRPM8-Rezeptor in Glioblastomzellen wurde bereits gezeigt, wobei über Agonisten am TRPM8-Rezeptor eine Modulation der Migration von Glioblastomzellen möglich war [112, 113]. Demzufolge könnte über die Aktivität des BK Kanals, in Zusammenspiel mit den jeweiligen Kalziumkanälen, sowohl der Einstrom von Kalzium in die Zelle aufrechterhalten, als auch der Kalziumeinstrom reduziert werden.

Die intrazelluläre Kalziumhomöostase ist ein sehr genau reguliertes Mikromilieu, wobei die Regulation sowohl auf zeitlicher, als auch lokaler Ebene erfolgt [114]. Die nachhaltige Regulation erfolgt über Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration, Kalziumtransienten, sowie über frequenz-beziehungsweise amplitudenregulierte Kalziumoszillationen [115]. Die CaMKII stellt einen bedeutenden Sensor und Vermittler dieser Kalziumsignale dar. Vier Gene und multiple Splicevarianten dieser kalziumabhängigen Kinase ermöglichen eine hohe Spezifität für diese unterschiedlichsten Kalziumsignale [116]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch ionisierende Strahlung stimulierte Aktivierung der CaMKII eine Aktivierung des BK Kanals voraussetzt. Es ist gut vorstellbar, dass eine strahlungsinduzierte BK Kanalaktivität erforderlich ist, um Kalziumsignale zu generieren beziehungsweise aufrecht zu erhalten. Diese BK Kanalaktivität stellt somit eine notwendige Voraussetzung für die Aktivität einzelner CaMKII Isoformen dar.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit, dass die BK Kanalaktivierung und die sich anschließende BK abhängige CaMKII

Aktivierung einen wesentlichen und entscheidenden Signalweg in der strahlungsinduzierten Migration der Glioblastomzellen darstellen.

In Hinblick auf eine therapeutische Beeinflussung beziehungsweise Hemmung der strahlungsinduzierten Migration, mit dem Ziel der Senkung der Rezidivraten, stellt das hier verwendete Paxillin eine durchaus denkbare Therapieoption dar. Grundsätzlich zeichnet sich Paxillin durch eine sehr spezifische BK Kanalinhibition im Bereich nanomolarer Konzentrationen aus. Darüber hinaus überwindet das aus dem Pilz *Penicillium paxilli* isolierte Paxillin die Blut-Hirn-Schranke, was sich im Rahmen der Weidelgrastaumelkrankheit bei Schafen in Form von Ataxie und Tremor zeigt [117]. Wie bereits erwähnt stellen Ionenkanäle Zielstrukturen ionisierender Strahlung dar, woraus sich die logische Konsequenz ergibt, dass die pharmakologische Beeinflussung weitere Kanäle in Hinblick auf ihre antitumorale Wirkung untersucht werden sollten. Eine fraktionierte Radiatio, wie es klinischer Standard ist, kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht adressiert werden. Die Situation bei der fraktionierten Bestrahlung kann nicht 1:1 mit dem verwendeten Versuchsaufbau imitiert werden. Die Migrationsexperimente ermöglichen nur begrenzte weiterführenden Aussagen bezüglich Invasion, welche der eigentlichen *in vivo* Situation eher entspricht. Bei der hier untersuchten Migration wandern die Zellen durch präformierte Öffnungen, was eine gewisse zelluläre Formänderung notwendig macht, allerdings nur bedingt mit der *in vivo* Situation vergleichbar ist, bei der ein bestehender Zellverband ein Hindernis für die weitere Ausbreitung darstellt. Die Limitationen der etablierten Zelllinien in Hinblick auf molekulare Adaptation aufgrund multipler Passagen legen nahe, dass Primärkulturen aus frischem Tumorgewebe etabliert werden sollten. Dies ermöglicht den Aufbau einer breiten Zelldatenbank und die Korrelation mit dem klinischen Verlauf des Patienten. In weiterführenden Arbeiten sollte ein dreidimensionaler Zellkulturansatz angestrebt werden, um die komplexen Zellinteraktionen besser abbilden zu können. Darüberhinaus bleiben in Zellkulturen das komplexe Mikroenvironment, sowie der Einfluss des Immunsystems nahezu völlig unbeachtet.

In wieweit Fraktionierung und moderne Bestrahlungstechniken wie IMRT, mit dem damit einhergehenden „low dose bath“, eine relevante Rolle für strahlungsinduzierte Migration spielen bedarf weiterer *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen.

Inzwischen konnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im orthotopen Glioblastommodell bestätigt werden [118]. In dieser Nachfolgearbeit wurden die orthotopen Tumore fraktioniert bestrahlt und mit spezifischen BK Kanal-Inhibitoren systemisch behandelt. Hierbei bestätigte sich zum einen die strahlungsinduzierte Hyper-Migration/Invasion der Glioblastomzellen und andererseits die Blockierbarkeit der Hyper-Migration durch BK Kanal-Targeting. Genetische Tumormodelle könnten den Einfluss des Immunsystems darüberhinaus in die weiteren Betrachtungen einbeziehen.

Interessanterweise befinden sich Medikamente mit BK-Kanal modulatorischen Eigenschaften in breiter klinischer Anwendung. Klassische Neuroleptika wie Haloperidol oder Chlorpromazin inhibieren BK Kanäle mit einer IC50 im niedrigen mikromolaren Bereich [119]. Es wurde darüberhinaus nachgewiesen, dass Haloperidol im menschlichen Gehirn im Bereich von mikromolaren Konzentrationen akkumuliert [120], bei Chlorpromazin wird von noch höheren Konzentrationen ausgegangen [121], was eine Beeinflussung der BK Kanalaktivität im Bereich der therapeutischen Dosierungen nahelegt.

Letztlich sollte die Korrelation zwischen *in vitro*, *in vivo* und dem klinischen Verlauf einzelner Patienten das entscheidende Ziel der weiteren Forschung darstellen, als Vorarbeiten für prospektive, randomisierte, placebokontrollierte klinische Studien.

Die Strahlentherapie ist aus der Therapie des Glioblastoms nicht wegzudenken. Die Erkenntnisse aus den hier gezeigten Untersuchungen zeigen welche komplexe zelluläre und biochemische Mechanismen nach ionisierender Strahlung zu beobachten sind und dienen möglicherweise zur Optimierung der Strahlentherapie, sowie dem klinischen Einsatz spezifischer Kanalinhhibitoren.

5. Zusammenfassung

Das Glioblastom stellt eine besondere therapeutische Herausforderung dar, da hier auch bei vermeintlich unifokalem Auftreten bereits eine diffuse Infiltration des Hirnparenchyms vorliegt, was eine klare Abgrenzung zwischen Hirngewebe und Tumor nahezu unmöglich macht [5]. Die starke Invasion in das angrenzende Parenchym und das netzartige, in der Bildgebung schlecht darstellbare und abzugrenzende Ausbreiten der Glioblastomzellen machen daher eine vollständige chirurgische Resektion oft unmöglich [6]. Die aktuelle multimodale interdisziplinäre Therapie besteht aus Neurochirurgie, Neuroonkologie und Strahlentherapie. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses ionisierender Strahlung auf die Migration von Glioblastomzellen. Im Speziellen soll geklärt werden, ob strahlungsinduzierte BK Kanalaktivität einen Einfluss auf die *in vitro* Migration von Glioblastomzellen hat. Alle Untersuchungen erfolgen *in vitro* an den humanen Glioblastomzelllinien T98G und U87MG. Zunächst erfolgt mittels elektrophysiologischer Methoden die Charakterisierung der verwendeten Zellen in Hinblick auf ihre funktionelle Expression des BK Kanals. Ableitungen einzelner migrierender T98G Zellen zeigen im „whole-cell“ Modus kalziumabhängige auswärtsgleichrichtende Kaliumströme, welche durch Paxillin gehemmt werden können. Des Weiteren lassen sich im „on-cell“ Modus Leitfähigkeiten von nahezu 200 pS detektieren. Diese Ergebnisse lassen auf eine funktionelle BK Kanalaktivität schließen. Eine Bestrahlungsdosis von 2 Gy führt zu einer Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit der BK Kanäle im Vergleich zu BK Kanälen unbestrahlter Zellen. Die Untersuchung der Migration erfolgte mittels eines automatisierten Transfiltermigrations-Verfahrens, womit es möglich ist den kontinuierlichen Verlauf der Migration zu analysieren. Bei steigender Strahlungsdosis ist eine Zunahme der Migration der Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Zellen zu beobachten. Die IC_{50} von Paxillin liegt bei 1 μ M für die Hemmung der strahlungsinduzierten Migration, bei für klassische Fraktionierungsschemata üblichen Dosen von 2 Gy. Hieraus lässt sich schließen, dass die strahlungsinduzierte BK Kanalaktivität die Steigerung der Migration nach Bestrahlung vermittelt. Die BK Kanalaktivität ist eng in die

Regulation der zellulären Kalziumhomöostase eingebunden. Zum einen wird der Kanal unter anderem durch Kalzium aktiviert und über seine Beeinflussung des Membranpotentials wirkt er modifizierend auf die Aktivität verschiedener Kalziumkanäle. Im Besonderen ist zu beobachten, dass die BK Kanal-abhängige Migration durch die CaMKII vermittelt wird. Paxillin unterdrückt die strahlungsinduzierte Phosphorylierung der CaMKII. Darüber hinaus führt eine pharmakologische Inhibierung der CaMKII ebenfalls zu einer Hemmung der strahlungsinduzierten Migration. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass ionisierende Strahlung in Abhängigkeit der BK Kanalaktivität die Migration von Glioblastomzellen *in vitro* steigert. Die Strahlentherapie ist aktuell ein fundamentaler Bestandteil der Behandlung von Patienten mit Glioblastom und führt, trotz infauster Prognose, zu einer deutlichen Steigerung des Gesamtüberlebens. Die hier gewonnenen Erkenntnisse legen einen Grundstein für eine mögliche Optimierung der Strahlentherapie und identifiziert den BK Kanal als mögliche Zielstruktur, um die strahlungsinduzierte Migration pharmakologisch zu hemmen.

6. Literaturverzeichnis

1. Schneider, T., et al., *Gliomas in adults*. Dtsch Arztebl Int, 2010. **107**(45): p. 799-807; quiz 808.
2. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.
3. Sanson, M., et al., *Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas*. J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4150-4.
4. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
5. Niyazi, M., et al., *FET-PET for malignant glioma treatment planning*. Radiother Oncol, 2011. **99**(1): p. 44-8.
6. Teodorczyk, M. and A. Martin-Villalba, *Sensing invasion: cell surface receptors driving spreading of glioblastoma*. J Cell Physiol, 2010. **222**(1): p. 1-10.
7. Seystahl, K., W. Wick, and M. Weller, *Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **99**: p. 389-408.
8. Ewelt, C., et al., *Glioblastoma multiforme of the elderly: the prognostic effect of resection on survival*. J Neurooncol, 2011. **103**(3): p. 611-8.
9. McGirt, M.J., et al., *Association of surgically acquired motor and language deficits on overall survival after resection of glioblastoma multiforme*. Neurosurgery, 2009. **65**(3): p. 463-9; discussion 469-70.
10. Malmstrom, A., et al., *Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(9): p. 916-26.
11. Wick, W., et al., *Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(7): p. 707-15.
12. Perry, J.R., et al., *Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma*. N Engl J Med, 2017. **376**(11): p. 1027-1037.
13. Niyazi, M., et al., *ESTRO-ACROP guideline "target delineation of glioblastomas"*. Radiother Oncol, 2016. **118**(1): p. 35-42.
14. Aydin, H., I. Sillenber, and H. von Lieven, *Patterns of failure following CT-based 3-D irradiation for malignant glioma*. Strahlenther Onkol, 2001. **177**(8): p. 424-31.
15. Chang, E.L., et al., *Evaluation of peritumoral edema in the delineation of radiotherapy clinical target volumes for glioblastoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **68**(1): p. 144-50.
16. Gaspar, L.E., et al., *Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992. **24**(1): p. 55-7.
17. Sijben, A.E., et al., *Toxicity from chemoradiotherapy in older patients with glioblastoma multiforme*. J Neurooncol, 2008. **89**(1): p. 97-103.

18. Park, C.M., et al., *Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways*. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8511-9.
19. Wild-Bode, C., et al., *Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma*. *Cancer Res*, 2001. **61**(6): p. 2744-50.
20. Pajonk, F., E. Vlashi, and W.H. McBride, *Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited*. *Stem Cells*, 2010. **28**(4): p. 639-48.
21. Maftai, C.A., et al., *Changes in the fraction of total hypoxia and hypoxia subtypes in human squamous cell carcinomas upon fractionated irradiation: evaluation using pattern recognition in microcirculatory supply units*. *Radiother Oncol*, 2011. **101**(1): p. 209-16.
22. Pawlik, T.M. and K. Keyomarsi, *Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004. **59**(4): p. 928-42.
23. Withers, H.R., *Cell cycle redistribution as a factor in multifraction irradiation*. *Radiology*, 1975. **114**(1): p. 199-202.
24. Marks, L.B. and M. Dewhirst, *Accelerated repopulation: friend or foe? Exploiting changes in tumor growth characteristics to improve the "efficiency" of radiotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1991. **21**(5): p. 1377-83.
25. Brown, J.M., D.J. Carlson, and D.J. Brenner, *The tumor radiobiology of SRS and SBRT: are more than the 5 Rs involved?* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014. **88**(2): p. 254-62.
26. Stock, C. and A. Schwab, *Protons make tumor cells move like clockwork*. *Pflugers Arch*, 2009. **458**(5): p. 981-92.
27. Schwab, A., et al., *Cells move when ions and water flow*. *Pflugers Arch*, 2007. **453**(4): p. 421-32.
28. Habela, C.W., et al., *Chloride accumulation drives volume dynamics underlying cell proliferation and migration*. *J Neurophysiol*, 2009. **101**(2): p. 750-7.
29. Sontheimer, H., *An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008. **233**(7): p. 779-91.
30. McCoy, E. and H. Sontheimer, *Expression and function of water channels (aquaporins) in migrating malignant astrocytes*. *Glia*, 2007. **55**(10): p. 1034-43.
31. McCoy, E.S., B.R. Haas, and H. Sontheimer, *Water permeability through aquaporin-4 is regulated by protein kinase C and becomes rate-limiting for glioma invasion*. *Neuroscience*, 2009.
32. Ransom, C.B., J.T. O'Neal, and H. Sontheimer, *Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells*. *J Neurosci*, 2001. **21**(19): p. 7674-83.
33. Olsen, M.L., et al., *Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells*. *J Neurosci*, 2003. **23**(13): p. 5572-82.
34. McFerrin, M.B. and H. Sontheimer, *A role for ion channels in glioma cell invasion*. *Neuron Glia Biol*, 2006. **2**(1): p. 39-49.

35. Ransom, C.B. and H. Sontheimer, *BK channels in human glioma cells*. J Neurophysiol, 2001. **85**(2): p. 790-803.
36. Weaver, A.K., V.C. Bomben, and H. Sontheimer, *Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells*. Glia, 2006. **54**(3): p. 223-33.
37. Fioretti, B., et al., *Expression and modulation of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in glioblastoma GL-15 cells*. Cell Physiol Biochem, 2006. **18**(1-3): p. 47-56.
38. Catacuzzeno, L., et al., *Serum-activated K and Cl currents underlay U87-MG glioblastoma cell migration*. J Cell Physiol, 2010.
39. Sciacaluga, M., et al., *CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(1): p. C175-84.
40. Camphausen, K., et al., *Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2207-11.
41. Qian, L.W., et al., *Radiation-induced increase in invasive potential of human pancreatic cancer cells and its blockade by a matrix metalloproteinase inhibitor, CGS27023*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(4): p. 1223-7.
42. Tabatabai, G., et al., *Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12*. Brain, 2006. **129**(Pt 9): p. 2426-35.
43. Cordes, N., et al., *Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines*. Br J Cancer, 2003. **89**(11): p. 2122-32.
44. Dittmann, K., et al., *Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport*. Radiother Oncol, 2009. **92**(3): p. 379-82.
45. Fulda, S., et al., *Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells*. Cell Death Differ, 1998. **5**(10): p. 884-93.
46. Sheard, M.A., S. Uldrijan, and B. Vojtesek, *Role of p53 in regulating constitutive and X-radiation-inducible CD95 expression and function in carcinoma cells*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7176-84.
47. Streffer, J.R., et al., *Irradiation induced clonogenic cell death of human malignant glioma cells does not require CD95/CD95L interactions*. Anticancer Res, 1999. **19**(6B): p. 5265-9.
48. Kleber, S., et al., *Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma*. Cancer Cell, 2008. **13**(3): p. 235-48.
49. Barnhart, B.C., et al., *CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells*. Embo J, 2004. **23**(15): p. 3175-85.
50. Satoh, E., et al., *Effect of irradiation on transforming growth factor-beta secretion by malignant glioma cells*. J Neurooncol, 1997. **33**(3): p. 195-200.
51. Shao, C., M. Folkard, and K.M. Prise, *Role of TGF-beta1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells*. Oncogene, 2008. **27**(4): p. 434-40.

52. Shao, C., K.M. Prise, and M. Folkard, *Signaling factors for irradiated glioma cells induced bystander responses in fibroblasts*. *Mutat Res*, 2008. **638**(1-2): p. 139-45.
53. Merzak, A., et al., *Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1*. *Br J Cancer*, 1994. **70**(2): p. 199-203.
54. Nakano, A., et al., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas*. *J Neurosurg*, 1995. **83**(2): p. 298-307.
55. Wesolowska, A., et al., *Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor*. *Oncogene*, 2008. **27**(7): p. 918-30.
56. Jenkinson, D.H., *Potassium channels--multiplicity and challenges*. *Br J Pharmacol*, 2006. **147 Suppl 1**: p. S63-71.
57. Jensen, M.O., et al., *Principles of conduction and hydrophobic gating in K⁺ channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(13): p. 5833-8.
58. Sandhiya, S. and S.A. Dkhar, *Potassium channels in health, disease & development of channel modulators*. *Indian J Med Res*, 2009. **129**(3): p. 223-32.
59. Kohler, M., et al., *Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain*. *Science*, 1996. **273**(5282): p. 1709-14.
60. Joiner, W.J., et al., *hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 11013-8.
61. Ishii, T.M., et al., *A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(21): p. 11651-6.
62. Cui, J., D.H. Cox, and R.W. Aldrich, *Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K⁺ channels*. *J Gen Physiol*, 1997. **109**(5): p. 647-73.
63. Meera, P., et al., *Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 14066-71.
64. Kaczorowski, G.J., et al., *High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function*. *J Bioenerg Biomembr*, 1996. **28**(3): p. 255-67.
65. Quirk, J.C. and P.H. Reinhart, *Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K(ca) channels*. *Neuron*, 2001. **32**(1): p. 13-23.
66. Zhou, Y. and C.J. Lingle, *Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism*. *J Gen Physiol*, 2014. **144**(5): p. 415-40.
67. Ramanathan, K. and P.A. Fuchs, *Modeling hair cell tuning by expression gradients of potassium channel beta subunits*. *Biophys J*, 2002. **82**(1 Pt 1): p. 64-75.

68. Adelman, J.P., et al., *Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs*. *Neuron*, 1992. **9**(2): p. 209-16.
69. Yusifov, T., et al., *The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(1): p. 376-81.
70. Wei, A., T. Jegla, and L. Salkoff, *Eight potassium channel families revealed by the C. elegans genome project*. *Neuropharmacology*, 1996. **35**(7): p. 805-29.
71. Wei, A., et al., *Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain*. *Neuron*, 1994. **13**(3): p. 671-81.
72. Xia, X.M., X. Zeng, and C.J. Lingle, *Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels*. *Nature*, 2002. **418**(6900): p. 880-4.
73. Yang, H., et al., *Mg²⁺ mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(46): p. 18270-5.
74. Santarelli, L.C., et al., *Three methionine residues located within the regulator of conductance for K⁺ (RCK) domains confer oxidative sensitivity to large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels*. *J Physiol*, 2006. **571**(Pt 2): p. 329-48.
75. Zhou, X.B., et al., *A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(46): p. 43239-45.
76. Schubert, R. and M.T. Nelson, *Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle*. *Trends Pharmacol Sci*, 2001. **22**(10): p. 505-12.
77. Alioua, A., et al., *Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(22): p. 14560-5.
78. Wallner, M., P. Meera, and L. Toro, *Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25): p. 14922-7.
79. Xie, J. and D.P. McCobb, *Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones*. *Science*, 1998. **280**(5362): p. 443-6.
80. Cox, D.H. and R.W. Aldrich, *Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca(2+) sensitivity*. *J Gen Physiol*, 2000. **116**(3): p. 411-32.
81. Galvez, A., et al., *Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion Buthus tamulus*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(19): p. 11083-90.
82. Sausbier, U., et al., *Ca²⁺-activated K⁺ channels of the BK-type in the mouse brain*. *Histochem Cell Biol*, 2006. **125**(6): p. 725-41.
83. Sausbier, M., et al., *Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(25): p. 9474-8.

84. Wang, Z.W., *Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels*. Mol Neurobiol, 2008. **38**(2): p. 153-66.
85. Ruttiger, L., et al., *Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12922-7.
86. Savaria, D., et al., *Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle*. Am J Physiol, 1992. **262**(3 Pt 1): p. L327-36.
87. McCobb, D.P., et al., *A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle*. Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 2): p. H767-77.
88. Herrera, G.M., T.J. Heppner, and M.T. Nelson, *Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(1): p. R60-8.
89. Sprossmann, F., et al., *Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder*. FEBS J, 2009. **276**(6): p. 1680-97.
90. Coiret, G., et al., *The antiestrogen tamoxifen activates BK channels and stimulates proliferation of MCF-7 breast cancer cells*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(3): p. 843-51.
91. Bloch, M., et al., *KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer*. Oncogene, 2007. **26**(17): p. 2525-34.
92. Liu, X., et al., *Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells*. J Neurosci, 2002. **22**(5): p. 1840-9.
93. Thompson, E.G. and H. Sontheimer, *A role for ion channels in perivascular glioma invasion*. Eur Biophys J, 2016. **45**(7): p. 635-648.
94. Ge, Y., T. Deng, and X. Zheng, *Dynamic monitoring of changes in endothelial cell-substrate adhesiveness during leukocyte adhesion by microelectrical impedance assay*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(3): p. 256-62.
95. Xing, J.Z., et al., *Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors*. Chem Res Toxicol, 2005. **18**(2): p. 154-61.
96. Foller, M., et al., *Functional significance of the intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel for the short-term survival of injured erythrocytes*. Pflugers Arch, 2010. **460**(6): p. 1029-44.
97. Huber, S.M., et al., *Bradykinin-stimulated Cl⁻ secretion in T84 cells. Role of Ca²⁺-activated hSK4-like K⁺ channels*. Pflugers Arch, 1999. **438**(1): p. 53-60.
98. Kasinathan, R.S., et al., *Oxidation induces CIC-3-dependent anion channels in human leukaemia cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(28): p. 5407-12.
99. Neher, E. and B. Sakmann, *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature, 1976. **260**(5554): p. 799-802.

100. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
101. Morgan, A.J. and R. Jacob, *Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane*. Biochem J, 1994. **300 (Pt 3)**: p. 665-72.
102. Steinle, M., et al., *Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels*. Radiother Oncol, 2011. **101**(1): p. 122-6.
103. Colbran, R.J., *Regulation and role of brain calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. Neurochem Int, 1992. **21**(4): p. 469-97.
104. Stegen, B., et al., *K(+) channel signaling in irradiated tumor cells*. Eur Biophys J, 2016. **45**(7): p. 585-598.
105. Cuddapah, V.A. and H. Sontheimer, *Molecular interaction and functional regulation of CIC-3 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11188-96.
106. Venturini, E., et al., *Targeting the Potassium Channel Kv1.3 Kills Glioblastoma Cells*. Neurosignals, 2017. **25**(1): p. 26-38.
107. Heise, N., et al., *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, 2010. **26**(4-5): p. 597-608.
108. Wu, X., et al., *Potentiation of large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels by alpha5beta1 integrin activation in arteriolar smooth muscle*. J Physiol, 2008. **586**(6): p. 1699-713.
109. Yang, Y., et al., *Alpha5beta1 integrin engagement increases large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel current and Ca²⁺ sensitivity through c-src-mediated channel phosphorylation*. J Biol Chem, 2010. **285**(1): p. 131-41.
110. Tanneur, V., et al., *Time-dependent regulation of capacitative Ca²⁺ entry by IGF-1 in human embryonic kidney cells*. Pflugers Arch, 2002. **445**(1): p. 74-9.
111. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 517-24.
112. Wondergem, R. and J.W. Bartley, *Menthol increases human glioblastoma intracellular Ca²⁺, BK channel activity and cell migration*. J Biomed Sci, 2009. **16**: p. 90.
113. Wondergem, R., et al., *HGF/SF and menthol increase human glioblastoma cell calcium and migration*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **372**(1): p. 210-5.
114. Horigane, S.I., et al., *Calcium signaling: a key regulator of neuronal migration*. J Biochem, 2019.
115. Romero-Garcia, S. and H. Prado-Garcia, *Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review)*. Int J Oncol, 2019.

116. Bayer, K.U., P. De Koninck, and H. Schulman, *Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMKII to Ca(2+) oscillations*. EMBO J, 2002. **21**(14): p. 3590-7.
117. Imlach, W.L., et al., *The molecular mechanism of "ryegrass staggers," a neurological disorder of K+ channels*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **327**(3): p. 657-64.
118. Edalat, L., et al., *BK K+ channel blockade inhibits radiation-induced migration/brain infiltration of glioblastoma cells*. Oncotarget, 2016. **7**(12): p. 14259-78.
119. Lee, K., et al., *The effects of neuroleptic and tricyclic compounds on BKCa channel activity in rat isolated cortical neurones*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(8): p. 1810-6.
120. Korpi, E.R., et al., *Reduced haloperidol in the post-mortem brains of haloperidol-treated patients*. Psychiatry Res, 1984. **11**(3): p. 259-69.
121. Huang, C.L. and B.H. Ruskin, *Determination of Serum Chlorpromazine Metabolites in Psychotic Patients*. J Nerv Ment Dis, 1964. **139**: p. 381-6.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die gesamte Arbeit entstand unter der Leitung von Stephan M. Huber und Peter Ruth. Die Zelllinien T98G und U87MG wurden durch das Labor für Experimentelle Radioonkologie des Uniklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Migrationsexperimente wurden von mir im Labor für Pharmakologie, Toxikologie und klinischen Pharmakologie der Universität Tübingen durchgeführt, die Etablierung der Methode erfolgte durch mich. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte am Universitätsklinikum für Radioonkologie durch Stephan M. Huber und Daniela Palme. Die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgten im Labor für Experimentelle Radioonkologie des Uniklinikums Tübingen durch Stephan M. Huber, Milan Misovic und mir. Die Proteinnachweise mittels „Western Blot/Immunoblot“ wurden im Labor für Experimentelle Radioonkologie des Uniklinikums Tübingen durch Stephan M. Huber, Daniela Palme, Milan Misovic und mir durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich in enger Rücksprache mit Stephan M. Huber. Stephan M. Huber, Peter Ruth, Robert Lukowski, Justine Rudner und Klaus Dittmann leisteten ihren Beitrag durch wissenschaftliche Diskussion, Design und Korrektur der Arbeit. Die Dissertation wurde von mir persönlich verfasst.