

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**„Die Rolle von TRPM7 bei der Aktivierung und Proliferation von Chronisch  
Lymphatischen Leukämiezellen“**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Petro Bannout  
aus Augsburg  
2022

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Irmela Jeremias  
Prof. Dr. Helga Schmetzer

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2022

---

Für meine Familie,  
für all diejenigen Patientinnen und Patienten,  
die einen kraftraubenden Kampf gegen die Chronisch Lymphatische Leukämie führen  
müssen und für alle Hinterbliebenen, die durch diese Erkrankung einen Menschen verloren  
haben

---

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Überblick über die Familie der TRP-Kanäle.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Die Unterfamilie der TRPM-Kanäle .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 TRPM7.....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Struktur von TRPM7 .....	7
1.3.2 Kanalfunktion .....	8
1.3.3 Kinasefunktion.....	10
1.3.4 Wechselwirkung zwischen Kanal und Kinase .....	10
1.3.5 Von TRPM7 beeinflusste zelluläre Prozesse.....	11
1.3.6 Die Rolle von TRPM7 bei verschiedenen Krebsarten .....	12
<b>1.4 Chronisch Lymphatische Leukämie .....</b>	<b>13</b>
1.4.1 Definition, Risikofaktoren und Epidemiologie.....	13
1.4.2 Diagnostik.....	13
1.4.3 Einteilung und Symptomatik .....	14
1.4.4 Therapie und Prognose .....	15
<b>1.5 Signaltransduktion am B-Zell-Rezeptor .....</b>	<b>21</b>
1.5.1 Physiologie des B-Zell-Rezeptors in gesunden B-Zellen .....	21
1.5.2 Veränderungen in der Signaltransduktion bei B-CLL-Zellen .....	23
<b>1.6 Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Chemikalien und Geräte.....	25
2.1.2 Puffer- und Patch-Clamp-Lösungen.....	27
2.1.3 Verwendete Zellen und Nährmedien .....	28
2.1.4 Guava ViaCount und Fluoreszenzfarbstoffe .....	30
2.1.5 PT-stabilisiertes Oligodesoxynukleotid DSP30 und Interleukin 2.....	31
2.1.6 Inhibitoren.....	31
2.1.6.1 Dasatinib .....	31
2.1.6.2 NS8593 .....	31
2.1.7 B Cell Enrichment Kit .....	31
2.1.8 Computersoftware .....	31
2.1.8.1 Microsoft Excel und SPSS .....	31
2.1.8.2 InCyte Software für Guava® easyCyte HT Systems .....	31
2.1.8.3 HEKA-Patchmaster und FitMaster .....	31
2.1.8.4 Igor Pro (WaveMetrics).....	32
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Zellbiologische Methoden .....	32
2.2.1.1 Mock Fibroblasten .....	32
2.2.1.1.1 Auftauen der MOCK-Fibroblasten .....	32
2.2.1.1.2 Passagieren der MOCK-Fibroblasten .....	32
2.2.1.1.3 Einfrieren der MOCK-Fibroblasten .....	33
2.2.1.2 CLL Proliferationsassay über 3 Tage.....	33

2.2.1.2.1 Coaten und Aussähen der Fibroblasten auf 24er Wellplatten .....	33
2.2.1.2.2 Aussähen der CLL-Zellen und Behandlung mit DSP30 + IL-2 + Inhibitoren .....	33
2.2.1.2.2 Ernten der stimulierten Zellen nach 3 Tagen .....	35
2.2.1.3 B-Zell-Isolation aus Vollblut .....	35
2.2.1.3.1 Lymphoflotunterschichtung und Gradientenzentrifugation .....	35
2.2.1.3.2 Waschung der gewonnenen PBMC-Schicht .....	36
2.2.1.3.3 B-Zell-Isolation aus den PBMCs .....	37
2.2.1.4 Aktivierung und Stimulation der B-Zellen/CLL-Zellen mit PMA und Ionomycin .....	38
2.2.2 Durchflusszytometrie .....	39
2.2.2.1 Theoretische Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	39
2.2.2.2 Präparation der B-Zell-/CLL-Zellsuspensionen .....	40
2.2.2.3 Blockierung unspezifischer Bindestellen und Färbung der Zellen mit CD5, CD19, CD80 und CD86 .....	40
2.2.2.4 Detektion mit der InCyte Software für Guava® easyCyte HT Systems .....	42
2.2.2.5 Statistische Auswertung in Microsoft Excel und SPSS .....	43
2.2.3 Elektrophysiologische Methoden – Patch-Clamp-Technik .....	43
2.2.3.1 Theoretische Grundlagen der Patch-Clamp-Technik .....	43
2.2.3.2 Messungen von TRPM7-Ionenströmen in B-Zellen und CLL-Zellen .....	45
2.2.3.3 Export und Auswertung der Daten in Igor Pro, Microsoft Excel und SPSS .....	47
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Durchflusszytometrie des CLL-Proliferationsassays .....</b>	<b>47</b>
3.1.1 Proliferation nach Aktivierung und Stimulation von CLL-Zellen mit dem CpG-Motiv DSP30 und IL-2 .....	47
3.1.2 Messung von CD80 und CD86-Signalen in stimulierten CLL-Zellen .....	49
<b>3.2. Elektrophysiologische Messungen von TRPM7 .....</b>	<b>52</b>
3.2.1 Quervergleich: CLL-Zellen und B-Zellen .....	52
3.2.1.1 Stromdichte von CLL-Zellen gegenüber B-Zellen nach Auftauen bzw. Isolation aus Vollblut .....	52
3.2.1.2 Stromdichteentwicklung von CLL- bzw. B-Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin .....	53
3.2.2 TRPM7-Stromdichten in mit DSP30 und Interleukin-2 stimulierten proliferierenden CLL-Zellen .....	55
3.2.2.1 Entwicklung der TRPM7-Stromdichte von proliferierenden CLL-Zellen über 4 Tage .....	55
3.2.2.2 Zellgrößenunabhängige TRPM7-Ströme von proliferierenden CLL-Zellen über 4 Tage .....	55
3.2.3 Inhibition der TRPM7-Ströme in CLL-Zellen durch intrazelluläres .....	56
Mg <sup>2+</sup> und Mg•ATP .....	56
3.2.3.1 Kanalhemmung frisch aufgetauter CLL-Zellen .....	56
3.2.3.2 Kanalhemmung proliferierender CLL-Zellen nach 3 Tagen .....	57
3.2.3.3 Kanalhemmung mit PMA und Ionomycin stimulierter CLL-Zellen .....	58
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Zusammenfassung .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 TRPM7 und Proliferation von Krebszellen .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3 TRPM7-Ströme in CLL-Zellen .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4 Ausblick .....</b>	<b>64</b>
4.4.1 NS8593 als potentieller Wirkstoff in der CLL-Behandlung? .....	64
4.4.2 Weiterführende Experimente .....	65
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>6 Danksagungen .....</b>	<b>72</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick über die Familie der TRP-Kanäle

Die Kationenkanäle der TRP-Familie („Transient Receptor Potential“), die in zahlreichen Organismen wie Würmern, Fruchtfliegen, Zebrafischen, Mäusen und Menschen exprimiert werden, weisen hinsichtlich ihres unterschiedlichen Vorkommens, ihrer Aktivität und Funktionen eine im Vergleich zu anderen Ionenkanälen hohe Heterogenität auf. Sie zählen zu den größten Ionenkanalfamilien. Trotz ihrer Gemeinsamkeiten wie z.B. das Vorhandensein von sechs Transmembrandomänen, die Durchlässigkeit für Kationen und abschnittsweise Parallelen in der Aminosäuresequenz, benötigen die Vertreter dieser Ionenkanalfamilie unterschiedliche Aktivierungsmechanismen (chemo-, mechano- und thermosensitiv) und differieren in der Kationenselektivität. TRP-Kanäle spielen eine essentielle Rolle in der Sensorik hinsichtlich visueller, auditorischer, taktiler, olfaktorischer, gustatorischer Sensibilität sowie der Thermosensibilität.

Die TRP-Kanäle werden in sieben Unterformen aufgeteilt:

- TRPC („Transient Receptor Potential **Canonical**“)
- TRPV („Transient Receptor Potential **Vanilloid**“)
- TRPM („Transient Receptor Potential **Melastatin**“)
- TRPN („Transient Receptor Potential **no mechanoreceptor potential C**“)
- TRPA („Transient Receptor Potential **Ankyrin**“)
- TRPP („Transient Receptor Potential **Polycystin**“)
- TRPML („Transient Receptor Potential **Mucolipin**“)

TRP-Kanäle – der phylogenetische Stammbaum ist in Abb. 1 veranschaulicht - beeinflussen viele zelluläre Vorgänge, Mutationen in den Kanälen können kardiovaskuläre, renale, skelettale und neuronale Erkrankungen hervorrufen (Venkatachalam und Montell 2007; Kaneko und Szallasi 2014).

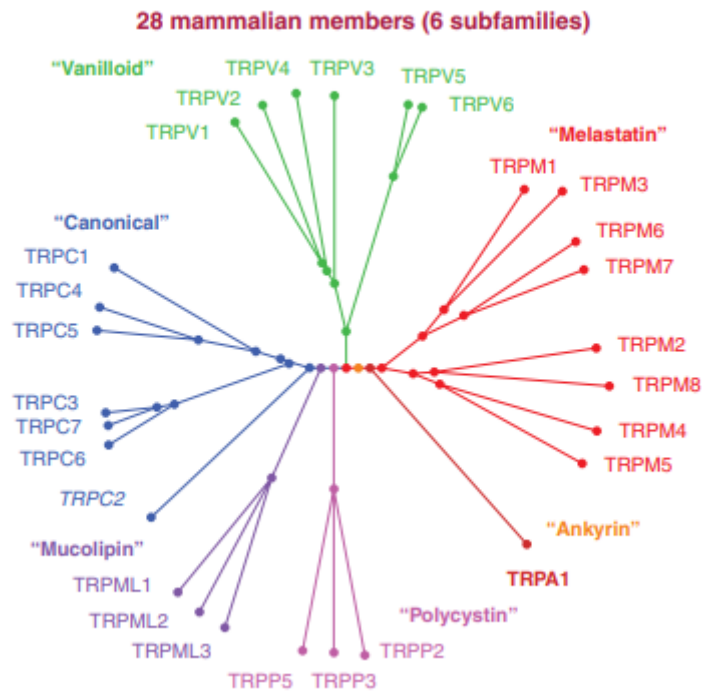


Abbildung 1: Der phylogenetische Stammbaum der TRP-Ionenkanäle. In Säugetieren kommen bis auf TRPN alle erwähnten Unterfamilien vor. Entnommen aus (Gees et al. 2010)

## 1.2 Die Unterfamilie der TRPM-Kanäle

Die in ihrer Funktion weitgehend noch nicht entschlüsselte Familie der TRPM- (engl.: „transient receptor potential melastatin-like channels“) Kanäle besteht aus acht Mitgliedern, TRPM1-TRPM8, die unspezifisch vorwiegend mono- oder bivalente Kationen, wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , leiten. Ausgenommen hiervon sind TRPM4 und 5, die lediglich monovalente Kationen und kein  $\text{Ca}^{2+}$  leiten. Die Kanäle befinden sich im menschlichen Körper in verschiedenen Geweben und erfüllen dort unterschiedliche Aufgaben. Die Proteine bilden sechs Transmembran-Domänen mit intrazellulären C- und N-Termini. Der nicht-selektive **TRPM1** spielt bei der Depolarisation der ON-Bipolarzellen in der Retina eine essentielle Rolle. Eine autosomal-rezessive Mutation im TRPM1-Gen führt zur kongenitalen stationären Nachtblindheit (engl.: CSNB) Typ 1. In Melanozyten hingegen steht die Aktivität von **TRPM1** in direktem Zusammenhang mit der Produktion von Melanin (Duvoisin et al. 2017). Neben seiner hauptsächlichsten Expression im Gehirn und seiner Verwicklung in die Toxizität von  $\beta$ -Amyloid ist das wärmeaktivierte **TRPM2** insbesondere in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas cAMP-vermittelt in der Insulinfreisetzung involviert (Togashi et al. 2006; Miller 2006). Klassischerweise wird TRPM2 durch hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und Sauerstoffradikale aktiviert und leitet vorwiegend  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^{2+}$ . Über letzteren Aktivierungsweg wird auch die TRPM2-vermittelte Produktion von Chemokinen in Immunzellen wie Monozyten beeinflusst (Yamamoto et al. 2008; Home | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY 2020.000Z). **TRPM3** ist neben TRPV1 in Neuronen coexprimiert und dient der

---

Thermozeption bzw. der Scherzvermittlung durch Hitze einwirkung. Darüber hinaus verursacht der Kanal auch Hyperalgesie bei Nervenverletzungen oder entzündlichen Prozessen am Nerv (Vriens und Voets 2018). **TRPM4** ist vor allem in Vorhofzellen und Zellen des Reizweiterleitungssystems des Herzes exprimiert. Dort verzögert es die späte Repolarisation des Aktionspotentials und weist im Zuge des kardialen Remodelings ein proarrhythmisches Potential auf (Hu et al. 2017; Demion et al. 2014). Mutationsbedingte Erhöhung der Kanaldichte in der Zellmembran wird in Zusammenhang mit dem Familiären Progressiven Herzblock Typ 1 gesehen (Kruse et al. 2009). **TRPM5** ist an der Geruchswahrnehmung von Pheromonen beteiligt. Weiterhin spielt der Kanal in der Chemosensorik eine wichtige Rolle bei der mukoziliären Clearance, da im Mausmodell bei TRPM5-defizienten Exemplaren eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber natürlichen Pathogenen vorlag. (López et al. 2014; Perniss et al. 2020). **TRPM6** (Ionenselektivität:  $Zn^{2+} > Ba^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+} > Sr^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$ ) allein hat nur einen relativ geringen Einfluss auf zelluläres Geschehen und interagiert vorwiegend als Heteromer mit TRPM7 (Ionenselektivität als TRPM6/7-Heteromer:  $Zn^{2+} > Mg^{2+} > Mn^{2+} > Ba^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$ ). Physiologisch relevant ist vor allem die Leitfähigkeit für Magnesium. Gemeinsam vermitteln die beiden Kanäle die  $Mg^{2+}$ -Resorption in humanen und murinen Kolonzellen. (Brandao et al. 2014; Ferioli et al. 2017; Luongo et al. 2018; Li et al. 2006; Chubanov et al. 2016). Vom nicht-selektiven **TRPM8** wird beruhend auf einer breiten wissenschaftlichen Datenlage angenommen, dass er hauptsächlich in Neuronen bei der Vermittlung von Kältereizen, Kälteschmerz und der Analgesie durch Kühlung beteiligt ist (Knowlton et al. 2013).

## 1.3 TRPM7

### 1.3.1 Struktur von TRPM7

TRPM7 wird ubiquitär exprimiert und nimmt als bifunktionales „Chanzym“ eine besondere Rolle innerhalb der TRPM-Subfamilie ein, da es sowohl als Ionenkanal als auch als Enzym fungiert. Von herausragender Bedeutung ist TRPM7 vor allem in B-Zellen: Es konnte gezeigt werden, dass eine fehlende TRPM7-Kanalfunktion in Vorläuferzellen im murinen Knochenmark die Entwicklung reifer B-Lymphozyten beeinträchtigt. Dieser Effekt konnte durch extrazelluläre Magnesiumsupplementation partiell aufgehoben werden. Weiterhin zeigte sich in DT40-B-Zellen, dass ein Fehlen von TRPM7 die Internalisierung bzw. B-Zellrezeptor vermittelte Endozytose von Antigenen von 75% auf 35% im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe reduzierte (Krishnamoorthy et al. 2018a; Krishnamoorthy et al. 2018b). TRPM7 besteht, wie bereits in der allgemeinen Charakterisierung der TRPM-Kanäle beschrieben, aus sechs Transmembrandomänen und einem intrazellulären C- sowie N-Termini. Die Ionenpore wird dabei von der fünften und sechsten Transmembrandomäne gebildet. Für die Bildung einer





Schwermetallionen wie  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  werden ebenfalls geleitet (Yee 2017). Bei negativen Membranpotentialen ist der Strom gering, einwärtsgerichtet und ist im Wesentlichen durch bivalente Kationen getragen, während der bei positiven Membranpotentialen deutlich größere Strom auswärtsgerichtet ist und durch den Fluss monovalenter Kationen entsteht (Yee et al. 2014). Unter Ruhebedingungen unterliegt die Kanalaktivität einer Hemmung durch intrazelluläres  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$  (Yee et al. 2014). Die Hemmwirkung von  $\text{Mg}$ -Trinukleotiden wird über eine Nukleotidbindungsstelle innerhalb der Kinasedomäne (siehe Abb. 3) vermittelt und nimmt in der Reihenfolge  $\text{ATP}>\text{TTP}>\text{CTP}>\text{GTP}>\text{UTP}>\text{ITP}$  in ihrer Stärke ab. Auch  $\text{Mg}$ -Mononukleotide und  $\text{Mg}$ -Dinukleotide hemmen, schwächer jedoch als  $\text{Mg}$ -Trinukleotide, TRPM7. Die Inhibition durch reines  $\text{Mg}^{2+}$  außerhalb der Kinasedomäne für sich genommen ist schwächer als die von  $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ , beide verstärken sich aber wechselseitig in ihrer Hemmwirkung (Yee et al. 2014; Demeuse et al. 2006). Sofern TRPM7 mit TRPM6 Heteromere bildet, geht die Inhibition durch  $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$  verloren, dies ist jedoch durch die Ausschaltung der TRPM6-Kinase reversibel (Zhang et al. 2014b). Weitere Hemmfaktoren sind eine  $\text{PIP}_2$ -Depletion ( $\text{PIP}_2$ , Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) und zytosolische Azidität ( $\text{IC}_{50}$   $\text{pH}=6.3$ ). Keinen eigenen, aber einen synergistischen inhibitorischen Effekt mit  $\text{Mg}^{2+}$  können Halogenide wie  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  und  $\text{I}^-$  haben. Magnesium-Depletion, intrazelluläre Alkalose und cAMP hingegen aktivieren den Kanal (Yee et al. 2014; Chubanov et al. 2017).

Bekanntes den Kanal aktivierende Substanzen sind weiterhin Naltriben und Mibefradil, während Waixenicin A, NS8593 und Spermin als Inhibitoren wirken (Chubanov et al. 2014; Chubanov et al. 2017; Zierler et al. 2011).

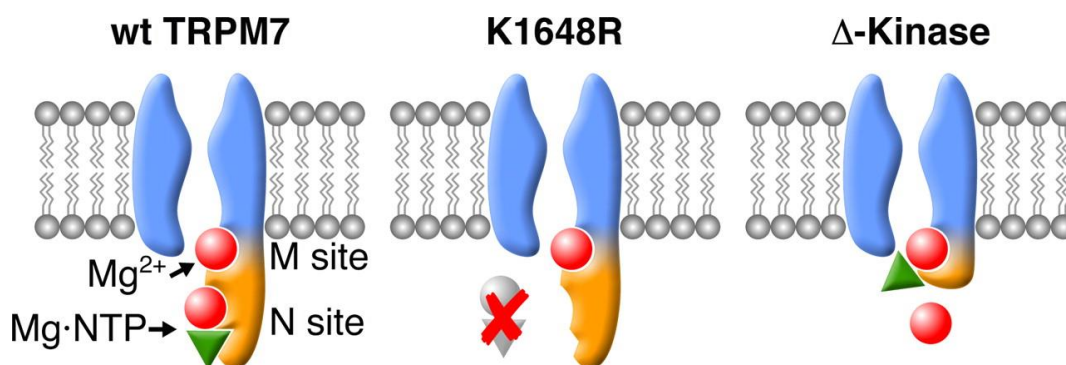


Abbildung 3: Lokalisation und Mutationsformen der Bindungsstellen von Magnesium an TRPM7. Gekennzeichnet sind die extrinsische (außerhalb der Kinasedomäne) Bindungsstelle M für  $\text{Mg}^{2+}$  und die intrinsische (innerhalb der Kinasedomäne) Bindungsstelle N für  $\text{Mg}\cdot\text{NTP}$ . Im Wildtyp TRPM7 links sind beide Hemmmöglichkeiten abgebildet. Bei der phosphotransferase-defizienten Mutation (K1648R) in der Mitte entfällt die Funktion der Kinasedomäne als Nukleotidandockstelle N. Die alleinig schwächere extrinsische  $\text{Mg}^{2+}$ -Inhibition bleibt davon unberührt, sodass insgesamt eine leichte Hemmung des Kanals resultiert. Auch beim Kinase-KO (rechts) fällt die Nukleotidandockstelle N im Zuge des gesamten Kinaseverlustes weg. Zwar kann  $\text{Mg}\cdot\text{NTP}$  hier ebenfalls wie freies  $\text{Mg}^{2+}$  an die  $\text{Mg}^{2+}$ -Bindungsstelle ansetzen, entfaltet seine Hemmstärke jedoch nur im gleichen Maß wie das freie divalente Kation allein. Entnommen aus (Demeuse et al. 2006)

---

### 1.3.3 Kinasefunktion

Die Kinase im C-terminalen Teil des Gesamtproteins TRPM7 hat kein klassisches Phosphorylierungsmotiv sondern phosphoryliert Serin-/Threoninreste in  $\alpha$ -Helices von diversen Proteinen. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem Annexin A1, Myosin IIA, Smad2, eEF2-k und PLC $\gamma$ 2 (Nadolni und Zierler 2018), das eine direkte Verbindung zur Signaltransduktionskaskade der B-Zell-Rezeptorstimulation in Immunzellen darstellt. Autophosphorylierung der Serin-Threonin-reichen Region N-terminal der Kinase spielt eine essentielle Rolle bei der Substraterkennung von TRPM7, beeinflusst allerdings die intrinsische Kinaseaktivität nicht. Daher kann sich die katalytische Fähigkeit trotz voll ausgeprägter Kinaseaktivität bei fehlender oder geringer Autophosphorylierung in der Serin/Threonin-reichen Region in geringerer Substratphosphorylierung niederschlagen. Der exakte Mechanismus der verbesserten Substraterkennung durch die Autophosphorylierung ist bisher noch nicht genau verstanden. Diskutiert werden entweder eine direkte Bindung der Substrate an hyperphosphorylierte Serin/Threonin-Reste oder eine entstehende Änderung der Tertiärstruktur von TRPM7, die einen leichteren Zugang zu Substraten ermöglicht (Clark et al. 2008).

### 1.3.4 Wechselwirkung zwischen Kanal und Kinase

Relativ umstritten ist aktuell, ob und inwiefern es eine funktionelle Interaktion zwischen dem Kanal und der Kinase gibt. Diskutiert wird unter anderem eine wechselseitige Beeinflussung dahingehend, dass die Kinase die Kanalaktivität durch Serin-/Threoninphosphorylierung der Kanaldomäne reguliert, während der Kanal im Gegenzug durch veränderte Leiteigenschaften die Kinaseaktivität steuert (Schmitz et al. 2014).

Gestützt wird diese Hypothese durch den mutationsanalytischen und elektrophysiologischen Befund, dass Mutationen in den ATP-bindenden Regionen der Kinase Ströme durch den Kanal verringert haben. Widersprüchlich ist in dieser Hinsicht aber, dass bei Mutationen im katalytischen Zentrum trotz inaktivierter Kinase die TRPM7-Ströme durch den Kanal unbeeinflusst bleiben (Yee 2017). Kongruent dazu konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Punktmutation von Lysin zu Arginin an Position 1646 im katalytischen Zentrum der Kinase die intrazellulären massenspektrometrisch bestimmten  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen in T-Helferzellen im Vergleich zum TRPM7-Wildtyp nicht verändern (Romagnani et al. 2017). Auch weisen Ergebnisse darauf hin, dass die Kinaseaktivität unabhängig vom Kanal ist, die Kinase nach caspase-vermittelter Abspaltung vom restlichen TRPM7-Protein sogar in den Zellkern wandern kann und dort autonom Histone phosphoryliert (Krapivinsky et al. 2014). Über diese Beispiele hinaus gibt es zahlreiche weitere widersprüchliche Versuchsergebnisse in der bestehenden Literatur, sodass die Frage der Wechselwirkung von Kanal und Kinase bisweilen offen bleibt.

---

### 1.3.5 Von TRPM7 beeinflusste zelluläre Prozesse

TRPM7 beeinflusst wesentliche Prozesse wie die  $Mg^{2+}$ -Homöostase sowohl lokal auf zellulärer Ebene als auch systemisch. Es konnte gezeigt werden, dass heterozygote  $TRPM7^{+/\Delta Kinase}$  - Mäuse, deren TRPM7-Kinase genetisch ausgeschaltet wurde, bei einer 14-tägigen magnesiumarmen Ernährung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wildtyp) signifikant niedrigere  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen in Blutplasma, Urin und Knochen aufwies (Ryazanova et al. 2010). Hinsichtlich des Zellwachstums wurde im Mausmodell aufgezeigt, dass das Wachstum embryonaler Stammzellen von heterozygoten  $TRPM7^{+/\Delta Kinase}$  – Mäusen sowie homozygoten  $TRPM7^{\Delta Kinase/\Delta Kinase}$  – Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eingeschränkt war. Dieser Effekt ließ sich durch die Supplementation von höheren  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen in die jeweiligen Nährmedien vollständig aufheben (Ryazanova et al. 2010). Auch die enterale Resorption von  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  ist von TRPM7 abhängig. Mäuse mit genetisch inaktivierten intestinalem TRPM7 wiesen nicht nur einen systemischen Mangel dieser Spurenelemente auf, sondern unterlagen im Vergleich zur Kontrollgruppe einem deutlich kompromittierten postnatalen Wachstum bzw. Gewichtszunahme mit einer Überlebensrate von 0% nach 10 Tagen (Mittermeier et al. 2019). Darüber hinaus ist das Protein neben dem Wachstum in weitere zelluläre Abläufe wie Adhäsion, Migration und Proliferation integriert.

Wenn der Kanal von TRPM7 blockiert wird, tritt der Zellzyklusarrest ein. Weiterhin ist TRPM7 für die Motilität von Immunzellen, speziell T-Zellen verantwortlich (Chimote et al. 2013; Zierler et al. 2011; Chubanov et al. 2017) und kontrolliert maßgeblich via Myosin IIA-Phosphorylierung die zytoskelettale Kontraktilität.

Unverzichtbar ist TRPM7 offenbar für eine gesunde und unbeeinträchtigte früh embryonale Entwicklung und Organogenese (Chubanov et al. 2017).

Neurodegenerative Erkrankungen wie ALS oder Parkinson, Vorhofflimmern, kardiale Fibrosierung und Reaktion auf oxidativen Stress werden ebenso wie Mangel an Megakaryozyten im Knochenmark überdies mit TRPM7 in Verbindung gebracht (Chubanov et al. 2017).

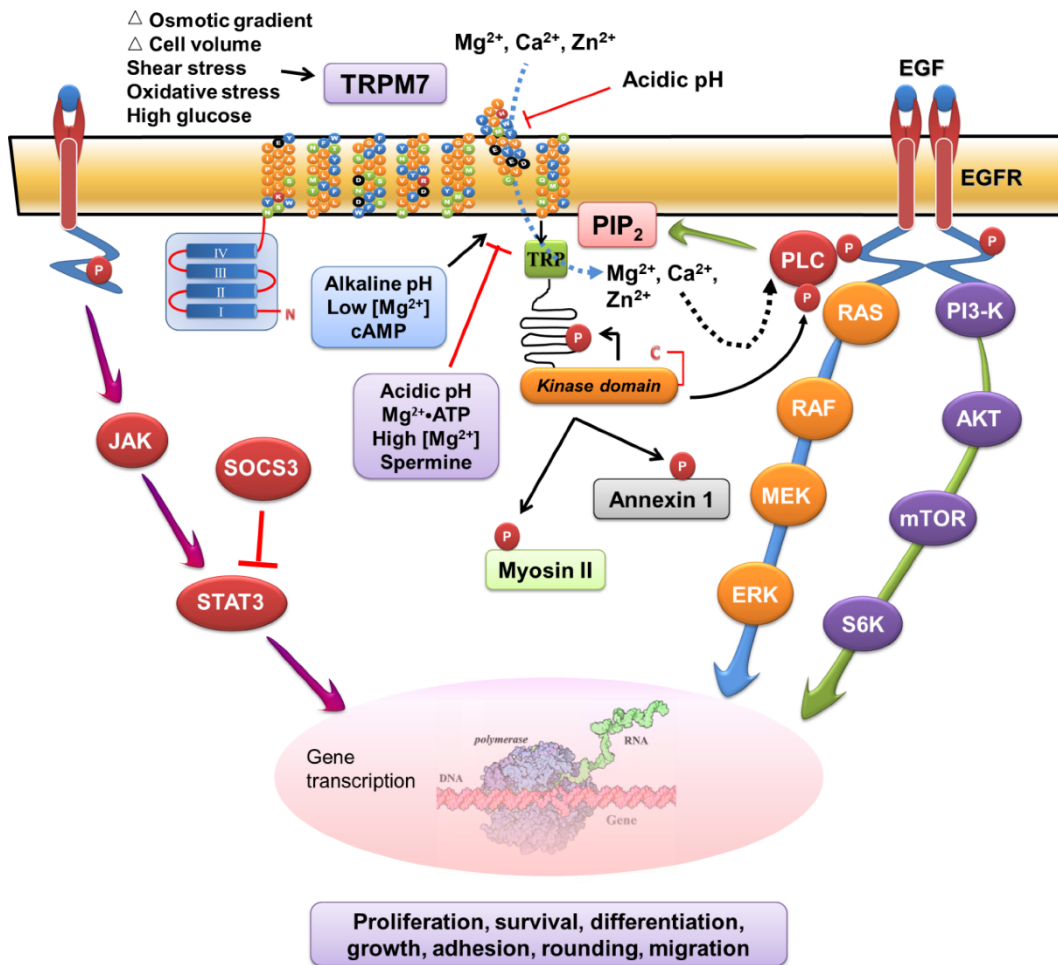


Abbildung 4: Übersicht über die zellulären Interaktionen von TRPM7, für Einzelheiten siehe Text. Entnommen aus (Yee 2017)

### 1.3.6 Die Rolle von TRPM7 bei verschiedenen Krebsarten

Neben den bereits angesprochenen allgemeinen Funktionen IST die Rolle von TRPM7 bei verschiedenen Krebsarten in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus gerückt. Entsprechend der Funktionen von TRPM7 in normalen Zellen ist das Protein auch in entarteten Zellen für Vorgänge wie Proliferation, Überleben, Zellzyklusprogression, Migration und Invasion verantwortlich. In diesem Zuge ist TRPM7 beispielsweise in Karzinomen des Pankreas und der Brustdrüse, sowie beim Glioblastom überexprimiert, während somatische Mutationen sowie Polymorphismen in Magen-, Darm-, Ovarial- und Brustkrebs ausgemacht werden konnten (Yee 2017). Die Überexpression bei Pankreastumoren steht in direkter Korrelation zur Tumorgroße und –ausdehnung (Yee 2017). Für die Migration von Krebszellen ist speziell die Leitfähigkeit von  $Mg^{2+}$  von entscheidender Bedeutung, da eine beeinträchtigte Magnesiumaufnahme die Migrationsvorgänge bis zur reversiblen  $Mg^{2+}$ -Supplementation unterbindet (Yee 2017). Damit trägt TRPM7 zur allgemeinen Eigenheit von Krebszellen bei,  $Mg^{2+}$  intrazellulär zu akkumulieren. Auch in das Zellwachstum des Hepatozellulären Karzinoms scheint TRPM7 involviert zu sein: Über eine pharmakologische Hemmung von TRPM7 mittels NS8593 wurde die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung von RhoA

---

gedrosselt, woraufhin die Aktinpolymerisation und Komplexbildung des tumorigenen Transkriptionsfaktors MRTF-A (engl.: Myocardin-related transcription factor A) abnahm. Dadurch wurde die für die Genexpression erforderliche Translokation von MRTF-A in den Zellkern unterbunden, so dass die tumorauslösende Beeinflussung der Genexpression verhindert wurde. Zusammengefasst führte die pharmakologische Blockade von TRPM7 zur Seneszenz von HCC-Zellen in vitro und in vivo (Voringer et al. 2020). Während es viele Untersuchungen und Veröffentlichungen über den Zusammenhang zwischen TRPM7 und soliden Tumoren gibt, ist die Datenlage bezüglich der klassischen hämatologischen Neoplasien wie z.B. der akuten und chronischen, myeloischen und lymphatischen Leukämieformen bisweilen eher dünn.

## **1.4 Chronisch Lymphatische Leukämie**

### **1.4.1 Definition, Risikofaktoren und Epidemiologie**

Die Chronisch Lymphatische Leukämie ist ein niedrig malignes leukämisch verlaufendes B-Zell-Non Hodgkin-Lymphom und beruht auf einer klonalen Expansion von reifen, kleinzelligen und funktionslosen B-Lymphozyten. Die Erkrankung ist die häufigste Leukämieform in der westlichen Welt und hat einen Altersgipfel zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr. Laut der Deutschen Krebsgesellschaft erkranken hierzulande jährlich 4 von 100 000 Einwohnern neu an CLL, das Erkrankungsrisiko für Männer ist fast doppelt so hoch wie für Frauen. Als Risikofaktoren für die Entstehung der Krankheit werden neben einem hohen Alter vor allem genetische Einflüsse sowie Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen wie vor allem organischen Lösungsmitteln angenommen.

### **1.4.2 Diagnostik**

Der ‚*International Workshop on CLL*‘ hat im Jahr 2008 die Diagnose einer CLL wie folgt mit Kriterien festgelegt:

1. Nachweis von mindestens 5000 klonalen B-Lymphozyten im peripheren Blut. Symptomlose Werte, die diese Grenze unterschreiten, können eine monoklonale B-Lymphozytose begründen.
2. Zytologischer Blutaussstrich: Vorwiegend kleine, kugelige reife Lymphozyten
3. Koexpression des T-Zellantigens CD5 gemeinsam mit CD19, CD20 und CD23

Demnach erfolgt die Diagnosestellung im Wesentlichen durch ein Blutbild mit Differentialblutbild, Blutaussstrich und Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie. Die vorausgegangene Anamnese und klinische Untersuchung können allenfalls Indizien liefern, da die Symptome einer CLL einerseits auch bei anderen Erkrankungen auftreten und andererseits auch gänzlich fehlen können.

---

Neben dem oben angesprochenen Befund im Blutausstrich imponiert darüber hinaus der sogenannte Gumprecht'sche Kernschatten als pathognomonisches Merkmal. Dabei handelt es sich um in der Anfertigung des Blutausstrichs zerstörte CLL-Zellen, die deutlich vulnerabler als gesunde B-Lymphozyten sind, leichter zerplatzen und als amorphe blau-violette Farbflecke erkennbar sind.

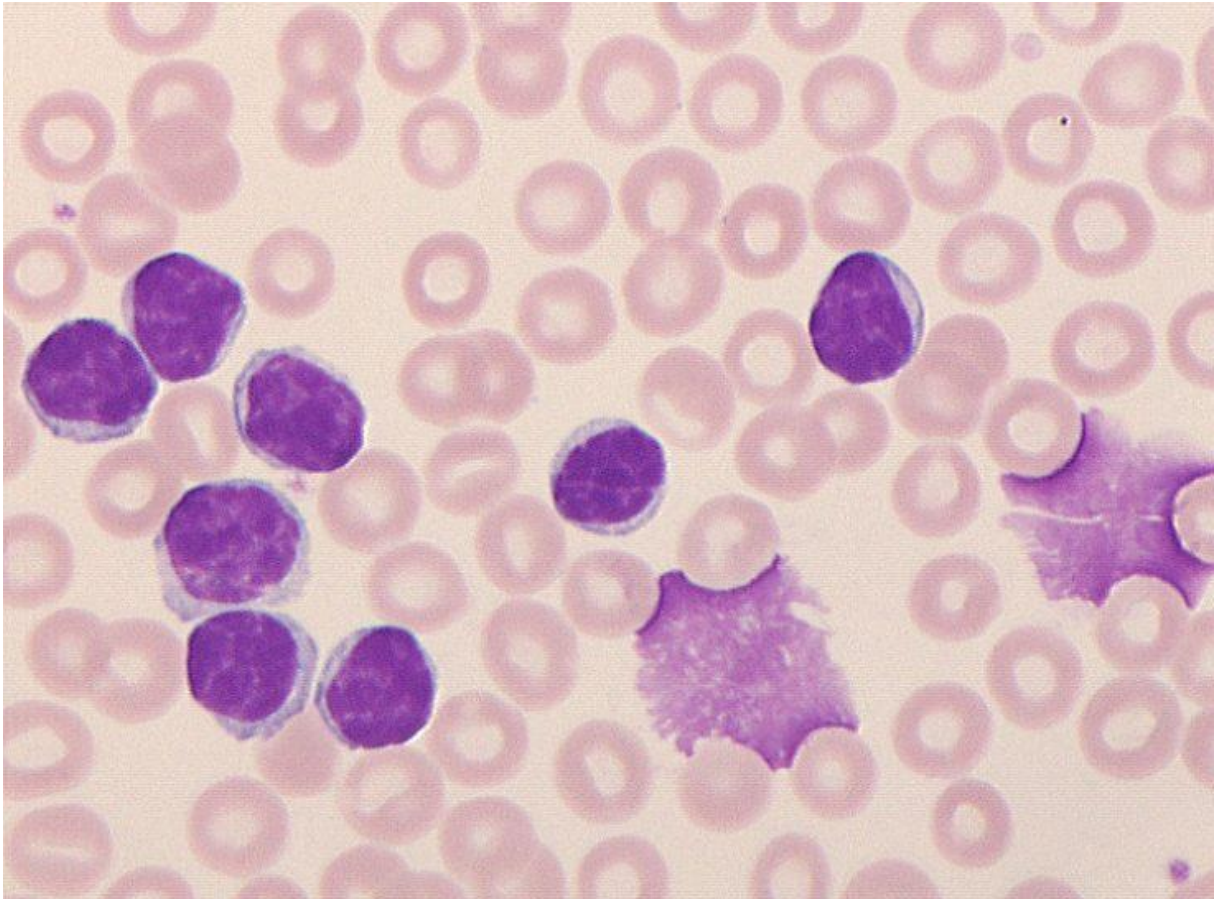


Abbildung 5: Blutausstrich bei einer CLL: Als blaue-violette „Farbkleckse“ imponiert der sogenannte pathognomonische Gumprecht'sche Kernschatten. Bild von: ([https://www.hemato-images.eu/content/e7421/e10372/e7437/index\\_ger.html](https://www.hemato-images.eu/content/e7421/e10372/e7437/index_ger.html))

Weiterführende Diagnostiken wie Knochenmarks- oder Lymphknotenpunktionen spielen in der Primärdiagnostik eine untergeordnete Rolle und werden nur im Rahmen von speziellen Fragestellungen (z.B. Remissionsgrad nach Therapieeinleitung) durchgeführt.

### **1.4.3 Einteilung und Symptomatik**

Die Chronisch Lymphatische Leukämie kann grundsätzlich asymptomatisch und symptomatisch verlaufen, sowie innerhalb der auftretenden Symptome sehr variieren. Neben einer für Krebserkrankungen klassischen B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust) treten Lymphknotenschwellungen, Hepato- und Splenomegalie auf. Je nach Schweregrad der Knochenmarksinfiltration können durch die Suppression der drei hämatopoetischen Stammzelllinien

Infektanfälligkeit, Anämie und Blutungsneigung resultieren. Als Folge entstehen bakterielle, virale und mykotische Infektionen (z.B. Erysipel und Herpes Zoster-Infektionen), sowie Hautblutungen und blasse Haut und Schleimhäute. Weiterhin gehören kutane Symptome wie chronischer Pruritus und Urtikaria zum Beschwerdebild.

Für die Stadieneinteilung der CLL werden zwei Klassifikationen, Rai und Binet (siehe Tab. 1 und 2), herangezogen, die beide diverse hämatologische Parameter wie den Grad der Lymphozytose, Hämoglobinwert und Thrombozytenzahl beinhalten.

Stadium	Lymphozytose ( $>4 \times 10^3/\mu\text{l}$ )	Anzahl befallener Lymphknoten	Hämoglobin	Thrombozyten
A	Ja	< 3 Regionen befallen	$\geq 10 \text{ g/dl}$	$\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$
B	Ja	$\geq 3$ Regionen befallen	$\geq 10 \text{ g/dl}$	$\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$
C	Ja	Irrelevant	$< 10 \text{ g/dl}$ <b>ODER</b>	$< 100 \times 10^3/\mu\text{l}$

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet

St	Risiko	Lymphozytose ( $>15 \times 10^3/\mu\text{l}$ )	Lymphadenopathie	Hepato- oder Splenomegalie	Hämoglobin	Thrombozyten
0	Niedrig	Ja	Nein	Nein	$\geq 11 \text{ g/dl}$	$\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$
I	Mittel	Ja	Ja	Nein	$\geq 11 \text{ g/dl}$	$\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$
II		Ja	Irrelevant	Ja	$\geq 11 \text{ g/dl}$	$\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$
III	Hoch	Ja	Irrelevant	Irrelevant	$< 11 \text{ g/dl}$	$\geq 100 \times 10^3/\mu\text{l}$
IV		ja	irrelevant	irrelevant	irrelevant	$< 100 \times 10^3/\mu\text{l}$

Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai

Die Indikationsstellung zur Therapie der CLL wird unter anderem in Abhängigkeit des Stadiums gestellt. Auch die Prognose des Patienten wird in beiden Klassifikationen mit fortgeschrittenerem Stadium ungünstiger.

#### 1.4.4 Therapie und Prognose

Grundsätzlich stehen für die Behandlung der Chronisch Lymphatischen Leukämie mehrere Alternativen zur Verfügung. Die wesentlichen Therapieelemente sind:



- 
1. Klassische Chemotherapie: Mehrere Chemotherapeutika werden seit Jahren erfolgreich bei der Behandlung eingesetzt. **Chlorambucil** zählt seit Jahrzehnten zum Goldstandard, da es nur unwesentlich toxisch, kostengünstig und oral applizierbar ist. Da andererseits die geringe Wirkstärke keine komplette Remission erzielen kann, hat sich die Kombination von Chlorambucil mit CD20-Antikörpern in Studien als überlegen erwiesen. Anwendung findet Chlorambucil daher im Wesentlichen bei älteren gebrechlichen Patienten mit palliativer Zielsetzung (Hallek 2017). Für das Purinanalogon **Fludarabin** konnte nachgewiesen werden, dass es als Monosubstanz bezüglich vollständiger Remission anderen Therapeutika wie z.B. CHOP (Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin und Prednisolon) oder Chlorambucil als Singletherapie in 7-40% der Fälle überlegen war, ohne jedoch die Gesamtüberlebenszeit verlängern zu können (Hallek 2017). *In vitro* konnte jedoch ein synergistischer Effekt von Fludarabin in Kombination mit Mafosfamid (aktive Form von Cyclophosphamid) nachgewiesen werden, der den Einzelsubstanzen überlegen war (Bellosillo et al. 1999). Daher werden diese beiden Agenzien in der Behandlung der CLL bevorzugt kombiniert. Das Alkylanz **Bendamustin** konnte in Studien bei höherer Toxizität eine größere Ansprechrate und progressionsfreies Überleben gegenüber Chlorambucil (67% vs. 30%, 22 vs. 8 Monate) verzeichnen, auch wenn kein Gesamtüberlebensvorteil besteht. Auch gegenüber Fludarabin zeigt sich Bendamustin hinsichtlich progressionsfreies Überleben (20.1 vs 14.8 Monate) und Ansprechrate (76% vs. 62%) überlegen. Bendamustin wird daher als Monosubstanz in der CLL-Behandlung angewandt (Hallek 2017).
  2. Monoklonale Antikörper und Targeted Agents: Diese heterogene Medikamentengruppe umfasst sowohl Wirkstoffe, die an Oberflächenantigene von CLL-Zellen binden, als auch Substanzen, die in die Signaltransduktionskaskade am B-Zell-Rezeptor eingreifen. **Rituximab** bindet als monoklonaler Antikörper an CD20 auf der Zelloberfläche von B-Zell-Malignomen und konnte die Behandlung der Non-Hodgkin-Lymphome entscheidend verbessern. Die Wirkungsweise entfaltet sich über eine komplement- und antikörpervermittelte Zytotoxizität (Hallek 2017). Als ergänzendes Präparat zu Fludarabin und Cylophosphamid konnte es bei der initialen Behandlung von CLL bei Patienten in gutem Allgemeinzustand die Gesamtüberlebenszeit verlängern (Goede et al. 2014). **Obinutuzumab**, ebenfalls ein CD20-Antikörper, ist noch effektiver als Rituximab und vermittelt seine Zytotoxizität stärker über Antikörper (Hallek 2017; Goede et al. 2014). Es wird vorwiegend mit Chlorambucil kombiniert. Ein weiterer Vertreter dieser Wirkgruppe ist **Ofatumumab**, das vorwiegend bei Fludarabinresistenz zum Einsatz kommt (Goede et al. 2014). **Idelalisib** ist ein potenter Inhibitor der PI3K-Isoform (Phosphoinositid-3-Kinasen), PI3K $\gamma$ , der die in CLL-Zellen konstitutiv

---

erhöhte Aktivität dieses Enzyms blockiert und somit spezifisch deren Proliferation hemmt, ohne T-Zellen, NK-Zellen oder die antikörpervermittelte Zytotoxizität zu beeinträchtigen (Hallek 2017). In einer Phase 1-Studie konnte mit Idelalisib bei therapierefraktärer bzw. rezidivierender CLL bei 54 Patienten eine Gesamtansprechrates von 72% und ein progressionsfreies Überleben von 15.8 Monaten erzielt werden (Hallek 2017). Der Wirkstoff kommt in der Erstlinientherapie bei Patienten mit p53 bzw. 17p-Deletion, die für eine Chemoimmuntherapie nicht in Frage kommen, vor und wird auch bei Rückfall in Kombination mit Rituximab oder Ofatumumab angewandt (Palazzo et al. 2018). **Ibrutinib** ist ein oral applizierbarer, irreversibler BTK-Inhibitor, der Zellapoptose in B-CLL-Zellen und B-Zelllymphomen induziert. In einer Studie mit 56 Patienten mit CLL-Rückfall oder therapierefraktärer Erkrankung wurden eskalierende Dosen Ibrutinib in zwei Gruppen getestet. Gruppe 1 erhielt Ibrutinib über 28 Tage mit 7 Tage Pause, während Gruppe 2 Ibrutinib kontinuierlich appliziert bekam. Dabei wurde eine objektive Ansprechrates von 60% erzielt, inklusive 16% vollständige Remission. Die mediane progressionsfreie Überlebenszeit betrug 13.6 Monate. Befürchtete schwerwiegende Nebenwirkungen wie Myelosuppression, Hepato- oder Nephrotoxizität konnten nicht festgestellt werden, jedoch kam es zu viralen Infektionen. Insgesamt wies Ibrutinib eine hohe Therapiesicherheit auf, da der Wirkstoff bedingt durch die geringe BTK-Expression in (gesunden) hämatopoetischen Zellen und die unterschiedliche Rolle von BTK bei B-Vorläuferzellen und reifen B-Zellen kaum Schäden an gesundem Gewebe verursacht. Diesbezüglich erweist sich auch die pharmakokinetisch rasche Aufnahme und Elimination als vorteilhaft. Weiterhin hat Ibrutinib keinen Effekt auf T-Zellen und vermindert die Antikörperkonzentration im Blut nicht (Hallek 2017; Advani et al. 2012). Aufgrund der genannten Aspekte und der Tatsache, dass die Wirksamkeit von Ibrutinib auch bei Risikopatienten mit ungünstigen Prognosefaktoren wie z.B. 17p-Deletion nicht beeinträchtigt ist (Byrd et al. 2013), wird der BTK-Inhibitor sowohl bei komplizierten Fällen als auch in der Zweitlinientherapie der CLL eingesetzt.

3. Stammzelltransplantation: Die allogene Stammzelltransplantation stellt die einzige kurative Behandlungsmethode der CLL dar. Durch den Graft-versus-Leukämie-Effekt können potentiell restliche Leukämiezellen abgetötet werden. Prognostisch günstig ist eine therapeutische Remission vor Einleitung der Transplantation. Die Indikation und Durchführbarkeit der SZT muss im Einzelfall genau geprüft werden, da ihr Erfolg sehr von der gesundheitlichen Grundkonstitution des Patienten abhängt und bisweilen umstritten ist. Diskutiert wird die Eignung einer allogenen SZT bei Niedrig-Risikopatienten mit 17p-Deletionen und/oder Resistenz gegen Purinanaloga. Es konnte in einer prospektiven longitudinalen multizentrischen Phase 2-Studie nachgewiesen werden, dass ungünstige Prognosefaktoren

durch eine erfolgreiche Stammzelltransplantation aufgehoben werden konnten. 27 von 52 Patienten waren nach allogener Stammzelltransplantation 12 Monate nach Transplantation ohne nachweisbare Restkrankheit, 89% überlebten die nächsten 4 Jahre unabhängig von genetischen Aberrationen ereignisfrei. Vergleiche zwischen Stammzelltransplantation und Therapiestrategien ohne Transplantation stehen derzeit allerdings noch aus (Dreger et al. 2010). Der endgültige Stellenwert einer allogenen Stammzelltransplantation bei der Behandlung der CLL bleibt daher bisweilen ungeklärt.

Grundsätzlich werden Patienten mit symptomatischer Erkrankung, im Binet-Stadium C oder im Hochrisikostadium III/IV nach Rai behandelt. Asymptomatisch Erkrankte im Binet-Stadium A-B und Niedrigrisiko- bzw. Mittlerisikostadium 0-II nach Rai werden hingegen zunächst nur beobachtet (Hallek 2017).

Führt eine Erstlinientherapie, wie sie unten grafisch abgebildet (siehe Abb. 6) ist, nicht zum gewünschten Erfolg, wird eine Zweitlinientherapie (siehe Abb. 7) durchgeführt, die in Abhängigkeit des Therapieoutcomes aus der Initialbehandlung und weiteren Faktoren (Patientenalter, Allgemeinzustand, Verträglichkeit, Durchführbarkeit) steht.

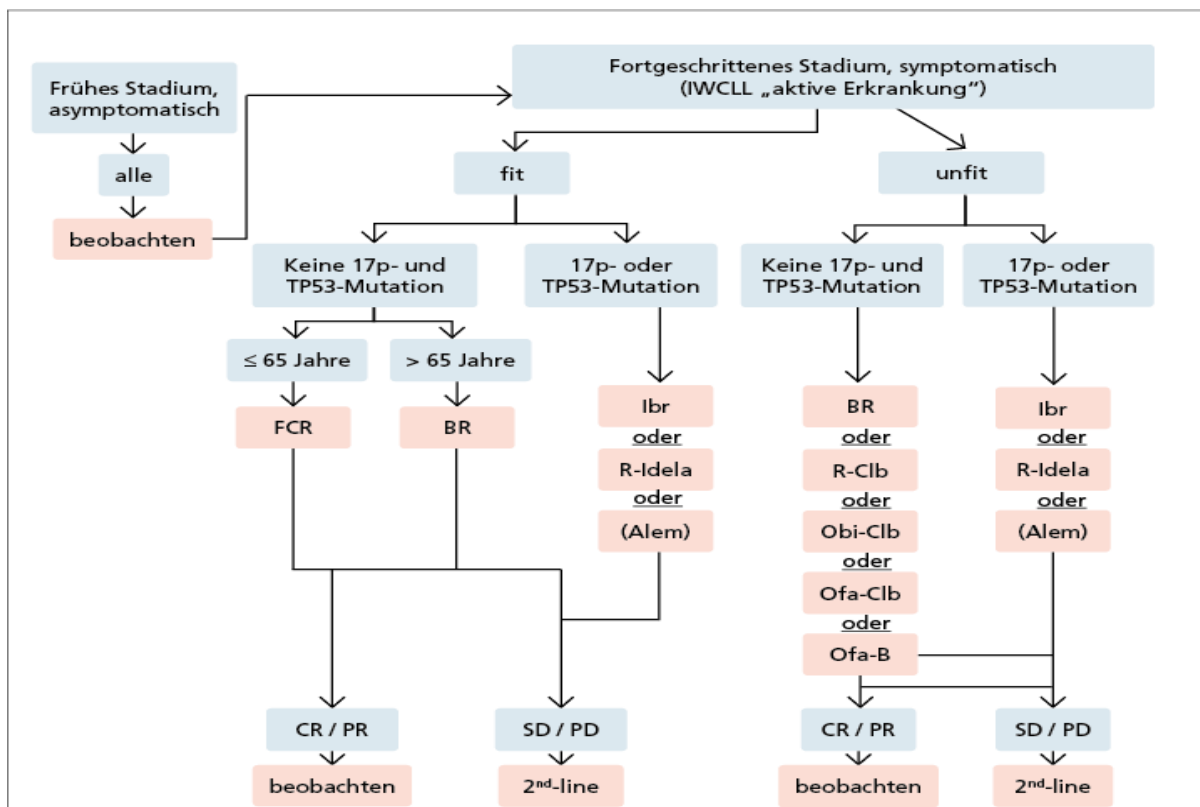


Abbildung 6: Erstlinientherapieschema der Chronisch Lymphatischen Leukämie. In Abhängigkeit von Symptomatik, allgemeiner körperlicher Verfassung, 17p-Deletion, TP53-Mutationsstatus und Alter werden unterschiedliche Therapieregime gewählt. Die aufgeführten Therapeutika werden im Fließtext näher erläutert. F=Fludarabin, C=Cyclophosphamid, R=Rituximab, B=Bendamustin, Idela=Idelalisib, Ibr=Ibrutinib, Clb=Chlorambucil, Obi=Obinutuzumab, Ofa=Ofatumumab, CR=Komplette Remission, PR=Partielle Remission, SD= Stabiles Erkrankungsstadium, PD= Fortschreitende Erkrankung;

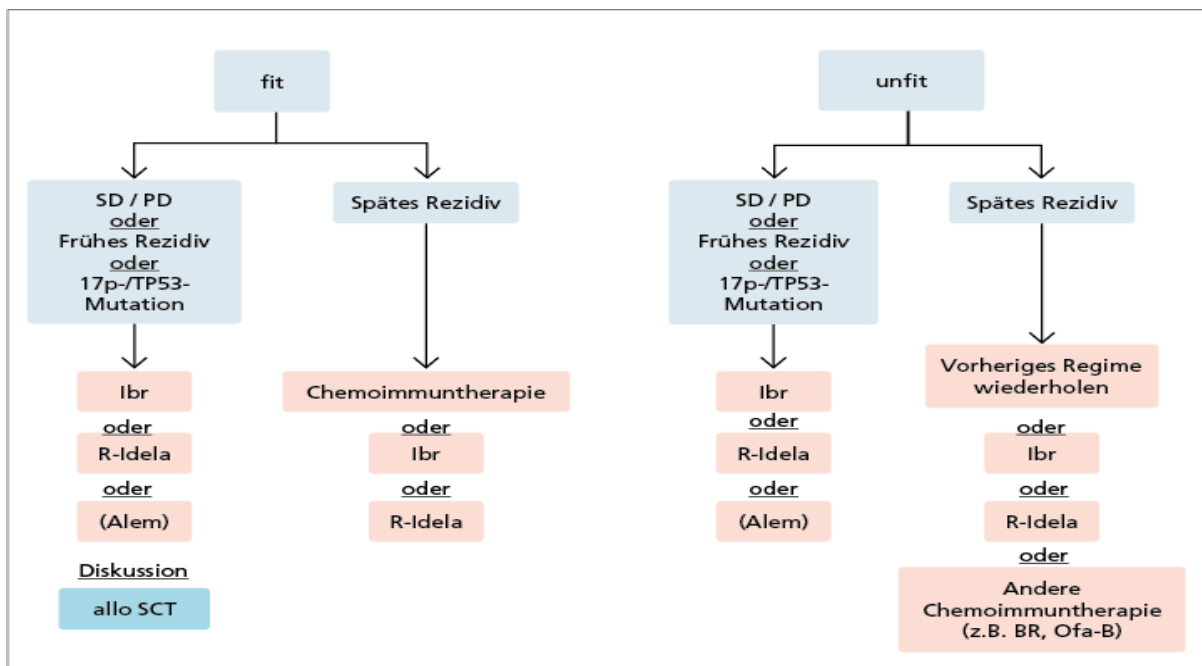


Abbildung 7: Zweitlinientherapieschema der Chronisch Lymphatischen Leukämie. Die aufgeführten Therapeutika werden im Fließtext näher erläutert. R=Rituximab, B=Bendamustin, Idela=Idelalisib, Ibr=Ibrutinib, Ofa=Ofatumumab, SD= Stabiles Erkrankungsstadium, PD= Fortschreitende Erkrankung; Entnommen aus: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@guideline/html/index.html>

Die Prognose der CLL ist von diversen Faktoren ganz besonders stark abhängig. Eine Metaanalyse (The International CLL-IPI working group 2016) setzte sich äußerst intensiv mit Prognosefaktoren der CLL auseinander. Insgesamt 3472 Patientendaten wurden initial hinsichtlich des 5-Jahres- bzw. 10-Jahres-Überleben sofern möglich auf unterschiedliche Prognosekenngrößen wie z.B. Alter, Geschlecht, verschiedene Mutationen und Proteinexpressionen in einer multivariaten Analyse untersucht. Daran anschließend wurde randomisiert ein Trainingsdatensatz (n=2308) für eine Modellaufstellung und ein Validierungsdatensatz (n=1095) zur Überprüfung generiert, von denen jeweils für die endgültigen Resultate für Ersteres n=1214 und für Zweiteres n=585 war. Als externe Validierung dienten zwei unabhängige Patientenkohorten MAYO aus den USA und SCAN aus Skandinavien. Fünf Faktoren konnten sich dabei durchsetzen: **TP53-Status, IgHV-Mutationsstatus, Alter,  $\beta_2$ -Mikroglobulinkonzentration im Serum** und das **klinische Stadium nach Rai/Binet**.

Der **TP53-Status** besagt, ob eine Mutation bzw. Deletion von p53 oder dem Chromosomenabschnitt 17p vorliegt oder nicht. p53 ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen, dessen Funktionsverlust Krebsentstehung begünstigt. Im finalen multivariablen Modell der fünf genannten Faktoren betrug die Hazard-Ratio (Konfidenzintervall in Klammern) für Mutation bzw. Deletion von TP53 im

---

Trainingsdatensatz 4.2 (3.2-5.5), im Validierungsdatensatz 3.3 (2.4-4.5), MAYO 4.0 (2.4-6.7) und SCAN 3.6 (2.2-6.0).

**IgHV** bezeichnet die variable Region der schweren Immunglobulinkette, die in gesunden B-Zellen zwecks Antikörperdiversität einer somatischen Hypermutation unterliegt. Mutationen im IgHV stehen für eine bessere, unmutierte IgHV für eine schlechtere Prognose bei der CLL wie auch in anderen B-Zell-Neoplasien (Forconi et al. 2009; Patten et al. 2012). Im finalen Modell der Metaanalyse betrug die Hazard-Ratio (Konfidenzintervall in Klammern) für unmutiertes IgHV im Trainingsdatensatz 2.6 (2.1-3.2), im Validierungsdatensatz 2.1 (1.5-2.8), MAYO 2.2 (1.5-3.1) und SCAN 3.8 (3.6-5.2).

Für das **Alter** betrug die Hazard-Ratio (Konfidenzintervall in Klammern) für Patienten über 65 Jahre im Trainingsdatensatz 1.7 (1.4-2.1), im Validierungsdatensatz 1.6 (1.3-2.2), MAYO 2.2 (1.6-2.2) und SCAN 2.5 (1.9-3.3).

**$\beta_2$ -Mikroglobulin** ist Bestandteil des MHC-1-Komplexes auf antigenpräsentierenden Zellen (Sreejit et al. 2014) und kommt als Bestandteil der  $\beta$ -Globulinfraktion im Blut vor. Labormedizinisch ist es als Tumormarker relevant. Für die Konzentration von  $>3.5\text{mg/l}$  im Blutserum betrug die Hazard-Ratio (Konfidenzintervall in Klammern) im Trainingsdatensatz 2.0 (1.6-2.4), im Validierungsdatensatz 1.6 (1.2-2.1), MAYO 2.2 (1.5-3.1) und SCAN 1.6 (1.1-2.3).

Für die **klinischen Stadien Rai I-IV bzw. Binet B- C** betrug die Hazard-Ratio (Konfidenzintervall in Klammern) im Trainingsdatensatz 1.6 (1.3-1.9) und im Validierungsdatensatz 1.9 (1.4-2.8). In den externen Validierungsstudien wurde nicht die exakt gleiche Stadiengruppe definiert, sodass die Werte deren Hazard Ratio hier nicht aufgeführt werden.

Die Faktoren wurden gewichtet und darauf aufbauend eine Klassifikation mit vier Kategorien wie folgt erstellt:

Prognosefaktor	Punkte	Prognosestadium	Punktescore
TP53	4	Niedriges Risiko	0-1
IgHV	2	Mittleres Risiko	2-3
Alter	1	Hohes Risiko	4-6
$\beta_2$ -Mikroglobulin	2	Sehr hohes Risiko	7-10
Klinisches Stadium	1		

Tabelle 3: Prognosekriterien und darauf aufbauende Prognosestadien nach CLL-IPI

Für die endgültige unten dargestellte prognostische Überlebensgrafik (siehe Abb. 8) betragen die 5-Jahres- bzw. 10-Jahres-Überlebensraten für die Niedrigrisikogruppe 93.2% (90.5-96.0) und 79.0% (71.8-86.3), für die Mittelrisikogruppe 79.3% (75.5-83.2) und 39.2% (31.0-47.4), für die Hochrisikogruppe 63.3% (57.9-68.8) und 21.9% (14.2-29.6) und für die Sehrhochrisikogruppe 23.3% (12.5-34.1) und 3-5%.

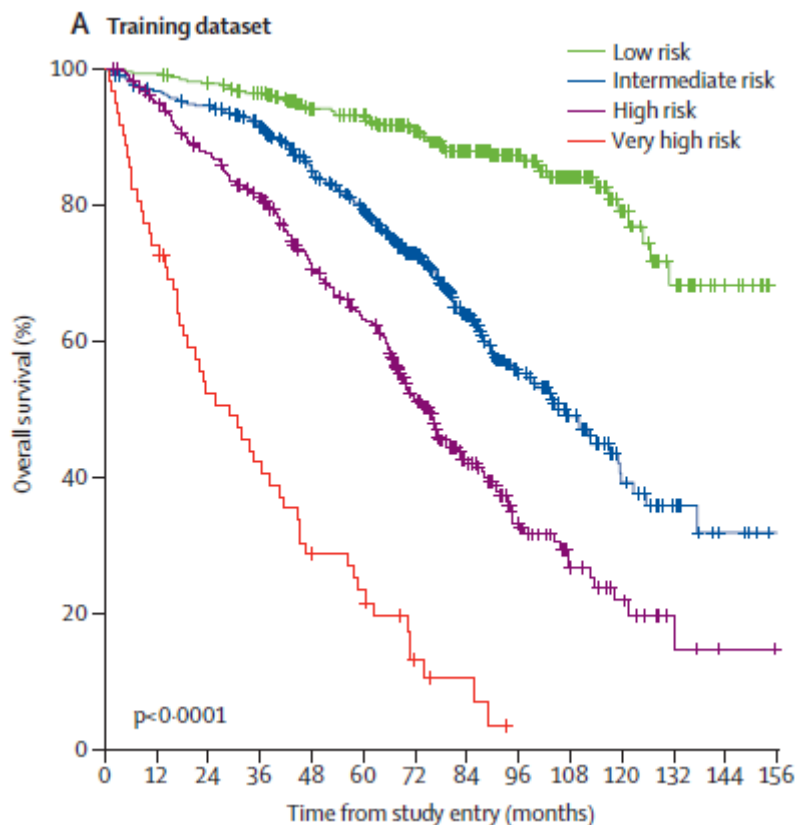


Abbildung 8: : Überlebensgrafik der CLL-Patienten der unterschiedlichen Risikogruppen; Entnommen aus: <https://www.onkopedia.com/de/wissensdatenbank/wissensdatenbank/chronische-lymphatische-leukaemie-ctl/v34-gregor-92-vortrag.pdf>

## 1.5 Signaltransduktion am B-Zell-Rezeptor

### 1.5.1 Physiologie des B-Zell-Rezeptors in gesunden B-Zellen

Die Signaltransduktion am B-Zell-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle für das Überleben und die Funktion der B-Zelle. Er besteht aus einem für jede B-Zelle einzigartigen zellmembranständigen heterotetrameren Antikörper, der aus zwei schweren Ketten  $\mu$  oder  $\delta$  (IgM oder IgD) und zwei leichten Ketten der Isoformen  $\lambda$  oder  $\kappa$  zusammengesetzt ist. Gekoppelt ist der Antikörper mit einer  $Ig\alpha$ -Kette (CD79a) und einer  $Ig\beta$ -Kette (CD79b), die in ihrem zytoplasmatischen Anteil immunrezeptortyrosin-

---

basierte Aktivierungsmotive (ITAMs) beinhalten. Diese ITAMs können nach Antigenbindung signalübertragend phosphoryliert werden und sind für die B-Zelle überlebenswichtig (Schweighoffer und Tybulewicz 2017). Für die Phosphorylierung sind die Tyrosinkinase Lyn (Src Kinase; lymphocyte kinase) und Syk (Rezeptortyrosinkinase) zuständig. Syk phosphoryliert schwerpunktmäßig die ITAMs, während Lyn eher verstärkt weitere Tyrosinkinase rekrutiert und die Komplexformierung mit CD19 moderiert, sodass beide die Rezeptoraktivität erhöhen (Woyach et al. 2012). An die phosphorylierten ITAMs bindet dann Syk selbst, das dadurch seinerseits aktiviert wird. Weiterhin lagern sich BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) und B-Cell Linker (BLNK) an und an letzterem dann die Phospholipase C  $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) an. Im weiteren Verlauf der Aktivierung bilden sich B-Zell-Rezeptoraggregate, Mikrocluster und enge Formationen mit dem ebenfalls zellmembranständigen Protein CD19 (Woyach et al. 2012; Mócsai et al. 2010).

Die gemeinsame für die Zelle überlebenssichernde Wirkung können über mehrere Teilwege der Signaltransduktion erzielt werden: Durch die Interaktion mit Syk, BTK und BLNK bedingt spaltet die PLC $\gamma$ 2 PIP $_2$  zu DAG und IP $_3$ . DAG aktiviert die Proteinkinase C, während IP $_3$  den Einstrom von Ca $^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum bzw. aus dem extrazellulären Raum ins Zytosol ermöglicht. Der Ca $^{2+}$ -Einstrom aktiviert direkt die Transkriptionsfaktoren NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) und Jun. Die Proteinkinase C greift in den MAP-Kinase-Weg (MAP, *mitogen-activated protein*) ein und führt zur vermehrten Aktivierung von myc, Jun und ATF2. Durch Rekrutierung der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85 an die Zellmembran durch die Src-Kinasen Lyn und Fyn (*fibroblast yes-related non receptor kinase*) in Folge der BCR-Aktivierung wird ein weiterer Signalweg eingeschlagen. Lyn phosphoryliert CD19, das seinerseits gemeinsam mit p85 die katalytische PI3K-Untereinheit p110 aktiviert, sodass die PI3K daraufhin PIP $_2$  zu PIP $_3$  umsetzen kann, sowie in der Folge AKT und NF $\kappa$ B aktiviert (siehe Abb. 9). PIP $_3$  wiederum rekrutiert weitere BTK (Woyach et al. 2012). Die BTK phosphoryliert und inaktiviert ähnlich wie AKT den NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B, wodurch vermehrt NF $\kappa$ B in den Zellkern wandern und als Transkriptionsfaktor wirken kann.

Alle Signalwege münden zusammenfassend in die gemeinsame Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B, NFAT, myc, Jun und ATF2 (*Activating transcription factor-2*), die in ihrer Funktion für das Zellüberleben verantwortlich sind (siehe Abb. 9).

Um einer dauerhaften Überaktivierung der BCR-Kaskade entgegenzuwirken, gibt es in gesunden B-Zellen auch negativ regulatorische Proteine wie z.B. das Fc $\gamma$ R11b, welches via einer integrierten Phosphatase beispielsweise die Bildung von PIP $_3$  rückgängig macht und die Membranbindung von BTK, PLC $\gamma$ 2 und AKT aufhebt. Dadurch wird die Wirkung des B-Zell-Signallings abgeschwächt (Woyach et al. 2012).

---

Untersuchungen zeigten, dass Deletionen im ITAM-Bereich der CD79a-Domäne in reifen B-Zellen passend dazu zu einem raschen Zelltod führten (Schweighoffer und Tybulewicz 2017). Da das Fehlen des BCR-Rezeptors bzw. einer seiner Bestandteile also offenbar mit dem Überleben der Zelle nicht vereinbar ist, es allerdings kein Antigen gibt, das bei gegebenem B-Zell-Rezeptor-Polymorphismus sämtliche B-Zellen ausreichend stimulieren kann, wird angenommen, dass eine antigenunabhängige tonische Aktivität des Rezeptors das Zellüberleben sichert (Schweighoffer und Tybulewicz 2017; Srinivasan et al. 2009). Experimente mit BCR<sup>-/-</sup>-Mäusen hierzu haben ergeben, dass diese konstitutive Aktivität auf PI3K zurückzuführen ist, der den proapoptogenen Transkriptionsfaktors FOXO1 wirksam supprimiert und so das Zellüberleben sicherstellt (Srinivasan et al. 2009).

### **1.5.2 Veränderungen in der Signaltransduktion bei B-CLL-Zellen**

Der B-Zell-Rezeptor auf malignen Zellen ist tonisch und konstitutiv aktiviert. Bei der CLL beispielsweise treten in der Signalkaskade für die im Vergleich zu gesunden B-Zellen BCR-Überaktivierung verantwortliche Unterschiede auf. Im Vergleich zum Signalling beim B-Zell-Rezeptor auf gesunden Zellen sind Lyn und Syk auf Proteinebene überexprimiert. Letzteres ist auch in kranken Zellen deutlich stärker phosphoryliert. Die Antigenstimulation des BCR auf Leukämiezellen fällt variabel aus. Verschiedene *in vitro* Versuche haben gezeigt, dass in CLL-Zellen durch gezielte Lyn- bzw. Syk-Blockade mittels individueller Inhibitoren die Apoptose eingeleitet wird.

Weiterhin ist die PI3-Kinase respektive der Akt-Signalweg in CLL-Zellen im Gegensatz zu gesunden Zellen fortwährend aktiviert, die beiden Inhibitoren LY294002 und CAL-101 konnten in *in vitro* Versuchen nachweislich die Apoptose in den malignen Zellen via bax-Inhibition (antiapoptogene bcl-2 Familie) einleiten.

Ein weiterer überaktiver Signalweg ist der MAPK-Signalweg, vermittelt über eine konstitutive Phosphorylierung von Erk. Auch NfκB ist in CLL-Zellen höher konzentriert und vermittelt die Überexpression anti-apoptotischer Gene. (Woyach et al. 2012)



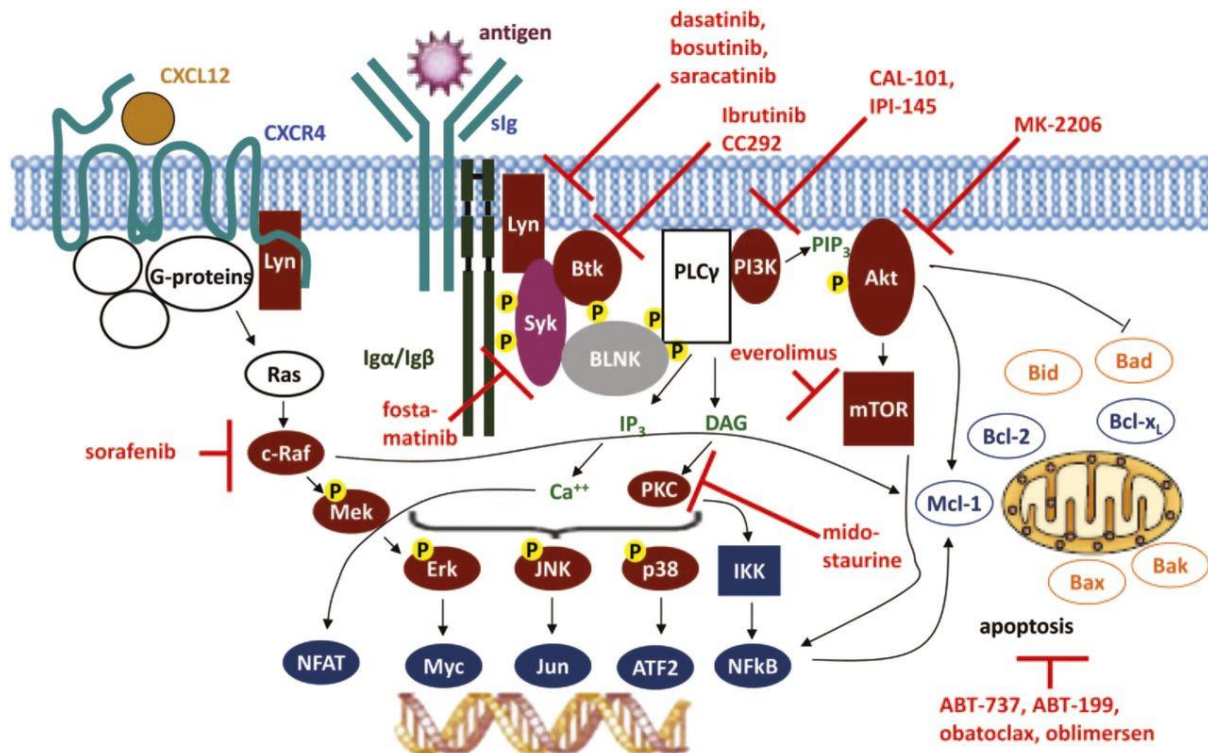


Abbildung 9: Signaltransduktion am B-Zell-Rezeptor und in die Kaskade eingreifende Medikamente: Zu sehen ist der membranständige B-Zellrezeptor mit assoziierter intrazellulärer Igα- und Igβ-Kette. In enger Assoziation mit dem Rezeptor stehen Syk, Lyn, BTK, BLNK und PLCγ. Das bei der Behandlung der CLL eingesetzte Ibrutinib blockiert die BTK, Idelalisib ist hier unter seinem Synonym CAL-101 eingezeichnet und entfaltet seine Wirkung als Hemmstoff der PI3K. Dasatinib, das in Phase 2 Studien für die CLL getestet wird und im Zuge dieser Arbeit bei der Hemmung von proliferierenden CLL-Zellen Anwendung findet, blockiert unter anderem wie hier eingezeichnet Lyn. Syk = Spleen tyrosine kinase; BTK = Bruton Tyrosinkinase; BLNK = B-cell linker protein; PLCγ = Phospholipase Cγ; CLL = Chronisch Lymphatische Leukämie; PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase) Entnommen aus: (Hallek 2013)

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der bisher weitgehend unbekannt Zusammenhänge zwischen dem Protein TRPM7 und der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL). Von besonderem Interesse ist dabei eine mögliche, funktionelle Überexpression von TRPM7 in chronischen Leukämiezellen, was über die Messung von TRPM7 vermittelten Ionenströmen in CLL-Zellen und gesunden B-Zellen ermittelt werden soll. Diese TRPM7-Ströme sollen unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen evaluiert werden. Weiterhin soll die Auswirkung der pharmakologischen Inhibition von TRPM7 auf die Proliferation von CLL-Zellen untersucht werden. Hierbei kommt ein multimethodischer Ansatz aus zellbiologischen, durchflusszytometrischen und elektrophysiologischen Arbeitstechniken zum Einsatz, um folgende Fragen zu klären:

1. Wie verhält sich die TRPM7-Kanalaktivität in aktivierten und proliferierenden CLL-Zellen im Vergleich zu unstimulierten CLL-Zellen und inwiefern verändert sich diese während der

Aktivierung der CLL-Zellen in den ersten drei Tagen? Gibt es Unterschiede in der TRPM7-Kanalaktivität in stimulierten CLL-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen im Zeitverlauf?

2. Ist die TRPM7-Kanalaktivität in unstimulierten CLL-Zellen verglichen mit gesunden B-Zellen erhöht? Inwiefern verändert sich die TRPM7-Kanalaktivität in kranken als auch in gesunden B-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin?
3. Kann die Aktivierung und Proliferation von CLL-Zellen durch pharmakologische Inhibition von TRPM7 nachweislich beeinflusst werden? Kann ein synergistischer Effekt zwischen TRPM7-Inhibitoren und etablierten Tyrosinkinasehemmern erzielt werden?

Die experimentellen Ergebnisse sollen danach in einen wissenschaftlichen Kontext zur bestehenden Literatur eingebettet werden und überprüfen, ob und inwieweit die in der Einleitung geschilderte Bedeutung von TRPM7 bei anderen Krebsarten auch auf die CLL zutrifft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Geräte

Artikel	Hersteller
<b>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)tetraessigsäure (EGTA)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Fetales Kälberserum</b>	Life Technologies GmbH
<b>Gelatinepulver (Gelatine from porcine skin)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Interleukin 2</b>	PeptoTech
<b>Ionomycin</b>	Alomone labs
<b>L-Asparagin</b>	Sigma-Aldrich
<b>L-Glutaminsäure</b>	Sigma-Aldrich
<b>Magnesiumchlorid (Lösung)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Natriumpyruvat</b>	Sigma-Aldrich

<b>NS8593</b>	Sigma-Aldrich
<b>Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)</b>	Sigma-Aldrich
<b>RPMI 1640 Medium</b>	Sigma-Aldrich
<b>Trypanblau</b>	Sigma-Aldrich
<b>B-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich
<b>MEM nonessential amino acids</b>	Sigma-Aldrich
<b>Penicillin/Streptomycin (PenStrep)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Pipetten ( Eppendorf Research Plus)</b>	Eppendorf
<b>Kulturflaschen, Falcons, Well Plates</b>	Sarstedt
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Carl Roth
<b>Inkubator (Galaxy 170S)</b>	Eppendorf (New Brunswick)
<b>Wasserbad</b>	Memmert
<b>Zentrifuge Zellkultur (Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge)</b>	Thermo Scientific
<b>Zentrifuge im FACS Raum (Centrifuge 5804R)</b>	Eppendorf
<b>Puller (PatchClamp)_DMZ-Universal Puller</b>	Zeitz
<b>Patchpipetten (GB 150T-8P with Filament)</b>	Science Products
<b>Berner Flow Safe®</b>	Berner International GmbH
<b>FCS (Guava easyCyte)</b>	Merck Millipore
<b>Guava Via Count®</b>	Merck Millipore
<b>Guava ICF® Instrument Cleaning Fluid</b>	Merck Millipore
<b>Axiovert 35M Mikroskop</b>	Zeiss
<b>Natriumpyruvat</b>	Sigma-Aldrich
<b>MEM NEEA</b>	Sigma-Aldrich
<b>CpG-Motif</b>	Metabion
<b>Histopaque®-1077</b>	Sigma-Aldrich
<b>FcR Blocking Reagent (Human)</b>	Miltenyi Biotec
<b>Dasatanib</b>	Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti-Human CD19 HIB19 APC</b>	Affymetrix eBioscience
<b>Anti-Human CD5 UCHT2 PE</b>	Affymetrix eBioscience
<b>Anti-Human CD80 2D10.4 FITC</b>	Affymetrix eBioscience
<b>Anti-Human CD86 IT2.2 PE</b>	Affymetrix eBioscience
<b>D-Glucose</b>	Sigma-Aldrich
<b>Natriumchlorid</b>	Sigma-Aldrich

Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Cesiumhydroxid	Sigma-Aldrich
glisseal®HV	Borer Chemie AG
pH-meter	Mettler-Toledo
Vortex (Vortex-Genie® 2)	Scientific Industries, Inc.
Waage	Sartorius Analytic
DMSO	Carl Roth
EasyPet	Eppendorf
Patch Clamp EPC10 USB	HEKA Elektronik

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Geräte mit jeweiligem Hersteller

## 2.1.2 Puffer- und Patch-Clamp-Lösungen

### FACS-Puffer:

0.5L PBS

2mM EDTA

2% FBS

### B-Cell-Enrichment Kit Puffer:

0.5L PBS

1mM EDTA

2%FBS

### Patch-Clamp

Für die Patch-Clamp-Versuche waren zwei verschiedene Arten von Lösungen erforderlich. Interne Lösungen, die sich in ihrer Zusammensetzung am intrazellulären Milieu orientierten und analog dazu eine externe Lösung, die das extrazelluläre Milieu nachbildete. Die Lösungen (intern stets 2ml) wurden mit dem pH-Meter und Osmometer nach Herstellung geprüft. Zielwerte waren bezüglich des pH 7,2 und bezüglich der Osmolarität 290 mosmol/l. Im Falle der magnesiumhaltigen internen Lösungen wurde zur Berechnung der exakten Pipettiermengen zum Erhalt der gewünschten Konzentrationen die Website WebMaxC Standard verwendet. Für 250µM Endkonzentration *freies* Mg<sup>2+</sup> berechnete

---

WebMaxC eine erforderliche Ausgangskonzentration von 0.38mM  $MgCl_2$ , für 1.5mM Endkonzentration  $Mg\bullet ATP$  waren es 2,71mM  $MgCl_2$  und 2.15mM  $Mg\bullet ATP$ .

**Standardinterne Lösung  $Mg^{2+}$ -frei:**

1.7ml 120mM Cäsiumglutamat-Ringer (in mM: 120 Cs-glutamate, 8 NaCl, 10 HEPES)  
200 $\mu$ l EGTA (Endkonzentration: 10 mM)  
100 $\mu$ l EDTA (Endkonzentration: 5 mM)

**Interne Lösung mit 250 $\mu$ M  $Mg^{2+}$ :**

1.7324ml 140 mM Cäsiumglutamat-Ringer (in mM: 140 Cs-glutamate, 8 NaCl, 10 HEPES)  
200 $\mu$ l EGTA (Endkonzentration: 10 mM)  
60 $\mu$ l EDTA (Endkonzentration: 3 mM)  
7.6 $\mu$ l  $Mg^{2+}$  (1:10 verdünnt aus 1M-Stammlösung; Endkonzentration: 0.38 mM)

**Interne Lösung mit 1.5mM  $Mg\bullet ATP$ :**

1.6276ml 120 mM Cäsiumglutamat-Ringer  
200 $\mu$ l EGTA (Endkonzentration: 10 mM)  
60 $\mu$ l EDTA (Endkonzentration: 3 mM)  
54.2 $\mu$ l  $Mg^{2+}$  (1:10 verdünnt aus 1M-Stammlösung; Endkonzentration: 2,71 mM)  
58.2 $\mu$ l  $Mg\bullet ATP$  (74mMolare-Aliquots; Endkonzentration: 1.5 mM)

**Standardexterne Lösung  $Mg^{2+}$ -frei:**

25ml Na-Ringer  $\emptyset Mg^{2+}/Ca^{2+}$  (in mM: 140 NaCl, 2.8 KCl, 10 HEPES-NaOH)  
50mg Glukose (Endkonzentration: 11 mM)  
69 $\mu$ l  $CaCl_2$  (Endkonzentration: 3mM)

### **2.1.3 Verwendete Zellen und Nährmedien**

CLL-Samples aus Patientenblut von Erkrankten, sowie MOCK-transfizierte Fibroblasten wurden durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Richard Greil vom Salzburg Cancer Research Institute zur Verfügung gestellt und uns für die Experimente auf Trockeneis zugeschickt. Die nachfolgende Tabelle 5 illustriert die biologische und klinische Charakteristik der verwendeten Patientenproben. **In den Abbildungsbeschreibungen im Ergebnisteil der Arbeit werden die Nummern der jeweils verwendeten CLL-Samples ausgewiesen.**

Nummer (Nr.)	Sample-ID	Proben-datum	Geschlecht	Geburts-jahr	ZAP-70	IgVH-Status	FISH	CD38	Behandlungs-status
1.	9152	31.03.2014	m	1944	niedrig	M	del13q	niedrig	unbehandelt
2.	9153	31.03.2014	m	1949	niedrig	M	unauffällig	niedrig	unbehandelt
3.	9158	03.04.2014	w	1930	hoch	M	del13q; tri12	niedrig	unbehandelt
4.	9172	11.04.2014	w	1939	niedrig	M	del13q	niedrig	behandelt
5.	9175	15.04.2014	k. A.	1971	hoch	UM	del13q	niedrig	behandelt
6.	9178	16.04.2014	w	1959	hoch	M	del13	niedrig	unbehandelt
7.	9184	22.04.2014	w	1935	niedrig	M	del13q; del17p	niedrig	unbehandelt
8.	9186	22.04.2014	m	1931	niedrig	k. A.	del11q	hoch	behandelt
9.	9187	23.04.2014	w	1939	niedrig	k. A.	del6q; del13q	niedrig	k. A.
10.	9190	24.04.2014	w	1963	hoch	M	unauffällig	niedrig	unbehandelt
11.	371	k. A.	m	1953	niedrig	M	del 13q	niedrig	unbehandelt
12.	671	k. A.	m	1939	hoch	UM	del 13q	niedrig	behandelt
13.	707	k. A.	m	1947	hoch	UM	del 13q	niedrig	behandelt
14.	743	k. A.	w	1945	niedrig	M	del 13q	niedrig	unbehandelt
15.	12348	26.07.2017	m	1959	niedrig	M	del 13q	niedrig	behandelt
16.	12342	26.07.2017	m	1957	niedrig	M	del13q, del17p	niedrig	unbehandelt
17.	12387	08.08.2017	m	1947	hoch	M	del13q, del17p	niedrig	behandelt
18.	12390	08.08.2017	m	1949	niedrig	M	k. A.	niedrig	unbehandelt
19.	12392	08.08.2017	w	1951	niedrig	M	del 13q	niedrig	unbehandelt

*Tabelle 5: Biologische und klinische Charakteristik der verwendeten Patientenproben. m = männlich; w = weiblich; M = Mutiert; UM = Unmutiert; k. A. = keine Angabe*

Die B-Zellen wurden aus Vollblut gewonnen, dies wurde von Prof. Dr. Markus Sperandio, LMU, zur Verfügung gestellt.

**MOCK-Fibroblastenmedium:**

0.5L DMEM-Medium

10% FBS

1% Pen/Strep

**B-Zellen/ CLL-Medium:**

0.5L RPMI 1640

10% FBS

50 IU/ml Pen/Strep

1µmol/l Na-pyruvate 1 µmol/L

2µmol/l L-glutamine

20µg/ml L-asparagine 20 µg/mL

0.05µmol/l 2-mercaptoethanol 0.05 µmol/L

10µmol/l HEPES 10 µmol/L

**2.1.4 Guava ViaCount und Fluoreszenzfarbstoffe**

Antigen	Label	Hersteller
CD 5	PE	Affymetrix eBioscience
CD 19	HIB19 APC	Affymetrix eBioscience
CD 80	FITC	Affymetrix eBioscience
CD 86	PE-Cy5.5	Affymetrix eBioscience
<b>Lösungen</b>		<b>Hersteller</b>
<b>Guava ViaCount</b>		Merck
<b>FcR-Blocking Solution human</b>		Miltenyi

*Tabelle 6: Die unterschiedlich verwendeten Antikörperkonjugate sowie die Lösungen für die Ermittlung der Zellzahlen in den Proben (Guava ViaCount) und die Blockade unspezifischer Bindungsstellen (FcR-Blocking Solution) mit jeweiligem Hersteller.. CD = Cluster of Differentiation; APC = Allophycocyanin; PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoreszeinisothiocyanat; PE-Cy5.5 = Phycoerythrin-Cyanine 5.5*

---

### **2.1.5 PT-stabilisiertes Oligodesoxynukleotid DSP30 und Interleukin 2**

Für den Proliferationsassay wurde das synthetische phosphorothiazid-stabilisierte Oligodesoxynukleotid DSP30 von Metabion verwendet. Die Sequenz von DSP30 lautet 5`-TCG-TCG-CTG-TCT-CCG-CTT-CTT-CTT-GCC-3'. Interleukin 2 wurde von der Firma PeproTech bezogen.

### **2.1.6 Inhibitoren**

#### **2.1.6.1 Dasatinib**

Es wurde der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib von der Firma Santa Cruz Biotechnology verwendet.

#### **2.1.6.2 NS8593**

Es wurde der TRPM7-Hemmstoff NS8593 von der Firma Sigma Aldrich verwendet.

### **2.1.7 B Cell Enrichment Kit**

Für die Anreicherung von B-Zellen aus den aus Vollblut gewonnenen PBMCs wurde der EasySep™ Human B Cell Enrichment Kit without CD43 Depletion von STEMCELL TECHNOLOGIES verwendet.

### **2.1.8 Computersoftware**

#### **2.1.8.1 Microsoft Excel und SPSS**

Für die statistische Auswertung sämtlicher Daten wurden Microsoft Excel von Microsoft Office in der Version des Jahres 2013 verwendet und SPSS von der Softwarefirma IBM.

#### **2.1.8.2 InCyte Software für Guava® easyCyte HT Systems**

Sowohl die Färbungen als auch die Zellzahl-Erhebung wurden mittels Durchflusszytometer durchgeführt. Es wurde mit der 32bit-Version der ersten Generation InCyte Software für Guava® easyCyte HT Systems gearbeitet. Im Programmmodus ViaCount konnte die Zellzählung stattfinden, im Programmmodus Incyte wurden die Färbungen grafisch dargestellt.

#### **2.1.8.3 HEKA-Patchmaster und FitMaster**

Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit der HEKA-Patchmaster Software von Havard Bioscience erfasst und die Rohdaten auf dem Computer am elektrophysiologischen SetUp gespeichert. Die gespeicherten Daten wurden dann in der FitMaster-Software geöffnet und konnten von dort aus exportiert werden für die Auswertung im Programm IgorPro



---

#### **2.1.8.4 Igor Pro (WaveMetrics)**

In IgorPro von Wavemetrics wurden sowohl primär die elektrophysiologischen Messdaten als auch die in Microsoft Excel enthaltenen Daten der Durchflusszytometrie zusammengeführt und grafisch dargestellt. Sämtliche Grafiken und Balkendiagramme im Teil Ergebnisse stammen somit aus IgorPro. Die in Excel ermittelten statistischen Signifikanzen wurden ebenfalls optisch in die Balkendiagramme in Igor eingepflegt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

Vorbemerkung: Gearbeitet wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank im Zellkulturraum nach den S1-Richtlinien der Biostoffverordnung. Überschüssiges Material, anfallende biologische Abfälle sowie verbrauchte Materialien wurden fachgerecht entsorgt.

#### **2.2.1.1 Mock Fibroblasten**

##### **2.2.1.1.1 Auftauen der MOCK-Fibroblasten**

Für den Auftauvorgang wurden zunächst 6ml kaltes PBS in ein 15ml Falcon überführt. Die Kryotuben mit den bei -80°C tiefgefrorenen MOCK-Fibroblasten wurden im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schwenken aufgetaut und daraufhin mit einer 2ml-Pipette mittels Pipetboy in das Falcon eingelassen und auf- und abpipettiert. Während die Zellsuspension bei 20°C und 1000 rpm 5 Minuten zentrifugiert wurde, wurde das Fibroblasten-Medium im Wasserbad erwärmt. Der Überstand wurde mittels Pumpe abgesaugt und das Zellpellet im warmen Fibroblastenmedium resuspendiert und nach Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer in eine bzw. mehrere mit 12 ml Medium gefüllte T75-Kulturflaschen in der Konzentration  $5 \times 10^5$ /ml überführt. Die Kulturflaschen wurden in den Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt.

##### **2.2.1.1.2 Passagieren der MOCK-Fibroblasten**

Nach 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen, sofern Sie nicht unmittelbar für Experimente verwendet wurden, gesplittet und in neue Kulturflaschen überführt. Hierzu wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und die adhärenen Zellen zunächst mit je 4ml warmen PBS dreimal gewaschen und sodann mit 1.5ml Trypsin gespült. Nach einminütiger Inkubation unter leichtem Schwenken der Kulturflasche wurden 7ml aufgewärmtes frisches Fibroblasten-Medium mittels Pipetboy mit leichtem Druck auf den Kulturflaschenboden auf- und abpipettiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und bei 20°C und 200 RCF 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 500µl Medium resuspendiert. Nach Zellzählung

---

in der Zählkammer wurde die Zellsuspension in der Konzentration  $5 \times 10^5$ /ml auf eine bzw. zwei neue mit je 12 ml Medium gefüllte Kulturflaschen verteilt und die übriggebliebene Zellsuspension verworfen bzw. eingefroren. Die Kulturflaschen wurden abschließend in den Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt.

#### **2.2.1.1.3 Einfrieren der MOCK-Fibroblasten**

Mock-Fibroblasten, die nicht für Versuche herangezogen worden sind oder in Kultur behalten werden sollten, wurden eingefroren. Hierzu wurden Mock-Fibroblasten aus der Suspension mit DMEM (+10%FBS) auf 5ml aufgefüllt und mit 500µl DMSO versetzt. DMSO verhindert beim Einfrieren mechanische Zellschädigungen durch spitze Eiskristalle. Die erhaltene Suspension wurde zu je 1ml in Kryotuben überführt und bei -80°C eingefroren.

#### **2.2.1.2 CLL Proliferationsassay über 3 Tage**

##### **2.2.1.2.1 Coaten und Aussähen der Fibroblasten auf 24er Wellplatten**

Die CLL-Proliferation wurde in enger methodischer Anlehnung an diejenige von (Decker et al. 2000b) durchgeführt: Es wurden am Vortag des eigentlichen Experiments je nach Versuchsreihe unterschiedliche Anzahlen an Einsenkungen einer 24er Wellplatten mit 500µl 2%iger Gelatinelösung pipettierend überzogen und für 1 Stunde in den Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Die überschüssige Gelatine wurde durch vorsichtiges Absaugen entfernt, sodass in den jeweiligen Wells eine dünne gecoatete Bodenschicht übrig blieb. Daraufhin wurden Fibroblasten in ihrem Medium in die Wells ausgesät. Die Konzentration von  $5 \times 10^4$ /ml wurde bewusst niedrig gehalten, um eine Überwachung der Fibroblastenzahl über den mehrtägigen Verlauf des Experiments zu vermeiden.

##### **2.2.1.2.2 Aussähen der CLL-Zellen und Behandlung mit DSP30 + II-2 + Inhibitoren**

24 Stunden nach dem Aussähen wurde an Tag 0 das überstehende Fibroblasten-Medium in den Wells wieder abgesaugt, da sich die Zellen inzwischen in die Gelatineschicht abgesenkt hatten. Die CLL-Proben (Kooperation mit Prof. Dr. Richard Greil, Salzburg Research Cancer Institute, Salzburg) wurden zum Auftauen in den Kryotuben im Wasserbad bei 37°C leicht geschwenkt und in 6 ml kaltes PBS in einem 15ml Falcon überführt, bei 20°C und 300 G (Relative Centrifugal Force (RCF)) 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 300µl warmen PBS resuspendiert, von denen 20µl abgezweigt und mit 380µl GuavaViaCount-Lösung zwecks Zellzählung zusammenpipettiert wurde. Weitere 80µl wurden für die FACS-Färbungen abgezweigt. Die entstandene 400µl Gesamtlösung wurde für 5 Minuten inkubiert und sodann mithilfe des Programmteils ViaCount der Guava Incyte Software von Millipore am gleichen Durchflusszytometergerät mit angeschlossenem PC ausgewertet, mit dem auch die

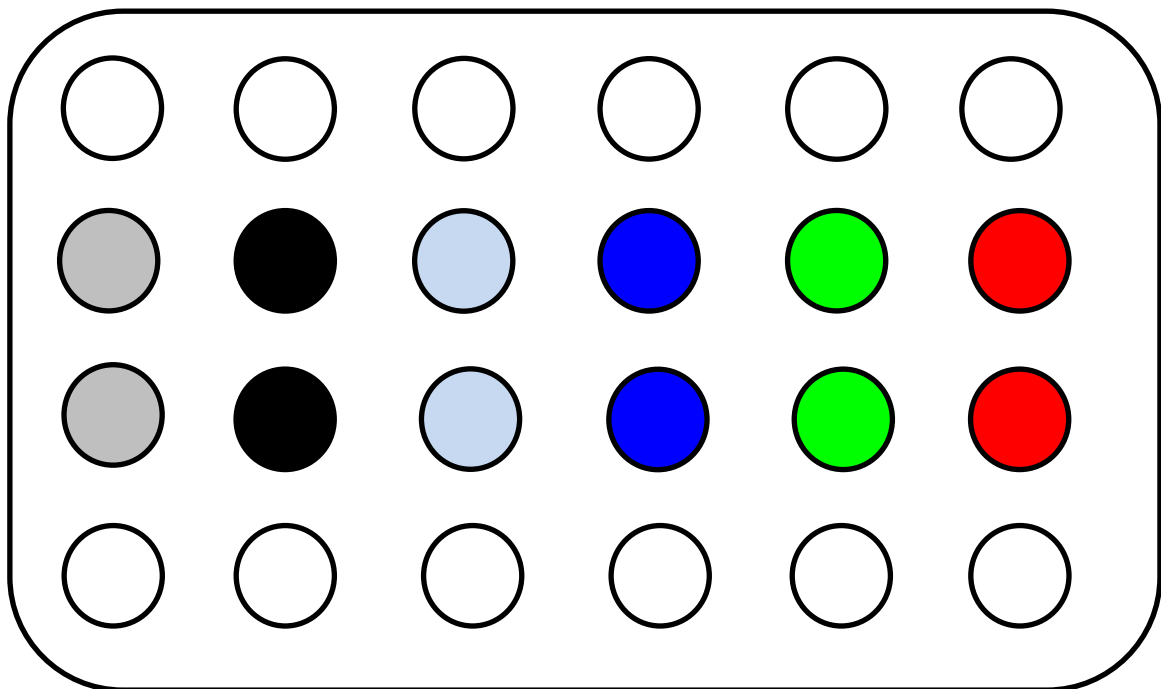
---

Antikörperfärbungen der Zellen wie nachfolgend in 2.2.2.3 und 2.2.2.4 geschildert erfasst wurden. Dabei wurden sowohl die absolute Anzahl der lebenden als auch toten Zellen in der Probe und die viable Zellkonzentration erhoben. Die Daten wurden vom Programm automatisch in eine Microsoft-Excel-Datei überführt. Der Zählvorgang blieb stets methodisch gleich und wurde, wann immer in den folgenden Abschnitten erwähnt, auf die beschriebene Art durchgeführt.

Nachdem in die Wells je 1ml CLL-Medium vorgelegt wurde, wurden die resuspendierten CLL-Zellen gleichmäßig in der Konzentration  $5 \times 10^5$ /ml ausgesät. In die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden die für die Stimulation und Proliferation sowie für deren Inhibition verantwortlichen Substanzen zugesetzt. Überschüssige Zellen in der restlichen Suspension (200 $\mu$ l) wurden für die Patch-Clamp-Messungen an Tag 0 herangezogen.

Das Oligodesoxynukleotid DSP30 fungiert als Toll-Like-Rezeptor 9-Agonist und aktiviert über eine nachgeschaltete intrazelluläre Signalkaskade u.a. B-Lymphozyten. Nach Zugabe der Agenzien wurde die 24er Wellplatte in den Inkubator gestellt und für die jeweils für die Experimente benötigte Zeit von 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert.

Im Folgenden (Abb. 10) ist das typische Pipettierschema einer 24er Wellplatte abgebildet. Für DSP30 wurde eine Konzentration von 10 $\mu$ M/ml, für IL-2 2ng/ml, für NS je 10 und 30 $\mu$ M, für die Kombination aus NS und Dasatinib 10 $\mu$ M und 0.5 $\mu$ M und für Dasatinib 0.5 $\mu$ M verwendet.



---

Abbildung 10:: 24er Wellplatte mit Pipettierschema für die CLL-Probe eines Patienten. Die oberste und unterste Reihe der Platte blieben unbenutzt, die mittleren gefüllt dargestellten Wells zeigen zwei angelegte Versuchsreihen eines Patienten an. Eine Reihe diente für die Färbungen bzw. Durchflusszytometrie und die andere für das jeweilige Patch-Clamp-Experiment.

**Grau = Kontrolle (CLL nur in Medium ohne weitere Agenzien)**

**Schwarz: DSP30 + IL-2**

**Hellblau: DSP30 + IL-2 + NS10**

**Dunkelblau: DSP30 + IL-2 + NS30**

**Grün: DSP30 + IL-2 + NS10 + 0.5D**

**Rot: DSP30 + IL-2 + 0.5D**

### **2.2.1.2.2 Ernten der stimulierten Zellen nach 3 Tagen**

Die Vorgehensweise zum Ernten der Zellen war identisch, unabhängig ob die Zellen nach 24, 48 oder erst nach 72 Stunden geerntet wurden. Das CLL-Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 1ml frischem, warmen CLL-Medium mit leichtem Druck aus der Gelatineschicht herausgelöst, bei 300 G (RCF) und 20°C 10 Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in 100µl FACS-Puffer gelöst, wenn es für Färbungen für die Durchflusszytometrie oder Zellzählung verwendet wurde, oder im Medium resuspendiert und auf Coverplates ausgesät, wenn die Zellen für Patch-Clamp-Messungen vorgesehen waren.

### **2.2.1.3 B-Zell-Isolation aus Vollblut**

#### **2.2.1.3.1 Lymphoflotunterschichtung und Gradientenzentrifugation**

Für die Isolierung von Lymphozyten aus Blut hat sich in der praktischen Laborarbeit die Methode der Dichtegradientenzentrifugation bewährt. Das Grundprinzip der Methode besteht darin, dass die einzelnen Blutbestandteile sich beim Zentrifugationsvorgang aufgrund unterschiedlicher Dichte aufgeschichtet in einem Falcon anordnen. Eine von der Dichte her zwischen Lymphozyten und den restlichen zellulären Blutbestandteilen angesiedelte polysaccharide Trennflüssigkeit (hier Lymphoflot, wahlweise auch Ficoll) bildet nach der Zentrifugation die Zwischenschicht (s.u.).

Die B-Zellen wurden aus 80ml Vollblut von freiwilligen Spendern in Kooperation mit Prof. Dr. Markus Sperandio, Biomedizinisches Zentrum, LMU, München gewonnen. Nach Blutentnahme wurde das heparinisierte Vollblut in 50ml Falcons überführt, wobei vier Falcons mit einer 1:1 Verdünnung mit PBS gefüllt wurden (20ml PBS + 20ml Vollblut). In die Falcons wurden jeweils 10ml Lymphoflot mit dem Pipetboy vorsichtig unterschichtet, sodass sich eine vom Rest der Blut/PBS-Suspension klar abgegrenzte Lymphoflotschicht am Boden des Falcons befand. Da jede Schüttelbewegung die Schichtung potentiell zerstören könnte, wurden die Falcons einzeln langsam in die Zentrifuge eingelassen. Der Zentrifugationsvorgang fand bei 20°C und 600 rcf statt. Die Bremsfunktion wurde explizit ausgeschaltet, da ein abrupter Bremsvorgang unmittelbar den Gradienten zerstört hätte. Resultat war eine Schichtung des vorigen Gemischs mit Bildung eines „Lymphozytenrings“ (=PBMCs)

auf halber Höhe des Falcons. Abbildung 11 zeigt exemplarisch das Prinzip der Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile mittels Dichtegradientenzentrifugation.

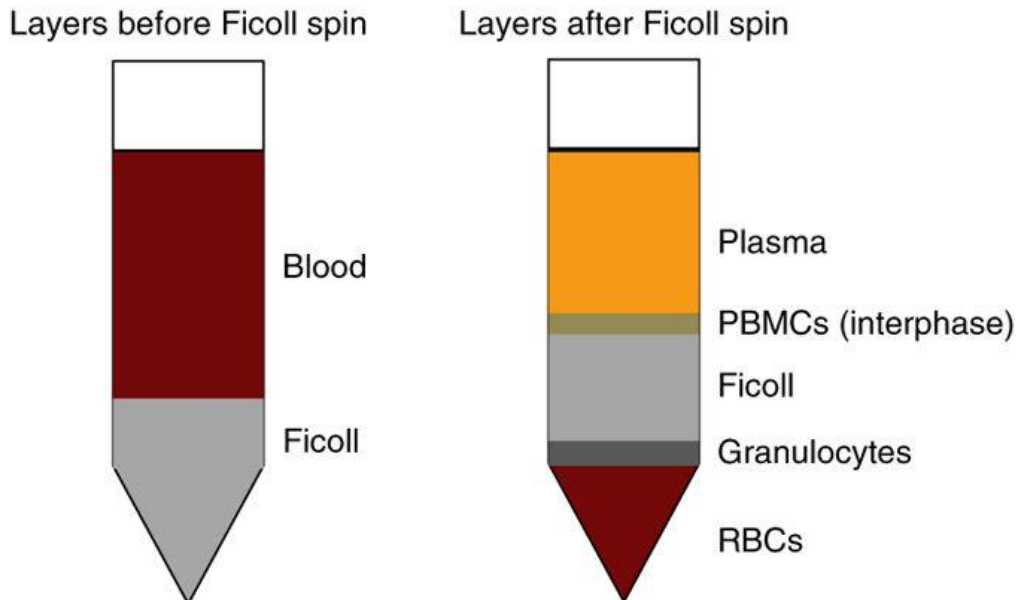


Abbildung 11: Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation: Dargestellt ist das Falcon links vor und rechts nach Zentrifugation mit Ficoll. Für die Arbeit wurde Lymphoflot verwendet, das allerdings das gleiche Resultat hervorruft. Zu sehen ist wie sich das Plasma mit seiner geringen Dichte nach Zentrifugation in der obersten Schicht befindet, dicht gefolgt vom „Lymphozytenring“ (=PBMCs). Die Trennlösung Ficoll bzw. Lymphoflot befindet sich genau zwischen den PBMCs und den restlichen zellulären Blutbestandteilen, die aufgrund der höchsten Dichte auf den Boden des Falcons sinken. (Lin et al. 2014)

#### 2.2.1.3.2 Waschung der gewonnenen PBMC-Schicht

Nachdem die Falcons behutsam aus der Zentrifuge genommen und zurück unter die Sicherheitswerkbank gebracht wurden, wurden die Lymphozytenringe vorsichtig abpipettiert und in ein neues 15ml Falcon überführt. Die Suspension wurde mit warmen PBS durchmischt und auf 15 ml aufgefüllt, bevor das Falcon 10 Minuten bei 300 G (Relative Centrifugal Force (RCF)) zentrifugiert wurde, um die Zellen zu waschen. Der Überstand wurde mit der Pumpe abgesaugt und das Zellpellet in 300µl PBS resuspendiert. Davon wurden 20µl abgezweigt und mit 380µl GuavaViaCount-Lösung zusammenpipettiert, um eine Zellzählung mithilfe der Guava Incyte Software von Millipore durchzuführen. Für die im Anschluss vorgesehene Negativselektion mittels EasySep™ Human B-Cell Enrichment Kit w/o CD43-Depletion zur Isolation der B-Zellen aus den PBMCs musste die Zellkonzentration auf  $5 \times 10^7$ /ml angepasst werden. Dazu wurden die übrigen 280µl PBMC-Lösung erneut 10 Minuten bei 300 G abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet anschließend in einem auf die genannte Konzentration abgestimmten Volumen von B-Cell Enrichment Kit Puffer resuspendiert.

---

### **2.2.1.3.3 B-Zell-Isolation aus den PBMCs**

Die finale Isolation der B-Zellen aus den PBMCs wurde mithilfe des EasySep™ Human B-Cell Enrichment Kit w/o CD43-Depletion bewerkstelligt. Die Isolationsmethode beruht auf einer Negativselektion, bei der mithilfe eines Antikörpercocktails zunächst sämtliche unerwünschten Zellen markiert werden. Zugegebene magnetische Nanopartikel binden an die markierenden Antikörper. Wird die Lösung dann in einen speziell vorgesehenen Magneten gestellt, werden die markierten, magnetischen Zellen an die Glaswand des Trägergefäßes gezogen und imponieren dort fixiert als fein bräunliche sandkornartige Beschichtung.

Die in 2.2.1.3.2 erhaltene Zellsuspension wurde in Corning Tubes überführt, da diese für die spätere magnetische Separation besser geeignet waren. In die Lösung wurden 50µl/ml EasySep™ Human B Cell Enrichment Cocktail w/o CD43 Depletion hinzugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden EasySep™ Magnetic Nanoparticles ebenfalls in der Konzentration 50µl/ml zupipettiert und 10 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung mit B-Cell Enrichment Kit Puffer bis auf 2.5ml Volumen aufgefüllt und das Corning Tube in den EasySep-Magneten (siehe Abb. 12) für 5 Minuten gestellt. Das Corning Tube wurde noch im Magneten belassen gekippt und die Zelllösung vorsichtig in ein neues Corning Tube bzw. 15ml Falcon überführt. Die danach erhaltene Lösung enthielt die isolierten B-Zellen. Die Inkubation im Magneten konnte bei Bedarf bis zu dreimal wiederholt werden. Während mehrmalige Wiederholung die Probenreinheit erhöht, sinkt gleichzeitig die Ausbeute an Zellen. Aus der finalen Zellsuspension konnte ein Teil wieder zur Zellzählung abgezweigt werden, bzw. die Zellen nach Zentrifugation und Resuspension in der jeweilig benötigten Trägerflüssigkeit für anschließende Versuche verwendet werden (Resuspension in FACS-Puffer für die Reinheitskontrolle mittels CD19-Färbung, Resuspension in Medium, wenn die Zellen in Kultur gebracht werden sollten bzw. für Patch-Clamp-Experimente vorgesehen waren).



Abbildung 12: EasySep™-Magnet für die magnetische Separation. In der Mitte ist die Einsenkung für das Probenröhrchen ersichtlich. <https://www.stemcell.com/easysep-cell-separation-magnet.html>

#### 2.2.1.4 Aktivierung und Stimulation der B-Zellen/CLL-Zellen mit PMA und Ionomycin

Eine bekannte Methode zur Stimulierung von Immunzellen ist die Aktivierung und Stimulation mit PMA und Ionomycin. PMA (Phorbolmyristylacetat) ist ein unspezifisches stimulierendes Analogon des zentralen Downstream-Moleküls Diacylglycerol, das die Zytokinproduktion insbesondere von IL-2 und IL-4 erhöht. PMA aktiviert direkt die Proteinkinase C und sorgt für die Translokation von NFκB in den Zellkern, indem es dessen Inhibitor IκB durch Phosphorylierung deaktiviert. Dadurch wird das Zellwachstum bzw. die Proliferation beeinflusst. Das mit PMA synergistisch agierende Ionophor Ionomycin bewirkt die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum, wodurch Ca<sup>2+</sup>-sensitive Enzyme aktiviert werden. Eines davon ist Calcineurin, das NFAT dephosphoryliert, sodass es ebenfalls wie NFκB in den Zellkern wandern kann (Crawford et al. 2014; Jacquier et al. 2015; Zimmermann et al. 2015). Sofern das Nährmedium für Zellen jedoch Ca<sup>2+</sup> enthält, kommt es zu einem starken Einstrom der Ionen von extrazellulär in das Zytoplasma, während die Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum eher geringgradiger ausfällt.

Für die Simulation mit PMA und Ionomycin wurden sowohl B-Zellen als auch CLL-Zellen in einer Konzentration von 1x10<sup>6</sup>/ml in je 2ml Medium jedes Wells einer 6-Wellplatte jeweils 19 Stunden inkubiert. In drei Wells wurden PMA (10nM) und Ionomycin (175nM) hinzugegeben, in die übrigen drei Wells wurde DMSO als Kontrolle hinzupipettiert, da die verwendeten PMA und Ionomycin selbst in DMSO gelöst vorlagen.

---

## 2.2.2 Durchflusszytometrie

### 2.2.2.1 Theoretische Grundlagen der Durchflusszytometrie

Das Grundprinzip der Durchflusszytometrie besteht zusammengefasst darin, dass Zellen in einer Trägerflüssigkeit in das Durchflusszytometer mit einer einstellbaren Geschwindigkeit eingesaugt werden, mit einem monochromatischen Laser (zumeist Argonionen mit 488nm Wellenlänge (Luttmann et al. 2014a)) beschossen werden und das entstandene Streulicht unter Einwirkung von Filtern und Spiegeln in unterschiedliche Wellenlängen aufgetrennt mit verschiedenen Detektoren erfasst wird. Nicht nur die Zellgröße und Granularität, sondern auch Fluoreszenzen können gängigerweise in vier Kanälen (= 4 Farbstoffe) unterschiedlicher Wellenlänge detektiert werden. Dies waren im Fall der vorliegenden Arbeit **Grün** (Kanal 1, FITC, Fluoreszenzemissionsmaximum 519nm), **Gelb** (Kanal 2, PE, Fluoreszenzemissionsmaximum 578nm), **Rot** (Kanal 3, PerCP-Cy5.5, Fluoreszenzemissionsmaximum 678nm), und **Rot2** (Kanal 4, APC, Fluoreszenzemissionsmaximum 660nm) (Luttmann et al. 2014a; Guava UG.book - EMD Millipore). Das Gerät ist verbunden mit einem Computer, auf dem eine spezielle Software die grafische Erfassung der Detektion vornimmt. Im Fall dieser Arbeit war dies die InCyte Software für Guava® easyCyte HT Systems von der Firma Merck Millipore.



Abbildung 13: Das verwendete Durchflusszytometer von Merck Millipore. Angeschlossen wurde das Gerät an einen PC, auf dem die InCyte Software installiert war; <https://www.selectscience.net/products/guava-easycyte-8ht-benchtop-flow-cytometer/?prodID=84548>

Üblicherweise werden Oberflächenantigene auf den Zellen durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper den Kanälen entsprechender Wellenlängen angefärbt, sodass eine heterogene Zellsuspension, klassischerweise Blutbestandteile, differenziert und aufgetrennt in der Computer-Software grafisch



dargestellt werden kann. Die nachfolgende Abbildung 14 veranschaulicht das optische Prinzip eines Durchflusszytometers.

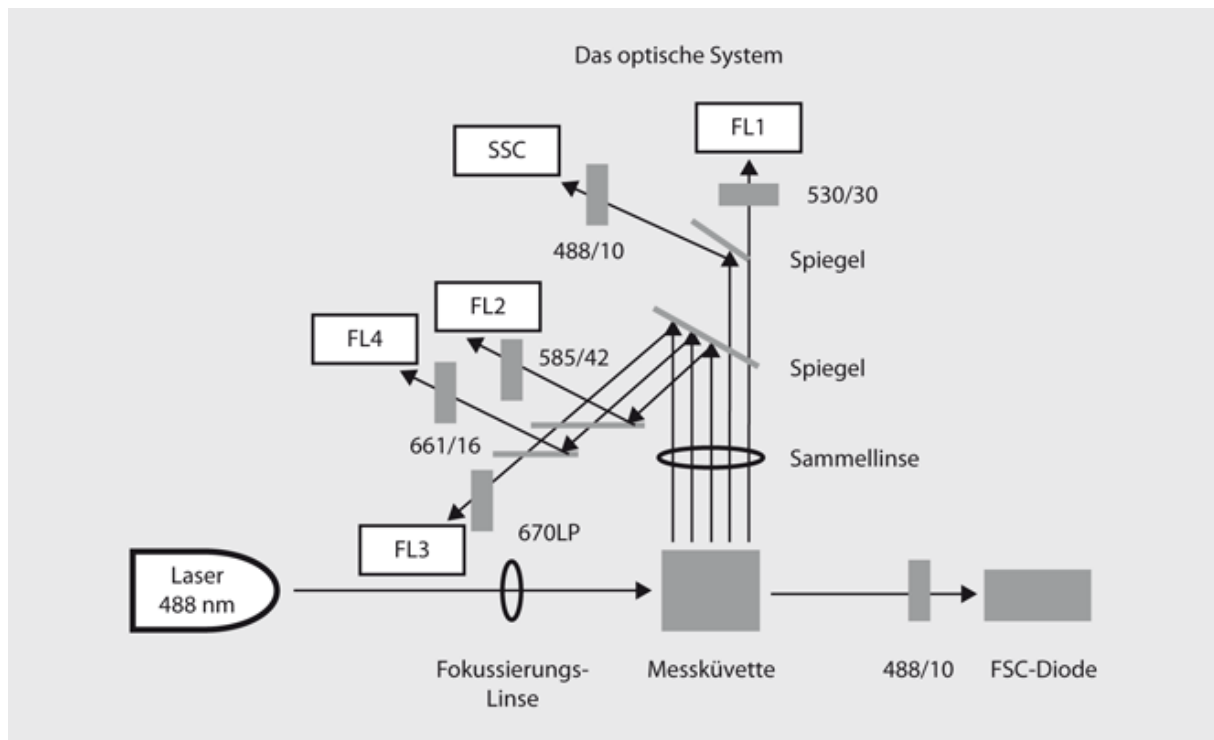


Abbildung 14: Das optische System eines Durchflusszytometers. Zu sehen ist das monochromatische Lichtbündel aus dem Laser mit 488nm Wellenlänge, das die Messkuvette mit enthaltener Probe bestrahlt. Das Licht wird sowohl gestreut als auch an Spiegelvorrichtungen reflektiert. Für die Kanäle FL1-FL4 sorgen eigene Bandpassfilter dafür, dass nur Licht der entsprechenden Kanalwellenlänge in den Detektor gelangt. Für jeden Kanal ist die mittlere Wellenlänge angegeben, sowie hinter dem Schrägstrich die Bandbreite der Wellenlänge (bspw. bedeuten 530/30 bei FL1, das Licht mit der Wellenlänge 515-545nm, also einer Bandbreite von 30nm um den mittleren Wert 530nm detektiert wird). Mit dieser klassischen Vorrichtung lassen sich sowohl Vorwärtstreulicht (Zellgröße), Seitwärtstreulicht (Granularität) als auch vier unterschiedliche Farbstoffwellenlängen FL1-FL4 erzeugen. (Luttmann et al. 2014b)

### 2.2.2.2 Präparation der B-Zell-/CLL-Zellsuspensionen

Die Durchflusszytometrie war für die Experimente von unmittelbarer zentraler Bedeutung, da sowohl Probenreinheit als auch der Funktionsnachweis der Proliferationsmethode wie in 2.2.1.2 geschildert, durch Färbungen mit fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Hierzu wurden Zellsuspensionen der jeweiligen Zellen in 100µl FACS-Puffer hergestellt. 20µl wurden jeweils abgezweigt und zur Zellzählung herangezogen.

### 2.2.2.3 Blockierung unspezifischer Bindestellen und Färbung der Zellen mit CD5, CD19, CD80 und CD86

Um die unspezifische Antikörperbindung möglichst gering zu halten wurden der 80µl Zellsuspension zunächst 20µl *Human FcR Blocking Solution* zugegeben. Daraufhin erfolgte eine Inkubation bei 4°C im Kühlschrank für 15 Minuten.

Da die Antikörper für die Färbungen in sehr kleiner Konzentration pipettiert werden mussten, wurde die 100µl Zellsuspensionen nach obiger Inkubation zunächst auf die für die Färbungen jeweilig gewünschte Anzahl an Tuben gleichmäßig aufgeteilt und mit FACS-Puffer auf 200µl Volumen aufgefüllt. Dies war insbesondere deshalb unkompliziert möglich, da das Färbeprotokoll eine großzügige Bandbreite hinsichtlich der Zellzahl ( $10^5$ - $10^8$ ) gewährleistete und stets eine ausreichende Zellzahl in den Isolierungen bzw. der Proliferation erreicht werden konnte.

Je nach gewünschter Färbung wurden dann die jeweiligen Antikörper in die Lösungen pipettiert. Zu beachten war hierbei, dass ab diesem Schritt strikt bei Dunkelheit gearbeitet werden musste, um die farbstoffkonjugierten Antikörper durch Lichteinwirkung nicht zu bleichen. Tab. 6 veranschaulicht die verwendeten Antikörperkonzentrationen. Wie bereits angesprochen, diente die Durchflusszytometrie sowohl dem Nachweis der speziellen Zellart als auch dem Funktionsnachweis des Proliferationsassays für die CLL-Zellen. Sowohl gesunde B-Zellen als auch maligne B-CLL-Zellen wurden zwecks Nachweis stets auf CD19 angefärbt, da dies in der Laborroutine ein bewährter Marker von B-Zellen ist. Ein besonderes pathologisches Merkmal der Krebszellen ist die Koexpression von CD19 und CD5, ein Oberflächenantigen, das physiologisch nur auf T-Zellen zu finden ist. Daher wurden die CLL-Zellen darüber hinaus auch auf CD5 angefärbt. Sofern mit den CLL-Zellen der Proliferationsassay durchgeführt wurde, wurden zusätzlich in einer Vierfachfärbung auch die Oberflächenantigene CD80 und CD86, die bei Stimulation und Aktivierung hochreguliert werden, angefärbt und detektiert.

Antikörper	Konzentration	Pipettiertes Volumen in 200µl Zelllösung	Aussagewert
<b>CD19-APC</b>	1:200	1µl	Nachweis von gesunden und kranken B-Zellen
<b>CD5-PE</b>	1:500	0.4µl	Nachweis von malignen B-Zellen (CLL-Zellen), da Koexpression von CD19 und CD5
<b>CD80-FITC</b>	1:200	1µl	Nachweis der Aktivierung und Stimulation durch den CLL- Proliferationsassay
<b>CD86-PE-Cy5.5</b>	1:200	1µl	<i>Siehe CD80-FITC</i>

*Tabelle 7: Der unterschiedlich verwendeten Antikörperkonjugate. CD = Cluster of Differentiation; APC = Allophycocyanin; PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoreszeinisothiocyanat; PE-Cy5.5 = Phycoerythrin-Cyanine 5.5*

Nach Zugabe der Antikörper wurden die Tuben gevortext und in einer lichtgeschützten Schachtelverpackung bei 4°C im Kühlschrank für 40 Minuten inkubiert. Danach erfolgten drei Waschgänge, bei denen das Volumen jeweils bis auf 1.5ml mit FACS-Puffer aufgefüllt, die Tuben bei

600 G (RCF) für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgegossen wurden. Nach dem letzten Waschgang wurde das Volumen mit FACS-Puffer auf 800µl aufgefüllt, sodass ein für das Durchflusszytometergerät adäquates Flüssigkeitsvolumen generiert wurde. Die Proben wurden daraufhin auf Eis gelagert, um eine Erwärmung auf Raumtemperatur in der Zeit bis zur Messung am Gerät/PC zu vermeiden.

#### 2.2.2.4 Detektion mit der InCyte Software für Guava® easyCyte HT Systems

Die Proben wurden in die vorgesehene Vorrichtung des Durchflusszytometers eingelassen und konnten dann mit Hilfe der Software InCyte ausgewertet werden. Die Programmeinstellungen wurden für sämtliche Versuche konstant gehalten, der Gain in allen Kanälen wurde auf 8 festgelegt, der FSC (Vorwärtsstreulicht) wurde auf 56 und der SSC (Seitwärtsstreulicht) auf 123 eingestellt. Als weitere Kontrollen wurden ungefärbte Zellen (Negativkontrollen) sowie Einzelfärbungen mitgeführt. Da die verwendeten Farbstoffkonjugaten in keinem nennenswerten Ausmaß in jeweils andere Kanäle eingestrahlt haben, wurde auf zusätzliche Kompensation gänzlich verzichtet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde wie folgt gewählt: Das Vorwärtsstreulicht (Zellgröße) wurde gegen das Seitwärtsstreulicht (Granularität) linear aufgetragen während die Färbungen gegeneinander logarithmisch aufgetragen wurden. Abbildung 15 veranschaulicht die Vorgehensweise bei der CLL-Proliferation, bei der alle 4 Farbstoffe verwendet wurden.

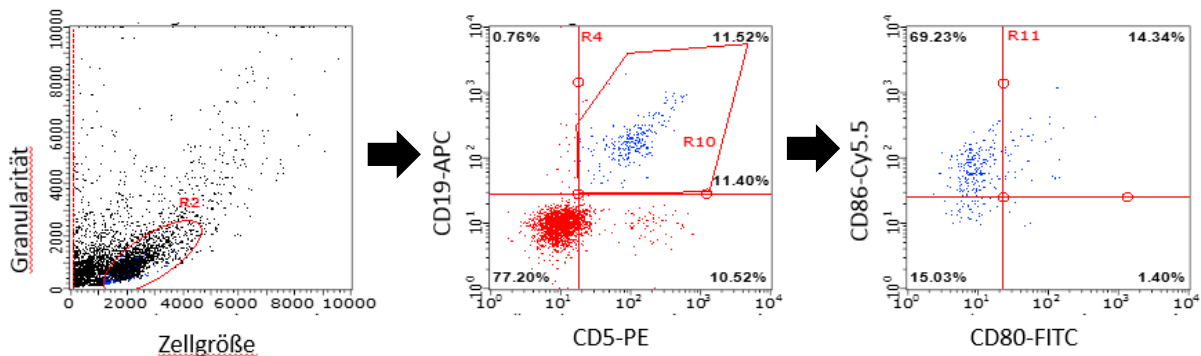


Abbildung 15: Exemplarisch dargestellt ist die Anfärbung unbehandelter Kontrollzellen beim CLL-Proliferationsassay. Da diese Zellen unbehandelt blieben, war auch durchflusszytometrisch im Vergleich zu den behandelten Zellen keine Aktivierung bzw. Stimulierung feststellbar. **Links:** Aufgetragen sind linear das Seitwärtsstreulicht (Granularität) gegen das Vorwärtsstreulicht (Zellgröße). Da B-Zellen/CLL-Zellen sehr klein, kugelig und glatt ohne Granulationsvesikel beschaffen sind, konnte diese Zellpopulation auf der X- und Y-Achse relativ weit links-unten identifiziert werden. Für die Anfärbung wurde diese Region mit R2 markiert.

**Mitte:** Resultierend aus der extrahierten R2 („gated auf R2“) wurden die Antikörper für den CLL-Nachweis, CD19-APC und CD5-PE logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Die doppelt positiven Zellen in der Region 10 im rechten oberen Quadranten stellten die CLL-Zellen dar. **Rechts:** Für den Fall, dass es zusätzlich zum Zellartnachweis auch um den Aktivierungs- bzw. Stimulationsnachweis ging wie beim CLL-Proliferationsassay, wurde gated auf Region 10 zusätzlich CD86-PE-Cy5.5 logarithmisch gegen CD80-FITC aufgetragen. Der Prozentsatz im rechten oberen Quadranten gab schlussendlich an, welcher Anteil der CLL-Zellen doppelt positiv und somit aktiviert und stimuliert war.

---

### 2.2.2.5 Statistische Auswertung in Microsoft Excel und SPSS

Für die weiteren Versuche wurden nur gesunde B-Zell-Proben herangezogen, deren CD19-Reinheit über 90% lag. Im Falle der CLL-Zellproliferation über 3 Tage wurden die Prozentsätze aus dem rechten oberen Quadranten der CD80/CD86-Grafik unter den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen extrahiert und von mehreren Patienten in Microsoft Excel bzw. SPSS tabellarisch gesammelt. Es wurden Mittelwerte gebildet und die unterschiedlichen Testbedingungen statistisch ausgewertet. Im Fall von zwei miteinander verglichenen Bedingungen wurde ein zweiseitiger T-Test für unabhängige Stichproben herangezogen, während bei mehr als zwei zu vergleichenden Bedingungen die Auswertung mit einer einseitigen ANOVA und anschließendem Post-Hoc-Test erfolgte. Werte galten unter 0.05 als signifikant (\*), unter 0.01 als hochsignifikant (\*\*) und unter 0.001 als höchstsignifikant (\*\*\*). Die mit ViaCount ermittelten Zellkonzentrationen der CLL-Zellen nach 3 Tagen Proliferationsassay mehrerer Experimente wurden ebenfalls für die einzelnen Versuchsbedingungen gemittelt und nach dem gleichen Verfahren statistisch ausgewertet. Die endgültige grafische Darstellung fand gemeinsam mit den elektrophysiologischen Daten im Programm IgorPro statt.

## 2.2.3 Elektrophysiologische Methoden – Patch-Clamp-Technik

### 2.2.3.1 Theoretische Grundlagen der Patch-Clamp-Technik

Die elektrophysiologischen Messungen von Ionenströmen durch den TRPM7-Kanal in gesunden B-Zellen und malignen CLL-Zellen mithilfe der Patch-Clamp-Technik unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen bildet den Kern der Daten der Arbeit. Die mittlerweile etablierte Methode, mit der Ströme durch einen bestimmten Ionenkanal erfasst werden können, hat einen hohen Stellenwert in der wissenschaftlichen Arbeitspraxis gewonnen.

Für die Durchführung von Patch-Clamp-Messungen wird eine bestimmte Ausstattung benötigt, aus denen ein Messplatz aufgebaut wird. Ein auf **einem schwingungsgedämpften Messtisch stehendes inverses Mikroskop** mit Einspannvorrichtung für Petrischalen (darin befinden sich später die zu messenden Zellen in der extrazellulären Lösung, sh. oben), ein **Pipettenhalter mit Elektrodendraht (Silberdraht mit Silberchlorid beschichtet) und angeschlossenem Mikromanipulator**, eine weitere Elektrode („Badelektrode“), ein mit beiden Elektroden verbundener **Vorverstärker**, ein diesem nachgeschalteter **Patchclamp-Verstärker** (EPC10, HEKA, Harvard Bioscience), ein **Ansaugschlauch**, der an den Pipettenhalter angebracht ist, je ein **PC für das Monitoring** des Messobjekts durch die Mikroskop-Kamera sowie ein **PC, der die Signale des Patchclamp-Verstärkers erhält** und in einer Software (PatchMaster, HEKA) erfasst und darstellt. Der Messplatz wird umgeben von einem **Faradaykäfig**, der ihn elektrisch abschirmt. Ein **Puller** dient dazu, Pipettenspitzen zur Zusammensetzung der Messelektrode aus Glaskapillaren (Borosilikatglas) herzustellen, in dem unter

modifizierbarer Hitze- bzw. Zugspannungseinwirkung das Glasmaterial auseinandergezogen wird. Die so angefertigten Pipettenspitzen haben einen sehr kleinen Durchmesser, der sich zu einer extrem kleinen Pipettenspitzenöffnung hin verjüngt. Die Öffnungsfläche ist zur Größe des Widerstands indirekt proportional.

Die Vorgehensweise der Methode besteht darin, dass eine einzelne Zelle, die sich in einer externen dem extrazellulären Milieu *in vivo* angeglichenen Badlösung samt Badelektrode befindet, bildschirmüberwacht mit der über den Silberdraht gestülpten, mit einer internen (=intrazellulären) Lösung gefüllten Pipettenspitze mikromanipulatorisch vorsichtig angesteuert wird. Die Pipettenöffnungsspitze wird an die Zellmembran gedrückt, mit dem Ansaugschlauch wird ein leichter Unterdruck erzeugt, der dafür sorgt, dass eine feste, abgedichtete und hochohmige Verbindung zwischen Membranareal und Spitzenöffnung entsteht – der Gigaseal (siehe Abb. 16). Durch weiteren Unterdruck wird die Membran aufgebrochen, sodass Pipetteninhalt und Zytoplasma einen gemeinsamen isolierter Innenraum bilden. Ist dieser Zustand erreicht, spricht man von der sogenannten „Whole-Cell-Konfiguration“. Sämtliche Messungen der Arbeit wurden in diesem Modus durchgeführt.

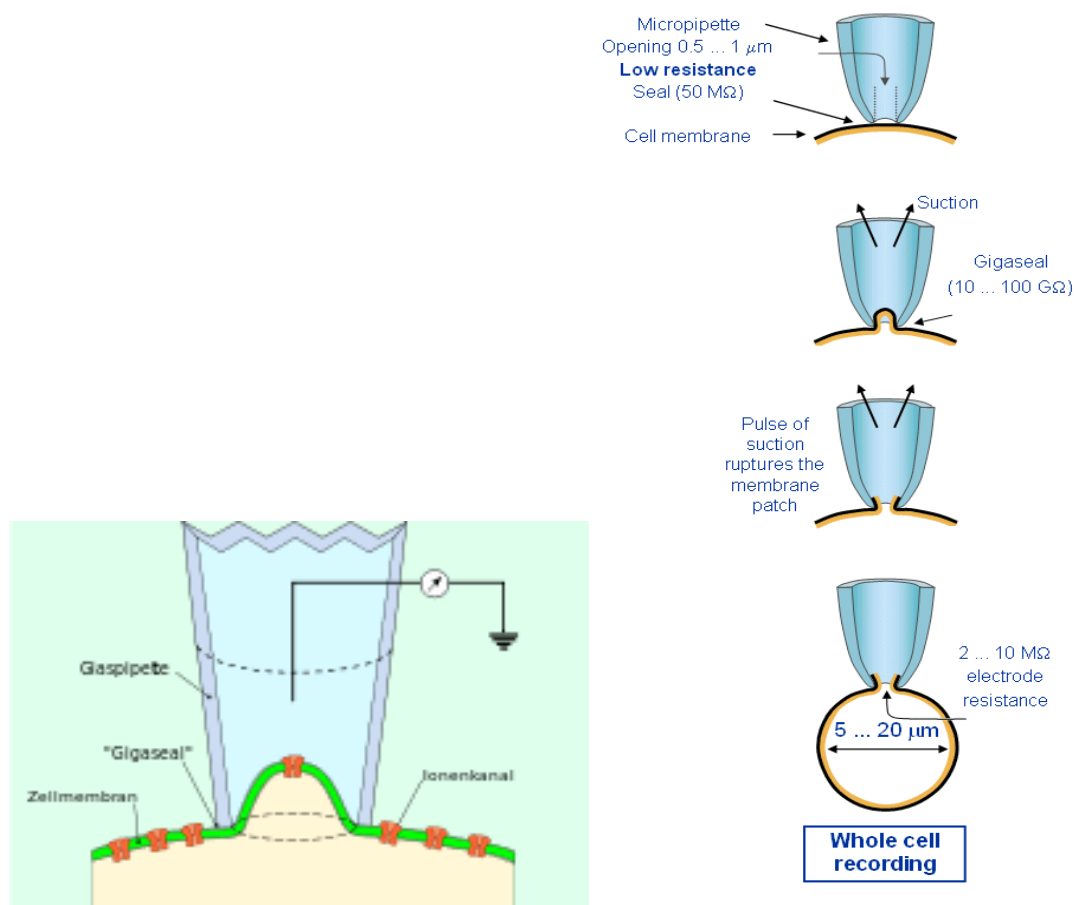


Abbildung 16: Links: Zu erkennen ist eine Pipettenspitze, die aufgesetzt auf eine zu untersuchende Zelle einen Gigaseal bildet. Der eingesaugte Membranabschnitt beinhaltet einen Ionenkanal; Darstellung entnommen aus: <https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Patchclamp.png>

**Rechts:** Abgebildet ist der gesamte Vorgang von der Annäherung an die Zielzelle bis zum Erstellen der Whole-Cell-Konfiguration. Zunächst liegt der Widerstand bei unvollständiger Zellannäherung seitens der Pipette im Megaohm-Bereich, erreicht aber schlagartig nach Erzeugung des Gigaseals durch leichten Unterdruck Werte im Gigaohm-Bereich, die sofort wieder drastisch abfallen, wenn durch weiteren Unterdruck die Zellmembran aufgebrochen wird. Dadurch bilden Pipettenspitzeninhalt und Zytosol eine gemeinsame Flüssigkeit – die Whole-Cell-Konfiguration ist erreicht und die Messung kann beginnen; Darstellung entnommen aus: <http://shermanlab.uchicago.edu/patch.html>

Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration wird die Strommessung gestartet und über die Messelektrode aufgenommen. Deren Signal wird von einem Vorverstärker (Abb. 17) amplifiziert und an den Patchclamp-Verstärker weitergeleitet, der wiederum die Software des Auswertungs-PC mit Daten versorgt.

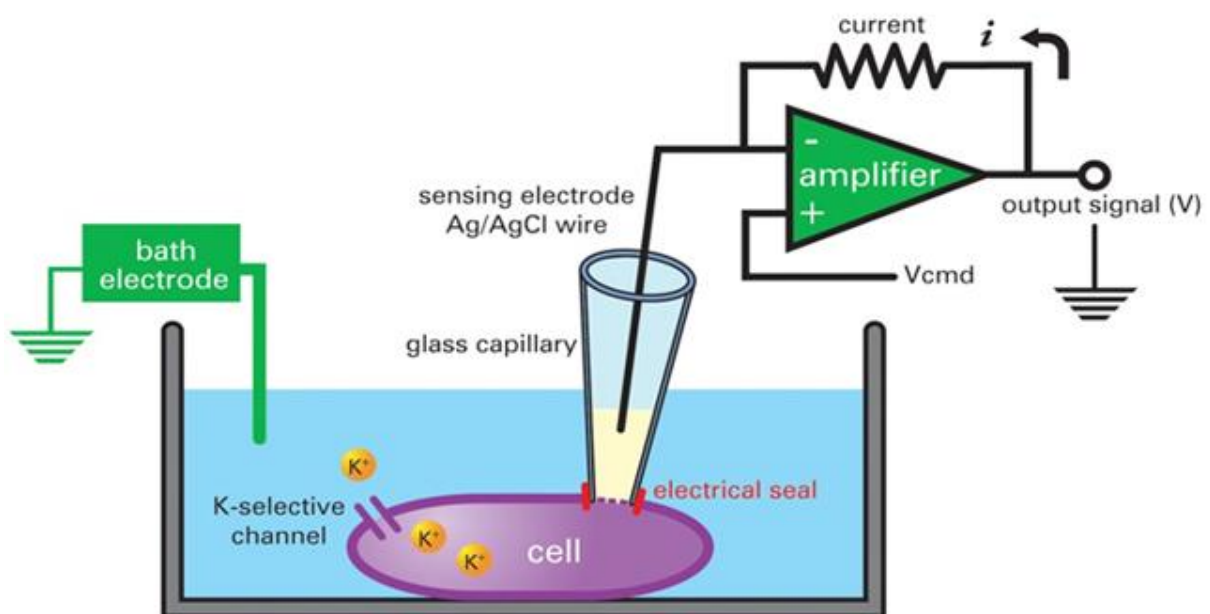


Abbildung 17: Der Aufbau einer Patch-Vorrichtung. Im Wasserbad befinden sich auf einem Coverslip adhärenente Zellen. Diese werden mittels Patchpipette angesteuert und angesaugt. In der Whole-Cell-Konfiguration kann die Messung beginnen. Über eine in die Pipette eingebrachte Elektrode wird der Strom über den entsprechend zu messenden Kanal abgeleitet und über einen Verstärker weiter an das zuständige Computerprogramm vermittelt. Entsprechende Programmeinstellungen der Software lassen die Messung eines bestimmten Kanals zu. Weiterhin zu sehen ist die erdende Bad-Elektrode. Darstellung entnommen aus: <http://www.bioelectrolab.unifi.it/research/experimental-techniques/>

### 2.2.3.2 Messungen von TRPM7-Ionenströmen in B-Zellen und CLL-Zellen

Zunächst mussten die Zellen für die Messungen vorbereitet werden. Dazu wurden PDL-beschichtete Coverslips in geringem Volumen warmen Zellmediums in 24er Wellplatten eingelassen. Die Zellsuspensionen der B-Zellen bzw. CLL-Zellen konnten in die Wells einpipettiert werden, sodass sich die Zellen nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Inkubator (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) auf die zum Wellboden gesunkenen Coverslips absinken konnten. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Plättchen daher mit einer Pinzette aus dem Well genommen und in einer kreisrunden Petrischale („dish“) mithilfe von Silgard zentral fixiert. Daraufhin wurden 1.5-2ml externe Lösung in die Schale

---

gefüllt und das entstandene Lösungsbad in die Haltevorrichtung des inversen Mikroskops eingelassen. Unterdessen wurden die internen Lösungen in kleinen Behältern auf Eis gelagert nebenher bereitgestellt. Nach Eintauchen und Fixieren der Badelektrode wurden die im Pipetten-Puller hergestellten Pipettenspitzen in einer Plastikhalterung bis zum Einsatz zwischengelagert. Die Spitzen wurden je nach Fragestellung des Versuchs mit den unterschiedlichen internen Lösungen gefüllt und daraufhin zur Benutzung über den silberchloridbeschichteten Silberdraht zur Komplettierung der Messelektrode festgeschraubt und mittels Mikromanipulator in die Badlösung eingelassen. Dabei konnte über die **HEKA Patchmaster Software (Harvard Bioscience)**, über die letztendlich die gesamte Messung lief, der Pipettenwiderstand kontrolliert werden. Nach Eintauchen in das Wasserbad lag der Widerstand idealerweise im Bereich von 3.5 bis 4.5 M $\Omega$ . Kleinere Widerstände (=größere Pipettenöffnung) hätten keinen abgedichteten Gigaseal gewährleisten können, während größere Widerstände (=kleinere Pipettenöffnung) die Erzeugung von Unterdruck erschwert hätten. Nach Aufsuchen der zu messenden Zelle und Erstellung der Whole-Cell-Konfiguration konnte die Messung mit dem Software-Protokoll „Ramp100“ erfolgen. Messpunkte wurden in der Software auf dem Bildschirm alle 2 Sekunden erzeugt, es wurden 500 Sekunden gemessen und somit stets 250 Messpunkte erzeugt. Eine Spannungsrampe lief zu jedem Messpunkt über 50ms mit einer Frequenz von 10 kHz (Messwerte alle 0.1 Millisekunden) von -120mV zu +120mV ab, die an die Badlösung via Messelektrode angelegt wurden. Grafisch und tabellarisch wurden in der Computersoftware einstellungsgemäß zu jedem Messpunkt die Auswärtsströme bei +80mV (p80) und die Einwärtsströme bei -80mV (m80), der momentane (sich geringfügig ändernde) Pipettenöffnungswiderstand und der C-Slow in pF dargestellt. Der C-Slow stellt ein Maß für die Zellgröße dar und war für die spätere Auswertung der Daten von großer Bedeutung. Bei frisch aufgetauten CLL-Zellen bzw. isolierten B-Zellen rangierte der C-Slow in der Größenordnung 1.5-2pF, bei PMA- und Ionomycin-stimulierten Zellen bei 3-6pF und bei den CLL-Zellen aus dem Proliferationsassay erreichte der C-Slow aufgrund des massiven zellulären Größenzuwachs Durchschnittswerte zwischen 9-13pF, wobei Spitzenwerte bis zu 18pF zu beobachten waren. Hinsichtlich des Widerstands wurden Messungen bis hin zu 15M $\Omega$  toleriert, Messungen mit darüber liegenden Werten wurden von der Auswertung kraft mangelnder Validität ausgeschlossen. **Die TRPM7-Kanalaktivität stellte sich dabei charakteristischerweise als erst spät während der Messung entfaltender Strom dar, die im höheren positiven Spannungsbereich schlank bis zum Erreichen eines Plateaus anwuchsen.** Die Dishes wurden regelmäßig nach 1.5 Stunden Bearbeitung, in denen durchschnittlich 4 Messungen möglich waren, gewechselt bzw. neu angesetzt. Das Liquid Junction Potential wurde mit 10mV über die Software korrigiert.

---

### **2.2.3.3 Export und Auswertung der Daten in Igor Pro, Microsoft Excel und SPSS**

Abgespeicherte Messungen sowie darin enthaltene einzelne Traces (Strom/Spannungskurve zu jedwedem gewünschten Messpunkt) konnten als Rohdaten in einer zweiten Software, dem FitMaster, geöffnet und exportiert werden, sodass sie im Programm Igor Pro ausgewertet werden konnten. Dazu wurden die erhaltenen p80-Messkurven mehrerer Messungen unterschiedlicher Patienten- bzw. Probandenzellen aber gleicher Bedingungen gepoolt, auf Zellgröße durch Division durch den jeweiligen C-Slow nach 100 Pulsen normiert, gemittelt und samt Standardfehler als Fehlerbalken grafisch dargestellt. Weiterhin wurden Strom-Spannungs-Traces vom Beginn und Ende ausgewählter repräsentativer Messungen grafisch dargestellt. Dabei wurde im Vorfeld darauf geachtet, dass das Hintergrundrauschen im jeweiligen zu exportierenden Trace möglichst gering ist und höchstens der dritte bzw. drittletzte Messpunkt ausgehend vom Beginn oder Ende der Messung herangezogen wurde. Es wurden die p80 bzw. C-Slow-Messwerte je nach Anzahl der unterschiedlichen Messbedingungen statistisch mithilfe eines zweiseitigen T-Tests für unabhängige Stichproben in Microsoft Excel oder mittels ANOVA und anschließendem Post-Hoc-Test in SPSS ausgewertet. Werte galten unter 0.05 als signifikant (\*), unter 0.01 als hochsignifikant (\*\*), und unter 0.001 als höchstsignifikant (\*\*\*)).

## **3 Ergebnisse**

### **3.1. Durchflusszytometrie des CLL-Proliferationsassays**

#### **3.1.1 Proliferation nach Aktivierung und Stimulation von CLL-Zellen mit dem CpG-Motiv DSP30 und IL-2**

Um sicherzustellen, dass die CLL-Zellen unter den Versuchsbedingungen des Proliferationsassays mit CpG- und IL-2-Stimulation auch tatsächlich proliferieren, wurden die Zellen sowohl zwecks adäquater Aussähekonzentration in die Wells am Tag 0 des Auftauens sowie am Tag 3 nach dem Ernten jeweils mithilfe von ViaCount gezählt. Bei der täglichen kurzen Sichtkontrolle der Wellplatte unter dem Lichtmikroskop konnte der deutliche Größenzuwachs der in die Gelatineschicht zwischen die Fibroblasten eingesunkenen CLL-Zellen über die 3 Tage, wie ihn (Decker et al. 2000b) auch bei ihren Versuchen beschrieben, festgestellt werden. Die anfänglich in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml pro Well gleichmäßig ausgesäten Zellen, variierten an Tag 3 deutlich untereinander. Zellen, die mit dem CpG-Motiv DSP30 und IL-2 jedoch ohne Inhibitoren inkubiert worden, zeigten einen mittleren Konzentrationszuwachs auf  $1.61 \times 10^6$ /ml mit Standardfehler  $0.53 \times 10^6$ /ml, sodass im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit  $0.58 \times 10^6$ /ml (Standardfehler:  $0.16 \times 10^6$ /ml) Zellen eine fast dreifach so hohe Zellzahl vorlag. Die Aktivierung und Stimulation hatte somit eine Proliferation verursacht.



---

Daraufhin wurde getestet, ob die stimulierten Zellen durch Zugabe von Agenzien in ihrer Proliferation gehemmt werden können. Bei den stimulierten Zellen mit Zusatz von 0.5µM des etablierten Tyroinkinasehemmers Dasatinib konnte erwartungsgemäß die Proliferation der Zellen mit  $0.79 \times 10^6$  /ml (Standardfehler:  $0.23 \times 10^6$ /ml) knapp auf die Hälfte der ausschließlich stimulierten Zellen gedrosselt werden. Interessanterweise wurde die Proliferation auch durch Zusatz des speziellen TRPM7-Inhibitors NS8593 gehemmt. Bei Zugabe von 10µM war die Zellzahl  $0.45 \times 10^6$ /ml (Standardfehler:  $0.14 \times 10^6$ /ml), bei 30µM  $0.45 \times 10^6$ /ml (Standardfehler:  $0.13 \times 10^6$ /ml) und in der Kombination von 10µM NS und 0.5µM Dasatinib  $0.50 \times 10^6$ /ml (Standardfehler:  $0.06 \times 10^6$ /ml). Abbildung 18 veranschaulicht die Ergebnisse grafisch. Die statistische Auswertung erfolgte in SPSS mit einer univariaten ANOVA und anschließendem post-Hoc-Test. Die jeweiligen Stichprobenvergleiche zwischen der CPG-stimulierten Gruppe und den anderen Testgruppen waren bis auf den Vergleich der rein mit Dasatinib behandelten Zellen signifikant (s. Abb. 18). Um zu überprüfen, ob tatsächlich die Proliferation der Zellen gehemmt wurde, oder sich die Zellzahl nach Zugabe von NS und Dasatinib lediglich aufgrund deren Toxizität im Sinne eines Zellsterbens verringerte, wurde mittels GuavaVia-Count-Assay eine Viabilitätsanalyse durchgeführt. Hierbei ergab sich für die Kontrolle eine durchschnittliche Viabilität von 92.86% (Standardfehler 2.57%), für die mit CpG-Motiv stimulierten Zellen 91.54% (Standardfehler 2.48%), für die Inhibition mit NS10 88.26% (Standardfehler 0.94%), für NS30 77.27% (Standardfehler 4.48%), für die Kombination NS10 + Dasatinib 76.12% (Standardfehler 3.54%) und für Dasatinib 84.63% (Standardfehler 3.27%). Die Viabilitäten sind grafisch in Abbildung 19 dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte auch hier in SPSS mit einer univariaten ANOVA und anschließendem post-Hoc-Test. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Viabilität zwischen der stimulierten Gruppe und den mit NS30 sowie NS10 + Dasatinib gehemmtten Zellgruppen. Die anderen Gruppenvergleiche fielen nicht signifikant aus (s. Abb.19). In Anbetracht des deutlichen Rückgangs der Zellzahl bei verhältnismäßig geringfügiger Reduktion der Viabilität ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine tatsächliche Proliferationshemmung durch die zugeführten Inhibitoren handelte. Dieser Effekt wurde den Daten zufolge also nur marginal durch eine toxische Wirkung der Inhibitoren konterkariert.

Alles in allem wird durch diese Befunde die in der Literatur überwiegende These gestützt, dass TRPM7 für die Proliferation von Zellen eine entscheidende Rolle spielt, gestützt.

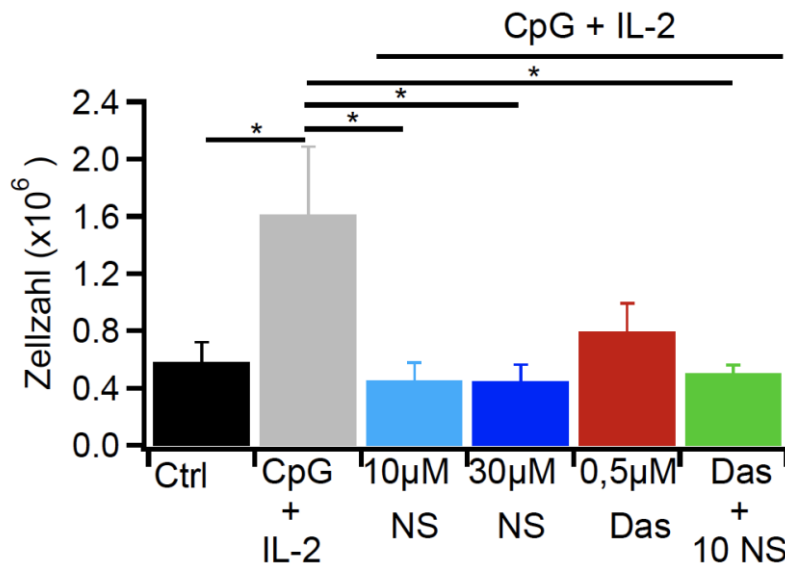


Abbildung 18: Zellzahlentwicklung der B-CLL-Zellen (Nr. 11-14, 18 + 19) an Tag 3 des Proliferationsassays: Während die unbehandelte Kontrolle im Wesentlichen unverändert bleibt, steigt die Zellzahl bei den mit CpG-Motiv und IL-2 stimulierten Zellen an (CpG+Interleukin-2). Der Anstieg der Zellzahlen wird durch die Inhibitoren NS8593 (NS) und Dasatinib (Das) in den unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen verhindert. Daraus ergibt sich, dass die Stimulation zu einer Proliferation geführt hat und dass die Inhibitoren potente bzw. im Falle von Dasatinib bereits bekannte Proliferationshemmer sind. Bemerkenswert ist allerdings, dass Dasatinib in der verwendeten Konzentration von 0,5 µM alleine noch nicht signifikant die Proliferation in den ersten 3 Tagen inhibiert, jedoch aber in Kombination mit 10µM NS. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. (n = 4). \* = P < 0.05, angewandt wurde eine ANOVA mit anschließendem PostHoc Test; Das = Dasatinib, S.E.M. = Standardfehler

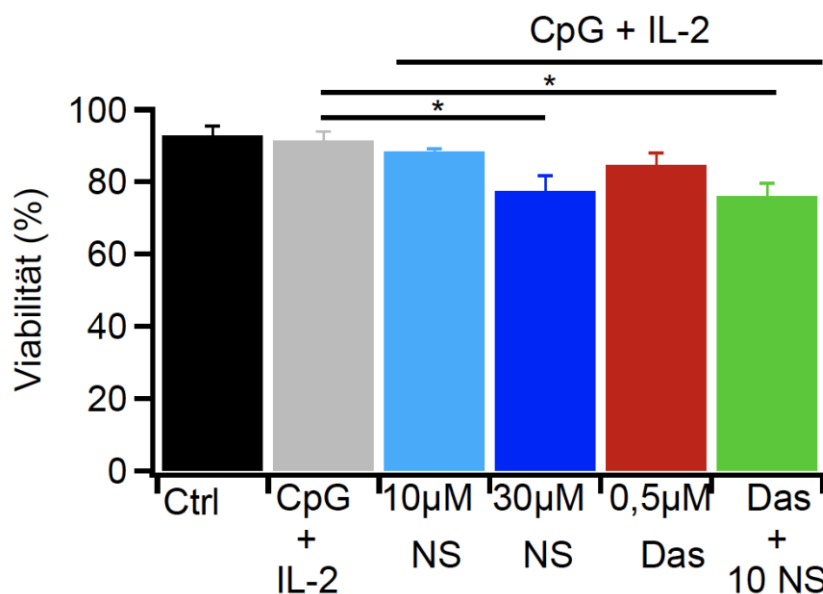


Abbildung 19: Viabilität der B-CLL-Zellen (Nr. 11-14, 18 + 19) an Tag 3 des Proliferationsassays: Die Viabilität bei der Kontrolle, den mit CpG-Motiv und IL-2 stimulierten Zellen und bei den mit 10 µM NS und Dasatinib behandelten Zellen ist annähernd konstant, während die Viabilität der mit 30 µM und der Wirkstoffkombination 10 µM NS + 0.5 µM Dasatinib behandelten Zellen geringfügig, aber signifikant reduziert ist. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. (n = 6). \* = P < 0.05, \*\* = P < 0.001, angewandt wurde eine ANOVA mit anschließendem PostHoc Test; Das = Dasatinib, S.E.M. = Standardfehler

### 3.1.2 Messung von CD80 und CD86-Signalen in stimulierten CLL-Zellen

Laut Decker und Kollegen führt die Aktivierung und Stimulation der B-CLL-Zellen über die 3 Tage zu einer Hochregulation von CD80 und CD86 (Decker et al. 2000b; Decker et al. 2000a). Diese beiden

---

Oberflächenantigene werden sowohl auf T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen als auch B-Zellen exprimiert. Bei letzteren überwiegt im Ruhezustand eine schwache CD86-Expression, während CD80 kaum vorhanden ist. Hochreguliert werden kann die Expression der beiden Antigene durch CD40-Ligation, Zytokineinwirkung, Kalziumionophoren und B-Zell-Rezeptor-Stimulation (Sahoo et al. 2002). Auch bei den Versuchsreihen dieser Arbeit führte die CpG-Stimulation der B-CLL-Zellen zu einer Hochregulation von CD80 und CD86, die durchflusszytometrisch erfasst werden konnte. Die unstimulierte, unbehandelte Kontrolle wies eine CD80/CD86-Positivität von  $15.16 \pm 4.29\%$  auf, während die stimulierten Zellen bei  $59.81 \pm 2.84\%$  lagen. Dies war statistisch auf dem Niveau 0.001 signifikant (siehe Abbildung 21).

Wie bereits in 3.1.1 ausgeführt, konnten die inhibitorischen Zusätze in Form von  $10\mu\text{M}$  NS und  $30\mu\text{M}$  NS,  $0.5\mu\text{M}$  Dasatinib und die Kombination  $10\mu\text{M}$  NS und  $0.5\mu\text{M}$  Dasatinib die Zellproliferation bei nur geringfügigen Viabilitätsverlusten wirksam reduzieren. Daher war es nun auch von Interesse, welche Auswirkungen die Inhibitoren auf die CD80/CD86-Positivität, kennzeichnend für das Ausmaß der Aktivierung und Stimulation, hatten. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle zugesetzten Inhibitoren in den genannten Konzentrationen die CD80/CD86-Positivität im Vergleich zur reinen Stimulation prozentual inhibierten.  $10\mu\text{M}$  NS inhibierte um  $26.96 \pm 6.78\%$ ,  $30\mu\text{M}$  NS um  $59.86 \pm 5.76\%$  und  $0.5\mu\text{M}$  Dasatinib um  $36.62 \pm 3.81\%$ . Daraus lässt sich erkennen, dass die Inhibition durch NS in dieser Dosisgrößenordnung konzentrationsabhängig war. Die Kombination aus NS  $10\mu\text{M}$  und  $0.5\mu\text{M}$  Dasatinib konnte die CD80/CD86-Positivität um  $61.43 \pm 2.58\%$ , hemmen. Im Vergleich zur reinen Stimulationsprobe war die CD80/CD86-Hemmung für  $10\mu\text{M}$  NS auf dem Niveau 0.05 signifikant,  $30\mu\text{M}$  für NS auf dem Niveau 0.001, für  $0.5\mu\text{M}$  Dasatinib auf dem Niveau 0.01 und für die Kombination aus NS  $10\mu\text{M}$  und  $0.5\mu\text{M}$  Dasatinib auf dem Niveau 0.001 (siehe Abbildung 21).

Durch die Resultate, dass  $10\mu\text{M}$  NS und  $0.5\mu\text{M}$  Dasatinib für sich allein genommen jeweils bedeutend schwächer inhibieren als zusammen in Kombination wie auch eine annähernd gleiche Wirkung des niedrigkonzentrierten  $10\mu\text{M}$  NS im Vergleich zum hochkonzentrierten  $30\mu\text{M}$  NS, sofern ersteres mit Dasatinib kombiniert wurde, lässt sich darauf schließen, dass ein bestimmter Wirkungssynergismus zwischen  $10\mu\text{M}$  NS und  $0.5\mu\text{M}$  Dasatinib vorliegt. NS – das auch SK-Kanäle ( $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^{+}$ -Kanäle), die aber normalerweise nicht in Lymphozyten vorkommen, blockiert - besitzt somit in vitro das Potential, das bewährte wirktechnisch breitgefächerte Dasatinib in seiner Wirkung zu verstärken oder zu ergänzen, wodurch es als künftig mögliches klinisches Therapeutikum Bedeutung erlangen könnte.

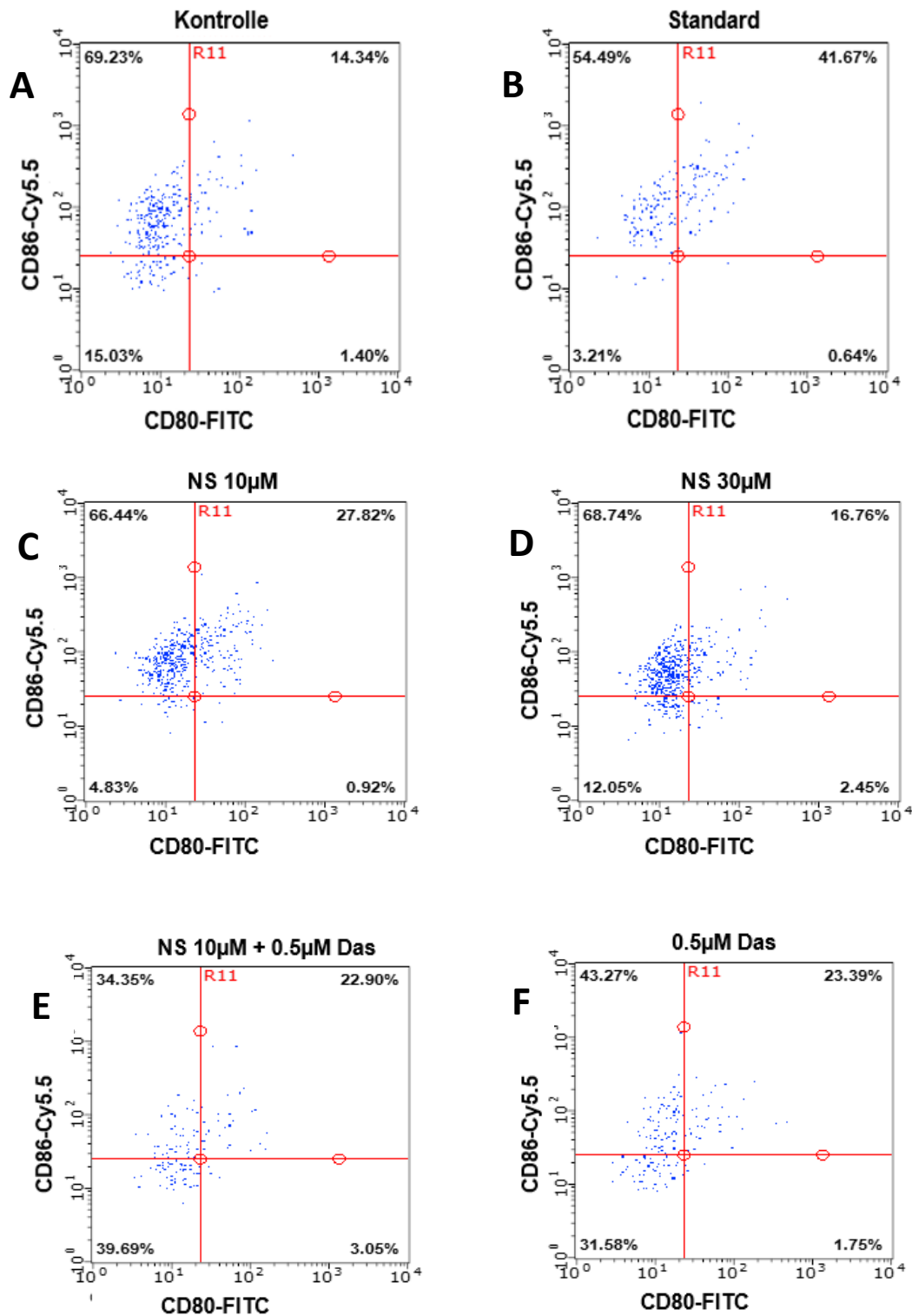


Abbildung 20: Exemplarische, repräsentative, durchflusszytometrische Messung der CD80/CD86-Positivität von *in vitro* stimulierten CLL-Zellen (Nr. 12) am Tag 3 des Proliferationsassays. Das Vor-Gaten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, sowie auf CD5/CD19-Positivität (spezifisch für CLL-Zellen) erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.4 erläutert. Zu sehen sind die sechs im Fließtext beschriebenen Untersuchungsbedingungen. Die Prozentwerte im jeweiligen rechten oberen Quadranten zeigen die CD80/CD86-Positivität an. Deutlich erkennbar ist die Hochregulation der beiden Oberflächenantigene bei der Standardprobe (B) im Vergleich zur Kontrolle (A) (41.67% vs. 14.34%). Ebenfalls gut erkennbar der konzentrationsabhängige Rückgang auf 27.82% bei 10 $\mu$ M NS (C) und 16.76% bei 30 $\mu$ M NS (D). Der synergistische Effekt von 10 $\mu$ M NS und 0.5 $\mu$ M Dasatinib (E) in der gezeigten Einzelmessung ist nicht ganz so ausgeprägt, wie in der durchschnittlichen Gesamtauswertung aller Messungen.

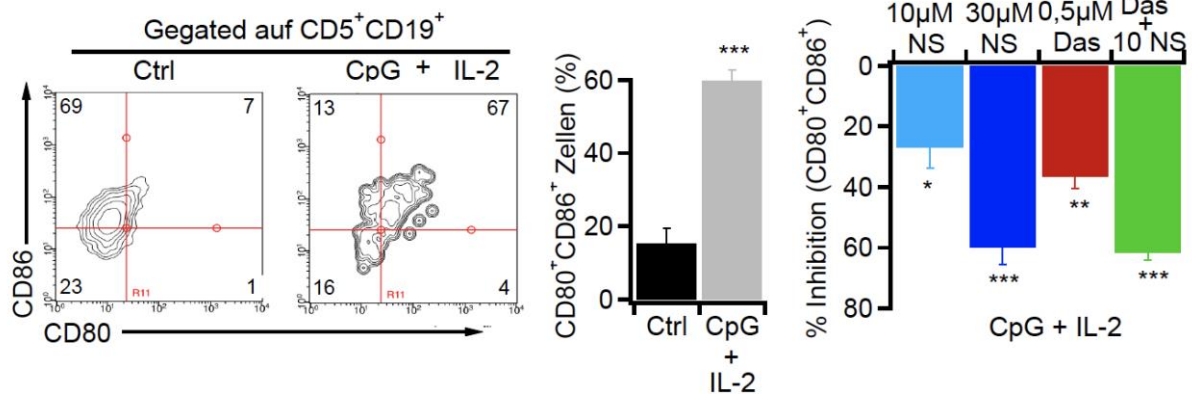


Abbildung 21: **Links:** Die deutliche Diskrepanz der CD80/CD86-Positivität zwischen der unbehandelten Kontrolle im Vergleich zur stimulierten Standardprobe. Dargestellt ist eine exemplarische, repräsentative Durchflusszytometrische Messung der CD80/CD86-Positivität von *in vitro* stimulierten CLL-Zellen am Tag 3 des Proliferationsassays. Das Vor-Gaten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, sowie auf CD5/CD19-Positivität (spezifisch für CLL-Zellen) erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.4 erläutert. Die statistische Auswertung zeigt die gemittelten Werte der unbehandelten Kontrolle (Ctrl, schwarz, n = 4) sowie die Aktivierung mit CpG und IL-2 (grau, n = 6) ± S.E.M.; \*\*\* = P < 0.001, angewandt wurde ein zweiseitiger studentischer t-Test. **Rechts:** Die Inhibition der CD80/CD86-Positivität durch die jeweiligen Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen und Konstellationen wurde auf die mit CpG und IL-2 aktivierte Probe normiert und die gemittelten Werte in Prozent (%) ± S.E.M. dargestellt. \* = P < 0.05; \*\* = P < 0.01; \*\*\* = P < 0.001, angewandt wurde eine ANOVA mit anschließendem PostHoc Test; n = 6. Für die dargestellte Versuchsreihe wurden die Proben Nr. 11-14 und 17-19 verwendet.

## 3.2. Elektrophysiologische Messungen von TRPM7

### 3.2.1 Quervergleich: CLL-Zellen und B-Zellen

#### 3.2.1.1 Stromdichte von CLL-Zellen gegenüber B-Zellen nach Auftauen bzw. Isolation aus Vollblut

TRPM7 wurde bereits mehrfach mit dem Wachstum und Überleben von Tumorzellen in Verbindung gebracht und ist in vielen Tumorzellen Überexprimiert. Über die Expression und Funktion von TRPM7 in chronischen lymphoiden Leukämiezellen ist allerdings noch gar nichts bekannt. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Rolle von TRPM7 bei der Aktivierung und Proliferation von CLL-Zellen.

Um TRPM7 in den B-CLL-Zellen funktionell zu charakterisieren, wurde die elektrophysiologische Patch-Clamp-Technik für unterschiedliche Fragestellungen herangezogen. Eine davon war, wie ausgeprägt die TRPM7-Ströme in kranken B-CLL-Zellen im Vergleich zu gesunden B-Zellen im Ruhezustand waren. Als Ruhezustand wurde definiert, dass die Zellen entweder frisch aufgetaut (CLL) oder frisch aus dem Vollblut isoliert waren und nicht stimuliert wurden.

Wie in 2.2.3.2 geschildert, wurden die B-Zellen und B-CLL-Zellen auf den Coverslips in Petrischalen vorbereitet. Für die Messungen im Ruhezustand der Zellen wurden die interne Lösung zur Befüllung der Patch-Pipetten bzw. die externe Lösung in den Petrischalen verwendet. Durch die beiden Lösungen sollte das reguläre intra- bzw. extrazelluläre Milieu simuliert werden. Da Lymphozyten typischerweise klein und kugelförmig sind, wurde beim Herstellen der Pipettenspitzen ein entsprechend hoher Pipettenöffnungswiderstand 4MΩ gewählt. Die durchgeführten Messungen wurden wie bereits

---

beschrieben gesammelt, exportiert und statistisch ausgewertet. Für B-Zellen und B-CLL-Zellen wurden zudem Traces vom Beginn und Ende einer unter den verschiedenen Bedingungen jeweilig repräsentativen Einzelmessung zum Erstellen einer Strom-Spannungskurve extrahiert (siehe Abb. 20). Dabei ergab sich eine mittlere Stromdichte p80 der B-CLL-Zellen von  $67.8 \pm 3.8$  pA/pF gegenüber  $26.2 \pm 3.5$  pA/pF der B-Zellen ( $P < 0.001$ ). Somit war die basale Kanalaktivität in den kranken B-CLL-Zellen deutlich höher als in den gesunden B-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass in B-CLL-Zellen TRPM7 funktionell überexprimiert ist und lässt auf eine wichtige Funktion des Proteins in diesen Zellen schließen.

### **3.2.1.2 Stromdichteentwicklung von CLL- bzw. B-Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin**

Vor dem Hintergrund des deutlichen Unterschieds zwischen den Kanalaktivitäten beider Zelltypen (krank und gesund) im unstimulierten Zustand war die weiterführende Frage, wie sich die Stromdichten nach Aktivierung und Stimulation entwickeln. Hierzu wurden beide Zellgruppen mit PMA 10nM und Ionomycin 175nM über 19 Stunden stimuliert und anschließend Patch-Clamp-Versuche durchgeführt. Für die Messungen der stimulierten Zellen wurden hierbei Pipettenspitzen mit 3MΩ-Öffnungswiderstand verwendet, da die Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle an Größe zugenommen hatten und daher eine größere Pipettenspitze zu besserem Messerfolg führte. Verwendete wurden wieder unsere interne und externe Standardlösungen. Es wurden sowohl stimulierte Zellen als auch unstimulierte Kontrollen gemessen (Abb. 22). Die statistische Auswertung erfolgte bei den paarweisen Vergleichen mittels Student's T-Test. Hierbei ergab sich für die B-Zellen nach Stimulation ein Stromdichteanstieg p80 auf  $31.7 \pm 2.9$  pA/pF (nicht signifikant), während die malignen CLL-Zellen einen signifikanten Stromdichterückgang p80 auf  $27.6 \pm 2.7$  pA/pF ( $P < 0.001$ ) aufwiesen. Die gemessenen unstimulierten Kontrollmessungen ergaben wie zu erwarten im Mittel identische Werte wie die in 3.2.1.1 ermittelten Stromdichten. Als problematisch erwies sich der unterschiedlich starke Größenzuwachs der Zellen, was sich in einer deutlich höheren Kapazität (C-Slow, gemessen in picoFarrad) bemerkbar machte: Die CLL-Zellen wuchsen in beträchtlicherem Ausmaß als die B-Zellen, sodass neben der Stromdichte auch die unnormierten Ströme der unstimulierten und stimulierten CLL-Probe verglichen wurden. Dennoch zeigte sich auch hierbei eine abnehmende Tendenz, sodass festzustellen war, dass die Stimulation mit PMA und Ionomycin die B-Zell-Ströme erhöhte, während sie in den malignen B-CLL-Zellen keine signifikante Änderung bewirkte.

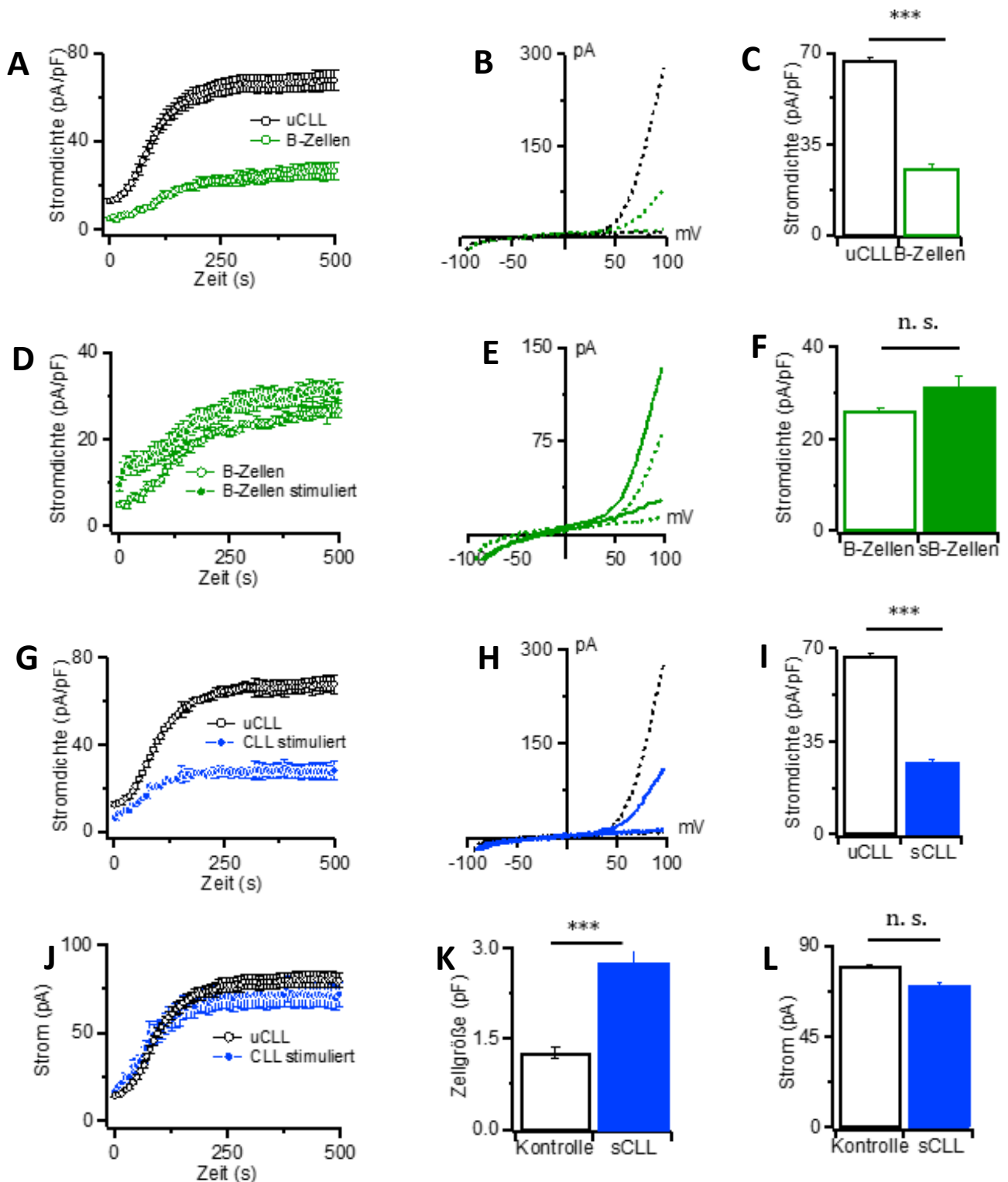


Abbildung 22: Veranschaulicht ist der Vergleich der TRPM7-Auswärtsstromdichte extrahiert bei +80mV zwischen frisch aufgetauten und unbehandelten CLL-Zellen (uCLL, schwarz, offene Kreise,  $n = 57$ , Nr. 1-10) und B-Zellen (grün, offene Kreise,  $n = 6$ ) (A). Dargestellt wurden die gemittelten Werte  $\pm$  S.E.M. Aus zwei repräsentativen Messungen wurden die Traces extrahiert und eine Strom-Spannungskurve (B) erstellt. Die Auswärtsstromdichten sind nochmals mit statistischer Auswertung (studentischer t-Test) in einem Balkendiagramm (C) als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Analog dazu ist der Vergleich zwischen unbehandelten und stimulierten B-Zellen (D, E, F), sowie zwischen frisch aufgetauten, unbehandelten CLL-Zellen und stimulierten CLL-Zellen (G, H, I) illustriert ( $n = 15$ , Nr. 6-10). Die unterste Reihe (J, K, L) zeigt nochmals einen Vergleich zwischen frisch aufgetauten, unbehandelten CLL-Zellen (uCLL, schwarz, offene Kreise,  $n = 57$ ) und stimulierten CLL-Zellen (blau,  $n = 15$ , Nr. 6-10). Hierbei entfiel aber die Normierung des ermittelten Stroms auf die Zellgröße, so dass nicht die Stromdichte, sondern

---

der Strom der beiden Vergleichsgruppen gegeneinander aufgetragen ist. Zu sehen sind zudem der Zellgrößenunterschied (K) und die Auswärtsstromdifferenz (L). \*\*\* =  $P < 0.001$ , n.s. = nicht signifikant.

### **3.2.2 TRPM7-Stromdichten in mit DSP30 und Interleukin-2 stimulierten proliferierenden CLL-Zellen**

#### **3.2.2.1 Entwicklung der TRPM7-Stromdichte von proliferierenden CLL-Zellen über 4 Tage**

Die Stimulation von PMA und Ionomycin ist zuverlässig und in der gängigen Laborpraxis zur in vitro Aktivierung von Lymphozyten fest etabliert. Eine andere methodische Herangehensweise ist die Aktivierung und Stimulation mit einem CpG-Motiv, die in CLL-Zellen, aber nicht in gesunden B-Zellen zu einer Proliferation führt (Decker et al. 2000b; Decker et al. 2000a). Dabei wurden bei jeder Patientenprobe respektive Proliferationsversuchsreihe die Zellen, die nicht zur Durchflusszytometrie herangezogen wurden, an den Tagen 1,2 und 3 für Patch-Clamp-Versuche verwendet. Hierbei wurde nur auf die mit DSP30 und IL-2 stimulierten Zellen ohne zusätzliche Hemmstoffsupplementation zurückgegriffen und an Tag 3 zusätzlich auch die unstimulierte Kontrolle gemessen. Verwendete Lösungen waren wieder unsere internen und externen Standardlösungen. Grundlage der statistischen Auswertung bildete eine univariate ANOVA mit darauffolgendem Dunnett T3 post-hoc-Test. Über die drei Messtage zeigte sich eine starke Größenprogredienz der CLL-Zellen, die Kapazität (C-Slow, in pF) stieg auf Werte bis zu 18pF an. Die mittleren Stromdichten wiesen eine absteigende Entwicklung auf: an Tag 1 nach Stimulation (Tag 0) war die Stromdichte bereits auf  $33.1 \pm 3.2$  pA/pF gefallen, an Tag 2 auf  $22.7 \pm 2.1$  pA/pF und an Tag 3 auf  $19.6 \pm 2.3$  pA/pF. Alle Messungen der drei aufeinanderfolgenden Tage waren im Vergleich mit der der unstimulierten CLL-Zellen hoch signifikant ( $P < 0.001$ ), zwischen Tag 1 und 3 zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied ( $P < 0.05$ ), siehe Abb. 23.

#### **3.2.2.2 Zellgrößenunabhängige TRPM7-Ströme von proliferierenden CLL-Zellen über 4 Tage**

Da die starke Größenprogredienz der CLL-Zellen unmittelbar Auswirkung auf die Stromdichte hatte, wurden die unnormierten Ströme der 3 Tage einschließlich derjenigen vom Tag 0 (=unstimuliert) gemittelt und ausgewertet. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zur Stromdichte eine aufsteigende Tendenz. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die moderate Stromerhöhung der Zellen durch ihren massiven Größenzuwachs überlagert wurde und somit in der Gesamtschau eine Abnahme der Stromdichte errechnet wurde.



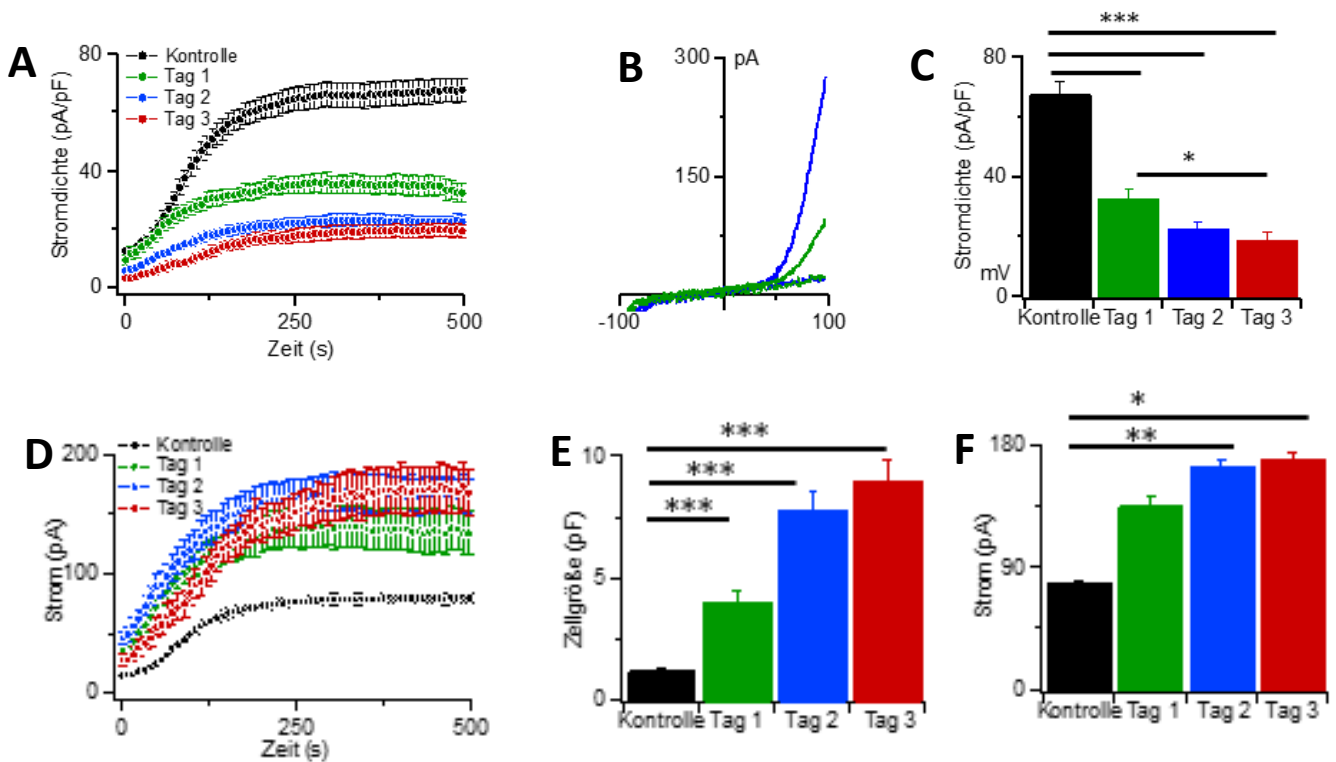


Abbildung 23: Veranschaulicht ist der Vergleich der TRPM7-Auswärtsstromdichte (Mittelwert  $\pm$  S.E.M.) extrahiert bei +80mV zwischen frisch aufgetauten und unbehandelten CLL-Zellen (Kontrolle, schwarz,  $n = 57$ , Nr. 1-10) sowie mit DSP30 + Interleukin-2 stimulierten Zellen (jeweils Nr. 17+18) über die Tage 1 (grün,  $n = 15$ ), 2 (blau,  $n = 14$ ) und 3 (rot,  $n = 9$ ) (A). Aus zwei repräsentativen Messungen von Tag 1 und 2 wurden die Traces extrahiert und eine Strom-Spannungskurve (B) erstellt. Die Auswärtsstromdichten sind zudem mit statistischer Auswertung (univariate ANOVA mit anschließendem Dunnett T3 post-hoc-Test) in einem Balkendiagramm als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. in (C) dargestellt. Die untere Reihe (D, E, F) zeigt nochmals den Vergleich zwischen frisch aufgetauten, unbehandelten CLL-Zellen (Kontrolle, schwarz) und den stimulierten CLL-Zellen über die drei Tage. Hierbei entfiel aber die Normierung des ermittelten Stroms auf die Zellgröße, so dass nicht die TRPM7-Stromdichte, sondern der TRPM7-Strom der beiden Vergleichsgruppen gegeneinander aufgetragen ist. Zu sehen sind zudem der Zellgrößenunterschied (E) und der Vergleich der Auswärtsströme in einem Balkendiagramm (F). \*\*\* =  $P < 0.001$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \* =  $P < 0.05$ ; S.E.M. = Standardfehler

### 3.2.3 Inhibition der TRPM7-Ströme in CLL-Zellen durch intrazelluläres $Mg^{2+}$ und $Mg\bullet ATP$

#### 3.2.3.1 Kanalhemmung frisch aufgetauter CLL-Zellen

Intrazelluläres Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ist ein bekannter Inhibitor von TRPM7.

Feroli et al. 2017 konnten zeigen, dass TRPM6/7-Heteromere in TRPM6 und TRPM7 cotransfizierten HEK-Zellen unterschiedliche Ionenstromeigenschaften aufwiesen als reine homomere TRPM7-Komplexe. Die Heteromere wiesen im Vergleich zu Homomeren eine deutliche höhere Stromdichte auf und waren durch  $Mg^{2+}$  und selbst hohe Konzentrationen von  $Mg\bullet ATP$  von 9mM nur geringfügig hemmbar, während die Stromdichte bei homomeren TRPM7 stark abnahm.

---

Eine experimentelle Inhibition der TRPM7-Ströme in den CLL-Zellen durch  $Mg^{2+}$  und  $Mg\bullet ATP$  ist daher nicht nur dahingehend interessant, um die bei anderen Zellarten in der Fachliteratur beschriebene Hemmung auch für die CLL-Zellen nachzuweisen, sondern auch um Hinweise auf die Kanalproteininformationen bzw. das mögliche Vorliegen von TRPM6/7-Heteromeren zu erlangen.

Zunächst wurde die Inhibition der Ionenströme an frisch aufgetauten CLL-Zellen durchgeführt. Für die Pipettenspitzen galten die gleichen Zielwerte an Widerstand wie in 3.2.1.1. Verwendete Lösungen waren in diesem Fall interne Lösungen mit  $250\mu M Mg^{2+}$  bzw. mit  $1.5mM Mg\bullet ATP$  kombiniert mit der externen Standardlösung. Grundlage der statistischen Auswertung bildete eine univariate ANOVA mit darauffolgendem Dunnett T3 post-hoc-Test im Fall von mehr als zwei Vergleichsgruppen sowie der Student's T-Test bei Vergleichen von zwei Gruppen. Es konnte gezeigt werden, dass  $250\mu M Mg^{2+}$  den Ionenstrom auf  $38.6 \pm 3.8 pA/pF$  und damit auf nahezu die Hälfte der ursprünglichen Stromdichte von  $67.8 \pm 3.8 pA/pF$  ( $P < 0.001$ ) der Kontrollzellen reduzierte (siehe Abb. 24).  $1.5mM Mg\bullet ATP$  ( $P < 0.001$ ) führte sogar zu einer noch stärkeren Inhibition auf  $7.1 \pm 1.5 pA/pF$  Stromdichte und damit praktisch zum Erliegen des Ionenflusses. Die inhibierende Wirkung von intrazellulärem Magnesium konnte somit bestätigt und das Vorliegen von TRPM6/7-Heteromeren weitgehend ausgeschlossen werden, sodass der gemessene Strom höchstwahrscheinlich von reinen TRPM7-Homomeren generiert wurde.

### **3.2.3.2 Kanalhemmung proliferierender CLL-Zellen nach 3 Tagen**

Auch die Inhibition der proliferierenden CLL-Zellen aus dem Proliferationsassay mit  $1.5mM Mg\bullet ATP$  wurde experimentell erfasst. Die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von TRPM6/7-Heteromeren mit veränderten Stromdichteprofilen steigt logischerweise mit vermehrter TRPM6-Hochregulation. Da der Zusammenhang zwischen zellulärer Aktivierung, Stimulation und Proliferation und TRPM6-Hochregulation für diverse Zelltypen in der Literatur (Zhang et al. 2014) beschrieben ist, wurde davon ausgegangen, dass eine Hochregulation von TRPM6 mit funktioneller Konsequenz zumindest nicht ausgeschlossen werden konnte. Da die Stromdichte wie in 3.2.2 geschildert an Tag 3 auf  $19.6 \pm 2.3 pA/pF$  gefallen war, war die Fragestellung über diejenige nach dem Vorhandensein von stromverändernden TRPM6/7-Heteromeren hinaus auch, inwieweit eine derart geringe TRPM7-Stromdichte in den stimulierten CLL-Zellen noch weiter wirksam inhibiert werden kann. Hierzu wurden die Zellen an Tag 3 wie gewöhnlich geerntet und präpariert. Verwendet wurden die interne Lösung mit  $1.5mM Mg\bullet ATP$  und die externe Standardlösung. Die Stromdichte konnte hierbei von  $19.6 \pm 2.3 pA/pF$  auf  $4.0 \pm 0.7 pA/pF$  signifikant ( $P < 0.001$ ) reduziert werden. Wie bei den frisch aufgetauten CLL-Zellen, zeigte sich also auch hier eine deutliche inhibitorische Wirkung von  $Mg\bullet ATP$ , die das Vorliegen von TRPM6/7-Heteromeren unwahrscheinlich macht.

### 3.2.3.3 Kanalhemmung mit PMA und Ionomycin stimulierter CLL-Zellen

Um das Inhibitionsprofil von intrazellulärem Magnesium auf die TRPM7-Ströme in CLL-Zellen zu komplettieren, wurden auch die Ionenströme der mit 10nM PMA und 175nM Ionomycin über 19h stimulierten CLL-Zellen gemessen. Für die Messungen der Zellen wurden hierbei Pipettenspitzen mit 3M $\Omega$ -Öffnungswiderstand verwendet, sowie interne Lösungen mit 250 $\mu$ M Mg<sup>2+</sup> bzw. mit 1.5mM Mg•ATP kombiniert mit der externen Standardlösung. Hierbei ergab sich eine Stromdichtereduktion von 27.6  $\pm$  2.7 pA/pF auf 16.3  $\pm$  5.2 pA/pF für 250 $\mu$ M Mg<sup>2+</sup> (nicht signifikant) und 3.4  $\pm$  0.6 pA/pF für 1.5mM Mg•ATP (P < 0.001).

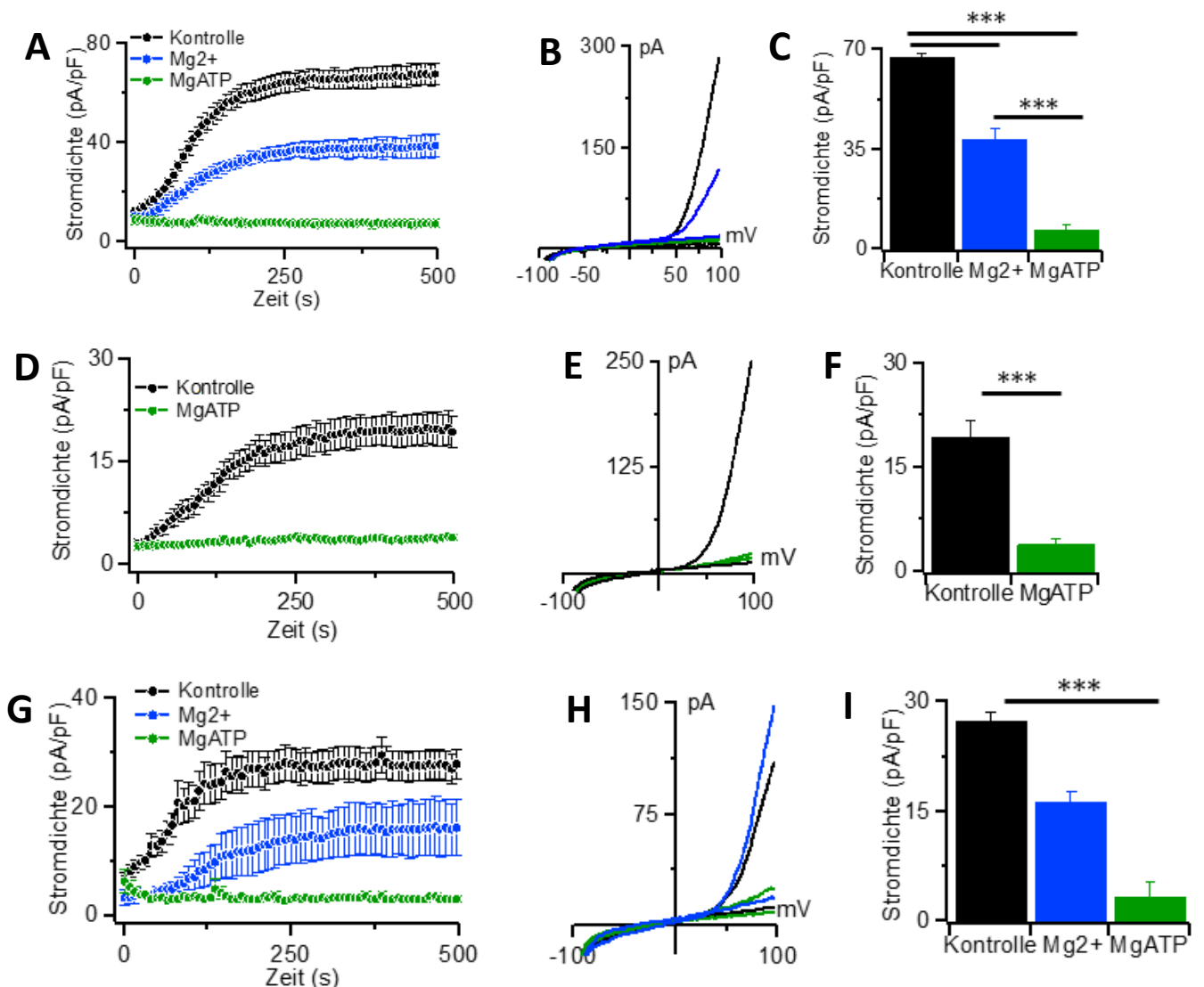


Abbildung 24: Veranschaulicht ist der Vergleich der TRPM7-Auswärtsstromdichte (Mittelwert  $\pm$  S.E.M.) extrahiert bei +80mV zwischen frisch aufgetauten und unbehandelten CLL-Zellen jeweils ohne Magnesium (Kontrolle, schwarz, n = 57, Nr. 1-10), mit 250 $\mu$ M Mg<sup>2+</sup> (blau, n = 12) und 1.5mM Mg•ATP (grün, n = 13) in der externen Lösung (jeweils Nr. 15+16) (A). Aus drei repräsentativen Messungen der Vergleichsgruppen wurden die Traces extrahiert und eine Strom-Spannungskurve (B) erstellt. Die Auswärtsstromdichten sind zudem mit statistischer Auswertung (univariate ANOVA mit anschließendem Dunnett T3 post-hoc-Test) in einem Balkendiagramm als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. in (C) dargestellt. Die mittlere Reihe zeigt den Vergleich der mittleren Stromdichte an Tag 3 der Proliferation einmal ohne Magnesium (Kontrolle, schwarz, n = 9) und einmal mit 1.5mM

---

*Mg•ATP (grün, n = 12) in der externen Lösung (jeweils Nr. 15+16) (D). Repräsentative Traces sind in (E) und das Balkendiagramm mit den entsprechenden gemittelten Auswärtsstromdichten  $\pm$  S.E.M. in (F) dargestellt. Die untere Reihe illustriert die gemittelten Auswärtsstromdichten  $\pm$  S.E.M. von mit PMA und Ionomycin stimulierten CLL-Zellen, analog zur oberen Reihe ebenfalls jeweils ohne Magnesium (Kontrolle, schwarz, n = 4), mit 250 $\mu$ M Mg<sup>2+</sup> (blau, n = 4) und 1.5mM Mg•ATP (grün, n = 6) in der externen Lösung (jeweils Nr. 15+16) (G). Entsprechende repräsentative Traces sind in (H) und das Balkendiagramm mit den entsprechenden gemittelten Auswärtsstromdichten  $\pm$  S.E.M. in (I) dargestellt. \*\*\* = P < 0.001 (ANOVA).*

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung

Die Zielsetzung der Arbeit bestand darin, erstmalig die Rolle von TRPM7 bei der Aktivierung und Stimulation sowie Proliferation von CLL-Zellen zu eruieren. Hierzu wurden im Wesentlichen zellbiologische, durchflusszytometrische und elektrophysiologische Methoden angewandt. Es wurden sowohl maligne B-CLL-Zellen als auch gesunde B-Zellen als Vergleichspopulation verwendet und mit Hilfe von Oberflächenmarkierungen und elektrophysiologische Strommessungen untersucht. TRPM7 spielt nach aktuellem Stand eine entscheidende Rolle für das Wachstum und Überleben von Tumorzellen. Die chronisch lymphatische Leukämie stellt epidemiologisch die häufigste Leukämie in der westlichen Welt dar, eine weitere Verbesserung der bisherigen Therapiemöglichkeiten durch neue Erkenntnisse über die Kanalaktivität von TRPM7 und dessen Blockierung könnte ein vielversprechender Ansatz für die Zukunft darstellen.

Mit den durchflusszytometrischen Färbungen der Oberflächenmarker von Lymphozyten wurde durch CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>-Doppelpositivität die Reinheit der B-CLL-Zellen und durch CD19-Positivität die Reinheit der B-Zellen überprüft. Ferner wurde die Proliferation der CpG-stimulierten (und wahlweise zusätzlich mit inhibitorischen Agenzien versetzten) CLL-Zellen durch Zellzahlmessung gezeigt. Als inhibitorische Substanzen dienten der spezifische TRPM7 Inhibitor NS8593 und der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib. Die CpG-vermittelte Aktivierung und Stimulation wurde durch die CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>-Doppelpositivität der CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>-doppelpositiven CLL-Zellen nachgewiesen.

Ein wesentlicher Teil der Arbeit beschäftigte sich somit mit der Kombination von etablierten (Dasatinib) Wirkstoffen mit dem TRPM7-Inhibitor NS8593 hinsichtlich ihrer proliferationshemmenden Wirkung auf die malignen Zellen, die Fragestellung hierbei war, ob insbesondere ein Wirksynergismus zwischen den Substanzen gezeigt werden konnte. Dies könnte künftige antineoplastische Therapien effektiver und in der Dosis und Nebenwirkung – Dasatinib verursacht als Nebenwirkung u.a. pulmonalarterielle Hypertonie (Skride et al. 2017) - für den Patienten deutlich schonender gestalten.

---

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die durch CpG-Stimulation ausgelöste Proliferation der B-CLL-Zellen sowohl durch den bewährten Wirkstoff Dasatinib als auch durch NS8593 und in Kombination beider Wirkstoffe gehemmt werden konnte. Auch die CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>-Doppelpositivität als Maß für die Stimulation ging bei den durch NS8593 inhibierten Zellen zurück. Da NS8593 ein spezifischer TRPM7-Inhibitor ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Ionenkanalfunktion von TRPM7 für die Stimulation und Proliferation von CLL-Zellen von unverzichtbarer Bedeutung ist. Gestützt wird dies auch durch die elektroфизиologischen Resultate der TRPM7-Ströme: Bereits im Ruhezustand waren diese bei den entarteten CLL-Zellen höher als bei den gesunden B-Zellen. Die TRPM7-Ströme der proliferierenden Zellen nahmen darüber hinaus über die drei Tage hinweg sukzessive zu.

In der Gesamtschau untermauern die Versuchsergebnisse die These, dass das Ausmaß der funktionellen Aktivität des Ionenkanals TRPM7 ausschlaggebend für eine entsprechende Stimulation und Proliferation von B-CLL-Zellen ist. Dadurch wird der Kanal zu einem interessanten Ansatzpunkt für antineoplastische Therapeutika. Insbesondere die aufgezeigte Differenz zwischen der Kanalaktivität in gesunden B-Zellen und malignen CLL-Zellen könnte zudem für einen etwaigen gegen TRPM7 gerichteten Wirkstoff bedeuten, dass er in niedrigen Dosen eine effektive Wirksamkeit bei zurückhaltenden Nebenwirkungen auf gesunde Lymphozyten entfaltet. Dies gewinnt besonders an Bedeutung, da Krebspatienten durch die Tumorerkrankung im Allgemeinen immungeschwächerter als gesunde Menschen sind und sowohl durch die klassische Chemotherapie als auch etablierte therapeutische Antikörper eine weitere Kompromittierung der Abwehrkräfte stattfindet. Durch eine neuartige Therapie weitestgehend unbeeinträchtigte gesunde B-Lymphozyten stellen daher hinsichtlich der bekannten Infektneigung von CLL-Patienten einen wichtigen immunologischen Schutz für Betroffene dar und könnten zur Erniedrigung der Hospitalisierungsrate führen.

## 4.2 TRPM7 und Proliferation von Krebszellen

Dass eine Inhibition von TRPM7 die Proliferation von CLL-Zellen hemmt konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. Für andere Krebsarten allerdings liegen hierzu schon kongruente Daten vor. Huang et al. 2017 untersuchten die TRPM7-Ströme in der humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29. Sie konnten zeigen, dass eine auf TRPM7 spezifizierte siRNA-Transfektion eine Reduktion der TRPM7 mRNA um 67% gegenüber der Transfektionskontrolle hervorrief. Daraufhin elektroфизиologisch erfasste TRPM7-Stromdichten der siRNA transfizierten Zellen zeigten eine Reduktion von 60% gegenüber der Kontrolle. Die Zellproliferation nach 72 Stunden Inkubation war schlussendlich im Vergleich zur Kontrolle bei den transfizierten Zellen um 35% erniedrigt, und bei mit dem TRPM7-Inhibitor Waixenicin A bei 10 $\mu$ M inkubierten Zellen um 45% erniedrigt.

---

Chen et al. 2015 befassten sich mit dem Zusammenhang von TRPM7 und der Proliferation von Krebszellen anhand einer humanen U87 Glioblastomzelllinie. Sie zeigten, dass 500µM des TRPM7-Inhibitors Carvacrol die TRPM7-Stromdichte in den Glioblastomzellen von 9 auf 4.6 pA/pF an auswärtsgerichteten Strom bei 100 mV reduzierte. Die Zellproliferation der U87-Zellen wurde darüber hinaus jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Während die Kontrolle über die drei Zeitpunkte eine zunehmende Proliferation aufwies (119.9%, 196.1% und 250.1% bezogen auf die Zellzahl bei 0 Stunden), konnte der Zusatz von 250µM Carvacrol die Proliferation auf 112.0%, 180.5% und 222.3% reduzieren. 750µM und 1000µM Carvacrol konnten die Proliferation sogar unter 100% senken. Somit konnte auch hier ein direkter Zusammenhang zwischen TRPM7 und der Zellproliferation dieser Krebszellart gezeigt werden.

Guilbert et al. 2009 zeigten einen Zusammenhang zwischen TRPM7-Expression und Proliferation am Beispiel von humanen Brustkrebszellen. Hierbei konnte eine signifikante direkte Korrelation zwischen erhöhtem Ki-67-Proliferationsindex und TRPM7-Expression festgestellt werden.

Es ist bekannt, dass TRPM7 eine essentielle Rolle in der  $Mg^{2+}$ -Homöostase einnimmt. Insbesondere aktivierte und proliferierende Malignomzellen neigen stark dazu, Magnesium intrazellulär zu akkumulieren um den beschleunigten Zellzyklus gewährleisten zu können. Durch die Inhibition von TRPM7, wie bei den Versuchen bereits erfolgreich durchgeführt, kommt es zum Zellzyklusarrest und die Proliferation sistiert. Dass die gemessene Zellzahl der durch NS 10µM, NS 30µM, NS 10µM + 0.5µM Dasatinib und 0.5µM Dasatinib inhibierten CpG-stimulierten CLL-Proben nicht nur unter den rein CpG-stimulierten Zellen liegen, sondern auch unter die unstimulierte Kontrolle zurückfallen, könnte mehrere Ursachen haben. Da bei Proliferationsvorgängen Zellen stärker um Nährstoffe im Medium konkurrieren, kann es neben der Vermehrung von Zellen zum Teil auch zu erhöhter Apoptose kommen. Die gemessenen Viabilitäten der Vergleichsgruppen zeigten hierbei allerdings nur einen geringfügigen Einbruch der Viabilitätsrate bei den mit NS 30µM sowie NS10µM + 0.5µM Dasatinib behandelten CLL-Zellen. Während also in diesen Gruppen ein zusätzlicher toxischer Effekt der zugesetzten Wirkstoffe für eine Reduktion der Zellzahl nicht auszuschließen ist, scheint in den übrigen Dosierungsgruppen eine reine Proliferationshemmung vorzuliegen.

Andererseits könnte die optimale Hemmstoffkonzentration noch nicht gefunden worden sein, sodass der Zellrückgang unter das Ausgangsniveau der Kontrolle zumindest für NS 30µM sowie NS10µM + 0.5µM Dasatinib daran liegen mag, dass die TRPM7-spezifische Inhibition der CLL-Zellen bereits schon mit niedrigeren Konzentrationen – vor allem bei der Kombination mit Dasatinib - bei erhaltener Viabilität zu erreichen ist. Beispielsweise zeigt die Relation zwischen Zellrückgang und Viabilität bei NS10 im Vergleich zu NS30, dass NS in niedrigeren Dosen möglicherweise ein besseres Nutzen-Risiko-Verhältnis aufweist.

---

Ein Wirksynergismus zwischen NS10 und 0.5µM Dasatinib ist hinsichtlich der Zellzahl zumindest angedeutet, da die Zellzahl geringer war als in der reinen Dasatinib-Gruppe. Inwiefern dies allein auf die Unterschiede der Viabilität (bei Dasatinib allein größer) zurückzuführen ist, muss durch weitere Versuchsreihen geklärt werden. Möglicherweise gibt es tatsächlich einen Wirkstoffsynergismus, der im gleichen Maße die Proliferation hemmt, allerdings eine geringere Toxizität aufweist und mit der angewandten Methode der Zellzählung darstellbar ist. **Vielversprechender hierbei sind hingegen die durchflusszytometrische Detektion der CD80+/CD86+-Doppelpositivität in den jeweilig mit NS8593 und Dasatinib in Kombination behandelten Zellen: Hierbei zeigt sich ein eindeutiger Wirksynergismus der getesteten Wirkstoffkombination, da die CD80+/CD86+-Doppelpositivität in den so inhibierten CLL-Zellen signifikant rückläufiger war als in den Vergleichsgruppen mit den jeweiligen Einzelsubstanzen.**

Für künftige daran anknüpfende Versuche wäre es daher hilfreich, weitere ggf. noch niedrigere Konzentrationen der Hemmstoffe auszutitrieren. Denkbar wären beispielsweise Kombinationen, bei denen sowohl NS8593 als auch Dasatinib niedriger dosiert werden. Eine weitere Möglichkeit die Proliferation selbst zu messen, bestünde in der durchflusszytometrischen Ki-67-Markierung der Zellen. Das Protein Ki-67 wird in allen Zellzyklusphasen außer der G<sub>0</sub>-Phase von ruhenden Zellen exprimiert und stellt ein geeignetes Nachweisverfahren für die Proliferation dar. Ein weiterer Kritikpunkt stellt schlussendlich der CLL-Proliferationsassay selbst dar: Die angewandte Proliferationsmethode nach Decker et al. 2000a verläuft lediglich über drei Tage und erfasst zeitlich möglicherweise nur den initialen Anstieg an TRPM7 während des starken Zellwachstums aber nicht das Plateau der eigentlichen Proliferation. Dies könnte unter anderem erklären, warum die deutliche Inhibition der CD80+/CD86+-Doppelpositivität nicht direkt mit entsprechend niedrigeren Zellzahlen korreliert. Es ist anzunehmen, dass die Verminderung von CD80 und CD86 an der Zelloberfläche der CLL-Zellen der eigentlichen Proliferationshemmung zeitlich um Stunden bzw. Tage vorausgeht. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 5-7 Tage könnte daher dazu führen, dass die eingesetzten Substanzen bzw. Kombinationen ihre Wirkung signifikanter entfalten können und die Resultate der Zellzählung einschlägiger ausfallen.

### 4.3 TRPM7-Ströme in CLL-Zellen

Zentraler Kernbestandteil der Arbeit war die erstmalige Erfassung von TRPM7-Ionenströmen in den CpG-stimulierten CLL-Zellen über drei Tage. Durch die erhobenen Befunde der Zellzahlmessung und durchflusszytometrischen Anfärbungen der Oberflächenmarker der proliferierenden Zellen und der aus der Literatur direkten Korrelation zwischen TRPM7, Mg<sup>2+</sup>-Einstrom und Proliferation, war es naheliegend, dass die Stromdichten bis hin zu Tag 3 zunehmen sollten. Allerdings wurde hier zunächst

---

gegenteilig eine Abnahme der Stromdichte beobachtet, während die Zellgröße drastisch zunahm. Um auszuschließen, dass dies auf einen prozentualen Viabilitätsverlust der proliferierenden Zellen zurückzuführen war, wurde die Viabilität gemeinsam mit der Zellzahl ermittelt. Die Viabilitäten vor und nach Proliferation über 3 Tage unterschieden sich nicht wesentlich. Da darüber hinaus die Zellzahl der CpG-stimulierten Zellen erwartungsgemäß für den Proliferationsvorgang anstieg und auch die CD80+/CD86+-Doppelpositivität zunahm, wurde die massive Zellgrößenzunahme auch in ihrem Ausmaß als natürliche Folge der Proliferation bewertet.

Die Schlussfolgerung aus allen nachgegangenen Überlegungen war, dass die Stromdichteabnahme lediglich durch die Normierung auf die überproportionale Zellgrößenzunahme generiert war. Die angewandte Proliferationsmethode nach Decker et al. 2000a verläuft wie bereits in 4.2 erwähnt lediglich über drei Tage und erfasst zeitlich möglicherweise nur den initialen Anstieg an TRPM7 während des starken Zellwachstums. Denkbar wäre eine Verlängerung der Inkubationszeit über drei Tage hinaus mit Wechsel auf ein frisches Medium. Dadurch könnten weit höhere TRPM7-Ströme bei gleichbleibender Zellgröße und damit höhere Stromdichten erfasst werden.

Die elektrophysiologischen TRPM7-Resultate der Zellen, die über 19 Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden, unterschieden sich interessanterweise von den CpG-stimulierten Zellen. Im Falle der B-Zellen war ein leichter aber nicht signifikanter Anstieg der mittleren Stromdichte zu verzeichnen, während die Stromdichte in den B-CLL-Zellen stark und signifikant abnahm. Dies war zwar auch zum Teil wie bei den CpG-stimulierten Zellen auf eine gewisse Größenprogredienz der Zellen zurückzuführen, allerdings waren in diesem Fall selbst die unnormierten Ströme der stimulierten Zellen geringfügig niedriger als die der unstimulierten.

Ein Grund hierfür könnte die Eigenschaft von PMA und Ionomycin sein, Zellproliferation in malignen Zellen unter Umständen eher zu hemmen als zu fördern.

Han und Kollegen untersuchten hierzu die Wirkung von PMA und Ionomycin auf die Proliferation von Glioblastomzellen (Han et al. 2013). Sie konnten zeigen, dass sowohl PMA und Ionomycin allein als auch in Kombination im MTT-Assay über 120 Stunden und bei der kontrollierenden Zellzählung nach 48 Stunden zu einem Rückgang der Proliferation der Glioblastomzellen in zwei Zelllinien U87 und U251 führte. Weiterhin stieg die Apoptoserate über einen Zeitraum von 48 Stunden in beiden Zelllinien im TUNEL-Assay und eine Propidiumiodid-Analyse zeigte einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase in PMA und Ionomycin behandelten Zellen. Als molekularer Mechanismus konnte eine direkte Korrelation zwischen Fas-Ligand Produktion und NFAT-Expression ausgemacht werden – NFAT ist einer der Downstream-Transkriptionsfaktoren bei PMA/Ionomycin-Stimulation. Bei vielen Krebsarten liegt eine Überexpression von NFAT vor. In Bezug auf den in dieser Arbeit erhobenen TRPM7-Stromdichtenrückgang der kranken CLL-Zellen im Vergleich zum Anstieg bei gesunden B-Zellen nach



---

Stimulation mit PMA und Ionomycin könnte dies bedeuten, dass über den Zellzyklusarrest und die Apoptoseeinleitung via Fas-Pathway Vorgänge, die zu einer Proliferation führen, ausbleiben. In der Annahme der Wichtigkeit von TRPM7 für die Proliferation maligner Zellen ist es daher nachvollziehbar, dass auch die Stromdichte zurückgeht. Die Zeiträume des TRPM7-Stromdichterückgangs der mit PMA und Ionomycin stimulierten CLL-Zellen über lediglich 19 Stunden, während Han et al. in den Glioblastomzellen die ausbleibende Proliferation erstmals nach 24 Stunden sowie Apoptose erstmals nach 48 Stunden nachweisen konnten, könnten einen plausiblen Anhaltspunkt über die Reihenfolge des zellulären Geschehens in malignen Zellen darstellen. Offenbar wurden in den CLL-Zellen im Zeitraum von 19 Stunden noch keine antiproliferativen Vorgänge induziert. Dies würde erklären, warum die CLL-Zellen trotz Stromdichterückgang in der Guava-ViaCount-Messung (noch) vital unverändert mit ähnlicher Zellzahl im Vergleich vor Stimulation vorhanden waren. Künftige Western-Blot-Analysen von NFAT in CLL-Zellen verglichen mit B-Zellen während PMA und Ionomycin-Stimulation könnten mehr Aufschluss über die zellulären Vorgänge und damit verbunden die divergente Stromdichteentwicklung geben.

## 4.4 Ausblick

### 4.4.1 NS8593 als potentieller Wirkstoff in der CLL-Behandlung?

Die Versuche haben sich unter anderem mit der Fragestellung beschäftigt, ob der TRPM7-Inhibitor NS8593 potentiell als Wirkstoff in der Behandlung der Chronisch Lymphatischen Leukämie eingesetzt werden kann. In der Tat konnte eine *in vitro* Proliferationshemmung der CLL-Zellen bei Zugabe von NS8593 beobachtet werden. Dies liefert einen Anhaltspunkt dafür, dass die Substanz künftig ein Medikament werden könnte. Fraglich ist hierbei allerdings, inwiefern die *in vitro* Resultate auch die Vorgänge *in vivo* widerspiegeln und ob der Wirkstoff als eigenständiges Therapeutikum angewandt werden könnte oder bisherige Therapien lediglich augmentierend ergänzt. TRPM7 wird ubiquitär exprimiert, denkbare Nebenwirkungen leiten sich aus den Funktionen für TRPM7 in anderen Geweben ab. Möglicherweise kommt es beispielsweise durch Hemmung von TRPM7 in intestinalen Epithelzellen zu einer gestörten Magnesiumresorption oder durch eine Abnahme an dopaminergen Zellen in der Substantia Nigra zur Ausbildung eines Morbus Parkinson. Da es bisher naturgemäß noch keine Medikamentenstudie zu dem Molekül gibt, ist noch gänzlich unklar, wie sich der Stoff pharmako- bzw. toxikokinetisch im menschlichen Körper verhalten wird. Interessant ist zumindest in diesem Zusammenhang, dass es bereits *in vivo*-Versuche mit Nacktmäusen gab, die ein HCC-Xenograft abgeleitet von HuH7-Zellen in sich trugen. Hierbei zeigte sich, dass eine Injektion von NS8593 alle zwei Tage zu einer wirksamen Hemmung des Tumorwachstums führte (Voringer et al. 2020). Ob sich ähnliche Ergebnisse auch in klinischen Studien an Menschen reproduzieren lassen ist noch unklar. Das therapeutische Potential wird diesbezüglich stark eingeschränkt, wenn die klassischen

---

pharmakologischen Parameter wie Freisetzung, Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung die erwünschte Wirkung des Stoffes konterkarieren. So könnte es beispielsweise sein, dass die Substanz in der Leber in toxische Metabolite umgewandelt wird oder die CLL-Zellen erst gar nicht erreicht, da die Resorptionsfähigkeit nicht gegeben ist oder die Penetration ins Zielgewebe des Knochenmarks nicht gelingt. Weiterhin wären gefährliche CYP450-Interaktionen zu eruieren und eine sorgfältige Risikostratifizierung des Nebenwirkungsprofils durchzuführen. Ein Ansatz um die naheliegendste Nebenwirkung der Beeinträchtigung gesunder B-Zellen bereits experimentell zu erfassen, bestünde in der Aktivierung und Stimulation von B-Zellen beispielsweise mittels stimulierter T-Helferzellen und anschließender Zugabe von NS8593. Sollte es hier zu einer deutlich geringeren Hemmung als in den malignen CLL-Zellen kommen, würde der Wirkstoff zumindest was die gesunden B-Zellen betrifft zu keinen bzw. nur geringen unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen. Kritisch hierbei muss allerdings wiederholt die Tatsache angemerkt werden, dass TRPM7 ubiquitär vorkommt und ein solcher Versuch über Nebenwirkungen an anderem Gewebe bzw. Organverbänden keine prognostizierende Aussage treffen kann. Langzeitschäden durch den Wirkstoff sind ebenfalls nicht ausgeschlossen. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass klinisches Potential für NS8593 in der CLL-Behandlung besteht, weitere präklinische *in vitro*-Experimente und die gesamte *in vivo* Testung aber noch ausstehen.

#### **4.4.2 Weiterführende Experimente**

Mit den elektrophysiologischen Patch-Clamp-Messungen von TRPM7-Strömen in CLL-Zellen wurde wissenschaftliches Neuland betreten. Wie zu erwarten war, erhöhen sich die TRPM7-Ströme in proliferierenden Zellen im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen. Interessant wäre künftig auch die Evaluation von TRPM7-Strömen in den Zellen, die mit Wirkstoffen wie NS8593 und Dasatinib behandelt worden sind, um eine wahrscheinliche Reduktion der Stromdichte zu eruieren. Dies würde die vorliegenden Resultate untermauern. Da das Hauptaugenmerk der Arbeit auf dem Kanalanteil des TRPM7-Proteins lag, wäre es in Zukunft von großem Interesse, die direkten Interaktionen der Kinase mit Proteinen der B-Zell-Signalkaskade molekularbiologisch näher zu untersuchen. Hier aufgedeckte Phosphorylierungsvorgänge von TRPM7 in malignen CLL-Zellen würden einen weiteren, sogar direkten Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation der Zellen darstellen. Die Kinase ist gegenüber dem Kanal als Zielstruktur für angreifende Medikamente möglicherweise sogar noch besser geeignet, da gezeigt wurde, dass in Mäusen die genetische Inaktivierung der Kinase keine gravierende Auswirkung auf den Phänotyp hatte. Dadurch gewönne die Rolle von TRPM7 bei der Aktivierung und Proliferation von CLL-Zellen sowie die daraus abgeleiteten spezifischen Therapiemöglichkeiten noch mehr an Bedeutung, wie sie bereits in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurde.

---

## 5 Literaturverzeichnis

Advani, Ranjana H.; Buggy, Joseph J.; Sharman, Jeff P.; Smith, Sonali M.; Boyd, Thomas E.; Grant, Barbara et al. (2012): Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies. In: *Journal of Clinical Oncology* 31 (1), S. 88–94. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.7906.

Bellosillo, B.; Villamor, N.; Colomer, D.; Pons, G.; Montserrat, E.; Gil, J. (1999): In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. In: *Blood* 94 (8), S. 2836–2843.

Brandao, Katherine; Deason-Towne, Francina; Zhao, Xiaoyun; Perraud, Anne-Laure; Schmitz, Carsten (2014): TRPM6 kinase activity regulates TRPM7 trafficking and inhibits cellular growth under hypomagnesian conditions. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71 (24), S. 4853–4867. DOI: 10.1007/s00018-014-1647-7.

Byrd, John C.; Furman, Richard R.; Coutre, Steven E.; Flinn, Ian W.; Burger, Jan A.; Blum, Kristie A. et al. (2013): Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. In: *The New England journal of medicine* 369 (1), S. 32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637.

Chen, Wen-Liang; Barszcyk, Andrew; Turlova, Ekaterina; Deurloo, Marielle; Liu, Baosong; Yang, Burton B. et al. (2015): Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. In: *Oncotarget* 6 (18). DOI: 10.18632/oncotarget.3872.

Chimote, Ameet A.; Hajdu, Peter; Kucher, Vladimir; Boiko, Nina; Kuras, Zerrin; Szilagyi, Orsolya et al. (2013): Selective inhibition of KCa3.1 channels mediates adenosine regulation of the motility of human T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (12), S. 6273–6280. DOI: 10.4049/jimmunol.1300702.

Chubanov, Vladimir; Ferioli, Silvia; Wisnowsky, Annika; Simmons, David G.; Leitzinger, Christin; Einer, Claudia et al. (2016): Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.20914.

Chubanov, Vladimir; Mittermeier, Lorenz; Gudermann, Thomas (2017): Role of kinase-coupled TRP channels in mineral homeostasis. In: *Pharmacology & therapeutics*. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.11.003.

Chubanov, Vladimir; Schäfer, Sebastian; Ferioli, Silvia; Gudermann, Thomas (2014): Natural and Synthetic Modulators of the TRPM7 Channel. In: *Cells* 3 (4), S. 1089–1101. DOI: 10.3390/cells3041089.

Clark, Kristopher; Middelbeek, Jeroen; Morrice, Nick A.; Figdor, Carl G.; Lasonder, Edwin; van Leeuwen, Frank N. (2008): Massive autophosphorylation of the Ser/Thr-rich domain controls protein kinase activity of TRPM6 and TRPM7. In: *PLoS one* 3 (3), e1876. DOI: 10.1371/journal.pone.0001876.

Crawford, Timothy Q.; Jalbert, Emilie; Ndhlovu, Lishomwa C.; Barbour, Jason D. (2014): Concomitant evaluation of PMA+ionomycin-induced kinase phosphorylation and cytokine production in T cell

---

subsets by flow cytometry. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 85 (3), S. 268–276. DOI: 10.1002/cyto.a.22444.

Decker, T.; Schneller, F.; Sparwasser, T.; Tretter, T.; Lipford, G. B.; Wagner, H.; Peschel, C. (2000a): Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. In: *Blood* 95 (3), S. 999–1006.

Decker, Thomas; Schneller, Folker; Kronschnabl, Manuela; Dechow, Tobias; Lipford, Grayson B.; Wagner, Hermann; Peschel, Christian (2000b): Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. In: *Experimental Hematology* 28 (5), S. 558–568. DOI: 10.1016/S0301-472X(00)00144-2.

Demeuse, Philippe; Penner, Reinhold; Fleig, Andrea (2006): TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain. In: *The Journal of general physiology* 127 (4), S. 421–434. DOI: 10.1085/jgp.200509410.

Demion, Marie; Thireau, Jérôme; Gueffier, Mélanie; Finan, Amanda; Khoueiry, Ziad; Cassan, Cécile et al. (2014): Trpm4 gene invalidation leads to cardiac hypertrophy and electrophysiological alterations. In: *PloS one* 9 (12), e115256. DOI: 10.1371/journal.pone.0115256.

Dreger, Peter; Döhner, Hartmut; Ritgen, Matthias; Böttcher, Sebastian; Busch, Raymonde; Dietrich, Sascha et al. (2010): Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. In: *Blood* 116 (14), S. 2438–2447. DOI: 10.1182/blood-2010-03-275420.

Duvoisin, Robert M.; Haley, Tammie L.; Ren, Gaoying; Strycharska-Orczyk, Iwona; Bonaparte, James P.; Morgans, Catherine W. (2017): Autoantibodies in Melanoma-Associated Retinopathy Recognize an Epitope Conserved Between TRPM1 and TRPM3. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 58 (5), S. 2732–2738. DOI: 10.1167/iovs.17-21443.

Feroli, Silvia; Zierler, Susanna; Zaißerer, Joanna; Schredelseker, Johann; Gudermann, Thomas; Chubanov, Vladimir (2017): TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg<sup>2+</sup> and Mg·ATP. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 8806. DOI: 10.1038/s41598-017-08144-1.

Forconi, Francesco; Sozzi, Elisa; Cencini, Emanuele; Zaja, Francesco; Intermesoli, Tamara; Stelitano, Caterina et al. (2009): Hairy cell leukemias with unmutated IGHV genes define the minor subset refractory to single-agent cladribine and with more aggressive behavior. In: *Blood* 114 (21), S. 4696–4702. DOI: 10.1182/blood-2009-03-212449.

Gees, Maarten; Colsohl, Barbara; Nilius, Bernd (2010): The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (10), a003962. DOI: 10.1101/cshperspect.a003962.

Goede, Valentin; Fischer, Kirsten; Busch, Raymonde; Engelke, Anja; Eichhorst, Barbara; Wendtner, Clemens M. et al. (2014): Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. In: *The New England journal of medicine* 370 (12), S. 1101–1110. DOI: 10.1056/NEJMoa1313984.

Guava UG.book - EMD Millipore. Online verfügbar unter <https://www.google.de/search?biw=1366&bih=662&ei=->

---

Nn6WuGMBOeRgAb82KXIDg&q=apc+red2&oq=apc+red2&gs\_l=psy-ab.3.0i8i13i30k1l2.4571.5207.0.5619.5.5.0.0.0.144.508.0j4.4.0...0...1c.1.64.psy-ab.1.4.505...0j0i131k1j0i67k1j0i22i30k1.0.TvczNaVk8s, zuletzt geprüft am 15.05.2018.

Guilbert, Arnaud; Gautier, Mathieu; Dhennin-Duthille, Isabelle; Haren, Nathalie; Sevestre, Henri; Ouadid-Ahidouch, Halima (2009): Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. In: *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 297 (3), C493-C502. DOI: 10.1152/ajpcell.00624.2008.

Hallek, Michael (2013): Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. In: *Blood* 122 (23), S. 3723–3734. DOI: 10.1182/blood-2013-05-498287.

Hallek, Michael (2017): Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. In: *American journal of hematology* 92 (9), S. 946–965. DOI: 10.1002/ajh.24826.

Han, Sheng; Tie, Xinxin; Meng, Lingxuan; Wang, Yunjie; Wu, Anhua (2013): PMA and ionomycin induce glioblastoma cell death: activation-induced cell-death-like phenomena occur in glioma cells. In: *PloS one* 8 (10), e76717. DOI: 10.1371/journal.pone.0076717.

Home | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (2020.000Z). Online verfügbar unter <https://www.guidetopharmacology.org/>, zuletzt aktualisiert am 06.07.2020.000Z, zuletzt geprüft am 06.07.2020.

Hu, Yaopeng; Duan, Yubin; Takeuchi, Ayako; Hai-Kurahara, Lin; Ichikawa, Jun; Hiraishi, Keizo et al. (2017): Uncovering the arrhythmogenic potential of TRPM4 activation in atrial-derived HL-1 cells using novel recording and numerical approaches. In: *Cardiovascular research* 113 (10), S. 1243–1255. DOI: 10.1093/cvr/cvx117.

Huang, Junhao; Furuya, Hideki; Faouzi, Malika; Zhang, Zheng; Monteilh-Zoller, Mahealani; Kawabata, Kelly Galbraith et al. (2017): Inhibition of TRPM7 suppresses cell proliferation of colon adenocarcinoma in vitro and induces hypomagnesemia in vivo without affecting azoxymethane-induced early colon cancer in mice. In: *Cell Commun Signal* 15 (1), S. 83. DOI: 10.1186/s12964-017-0187-9.

Jacquier, Vincent; Estelle, Jordi; Schmaltz-Panneau, Barbara; Lecardonnel, Jerome; Moroldo, Marco; Lemonnier, Gaetan et al. (2015): Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation by LPS or PMA-Ionomycin. In: *BMC genomics* 16, S. 26. DOI: 10.1186/s12864-015-1218-9.

Kaneko, Yosuke; Szallasi, Arpad (2014): Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. In: *British journal of pharmacology* 171 (10), S. 2474–2507. DOI: 10.1111/bph.12414.

Knowlton, Wendy M.; Palkar, Radhika; Lippoldt, Erika K.; McCoy, Daniel D.; Baluch, Farhan; Chen, Jessica; McKemy, David D. (2013): A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (7), S. 2837–2848. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1943-12.2013.

Krapivinsky, Grigory; Krapivinsky, Luba; Manasian, Yunona; Clapham, David E. (2014): The TRPM7 chanzyme is cleaved to release a chromatin-modifying kinase. In: *Cell* 157 (5), S. 1061–1072. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.046.

- 
- Krishnamoorthy, Mithunah; Buhari, Fathima Hifza Mohamed; Zhao, Tiantian; Brauer, Patrick M.; Burrows, Kyle; Cao, Eric Yixiao et al. (2018a): The ion channel TRPM7 is required for B cell lymphopoiesis. In: *Science signaling* 11 (533). DOI: 10.1126/scisignal.aan2693.
- Krishnamoorthy, Mithunah; Wasim, Laabiah; Buhari, Fathima Hifza Mohamed; Zhao, Tiantian; Mahtani, Trisha; Ho, Josephine et al. (2018b): The channel-kinase TRPM7 regulates antigen gathering and internalization in B cells. In: *Science signaling* 11 (533). DOI: 10.1126/scisignal.aah6692.
- Kruse, Martin; Schulze-Bahr, Eric; Corfield, Valerie; Beckmann, Alf; Stallmeyer, Birgit; Kurtbay, Güven et al. (2009): Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (9), S. 2737–2744. DOI: 10.1172/JCI38292.
- Li, Mingjiang; Jiang, Jianmin; Yue, Lixia (2006): Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. In: *The Journal of general physiology* 127 (5), S. 525–537. DOI: 10.1085/jgp.200609502.
- Lin, Zhonghua; Chiang, Nancy Y.; Chai, Ning; Seshasayee, Dhaya; Lee, Wyne P.; Balazs, Mercedesz et al. (2014): In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells. In: *Nature protocols* 9 (7), S. 1563–1577. DOI: 10.1038/nprot.2014.104.
- López, Fabián; Delgado, Ricardo; López, Roberto; Bacigalupo, Juan; Restrepo, Diego (2014): Transduction for pheromones in the main olfactory epithelium is mediated by the Ca<sup>2+</sup>-activated channel TRPM5. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (9), S. 3268–3278. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4903-13.2014.
- Luongo, Francesca; Pietropaolo, Giuseppe; Gautier, Mathieu; Dhennin-Duthille, Isabelle; Ouadid-Ahidouch, Halima; Wolf, Federica I.; Trapani, Valentina (2018): TRPM6 is Essential for Magnesium Uptake and Epithelial Cell Function in the Colon. In: *Nutrients* 10 (6). DOI: 10.3390/nu10060784.
- Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. (2014a): *Der Experimentator: Immunologie*: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=wgEgBAAAQBAJ>.
- Luttmann, Werner; Bratke, Kai; Küpper, Michael; Myrtek, Daniel (2014b): *Durchflusscytometrie*. In: Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper und Daniel Myrtek (Hg.): *Der Experimentator: Immunologie*, Bd. 243. 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum (Experimentator), S. 73–101.
- Miller, B. A. (2006): The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. In: *The Journal of membrane biology* 209 (1), S. 31–41. DOI: 10.1007/s00232-005-0839-3.
- Mittermeier, Lorenz; Demirkhanyan, Lusine; Stadlbauer, Benjamin; Breit, Andreas; Recordati, Camilla; Hilgendorff, Anne et al. (2019): TRPM7 is the central gatekeeper of intestinal mineral absorption essential for postnatal survival. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (10), S. 4706–4715. DOI: 10.1073/pnas.1810633116.
- Mócsai, Attila; Ruland, Jürgen; Tybulewicz, Victor L. J. (2010): The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (6), S. 387–402. DOI: 10.1038/nri2765.

- 
- Nadolni, Wiebke; Zierler, Susanna (2018): The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis. In: *Cells* 7 (8). DOI: 10.3390/cells7080109.
- Palazzo, Adam; Herter, Sylvia; Grosmaire, Laura; Jones, Randy; Frey, Christian R.; Limani, Florian et al. (2018): The PI3K $\delta$ -Selective Inhibitor Idelalisib Minimally Interferes with Immune Effector Function Mediated by Rituximab or Obinutuzumab and Significantly Augments B Cell Depletion In Vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. DOI: 10.4049/jimmunol.1700323.
- Patten, Piers E. M.; Chu, Charles C.; Albesiano, Emilia; Damle, Rajendra N.; Yan, Xiao-Jie; Kim, Dorothy et al. (2012): IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. In: *Blood* 120 (24), S. 4802–4811. DOI: 10.1182/blood-2012-08-449744.
- Perniss, A.; Liu, S.; Boonen, B.; Keshavarz, M.; Ruppert, A. L.; Timm, T. et al. (2020): Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides. In: *Immunity* 52 (4). DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.005.
- Romagnani, Andrea; Vettore, Valentina; Rezzonico-Jost, Tanja; Hampe, Sarah; Rottoli, Elsa; Nadolni, Wiebke et al. (2017): TRPM7 kinase activity is essential for T cell colonization and alloreactivity in the gut. In: *Nature communications* 8 (1), S. 1917. DOI: 10.1038/s41467-017-01960-z.
- Ryazanova, Lillia V.; Rondon, Lusliany J.; Zierler, Susanna; Hu, Zhixian; Galli, Joanna; Yamaguchi, Terry P. et al. (2010): TRPM7 is essential for Mg<sup>2+</sup> homeostasis in mammals. In: *Nature communications* 1, 109-. DOI: 10.1038/ncomms1108.
- Sahoo, N. C.; Rao, K. V. S.; Natarajan, K. (2002): CD80 expression is induced on activated B cells following stimulation by CD86. In: *Scandinavian journal of immunology* 55 (6), S. 577–584.
- Schmitz, Carsten; Brandao, Katherine; Perraud, Anne-Laure (2014): The channel-kinase TRPM7, revealing the untold story of Mg(2+) in cellular signaling. In: *Magnesium research* 27 (1), S. 9–15. DOI: 10.1684/mrh.2014.0357.
- Schweighoffer, Edina; Tybulewicz, Victor Lj (2017): Signalling for B cell survival. In: *Current opinion in cell biology* 51, S. 8–14. DOI: 10.1016/j.ceb.2017.10.002.
- Skride, Andris; Sablinskis, Matiss; Sablinskis, Kristaps; Lesina, Krista; Lejnicks, Aivars; Lejniece, Sandra (2017): Pulmonary arterial hypertension in a patient treated with dasatinib: a case report. In: *Journal of medical case reports* 11 (1), S. 362. DOI: 10.1186/s13256-017-1515-9.
- Sreejit, Gopalkrishna; Ahmed, Asma; Parveen, Nazia; Jha, Vishwanath; Valluri, Vijaya Lakshmi; Ghosh, Sudip; Mukhopadhyay, Sangita (2014): The ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis interacts with beta-2-microglobulin ( $\beta$ 2M) affecting antigen presentation function of macrophage. In: *PLoS pathogens* 10 (10), e1004446. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004446.
- Srinivasan, Lakshmi; Sasaki, Yoshiteru; Calado, Dinis Pedro; Zhang, Baochun; Paik, Ji Hye; DePinho, Ronald A. et al. (2009): PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. In: *Cell* 139 (3), S. 573–586. DOI: 10.1016/j.cell.2009.08.041.
- The International CLL-IPI working group (2016): An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. In: *The Lancet Oncology* 17 (6), S. 779–790. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30029-8.

- 
- Togashi, Kazuya; Hara, Yuji; Tominaga, Tomoko; Higashi, Tomohiro; Konishi, Yasunobu; Mori, Yasuo; Tominaga, Makoto (2006): TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. In: *The EMBO journal* 25 (9), S. 1804–1815. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601083.
- Venkatachalam, Kartik; Montell, Craig (2007): TRP channels. In: *Annual review of biochemistry* 76, S. 387–417. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Voringer, Sandra; Schreyer, Laura; Nadolni, Wiebke; Meier, Melanie A.; Woerther, Katharina; Mittermeier, Constanze et al. (2020): Inhibition of TRPM7 blocks MRTF/SRF-dependent transcriptional and tumorigenic activity. In: *Oncogene* 39 (11), S. 2328–2344. DOI: 10.1038/s41388-019-1140-8.
- Vriens, Joris; Voets, Thomas (2018): Sensing the heat with TRPM3. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. DOI: 10.1007/s00424-017-2100-1.
- Woyach, Jennifer A.; Johnson, Amy J.; Byrd, John C. (2012): The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. In: *Blood* 120 (6), S. 1175–1184. DOI: 10.1182/blood-2012-02-362624.
- Yamamoto, Shinichiro; Shimizu, Shunichi; Kiyonaka, Shigeki; Takahashi, Nobuaki; Wajima, Teruaki; Hara, Yuji et al. (2008): TRPM2-mediated Ca<sup>2+</sup> influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. In: *Nature medicine* 14 (7), S. 738–747. DOI: 10.1038/nm1758.
- Yee, Nelson S. (2017): Role of TRPM7 in Cancer: Potential as Molecular Biomarker and Therapeutic Target. In: *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 10 (2). DOI: 10.3390/ph10020039.
- Yee, Nelson S.; Kazi, Abid A.; Yee, Rosemary K. (2014): Cellular and Developmental Biology of TRPM7 Channel-Kinase: Implicated Roles in Cancer. In: *Cells* 3 (3), S. 751–777. DOI: 10.3390/cells3030751.
- Zhang, Zheng; Faouzi, Malika; Huang, Junhao; Geerts, Dirk; Yu, Haijie; Fleig, Andrea; Penner, Reinhold (2014a): N-Myc-induced up-regulation of TRPM6/TRPM7 channels promotes neuroblastoma cell proliferation. In: *Oncotarget* 5 (17), S. 7625–7634. DOI: 10.18632/oncotarget.2283.
- Zhang, Zheng; Yu, Haijie; Huang, Junhao; Faouzi, Malika; Schmitz, Carsten; Penner, Reinhold; Fleig, Andrea (2014b): The TRPM6 kinase domain determines the Mg-ATP sensitivity of TRPM7/M6 heteromeric ion channels. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (8), S. 5217–5227. DOI: 10.1074/jbc.M113.512285.
- Zierler, Susanna; Yao, Guangmin; Zhang, Zheng; Kuo, W. Cedric; Pörzgen, Peter; Penner, Reinhold et al. (2011): Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (45), S. 39328–39335. DOI: 10.1074/jbc.M111.264341.
- Zimmermann, Jakob; Radbruch, Andreas; Chang, Hyun-Dong (2015): A Ca<sup>2+</sup> concentration of 1.5 mM, as present in IMDM but not in RPMI, is critical for maximal response of Th cells to PMA/ionomycin. In: *European journal of immunology* 45 (4), S. 1270–1273. DOI: 10.1002/eji.201445247.



---

## 6 Danksagungen

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Thomas Gudermann für die Möglichkeit danken, in dem von ihm geleiteten Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie meine experimentelle Doktorarbeit durchführen zu dürfen. Insbesondere den organisatorisch seinerseits ermöglichten einfachen und unkomplizierten Einstieg in meine Arbeit am Institut werde ich in sehr guter Erinnerung behalten.

Mein besonderer Dank gilt vor allem meiner Doktormutter Prof. Dr. Susanna Zierler für die professionelle, engagierte und aufopferungsvolle fachliche und menschliche Betreuung während der gesamten Zeit am Walther-Straub-Institut. Sie hat mir jederzeit den notwendigen Rückhalt gegeben, der Voraussetzung für das Gelingen einer Promotion ist.

Für die Einarbeitung in die konkreten Arbeitstechniken möchte ich zudem sämtlichen Mitgliedern der AG Zierler danken, die mich durch ihre gründlichen praktischen Einweisungen und hilfreichen Ratschläge in besonderem Maße unterstützt haben.

Weiterhin danke ich den Wissenschaftlern aus dem Salzburg Cancer Research Institut der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg, die uns während einer bereichernden kollegialen Kooperation die CLL-Patientenproben zukommen ließen, ohne die die Experimente und Datenerhebung meinerseits gar nicht möglich gewesen wären.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mir in den schwierigsten Stunden motivierend beistanden und mir durch Ihre emotionale Unterstützung aber auch fachlichen Kenntnisse in schwierigen Phasen der Arbeit ermutigend Zuspruch leisteten. Die Zeit meiner Doktorarbeit hat mir einmal mehr aufgezeigt, dass intensiver familiärer Zusammenhalt durch nichts zu ersetzen ist im Leben.

---

# Eidesstattliche Versicherung

**Bannout, Petro**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Die Rolle von TRPM7 bei der Aktivierung und Proliferation von Chronisch Lymphatischen Leukämiezellen“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, den 14.01.2022

Petro Bannout