

**Die Rolle von SK4 und TRPM3 für die Proliferation  
von MMTV PyMT Brusttumorzellen**

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

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

**vorgelegt von  
Illison, Eric Florian**

**2016**

Dekan: Prof. Dr. med. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Mörike

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Das Mammakarzinom .....	1
1.2 Das MMTV cNeu Mausmodell.....	3
1.3 Das MMTV PyMT Mausmodell.....	4
1.4 Kaliumkanäle .....	6
1.4.1 Ca <sup>2+</sup> -aktivierte Kaliumkanäle .....	9
1.5 Calciumkanäle .....	13
1.5.1 Die Familie der TRP-Kanäle (= Transient Receptor Potential).....	16
1.6 Vorangegangene Arbeiten .....	24
1.6.1 Tumorfrees Überleben von MMTV cNeu SK4-Knockout Mäusen (gemischter Hintergrund).....	24
1.6.2 Tumorfrees Überleben von MMTV PyMT Mäusen (FVB Hintergrund) .....	26
1.6.3 Nachweis der mRNA des SK4- und des TRPM3-Kanals mittels Nanostring Technologie sowie quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) ..	26
1.6.4 Untersuchung der Funktion des SK4-Kanals auf akute Ca <sup>2+</sup> -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Verwendung von TRAM-34.....	28
1.6.5 Untersuchung der Funktion des SK4-Kanals auf spontane Ca <sup>2+</sup> -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Verwendung von TRAM-34.....	29
1.6.6 Untersuchung zur Funktion des TRPM3-Kanals auf akute Ca <sup>2+</sup> -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Verwendung von Mefenaminsäure .....	30
1.7 Zielsetzung.....	31
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Material .....	32
2.1.1 Geräte.....	32
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	35
2.1.3 Zellkultur .....	37
2.1.4 Proliferationsuntersuchungen.....	39
2.1.5 Ca <sup>2+</sup> -Imaging.....	40
2.1.6 qRT-PCR .....	45
2.1.7 Gelelektrophorese.....	48
2.2 Methoden .....	50

---

2.2.1	Zellkultur .....	50
2.2.2	Kultivierung muriner MMTV PyMT und MMTV cNeu Brusttumorzellen.....	50
2.2.3	Beseitigung von Fibroblasten durch Aufreinigung mit Trypsin .....	52
2.2.4	Passagieren von MMTV PyMT Brusttumorzellen .....	52
2.2.5	Arretierung von MMTV PyMT Brusttumorzellen.....	54
2.2.6	Proliferationsuntersuchungen synchronisierter MMTV PyMT Brusttumorzellen .....	55
2.2.7	Nachweis der mRNA verschiedener Komponenten des Ca <sup>2+</sup> -Signalings mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR).....	57
2.2.8	Messung intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Transienten mittels Ca <sup>2+</sup> -Imaging .....	66
3	Ergebnisse .....	73
3.1	Nachweis von TRPM3 und TRPM7 mRNA-Expression in MMTV PyMT Brusttumorzellen sowie Brusttumorgewebe mittels qPCR.....	73
3.2	Proliferationsverhalten von MMTV PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition von SK4- und TRPM3-Kanälen .....	75
3.3	Effekt der pharmakologischen SK4- und TRPM3-Kanalinhibition auf akute Ca <sup>2+</sup> -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen .....	78
3.4	Messung der spontanen Ca <sup>2+</sup> -Transienten unter pharmakologischer SK4- und TRPM3-Kanalinhibition.....	81
3.5	Untersuchung des Effekts von Diclofenac auf die akuten Ca <sup>2+</sup> -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen .....	85
3.6	Messung akuter Ca <sup>2+</sup> -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter SK4-Kanalaktivierung mit DCEBIO.....	88
3.7	mRNA Screening von Komponenten des Ca <sup>2+</sup> -Signalings mittels qPCR .....	90
4	Diskussion.....	92
4.1	Nachweis von TRPM3 und TRPM7 mRNA-Expression in MMTV PyMT Brusttumorzellen sowie MMTV PyMT Brusttumorgeweben .....	92
4.2	Untersuchungen zur Proliferation von MMTV PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des SK4- und TRPM3-Kanals .....	94
4.3	Rolle von SK4- und TRPM3-Kanälen für akute und spontane Ca <sup>2+</sup> - Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen .....	96
4.4	Effekt einer SK4 und TRPM3 Inhibition auf die spontanen Ca <sup>2+</sup> -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen .....	98

---

4.5	COX-unabhängige Entstehung von $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen .....	100
4.6	Effekt des SK4-Aktivators DCEBIO auf akute $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen .....	103
4.7	Nachweis weiterer Komponenten des $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings in MMTV PyMT und MMTV cNeu Brusttumorzellen.....	104
5	Zusammenfassung.....	107
6	Literaturverzeichnis .....	109
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	121
	Danksagung .....	122

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikro-Molar
BK	Calcium aktivierter Kaliumkanal hoher Leitfähigkeit
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazelluläres Calcium
CaM	Calmodulin-Bindungsdomäne
CDK	<i>Cyclin-dependent-kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	cyclische Desoxyribonukleinsäure
cNeu	murines Analog zum HER2
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
DCEBIO	5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-one
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Phosphat gepufferte Lösung
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ER	Estrogen-Rezeptor

---

EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FURA-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
g	Gramm
HER2	Human-epidermal-growth factor receptor
hERG	<i>human Ether-a-go-go related gene</i>
IMEM	Improved Minimum Essential Medium
IMEM (ohne Phenolrot)	Improved Minimum Essential Medium ohne Phenolrot
K <sup>+</sup>	Kalium
kbp	Kilobasenpaare
K <sub>Ca</sub>	Calcium aktivierter Kaliumkanal
KO	Knockout
l	Liter
M	Molar
MEF	Mefenaminsäure
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Milli-Molar
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl

---

NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
Orai	Gen, welches für das " <i>Calcium release-activated calcium channel protein 1</i> " codiert
PAX	Paxilline
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
peqGold	peqGold RNA Pure™
pS	pico Siemens
PyMT	Polynomavirus middle T Antigen
qRT-PCR Kettenreaktion	Quantitative Echtzeit Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SK4	Calcium aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit
STIM	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
SYBR® Green	iQ™ SYBR® Green Supermix
TRAM-34	1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPM	<i>Transient receptor potential melastatin</i>
Trypsin	1x Trypsin/EDTA + 9x DPBS
U/Min	Umdrehungen pro Minute



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

Im Jahr 2014 werden alleine in den USA über 1,6 Millionen Krebsneuerkrankungen erwartet. Mit 232.000 geschätzten Neuerkrankungen ist Brustkrebs nicht nur die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen, sondern stellt mit ca. 40 000 erwarteten Todesfällen die Krebserkrankung mit der zweithöchsten Mortalität bei Frauen dar [1]. Grund für den häufig tödlichen Ausgang des Mammakarzinoms ist jedoch nicht der Primärtumor [2], sondern die Tatsache, dass die Tumorzellen insbesondere in Lunge, Leber, Gehirn sowie Lymphknoten und Knochen metastasieren [3].

Die Entstehung von Brusttumoren wird von mehreren Risikofaktoren begünstigt. So scheint das Alter der Frauen zum Zeitpunkt der Geburt ihres ersten Kindes eine wichtige Rolle zu spielen. Frauen, welche zu dem Zeitpunkt der Geburt ihres ersten Kindes älter als 30 Jahre sind haben im Vergleich zu Frauen, die ihr erstes Kind mit 18 Jahren zur Welt gebracht haben ein vier bis fünffach erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Auch mehrere erlittene Fehlgeburten scheinen das Risiko deutlich zu erhöhen [4]. Ein weiterer Risikofaktor ist das mangelnde Stillen von Säuglingen. Frauen, welche nie gestillt haben, zeigen gegenüber Frauen, die gestillt haben, ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken [5]. Weitere Risikofaktoren sind Zeitpunkt von Menarche und Menopause. So erhöhen sowohl eine frühe Menarche als auch eine späte Menopause das Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Diese Tatsache scheint in lobulären Tumoren eine noch größere Bedeutung zu haben als in duktalem Tumoren. Vergleicht man zwei gleichaltrige prä- bzw. postmenopausale Frauen, so zeigen weitere Studien, dass die prämenopausale Frau ein höheres Risiko hat, an Brustkrebs zu erkranken. Dieser Effekt scheint bei Estrogen-Rezeptor-positiven Tumoren nochmals stärker ausgeprägt zu sein [6].

Ein familiär gehäuftes Vorkommen von Brusttumoren kann auf genetisch prädisponierende Faktoren hindeuten. So konnte gezeigt werden, dass bei einer

positiven Familienanamnese das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, um das Zwei- bis Dreifache erhöht ist [7].

Die Entstehung von Brustkrebs scheint auch durch ein Absinken der Sexualhormone Östrogen und Progesteron begünstigt zu werden. So wurde nachgewiesen, dass ein Defizit an Progesteron das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, um mehr als das Fünffache steigert. Dabei wurde der größte Anstieg an Brustkrebsneuerkrankungen zwischen dem 30.-50. Lebensjahr beobachtet. Der Grund hierfür scheint das Absinken der Östrogen- und Progesteronlevel durch eine verminderte Produktion in den Ovarien zu sein [8].

In vielen Tumorgeweben lassen sich sowohl Mutationen, Überexpressionen oder Amplifikationen verschiedener Protoonkogene und Onkogene, als auch Mutationen oder der Funktionsverlust verschiedener Tumorsuppressorproteine detektieren. Ein Beispiel hierfür sind die Gene BRCA1 und BRCA2 (*BR*east *C*ancer). Hierbei handelt es sich um Tumorsuppressoren [9], welche an diversen Vorgängen wie DNA-Reparaturen, Transkription sowie der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind [10]. Mutationen innerhalb dieser Gene führen neben der Begünstigung der Entstehung von Brustkrebs [11, 12] auch zu einer Begünstigung bei der Entstehung anderer Primärtumoren wie z.B. Tumoren des Bauches, des Pankreas, des Gallengangs sowie der Prostata [9]. Bei Patienten mit Mutationen in den BRCA-Genen konnte außerdem eine familiäre Häufung sowie ein erhöhtes beidseitiges Vorkommen von Brustkrebs ermittelt werden. Auch mussten sich diese Patienten häufiger einer Mastektomie unterziehen [13].

Ein wichtiges Onkogen, was auch häufig mit Brusttumoren assoziiert ist, ist das sogenannte HER-2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2, [EGFR] oder ErbB2*), ein Mitglied der EGFR-Familie. Dieses Onkogen ist in etwa 30% aller untersuchten Brusttumoren zwei bis 20-fach überexprimiert [14]. In anderen Studien wird sogar von einer bis zu 50-fachen Überexpression gesprochen [15]. Laut Fantozzi et al. sind etwa 15-20 % aller Brusttumoren mit HER-2 assoziiert. Zudem wurde in 30% aller Brusttumoren eine erhöhte Expression der aktivierten Form von HER-2 entdeckt [16]. Dabei korreliert eine hohe Überexpression von HER-2 mit einer rapiden Abnahme der rezidivfreien Überlebenszeit sowie der Überlebenszeit an sich. So ist bereits ab einer fünffachen Überexpression die rezidivfreie Überlebensrate nach mehr als einem Jahr um etwa 40% reduziert.

Und auch die Gesamtüberlebensrate ist nach etwa drei Jahren um ebenfalls 40% vermindert [14].

Da die Therapie von Brusttumoren häufig mit starken Nebenwirkungen einhergeht und einige Brusttumoren mittlerweile Resistenzen gegen die gängigen Therapiemaßnahmen entwickelt haben, sind neue zielgerichtete Therapiekonzepte wünschenswert. Mausmodelle sind dabei etablierte Werkzeuge für die Entwicklung innovativer Behandlungsverfahren, da diese mehrere Vorteile mit sich bringen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen Tumoren dieselben Stadien durchlaufen [17]. Aufgrund dieser Tatsache lassen sich Rückschlüsse über die Tumorprogression in Mäusen auf Menschen ziehen [18]. Des Weiteren ist es möglich, die DNA von Mäusen genetisch zu verändern indem z.B. gewisse Gene ausgeschaltet werden (Knockoutmäuse). Ein weiterer Vorteil liegt in der schnellen Vermehrung sowie Aufzucht dieser Mäuse.

## 1.2 Das MMTV cNeu Mausmodell

Beim Maus Mamma Tumor Virus (*Mouse Mammary Tumour Virus; MMTV*) handelt es sich um ein Retrovirus, welches in infizierten Mäusen zur Entstehung von Mammakarzinomen führen kann [19]. Dabei liegt das Virus zunächst in einer inaktiven Form vor. Um seine mutagenen Eigenschaften entfalten zu können, muss zunächst das MMTV-Genom in die DNA einer Wirtszelle eingeschleust werden. Dort kommt es durch eine verstärkte Aktivierung diverser Gene zu einem Ungleichgewicht in der DNA-Expression der Wirtszelle sowie den umliegenden Zellen. Dieser Vorgang ist die Konsequenz des Wirkens sogenannter Enhancer-Sequenzen, welche sich in den LTR (*Long Terminal Repeat*) des MMTV Genoms befinden [18]. Meist geschieht dies nach der ersten Schwangerschaft [16]. Mäuse, welche mit diesem Virus infiziert wurden, weisen drei unterschiedliche, biologisch definierte Stadien auf. Im ersten Stadium finden sich in den Mäusen noch keine Neoplasien, jedoch sind die Lymphknoten schon vergrößert. Im zweiten Stadium hat sich bereits ein maligner Tumor gebildet, und im dritten Stadium bilden sich bereits Metastasen [18]. Dabei treten diese meist in der Lunge [15, 16, 18] und den Lymphknoten auf [16].

Es gibt verschiedene MMTV Mausmodelle, eines ist das sogenannte MMTV cNeu Mausmodell. Bei cNeu handelt es sich um ein Protoonkogen, welches für ein transmembranäres Protein codiert, welches zur Familie der Epidermalen Wachstumsfaktoren, den EGF-Rezeptoren (*Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*) gehört [15, 16]. cNeu ist das murine Analogon zum humanen HER-2/ErbB2 (s.o.) [14]. Eine onkogenetische Aktivierung des cNeu kann z.B. durch eine Punktmutation in der transmembranären Domäne oder eine Überexpression erfolgen. Das hier beschriebene Mausmodell basiert auf dem cNeu Onkogen der Ratte. Hierbei entwickeln 50% der Weibchen nach 205 Tagen Brusttumoren. Die Expression von cNeu Protein war im Tumorgewebe deutlich höher als in den umliegenden Geweben, was eine essentielle Funktion von cNeu für die Tumorgenese vermuten lässt [15].

### 1.3 Das MMTV PyMT Mausmodell

Ein alternatives Mausmodell ist das MMTV PyMT Mausmodell. Dabei steht PyMT für das Polynomavirus T-Middle Antigen [20] welches auch PyV-mT genannt wird [21, 22].

Im Vergleich zum MMTV cNeu Mausmodell ist im MMTV PyMT Mausmodell das Tumorstadium aggressiver, hier entwickeln sowohl murine Männchen als auch Weibchen Brusttumoren, wobei die Männchen ihre Tumoren etwas später entwickeln. Die Weibchen sind zudem nicht mehr in der Lage, ihre Jungen zu stillen, da sie die Fähigkeit verlieren zu laktieren. Die Expression des Transgens erfolgt bei den Weibchen, wie auch den Männchen hauptsächlich in den Brusttumorgeweben, aber auch in Speicheldrüsen und Ovarien bzw. Nebenhoden werden geringe Mengen exprimiert [23]. In späten Stadien der PyMT Tumoren konnte auch eine Überexpression an cNeu mRNA nachgewiesen werden [17].

Der Zeitpunkt der Tumorentstehung scheint unter anderem stark vom genetischen Hintergrund abhängig zu sein. Dabei liegt der mittlere Entstehungszeitpunkt von multifokalen Tumoren bei Mäusen vom FVB Hintergrund bei etwa 53 Tagen [20] bzw. 58 Tagen [19],<sup>2</sup> wohingegen Mäuse auf dem C57/Bl/6 (Bl6) Hintergrund erst nach 93 Tagen Tumoren entwickeln. Schon während des Stillens zeigen FVB Mäuse bereits fortgeschrittene Hyperplasien [20]. Neben der raschen

Tumorentstehung bilden sich in diesem Mausmodell ebenfalls häufig und sehr schnell Lungenmetastasen. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich dieses Mausmodell unter anderem für Untersuchungen des Metastasierungsverhaltens [19, 20, 23]. Neben der Tumorentstehung ist auch das Tumorwachstum bei den FVB Mäusen im Vergleich zu Bl6 deutlich erhöht. Ab einer Tumorgröße von 1 cm<sup>3</sup> schreitet das Tumorwachstum hier etwa exponentiell fort, wohingegen das Tumorwachstum von Bl6 Mäusen eher linear erfolgt [20].

Für die Tumorentstehung wird in diesem Mausmodell u.a. den Tyrosinkinasen der *c-src* (*cellular sarcoma*) Familie eine wichtige Funktion zugeschrieben, welche durch die Überexpression von PyMT aktiviert werden [22]. Hierzu zählen insbesondere Src, Fyn und Yes [24-26]. Des Weiteren weisen Tumoren der MMTV PyMT Mauslinie eine reduzierte Expression von Estrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie von  $\beta$ 1 Integrinen auf, was mit der Entwicklung des Tumors korreliert. Außerdem konnte eine kontinuierliche Expression von cNeu und Cyclin D1 nachgewiesen werden. Aufgrund weiterer Studien scheint es unwahrscheinlich, dass eine alleinige Aktivierung der Src für das rasche Fortschreiten der Tumoren verantwortlich ist, da die aktive Form der Tyrosinkinase zwar zu einer epithelialen Hyperplasie in den Brustdrüsen transgener Mäuse führt aber nur selten zu invasiven Tumoren. [27]. Für die rasche Tumorgenese scheint viel mehr die „*Inducible Nitric Oxide Synthase*“ (iNOS) eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass bei MMTV PyMT Bl6 Mäusen das Fehlen der iNOS die Tumorentstehung um etwa 3-4 Wochen verzögern kann und zusätzlich Tumorwachstum und Tumorgröße und somit auch das Gewicht der Tumoren verringert. Jedoch bleibt das Metastasierungsverhalten unverändert [21]. In MMTV PyMT Mäusen auf dem FVB Hintergrund konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Allerdings war dieser nicht so ausgeprägt und auch schwieriger nachzuweisen, da hier die Tumorgenese wie bereits erwähnt sehr rasch erfolgt [20].

Für das rasche und aggressive Metastasierungsverhalten der Tumoren im MMTV PyMT Mausmodell scheinen mitunter Makrophagen, welche im Primärtumor vorkommen, verantwortlich zu sein. Aber auch die Etablierung von Interaktionen zwischen den *Colony-Stimulating-Factor-1* (CSF-1) und EGF Liganden bzw. den Makrophagen sind von großer Bedeutung [28, 29]. Andere Untersuchungen zeigen, dass auch das Adhäsionsmolekül CD44 bei der Entstehung von

Lungenmetastasen eine wichtige Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CD44 die Entstehung von Lungenmetastasen vorantreibt [30].

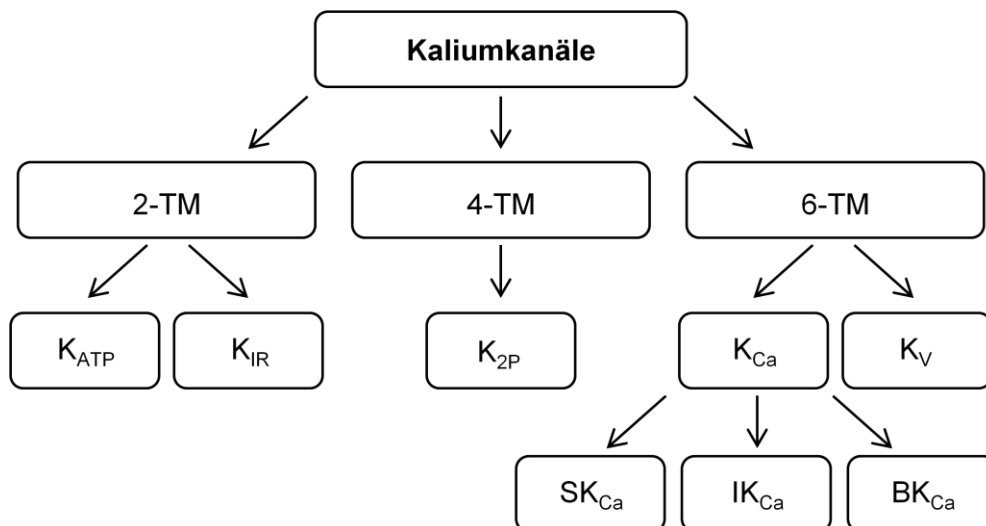
## 1.4 Kaliumkanäle

Bei Ionenkanälen handelt es sich um Proteine, welche in der Zellmembran verankert sind. Sie gehören zur fundamentalen Ausstattung einer jeden lebenden Zelle. Es sind bereits mehr als 400 Gene bekannt, welche für Ionenkanäle codieren. Dies entspricht etwa 1,5 % des gesamten menschlichen Genoms.

Ionenkanäle übernehmen bei grundlegenden physiologischen Prozessen essentielle Funktionen [31]. Funktionsstörungen von Ionenkanälen sind mit zahlreichen Krankheiten so auch malignen Tumorerkrankungen assoziiert [32]. Über transmembranäre Domänen bilden diese Kanalproteine Poren, welche für bestimmte Ionen permeabel sind, so dass diese entlang eines Gradienten die Zellmembran passieren können [33]. Dabei ist die Permeabilität der meisten Kanäle spezifisch für bestimmte Ionen. Diese Spezifität lässt sich jedoch häufig durch bestimmte äußere Einflüsse beeinflussen bzw. verändern [34].

Eine große und wichtige Gruppe der Ionenkanäle bilden die Kaliumkanäle. Mittlerweile sind etwa 77 Gene bekannt, welche für Kaliumkanäle codieren [35]. Sie ermöglichen den  $K^+$ -Efflux aber auch den  $K^+$ -Influx durch eine spezifische Pore [36]. Dabei lassen sich sowohl Aktivität als auch Permeabilität dieser Kanäle auf verschiedenste Arten modulieren. So wird der Fluss der  $K^+$ -Ionen z.B. durch  $Ca^{2+}$ -Ionen, Adenosintriphosphat (ATP), Signalmoleküle oder auch die Änderung des Membranpotentials verändert. Kaliumkanäle lassen sich nach unterschiedlichen Gesichtspunkten einteilen z.B. nach ihrer Leitfähigkeit oder nach Art der Aktivierung. Aber auch eine Einteilung nach Anzahl der transmembranären Domänen (TM) ist eine gängige Aufteilung [36]. Bei dieser Einteilung werden drei Gruppen mit zwei, vier und sechs Transmembrandomänen (2TM, 4TM, 6TM) unterschieden. Zur 2TM Familie gehören die ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ ) und die nach innen gerichteten Kaliumkanäle (inward rectifier potassium channels,  $K_{IR}$ ). Bei den  $K_{IR}$  handelt es sich um G-Protein aktivierte Kaliumkanäle. [34]. Jedoch ist der Name der  $K_{IR}$  irreführend, da diese Kanäle in Abhängigkeit des elektrochemischen Gradienten

sowohl nach innen, als auch nach außen gerichtet sein können [36]. Wie die  $K_{ATP}$  finden sich auch die  $K_{IR}$  in neuronalem Gewebe, sowie Herz- und Skelettmuskelzellen [34].  $K_{ATP}$  konnten zusätzlich in Pankreas, Gehirn [37] und Leberzellen nachgewiesen werden, in denen sie die Zellproliferation regulieren [38]. Obwohl die  $Ca^{2+}$  Ströme nach allem Anschein nach nicht durch die  $K_{ATP}$  beeinflusst werden, gibt es Hinweise, dass die  $K_{ATP}$  eine Rolle beim Fortschreiten der G1-Phase in Brusttumoren haben [39]. Sowohl  $K_{IR}$  als auch  $K_{ATP}$  können durch intrazelluläres Magnesium und Polyamine gehemmt werden [34]. Die 4TM-Gruppe, wird durch Kaliumkanäle gebildet, welche zwei Poren aufweisen ( $K_{2P}$ ) [40]. Die  $K_{2P}$  sind während des Ruhemembranpotentials geöffnet und werden daher eher als passiv agierende Kaliumkanäle angesehen [34, 41]. Zu den Mitgliedern der letzten und größten Gruppe zählen die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) und die spannungsabhängigen Kaliumkanäle ( $K_V$ ). Die  $K_V$  können in acht Untergruppen eingeteilt werden, wohingegen sich die  $K_{Ca}$  in drei Untergruppen einteilen lassen: Calcium-aktivierte Kanäle geringer Leitfähigkeit (small conductance, SK), mittlerer Leitfähigkeit (intermediate conductance, IK, SK4) und hoher Leitfähigkeit (big conductance, BK). Mit Ausnahme des BK-Kanals, welcher sieben TM besitzt, besitzen alle übrigen Kanäle dieser Gruppe sechs TM [34].



**Abbildung 1.1: Einteilung der Kaliumkanäle hinsichtlich der Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TM).** Es werden drei Hauptgruppen unterschieden. Die Mitglieder der ersten Gruppe besitzen zwei TM. Hierzu gehören die ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) sowie die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle ( $K_{IR}$ ). Die zweite Gruppe beinhaltet Kaliumkanäle mit vier TM, welche zwei Poren bilden ( $K_{2P}$ ). Zur dritten und größten Gruppe gehören mit 6 TM die spannungsabhängigen Kaliumkanäle ( $K_V$ ) und die  $Ca^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ). Diese lassen sich wiederum in Calcium aktivierte

Kaliumkanäle geringer ( $SK_{Ca}$ ), mittlerer ( $IK_{Ca}$ ) und großer Leitfähigkeit ( $BK_{Ca}$ ) einteilen. Dabei bilden die  $BK_{Ca}$  eine Ausnahme, da diese Kanäle nicht 6 TM sondern 7 TM besitzen.

$K^+$ -Kanäle regulieren eine Vielzahl von physiologischen Funktionen. So ist bekannt, dass sie für die Steuerung der Insulinsekretion, die Freisetzung von Neurotransmittern, sowie für die kardiale Repolarisation und der Relaxation glatter Muskelzellen entscheidend sind [42]. Aufgrund dieser vielfältigen Aufgaben werden Kaliumkanalfehlfunktionen häufig mit Krankheiten assoziiert, wie z.B. Diabetes mellitus [43], Epilepsie [31, 44], erektiler Dysfunktion [45] und kardialen Arrhythmien in Zusammenhang gebracht [31].

Einige Tumorspezifische Prozesse wie Zellproliferation und Zellmigration werden durch Kaliumkanäle reguliert. Aber auch bei Zellentwicklung und Zellwachstum von Tumoren spielen Kaliumkanäle eine essenzielle Rolle [31, 32]. Dabei weisen die meisten Studien auf den Einfluss spannungsabhängiger Kaliumkanäle auf die Proliferation der verschiedenen Tumoren hin [46-49]. Ein Beispiel hierfür ist der hERG-Kaliumkanal (human ether-a-go-go-related gene). Dieser Kanal konnte in den verschiedensten Tumoren nachgewiesen werden. So auch im Prostata-, Lungen- und Kolonkarzinom. Aber auch in Brusttumorgewebe scheint dieser Kanal exprimiert zu sein. Hier scheint hERG Apoptose und Zellproliferation zu kontrollieren [50]. Neben spannungsabhängigen Kaliumkanälen finden sich auch  $Ca^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle in verschiedenen Tumorgeweben wie Prostatakarzinom [51], Endometriumkarzinom [52], Pankreaskarzinom [53] sowie Mammakarzinom [37].

Neben der Proliferation sind  $K^+$ -Kanäle auch an anderen wichtigen Prozessen der Tumorgenese mitbeteiligt. So spielen etwa SK-Kanäle bei Invasion und Metastasierung von Tumoren eine entscheidende Rolle. Hierbei lösen sich einzelne Tumorzellen von ihren Primärtumoren und gelangen über die Blut- und Lymphbahnen an andere Orte im Organismus, wo sie ihre Adhäsion wiedererlangen. Sowohl die Invasion als auch die Metastasierung spielen bei der Tumorentwicklung eine wichtige Rolle [36].

Für die Regulation des Zellvolumens [54, 55] sowie die Angiogenese spielen Kaliumkanäle ebenfalls eine entscheidende Rolle [56].



### 1.4.1 $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle

$\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) weisen sowohl in neuronalem als auch in nicht-neuronalem Gewebe eine breite Gewebesdistribution auf. Wie zuvor geschildert, lassen sich die  $\text{K}_{\text{Ca}}$  in Abhängigkeit ihrer Leitfähigkeit in drei Gruppen einteilen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle hoher Leitfähigkeit (BK), die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle mittlerer Leitfähigkeit (IK, SK4) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle geringer Leitfähigkeit (SK). Wie bereits angesprochen, besitzen mit Ausnahme des BK-Kanals alle  $\text{K}_{\text{Ca}}$  sechs transmembranäre Domänen. Für einen funktionstüchtigen Kanalkomplex lagern sich hier immer vier  $\alpha$ -Untereinheiten zu Homotetrameren zusammen [36, 57]. Die Funktion des porenbildenden Komplexes wird durch Interaktionen mit auxiliären  $\beta$ -Untereinheiten durch post-translationale Modifikationen und Splicevarianten moduliert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einige  $\text{K}_{\text{Ca}}$  bei Spannungsänderungen aktiv werden [57]. Die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle erhöht sich durch einem Anstieg des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ . Nach Öffnung dieser Kanäle kommt zu einem  $\text{K}^+$ -Efflux, was zu einer Hyperpolarisation führt. Die Aktivität von  $\text{K}_{\text{Ca}}$  spielt bei vielen physiologischen Prozessen wie z.B. der Neurosekretion, dem Tonus der glatten Muskulatur etc. eine wichtige Rolle [58].

SK-Kanäle sind  $\text{K}^+$ -selektiv und weisen mit 4-14 pS [59] die geringste Leitfähigkeit der  $\text{K}_{\text{Ca}}$  auf. Sie sind in vielen verschiedenen Zelltypen vorhanden und üben vor allem in erregbaren Zellen wichtige Funktionen aus. Die Aktivierung der SK-Kanäle erfolgt durch den Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels, im Zuge eines Aktionspotentials [58].

Der BK-Kanal besitzt mit einer Leitfähigkeit von 100-300 pS die höchste Leitfähigkeit innerhalb der Gruppe der  $\text{K}_{\text{Ca}}$  [58, 60]. Im Gegensatz zu den SK- und IK-Kanälen besitzt der BK-Kanal eine zusätzliche siebte Transmembrandomäne (S0) [34, 57]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten wird der BK-Kanal trotzdem zur Gruppe der Kaliumkanäle mit 6 TM gezählt [42]. Er ist aus porenformenden  $\alpha$ - und modulierenden akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut. Dabei wird die Pore von je vier  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet, welche sich zu einem Tetramer zusammenlagern [61]. Das Gen, welches für die porenbildende  $\alpha$ -Untereinheit codiert ist KCNMA1 [62]. Zusätzlich sind vier verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten, codiert durch die Gene KCNMB1-KCMNB4 bekannt [63]. Die Expression der unterschiedlichen  $\beta$ -Untereinheiten ist

stark gewebsabhängig [64]. So findet sich die  $\beta$ 4-Untereinheit hauptsächlich im Gehirn, wohingegen  $\beta$ 3- und  $\beta$ 2-Untereinheiten in neuronalem Gewebe zu finden sind. B1-Untereinheiten kommen vor allem in Glattmuskelzellen vor [65-68].

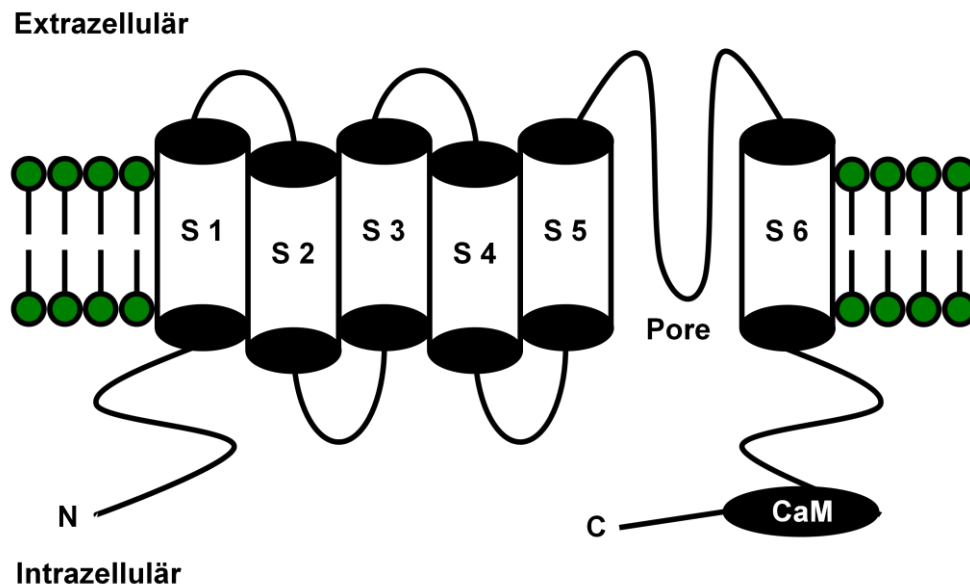
IK Kanäle weisen eine mittlere Leitfähigkeit zwischen 20-80 pS auf [58]. Aufgrund einer 42%igen Homologie der primären Aminosäuresequenz, zu den SK-Kanäle wird der IK-Kanal alternativ auch SK4-Kanal genannt [69]. In der Literatur finden sich außerdem die Bezeichnungen  $K_{Ca3.1}$  [70] oder IKCa1 [71].

Im nun folgenden Kapitel wird der SK4 ausführlicher beschrieben.

#### 1.4.1.1 Der $Ca^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanal intermediärer Leitfähigkeit (SK4)

SK4 und die anderen Mitglieder der SK-Kanalfamilie zeigen eine hohe Identität in ihrer primären Aminosäuresequenz, allerdings besitzt der SK4 im Vergleich zu den SK- und BK-Kanälen eine andere Gewebdistribution. Dabei findet man den SK4, anders als SK- und BK-Kanäle hauptsächlich in nicht-neuronalem Gewebe [72]. Daher nimmt der SK4 eine Sonderstellung in dieser Gruppe ein. Es konnten hohe mRNA-Spiegel in der humanen Placenta, Lunge, Speicheldrüse und Trachea [73] sowie in Brustdrüsengewebe [37] nachgewiesen werden. Geringere mRNA Spiegel waren in Leber, Colon, Thymus, Niere, Knochenmark und Endothel nachweisbar [73].

SK4-Kanäle besitzen wie für die Gruppe der  $K_{Ca}$  typisch sechs Transmembrandomänen (siehe Abbildung 1.2). Die Pore befindet sich zwischen der fünften und sechsten TM. Sowohl der C- als auch der N-Terminus befinden sich intrazellulär. Am C-Terminus befindet sich zudem eine sogenannte Calmodulin-Bindungsdomäne, über die SK4-Kanäle aktiviert und moduliert werden können. Kommt es in Folge einer Depolarisation zu einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle, so bindet dieses an das permanent mit der Calmodulin-Bindungsdomäne assoziierte Calmodulin. Dieser  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-Bindungskomplex ändert die Porenkonformation des Kanals, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht wird. Die Hälfte der SK4-Kanäle wird bereits ab einer  $Ca^{2+}$  Konzentration von etwa 95 nM aktiviert [74].



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des SK4-Kanals.** Der SK4-Kanal besteht aus sechs transmembranären Domänen (TM), S1-S6. Die Pore befindet sich in der Region zwischen S5 und S6. Sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich intrazellulär. Der C-Terminus verfügt zudem über eine Calmodulin-Bindungsdomäne (CaM), an der  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann und über die der Kanal aktiviert, bzw. die Kanaleigenschaften moduliert werden.

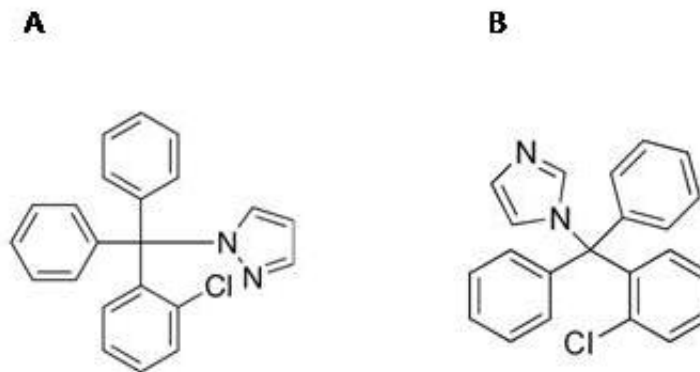
Durch die Generierung von SK4-Knockoutmäusen konnten wichtige Erkenntnisse zur In vivo Funktion des Kanals gewonnen werden. So spielt SK4 z.B. bei der Regulation der Insulinsekretion eine wichtige Rolle. Kommt es durch Glucoseaufnahme zu einer gesteigerten ATP Produktion, werden die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas geschlossen. Dies führt zu einer Membrandepolarisation und in Folge dessen kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom welcher zur Insulinsekretion führt. Des Weiteren werden durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx auch SK4-Kanäle aktiviert, was wiederum durch einen  $\text{K}^+$ -Efflux zu einer Hyperpolarisation der Membran führt. Diese Hyperpolarisation der Membran bewirkt ein Schließen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ, wodurch wiederum die Insulinsekretion gehemmt wird [75]. Auch für  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Immunglobuline E (IgE) oder die Endothelin-1 induzierte Mastzelldegranulation ist der SK4 von großer Bedeutung. Durch Aktivierung des SK4 kann es in Folge zu einer Mastzelldegranulation kommen. Dieser Mechanismus ist für die Abwehr von Parasiten essentiell und spielt darüber hinaus auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Asthma bronchiale [76]. Des Weiteren kann der SK4-Kanal als Bestandteil des Endothel Hyperpolarisierenden Faktor Signalweg (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor; EDHF*) an der Entstehung arterieller Hypertonie

bzw. einer Hypertrophie des linken Herzventrikels beteiligt sein. Dabei kontrolliert der EDHF-Signalweg den vaskulären Tonus und die endothelabhängige Blutdruckregulation. Diese Kontrollfunktion wird über die Aktivierung von SK4-Kanälen initiiert. Die durch den Kaliumefflux bedingte Hyperpolarisation der Membran führt zu einer Relaxation der vaskulären glatten Muskulatur. Bei einer Funktionsstörung der SK4-Kanäle bewirkt der veränderte Kaliumausstrom keine Hyperpolarisation. Dies resultiert in einer deutlichen Erhöhung des arteriellen Blutdrucks und in Folge dessen in einer Hypertrophie des linken Herzventrikels [77]. Aber auch in diversen Tumoren scheint der SK4-Kanal eine wichtige Rolle zu spielen, so konnte beispielsweise in humanen pankreatischen Tumoren eine erhöhte Expression an SK4 nachgewiesen werden [53] und auch in humanen Prostatazellen ist der SK4 an der Zellproliferation beteiligt [78]. Des Weiteren scheint der SK4 bei Endometriumkarzinomen eine essentielle Rolle in der Tumorgenese auszuüben. So konnte durch Hemmung des Kanals mittel TRAM-34 und Clotrimazol das Wachstum von Endometriumkarzinomen inhibiert werden [79].

Wie bereits erwähnt konnte SK4 sowohl in humanen MCF-7 als auch murinen Brusttumorzelllinien nachgewiesen werden [37, 80]. Weitere Studien legen nahe, dass der SK4-Kanal eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Brustkrebszelllinien spielt [81]. Hier konnte auch ein Zusammenhang mit dem Zellzyklus aufgezeigt werden [37, 81]. So konnte durch Ouadid-Ahidouch et al. gezeigt werden, dass eine Blockade des humanen IK1 (hIK1) mit Clotrimazol zu einer Depolarisation des Membranpotentials in der späten G1-Phase kommt. Diese Depolarisation geht mit einer Senkung des intrazellulären  $Ca^{2+}$  einher, was einen Übergang der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus verhindert und folglich zu einer Inhibition der Proliferation führt [37].

In der Fachliteratur finden sich mehrere pharmakologische Inhibitoren des SK4-Kanals. Z.B. das bereits genannte Clotrimazol, [37] und auch Charybdotoxin [82]. Clotrimazol ist in Deutschland als topisches Antimykotikum zugelassen und findet zusätzlich bereits klinische Anwendung bei Erkrankungen wie Sichelzellanämie und Diarrhö. Auch bei der Behandlung von Symptomen der Rheumatoiden Arthritis wurde es bereits eingesetzt [71]. Da Clotrimazol neben der SK4-Kanalinhibition, auch eine starke Interaktion mit Cytochrom P450 zeigt [69, 72, 82, 83], bleibt der therapeutische Wert begrenzt, zumal mit TRAM-34 (1-[(2-

chlorophenyl)diphenylmethyl]1-H-pyrazol) mittlerweile ein spezifischer und hochwirksamer Inhibitor des SK4-Kanals zur Verfügung steht. TRAM-34 hemmt den SK4-Kanal bereits in Konzentrationen von 20-25 nM und besitzt eine 200-1500-fach erhöhte Selektivität für SK4 im Vergleich zu anderen Ionenkanälen [71]. In vivo konnte bei TRAM-34 im Vergleich zu Clotrimazol keine Toxizität beobachtet werden [84].



**Abbildung 1.3: Strukturformel von TRAM-34 (A) und Clotrimazol (B),** zwei Inhibitoren des SK4-Kanals. TRAM-34 steht dabei für (1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]1-H-pyrazol).

## 1.5 Calciumkanäle

Bei Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes Signalmolekül, welches durch direkte Bindung an Zielproteine oder Effektoren bei vielen physiologischen Prozessen eine essenzielle Rolle spielt.  $\text{Ca}^{2+}$  ist sowohl extrazellulär als auch intrazellulär wirksam. So übt es extrazellulär beispielsweise wichtige Funktionen bei der Blutgerinnung aus. Intrazellulär spielt  $\text{Ca}^{2+}$  als Signalmolekül bei physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Befruchtung, der Zelldifferenzierung, dem Durchschreiten des Zellzyklus, der Proliferation und der Apoptose eine wichtige Rolle [85, 86]. Auch bei Muskelkontraktionen [87, 88], der Gentranskription [86] und der Freisetzung von Neurotransmittern [89] kommt intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> eine Schlüsselrolle zu [32, 85]. Im Ruhezustand weisen Zellen einen extrem hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum auf. Dabei beträgt [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> etwa 100 nM, wohingegen die extrazelluläre Konzentration bei einem etwa 20.000-fach höheren Wert (1,8 mM) liegt [90, 91]. Ein Anstieg von [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> kann sowohl über

$\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, als auch über intrazelluläre Speicher wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie dem muskulären Analogon, dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) erfolgen [85]. Mitochondrien und der Golgi-Apparat sind in zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege involviert. Um den hohen Gradienten der  $\text{Ca}^{2+}$  Level zwischen Intra- und Extrazellularraum zu erhalten bzw. um die internen Speicher aufzufüllen, bedient sich die Zelle verschiedenster Hilfsmittel in Form von Energie-verbrauchenden Pumpen, Austauschern und Puffern ( $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine), welche sich in der Zellmembran bzw. der Membran der Zellorganellen befinden [85, 92-94].

Damit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellularraum in die Zellen gelangen können, bedarf es sogenannter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Mit Hilfe dieser Kanäle können die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entlang eines elektrochemischen Gradienten die Plasmamembran überwinden und in die Zelle gelangen. Bis heute sind eine Vielzahl solcher Kanäle bekannt, deren Vorkommen vom Zelltyp abhängig ist [32]. Die wohl bekanntesten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle stellen die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle dar (Voltage-Operated-Calcium Channels, VOCs,  $\text{Ca}_v$ ). Wie der Name bereits vermuten lässt, reagieren  $\text{Ca}_v$  auf Änderungen des Membranpotentials. Dabei registriert ein sogenannter Spannungssensor Änderungen des elektrischen Membranpotentials und reagiert mit einer Konformationsänderung und in Folge dessen mit einer Öffnung des Kanals [95].  $\text{Ca}_v$  lassen sich in verschiedene Typen einteilen. Man unterscheidet die  $\text{Ca}_v$  vom L-, N-, P/Q-, R- und T-Typ. Dabei setzen sich diese Kanäle aus verschiedenen Untereinheiten zusammen, wobei die  $\alpha_1$ -Untereinheit für die Calcium-Selektivität verantwortlich ist (Ertel et al. 2000, Cain and Snutch 2011). Die einzelnen Mitglieder dieser Gruppe können sich deutlich in ihren pharmakologischen, physiologischen und regulatorischen Charakteristiken unterscheiden [95]. Obwohl  $\text{Ca}_v$  Kanäle hauptsächlich in erregbaren Zellen des ZNS oder in Muskelzellen exprimiert werden, spielen sie auch in anderen Zelltypen wie beispielsweise T-Lymphozyten eine wichtige Rolle [96, 97].

Eine zweite Gruppe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen bilden die ligandengesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, zu welchen die rezeptorgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (receptor-operated-channels, ROCs) und die Second-Messenger-Operated-Channels (SMOCs) gehören. Die ligandengesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden in der Plasmamembran exprimiert und öffnen sich, indem endogene Liganden an dafür vorgesehene

Stellen binden. Zur Gruppe der rezeptorgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gehören unter anderem der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor und der AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic)-Rezeptor, welche beide durch den Neurotransmitter Glutamat aktiviert werden, sowie die P2X-Rezeptoren, die durch extrazelluläres ATP aktiviert werden [98-101].

Die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel können auch über sogenannte „Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$ -Entry“ (SOCE) reguliert werden. Dies geschieht insbesondere durch die Interaktion des STIM-Proteins (*stromal interaction molecule*) und des Orai-Proteins (*calcium-release-activated calcium-modulator, CRACM*). Dieses System wurde bereits 1986 zum ersten Mal beschrieben [102], konnte aber erst 2006 im Zusammenhang mit Mutationen und den daraus resultierenden immunsupprimierenden Krankheiten zugeordnet werden [103, 104]. Bei den Orai-Proteinen handelt es sich um  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Poren, welche sich in der Plasmamembran der Zelle befinden. Die STIM-Proteine befinden sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und dienen dort als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor. Eine Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher im ER, führt zu einer Aktivierung der STIM-Proteine, welche dann innerhalb der ER-Membran umverteilt werden und so eine enge räumliche Beziehung zur Plasmamembran der Zelle aufweisen. Dort kommt es nun zu einer Anhäufung dieser Proteine und zur Bildung von Oligomeren. Diese interagieren nun über ihre CRAC-Domäne mit dem N-Terminus der Orai-Proteine [105]. Durch die dadurch bedingte Öffnung der Orai-Kanäle kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle [106, 107].

Weiterhin sind Kanäle bekannt, die auf Stimuli wie Temperaturänderung, pH-Änderung, Änderung der Osmolarität oder auch auf mechanische Reize reagieren. Eine große Anzahl dieser Kanäle gehört zu der großen Familie der Transient-Receptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle). TRP-Kanäle sind unter anderem auch am  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel beteiligt und scheinen eine wichtige Rolle beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle zu haben [32].

Wie bereits dargestellt sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege wichtige Funktionen in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, so auch in der Tumorgenese [108, 109]. Es ist z.B. bekannt, dass beim Kolonkarzinom das mRNA Expressionslevel von L-Typ  $\text{Ca}_v$  Kanälen deutlich erhöht ist [110]. T-Typ  $\text{Ca}_v$  Kanäle scheinen für den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in

HEK 293 Tumorzellen eine wichtige Rolle zu spielen [111]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx sowie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux auch bei Brusttumoren für Prozesse wie Proliferation, Migration und Apoptose der Zellen wichtig sind und dass es auch hier zu Veränderungen der Expressionen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen kommt. So konnte in T-47D Brusttumorzelllinien die Überexpression der  $\text{Ca}^{2+}$ -Effluxpumpe PMCA2, welche in Verbindung mit ErbB2 positiven Brusttumoren assoziiert ist detektiert werden. Diese Überexpression schien mit einer erhöhten Resistenz dieser Zellen gegen den Zelltod einherzugehen [112]. Eine andere Studie konnte eine Überexpression des  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen TRPM7 Kanals in MCF-7 Brusttumorzellen nachweisen und kam zu dem Schluss, dass diese mit ausgeprägten und rasch proliferierenden Tumoren einhergeht [113]. Solche Veränderungen der Expressionslevel lassen sich zum Teil bestimmten Subtypen der Brusttumoren zuordnen und geben Aufschluss über deren Prognose [114].

### 1.5.1 Die Familie der TRP-Kanäle (= Transient Receptor Potential)

Die Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle stellen eine große Gruppe innerhalb der Ionenkanäle dar. Sie weisen eine hohe Diversität hinsichtlich ihrer Ionenselektivität sowie Aktivierungsmechanismen auf. TRP-Kanäle sind an einer Vielzahl verschiedener Prozesse wie z.B. Sehen, Hören, Fühlen, Riechen oder Schmecken beteiligt. Aber bei der Fertilisation, dem Zellüberleben und der Zellentwicklung sind sie unabdingbar. Sie können durch viele verschiedenen Stimuli aktiviert werden, z.B. durch  $\text{PIP}_2$  (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat),  $\text{Ca}^{2+}$ , cyclische Nukleotide, ATP, Phosphorylierung, Temperaturänderungen, Änderung des osmotischen Drucks sowie Änderungen des pH etc. Dies führt zu einem Wechsel des Membranpotentials, zur Translokation wichtiger Signalmoleküle durch die Plasmamembran, zur Änderung enzymatischer Aktivitäten sowie zur Endo- bzw.- Exozytose [115].

Die Entdeckung und das erste Klonieren eines TRP-Proteins geht auf Montell im Jahr 1989 zurück [116]. Er beschrieb erstmals einen Kanal, welcher an der Fototransduktion in *Drosophila melanogaster* beteiligt ist. Als Antwort auf eine G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Aktivierung kommt es hier zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx [117]. Im Anschluss folgten rasch die Identifizierung und Klonierung weiterer



TRP-Kanäle, welche im weiteren Verlauf zu einer Superfamilie zusammengefasst wurden. Mittlerweile umfasst diese Familie 28 Mitglieder, welche sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie in sechs Unterfamilien einteilen lassen: TRPM (Melastatin), TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPA (Ankyrin), TRPML (Mucolipin) und TRPP (Polycystein) [118-124]. TRP Kanäle besitzen eine sehr breite Gewebesdistribution [121]. Allerdings unterscheiden sich die Subgruppen bezüglich der Expression, da ein Teil ubiquitär exprimiert wird wohingegen andere eher gewebe- bzw. zellspezifisch zu finden sind. Es wird vermutet, dass TRP-Kanäle neben der Plasmamembran auch in intrazellulären Membranen zu finden sind [125].

Funktional können TRP Kanäle mit der Patch-Clamp-Methode detektiert werden. Des Weiteren dient ein Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  infolge von spezifischen Stimuli für TRP-Kanäle als guter Indikator für deren funktionale Expression, wobei TRPM4 und TRPM5 nicht  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel sind [115]. Wie auch die  $\text{K}_v$  besitzen alle Mitglieder der TRP-Superfamilie sechs transmembranäre Domänen. Dabei findet sich die porenformende Region zwischen der fünften und sechsten Domäne. Alle Mitglieder der TRP-Superfamilie weisen sowohl einen intrazellulären N-Terminus als auch einen C-Terminus auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TRP-Kanäle Tetramere bilden [126, 127].

Die einzelnen Subfamilien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sequenzhomologie sowie ihrer Permeabilität für Kationen. Die meisten bisher entdeckten TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle und sind größtenteils für monovalente und divalente Kationen mit einem Verhältnis  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \leq 10$  durchlässig. Dabei steht  $P_{\text{Ca}}$  für die Permeabilität von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $P_{\text{Na}}$  für die Permeabilität von  $\text{Na}^+$ . Ausnahmen bilden die Kanäle TRPM4 und 5, welche ausschließlich für monovalente Kationen permeabel sind, sowie TRPV5 und 6, welche eine Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  besitzen [118, 119, 123].

Die TRPC-Subfamilie umfasst sieben Mitglieder (TRPC1-TRPC7). Mit wenigen Ausnahmen werden sie ubiquitär exprimiert. Aufgrund funktioneller Ähnlichkeiten und der Sequenzhomologie lassen sich wiederum vier Untergruppen bilden. TRPC1, TRPC2, TRPC3, 6 und 7 sowie TRPC4 und 5. TRPC-Kanäle sind nichtselektive Kationenkanäle, die zwar für  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel sind, sich aber hinsichtlich ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität stark unterscheiden [128, 129]. Die Aktivierung

dieser Kanäle erfolgt entweder G-Protein gekoppelt [130] oder über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) [131, 132].

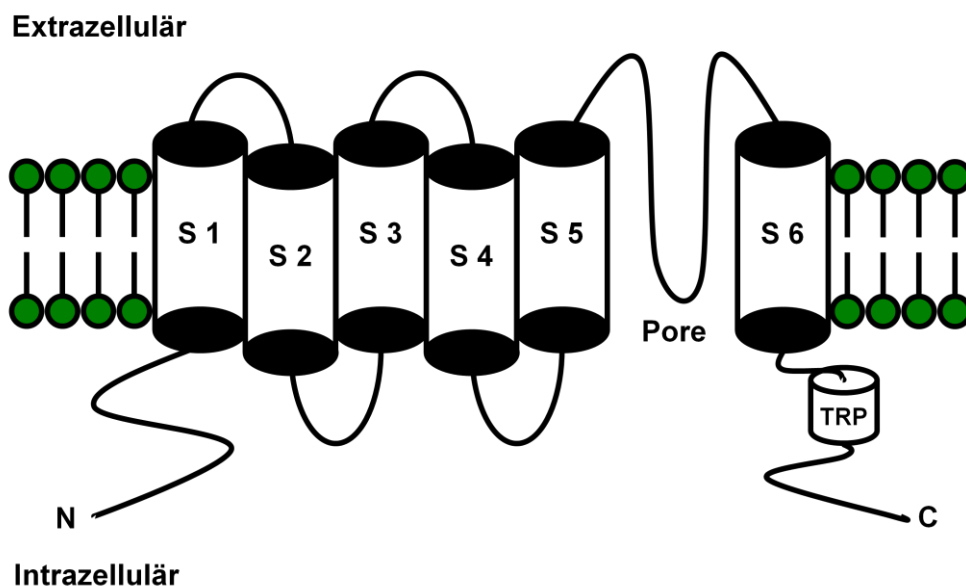
Die TRPV-Subfamilie umfasst sechs Mitglieder und wurde nach dem Vanilloid-Rezeptor 1 benannt [133]. Da sich vier der sechs Mitglieder über einen Anstieg der Temperatur aktivieren lassen, werden sie zu den thermosensitiven Kanälen gezählt [134] und finden sich in schmerzempfindlichen Neuronen des Hinterwurzelganglions sowie in mehreren nicht neuronalen Geweben [135, 136]. Wie auch bei den TRPC-Kanälen handelt es sich bei den TRPV-Kanälen um nicht-selektive Kationenkanäle, die wie alle TRP-Kanäle Tetramere bilden [126, 137]. Modulieren lassen sich die TRPV-Kanäle unter anderem durch  $\text{Ca}^{2+}$ , Calmodulin und Phosphoinositide [138, 139]. Anhand ihrer Funktionen und der Sequenzhomologien lassen sich TRPV-Kanäle in zwei Untergruppen einteilen: TRPV1-4 und TRPV 5 und 6, wobei lediglich TRPV 5 und TRPV6  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel sind [135, 136].

Die einzelnen Subfamilien der TRP-Kanäle weisen teilweise charakteristische Strukturelemente auf. So verfügen die Mitglieder der TRPC, TRPV und TRPA an ihrem intrazellulären N-Terminus auf einer Länge von 33 Aminosäuren über sogenannte Ankyrin-Repeat-Domänen. Diese spielen bei Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle. Für TRPV1 wurde eine Sequenz als Multiligandenbindungsstelle für ATP und Calmodulin identifiziert [140], welche die Kanalselektivität reguliert [118, 121]. Außerdem weisen die Mitglieder der TRPC- und TRPM-Subfamilien am C-Terminus eine Prolin-reiche Sequenz auf. Es wird vermutet, dass dieses Motiv als Interaktionsdomäne für PDZ-Proteine (*PSD95/SAP90* [*PSD = Post synaptic density*], *Septate junction-Protein Discs large* [aus *Drosophila melanogaster*] und, *Tight junction-Protein Zonula occludentes-1*) wie z.B. Homer-Proteine dient. Diesen Proteinen konnten regulatorische Funktionen auf membranäre und intrazelluläre Kanäle und Rezeptoren nachgewiesen werden [141-144].

#### 1.5.1.1 Die Unterfamilie der TRPM-Kanäle

Eine große und wichtige Unterfamilie der TRP-Kanäle stellen die TRPM-Kanäle dar. Die Familie besteht aus acht Mitgliedern, die sich anhand ihrer jeweiligen Sequenzhomologien in vier Untergruppen aufteilen lassen: TRPM1 und 3, TRPM2 und 8, TRPM4 und 5 sowie TRPM 6 und 7. [121, 145]. Benannt wurden

die Kanäle nach ihrem ersten identifizierten Mitglied Melastatin bei einer vergleichenden Untersuchung stark metastasierender und weniger stark metastasierender Melanozyten [146-148]. Wie auch die anderen Mitglieder der TRP-Familie besitzen auch die Mitglieder der TRPM-Unterfamilie sechs transmembranäre Domänen (S1-S6), wobei sich die porenbildende Region zwischen S5 und S6 befindet (siehe Abbildung 1.4). Auch C- und N-Terminus liegen intrazellulär. Zusätzlich weisen TRPM-Kanäle am C-Terminus eine sogenannte TRP-Domäne auf, wobei noch nicht geklärt ist, welche Funktion diese besitzt. Des Weiteren kann der C-Terminus in zwei Abschnitte aufgeteilt werden, nämlich in eine Coiled-Coil-Domäne und eine variable Sequenz. Zusätzlich weisen die Kanäle TRPM2, TRPM6 und TRPM7 enzymatische Aktivitäten für spezifische Substrate an ihrem C-Terminus auf. Der N-Terminus der TRPM-Kanäle ist eine konservierte Region und mit etwa 700 Aminosäuren im Vergleich zu dem der TRPC- und TRPV-Kanäle deutlich länger. Diese Region konnte bis jetzt ausschließlich bei TRPM-Kanälen identifiziert werden. Ihre Funktion ist derzeit noch ungeklärt. Hinsichtlich ihrer Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  weisen die TRPM-Kanäle ein breites Spektrum von nicht permeabel (TRPM4 und 5) bis hin zu hochgradig permeabel (TRPM3, 6 und 7) auf [121].



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der TRPM-Kanäle.** Wie alle TRP-Kanäle bestehen auch die Mitglieder der TRPM-Unterfamilie aus sechs transmembranären Domänen (S1-S6), wobei sich die porenbildende Region zwischen S5 und S6 befindet. C- und N-Terminus liegen intrazellulär. Zusätzlich verfügen alle Mitglieder der TRPM-Unterfamilie an ihrem C-Terminus über eine sogenannte TRP-Domäne. Zusätzlich lässt sich der C-Terminus in zwei Teile einteilen, in eine sogenannte Coiled-Coil-Domäne und

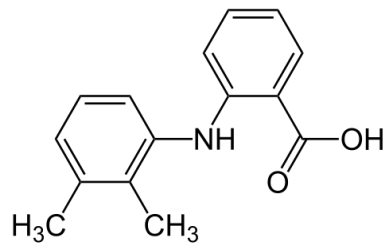
eine variable Sequenz. Der N-Terminus der TRPM-Kanäle ist eine konservierte Region und mit etwa 700 Aminosäuren im Vergleich zu dem der TRPC- und TRPV-Kanäle deutlich länger. Diese Region konnte bis jetzt ausschließlich bei TRPM-Kanälen identifiziert werden. Ihre Funktion ist derzeit noch ungeklärt. (TRP: Transient Receptor Potential; TRPM: Transient Receptor Potential Melastatin; TRPC: Transient Receptor Potential Canonical; TRPV: Transient Receptor Potential Vanilloid)

Wie bereits erwähnt handelt es sich beim ersten Mitglied, dem **TRPM1** auch gleichzeitig um den Namensgeber der Unterfamilie. Im Menschen konnte TRPM1 vor allem in Melanozyten, Melanomen, Gehirn und Retina nachgewiesen werden. Das Gen welches für den TRPM1 codiert enthält 31 Exons die jeweils 58kb (Kilobasenpaare) umfassen [149]. Durch Spleißen der mRNA, entstehen mehrere Isoformen [148]. Dabei hängt die Transkription der einzelnen Isoformen von der jeweiligen Melanomzelllinie ab [149]. Voneinander unabhängige Studien haben herausgefunden, dass der TRPM1 eine wichtige Rolle bei der synaptischen Funktion in Bipolarzellen der Retina besitzt. Mutationen des TRPM1 tragen daher vermutlich zu einer kongenitalen Nachtblindheit (*congenital stationary night blindness, CSNB*) bei, einem nicht-progressivem Defizit bei der Dunkeladaptation [150-152]. Aufgrund geringerer Expressionslevel in malignen Melanomen scheint TRPM1 auch über eine Tumorsuppressorfunktion zu verfügen [147].

Auch der **TRPM2**-Kanal ist ein nicht-selektiver Kationenkanal und besitzt ein annähernd lineares Verhältnis zwischen Ionenströmen und Spannung. Seine Leitfähigkeit liegt bei etwa 62 pS. Intensivieren lassen sich die Ströme durch Lanthan ( $\text{La}^{3+}$ ) bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Aktivieren lässt sich der Kanal sowohl durch oxidativen und nitrosativen Stress [153], als auch durch hohe intrazelluläre Level an  $\text{Ca}^{2+}$  [154, 155]. Gehemmt werden kann der Kanal durch nichtselektive Blocker wie z.B. Flufenaminsäure welches zur Gruppe der NSAIDs gehört, Clotrimazol oder Econazol. Bei den letztgenannten handelt es sich um ein Antimykotikum [156]. Am C-Terminus besitzt der TRPM2 eine enzymatisch aktive ADP-Ribose Pyrophosphatase-Domäne (ADP: Adenosindiphosphat) [157, 158]. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TRPM-Unterfamilie weist der TRPM2 keine allzu hohe Gewebedistribution auf. Jedoch konnten hohe mRNA-Expressionslevel in den Immunzellen des Gehirns nachgewiesen werden. Aber auch in einigen peripheren Zelltypen scheint der TRPM2 exprimiert zu werden [159].

Der **TRPM3**-Kanal besitzt aufgrund seiner Sequenzhomologie eine enge Beziehung zum TRPM1. TRPM3 ist ebenfalls ein konstitutiv aktiver, nichtselektiver,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanal mit einer linearen Stromspannungskurve [160]. Er besitzt eine breite Gewebesdistribution. In Ovarien, Pankreas, Gehirn, Niere, Hypophyse, Auge, Brustdrüsengewebe sowie in kontraktilen Elementen vaskulärer Glattmuskelzellen konnte TRPM3-mRNA nachgewiesen werden [80, 160-164]. Bis dato sind sechs Spleißvarianten des TRPM3 bekannt, welche sich in ihren Eigenschaften stark unterscheiden können. Noch ist jedoch nicht vollends geklärt, ob alle dieser Splicevarianten auch für funktionstüchtige Proteine codieren [160-162]. Als Aktivatoren des TRPM3 sind zum einen das D-Erythro-Sphingosin sowie seine beiden Analoga, Dihydro-D-Erythro-Sphingosin und N,N-Dimethyl-Erythro-Sphingosin, beschrieben [160, 165]. Weitere Studien legen nahe, dass auch Wirkstoffe wie Nifedipin und Pregnenolonsulfat, einem Neurosteroid den TRPM3-Kanal aktivieren können [163]. Neben den diversen Aktivatoren sind auch einige Inhibitoren bekannt. Zu diesen gehören unter anderem die NSAIDs Flufenaminsäure, Meclofenaminsäure, Tolfenaminsäure und Mefenaminsäure (MEF). Auch die Ionen Lanthan und Gadolinium sind als Blocker bekannt. Alle diesen Wirkstoffen ist eine starke Inhibition des TRPM3 gemein, allerdings sind diese, mit Ausnahme der Mefenaminsäure, nicht TRPM3-spezifisch, sondern hemmen unter anderem auch die TRPM2, TRPC6 und TRPV4 Kanäle. Mefenaminsäure dagegen scheint spezifisch für TRPM3 zu sein [160, 166].

Bis heute sind viele Funktionen und Aufgaben des TRPM3-Kanals noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist aber, dass eine Pregnenolonsulfat-vermittelte Aktivierung der TRPM3-Kanäle in  $\beta$ -Pankreaszellen zu einer erhöhten Insulinsekretion [163]. Aber auch bei der renalen Homöostase scheint der TRPM3 eine Funktion zu haben. Des Weiteren wird TRPM3 auch mit einer kongenitalen-mentalen Störung, dem Kabuki-Syndrom assoziiert [121]. Auch in Verbindung mit Tumoren bleibt die Rolle von TRPM3 weitestgehend unklar. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass die Transkription der TRPM3-mRNA in Glioblastomen stark reduziert ist. Dies, so wird vermutet, könnte auf eine tumorsuppressive Wirkung von TRPM3 hindeuten [167].



**Abbildung 1.5: Strukturformel der Mefenaminsäure:** Bei der Mefenaminsäure handelt es sich um einen Blocker des TRPM3-Kanals (TRPM: Transient Receptor Potential Melastatin3). Die  $IC_{50}$  der Mefenaminsäure für den TRPM3 liegt bei ca.  $6,6 \mu\text{M}$  [166].

Sowohl **TRPM4** als auch **TRPM5** stellen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{Na}^+$ -Kanäle dar. Sie sind nur für monovalente Kationen durchlässig, und besitzen somit keine  $\text{Ca}^{2+}$  Permeabilität. Aufgrund ihrer Permeabilität für  $\text{Na}^+$ -Ionen sind diese Kanäle an der Depolarisation erregbarer Zellen beteiligt [168-171]. Während TRPM4 ubiquitär vorkommt, wird TRPM5 in nur wenigen Geweben wie im Magen-Darm-Trakt sowie den Zellen des Tastempfindens exprimiert [168]. TRPM4 wird durch intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert und spannungsabhängig moduliert. Inhibitoren des TRPM4 sind AMP, ADP und ATP [170].

Der **TRPM6**-Kanal weist mit einer 49%igen Homologie in der Aminosäuresequenz die größte Ähnlichkeit zu TRPM7 auf [172]. Er ist hauptsächlich permeabel für divalente Kationen wie z.B.  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Allerdings besitzt der TRPM6 im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}$  eine vierfach höhere Affinität zu  $\text{Mg}^{2+}$  auf, was ihn zu einem zentralen Molekül im  $\text{Mg}^{2+}$ -Transport macht [173-175]. Bei TRPM6 handelt es sich um ein großes Protein mit mehr als 2000 Aminosäuren (AS). Am C-Terminus besitzt er eine einzigartige Serin/Threonin Proteinkinase Domäne. Das Gen welches für TRPM6 codiert besitzt 39 Exons [176]. TRPM6 wird über das intrazelluläre  $\text{Mg}^{2+}$  reguliert. So lässt sich eine Reihe von Erkrankungen auf eine Fehlfunktion des TRPM6 zurückführen, wie beispielsweise Hypomagnesiämie und sekundäre Hypocalciämie [174, 175].

Wie auch die meisten anderen TRPM-Kanäle, so ist auch der **TRPM7** permeabel für verschiedene bivalente Kationen, unter anderem für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  [177]. Vom Aufbau ähnelt der TRPM7 den anderen Mitgliedern der TRPM-Unterfamilie. Wie zuvor erwähnt besteht eine starke Homologie zu TRPM6, dies betrifft auch die C-

terminale Serin/Threonin-Kinase. Durch eine tetramere Anordnung der TRPM7-Untereinheiten wird die Pore gebildet [178]. TRPM7 ist ein wichtiger Regulator der Aktin-Myosin Kontraktilität, der Zelladhäsion und der gerichteten Zellmigration. Auch bei der Entwicklung von Brustkrebs übt er einige wichtige Funktionen aus. So konnte diesen Kanälen u.a. eine Beteiligung bei der Zellproliferation [113], der Zelladhäsion sowie an der Bildung von Metastasen nachgewiesen werden. Bei ausgeprägten Primärtumoren ist auch die TRPM7-Expression erhöht [113, 177]. Dabei ist die mRNA-Expression ein unabhängiger, diagnostischer Marker für das Auftreten von Rezidiven und Metastasen. In Mäusestudien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von TRPM7 mit einer verkürzten rezidivfreien Überlebenszeit und auch mit einer erhöhten Neigung zu Fernmetastasen einhergeht [177]. Als Modulatoren des TRPM7 wurden neben freiem  $Mg^{2+}$  auch an  $Mg^{2+}$  gebundene Nukleotide wie z.B. Mg-ATP identifiziert aber auch die Phospholipase C (PLC) konnte als Modulator gefunden werden [178]. In verschiedenen Studien konnten eine Reihe von Inhibitoren ausgemacht werden. Hierzu gehören u. A. Carvacrol [179], Sphingosine, FTY 720 [180], 5-lipoxygenase Inhibitoren [181], 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB) [182], Midazolam [183] sowie Waixenicin A [184, 185]. Allerdings handelt es sich bei all diesen Inhibitoren mit Ausnahme des Waixenicin A um unspezifische Inhibitoren. Studien zu Waixenicin A legen nahe, dass dieser Wirkstoff relativ spezifisch für den TRPM7 zu sein scheint [184, 185].

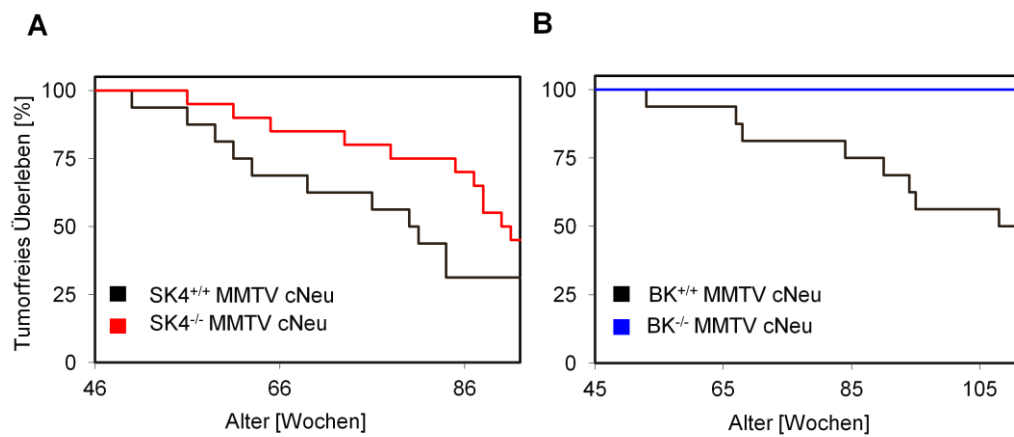
**TRPM8** findet sich hauptsächlich in Temperatur- und Schmerz-sensitiven Neuronen und fungiert dort als Thermosensor [186-188]. Stoffe wie Icilin oder Menthol können den Kanal ebenso aktivieren niedrige Temperaturen [173, 189].

## 1.6 Vorangegangene Arbeiten

### 1.6.1 Tumorfrees Überleben von MMTV cNeu SK4-Knockout Mäusen (gemischter Hintergrund)

In den Arbeitskreisen Ruth und Lukowski wurden bereits Brusttumormausmodelle mit einer genetischen Ablation des SK4- bzw. BK-Kanals etabliert (SK4<sup>-/-</sup> bzw. BK<sup>-/-</sup>). Um die Auswirkungen der Ablation auf das tumorfreie Überleben bei Mammakarzinomen zu untersuchen, wurden die SK4- und BK-Knockouttiere (gemischter Hintergrund) hierfür mit MMTV cNeu Mäusen verpaart. Die Mäuse wurden in regelmäßigen Abständen palpiert und das erste Auftreten eines Tumors dokumentiert. Die daraus resultierenden Daten sind in Abbildung 2.1 zusammengefasst. Etwa 62% der MMTV cNeu SK4<sup>+/-</sup>-Mäuse entwickelten Tumoren, die mittlere tumorfreie Überlebenszeit betrug dabei 69 Wochen (siehe Abbildung 1.6 A, schwarze Kurve). Im Gegensatz dazu entwickelten nur 50% der MMTV cNeu SK4<sup>-/-</sup>-Mäuse Brusttumoren, dabei war auch die mittlere tumorfreie Überlebenszeit mit 85 Wochen deutlich verlängert (siehe Abbildung 1.6 A, rote Kurve). MMTV cNeu SK4<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln demnach im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (MMTV cNeu SK4<sup>+/+</sup>) im Durchschnitt 16 Wochen später Brusttumoren (siehe Abbildung 1.6 A). Untersuchungen zum Einfluss der genetischen Ablation des BK-Kanals zeigten, dass BK<sup>-/-</sup> komplett vor der Tumorentstehung in dem MMTV cNeu Modell geschützt sind. Bei keinem der BK-negativen Tiere konnte während der gesamten Untersuchungszeit von mehr als zwei Jahren ein Brusttumor detektiert werden (siehe Abbildung 1.6 B). Die Wurfgeschwister MMTV cNeu<sup>+/+</sup> hingegen entwickelten zu 50% Tumoren, dabei lag die durchschnittliche tumorfreie Überlebenszeit bei ca. 89 Wochen. Kombinierte MRT (Magnetresonanztomographie)/PET (Positronen-Emissions-Tomographie)-Untersuchungen bestätigten (nicht gezeigt). Diese Befunde legen nahe, dass sowohl der SK4-Kanal als auch der BK-Kanal wichtige Funktionen bei der Entstehung von Brusttumoren übernehmen.

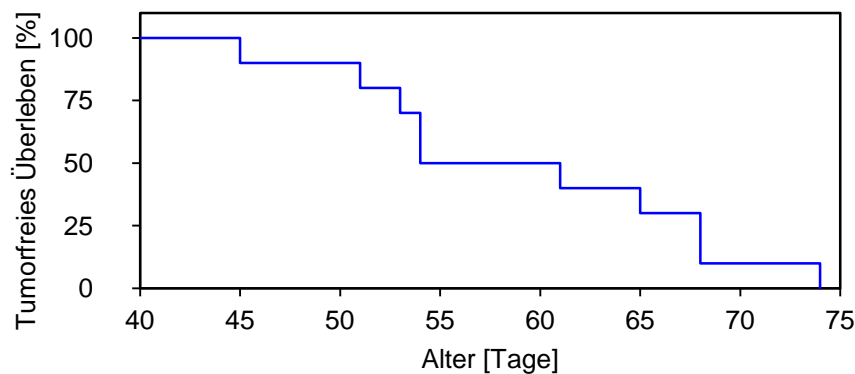




**Abbildung 1.6: Kaplan-Meier-Kurve zum tumorfreien Überleben von MMTV cNeu (A) SK4<sup>-/-</sup>- und (B) MMTV cNeu BK<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Wurfgeschwistern. (A)** MMTV cNeu SK4<sup>-/-</sup> weisen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern eine deutlich verzögerte Tumorgenese auf. So entwickeln etwa 62% der MMTV cNeu SK4<sup>-/-</sup>-Mäuse Tumoren, wobei die tumorfreie Überlebenszeit ca. 85 Wochen beträgt. **(B)** MMTV cNeu BK<sup>-/-</sup> sind gänzlich vor der Entstehung geschützt. Keines der untersuchten BK<sup>-/-</sup>-Tiere entwickelte während des Beobachtungszeitraumes einen Tumor. Wildtypwurfgeschwister dagegen entwickelten in 50% der Fälle Tumoren, wobei hier die tumorfreie Überlebenszeit bei 89 Wochen lag. (Severine Stehling, Pharmazeutisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie)

### 1.6.2 Tumorfrees Überleben von MMTV PyMT Mäusen (FVB Hintergrund)

Laut Literatur entwickeln MMTV PyMT Mäuse (FVB Hintergrund) durchschnittlich nach 57 Tagen Brusttumoren [19, 20]. In unserem Arbeitskreis konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (siehe Abbildung 1.7). Dreimal pro Woche wurden die Tiere auf Brusttumoren palpiert und das Entstehungsdatum dokumentiert. Dabei ergab sich, dass die MMTV PyMT Mäuse (FVB Hintergrund) hier eine durchschnittliche tumorfrem Überlebenszeit von 59 Tagen aufweisen.



**Abbildung 1.7: Kaplan-Meier-Kurve zum tumorfrem Überleben von MMTV PyMT Mäusen mit FVB Hintergrund:** Die MMTV PyMT Mäuse wurden dreimal wöchentlich palpiert. Nach durchschnittlich 59 Tagen entwickelten sich die Tumoren (*Friederike Steudel Pharmazeutisches Institut, LS für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie*).

### 1.6.3 Nachweis der mRNA des SK4- und des TRPM3-Kanals mittels Nanostring Technologie sowie quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zuerst wurde Brusttumorgewebe aus MMTV PyMT Mäusen auf die Expression von SK4-mRNA und möglicher Interaktionspartner mittels Nanostring Technologie in Kooperation mit Prof. Freichel und Dr. Krebs (Pharmakologisches Institut, Universität Heidelberg) bestimmt. Es konnte ein hohes Level an SK4 mRNA sowie ein mittleres Expressionslevel an TRPM3-mRNA, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Ionenkanal der TRPM-Familie (siehe Kapitel 1.5.1.1) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1.1).

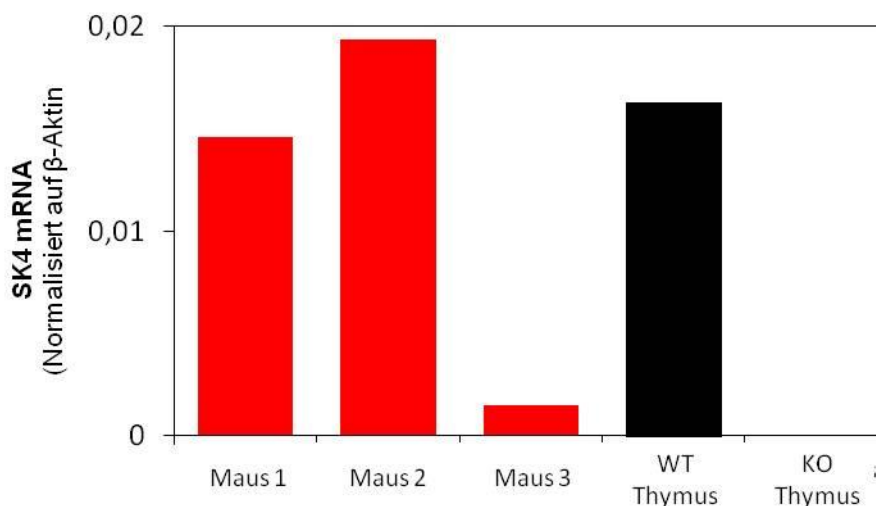
Dieser Kanal und seine Funktionen in Brusttumoren sowie der Zusammenhang zwischen SK4 und TRPM3 in Brusttumoren sind noch weitgehend ungeklärt. Des

Weiteren weist die Literatur auf eine stark reduzierte TRPM3-mRNA-Expression in Glioblastomen hin, was die Vermutung nahe legt, dass der TRPM3 eine tumorsuppressive Funktion ausüben könnte [167].

SK4-mRNA konnte auch in MMTV PyMT Brusttumorzellen mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) (siehe Kapitel 2.2.7) nachgewiesen werden.

	Maus 1	Maus 2
SK4	15517	16069
TRPM3	514	227

**Tabelle 1.1: Nachweis von SK4- und TRPM3-mRNA der in MMTV PyMT Brusttumorgewebe mittels Nanostring Technologie.** Mit Hilfe der Nanostring Methode konnte sowohl die mRNA des SK4-Kanals als auch die mRNA des TRPM3-Kanals in MMTV PyMT Brusttumorgeweben nachgewiesen werden, wobei die SK4-mRNA Expression beim direkten Vergleich mit der TRPM3 mRNA Expression um ein vielfaches höher liegt. (Friederike Steudel Pharmazeutisches Institut, LS für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie in Zusammenarbeit mit Prof. Freichel und Dr. Krebs, Pharmakologisches Institut, Universität Heidelberg.) (MMTV = Mouse Mammary Tumor Virus; PyMT = Polynomavirus Middle T Antigen; TRPM = Transient Receptor Potential)

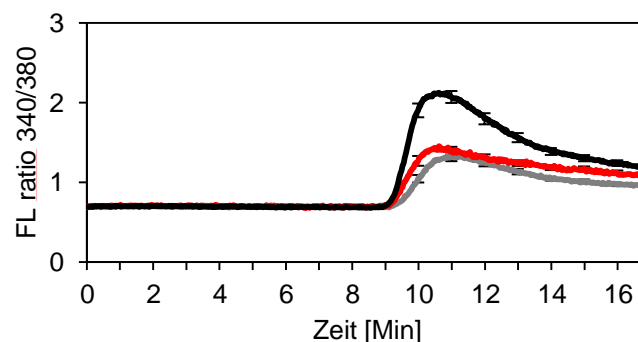


**Abbildung 1.8: Nachweis von SK4 mRNA in MMTV PyMT Brusttumorzellen mittels Quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR).** Mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) konnte die Expression von SK4-mRNA in

MMTV PyMT Brusttumorzellen nachgewiesen werden. Dabei erlaubt diese Technik neben dem Nachweis bestimmter RNA-Sequenzen auch eine Aussage über die Expressionshöhe. Dies geschieht mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. Alle Werte dieser Versuche wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert. Als Referenzgewebe diente Thymus von SK4 Wildtypmäusen (WT) sowie Thymus von SK4 Knockoutmäusen (KO). SK4 mRNA ist in den Brusttumorzellen der drei Versuchstiere exprimiert, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Hoang Y Nguyen Pharmazeutisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie). (MMTV = mouse mammary tumor virus; PyMT = polynomavirus middle T antigen; qRT-PCR = quantitative real time polymerase chain reaction)

#### 1.6.4 Untersuchung der Funktion des SK4-Kanals auf akute $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Verwendung von TRAM-34

Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Funktion des SK4-Kanals im  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel von MMTV PyMT Brusttumorzellen zu erlangen, wurden Messungen sogenannter akuter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Zugabe des selektiven SK4-Inhibitors TRAM-34 durchgeführt. Die Messung der intrazellulären Calciumspiegel und Calciumstromes erfolgte wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben. Der verwendete Versuchsaufbau entspricht war derselbe, welcher im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurde, um die Rolle des TRPM3 Kanals auf akute  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (siehe Kapitel 2.2.8.1) zu ermitteln. Auch hier wurden die Versuche unter zwei Kontrollbedingungen zum einen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (siehe Kapitel 2.1.5) und einem Serumpuffer (siehe Kapitel 2.1.5) durchgeführt. Wie Abbildung 1.9 zeigt, bewirkt eine TRAM-34-vermittelte SK4-Kanalinhibition eine Reduktion akuter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Dies unterstreicht eine essentielle Funktion des Kanals in der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase.

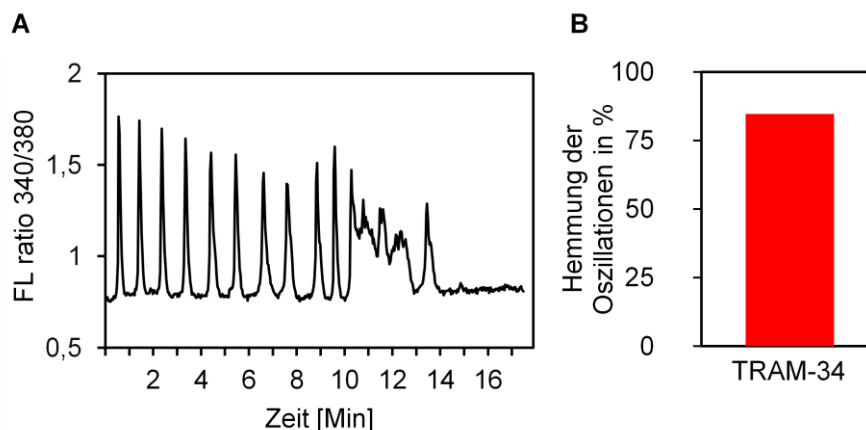


**Abbildung 1.9: Messungen akuter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Zugabe des selektiven SK4-Kanal-Inhibitors TRAM-34.** Die Versuchsdurchführung erfolgte hier wie unter 5.4 beschrieben. Zunächst wurde für 10 Minuten ein  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Puffer superfundiert. Nach 10 Minuten wurde auf einen Serumpuffer gewechselt(+ TRAM-34). In grau ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx unter alleiniger Zugabe eines  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffers dargestellt, in schwarz unter Zugabe eines Serumpuffers

(Ca<sup>2+</sup>-Puffer + FCS). Die rote Linie zeigt den Ca<sup>2+</sup>-Influx unter Zugabe des Serumpuffers + TRAM-34. Eine TRAM-34-vermittelte SK4-Kanalinhhibition bewirkt eine deutliche Reduktion akuter Ca<sup>2+</sup>-Transienten, was wiederum auf die essentielle Funktion des SK4-Kanals in der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase hinweist. (Friederike Steudel, *Pharmakologisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie*) (MMTV = mouse mammary tumor virus, PyMT = polynomavirus middle T antigen; SK4-Kanal = Ca<sup>2+</sup>-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; FCS = fetal calf serum; TRAM-34 = 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol, FURA-2-AM = Fura-2-Acetoxy-methylester)

### 1.6.5 Untersuchung der Funktion des SK4-Kanals auf spontane Ca<sup>2+</sup>-Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Verwendung von TRAM-34

Es wurden auch Untersuchungen zur Funktion des SK4-Kanals mittels einer pharmakologischen Inhibition durch TRAM-34 auf sogenannte spontane Ca<sup>2+</sup>-Transienten durchgeführt (Versuchsaufbau siehe Kapitel 2.2.8.2). Da bei den spontanen Ca<sup>2+</sup>-Messungen die Zellen zuvor nicht synchronisiert werden, handelt es sich bei diesem Versuchsaufbau um eine realitätsnähere Simulation der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase. Wie bei den akuten Ca<sup>2+</sup>-Transienten konnte auch bei den spontanen Ca<sup>2+</sup>-Messungen ein deutlicher inhibitorischer Effekt durch die TRAM-34-vermittelte SK4-Kanalblockade beobachtet werden.

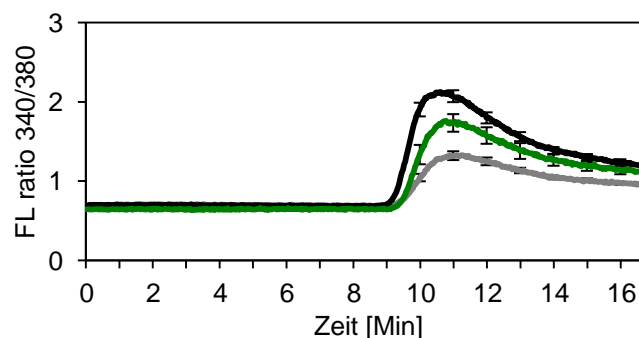


**Abbildung 1.10: Messung der spontanen Ca<sup>2+</sup>-Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen.** Die Messung spontaner Ca<sup>2+</sup>-Transienten erfolgte wie in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben. **(A)** Repräsentative Darstellung einer TRAM-34 vermittelten Hemmung spontaner Ca<sup>2+</sup>-Transienten. Nach der Zugabe von TRAM-34 nach 10 Minuten nehmen sowohl die Frequenz als auch die Amplitude der Oszillationen ab, bis die Zelle gänzlich aufhört zu oszillieren. **(B)** Insgesamt konnten 85% aller Oszillationen, die in den ersten zehn Minuten detektiert wurden, mit einer pharmakologischen Inhibition des SK4-Kanals gehemmt werden. (Hoang Y Nguyen und Friederike Steudel, *Pharmazeutisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie*) (MMTV = mouse mammary tumor virus, PyMT = polynomavirus middle T antigen; SK4-Kanal = Ca<sup>2+</sup>-

aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; FCS = fetal calf serum; TRAM-34 = 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol)

### 1.6.6 Untersuchung zur Funktion des TRPM3-Kanals auf akute $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Verwendung von Mefenaminsäure

Da es sich bei TRPM3 um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanal der TRPM-Familie handelt war wuden zunächst Untersuchungen zur Rolle des TRPM3 in Hinsicht auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel in MMTV PyMT Brusttumorzellen durchgeführt. Als spezifischer Inhibitor des TRPM3-Kanals wurde Mefenaminsäure (MEF) verwendet (siehe Kapitel 2.2.8.2), welche sehr potent und selektiv am TRPM-Kanal wirkt [166]. In der Tat zeigten diese Versuche, dass eine pharmakologische Hemmung des TRPM3-Kanals mit MEF in einer Verminderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx resultiert (siehe Abbildung 1.11), die allerdings im Vergleich zu einer TRAM-34 vermittelten SK4-Kanalinhibition geringer ist. (siehe Abbildung 1.9)



**Abbildung 1.11: Messung akuter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Zugabe des selektiven TRPM3-Inhibitors Mefenaminsäure (MEF).** In grau ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx unter alleiniger Zugabe eines  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffers dargestellt, in schwarz unter Zugabe eines Serumpuffers ( $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer + FCS). Die grüne Linie zeigt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx unter Zugabe des Serumpuffers + MEF. Eine MEF-vermittelte TRPM3-Kanalinhinhibition bewirkt eine deutliche Reduktion akuter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, was auf dessen essentielle Funktion beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx sowie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase hindeutet (Hoang Y Ngyuen, *Pharmakologisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie*). (MMTV = mouse mammary tumor virus, PyMT = polynomavirus middle T antigen; TRPM3 = transient receptor potential melastatin3; FCS = fetal calf serum; MEF = Mefenaminsäure; FURA-2-AM = Fura-2-Acetoxy-methylester)

## 1.7 Zielsetzung

Das Primärziel der vorliegenden Doktorarbeit war die funktionale Charakterisierung der SK4- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Wachstumseffekte in Mammakarzinomzellen. Hierfür wurden murinen Brusttumorzellen weiblicher MMTV PyMT Mäuse isoliert und kultiviert. Basierend auf vorangegangenen Untersuchungen in MMTV cNeu Brusttumorzellen (siehe Abbildung 1.6) wurde dabei die Hypothese aufgestellt, dass SK4 Kanäle mit  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanälen der TRPM-Familie insb. TRPM3 interagieren und über diesen Mechanismus die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase sowie das Wachstum der Zellen beeinflussen (siehe Tabelle 1.1). In der Tat wurden die wachstumshemmenden Effekte von TRAM-34 (einem SK4-Kanalinhibitor) in MMTV PyMT Brusttumorzellen erst kürzlich etabliert [80]. Diese Vorarbeiten implizieren weiterhin, dass eine TRAM-34-vermittelte Inhibition des SK4-Kanals nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren die Amplitude intrazellulärer Calciumspiegel reduziert (siehe Abbildung 1.9). Fokus der geplanten Arbeiten waren daher Analysen zum Wachstum der Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des TRPM3-Kanals mit Mefenaminsäure und Wachstumsuntersuchungen in Gegenwart von Mefenaminsäure und TRAM-34. Um den Zusammenhang der potentiellen Interaktion von SK4 mit TRPM3 für die Dynamik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase besser zu verstehen sollten evozierte/akute und spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale  $\pm$ Mefenaminsäure mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nach kombinierter Mefenaminsäure und TRAM-34 Applikation verglichen werden. Diese Experimente zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik in den MMTV PyMT Brusttumorzellen wurden schließlich noch durch Verwendung des SK4-Kanalöffners DCEBIO vervollständigt. Da Mefenaminsäure als nicht-steroidales Antirheumatikum als Inhibitor der Cyclooxygenasen (COX) wirkt, sollten schlussendlich auch Kontrolluntersuchungen mit Diclofenac eine Differenzierung der TRPM3- und COX-abhängigen Effekte von Mefenaminsäure auf Wachstum und  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase erlauben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius
Autoklav 3870 ELV	Tutnauer Systec
Brutschrank	Binder
<p>Ca<sup>2+</sup>-Imaging:</p> <p>Mikroskop, Axiovert S 100</p> <p>Kamera, Diagnostic Instruments</p> <p>Elektronischer Transformator für die mikroskopische Beleuchtungseinrichtung, Ebx 75 isolated</p> <p>Kontrollsystem Mac 500</p> <p>Meta Imaging (Software – Messung)</p> <p>Image J (Software – Auswertung)</p>	<p>Carl Zeiss</p> <p>Visitron Systems</p> <p>Ludl Electronic Products Ltd</p> <p>Meta</p> <p>Wayne Rasband</p>
Eismaschine	AF 100, Scotsman
Magnetische Heizplatte	<p>IKAMAG<sup>®</sup> RCT</p> <p>IKAMAG-COMBIMAG RCT</p>
Mikroskop	Wilovert S, Hund Wetzler
<p>Mikroskop Axiovert 200 M</p> <p>Kamera AxioCam RMC</p> <p>AxioVision Rel 4.8 (Software)</p>	Carl Zeiss



Nanophotometer P330	Implen
Opticon™, Continuous Fluorescence Detector OpticonMonitor™ Analysis Software Version 1.4	MJ Research
PCR Gerät	Mastercycle, Eppendorf
Pipette 10 µl	Abimed
Pipette 200 µl	Abimed
Pipette 1000 µl	Abimed
Pipette 10 µl	Pipetman Gilson
Pipette 200 µl	Pipetman Gilson
Pipette 1000 µl	Pipetman Gilson
Pipette 10 µl	Discovery Comfort
Pipette 20 µl	Discovery Comfort
Pipette 200 µl	Discovery Comfort
Pipette 1000 µl	Discovery Comfort
Pumpe	KNT Neuberger, Laboport RnF Laboport
Spannungsgerät	Biometra Standard Power Pack P25
Sterilwerkbank	HeraSafe Heraeus
Stickstoffbehälter	KG W Isotherm
Thermoschüttler	Thermomixer Compact, Eppendorf

UV-Licht-Kammer	Bio Doc Analyse Biometra
Vortexer	Vortex-Genie™, Bender & Hobein AG MS1 Minishaker IKA®
Waage	BP 2100 S, Sartorius MS-400 G&G®
Wasseraufbereitungsanlage	MilliQ®, Biocel
Wasserbad	Julabo SW-20c, T Lauda
Zentrifuge	Centrifuge 5804 Eppendorf Centrifuge 5415D Eppendorf Centrifuge 5417R Eppendorf

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Bestellnummer/ Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Abfalltüten klein Abfalltüten groß	E706.1 0384.1	Carl Roth GmbH
Calciummessschale Zellview™ Zellkulturschale mit Glasboden 35mm	627860	Greiner Bio One
Einmalhandschuh Peha Soft Nitrile S Einmalhandschuh Peha Soft Nitrile M Einmalhandschuh Peha Soft Nitrile L	9422061 9422071 9422081	Hartmann
Einmalhandschuh Purple Nitrile L	L52003M	Kimberly Clark
Eppendorfreaktionsgefäß 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß 2,0ml	Rotilabo- Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH
Falcon Tube 15 ml Falcon Tube 50 ml	430766 430291	Corning
Falcon Tube selbststehend 50 ml	430897	Corning
Filter Filtropur BT25 0.2 250 ml Bottle Top Filter	83.1822.101	Sarstedt
Filtrier-/Sammelgefäß	High Pure Filter Tubes, Collection Tubes	Roche
Gestopfte Pipettenspitze 10 µl Gestopfte Pipettenspitze 20 µl Gestopfte Pipettenspitze 200 µl Gestopfte Pipettenspitze 1000 µl	765288 774288 739288 740288	Greiner Bio

Individual PCR Tubes™ Low Tube Strip CLR	TLS0801	BioRad Laboratories Inc.
Konisches Zentrifugenröhrchen 15 ml	430291	Corning
Konisches Zentrifugenröhrchen 50 ml	430766	
Multiplate™ PCR Plates 96-well clear	MLL9601	BioRad Laboratories Inc.
Microseal® "B"-seal Seals	MSB1001	BioRad Laboratories Inc.
Pasteurpipetten	4522.1	Carl Roth GmbH
PCR Eppendorfgefäß 0,5 ml	003.124.537	Eppendorf
Pipettenspitzen 200 µl	70.706.002	Sarstedt
Pipettenspitzen 1000 µl	70.762	
Präzisionswischtuch	05511	Kimberly-Clark Professional
Proliferationsschälchen 60µ-Dish, 35mm hoch, Grid 500	81166	Ibidi
Skalpell No 11	02.00130.011	Feather
Stripette 5 ml	4487	Corning
Stripette 10 ml	4488	
Stripette 25 ml	4489	
Stripette 50 ml	4490	
Wägeschalen 41x41x8	1878.2	Rotilab®
Wägeschalen 89x89x25	1884.1	
Zählkammer, Neubauer Improved	DHC-N01	Digital Bio

Zellkulturgefäße		
25 cm <sup>2</sup> Flasche	430639	Corning
75 cm <sup>2</sup> Flasche	431080	
175 cm <sup>2</sup> Flasche	431080	
55 cm <sup>2</sup> Petrischale	430167	

### 2.1.3 Zellkultur

Substanz	Bestellnummer	Hersteller
10x Trypsin/EDTA	15400-054	Gibco/Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8418-100ML	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	10270-106	Gibco/Invitrogen
Improved Minimum Essential Medium (IMEM)	A10489-01	Gibco/Invitrogen
Improved Minimum Essential Medium (IMEM) (ohne Phenolrot)	A10488-01	Gibco/Invitrogen
Penicilline-Streptomycin-Lösung	15140-122	Gibco/Invitrogen
Phosphat gepufferte Lösung (DPBS)	14190-094	Gibco/Invitrogen

**2.1.3.1 Medium**

<b>Kulturmedium</b>	
IMEM	500 ml
FCS	25 ml
PenStrep	5ml

<b>Arretiermedium</b>	
IMEM (ohne Phenolrot)	500 ml

**2.1.3.2 Lösungen**

<b>1x Trypsin</b>	
10x Trypsin/EDTA	10 ml
DPBS	90 ml

→ Aliquotieren, danach Lagerung bei -20°C

## 2.1.4 Proliferationsuntersuchungen

### 2.1.4.1 Substanzen

Material	Bestellnummer	Hersteller
10x Trypsin/EDTA	15400-054	Gibco/Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8418-100ML	Sigma
Ethanol	34963-2.5L	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	10270-106	Gibco/Invitrogen
Improved Minimum Essential Medium (IMEM)	A10489-01	Gibco/Invitrogen
Improved Minimum Essential Medium (IMEM) (ohne Phenolrot)	A10488-01	Gibco/Invitrogen
Penicilline-Streptomycin-Lösung	15140-122	Gibco/Invitrogen
(DPBS)	14190-094	Gibco/Invitrogen
Mefenaminsäure (MEF)	M4267-50G	Sigma
Paxilline	BML-KC 155-0000	Enzo®
Penicilline-Streptomycin-Lösung	15140-122	Gibco/Invitrogen
Phosphat gepufferte Lösung (DPBS)	14190-094	Gibco/Invitrogen
TRAM-34		Pharmazeutisches Institut Universität Tübingen, AK Laufer

**2.1.4.2 Medium**

<b>Kulturmedium</b>	
IMEM	500 ml
FCS	25 ml
PenStrep	5ml

<b>Arretiermedium</b>	
IMEM (ohne Phenolrot)	500 ml

**2.1.5 Ca<sup>2+</sup>-Imaging****2.1.5.1 Substanzen**

<b>Substanz</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
10x Trypsin/EDTA	15400-054	Gibco/Invitrogen
Calciumchlorid-Dihydrat	5239.1	Carl Roth GmbH
DCEBIO	1422	Tocris
D-Glucose	6780.1	Carl Roth GmbH
Diclofenac-Natrium	135796	Euro OTC Pharma GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8418-100ML	Sigma
Ethanol	34963-2.5L	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	10270-106	Gibco/Invitrogen
Fura-2-Acetoxymethylester	D00142792	Calbiochem



(FURA-2-AM)		
HEPES	9105.3	Carl Roth GmbH
Improved Minimum Essential Medium (IMEM)	A10489-01	Gibco/Invitrogen
Improved Minimum Essential Medium (IMEM) (ohne Phenolrot)	A10488-01	Gibco/Invitrogen
Kaliumchlorid	6781.1	Carl Roth GmbH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	A537.1 1.05833.1000	Carl Roth GmbH Merck GmbH
Natriumchlorid	9105.3	Carl Roth GmbH
Penicilline-Streptomycin-Lösung	15140-122	Gibco/Invitrogen
(DPBS)	14190-094	Gibco/Invitrogen
Mefenaminsäure (MEF)	M4267-50G	Sigma
Paxilline	BML-KC 155-0000	Enzo®
Penicilline-Streptomycin-Lösung	15140-122	Gibco/Invitrogen
Phosphat gepufferte Lösung (DPBS)	14190-094	Gibco/Invitrogen
TRAM-34		Pharm. Institut Universität Tübingen, AK Laufer

### 2.1.5.2 Medium

<b>Kulturmedium</b>
---------------------

IMEM	500 ml
FCS	25 ml
PenStrep	5ml

<b>Arretiermedium</b>	
IMEM (ohne Phenolrot)	500 ml

### 2.1.5.3 Lösungen und Puffer

<b>Inkubationspuffer</b>	
HEPES	14,280 g
Natriumchlorid	14,500 g
Kaliumchlorid	0,750 g
D-Glucose	2,000 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,406 g
MilliQ® Wasser	Ad 2 l

→ Bei 37°C den pH auf 7,4 einstellen, Lagerung bei 4°C

<b>Calcium-freier Puffer</b>	
Inkubationspuffer	50 ml

<b>Calciumpuffer 1,8 mM</b>
-----------------------------

Ca <sup>2+</sup> (aus einer 1 M Ca <sup>2+</sup> -Stocklösung)	90 µl
Inkubationspuffer	50 ml

<b>Serumpuffer (5% FCS + 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>)</b>	
Ca <sup>2+</sup> (aus einer 1M Ca <sup>2+</sup> -Stocklösung)	90 µl
FCS	2,5 ml
Inkubationspuffer	50 ml

<b>Mefenaminsäure-haltiger Calciumpuffer</b>	
Mefenaminsäure (aus einer 15 mM Stocklösung)	100 µl
Calciumpuffer	50 ml

<b>Mefenaminsäure- und TRAM-34 -haltiger Calciumpuffer</b>	
Mefenaminsäure (aus einer 15 mM Stocklösung)	100 µl (30 µM)
TRAM-34	100 µl (10 µM)
Calciumpuffer	50 ml

<b>Mefenaminsäure- und TRAM-34 -haltiger Serumpuffer</b>	
--	--

Mefenaminsäure (aus einer 15 mM Stocklösung)	100 µl (30 µM)
TRAM-34	100 µl (10 µM)
Serumpuffer	50 ml

<b>Mefenaminsäure- und TRAM-34 -haltiger Calcium-freier Puffer</b>	
Mefenaminsäure (aus einer 15 mM Stocklösung)	100 µl (30 µM)
TRAM-34	100 µl (10 µM)
Calcium-freier Puffer	50 ml

<b>DCEBIO-haltiger Calcium-freier Puffer</b>	
DCEBIO (aus einer 100 mM Stocklösung)	25 µl
Calcium-freier Puffer	50 ml

<b>DCEBIO-haltiger Serumpuffer</b>	
DCEBIO (aus einer 100 mM Stocklösung)	25 µl
Serumpuffer	50 ml

## 2.1.6 qRT-PCR

### 2.1.6.1 Substanzen

Substanz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
Chloroform	372978-100ML	Sigma-Aldrich
DEPC-Wasser	T143	Carl Roth GmbH
Phosphat gepufferte Lösung (DPBS)	14190-094	Gibco/Invitrogen
DNase (recombinant, RNase free)	04716728001	Roche
Ethanol absolut	32205-2.5L	Sigma-Aldrich
iQ™ SYBR® Green Supermix (SYBR® Green)	170-8882	BioRad
Iscrip™ cDNA Synthesis Kit 5x iscrip™ Reverse Transkriptase (RT)	170-8891	BioRad
Isopropanol	9866.2	Carl Roth GmbH
peqGold RNA Pure™ (peqGold)	30-1010	PeqLab

### 2.1.6.2 Lösungen und Puffer

75% Ethanol in DEPC-Wasser	
Ethanol absolute	7,5 ml
DEPC-Wasser	2,5 ml

## 2.1.6.3 Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
TRPM3	F1: AAAGCACATTTCACTCCAGAAGA R1: GGGTCCTCCTTCCACGATGA	Eurofins
TRPM3 (2)	F1: GGGGAAGTGTTTGCTGACCA R1: GCAGCTGGATTGTCTTGCCA	Eurofins
TRPM3 (alle 6 Splicevarianten)	F1: TGGGGAATTGTGGAAAACCAGG R1: GAGAACGGTGAGCTTGCTCA	Eurofins
TRPM3 (Exon 500157)	F1: CAAAGATGACATGCCCTATATGA R1: CTTTCTTTCTGGATGATTCCC	Eurofins
TRPM3 (Exon 279066)	F1: TTTGCTGGACATCTTCGGCG R1: CTCATCAGCACCACCAGCAT	Eurofins
TRPM7	F1: TGCACATACACACGAAAACGT R1: GGGGTGCTGCTGGAGGTATT	Eurofins
STIM1	F1: CGATGCCAATGGTGATGTGGA R1: TGTTTCACTGTTGGGTCATGGT	Eurofins
STIM2	F1: TGCCCTGCTCTGTATCGGAA R1: TTCTGAAGCTGTGTCTGGCA	Eurofins
Orai1	F1: GACCTCGGCTCTGCTCTCC R1: CCTGGTGGGTAGTCATGGTCT	Eurofins
cNEU (Maus)	F1: TTGCCGGAGAGCTTTGATGG R1: CGAACACTTGGAGATGCTCTGG	Eurofins
cNEU 1 (Ratte)	F1: GCCAATGCCAGCCTCTCATT R1: ACCTGGTTGTGAGCGATGAG	Eurofins

cNEU 2 (Ratte)	F1: CCTCCACCCCAGGCAGAA R1: TGAGGGTTCCCACGGATCAA	Eurofins
KCNMB1	F1: ACACGGAAGACACTCGGGAT R1: AGGCTGTCTGGTAGTTGTCCA	Eurofins
KCNMB4	F1: TGAGATCGGTTCCCAGCCAT R1: GTGCGCTGTAGGAGAACGTC	Eurofins
ER-1- $\alpha$	F1: TACCTGGAGAACGAGCCCAG R1: TGCTGGACAGTCTCTCTCGG	Eurofins
PTGS1 (= COX 1)	F1: GTGATTGTA CTGCACGGGC R1: TTCCGAAGCCAGGTCCAGAT	Eurofins
PTGS2 (=COX 2)	F1: AACAAATCCCCTTCCTGCG R1: GCACATTGTAAGTAGGTGGACTGT	Eurofins
$\beta$ -Aktin	F1: GACGGCCAGGTCATCACATAT R1: CCACAGGATTCCATACCCAAG	Eurofins

## 2.1.7 Gelelektrophorese

### 2.1.7.1 Substanzen

Substanz	Bestellnummer	Hersteller/Lieferant
2 log ladder (DNA-Längenstandard)	N3200-S	Biolabs
Agarose	840004	Biozym Scientific GmbH
Borsäure	6943.3	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	15375	Serva
Ethidiumbromid	E15010.10ml	Sigma
Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatiumsalz Dihydrat (EDTA)	8043.2	Carl Roth GmbH
Ficoll 400	CN90.3	Carl Roth GmbH
Tris	5429.3	Carl Roth GmbH
Xylencyanol	X4126	Sigma



**2.1.7.2 Lösungen und Puffer**

<b>Elektrophoresepuffer 10x TBE</b>	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA pH 8	40 ml
MilliQ® Wasser	Ad 1 l

→ Verdünnung 1:10 mit MilliQ® Wasser → 1x TBE

<b>Ladepuffer 6xDye</b>	
Ficoll	9 g
0,5 M EDTA pH 8	12 ml
10x TBE	30 ml
Bromphenolblau	1,35 ml
Xylencyanol	1,5 ml

<b>Proteinmarker</b>	
2log DNA-Ladder	20 µl
6xDye	40 µl
MilliQ® Wasser	180 µl

### 2.1.7.3 Agarosegel

Agarosegel 3%	
Agarose	9 g
1x TBE	300 ml
Ethidiumbromid	30 $\mu$ l

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Je nach Größe der Zellkulturgefäße wurden folgende Volumina des Mediums, PBS (Phosphat gepufferte Lösung) und Trypsins verwendet.

Gefäß	Volumen Medium	Volumen Trypsin
Calciummessschale	2 ml	---
Flasche 25 cm <sup>2</sup>	5 ml	1 ml
Flasche 75 cm <sup>2</sup>	15 ml	3 ml
Flasche 175 cm <sup>2</sup>	20 ml	5 ml
Petrischale 55 cm <sup>2</sup>	10 ml	2 ml

**Tabelle 2.1: Volumenangabe der verwendeten Medien und Trypsin in Abhängigkeit der Größe der Zellkulturgefäße.** Für sämtliche in der Zellkultur durchgeführten Arbeiten wurden die oben angegebenen Volumina verwendet.

### 2.2.2 Kultivierung muriner MMTV PyMT und MMTV cNeu Brusttumorzellen

Für sämtliche Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden ausschließlich Brusttumorzellen verwendet, die zuvor aus weiblichen MMTV PyMT, sowie MMTV cNeu Mäusen isoliert wurden. Diese Zellen wurden bei -80°C

kryokonserviert und bei Bedarf zur Verwendung aufgetaut und in Zellkulturgefäße überführt.

Die kryokonservierten Zellen (ca. 1.500 000/Kryogefäß) wurden hierfür für 3 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Währenddessen wurden die Zellen aufgetaut. Währenddessen wurden 10 ml des erwärmten Nährmediums in ein 15 ml fassendes konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurden mittels einer 5 ml Stripette ca. 3 ml des zuvor überführten Nährmediums aufgezogen. Im nächsten Schritt wurden die aufgetauten Zellen mit aufgezogen und in das Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden erneut ca. 0,5 ml Nährmedium aus dem Zentrifugenröhrchen mittels einer Eppendorfpipette entnommen und das Kryogefäß damit nachgespült um möglichst alle Zellen verwenden zu können. Auch dieses zellhaltige Nährmedium wurde wieder ins Zentrifugenröhrchen überführt.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1000 U/Min (Umdrehungen / Minute) zentrifugiert. Dabei bildete sich am Boden des Röhrchens ein sogenanntes Zellpellet. Unter der Sterilwerkbank wurde dann der Überstand des Mediums mit Hilfe einer Stripette abgenommen, sodass nur noch das Zellpellet mit ca. 200 µl des Mediums im Gefäß zurück blieb. In diesen 200 µl wurden die Zellen resuspendiert, indem das Röhrchen über den Gitterboden der Sterilwerkbank gezogen wurde, was die Zellen gleichmäßig im Nährmedium verteilte. Danach wurde die Suspension mit 5 ml des Nährmediums verdünnt und anschließend mit einer Stripette aufgezogen, in ein Zellkulturfläschchen (25 cm<sup>2</sup>) überführt und die Zellen wurden durch kreisende Achterbewegungen gleichmäßig im Fläschchen verteilt. Anschließend wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen gleichmäßig verteilt waren. Zum Schluss wurden die Zellkulturflaschen beschriftet und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert

Am Tag vor dem Ausbringen der Zellen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um die Zellen, welche sich bis dahin noch nicht am Boden des Gefäßes festgesetzt hatten zu entfernen. Ansonsten erfolgte ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage.

### 2.2.3 Beseitigung von Fibroblasten durch Aufreinigung mit Trypsin

Da neben den eigentlichen Tumorzellen auch Bindegewebe ein wesentlicher Bestandteil von Tumoren ist, waren auch bei den verwendeten Zellkulturen teilweise noch Fibroblasten vorhanden. Da diese im Vergleich zu den Brusttumorzellen deutlich schneller wachsen und proliferieren, behindern diese die Tumorzellen bei ihrem Wachstum. Des Weiteren verfälschen Fibroblasten die Untersuchungsergebnisse

Fibroblasten lösen sich bei einer Behandlung mit Trypsin schneller als die Brusttumorzellen, was man sich bei der Aufreinigung zunutze macht.

Zu Beginn wurde unter dem Mikroskop eine geeignete Stelle im Zellrasen ausgesucht, welche sowohl Tumorzellen als auch Fibroblasten aufwies. Diese Stelle wurde außen auf dem Zellkulturgefäß mit einem Stift markiert. Das Kulturmedium (siehe. Kapitel 2.1.3) wurde dann abgenommen und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1x Trypsin auf die Zellen gegeben. Die hierbei verwendeten Volumina sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Anschließend wurde die zuvor markierte Stelle unter dem Mikroskop beobachtet, bis sich die Fibroblasten vom Gefäßboden ablösten. Bei diesem Vorgang sollte man die Zellen nicht länger als zwei Minuten mit Trypsin inkubieren, da sich sonst auch die Brusttumorzellen vom Boden des Zellkulturgefäßes ablösen. Das 1x Trypsin wurde dann mit Kulturmedium inaktiviert und die Trypsin-Medium-Zell-Suspension abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die verbliebenen Tumorzellen erneut zwei Mal mit PBS gewaschen und frisches Zellkulturmedium im entsprechenden Volumen zugegeben. Anschließend wurden die Zellen wieder im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

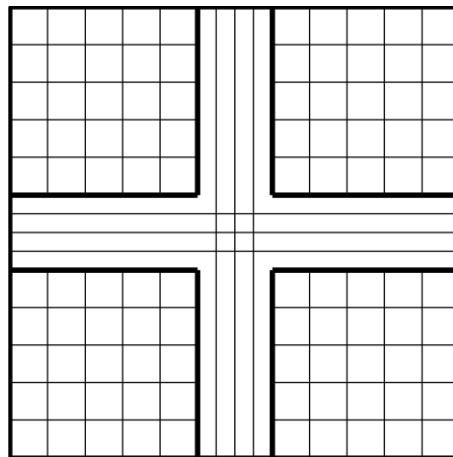
### 2.2.4 Passagieren von MMTV PyMT Brusttumorzellen

Die Sterilwerkbank sowie die benötigten Materialien wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben vorbereitet.

Zu Beginn wurde das Kulturmedium abgenommen. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. um eine Inaktivierung des Trypsins durch vorhandenes Medium zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden die Zellen im Brutschrank für 5-7 Minuten mit 1x Trypsin behandelt (Volumina siehe Tabelle

2.1), um die Zellen von Boden des Kulturgefäßes abzulösen. Danach wurde vorsichtig mit der Hand gegen das Zellkulturgefäß geklopft. Dieser zusätzliche mechanische Stress löst noch nicht vollständig gelöste Zellen vom Boden ab. Unter dem Mikroskop erfolgte nun die visuelle Kontrolle, ob noch adhärenente Zellen vorlagen. Daraufhin wurde das 1xTrypsin durch Zugabe von Kulturmedium deaktiviert und anschließend die gesamte Zell-Trypsin-Medium-Suspension mit einer Stripette abgezogen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 U/Min für fünf Minuten zentrifugiert. Das dadurch entstandene Zellpellet wurde nach Abnehmen des Überstandes in ca. 50-100  $\mu\text{l}$  resuspendiert, indem das Röhrchen mehrmals über die Gitterplatte der Sterilwerkbank gezogen wurde. Im Anschluss wurde wieder etwas Zellkulturmedium dazugegeben. Je nach Größe der Zellpellets wurden hierbei zwischen 4 und 10 ml verwendet. Im darauffolgenden Schritt wurden die Zellen durch Schwenken des Zentrifugenröhrchens gleichmäßig im Medium verteilt, bevor 10  $\mu\text{l}$  der Suspension mit einer Pipette entnommen und in eine Zählkammer pipettiert wurden, mithilfe derer die Zellen ausgezählt wurden (siehe Abbildung 2.1).

Nach Bestimmung der Zellzahl konnte die gewünschte Anzahl der Zellen pro Zellkulturgefäß ausgebracht werden (siehe Tabelle 2.2).



**Abbildung 2.1. Schematische Darstellung einer Zählkammer:** Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension werden 10  $\mu\text{l}$  der Suspension entnommen und auf eine Zählkammer aufgebracht. Anschließend werden alle Zellen in den vier Quadranten (hier dick umrandet) ausgezählt. Zellen, die auf den innenliegenden Linien (hier ganz fett dargestellt) lagen wurden mitgezählt. Zellen welche auf den äußeren Linien lagen wurden nicht berücksichtigt. Im Anschluss wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrant ermittelt. Dieser Wert entspricht der durchschnittlichen Zellzahl pro 0,1  $\mu\text{l}$ . Dadurch kann man die gesamte Zellzahl in der Zellsuspension bestimmen.

Gefäß	Zellzahl
Flasche 25 cm <sup>2</sup>	< 1.500 000
Flasche 75 cm <sup>2</sup>	1.500 000 – 3.000 000
Petrischale 55 cm <sup>2</sup>	3.000 000 – 5.000 000
Calciummessschale	Ca. 80.000
Grid-Plates	Ca. 80.000

**Tabelle 2.2:** Angabe der verwendeten Zellzahlen für die verschiedenen Zellkulturgefäße.

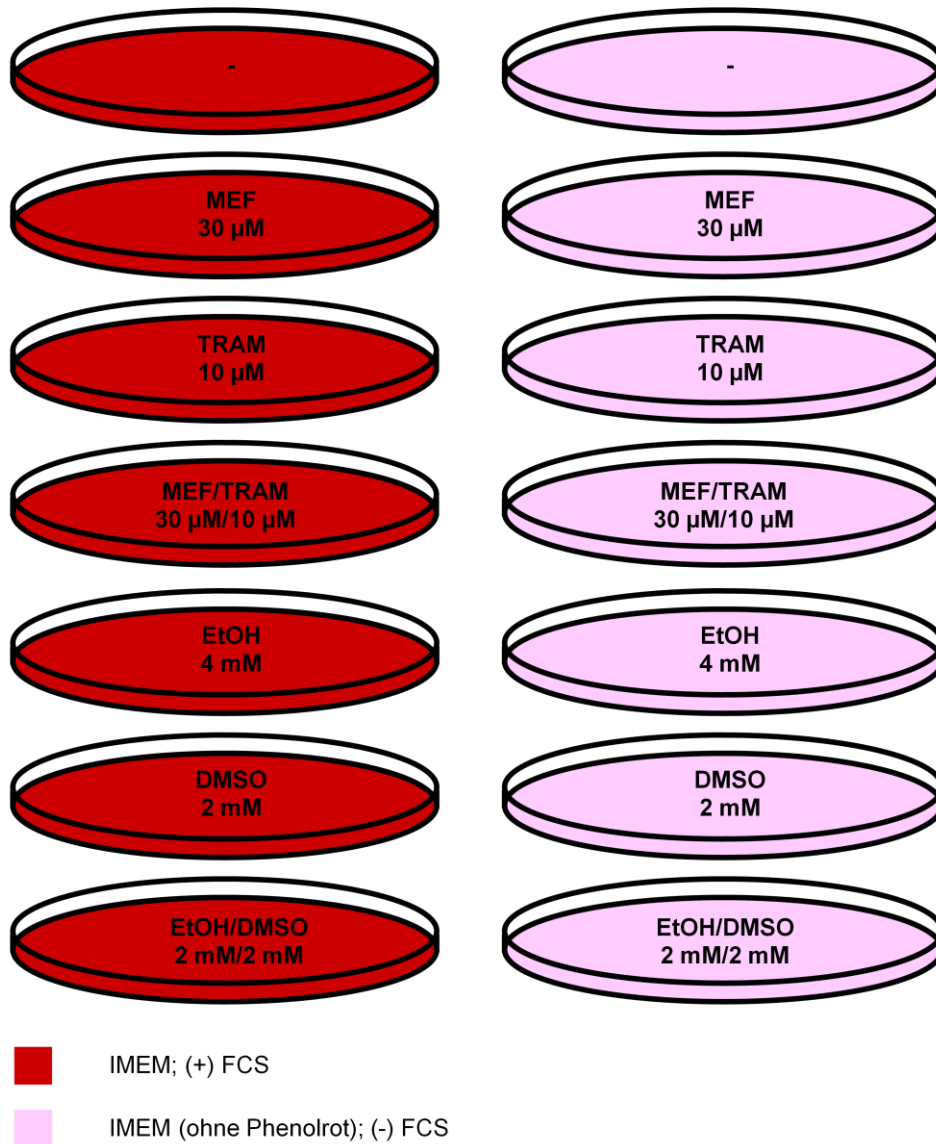
### 2.2.5 Arretierung von MMTV PyMT Brusttumorzellen

Zur Synchronisation der Zellen im Zellkulturgefäß (auch Arretierung genannt) wird den Zellen für 72 Stunden Serum entzogen, was damit auch zu einem Entzug von Wachstumsfaktoren führt. Dafür wurde den Zellen anstatt des Kulturmediums das Arretiermedium zugegeben (siehe Kapitel 2.1.3). Nach Durchführung der Synchronisation befinden sich alle Zellen im selben Stadium des Zellzyklus, was für die spätere Untersuchung von Bedeutung ist. Ohne Wachstumsfaktoren sind die Zellen nicht mehr in der Lage von der G1- in die S-Phase überzugehen [190]. Der Grund warum den Zellen für 72 Stunden das Kulturmedium entzogen wird liegt darin, dass diese Zellen etwa so lange für einen Zellzyklus benötigen. Im Vergleich dazu ist z.B. bei der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 ein Serumentzug von ca. 24 Stunden ausreichend [191].

Im ersten Schritt wurde das Zellkulturmedium abgenommen. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. In einem letzten Schritt wurde Arretiermedium (siehe Kapitel 2.1.3) auf die Zellen gegeben, welches frei von FCS und Phenolrot war. Im Anschluss wurden die Zellen für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **2.2.6 Proliferationsuntersuchungen synchronisierter MMTV PyMT Brusttumorzellen**

Um die inhibitorischen Effekte verschiedener Wirkstoffe auf die MMTV PyMT Brusttumorzellen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit sogenannte Proliferationsassays angefertigt. Diese wurden mittels sogenannter Grid Plates durchgeführt, in die Quadranten in den Gefäßböden eigearbeitet sind, welche vertikal mit Zahlen und horizontal mit Buchstaben versehen sind. Mithilfe dieser Markierungen ist es möglich sich innerhalb dieses Gefäßes zu orientieren und immer wieder dieselben Stellen wiederzufinden. Dadurch konnte über einen Zeitraum von 72 Stunden alle 24 Stunden ein Foto einer zum Zeitpunkt 0 definierten Stelle im Zellrasen angefertigt werden. Anhand dieser Fotos konnte eine Wachstumsdokumentation erstellt werden. Zu Beginn des Versuchs wurden wie unter (5.1.4) beschrieben die Zellen passagiert und anschließend pro Grid Plate je 80.000 Zellen ausgebracht. Für jeden verwendeten Kanalinhibitor wurden je zwei Schälchen pro Ansatz angelegt. Zunächst wurden die Zellen für 24 Stunden unter Zugabe von FCS im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Danach wurden die Zellen wie unter 5.1.3 beschrieben für 72 Stunden arretiert, anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen und dann mit verschiedenen Medien, entweder dem Kulturmedium oder dem Arretiermedium (siehe Kapitel 2.1.3) befüllt. Die Kanalinhibitoren wurden daraufhin nach folgendem Schema in den entsprechend angegebenen Konzentrationen hinzugegeben (siehe Abbildung 2.2).



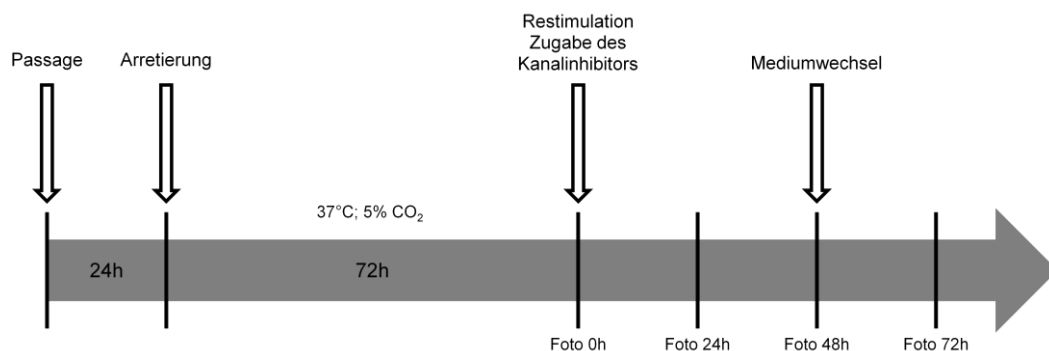
**Abbildung 2.2. Befüllungsschema und Konzentrationsangaben für die Proliferationsuntersuchungen:** Die Proliferationsuntersuchungen wurden unter den acht dargestellten Konditionen durchgeführt. Dabei steht „-“ für unbehandelte Zellen, d.h. hier wurde dem Medium kein Wirkstoff hinzugegeben. MEF = Mefenaminsäure wurde in einer Konzentration von 30  $\mu$ M zugeführt, TRAM = TRAM-34 wurde in einer Konzentration von 10  $\mu$ M verwendet. MEF/TRAM = eine Kombination aus Mefenaminsäure und TRAM-34 wurde mit einer Konzentration von 30  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M verwendet, PAX = Paxilline wurde in einer Konzentration von 2  $\mu$ M zugegeben, EtOH = Ethanol wurde in einer Konzentration von 2 mM, DMSO = Dimethylsulfoxid wurde in einer Konzentration von 2 mM und EtOH/DMSO = eine Kombination aus Ethanol und Dimethylsulfoxid mit einer Konzentration, wobei jede Substanz in einer Konzentration von 2 mM verwendet wurde.

Zum Zeitpunkt  $t_0$  (72 h nach dem Serumentzug) wurden die Zellen mit Kanalinhibitor ( $\pm$  FCS) stimuliert (siehe Abbildung 2.3). Ab diesem Zeitpunkt wurden alle 24 Stunden bis zum Zeitpunkt 72 Stunden Fotos angefertigt. Dazu



wurden zu Beginn ( $t_0$ ) pro Grid Plate zwei repräsentative Stellen innerhalb des Zellrasens ausgesucht, abfotografiert und die Stelle notiert (je Stelle ein Buchstabe und eine Zahl). Zur Orientierung diente das bereits erwähnte Raster (siehe Abschnitt 2.2.6). Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und der Wirkstoff erneuert.

Für die Auswertung der Bilder wurden alle Zellen der ausgewählten Ausschnitte zum jeweiligen Zeitpunkt gezählt. Im Anschluss wurde davon der Mittelwert gebildet (siehe Abbildungen 3.2-3.4) und die Ergebnisse in einem Balkendiagramm dargestellt.



**Abbildung 2.3. Versuchsaufbau zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von MMTV PyMT Brustumorzellen unter Zugabe verschiedener Kanalinhibitoren:** Zu Beginn wurden pro Grid Plate 80.000 Zellen ausgebracht und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch 72-stündigen Serumentzug in der G1-Phase synchronisiert. Nach Ablauf der 72 Stunden wurden die Zellen mit Serum restimuliert und ein Kanalinhibitor in definierter Konzentration hinzugegeben. Dieser Zeitpunkt wurde als Zeitpunkt  $t_0$  definiert das erste Foto angefertigt. Zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden wurden weitere Fotos gemacht. Nach 48 Stunden wurde ein Mediumwechsel sowie eine Erneuerung des Kanalinhibitors durchgeführt.

## 2.2.7 Nachweis der mRNA verschiedener Komponenten des Ca<sup>2+</sup>-Signalings mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Bei der Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) lässt sich wie auch bei der herkömmlichen Polymerase Kettenreaktion ein gewünschter DNA-Abschnitt amplifizieren. Zusätzlich wird bei der qRT-PCR allerdings auch die Menge an amplifizierter DNA bzw. cDNA gemessen. Für diese Quantifizierung bedient man sich des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR<sup>®</sup> Green [192]. Dieser Farbstoff lagert sich in die Doppelstränge der DNA ein, wodurch seine Fluoreszenz steigt (um etwa das

100-fache gegenüber herkömmlichen Farbstoffen). Dabei nimmt das Fluoreszenzsignal proportional zur DNA-Menge zu.

Die Abläufe der qPCR und die einer PCR sind vom Grundprinzip gleich. Am Anfang steht die Aufspalten (Denaturierung) der zu amplifizierenden DNA-Fragmente. Dies geschieht bei Temperaturen bis zu 98°C. Im Anschluss daran erfolgt ein abkühlen auf etwa 58°C. Bei dieser Temperatur können sich die Primer an die Einzelstränge der aufgespaltenen DNA anlagern (*annealing*). Dabei lagern sich die Vorwärtsprimer ans 3'-Ende und der Rückwärtsprimer ans 5'-Ende an. Nun erfolgt die eigentliche Amplifizierung (Polymerisation). Nach einer kurzen Initialreaktion wird die Temperatur wieder erhöht und die DNA-Stränge Denaturieren und der Zyklus fängt von vorne an.

Für die Durchführung der qPCRs musste zunächst RNA aus MMTV PyMT und MMTV cNeu Brusttumorzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben werden (siehe 2.2.7.2).

#### **2.2.7.1 RNA-Isolation aus MMTV PyMT und MMTV cNeu Brusttumorzellen**

Es wurden etwa 1.500.000 Zellen in Petrischalen (55 cm<sup>2</sup>) ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von 80-90% bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Das Fortschreiten des Zellwachstums wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Die RNA-Isolation erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion in Anlehnung an das Protokoll von Chomczynski [193], welches im hiesigen Arbeitskreis Ruth/Lukowski modifiziert und etabliert wurde. Alle diese Schritte der RNA-Isolation wurden auf Eis durchgeführt, um eine Degradation der RNA zu verhindern.

Die Zellproben wurden unter der Sterilwerkbank gewonnen. Vor der Isolation wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Dann wurden pro Schale 1000 µl PeqGOLD auf den Zellrasen pipettiert. PeqGOLD enthält u.a. Phenol, worin sich die RNA löst, sowie Guanidinisothiocyanat, einem Denaturierungsmittel, welches durch eine Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen die Zellen lysiert und dabei gleichzeitig RNAsen und andere Enzyme zerstört. Durch mehrmaliges Spülen mit PeqGOLD mittels einer Pipette wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst. Dazu wurde mit der Pipettenspitze über den Zellrasen gerieben und die Zellen somit zerstört. Die abgelösten Zellen wurden anschließend mit der Pipette abgezogen, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt

und auf Eis gelagert. Die folgenden Schritte wurden nun außerhalb der Sterilwerkbank durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden der PeqGOLD-Zellsuspension in dem Eppendorfgefäß 0,2 Volumenanteile Chloroform dazugegeben, d.h. bei einem zugeführten PeqGOLD-Volumen von 1000 µl wurden 200 µl Chloroform hinzupipettiert. Chloroform bewirkt dabei eine Phasentrennung. Danach wurde das Gefäß kurz invertiert und auf einem Rüttler gemischt. Anschließend wurden die Zellproben für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 4 °C und 13.000 U/Min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren drei Phasen innerhalb des Eppendorfgefäß erkennbar. In der obersten Phase befindet sich die gewünschte RNA, die Interphase enthält DNA und die untere Chloroformphase enthält Proteine. Die oberste RNA-haltige Phase wurde nun vorsichtig mit einer Pipette entnommen (ca. 500µl) und in ein frisches 2ml Eppendorfgefäß überführt, das ursprüngliche Eppendorfgefäß wurde verworfen. In einem weiteren Schritt wurden 0,7 Volumenanteile Isopropanol zugegeben, d.h. wenn man zuvor von der obersten Schicht ca. 500 µl entnommen hat, so muss man nun ca. 350 µl Isopropanol hinzugeben, um die RNA bei 4°C über Nacht zu fällen.

Am nächsten Tag wurde die gefällte RNA durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 13.000 U/Min sedimentiert, wodurch ein kleines milchiges Pellet entstand. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen, das Pellet wurde mit 800 µl einer 75% Ethanol-DEPC-H<sub>2</sub>O (DEPC = Diethylpyrocarbonat) Lösung gewaschen. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass sich das Pellet nach Möglichkeit nicht vom Rand des Eppendorfgefäßes löste. Anschließend wurde erneut für fünf Minuten bei 4°C und 13.000 U/Min zentrifugiert. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde anschließend noch ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur für etwa 30 Minuten getrocknet. Dazu wurde das Eppendorfgefäß mit dem darin befindlichen Pellet geöffnet und umgedreht und in einer schrägen Position auf ein Stofftuch gestellt. Dabei wurde das anfänglich milchige Pellet klar und durchsichtig.

Nach dem Trocknen wurden 53 µl DEPC-H<sub>2</sub>O pro Pellet zugegeben und dieses für 10 Minuten bei 56°C gelöst. Im Anschluss wurde die RNA-Probe mit Hilfe des

Nanophotometers P330 (Implen) bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Durch diese Messung konnten die RNA-Menge (photometrische Dichtemessung) und die Reinheit der Probe bestimmt werden. Bei der Reinheit wird der Quotient aus den Dichtemessungen bei 260nm und 280nm (260/280) gebildet. Da die RNA ihr Absorptionsmaximum bei 260nm und Proteine bei 280nm haben. D.h. hohe Werte sprechen für einen höheren Reinheitsgrad der Probe. Dabei liegt das Optimum einer DNA-Probe bei etwa 1,8 und die einer RNA-Probe bei 2,0. Die Voreinstellungen, welche am Nanophotometer vorgenommen werden, können der Tabelle 2.3 entnommen werden.

Lid Faktor	50
Verdünnungsfaktor	1.000
Hintergrund	An
Einheit	µg/µl
Faktor	40

**Tabelle 2.3: Voreinstellungen des Nanophotometer P330 (Implen) zur Bestimmung der RNA-Konzentration**

Zuerst wurde der Nullabgleich mit einer Probe durchgeführt, die aus dem Lösungsmittel DEPC-H<sub>2</sub>O bestand. Im Anschluss wurden pro RNA-Probe immer drei Messungen durchgeführt und danach der Mittelwert der RNA-Konzentration ermittelt. Für jede Messung wurde stets ein Volumen von 1 µl verwendet. Durch einen anschließenden DNase Verdau wurden potenzielle Verunreinigungen durch genomische DNA-Fragmente in der Probe abgebaut. Dazu wurde den Proben eine RNase-freie DNase (5 µl pro Ansatz) zupipettiert und die Proben wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNase durch eine 5-minütige Inkubation bei 80°C inaktiviert. Anschließend wurde in allen Proben durch die Zugabe von DEPC-H<sub>2</sub>O eine RNA-Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.7.2 Generierung der cDNA

Um eine quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion durchführen zu können musste die zuvor gewonnene mRNA (siehe 2.2.7.1) in eine sogenannte copy DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für diesen Schritt wurde das 5x Iscript™ System verwendet. Dabei wird das Iscript zusammen mit einer reversen Transkriptase (RT) und DEPC-H<sub>2</sub>O ständig auf Eis gelagert.

Um bei der späteren qPCR mögliche noch vorliegende genomische DNA-Verunreinigungen ausschließen zu können, wurde für jede Probe zusätzlich eine Negativ-Kontrolle ohne reverse Transkriptase durchgeführt, bei der kein Umschreiben der RNA in cDNA möglich ist.

Pro Kondition wurden folgende Mengen pipettiert.

	+ RT	- RT
5x Iscript™	4 µl	2 µl
RT	1 µl	---
RNA (0,1 µg/µl)	5 µl	5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	10 µl	11 µl

**Tabelle 2.4: Benötigte Mengen der Reagenzien pro Probe zur Generierung von cDNA mittels 5x Iscript™ System.** Um die cDNA herstellen zu können mussten die angegebenen Mengen der verschiedenen Substanzen in ein Eppendorf Gefäß pipettiert werden. Anschließend wurden die Proben in ein PCR-Gerät (Master-Cycler) gegeben, wo die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde. (RT = reverse Transkriptase; DEPC = Diethylenpyrocarbonat)

Für die Generierung der cDNA wurde immer ein Großansatz (Mastermix) für alle Proben hergestellt, der entsprechend der Anzahl der Proben auch ein entsprechendes Vielfaches der benötigten Reagenzien enthielt. Die RNA wurde allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt zugegeben. Für den Mastermix wurde zusätzlich zur Anzahl der Proben immer ein weiterer Ansatz als Reserve addiert. Anschließend wurden je 15 µl des Mastermixes in ein PCR-Eppendorfgefäß pipettiert, bevor 5 µl der entsprechenden RNA hinzupipettiert

und alles gut durchmischt wurde. Die in den Proben enthaltene mRNA wurde anschließend im PCR-Gerät (Master-Cycler) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde ein bereits gespeichertes Programm verwendet, welches drei verschiedene Temperatureinstellungen aufweist.

---

Anlagerungstemperatur	5 Minuten 25°C
Temperaturoptimum der reversen Transkription	30 Minuten 42°C
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	5 Minuten 85°C

---

Für jede Zellprobe lag nun eine sogenannte +RT sowie eine –RT-Probe vor. Am Schluss wurden die cDNA Proben 1:10 verdünnt, d.h. zu jeder Probe mit einem Volumen von 20 µl wurde je 180 µl DEPC-H<sub>2</sub>O zugegeben. Die Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

### 2.2.7.3 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Vor Beginn der eigentlichen quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) wurden alle Proben und verwendeten Reagenzien zunächst auf Eis aufgetaut. Bei den Reagenzien handelte es sich zum einen um SYBR-Green<sup>®</sup>. Dieser Farbstoff ermöglicht die Quantifizierung der DNA durch ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge dieser amplifizierten DNA stärker wird. Des Weiteren müssen sowohl der Vorwärts-, als auch Rückwärtsprimer aufgetaut werden, welche sich an das 3'- bzw. 5'-Ende der Einzelstränge anlagern und als Startpunkt der Elongation dienen.

Nachdem nun alle verwendeten Substanzen aufgetaut waren, wurden Großansätze für (Gen/Primer) (=Mastermix) hergestellt. Zusätzlich wurde ein Ansatz als Reserve addiert. Pro Probe wurden als technische Kontrolle je drei Ansätze der Kondition mit reverser Transkriptase (+RT) und ein Ansatz der Kondition ohne reverser Transkriptase (-RT) verwendet. Zusätzlich werden Proben für ein Referenzgen generiert. In den hier aufgeführten Versuchen wurde

$\beta$ -Aktin verwendet. Pro Ansatz wurde insgesamt ein Volumen von 20  $\mu$ l pipettiert. 18  $\mu$ l davon entfielen auf den Mastermix und 2  $\mu$ l auf die cDNA Probe. Beim Mastermix setzten sich die Volumina pro Ansatz wie folgt zusammen

DEPC-H <sub>2</sub> O	2 $\mu$ l
Vorwärtsprimer	3 $\mu$ l
Rückwärtsprimer	3 $\mu$ l
SYBR <sup>®</sup> Green	10 $\mu$ l

**Tabelle 2.5: Volumina und Reagenzien pro Ansatz, welche für die quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion benötigt werden.** (DEPC = Diethylpyrocarbonat; SYBR<sup>®</sup> Green = verwendeter Farbstoff)

Zunächst wurden für den Mastermix nur das DEPC-H<sub>2</sub>O, der Vorwärtsprimer und der Rückwärtsprimer zusammen pipettiert. Das SYBR<sup>®</sup> Green wurde erst zum Schluss hinzugegeben, um es so lange wie möglich vor Lichteinflüssen zu schützen, da dieser Farbstoff sehr lichtempfindlich ist. Nachdem das DEPC-H<sub>2</sub>O und die Primer gemischt wurden, wurden je 2  $\mu$ l der cDNA nach einem zuvor festgelegten Pipettierschema (siehe Abbildung 2.4) auf eine 96-Loch Platte (Multiplate<sup>™</sup> PCR Plates 96-well clear/ BioRad Laboratories Inc.) aufgetragen. Danach wurde den verschiedenen Mastermix die entsprechende Menge an SYBR<sup>®</sup> Green zugegeben und je 18  $\mu$ l des passenden Mastermix auf die 96-Loch Platte aufgetragen. Anschließend wurde die Platte mit einer *Microseal<sup>®</sup> B Seal* Folie abgedeckt, um sie vor Verunreinigungen zu schützen und um ein Herausschwappen der Proben zu vermeiden, in den *Opticon<sup>™</sup>, Continous Fluorescence Detector* gestellt und die qRT-PCR gestartet. Das verwendete Programm (JS template 13-4-11) benötigte dabei etwa 90 Minuten und durchlief dabei folgende Schritte.

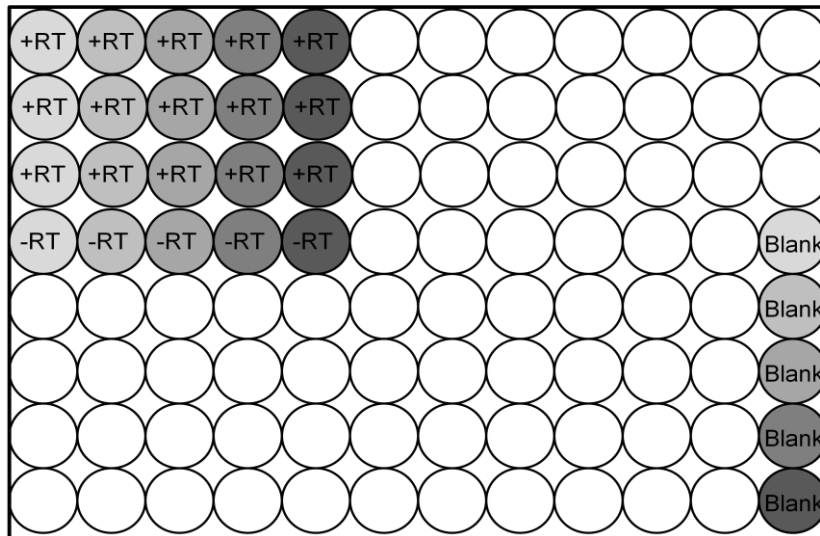
---

Initiale Denaturierung	1 Minute bei 98°C
Durchlaufen eines Zyklus	
Denaturierung	5 Sekunden 98°C
Primerhybridisierung, Elongation und Fluoreszenzquantifizierung	15 Sekunden 58°C
⇒ Dieser Zyklus wurde 40 Mal wiederholt	
Schmelzkurvenanalyse	58-95°C

---

Im Anschluss an die qRT-PCR wurde eine Gelelektrophorese mit den Proben durchgeführt um die Funktionalität der Primer zu überprüfen. Hierfür wurde ein 3%iges Agarosegel verwendet. Dazu wurden 9g Agarose abgewogen und mit 300 ml TBA-Puffer (siehe Kapitel 2.1.7) erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte und eine glasklare Flüssigkeit entstand. Anschließend ließ man das Gel auf einem Magnetrühr Tisch abkühlen, pipettierte 30 µl Ethidiumbromid hinzu und überführte es in eine Gelgießapparatur. Nach ca. 30 Minuten war das vollständig auspolymerisiert. Im nächsten Schritt wurden je 4 µl 6x Dye (siehe Kapitel 2.1.7) pro PCR-Ansatz der 96-Loch Platte hinzupipettiert. Danach wurden je 20 µl der Probe entnommen und in die Geltaschen aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Marker (siehe Kapitel 2.1.7) aufgetragen welcher zur Kontrolle von Fragmenten zwischen 0,1-1kbp (Kilobasenpaare) dient. Zu Beginn wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt. Sobald die Proben aus den Taschen in das Gel diffundiert waren, wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht. Im Anschluss konnten die einzelnen Gele unter UV-Licht (Bio Doc Analyse Biometra) detektiert und das Gel abfotografiert werden. Anhand dieser Bilder konnten die Fragmentlängen mit den erwarteten Konstrukten verglichen werden.





**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Pipettierschemas bei einer quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR).** Für alle Proben wurden je drei Ansätze mit reverser Transkriptase (+RT) und eine Kontrolle ohne reverser Transkriptase (-RT) pipettiert. Dabei wurden alle Konditionen einer Probe in vertikaler Richtung angeordnet, wie hier dargestellt. Die verschiedenen Grautöne stehen hierbei für die verschiedenen Proben. Pro Probe wurde außerdem ein sogenanntes Blank pipettiert. Hier wurde anstatt der cDNA, DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. (DEPC = Diethylpyrocarbonat)

#### 2.2.7.4 Auswertung der qRT-PCR

Um eine quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion auswerten zu können, muss der Zeitpunkt bzw. der Zyklus bestimmt werden, bei welchem die Kurve exponentiell ansteigt. Der Grund für den Anstieg ist die Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Dieses entsteht durch die Einlagerung des Farbstoffs in die kleine Furche der DNA. Mit dem Anstieg der Menge an DNA nimmt auch das Fluoreszenzsignal proportional zu. Dieser Anstieg wurde mit Hilfe des Opticon Monitor™ ermittelt. Der Zyklus ab welchem der exponentielle Anstieg der Kurve beginnt, wird auch als  $c_t$ -Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Als Referenzgen wurde wie bereits erwähnt  $\beta$ -Aktin verwendet. Um nun ein auf  $\beta$ -Aktin standardisiertes Expressionslevel des gewünschten Gens zu ermitteln wurde der  $c_t$ -Wert des  $\beta$ -Aktin vom  $c_t$ -Wert des gesuchten Gens abgezogen woraus sich der  $\Delta c_t$ -Wert ergibt. Da die DNA-Menge während der Messung exponentiell zunimmt, muss der negative  $\Delta c_t$ -Wert mit 2 potenziert werden, um nun das auf  $\beta$ -Aktin standardisierte DNA-Expressionslevel zu erhalten. Die DNA-Expression kann dann als relativer, auf  $\beta$ -Aktin bezogener Wert angegeben werden.

### 2.2.8 Messung intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten mittels $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging

Wie bereits erwähnt spielt  $\text{Ca}^{2+}$  als Signalmolekül bei vielen physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Zelldifferenzierung, dem Durchschreiten des Zellzyklus, der Proliferation und der Apoptose eine wichtige Rolle [85, 86]. Daher ist  $\text{Ca}^{2+}$  auch bei der Untersuchung von beispielsweise Brusttumoren ein wichtiges Werkzeug.

Zur Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Apparaturen wurden die Zellen wie in 5.1.4. beschrieben passagiert und ausgezählt. Anschließend wurden pro Calciummessschale etwa 80.000 Zellen ausgebracht. Dazu wurde die Zellsuspension mit dem Kulturmedium soweit verdünnt, dass 1 ml der Suspension etwa 80.000 Zellen enthielt. Dann wurde 1 ml des Kulturmediums in die Messschälchen vorgelegt und anschließend 1 ml der Zellsuspension pro Schälchen dazugegeben und anschließend wurde das Schälchen geschwenkt. Nun wurden die Zellen bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank kultiviert.

Zur Messung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  wurde die Substanz Fura-2-Acetoxymethylester (FURA-2-AM) verwendet. Dabei handelt es sich um eine fluoreszierende, lipophile Substanz, welche durch passive Diffusion in die Zelle gelangt. Dort spalten endogene Esterasen die Esterbindungen, wodurch FURA-2-AM aktiviert und gleichzeitig an einer Diffusion aus der Zelle hinaus gehindert wird. Das aktivierte Fura besitzt nun die Fähigkeit  $\text{Ca}^{2+}$  zu komplexieren, wodurch sich die Fluoreszenzeigenschaften von Fura ändern. Während das mit  $\text{Ca}^{2+}$  gesättigte Fura von Licht mit einer Wellenlänge 340nm angeregt wird, geschieht dies bei ungesättigtem Fura durch Licht der Wellenlänge 380nm. Anhand der Veränderung des Fluoreszenzverhältnisses 340/380 kann so der relative intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel bzw. dessen Veränderungen untersucht werden. Dabei werden die Zellen unter einem Mikroskop (Mikroskop, Axiovert S 100; Carl Zeiss) alle zwei Sekunden mit einer Lampe (Ludl Electronic Products Ltd) belichtet und mit Hilfe einer Kamera (Visitron Systems) wird dabei das Fluoreszenzsignal aufgenommen. Die Auswertung der Fluoreszenzverhältnisse erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ (Wayne Rasband).

### 2.2.8.1 Akute $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten synchronisierter MMTV PyMT Brusttumorzellen

Die Zellen wurden wie in 5.1.3 beschrieben ausgebracht und anschließend für 72 Stunden arretiert (siehe 2.1.3.4) um die Zellen zu synchronisieren. Zu Beginn der Messung befanden sich folglich alle Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus.

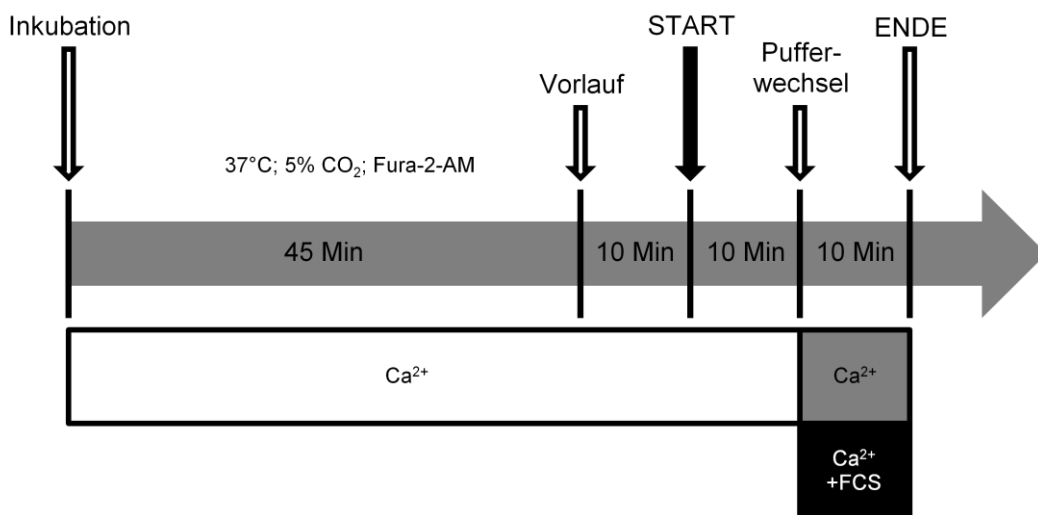
In den folgenden Versuchsanordnungen sollte nun das Ausmaß des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx unter Zugabe verschiedener Wirkstoffe untersucht werden. Zum einen sollte die Kombination aus Mefenaminsäure, einem selektiven TRPM3-Inhibitor und TRAM-34, einem spezifischen SK4-Kanal-Inhibitor getestet werden. In den Vorarbeiten wurden bereits einige Versuche dazu durchgeführt (siehe 2.2-2.6). Versuche mit dem SK4-Kanal Aktivator DCEBIO (5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one) sollten schließlich Aufschluss über die aktivitätsabhängige Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase durch SK4 bringen. Auch der COX-Inhibitor (Cyclooxygenase) und Diclofenac wurden im Rahmen dieser Versuche eingesetzt. Hierdurch sollten sich letztlich die potentiellen Effekte von Mefenaminsäure auf  $\text{Ca}^{2+}$  und COX abschätzen lassen. Die Substanzen wurden jeweils dem Calcium- und Serumhaltigen Puffer (siehe 2.1.5) zugegeben. Als Kontrolle wurden ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Puffer (siehe 2.1.5) und ein  $\text{Ca}^{2+}$ - und Serumhaltiger Puffer verwendet.

Nach dem 72-stündigen Serumentzug wurden die Zellen einmal mit 2ml  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Inkubationspuffer (siehe 2.1.5.1) gewaschen. Danach wurde 1ml des Inkubationspuffers in die Messschale pipettiert und 2,5  $\mu\text{l}$  FURA-2-AM hinzugegeben. Dies wurde bei möglichst dunklen Lichtverhältnissen durchgeführt, um FURA-2-AM vor Lichteinflüssen zu schützen. Anschließend wurden die Zellen für 45 Minuten bei 37°C und 6%  $\text{CO}_2$  in den Brutschrank gestellt, damit FURA-2-AM in die Zellen diffundieren konnte. Danach wurden die Calciummessschalen in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messapparatur eingespannt. Das Messsystem ermöglicht es den Zellen, kontinuierlich verschiedene Puffer zuzuführen, wobei gleichzeitig überschüssige Flüssigkeit durch einen Mini-Sauger entfernt wurde.

Zu Beginn wurde den Zellen für 10 Minuten  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Puffer zugeführt. Während der ersten 10 Minuten fanden allerdings noch keine Messungen statt, sie dienen lediglich dazu, überschüssiges FURA-2-AM, das zu diesem Zeitpunkt

noch nicht in die Zellen eingedrungen war, zu beseitigen, um eine Verfälschung der Messergebnisse durch ungebundenes Fura zu verhindern. Nach Ablauf der zehnminütigen Vorlaufzeit wurden die Messungen gestartet.

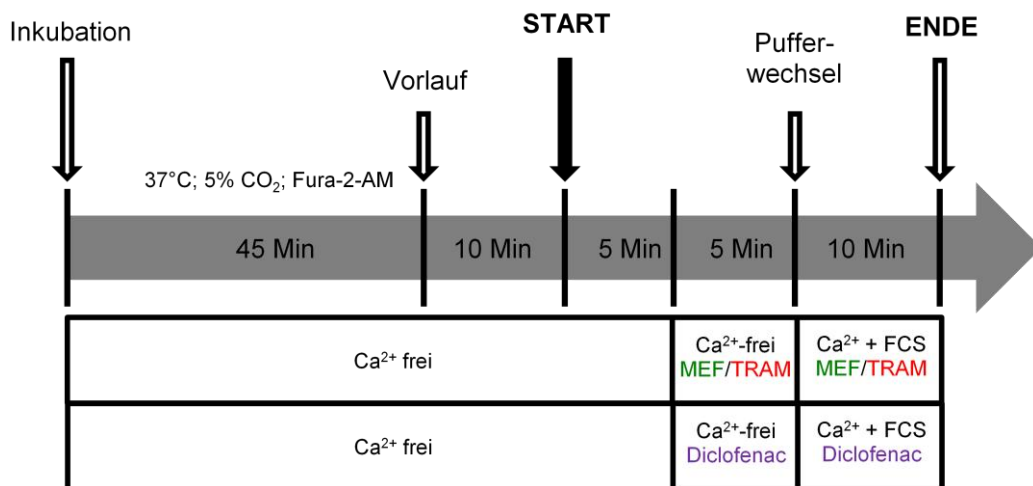
In den ersten zehn Minuten der Messung wurde bei den Kontrollmessungen grundsätzlich  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Puffer verwendet. In der ersten Kontrollmessung wurde dieser durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer ersetzt, in einer zweiten Kontrollmessung wurde ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Serumpuffer verwendet (siehe Abbildung 2.5) Dabei dienen die Kontrollmessungen bei der Auswertung dazu, die Ergebnisse vergleichen zu können. An jedem Versuchstag wurden beide Kontrollmessungen mindestens einmal durchgeführt.



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Ablaufes der Kontrollversuche.** Nachdem die Zellen für 24 Stunden kultiviert und danach für 72 Stunden mittels Serumentzug arretiert wurden, erfolgte die Inkubation der Zellen für 45 Minuten mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer und FURA-2-AM. Anschließend wurden die Zellen in die Messapparatur eingespannt und für weitere zehn Minuten mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer inkubiert, um überschüssiges FURA-2-AM, welches nicht in die Zellen gelangt war zu entfernen und somit einer Verfälschung der Ergebnisse vorzubeugen. Danach wurde die Messung begonnen. Während der ersten zehn Minuten wurden die Zellen weiterhin mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer versorgt. Im Anschluss wurde den Zellen für weitere zehn Minuten ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Puffer (grau) bzw. ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Serumpuffer (schwarz) zugeführt. Die Messungen endeten nach 20 Minuten. Die Auswertung erfolgte mittels der Software ImageJ (Wayne Rasband). (FURA-2-AM = Fura-2-Acetoxy-methylester)

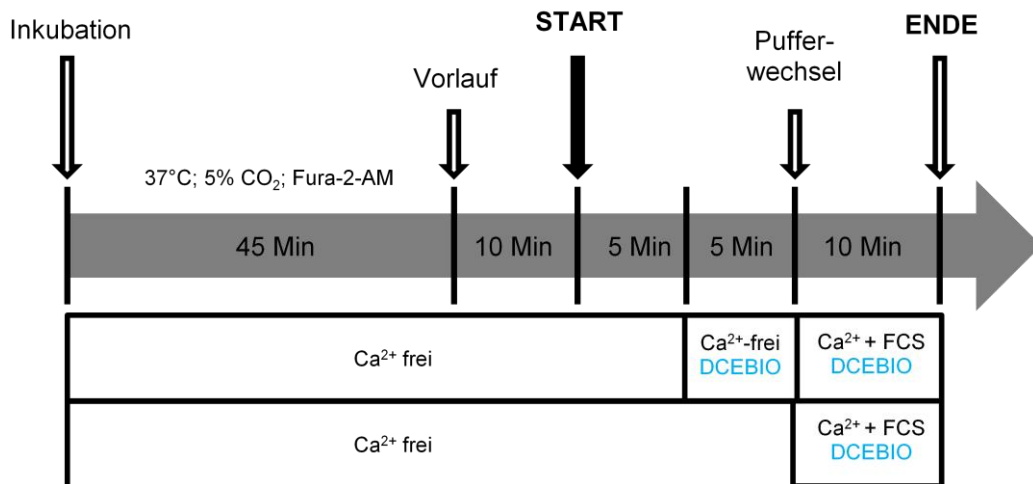
Bei den Untersuchungen der akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Zugabe der Substanzen Mefenaminsäure (30  $\mu\text{M}$ ) [166] und TRAM-34 (10  $\mu\text{M}$ ) [71] in Kombination und Diclofenac (0,2  $\mu\text{M}$ ) [194] wurde der Versuchsaufbau modifiziert (siehe Abbildung 2.6). Es wurde nach der 10-minütigen Vorlaufzeit nur eine fünfminütige Durchspülung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer durchgeführt. Anschließend

wurde dieser durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer ersetzt welcher die Wirkstoffe MEF und TRAM-34 bzw. Diclofenac enthielt. Nach weiteren fünf Minuten fand ein erneuter Pufferwechsel auf  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer mit einer Kombination aus MEF/TRAM-34 bzw. Calcium-haltigen Serumpuffer mit Diclofenac statt (siehe Abbildung 2.6).



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zu den akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen unter Zugabe von MEF/TRAM-34 bzw. Diclofenac.** Nachdem die Zellen für 24 Stunden kultiviert und danach für 72 Stunden arretiert wurden, erfolgte die Inkubation der Zellen für 45 Minuten mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer und FURA-2-AM. Anschließend wurden die Zellen in die Messapparatur eingespannt und für weitere zehn Minuten mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer durchgespült. Durch diese Vorlaufzeit wurde FURA-2-AM, welches nicht in die Zellen gelangt war entfernt um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Nach Ablauf dieser zehn Minuten wurden die Messungen gestartet. In den ersten fünf Minuten der Messungen wurden die Zellen weiterhin mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer behandelt. Daraufhin wurde den Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Puffer unter Zusatz einer Kombination aus Mefenaminsäure (MEF) 30  $\mu\text{M}$  und TRAM-34 10  $\mu\text{M}$  bzw. Diclofenac 0,2  $\mu\text{M}$  zugeführt. Nach der fünfminütigen Serinkubation mit MEF/TRAM-34 wurde für weitere zehn Minuten auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer unter Zusatz von MEF 30  $\mu\text{M}$  und TRAM-34 10  $\mu\text{M}$  bzw. Diclofenac 0,2  $\mu\text{M}$ . Auch hier wurden die Messungen nach 20 Minuten beendet. Die Auswertung erfolgte mittels der Software ImageJ (MEF = Mefenaminsäure; TRAM-34 = 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol; FURA-2-AM = Fura-2-Acetoxymethylester)

Für die Untersuchungen der akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Zugabe des SK4-Kanal-Aktivators DCEBIO (5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one) wurden zwei verschiedene Setups verwendet (siehe Abbildung 2.7). Beim ersten Setup wurde analog zu den zuvor beschriebenen Messungen mit DCEBIO in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer für fünf Minuten superfundiert. Danach wurde ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Serumpuffer unter Zugabe von DCEBIO verwendet. Im zweiten Setup wurde DCEBIO erst nach 10 Minuten in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer hinzugegeben.



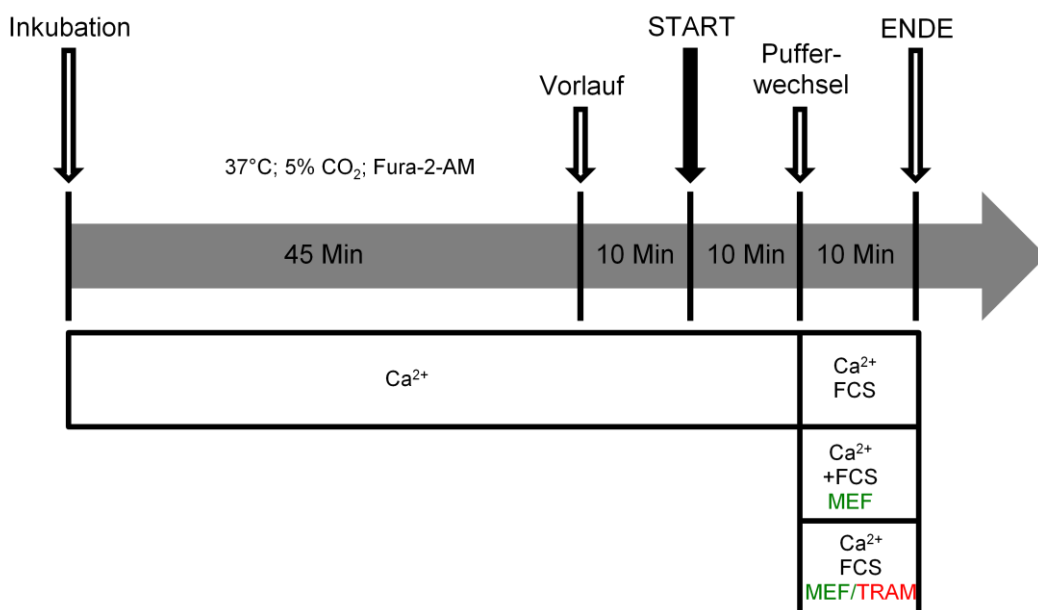
**Abbildung 2.7:** Schematische Darstellung der verwendeten Versuchsaufbauten zu den Untersuchungen der akuten Ca<sup>2+</sup>-Transienten unter Zugabe des SK4-Kanal Aktivators DCEBIO. Nachdem die Zellen für 24 Stunden kultiviert und danach für 72 Stunden arretiert wurden, erfolgte die Inkubation der Zellen für 45 Minuten mit Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer und FURA-2-AM. Anschließend wurden die Zellen in die Messapparatur eingespannt und für weitere zehn Minuten mit Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer durchgespült. Durch diese Vorlaufzeit wurde Fura, welches nicht in die Zellen gelangt, weggespült, um die Messungen nicht zu verfälschen. Nach Ablauf dieser zehn Minuten wurde die Messung gestartet. Im ersten Setup wurde in den ersten fünf Minuten der Messungen die Zellen weiterhin mit Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer versorgt. Nach Ablauf dieser fünf Minuten wurde den Zellen dann ein Ca<sup>2+</sup>-freier Puffer unter Zugabe von DCEBIO in einer Konzentration von 50 µM zugeführt. Nach der fünfminütigen Vorinkubation mit DCEBIO wurde für weitere zehn Minuten auf den letzten Puffer gewechselt. Dabei handelte es sich um einen Ca<sup>2+</sup>-haltigen Serumpuffer unter Zugabe von DCEBIO 50 µM. Beim zweiten Setup entfiel die fünfminütige Vorinkubation mit DCEBIO. Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ (SK4-Kanal = Ca<sup>2+</sup>-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; DCEBIO = (5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one); FURA-2-AM = Fura-2-Acetoxymethylester)

### 2.2.8.2 Spontane Ca<sup>2+</sup>-Transienten nicht synchronisierter MMTV PyMT Brusttumorzellen

Da sich in einem Tumor bzw. einem Gewebe nie alle Zellen im selben Stadium des Zellzyklus befinden, ist die Messung der akuten Ca<sup>2+</sup>-Transienten eher unphysiologisch. Im weiteren Verlauf wurden daher auch Messungen an nicht synchronisierten MMTV PyMT Brusttumorzellen durchgeführt.

Die Messung der spontanen Ca<sup>2+</sup>-Transienten mittels FURA-2-AM erfolgte in nicht synchronisierten Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten d.h. 24,48 und 72 Stunden nach Ausbringung der Zellen. Das bedeutet, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Messungen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befanden. Aufgrund dessen war im Vergleich zu den synchronisierten Zellen die prozentuale Ausbeute an oszillierenden Zellen deutlich geringer.

Wie schon bei der Untersuchung der akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurden auch diese Zellen bei der Untersuchung der spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten 45 Minuten vor Beginn der Messung mit FURA-2-AM inkubiert. Im Gegensatz zu den akuten Transienten wurde jedoch anstatt des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffers ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Puffer (siehe 2.1.5.1) verwendet, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher der Zellen aufzufüllen. Nach 45-minütiger Inkubation wurde auch hier die Schale mit den Zellen in die Messapparatur eingespannt. Anschließend fand eine zehnmünütige Vorinkubation mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer statt, in welcher das überschüssige FURA-2-AM entfernt wurde. Nach zehn Minuten wurde die Messung gestartet und die Zellen wurden für weitere zehn Minuten mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer inkubiert. Fanden innerhalb der ersten zehn Minuten der Messung Oszillationen statt, so wurde nach Ablauf dieser zehn Minuten der Puffer gewechselt. Dabei wurden insgesamt drei verschiedene Versuchsaufbauten verwendet (Abbildung 2.8). In einem ersten Setup wurden die Zellen mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer welcher MEF in einer Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  enthielt behandelt. Die zweite Kondition beinhaltete  $\text{Ca}^{2+}$  haltigen Puffer mit einer Kombination aus MEF ( $30 \mu\text{M}$ ) und TRAM-34 ( $10 \mu\text{M}$ ). Der dritte Aufbau diente als Kontroll- bzw.- Referenzuntersuchung. Dabei blieben die Zellen unbehandelt, das heißt über die gesamte Messung von 20 Minuten wurde den Zellen lediglich  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Puffer ohne jeglichen Zusatz zugeführt.



**Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsaufbauten zur Untersuchung der spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten.** Nachdem die Zellen für 24, 48 bzw.

72 Stunden kultiviert worden waren, erfolgte die Inkubation der Zellen für 45 Minuten mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer und FURA-2-AM. Danach wurden die Zellen in die Messapparatur eingespannt und für weitere zehn Minuten mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer behandelt. Durch diese Vorlaufzeit konnte Fura, welches nicht in die Zellen gelangt war weggespült werden, um die Messungen nicht zu verfälschen. Anschließend wurden die Messungen gestartet. Während der ersten zehn Minuten wurden die Zellen weiterhin mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer behandelt. Traten innerhalb der ersten zehn Minuten der Messung Oszillationen auf, so wurde danach der Puffer gewechselt. In einer ersten Versuchsreihe wurde den Zellen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer MEF (30  $\mu\text{M}$ ) zugeführt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde eine Kombination aus MEF (30  $\mu\text{M}$ ) und TRAM-34 (10  $\mu\text{M}$ ) verwendet. In einer letzten Versuchsreihe blieben die Zellen unbehandelt, d.h. den Zellen wurde lediglich ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Puffer zugeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ. (FURA-2-AM = Fura-2-Acetoxymethylester; MEF = Mefenaminsäure; TRAM-34 = 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol)



## 3 Ergebnisse

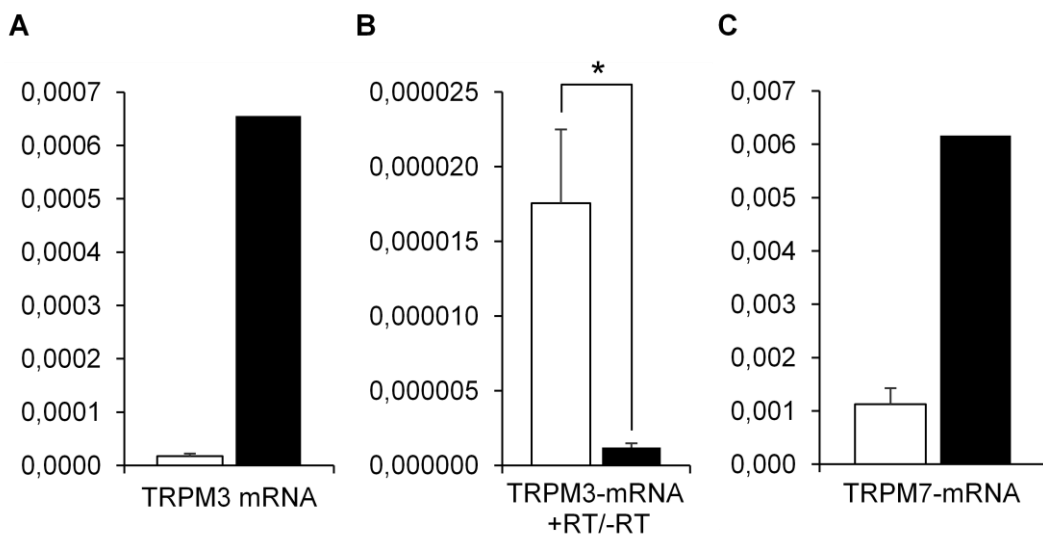
### 3.1 Nachweis von TRPM3 und TRPM7 mRNA-Expression in MMTV PyMT Brusttumorzellen sowie Brusttumorgewebe mittels qPCR

Wie in Kapitel 1.6.3 erwähnt, konnte die mRNA des TRPM3-Kanals mittels der Nanostring Methode bereits in MMTV PyMT Brusttumorgewebe nachgewiesen werden. Da die Versuche im Rahmen dieser Dissertation jedoch hauptsächlich mit MMTV PyMT Primärzellkulturen durchgeführt wurden, sollte die TRPM3 mRNA Expression in diesen Zellen zunächst überprüft werden. Dabei sollten auch die für das Tumorgewebe mittels Nanostring-Methode erhobenen Ergebnisse mittels qRT-PCR bestätigt werden. (siehe Kapitel 2.2.7).

Da keine TRPM3-Knockoutmäuse und somit auch keine entsprechenden Knockoutreferenzgewebe als Kontrolle nicht zur Verfügung standen, wurde die mRNA Expression lediglich in Relation zu einem Referenzgen,  $\beta$ -Aktin bestimmt.

Die mRNA Analyse mittels qPCR zeigt eine deutliche mRNA-Expression von TRPM3-Kanälen mit einem relativen Wert von 0,00065 (siehe Abbildung 3.1 A schwarzer Balken) in MMTV PyMT Brusttumorgewebe und bestätigt somit die durch die Nanostring-Methode bestimmten Level. Auch in MMTV PyMT Brusttumorzellen konnte TRPM3 mRNA detektiert werden (siehe Abbildung 3.1 A weißer Balken) allerdings lag diese Expression mit einem Wert von 0,000018 deutlich unter dem Level im Brusttumorgewebe. Die Expressionswerte der Gewebe lagen etwa um den Faktor 30 höher (siehe Abbildung 3.1 A). Um auszuschließen, dass es sich bei den niedrigen Expressionslevel in den Tumorzellen nicht um Artefakte handelte, wurden die bestimmten Werte mit Proben aus den Tumorzellen verglichen, welche ohne Zusatz der reversen Transkriptase (-RT) generiert worden waren. Diese -RT Werte sollten erwartungsgemäß deutlich niedriger liegen. Wie Abbildung 3.1 C zeigt, lag der Wert der Proben die unter Zugabe von reverser Transkriptase generiert wurden (Abbildung 3.1 C weißer Balken) über dem Level der -RT-Proben (Abbildung 3.1 C schwarzer Balken). MMTV PyMT Brusttumorzellen exprimieren also TRPM3 mRNA, wenn auch in einem deutlich geringeren Ausmaß wie die MMTV PyMT Brusttumorgewebe.

Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse bezüglich des TRPM3, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, in welcher die gleichen Untersuchungen der mRNA-Expression bezüglich des TRPM7-Kanals gemacht wurden. Damit sollte überprüft werden, ob TRPM-Kanäle generell in Tumorgewebe stärker exprimiert werden oder ob dieses Phänomen speziell auf den TRPM3-Kanal zutrifft. Die Ergebnisse zeigen, dass auch TRPM7-mRNA im Gewebe stärker als in den Zellen exprimiert wird, wenngleich, der Unterschied mit einem Faktor 6 deutlich niedriger ist, als für den TRPM3-Kanal. Außerdem zeigte die Auswertung, dass die Expression des TRPM7 im Vergleich zum TRPM3 in den Zellen um das etwa 40-fache und in den Geweben um das etwa 10-fache höher ist (Siehe Abbildung 3.1 B). Des Weiteren lassen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss zu, dass die mRNA-Expression der Mitglieder der TRPM-Unterfamilie im MMTV PyMT Brusttumorgewebe, im Vergleich zu den MMTV PyMT Tumorzellen wohl generell höher ausfällt.



**Abbildung 3.1: Nachweis der mRNA Expression des TRPM3-, sowie des TRPM7-Kanals in MMTV PyMT Brusttumorzellen und Brusttumorgewebe.** Mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qPCR) konnten mRNA-Expressionen für den TRPM3-Kanal und den TRPM7-Kanal, sowohl in MMTV PyMT Brusttumorzellen, als auch in MMTV PyMT Brusttumorgewebe nachgewiesen werden. Als Referenzgen diente  $\beta$ -Aktin. Abbildung (A) zeigt die Expression des TRPM3-Kanals in MMTV PyMT Brusttumorzellen (weiß) und Brusttumorgewebe (schwarz). Im Vergleich zu den Zellen ist die mRNA-Expression in den Geweben um etwa das 30-fache höher. Aufgrund dieser vergleichsweise geringen Expression, wurde die TRPM3 mRNA der Brusttumorzellproben mit Reverser Transkriptase (+RT) (weiß) und ohne Reverser Transkriptase (-RT) (schwarz) verglichen. (B) Anhand dieser Abbildung lässt sich deutlich erkennen, dass die TRPM3-Expression in den +RT Proben verglichen mit den -RT Proben sehr viel höher ausfällt, was auf eine geringe aber funktional möglicherweise bedeutende TRPM3 mRNA-Expression in den MMTV PyMT Brusttumorzellen hindeutet. In Abbildung (C) wurde derselbe Nachweis wie in Abbildung A für den TRPM7-Kanal durchgeführt. Auch hier wurden Brusttumorzellen (weiß) und das Brusttumorgewebe

(schwarz) verglichen. Wie auch schon beim TRPM3-Kanal fällt hier auch beim TRPM7-Kanal die mRNA-Expression im Gewebe im Vergleich zu den Zellen deutlich höher aus, wenn auch nicht ganz so ausgeprägt. Zusammengenommen lässt sich feststellen, dass die mRNA-Expressionen des TRPM7 verglichen mit dem TRPM3 in den Zellen um etwa das 40-fache und in den Geweben um etwa das 10-fache erhöht ist (*MMTV = Mouse Mammary Tumor Virus; PyMT = Polynomavirus Middle T Antigen; TRPM = Transient Receptor Potential Melastatin*).

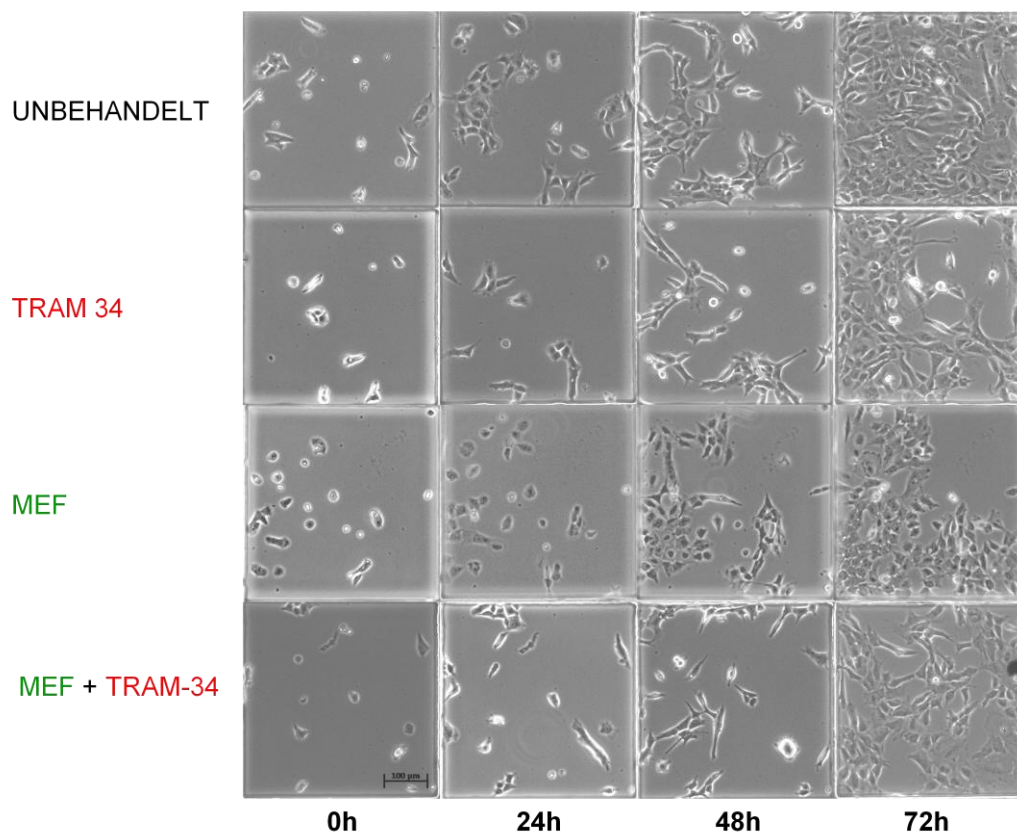
### **3.2 Proliferationsverhalten von MMTV PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition von SK4- und TRPM3-Kanälen**

Nachdem in den vorangegangenen mRNA-Expressionsuntersuchungen in MMTV PyMT Brusttumorzellen und Brusttumorgewebe sowohl der SK4 (siehe Kapitel 1.6.3) als auch der TRPM3 (siehe Kapitel 3.1) nachgewiesen werden konnten, sollten diese molekularen Befunde durch funktionale Experimente ergänzt werden. Hierfür wurden die pharmakologischen Effekte der SK4 bzw. TRPM3 Inhibitoren TRAM-34 und Mefenaminsäure auf die Proliferation von primären MMTV PyMT Brusttumorzellen untersucht.

Für diese Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Versuchsanordnungen gewählt. Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben ausgebracht. Nach 24-stündiger Kultivierung und 72-stündigem Serumentzug wurde die Hälfte der Zellen mit FCS-haltigem Kulturmedium (siehe Kapitel 2.1.3) restimuliert, die andere Hälfte der Zellen wurde weiterhin im Arretiermedium kultiviert. Dabei wurden die Zellen teilweise mit den zuvor beschriebenen Kanalinhhibitoren behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (siehe Abbildung 2.2) Ab dem Zeitpunkt der Restimulation (entspricht Zeitpunkt  $t_0$  Stunden) wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden alle 24 Stunden Fotos von den zuvor dokumentierten Stellen gemacht und dadurch das Wachstum dokumentiert. Die Stellen ließen sich anhand einer auf den Grid Plates aufgebrachte Skala zu jedem Zeitpunkt exakt wiederfinden (siehe Methoden 2.2.6).

Die restimulierten und unbehandelten Zellen wiesen ein ungehindertes Wachstum auf, welches lediglich durch das Platzangebot limitiert wurde. Die pharmakologische Inhibition des SK4-Kanals mit TRAM-34 resultierte dabei einer stark verminderten Proliferation der MMTV PyMT Brusttumorzellen. Dabei war das Wachstum zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant reduziert (siehe Abbildung 3.2 und 3.3). Auch

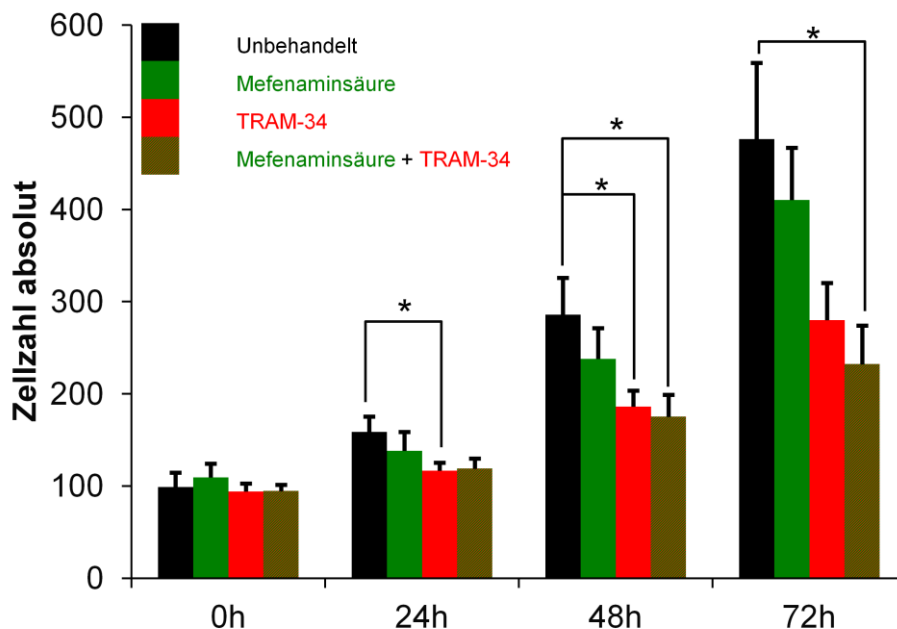
die mit MEF behandelten Zellen wiesen ein vermindertes Zellwachstum auf, welches jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant reduziert war (siehe Abbildung 3.3). Eine Kombinationstherapie aus MEF und TRAM-34 zeigte wiederum im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ein signifikant reduziertes Wachstum. Des Weiteren wies die Kombinationstherapie auch eine geringere Proliferation im Vergleich zur alleinigen Therapie mit TRAM-34 auf, jedoch waren diese Unterschiede ebenfalls zu keinem der dokumentierten Zeitpunkte signifikant (Siehe Abbildung 3.2 und 3.3).



**Abbildung 3.2: Proliferationsverhalten von MMTV PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition mit TRAM-34 und Mefenaminsäure.** Nach 72-stündigem Serumentzug wurden die Zellen mit TRAM-34 10µM (siehe 2.2.6), MEF 30µM (siehe 2.2.6), sowie einer Kombination aus TRAM-34 10µM und MEF 30 µM über einen Zeitraum von 72 Stunden behandelt. Dabei wurde das Wachstum alle 24 Stunden dokumentiert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Bei den hier gezeigten Bildern handelt es sich um repräsentative Ausschnitte aus sechs Experimenten. Das erste Bild wurde zum Zeitpunkt 0h kurz vor der Restimulation mit FCS aufgenommen (=  $t_0$ ). Die Aufnahme der weiteren Bilder erfolgte alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 72 Stunden. Bei den unbehandelten Zellen (1. Reihe) konnte eine stetige Proliferation beobachtet werden, wobei die limitierenden Faktoren das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren (Medium) sowie ausreichende Platzverhältnisse waren. Die pharmakologische Inhibition des SK4-Kanals mit TRAM-34 zu den Zeitpunkten 24- bzw. 48 Stunden führte zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation (2. Reihe). Eine nicht signifikante Wachstumsreduktion lässt sich auch durch die Blockade des TRPM3-

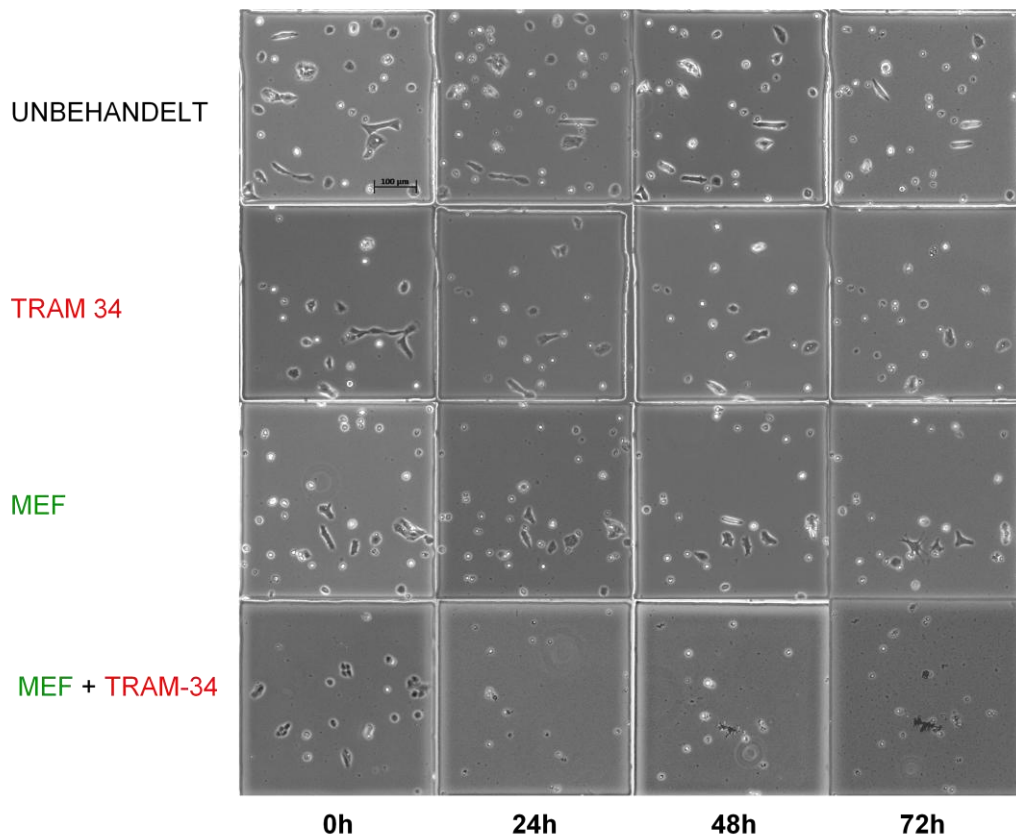
Kanals mit Mefenaminsäure erzielen Die Kombinationsbehandlung aus MEF und TRAM-34 zeigt im Vergleich zur alleinigen Applikation von TRAM-34 einen stärkeren Effekt, wobei die kombinierte Anwendung dieser Substanzen nicht das statistische Signifikanzniveau erreichte. (Reihe 4). (MMTV = *Mouse Mammary Tumor Virus*; PyMT = *Polynomavirus Middle T Antigen*; SK4-Kanal =  $Ca^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit TRPM = *Transient Receptor Potential Melastatin*; MEF = Mefenaminsäure; TRAM-34 = 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol).

Zur besseren Darstellung wurden die in Abbildung 3.2 repräsentativ dargestellten Versuche wiederholt (n=6) und die gesammelten Daten wurden zur Mittelwertbestimmung zusammengefasst. Dies Darstellung der Mittelwerte und Standartabweichungen gibt dabei Auskunft über die durchschnittliche Zellzahl pro Zeitpunkt und Behandlung (siehe Abbildung 3.3)



**Abbildung 3.3: Proliferationsuntersuchungen von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Zugabe von Mefenaminsäure und TRAM-34.** Gezeigt sind die durchschnittlichen Zellzahlen pro Ansatz und Versuch (n=6). Die Analyse der Zellzahlen ergab, dass eine Blockade des TRPM3-Kanals mit 30  $\mu$ M Mefenaminsäure (grüne Balken) zwar eine Wachstumshemmung der MMTV PyMT Brusttumorzellen verursacht, diese jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant ist. Eine Inhibition des SK4-Kanals mit 10  $\mu$ M TRAM-34 hingegen weist nach 24- und 48-stündiger Kultivierungszeit eine signifikante Proliferationshemmung auf (rote Balken), nach 72 Stunden lag der p-Wert bei 0,0589. Bei der Kombinationstherapie aus MEF und TRAM-34 (grün-rot gestreifte Balken) konnte nach 48- und 72-stündiger Kultivierungszeit eine signifikante Proliferationshemmung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erzielt werden. (MMTV = *Mouse Mammary Tumor Virus*; PyMT = *Polynomavirus Middle T Antigen*; SK4-Kanal =  $Ca^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit TRPM = *Transient Receptor Potential Melastatin*; MEF = Mefenaminsäure; TRAM-34 = 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol).

Die Auswertung dieser Versuchsreihen zeigt, dass anhaltender Entzug von Wachstumsfaktoren erwartungsgemäß zur Proliferationshemmung führt.



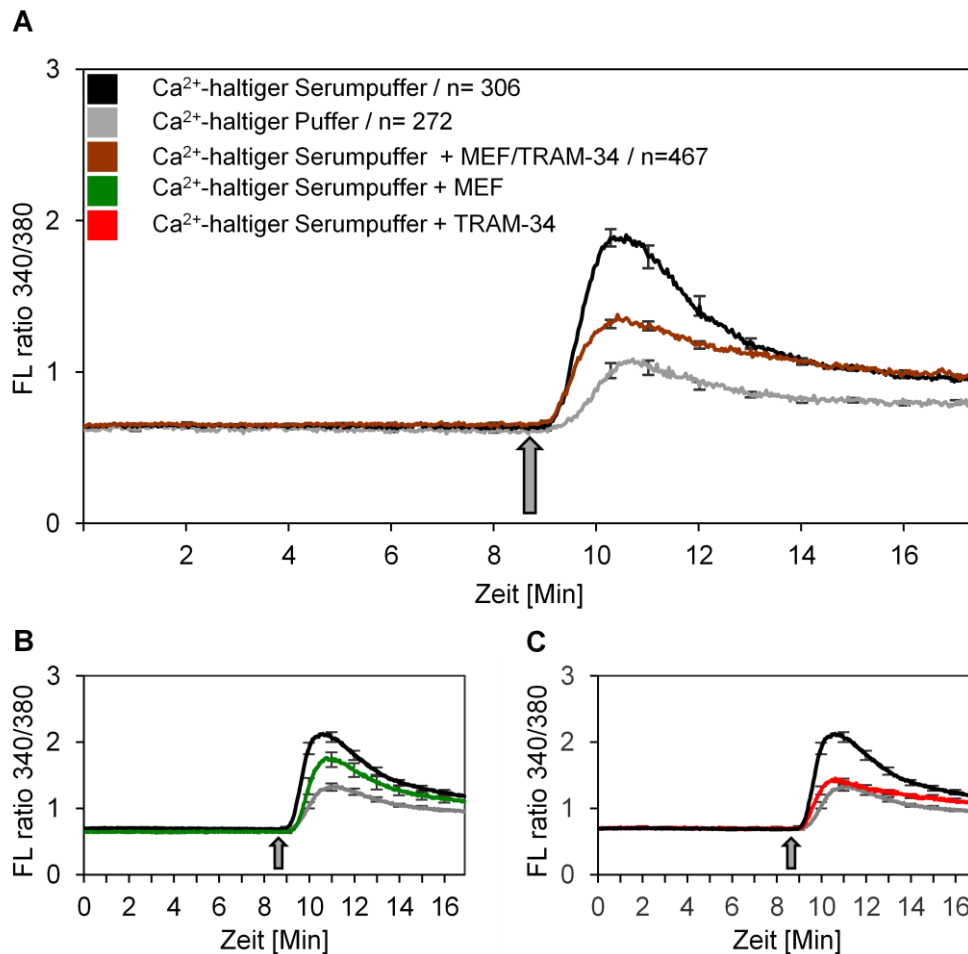
**Abbildung 3.4: Proliferationsverhalten von MMTV PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition von TRAM-34 und Mefenaminsäure.** Wie bereits in Abb. 3.3. beschrieben blieben die Zellen nach 72 h Serumentzug unbehandelt (1. Reihe) oder wurden mit TRAM-34 (2. Reihe), MEF (3. Reihe) sowie einer Kombination aus TRAM-34 und MEF (4. Reihe). Die hier gezeigten Bilder stellen lediglich einen repräsentativ ausgewählten Ausschnitt aller Versuche dar.

### 3.3 Effekt der pharmakologischen SK4- und TRPM3-Kanalinhibition auf akute $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen

Wie in Kapitel 1.6 bereits beschrieben wurden bereits Untersuchungen bezüglich der Funktion des SK4-Kanals im MMTV PyMT Mausmodell durchgeführt. Dazu wurden die auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten selektiven Kanalinhhibitoren TRAM-34 bzw. Mefenaminsäure verwendet. Beide Wirkstoffe führen zu einem verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Brusttumorzellen. Im Zuge dieser Dissertation wurden nun mögliche additive Effekte der kombinierten Applikation

aus Mefenaminsäure (30  $\mu\text{M}$ ) und TRAM-34 (10  $\mu\text{M}$ ) auf akute  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale untersucht. Die Zellen wurden hierfür wie in Kapitel 2.2.8.1 beschrieben für 24 Stunden kultiviert und anschließend für 72 Stunden arretiert. Nach einer 10-minütigen Messphase mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer wurde für weitere 10 Minuten entweder mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer oder  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer (siehe 2.1.3) superfundiert. Dieses Verfahren insbesondere der Pufferwechsel ist geeignet um akute cytoplasmatische Calciumsignale zu induzieren.

Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt 1046 Zellen untersucht, von denen 99,9% nach dem Pufferwechsel ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zeigten. Die Co-Applikation von Mefenaminsäure und TRAM-34 hatte einen stark hemmenden Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ - und Serumpuffer induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden in MMTV PyMT Brusttumorzellen (siehe Abbildung 3.5 A). Dieser Effekt ist deutlich stärker als der alleinige Effekt der Mefenaminsäure (Abbildung 3.5 B), allerdings war der Effekt nicht so ausgeprägt, wie jener unter alleiniger Applikation des SK4-Inhibitors TRAM-34 (Abbildung 3.5 C).



**Abbildung 3.5: Akute Ca<sup>2+</sup>-Transients in MMTV PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer TRPM3- und SK4-Kanalinhibition.** Von den 1045 oszillierenden Zellen entfielen 272 auf die Messung des Ca<sup>2+</sup>-Influx durch die alleinige Zugabe von Ca<sup>2+</sup>. 306 Zellen entfielen dabei auf die Kontrollversuche, bei welchen ein Ca<sup>2+</sup>-haltiger Serumpuffer hinzugegeben wurde und 467 entfielen auf die Versuche in welchen ein Ca<sup>2+</sup>-haltiger Serumpuffer unter Zugabe von Mefenaminsäure (30µM) und TRAM-34 (10µM). Die Zellen wurden zu Beginn der Messungen für 10 Minuten mit Ca<sup>2+</sup>-freien Puffer superfundiert. Nach Ablauf dieser 10 Minuten wurde auf einen anderen Puffer gewechselt. Je nach Kondition wurde hierbei ein Ca<sup>2+</sup>-haltiger Puffer (graue Kurve), ein Ca<sup>2+</sup>-haltiger Serumpuffer (schwarze Kurve) oder ein Ca<sup>2+</sup>-haltiger Serumpuffer unter Zugabe der Kanalinhhibitoren MEF (30µM) und TRAM-34 (10µM) verwendet (braune Kurve). Der Zeitpunkt des Pufferwechsels wird in den Abbildungen durch einen grauen Pfeil markiert. Abbildung (A) zeigt die Ergebnisse zu den akuten Ca<sup>2+</sup>-Messungen in MMTV PyMT Brusttumorzellen unter gleichzeitiger pharmakologischer Inhibition der SK4- und TRPM3-Kanäle mit TRAM-34 sowie MEF. Als Kontrolle dienen Ca<sup>2+</sup>-Signale von Zellen, die mit dem zuvor erwähnten Ca<sup>2+</sup>-haltigen Puffer (grauer Graph) oder Ca<sup>2+</sup>-haltigen Serumpuffer (schwarzer Graph) superfundiert wurden. Es lässt sich deutlich erkennen, dass eine gleichzeitige Blockade des TRPM3- und SK4-Kanals einen starken inhibitorischen Effekt auf den Ca<sup>2+</sup>-Influx in MMTV PyMT Brusttumorzellen ausübt. In den Abbildungen (B) und (C) wurden zum Vergleich nochmals die Ergebnisse der Voruntersuchungen (Hoang Y Ngyuen, Pharmakologisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie) zu den Effekten von MEF (B) und TRAM-34 (C) auf die akuten Transients dargestellt. (MMTV = Mouse Mammary Tumor Virus; PyMT = Polynomavirus Middle T Antigen; SK4-Kanal = Ca<sup>2+</sup>-aktivierter Kaliumkanal mittlerer



*Leitfähigkeit TRPM = Transient Receptor Potential Melastatin; MEF = Mefenaminsäure; TRAM-34 = 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol).*

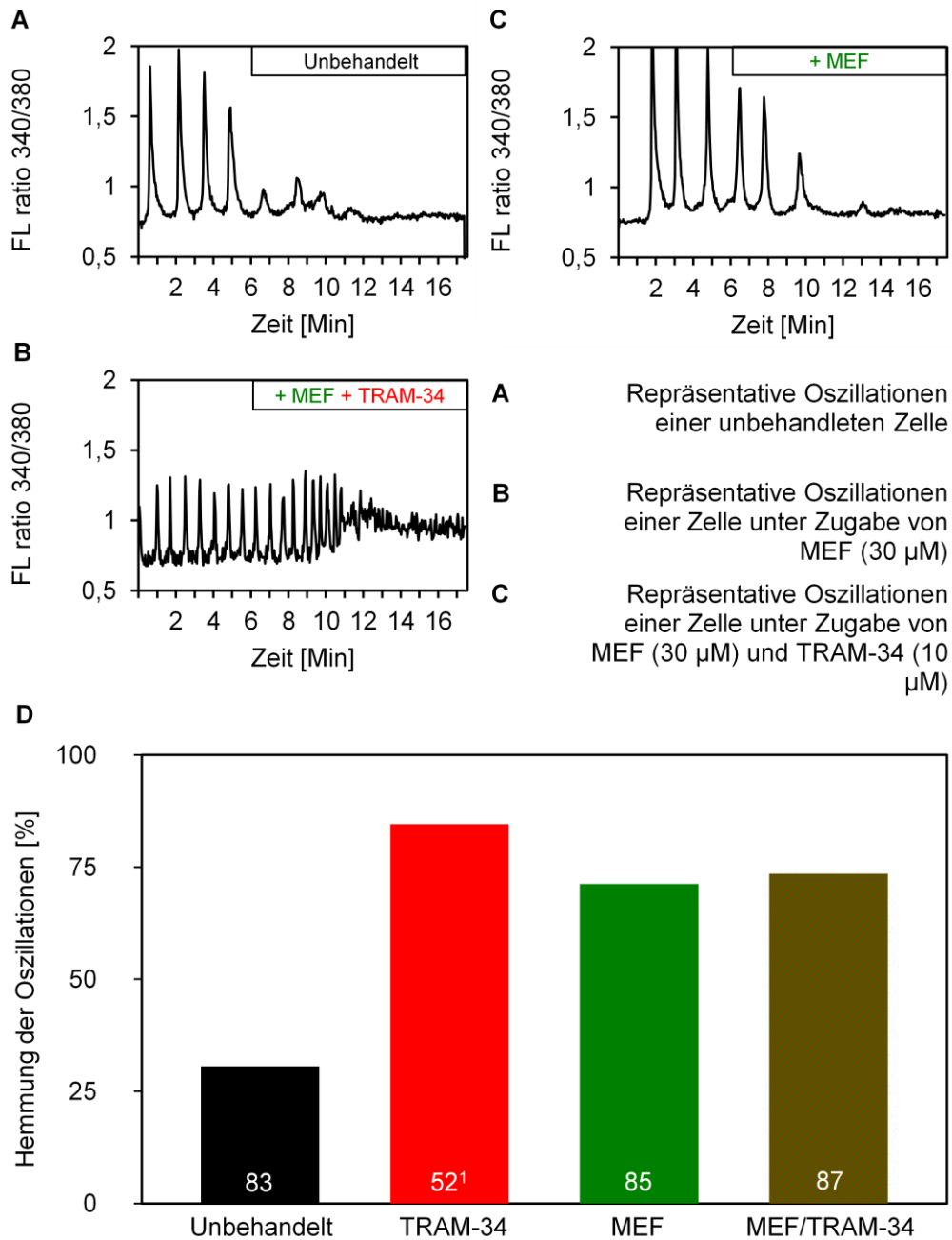
### 3.4 Messung der spontanen $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter pharmakologischer SK4- und TRPM3-Kanalinhibition

Alle bisher durchgeführten Versuche zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik wurden durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren in arretierten MMTV PyMT Brusttumorzellen durchgeführt.

Im Folgenden wurden daher in einem alternativen Setup spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in physiologisch wachsenden Zellen analysiert. Nach der Passage wurden die Zellen hierfür über verschiedene Zeiträume (24, 48, 72 Stunden) kultiviert und dann vermessen (siehe 2.2.1.1). Ziel war auch hier die Untersuchung des Einflusses einer pharmakologischen Inhibition des TRPM3-Kanals sowie einer kombinierten TRPM3 und SK-Inhibition. Des Weiteren sollte geprüft werden ob dieselben Ergebnisse wie bei den Untersuchungen der akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten erreicht werden. In der Tat führte eine pharmakologische Inhibition des SK4-Kanals in MMTV PyMT Brusttumorzellen mit TRAM-34 zu einer deutlichen Hemmung der spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. (siehe Kapitel 1.6.4-1.6.6 sowie Abbildung 3.5).

Da die MMTV PyMT Brusttumorzellen für diese Versuche zuvor nicht synchronisiert wurden, lag der prozentuale Anteil derjenigen Zellen, welche für die Auswertung berücksichtigt werden können deutlich niedriger. Von den 2629 Zellen, welche für diese Versuche untersucht wurden, erfüllten lediglich 252 (=9,6%) Zellen die Kriterien und konnten zur Auswertung herangezogen werden. Um bei der Auswertung berücksichtigt zu werden, mussten die Oszillationen mehrere Kriterien erfüllen. Zum einen mussten sie innerhalb der ersten 10 Minuten nach Beginn der Messungen auftreten, es mussten mindestens drei Oszillationen auftreten und die Oszillationen durften nicht innerhalb der ersten zehn Minuten nach Beginn der Messungen aufhören. Trotz des insgesamt eher seltenen Auftretens spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale war es möglich, ausreichend Zellen (n=80-87) unter den drei Versuchsbedingungen ((i.) Mefenaminsäure, (ii.) Mefenaminsäure plus TRAM-34 und (iii.) Kontrollbedingungen) zu analysieren.

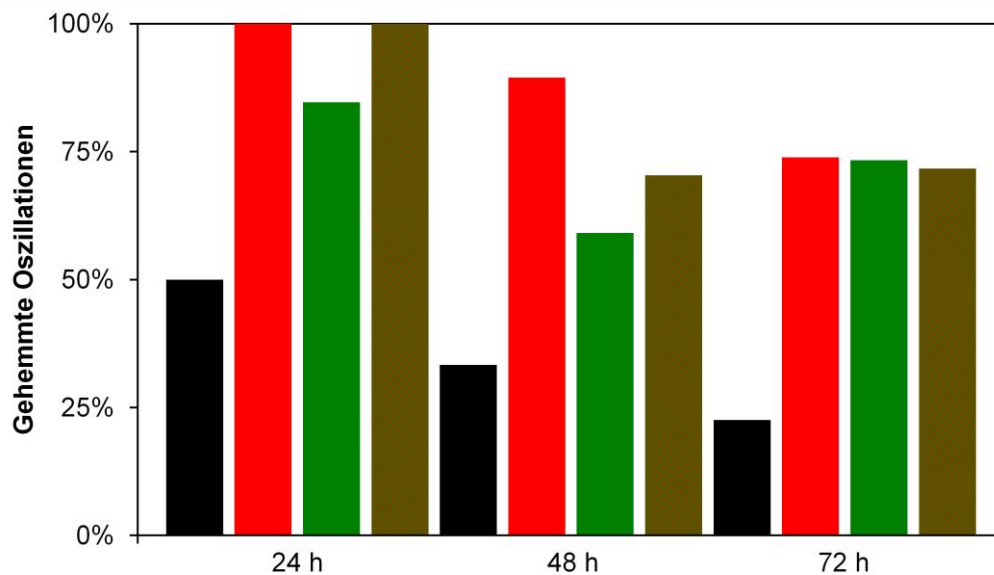
Die TRPM3-Kanalinhibition mit Mefenaminsäure bewirkte eine deutliche Reduktion der Oszillationsfrequenz und/oder Amplitude um 71%. Die Kombination aus Mefenaminsäure und TRAM-34 zeigte einen geringfügig stärkeren Effekt. Hier wurden 74% der Oszillationen gehemmt. Die alleinige Superfusion der Zellen mit TRAM-34 hatte den stärksten inhibitorischen Effekt auf spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. So konnten die Oszillationen in den 52 mit TRAM-34 behandelten Zellen in etwa 84% der Fälle gehemmt werden. (siehe Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Quantifizierung spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des SK4- und TRPM3-Kanals.** **A-C** Darstellung von repräsentativer Oszillationen einer unbehandelten Zelle (A), einer Zelle unter Zugabe von MEF 30 μM (B) und unter Anwendung einer Kombination von TRAM-34 10 μM und MEF 30 μM (C). **Abbildung D** zeigt die Quantifizierung spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Inhibition. Während der ersten 10 Minuten der Messung wurden die Zellen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer versorgt. Im Anschluss wurde für weitere 10 Minuten der Puffer gewechselt. Dabei wurde weiterhin ein der  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Puffer verwendet, allerdings wurde dieser mit den Kanalinhhibitoren Mefenaminsäure (30 μM, MEF) bzw. MEF und TRAM-34 (10 μM) versetzt. Für die Detektion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wurde FURA-2-AM, ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, welcher vor Beginn der Messungen für 45 Minuten inkubiert wurde. Wie bei den akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, reduzieren die verwendeten Substanzen auch die spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Bei ca.

30% der unbehandelten Zellen (schwarz) konnte spontan eine Reduktion der Oszillationen beobachtet werden. Die Zugabe des spezifischen SK4-Kanalinhibitors TRAM-34 (rot) nach 10 Minuten steigerte die Oszillationsinhibition am deutlichsten auf 84%. Auch die Applikation des TRPM3-Blockers Mefenaminsäure kann spontane Oszillationen reduzieren (71%, grüner Graph). Eine Kombinationsbehandlung der Substanzen zeigt keine deutliche Verbesserung gegenüber der Einzelapplikation. (*MMTV* = *Mouse Mammary Tumor Virus*; *PyMT* = *Polynomavirus Middle T Antigen*; *SK4-Kanal* = *Ca<sup>2+</sup>-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit* *TRPM* = *Transient Receptor Potential Melastatin*; *MEF* = *Mefenaminsäure*; *TRAM-34* = *1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol*; *FURA-2-AM* = *Fura-2-Acetoxymethylester*). <sup>1</sup>(Hoang y Nguyen, *Pharmakologisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie*).

Die Messungen der spontanen Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen fanden nach verschiedenen Kultivierungszeitpunkten statt (24, 48, 72 Stunden, siehe Kapitel 2.2.8.2). Betrachtet man die Oszillationsinhibition hinsichtlich des Zeitpunktes der Messung (siehe Abbildung 3.7), so lassen sich wirkstoffspezifische Abhängigkeiten erkennen. Nach 24 Stunden zeigen die Einzel- sowie Kombinationsbehandlungen die stärksten Effekte, TRAM-34 und auch die Kombination mit TRAM-34 und Mefenaminsäure führten bei allen gemessenen Zellen zu einer Inhibition. Für Mefenaminsäure allein konnte eine Hemmung in ca. 85% aller Fälle beobachtet werden. Generell war die Oszillationswahrscheinlichkeit der Zellen nach 24 Stunden in Kultur unabhängig von der tatsächlichen Behandlung am geringsten. Im Vergleich zu dem frühen Zeitpunkt (24 Stunden) nahmen nach 48 Stunden die pharmakologischen Hemmeffekte ab. TRAM-34 Superfusion führte hier nur noch in ca. 89% der Fälle zu einer Inhibition der spontanen Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen. Nach Behandlung mit Mefenaminsäure sowie Mefenaminsäure/TRAM-34 Kombination lagen die Werte bei ca. 59% bzw. 70%. Nach 72 Stunden waren die Effekte der drei unterschiedlichen Behandlungsregime annähernd identisch (TRAM-34 74%, Mefenaminsäure 73%, Kombination 72%). Bei genauerer Betrachtung ist außerdem zu beobachten dass der Effekt von Mefenaminsäure nach 48 Stunden schwächer wird und nach 72 Stunden wieder zunimmt, wohingegen unter allen anderen Versuchsbedingungen eine kontinuierliche Abnahme der Oszillationsinhibition mit Zunahme der Kultivierungszeit zu beobachten ist.



**Abbildung 3.7: Untersuchung der Effekte von Mefenaminsäure und TRAM-34 auf die spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen bezogen auf deren Kultivierungszeit.** Vor Beginn der Messungen wurden die Zellen für 24, 48 bzw. 72 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen mit FURA-2-AM, einem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Im Anschluss wurden die Messungen durchgeführt. In den ersten 10 Minuten wurde ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Puffer (siehe 2.1.3) verwendet. Nach Ablauf dieser ersten 10 Minuten fand ein Pufferwechsel statt, bei welchem dem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer die SK4- und TRPM3-Kanalinhhibitoren TRAM-34 (10  $\mu\text{M}$ ) und Mefenaminsäure (30  $\mu\text{M}$ , MEF) zugegeben wurden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, welche über die gesamte Messzeit von 20 Minuten mit demselben  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer superfundiert wurden. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden zeigen alle untersuchten MMTV PyMT Brusttumorzellen eine höhere Sensitivität gegenüber den Wirkstoffen Mefenaminsäure (grün), TRAM-34 (rot) bzw. deren Kombination (grün-rot-gestreift). Auch unbehandelte Zellen neigen eher nach kurzer Kultivierungszeit (24h) verstärkt dazu ihre Oszillationen spontan einzustellen (50%). Nach einer Kultivierungszeit von 72 Stunden hingegen halbiert sich dieser Wert bei unbehandelten Zellen. Auch die Sensitivität für MEF und TRAM-34 nach langer Kultivierungszeit nimmt deutlich ab. (MMTV = Mouse Mammary Tumor Virus; PyMT = Polynomavirus Middle T Antigen; SK4-Kanal =  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit TRPM = Transient Receptor Potential Melastatin; MEF = Mefenaminsäure; TRAM-34 = 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol; FURA-2-AM = Fura-2-Acetoxy-methylester)

### 3.5 Untersuchung des Effekts von Diclofenac auf die akuten $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen

Mefenaminsäure (MEF) ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum und ist somit ein Hemmer der Cyclooxygenase, welches eine Schlüsselfunktion bei der Prostaglandinsynthese aus der Arachidonsäure einnimmt. Prostaglandine sind an Prozessen wie Schmerzentstehung, Blutgerinnung sowie Entzündungen

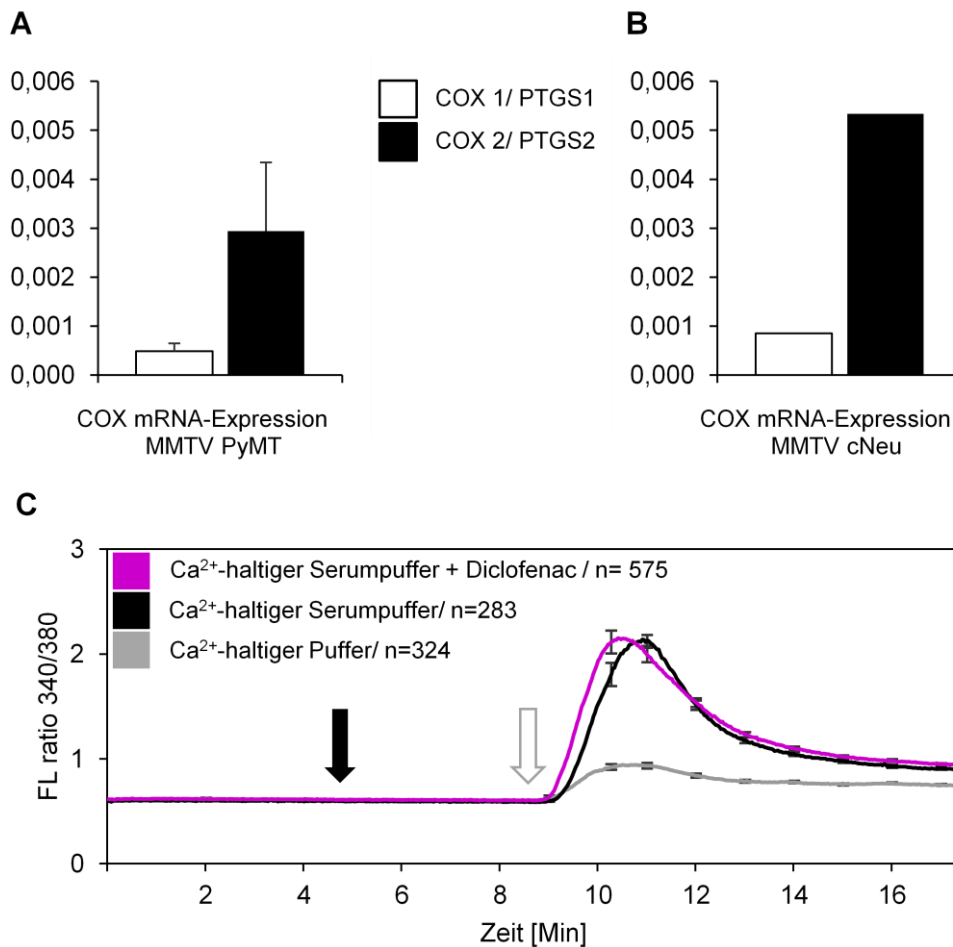
beteiligt und nehmen über Prostaglandinrezeptoren (insb. EP-1) Einfluss auf intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege. Es wäre also möglich, dass der in 6.4 bzw. 2.6 beobachtete inhibitorische Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nicht nur aus der TRPM3-Kanalhemmung resultiert, sondern gleichzeitig auch von der Hemmwirkung der Mefenaminsäure auf die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX1/2) abhängt. Um die COX-abhängigen Effekte auf die akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zu untersuchen, wurde der COX 1/2 Inhibitor Diclofenac verwendet [195]. Soweit bekannt hat Diclofenac keinen Effekt auf die TRPM3-Kanalaktivität.

Zunächst wurden auch die mRNA-Expressionslevel der COX 1 (Genname PTGS1) und COX 2 (Genname PTGS2) in den Brusttumorzellen (Abbildung 3.8/A+B) (MMTV PyMT und MMTV cNeu) mittels qPCR (siehe Kapitel 2.2.7) überprüft.

Sowohl COX 1 als auch COX 2 werden in beiden Brusttumorzelltypen exprimiert. In beiden Zelllinien konnte ein höheres mRNA-Expressionslevel für COX 2 detektiert werden. Bei beiden Zelltypen war das Expressionslevel von COX 2 etwa sechsfach höher als das von COX 1 (siehe Abbildung 3.8 A und B). Die Zellen exprimieren also beide Isoformen der COX. Weshalb die zuvor beobachteten Effekte von MEF auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (siehe Abbildung 3.6 und 3.7) auch TRPM3 unabhängig sein könnten.

Die folgenden Versuchsreihen wurden wie unter Kapitel 2.2.8.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde der Wirkstoff Diclofenac in einer Konzentration von  $0,2 \mu\text{M}$  verwendet, was der  $\text{IC}_{50}$  dieses Wirkstoffes für COX 1/2 entspricht. Auch bei diesen Untersuchungen lag die Zahl der Zellen in denen nach Stimulation ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient nachweisbar war bei 99,9%. Insgesamt wurden für diese Versuche 1182 Zellen untersucht. Dabei entfielen 324 Zellen auf die Kontrolluntersuchungen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, 283 Zellen entfielen auf die Kontrolluntersuchungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer und 575 Zellen entfielen auf die Untersuchung der akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Zugabe von Diclofenac. Wie in Kapitel 2.2.8.1. beschrieben wurden die Zellen für 5 Minuten mit Diclofenac vorinkubiert. Die Auswertung der Messungen zeigte jedoch keinen Effekt von Diclofenac auf die akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den MMTV PyMT Brusttumorzellen (siehe Abbildung 3.8 C). Zusammengenommen bestätigen diese Befunde, dass die inhibitorische Wirkung von MEF auf die akute  $\text{Ca}^{2+}$ -

Transienten nicht über den COX-Signalweg, sondern wahrscheinlich in der Tat über den TRPM3-Kanal vermittelt wird.



**Abbildung 3.8: Untersuchung akuter Ca<sup>2+</sup>-Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Verwendung des COX1- und COX2-Inhibitors Diclofenac.** Zunächst konnte sowohl in MMTV PyMT (**A**) als auch in MMTV cNeu (**B**) Brusttumorzellen eine mRNA-Expression von Cyclooxygenase 1 und Cyclooxygenase 2 nachgewiesen werden. In den MMTV PyMT Zellen war die Cyclooxygenase 2 (COX 2/ schwarz) etwa sechs Mal höher exprimiert, als Cyclooxygenase 1 (COX 1/ weiß). In den MMTV cNeu Brusttumorzellen lagen die Expressionen von COX 1 und COX 2 (schwarz) etwas höher. Jedoch war das Verhältnis COX 1 zu COX 2 in etwa dasselbe wie in den MMTV PyMT Zellen. In den sich anschließenden Untersuchungen wurde der Effekt von Diclofenac untersucht (**C**). Auch hier wurden drei unterschiedliche Versuchsreihen, zwei zur Kontrolle (grau, schwarz) und eine unter Zugabe von Diclofenac 0,2 µM (Magenta) durchgeführt. Bei der ersten Versuchsanordnung wurde den Zellen ein Ca<sup>2+</sup>-haltiger Puffer (grau) zugeführt. In den zweiten Kontrollversuchen wurde ein Ca<sup>2+</sup>-haltiger Serumpuffer (schwarz) verwendet (siehe Kapitel 2.1.5.1). Bei der dritten Versuchsanordnung wurde dann der Effekt von Diclofenac auf die akuten Ca<sup>2+</sup>-Transienten untersucht. Dazu wurde zu Beginn der Messungen ein Ca<sup>2+</sup>-freier Puffer verwendet. 5 Minuten nach Beginn der Messungen wurde auf einen Ca<sup>2+</sup>-freien-Puffer gewechselt, welchem 0,2 µM Diclofenac zugesetzt wurden. Nach einer Präinkubationszeit von 5 Minuten wurde ein Ca<sup>2+</sup>-haltigen Serumpuffer plus Diclofenac (0,2 µM) superfundiert. Der Start der Vorinkubation (Wechsel von Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer auf Diclofenac in Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer) wird hier durch den schwarzen Pfeil markiert. Der

Zeitpunkt zu welchen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, bzw. der  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer verabreicht wurde, wird durch den weißen Pfeil markiert. Zusammengefasst war keine hemmende Wirkung von Diclofenac auf die akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen erkennbar. (MMTV = *Mouse Mammary Tumor Virus*; PyMT = *Polynomavirus Middle T Antigen*; SK4-Kanal =  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit TRPM = *Transient Receptor Potential Melastatin*; MEF = *Mefenaminsäure*; Cyclooxygenase = COX).

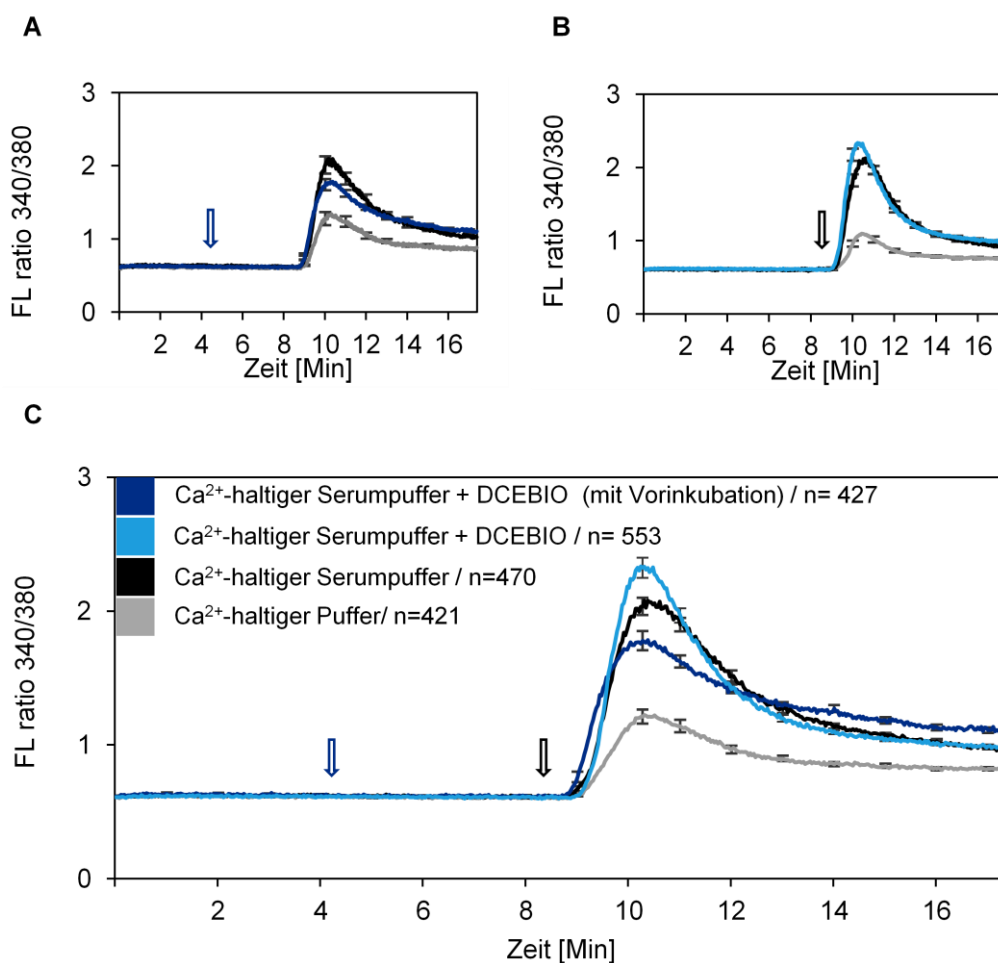
### 3.6 Messung akuter $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter SK4-Kanalaktivierung mit DCEBIO

Zuvor wurde bereits erwähnt, dass neben dem SK4-Inhibitor TRAM-34 auch die Wirkung von DCEBIO, einem SK4-Aktivator, auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx von MMTV PyMT Brusttumorzellen ermittelt werden sollte. Dabei sollte das Hauptaugenmerk auf eine mögliche Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influges durch die Behandlung der Zellen mit DCEBIO gelegt werden. Hierfür wurden akute  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Gegenwart und Abwesenheit von DCEBIO analysiert. In einem ersten Versuchsansatz, welcher (siehe Kapitel 2.2.8.1) wurden die Zellen mit DCEBIO für fünf Minuten vorinkubiert (siehe Abbildung 3.9 A). Für diese erste Versuchsreihe wurden insgesamt 860 Zellen untersucht, wobei hier 183 Zellen auf die Kontrollmessungen unter Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffers entfielen. 250 Zellen wurden bei den Kontrollbedingungen unter Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer analysiert (siehe Kapitel 2.1.5.1). Die restlichen 427 Zellen wurden für die Untersuchung der akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Zugabe von DCEBIO (50  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren zunächst überraschend, da DCEBIO in diesem Versuchsaufbau den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Zellen zumindest tendenziell verringerte (Abbildung 3.7 A). Möglicherweise führte die Vorinkubation mit DCEBIO bereits zu einer schnellen und maximalen Erregung der SK4-Kanäle, was letztendlich dazu führte, dass die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer aufgrund teilweise deaktivierter SK4-Kanäle nicht in einem höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Zelle resultierte.

In einem alternativen Versuchsaufbau (siehe Kapitel 2.2.8.1) wurden die Zellen daher ohne Vorinkubation mit DCEBIO behandelt. Hierfür wurden wiederum 1011 Zellen untersucht. Dabei entfielen 238 Zellen auf die Kontrolluntersuchungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, 220 Zellen entfielen auf die Kontrolluntersuchungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer (siehe Kapitel



2.1.5.1) und 553 Zellen wurden mit DCEBIO behandelt. Sowohl im ersten als auch im zweiten Versuchsaufbau kam es erneut bei 99,9% der Zellen zu Oszillationen. Nach Auswertung der Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe, zeigten sich andere in den DCEBIO superfundierten Zellen andere Effekte. So schien der SK4-Aktivator ohne Vorinkubation den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Zellen zu verstärken (Abbildung 3.7 B). Bei einem direkten Vergleich der Effekte von DCEBIO mit und ohne Vorinkubation konnte also gezeigt werden, dass die Wirkung von DCEBIO durch diese Veränderung im Versuchsaufbau zu stark differierenden Ergebnissen führt (Abbildung 3.7 C). Aufgrund der beiden unterschiedlichen Versuchsanordnungen konnte aufgezeigt werden, dass der SK4-Aktivator DCEBIO unter richtiger Anwendung tatsächlich einen verstärkenden Effekt auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in MMTV PyMT Brusttumorzellen bewirkt.



**Abbildung 3.9:** Messung akuter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen unter Zugabe des SK4-Aktivators DCEBIO. In der ersten

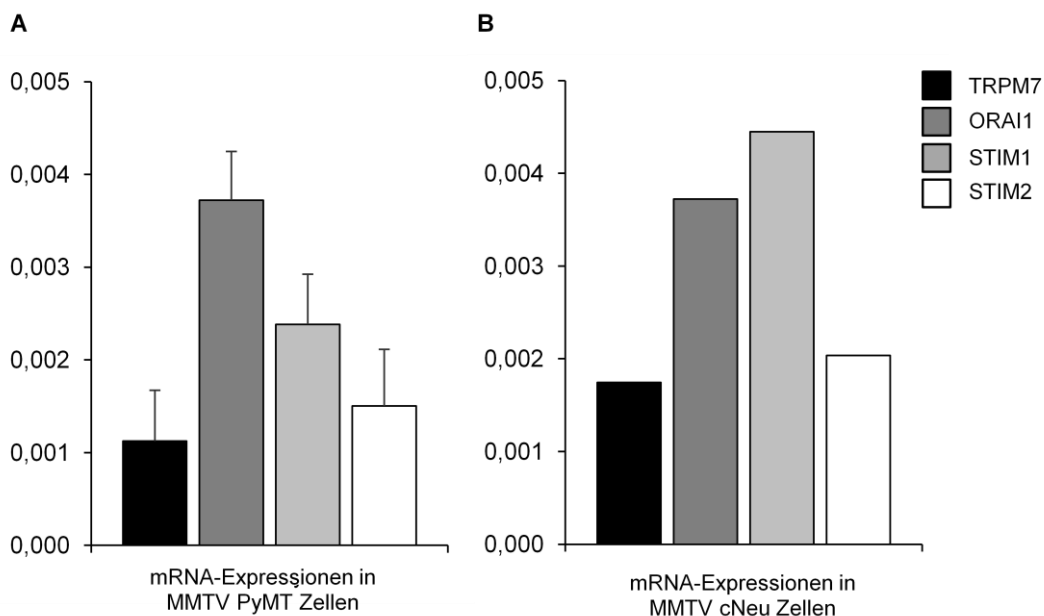
Versuchsreihe (A) wurden die Zellen zu Beginn der Messungen für 5 Minuten mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer vermessen und anschließend für weitere 5 Minuten mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer unter Zugabe von DCEBIO ( $50\mu\text{M}$ ) superfundiert (blauer Pfeil). Nach Ablauf dieser ersten 10 Minuten wurde auf einen  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffer unter Zugabe von DCEBIO ( $50\mu\text{M}$ ) gewechselt. Im zweiten Versuchsaufbau (B) wurden die Zellen nicht mit DCEBIO vorinkubiert. In Grafik (A) sind die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe dargestellt. Dabei zeigt der graue Graph die Kontrollmessungen, welche mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffer durchgeführt wurden. Der schwarze Graph stellt die Ergebnisse der Kontrollmessungen unter Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Serumpuffers dar (siehe Kapitel 2.1.5.1). Der dunkelblaue Graph zeigt die Messergebnisse unter Zugabe des DCEBIO-haltigen Serumpuffers (4.5.1). Der blaue Pfeil gibt den Zeitpunkt an, ab welchem mit DCEBIO vorinkubiert wurde. Anhand der Verläufe dieser drei Graphen lässt sich deutlich erkennen, dass DCEBIO bei vorheriger Inkubation einen hemmenden Effekt auf die akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und somit auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx zu haben scheint. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine zweite Versuchsreihe durchgeführt, bei welcher keine Vorinkubation mit DCEBIO stattfand (B). Die Kontrollbedingungen  $\text{Ca}^{2+}$ -freier sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Puffer sind erneut in grau und schwarz dargestellt. Der Cyan-farbene Graph zeigt die Ergebnisse der Messungen mit DCEBIO. Ohne Vorinkubation scheint DCEBIO den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in MMTV PyMT Brusttumorzellen erwartungsgemäß zu steigern. In Abbildung (C) wurden zum direkten Vergleich die Ergebnisse aus (A) und (B) zusammengeführt. In dieser Darstellung wird der stark differierende Effekt von DCEBIO in den verschiedenen Versuchsanordnungen gut erkennbar. (MMTV = *Mouse Mammary Tumor Virus*; PyMT = *Polynomavirus Middle T Antigen*; SK4-Kanal =  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; DCEBIO = 5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one).

### 3.7 mRNA Screening von Komponenten des $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings mittels qPCR

Da der Einsatz von der SK4- und TRPM3- Kanalinhhibitoren keine vollständige Hemmung der Proliferation sowie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxes in MMTV PyMT Brusttumorzellen bewirkte legt dies den Schluss nahe, das weitere Komponenten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings in diese Prozesse involviert sind. Dazu sollte in den folgenden Untersuchungen die mRNA-Expression weiterer Komponenten nachgewiesen werden, um weitere potenzielle Ziele für eine Behandlung von Brusttumoren aufzudecken. Des Weiteren bleibt auch nach den umfassenden Untersuchungen zur Rolle von TRPM3 die Frage unbeantwortet, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanäle im Zusammenspiel mit dem SK4-Kanal das Wachstum der MMTV PyMT Brusttumorzellen beeinflussen. Für diese Versuche wurden erneut MMTV PyMT als auch MMTV cNeu Brusttumorzellen mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qPCR) untersucht (Kapitel 2.2.7)

In beiden Zelltypen waren weitere Komponenten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskade nachweisbar (siehe Abbildung 3.10). Dabei handelte es sich um die mRNA des schon in 6.1 erwähnten TRPM7-Kanals, welcher neben dem TRPM3 ein weiteres Mitglied der TRPM-Unterfamilie bildet. Mit einem relativen Wert von 0,0011 wird

TRPM7-mRNA in MMTV PyMT Zellen im Vergleich zu TRPM3-mRNA etwa 40-fach höher exprimiert (siehe Abbildung 3.1). Des Weiteren konnten drei Mitglieder des *Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Pathway (SOCE)* identifiziert werden. Dabei handelte es sich um die mRNA der Orai1 (*CRACM, calcium-release-activated calcium-modulator*), STIM1 und STIM2 Proteine (*stromal interaction molecule*). Die mRNA-Expression von ORAI1, STIM1 und STIM2 ist im Vergleich zu der des TRPM7 um etwa das dreieinhalb-, zweieinhalb- und eineinhalb-fache erhöht (Abbildung 3.10). Für MMTV cNeu Zellen konnten ähnliche Werte bestimmt werden, lediglich das STIM1 mRNA-Level war im Vergleich zum MMTV PyMT Mausmodell deutlich höher.



**Abbildung 3.10: mRNA Screening weiterer Komponenten des Ca<sup>2+</sup>-Signalings in MMTV PyMT und MMTV cNeu Brusttumorzellen mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion.** Da durch die Anwendung von TRAM-34 sowie MEfenaminsäure keine vollständige Hemmung der Proliferation von MMTV PyMT Brusttumorzellen erreicht werden konnte, sollten in dieser Versuchsreihe neue, potenzielle therapeutische Ziele bzw. eine Verbindung zum SK4-Kanal ermittelt werden. Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben vorbereitet. Diese Versuche wurden sowohl an (A) MMTV PyMT, als auch an (B) MMTV cNeu Brusttumorzellen durchgeführt. Dargestellt ist die mRNA Expression von TRPM7 einem Mitglied der TRPM-Unterfamilie, Orai1 (*CRACM, calcium-release-activated calcium-modulator*), STIM1 sowie STIM2 Proteinen (*stromal interaction molecule*). Die letzten drei bilden die Mitglieder des sogenannten *Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Pathway (SOCE)*. Beide Zelltypen exprimieren die genannten Transkripte in ähnlichem Ausmaß. Lediglich für STIM2 konnte in MMTV cNeu Zellen ein etwas höherer Wert ermittelt werden. (MMTV = *Mouse Mammary Tumor Virus*; PyMT = *Polynomavirus Middle T Antigen*; SK4-Kanal = *Ca<sup>2+</sup>-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit*; STIM = *stromal interaction molecule*; ORAI = *CRACM, calcium-release-activated calcium-modulator*; SOCE = *Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Pathway*).

## 4 Diskussion

### 4.1 Nachweis von TRPM3 und TRPM7 mRNA-Expression in MMTV PyMT Brusttumorzellen sowie MMTV PyMT Brusttumorgewebe

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die TRPM3/7 mRNA Expressionen in MMTV PyMT Brusttumorzellen nachgewiesen. Hierbei zeigte sich für TRPM3-mRNA im Vergleich zur TRPM7 Expression eine niedrige Abundanz (siehe Kapitel 3.1). In den entsprechenden Brusttumorgewebe wurden dagegen deutlich höhere Expressionslevel für beide Kanäle detektiert. Diese Befunde implizieren, dass TRPM3/7 neben den Brusttumorzellen auch noch in stromatalen Zellen, beispielsweise in Fibroblasten [180, 196, 197], Endothelzellen [164, 198], Glattmuskelzellen [199] oder Immunzellen [200, 201] exprimiert werden. Alternativ sind die Unterschiede in der Expressionshöhe zwischen den MMTV PyMT Brusttumorzellen und Tumoren durch Unterschiede in der regulatorischen Kontrolle der TRPM3/7 Kanalexpression *in vitro* und *in vivo* bedingt.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten überdies auch TRPM3-Kanäle in weiteren Zelltypen wie den humanen Nierenzellen (HEK-293) [162], sowie Pankreas [163] nachweisen. Das zeigt, dass der TRPM3 eine breite Gewebesdistribution sowie eine Vielzahl an Aufgaben und Funktionen im gesamten Körper übernimmt.

Die TRPM3 Expression wurde in insgesamt drei unterschiedlichen MMTV PyMT Brusttumorzelllinien nachgewiesen. Das Expressionslevel war generell relativ gering, daher wurden +RT und -RT Werte gegenübergestellt (siehe Abbildung 3.1 B). Dieser Vergleich ergab etwa zehnfach höhere Werte für die +RT Proben (siehe Abbildung 3.1 B), was sich als spezifischer Nachweis für TRPM3-mRNA in MMTV PyMT Brusttumorzellen werten lässt. Des Weiteren ist aber zu beachten, dass die bisherigen Messungen der mRNA Mengen an nicht zwangsläufig Rückschlüsse über die TRPM3 Proteinmenge bzw. die Ionenkanalaktivität erlauben.

In einer bereits länger etablierten Kooperation mit Prof. Freichel und Dr. Krebs (Pharmakologisches Institut, Universität Heidelberg) wurde die TRPM3 Expression mittels Nanostring Technologie durch eine alternative Methode in MMTV PyMT Brusttumorgewebe nachgewiesen (siehe Kapitel 1.6.4) [80]. Zusammengenommen deuten auch diese Expressionsdaten daraufhin, dass TRPM3 Kanäle in MMTV PyMT Brusttumorzellen exprimiert werden.

Aufgrund der vergleichsweise hohen Expression von TRPM7 könnte dieser im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher analysierte Kanal ebenfalls für die SK4 modulierte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase relevant sein. In der Tat wurden dem TRPM7 eine Reihe von Funktionen in Verbindung mit Brusttumoren nachgewiesen. Sowohl in Brusttumorgewebe als auch gesundem Gewebe konnte TRPM7 nachgewiesen werden. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass in Grad III Tumoren in Verbindung mit der Tumorgroße und dem Ki-67 Protein eine Überexpression von TRPM7 vorliegt [113, 177]. Desweiteren wurde der TRPM7 mit der Proliferation von Tumoren [202, 203] speziell auch der von Brusttumorzellen [113] in Verbindung gebracht. Dabei wird vermutet, dass diese Beteiligung an der Proliferation über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse geschieht. Durch einen Knock-down von TRPM7 in hBCE (*human breast cancerous epithelial cells*) und MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) Zelllinien konnte die Proliferation von Brusttumoren gehemmt und das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  gesenkt werden [113]. Aber auch bei Prozessen wie Zelladhäsion sowie Metastasierung konnte ihm eine Beteiligung nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus wie TRPM7 die Zelladhäsion beeinflusst ist noch nicht vollständig geklärt jedoch wird vermutet, dass auch hier die Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über TRPM7 eine wichtige Rolle spielt. Desweiteren weiß man bereits, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Protease Calpain an der Kontrolle der Zelladhäsion mitbeteiligt ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TRPM7 über seine Kinaseaktivität mit Calpain interagiert. Durch eine Überexpression von TRPM7 kommt es nun zu einer Abrundung der Zellen, welche mit einem Adhäsionsverlust einhergeht. Durch den Knock-down von TRPM7 konnte die Interaktion mit Calpain unterbunden werden, was ein Abrunden der Zelle verhinderte und somit die Zelladhäsion stärkte [204].

Middelbeek et al. untersuchten an einem Maus Xenotransplantat Modell mit humanen Brusttumorzellen den Zusammenhang zwischen der TRPM7-Expression und dem Metastasierungsverhaltens sowie Progression von

Brusttumoren. Diese Studie brachte interessante Erkenntnisse hervor. So legen die Ergebnisse nahe, dass sowohl Tumorgröße als auch die Expression von TRPM7 einen Hinweisgeber für Rezidive und das Vorkommen von Fernmetastasen darstellen. Eine Überexpression von TRPM7 verkürzt demnach die rezidivfreie Überlebenszeit und erhöht gleichzeitig das Vorkommen von Fernmetastasen. In den erwähnten Tierexperimenten entwickelten alle Tiere Fernmetastasen, wobei sie sich diese zuerst in den Lungen manifestierten ehe sie sich innerhalb von 30 Tagen im gesamten Körper der Tiere ausbreiteten. Durch eine Deaktivierung von TRPM7 konnte die Ausbreitung der Metastasen ab dem siebten Tag reduziert werden. Des Weiteren legen die Erkenntnisse den Schluss nahe, dass die Deaktivierung von TRPM7 die Metastasierung von humanen Brustkrebszellen in vivo auf eine initiale Etablierung der Metastasen in der Lunge beschränkt. Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeitsgruppe lag in der Abhängigkeit zwischen TRPM7-Expression und der Progression von Brusttumoren [177]. Inwiefern eine TRPM7 Expression als Marker der Krebsentstehung oder sogar als neuartige Arzneimittelzielstruktur bei der Tumorbekämpfung geeignet ist bleibt unklar, da es derzeit noch keine ausgiebig getesteten Modulatoren des TRPM7 gibt.

## **4.2 Untersuchungen zur Proliferation von MMTV PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des SK4- und TRPM3-Kanals**

MMTV PyMT Brusttumorzellen wurden mit spezifischen Kanalinhhibitoren gegen SK4 (TRAM-34) und TRPM3 (Mefenaminsäure) behandelt, um eine mögliche Funktion der Kanäle im Proliferationsverhalten der Zellen zu charakterisieren. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl SK4- (siehe Kapitel 1.6.3) als auch TRPM3-Kanäle (siehe Kapitel 3.1) in MMTV PyMT Brusttumorzellen exprimiert werden. Des Weiteren konnte eine Beteiligung dieser Kanäle für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in HEK293 Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.6.4-1.6.6 + Kapitel 3.3/3.4) [160].

Es konnte gezeigt werden, dass Brusttumorzellen durch die pharmakologische SK4-Inhibition verglichen mit unbehandelten Brusttumorzellen signifikant langsamer wachsen (siehe 3.2). Auch unter MEF Behandlung war ein leicht

hemmender Effekt auf das Wachstum zu beobachten. Dieser erreichte jedoch im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht das Signifikanzniveau ( $p=0,45$ ). Die Kombinationstherapie mit MEF und TRAM-34 hingegen wies die stärksten wachstumshemmenden Effekte auf (siehe Abbildung 3.3). Obwohl die Effekte der Kombinationstherapie am stärksten ausgeprägt waren, war kein signifikanter Unterschied zu der alleinigen TRAM-34-Behandlung der Zellen erkennbar. Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich die Vermutung bestätigen, dass der SK4-Kanal eine wichtige Rolle für die Proliferation von MMTV PyMT Brusttumorzellen spielt. Die Wachstumsuntersuchungen in Gegenwart des TRPM3 Modulators MEF deuten dagegen auf eine höchstens untergeordnete Bedeutung des TRPM3 für das Proliferationsverhalten von MMTV PyMT Brusttumorzellen hin. Basierend auf den Nanostring und qPCR Analysen (siehe Tabelle 1.1/ Abbildung 1.8 und 3.1) scheint die TRPM3 Expression im in vitro Brusttumorkultursystem eher gering zu sein, was Rückschlüsse auf die Bedeutung des Kanals unter in vivo Bedingungen erschwert. Inwiefern die hohe TRPM3 mRNA Abundanz in dem MMTV PyMT Modell mit Tumorstadium assoziiert ist, muss daher künftigen in vivo Experimenten vorbehalten bleiben. Die möglicherweise essenzielle Rolle von TRPM3-Kanälen in Brusttumoren ließe sich beispielsweise durch pharmakologische Inhibition der Kanäle mittels MEF überprüfen. Allerdings sind die physiologischen Funktionen des TRPM3-Kanals trotz seiner vergleichsweise breiten Gewebedistribution weitestgehend noch nicht bekannt, was letztendlich eine Etablierung des Kanals als potentielle Zielstruktur bei der Behandlung von Brusttumoren erschwert. So wurden TRPM3 Kanäle bereits in Ovarien, Pankreas, Gehirn, Niere, Hypophyse, Auge, Brustdrüsengewebe sowie in kontraktiven Elementen vaskulärer Glattmuskelzellen detektiert [80, 160-164]. Unter physiologischen Bedingungen steuern TRPM3 Kanäle die Insulinsekretion und die renalen Homöostase. Die Beteiligung des TRPM3 an der Insulinsekretion wurde in HEK293 Zellen getestet. Hierfür wurden TRPM3 Kanäle mittels Pregnenolonsulfat aktiviert [163]. Durch die Aktivierung des TRPM3 kommt es zu einem  $Ca^{2+}$ -Influx, welcher gemeinsam mit dem  $Ca^{2+}$ -Influx durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ eine  $Ca^{2+}$ -abhängige Signalkaskade auslöst, welche zu einer veränderten Genexpression führt [205]. Des Weiteren triggert der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  die Aktivierung der Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) und ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinases*) Kinasen in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen und

Insulinzellen [206, 207]. Des Weiteren wird der TRPM3-Kanal auch mit kongenitalen Störungen in Verbindung gebracht [121, 163].

### **4.3 Rolle von SK4- und TRPM3-Kanälen für akute und spontane Ca<sup>2+</sup>-Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen**

In Vorversuchen, am hiesigen Lehrstuhl konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl MMTV PyMT als auch MMTV cNeu Brusttumorzellen Ca<sup>2+</sup>-Transienten erzeugen. (*Hoang Y Nguyen, Friederike Steudel, Pharmakologisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie*). In diesem Zusammenhang konnte Frau Dipl.-Pharm. Friederike Steudel in MMTV cNeu Brusttumorzellen zeigen, dass diese TRAM-34-sensitive spontane sowie akute Ca<sup>2+</sup>-Transienten generieren. Im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit hat Frau Dipl.-Pharm. Hoang Y Nguyen diese Befunde in MMTV PyMT Zellen kürzlich teilweise auf eine Hemmung des TRPM3 Kanals mit Mefenaminsäure ausgeweitet (siehe 1.10/1.11). In diesen Untersuchungen waren die durch Wachstumsfaktoren induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten MEF-sensitiv, der Effekt von MEF war jedoch weniger ausgeprägt als die Effekte von TRAM-34.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte nun untersucht werden, ob eine gleichzeitige Inhibition von SK4 und TRPM3 in MMTV PyMT Brusttumorzellen zu einem synergistischen Effekt und somit zu einer verstärkten Reduktion akuter Ca<sup>2+</sup>-Transienten führt. Interessanterweise hatte die Kombinationstherapie aus MEF und TRAM-34 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit MEF einen stärkeren Hemmeffekt auf die wachstumsfaktorinduzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten nach alleiniger MEF Applikation (siehe Abbildung 3.5 A/3.6) Insgesamt war der MEF/TRAM-34 Effekt auf die Ca<sup>2+</sup>-Transienten jedoch nicht ausgeprägter, als die alleinige SK4-Kanalblockade.

Mit Hilfe von Fura-2AM können Änderungen des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> detektiert werden. Ungesättigtes Fura-2AM wird mit Licht der Wellenlänge 380 nm und mit Ca<sup>2+</sup> gesättigtes Fura-2AM wird mit Licht der Wellenlänge 340 nm angeregt. Über die Ermittlung des Verhältnisses der Absorptionsmaxima (340/380) können nun Änderungen hinsichtlich des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> sichtbar gemacht werden. In den durchgeführten Versuchen konnten mit Hilfe der Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Ca<sup>2+</sup>-Puffer



sowie mit Hilfe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Serumpuffer diese Änderungen des intrazellulären Calciums evoziert werden. Auch eine direkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) scheinen möglich [208]. Bei der Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher gelangt  $\text{Ca}^{2+}$  über  $\text{IP}_3$ - oder den Ryanodin-Rezeptoren vom ER ins Zytoplasma, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten entstehen [209]. Neigen sich die intrazellulären Speicher ihrem Ende, kommt es zu einer Signalkaskade zwischen ER und Plasmamembran. Hierbei spielen die Komponenten des CRAC-Systems eine wichtige Rolle [210]. Dieses System ist Teil des sogenannten „Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$ -Entry“ (SOCE) über welches der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel reguliert werden kann. Dies geschieht insbesondere durch die Interaktion des STIM-Proteins (*stromal interaction molecule*) und des Orai-Proteins (*calcium-release-activated calcium-modulator*, CRACM). Das CRAC-System wurde bereits 1986 zum ersten Mal beschrieben [102], konnte aber erst 2006 im Zusammenhang mit Mutationen und den daraus resultierenden immunsupprimierenden Krankheiten zugeordnet werden [103, 104]. Die Orai-Proteine bilden  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Poren in der Plasmamembran der, während sich die STIM-Proteine in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) liegen und dort als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren fungieren. Eine Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher im ER, führt zu einer Aktivierung der STIM-Proteine, welche dann innerhalb der ER-Membran umverteilt werden und so eine enge räumliche Beziehung zur Plasmamembran der Zelle aufweisen. Dort kommt es nun zu einer Anhäufung dieser Proteine und zur Bildung von Oligomeren. Diese interagieren über ihre CRAC-Domäne mit dem N-Terminus der Orai-Proteine [105]. Durch die dadurch bedingte Öffnung der Orai-Kanäle kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle [106, 107]. Da in diesem Versuchsaufbau die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch den Entzug von  $\text{Ca}^{2+}$  und Wachstumsfaktoren theoretisch leer sind und deshalb aus diesen Speichern kein  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt werden kann muss das  $\text{Ca}^{2+}$  folglich aus dem umliegenden Extrazellularraum durch beispielsweise CRAC oder TRP-Kanäle in die Zelle gelangen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt im Rahmen dieser Untersuchung war die Rolle des SK4-Kanal für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. Zwar handelt es sich bei diesem um einen Calcium-aktivierten Kaliumkanal, jedoch kann der Calciumeinstrom in nicht erregbaren Zellen über SK4-Kanäle reguliert werden. Denn in Folge einer Aktivierung des SK4 kommt es zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran der Zelle [77]. Es wird vermutet, dass die Aktivierung des SK4 durch  $\text{Ca}^{2+}$

Freisetzung aus dem ER oder durch einen kleinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über CRAC Kanäle erfolgt [211]. Es ist bereits bekannt dass die Aktivität von SK4 eng mit Kanälen des SOCE verknüpft ist, zu welchen unter anderem der TRPM2, TRPM7 sowie die TRPC Familie (mit Ausnahme des TRPC7) gehören. Durch die mittels  $\text{Ca}^{2+}$  ausgelöste Hyperpolarisation des SK4 werden nun weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle des SOCE aktiviert wodurch es zu einem verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und letztendlich zu einer Aktivierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggelter Signalkaskade kommt [210].

Wie bereits erwähnt, zeigte die Behandlung von MMTV PyMT Brusttumorzellen mit einer Kombination aus MEF und TRAM-34 keinen synergistischen Effekt. Dieser Befund deutet daraufhin, dass neben des TRPM3 Kanal weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanäle an dem SK4/TRAM-34 vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Entry beteiligt sind.

#### **4.4 Effekt einer SK4 und TRPM3 Inhibition auf die spontanen $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von MMTV PyMT Brusttumorzellen**

Der Versuchsaufbau, welcher zur Untersuchung der akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten verwendet entspricht nicht ganz den physiologischen Gegebenheiten, da die Zellen zuvor durch Serumentzug synchronisiert wurden (siehe 2.2.1.4) [190]. Da eine Synchronisierung der Zellen in vivo unwahrscheinlich erscheint, wurden in einem anderen Versuchsansatz die spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten untersucht, was bedeutet, dass die Zellen zuvor nicht synchronisiert wurden (siehe 2.2.8.2). Die detektierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei spontane Transienten stellen sich in Form von Oszillationen dar (siehe Abbildung 1.10 B) wohingegen sich die detektierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale der akuten Transienten als Kurve darstellen, welche zum Zeitpunkt der Zugabe von Calcium rasch ansteigt und danach wieder langsam absinkt (siehe Abbildung 3.5). Während bei der Messung akute Transienten in nahezu allen Fällen (99,9%) detektiert wurden (siehe Abbildung 3.5 A), konnten nur bei 9,6% der Zellen eine spontane Oszillation beobachtet werden (siehe Abbildung 3.6). Bei der Untersuchung spontaner Oszillationen schien die Kultivierungszeit eine wichtige Rolle zu spielen da mit zunehmenden Kultivierungszeiträumen vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale detektiert wurden. So wurden nur 15% der detektierten Signale von spontanen Oszillationen nach einer 24-stündigen Kultivierungszeit beobachtet, wohingegen nach 48 Stunden 34% und nach einer 72-stündigen

Kultivierungszeit 51% der Signale beobachtet wurden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sich nach Anlegen von Zellkulturen die Zellen zunächst am Gefäßboden ansiedeln müssen, bevor sie mit der Zellteilung beginnen können. Dies dauert einige Zeit und so liegt der Schluss nahe, dass erst wenige Zellen nach Ablauf der ersten 24 Stunden mit der Zellteilung angefangen haben, was die geringe Anzahl der oszillierenden Zellen erklären würde, da diese Calciumoszillationen häufig am Übergang G1/S zu finden sind [190].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch überprüft, inwiefern das Auftreten und die Amplitude spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten durch eine Blockade des TRPM3-Kanals mit MEF reduziert werden können. Dabei konnte unter alleiniger Behandlung mit MEF bei 71% der oszillierenden Zellen eine Abnahme der Oszillationsfrequenz bzw. eine Verringerung der Oszillationsamplitude beobachtet werden. Bei einer Kombinationsbehandlung mit MEF und TRAM-34 lag dieser Wert bei 74%. Doch wie auch schon bei der Untersuchung der akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (siehe Abbildung 3.6) zeigt auch hier die alleinige SK4-Kanalinhinhibition mit TRAM-34 die stärkste Wirkung. Unabhängig von der Kultivierungszeit wurde hier bei etwa 84% der oszillierenden Zellen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx deutlich abgeschwächt oder kam gänzlich zum Erliegen (Hoang Y Nguyen, *Pharmakologisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie*).

Mögliche Erklärungen für den etwas schwächeren Effekt von MEF im Vergleich zur TRAM-34 könnte sein, dass das mRNA-Expressionslevel des TRPM3-Kanal im Vergleich zum SK4-Kanal in MMTV PyMT Brusttumorzellen deutlich niedriger liegt was bereits vorangegangene Untersuchungen belegen (Hoang Y Nguyen und Friederike Steudel (siehe Kapitel 1.6) *Pharmakologisches Institut, LS Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie*) sowie die vorliegende Arbeit bestätigt (siehe Kapitel 3.1). Zwar lässt dies keine Aussage bezüglich der Kanalproteinaktivität zu, jedoch könnte es ein Hinweis darauf geben. Eine weitere Möglichkeit könnte darin liegen, dass eine Hemmung des SK4 durch TRAM-34 eine Aktivierung weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanäle in der Zellmembran verhindert, wohingegen die Hemmung des TRPM3-Kanal keine bzw. wenig Effekte auf die Aktivität anderer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aufweist oder sogar im Gegenteil aktivierend auf andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wirkt. Zwar wurde der MEF eine selektive Hemmung des TRPM3 bestätigt, allerdings nur innerhalb der TRPM-Familie. Es

ist noch nicht endgültig geklärt, ob MEF eine aktivierende Wirkung auf andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle besitzt [166].

Interessanterweise war die MEF und TRAM-34 Sensitivität der Zellen nach kurzen Kultivierungszeiträumen größer. Nach 24-stündiger Behandlung mit TRAM-34 bzw. der Kombination aus MEF und TRAM-34 ließ sich eine vollständige Hemmung bzw. eine sehr starke Abnahme der Oszillationen und somit auch des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx beobachten (siehe Abbildung 3.7). In dem entsprechenden Vergleichszeitraum nahmen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen bzw. deren Amplituden in ca. 50% der unbehandelten Zellen ab. Auch mit steigender Kultivierungsdauer sinkt die Sensitivität der Zellen gegenüber TRAM-34 bzw. TRAM34/MEF. So wurden nach einer Kultivierungszeit von 72 Stunden die geringsten Effekte verzeichnet (siehe Abbildung 3.7). Interessanterweise scheinen sich die Effekte der verschiedenen Wirkstoffe immer weiter anzugleichen. D.h. die Zellen reagieren nach 72 Stunden ähnlich auf die Zugabe der verschiedenen Inhibitoren. So unterscheiden sich die Effekte von TRAM-34, MEF sowie der Kombination aus beiden nach 72 stündiger Kultivierungszeit lediglich um wenige Prozent. Eine mögliche Erklärung könnte darin begründet liegen, dass sowohl MEF als auch TRAM-34 mit zunehmender Kultivierungszeit mit anderen Substraten um Rezeptorbindungsstellen konkurrieren müssen, wodurch immer mehr Rezeptoren durch andere Substrate belegt sind. Folglich erreichen die Wirkungen der SK4- und TRPM3-Inhibitoren ein Wirkungsmaximum, da nicht mehr Bindungsstellen zur Verfügung stehen.

Möglicherweise können die unterschiedlichen Effekte zu den verschiedenen Kultivierungszeiträumen dadurch erklärt werden, dass sich die Zellen bei kurzer Kultivierungszeit noch nicht vollständig am Gefäßboden angesiedelt haben und damit noch sensitiver auf die inhibitorischen Wirkstoffe reagieren.

#### **4.5 COX-unabhängige Entstehung von $\text{Ca}^{2+}$ - Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen**

Laut einer Studie handelt es sich bei Mefenaminsäure (MEF) um einen selektiven TRPM3-Kanal-Inhibitor [166]. Allerdings gehört dieser Wirkstoff der Gruppe der NSAIDs an, welche bekanntlich als Entzündungshemmer und Schmerzstiller über eine Blockade des COX-Systems wirken [195]. Daher könnte die in 6.2-6.4

durch MEF herbeigeführte Hemmung der akuten und spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten sowie die Hemmung der Proliferation der MMTV PyMT Brusttumorzellen auch über die COX-Signalkaskade ausgelöst werden. Um dies zu überprüfen, wurden die akuten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen in Gegenwart des spezifischen COX-Inhibitors Diclofenac betrachtet (s. 5.4.1). Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei den akuten Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten  $\pm$ MEF bzw. TRAM-34. Entsprechend zeigten 99% der untersuchten Zellen nach Stimulation eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort und konnten somit für die Auswertung herangezogen werden.

Zuerst wurde die mRNA-Expression von COX1 (Gen=PTGS1) und COX2 (Gen=PTGS2) in den Zellen mittels qPCR nachgewiesen. Hierbei konnte eine 6-fach erhöhte Expression von COX2 gegenüber COX1 detektiert werden. Auch in anderen Studien konnte bereits eine Expression von COX2 in Brusttumorgewebe nachgewiesen werden, wohingegen in normalem Brusttumorgewebe keine COX2-Expression stattfindet. Allerdings ist sich die Literatur uneins darüber, ab wann und in welchem Maße COX2 in Brusttumoren synthetisiert wird. Allerdings liegt der Schluss nahe, dass vor allem große und invasive Tumoren zur COX2-Expression neigen. [212-214]. Des Weiteren könnte bereits gezeigt werden, dass hormonabhängige Brusttumoren, welche Estrogen für ihr Wachstum benötigen, zur erhöhten COX2-Expression neigen. Auch die häufige, mit Brusttumoren assoziierte HER2-Überexpression korreliert mit der COX2-Expression [215].

Nach Ermittlung der mRNA-Expression von COX1 und COX2 wurden also akute  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten unter Zugabe von Diclofenac untersucht. Dabei wurde Diclofenac in einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  verwendet. In Untersuchungen, welche durch eine andere Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, wurden sogar noch niedrigere Konzentrationen verwendet. Dabei ermittelten sie eine  $\text{IC}_{50}$  von Diclofenac für COX2 von 0,026  $\mu\text{M}$  [194]. Allerdings haben andere Arbeitsgruppen auch deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt, um Einflüsse von NSAIDs auf das Wachstum von Brusttumorzellen zu untersuchen. Dabei stößt man jedoch auch auf Berichte, nach welchen es in diesen Untersuchungen auch zu spontanen COX-unabhängigen Wachstumseffekten kam. Des Weiteren lagen die Wirkspiegel in diesen Versuchen in einem Bereich, welcher für Menschen toxisch wäre. Außerdem ist eine Anreicherung dieser Wirkstoffe im

Körper in solch hohen Konzentrationen unwahrscheinlich bzw. nicht möglich [216]. Im Rahmen dieser Arbeit wollte man jedoch lediglich die Effekte von Diclofenac als reinen COX-Hemmer ermitteln. Deshalb erhoffte man sich durch den Einsatz von Diclofenac in geringen Dosen aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen, ohne die durch Raz et al. erwähnten Effekte herbeizuführen.

Diclofenac zeigte in unseren Untersuchungen keinen Effekt auf akute  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen (siehe Abbildung 3.8). Die MEF-vermittelte Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (siehe Kapitel 1.6.6 bzw. 3.4) verläuft folglich COX-unabhängig, über eine Hemmung der TRPM3-Kanäle. Allerdings könnten hier in weiterführenden Untersuchungen zu diesem Thema durchaus auch weitere Versuchsreihen mit anderen Konzentrationen von Diclofenac durchgeführt werden, um auch eine gewisse Bandbreite an wirksamen bzw. unwirksamen Konzentrationen zu ermitteln. In einer in vivo Studie zur Untersuchung des Wachstums von Eierstockkarzinomen konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung von Diclofenac (200  $\mu\text{M}$ ) die Apoptose dieser Tumorzellen angeregt wird, wodurch es zu einer Inhibition des Tumorwachstums kommt [217].

Neben all den bereits erwähnten Kanälen könnte auch das Enzym COX2 bei der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden für Brusttumoren herangezogen werden. Auch in dieser Richtung wurden bereits etliche Untersuchungen durchgeführt, welche z.T. zu sehr interessanten Ergebnissen führten. Durch die erhöhten Estradiolspiegel in Brusttumoren [218] kommt es folglich auch zu einer erhöhten Aromatase Expression [219] sowie Aktivität [218, 220] in Brusttumoren. Da Aromatase an der Biosynthese von Estrogen beteiligt ist [221]. Weitere Untersuchungen zeigen eine Beteiligung von CYP19 an der Aromatase Expression auf. Des Weiteren konnte auch schon ein linearer Zusammenhang zwischen der COX1 und COX2 Expression und der CYP19 Expression festgestellt werden [222, 223]. In weiterführenden Studien welche unter anderem an MCF-7 Zellen durchgeführt wurden, konnte durch den Einsatz von NSAIDs und spezifischen COX2-Inhibitoren sowohl die Aromatase- als auch CYP19-Expression gesenkt werden [224]. Dadurch lässt sich die Vermutung anstellen, dass sich über eine COX2-Expression eventuell auch das Brusttumorwachstum beeinflussen lässt.

## 4.6 Effekt des SK4-Aktivators DCEBIO auf akute $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in MMTV PyMT Brusttumorzellen

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition von SK4-Kanälen durch TRAM-34 in einer deutlichen Abnahme  $\text{Ca}^{2+}$  +FCS-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten resultiert. Da SK4 ein  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Kaliumkanal und daher nicht für  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel ist, bedeutet dies, dass SK4 mit anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanälen interagieren muss. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher überprüft werden, ob es sich bei dem Calcium-FCS-induzierten Anstieg um den maximalen Effekt handelt oder ob dieser noch durch einen SK4-Kanalaktivator steigerbar ist. Dazu wurde der gängige Aktivator DCEBIO eingesetzt [225]. DCEBIO ist wie das bereits früher Entdeckte 1-EBIO (1-Ethyl-2-Benzimidazolinon) ein Aktivator des SK4 [226]. Allerdings handelt es sich bei DCEBIO um einen deutlich potenteren Aktivator [225]. Die Auswertung ergab ein recht unerwartetes Ergebnis. Die durch DCEBIO in vorinkubierten Zellen ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude war gegenüber der  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude der Zellen der Kontrollgruppe ( $\text{Ca}^{2+}$  +FCS) deutlich reduziert (siehe Abbildung 3.9A). Möglicherweise führt die Vorinkubation mit DCEBIO zu einer verstärkten Aktivierung von SK4-Kanälen. Da zu diesem Zeitpunkt jedoch kein  $\text{Ca}^{2+}$  zur Verfügung steht ist kein erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom möglich. Zum Zeitpunkt der Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  waren die SK4-Kanäle möglicherweise teilweise deaktiviert bzw. refraktär, was den elektrochemischen Gradienten beeinflusst und in der Folge auch andere Kanäle wie z.B. TRPM3 oder TRPM7. Dies könnte den verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx erklären. Des Weiteren konnte durch Untersuchungen an Glattmuskelzellen bereits gezeigt werden, dass  $K_{\text{Ca}}$  über eine negative Feedbackschleife an einem Mechanismus mitbeteiligt ist. Dieser Mechanismus soll einen exzessiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und somit eine zu hohe  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verhindern. Dies geschieht über eine Senkung der Aktivität spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [227]. Eine weitere Studie kommt zu dem Ergebnis, dass DCEBIO im Konzentrationsbereich in welchem es zur Aktivierung von SK4-Kanälen kommt die Ströme spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle merkbar senkt [228]. Zwar wurden die Untersuchungen nicht an Tumorzellen durchgeführt, könnten jedoch im Zusammenhang der Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit ein Hinweis darauf geben, dass spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle auch in MMTV PyMT Brusttumorzellen eine wichtige Funktion beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx innehaben.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine zweite Versuchsreihe ohne DCEBIO-Vorinkubation durchgeführt. Diese Zellen zeigten nun wie erwartet einen deutlichen Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx bei Zugabe von DCEBIO (siehe Abbildung 3.9B).

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass DCEBIO tatsächlich positive Effekte auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx von MMTV PyMT Brusttumorzellen zu haben scheint. Durch den Verzicht der Vorinkubation der SK4-Kanäle mit DCEBIO blieb die oben genannte verfrühte Überaktivierung aus, worüber der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx gesteigert wurde. Allerdings lässt sich diese Vermutung hiermit nicht bestätigen, widerlegt sie jedoch auch nicht. Aufschluss könnten hier Patch-Clamp Untersuchungen geben, bei welchen die Ströme der Kanäle direkt vermessen werden könnten.

#### **4.7 Nachweis weiterer Komponenten des $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings in MMTV PyMT und MMTV cNeu Brusttumorzellen**

Da durch die Hemmung der SK4- und TRPM3-Kanäle keine vollständige Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx sowie der Zellproliferation in MMTV PyMT Brusttumorzellen zu erreichen ist, legt dies den Schluss nahe, dass weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bzw. Komponenten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalings an diesen Vorgängen beteiligt sind. Deshalb wurden in präliminären Analysen weitere Komponenten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs untersucht. Dieser Nachweis erfolgte mittels qPCR (siehe 3.7). Dabei konnten sowohl TRPM7-Kanäle als auch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren und speichergesteuerte Kanäle des STIM/Orai-Systems (*Store-Operated Calcium Entry, SOCE*), STIM1 und STIM2 sowie Orai1 in MMTV PyMT und MMTV cNeu Brusttumorzellen nachgewiesen werden. Diesen Strukturen wird eine mögliche entscheidende Rolle in der Brusttumorthherapie zugesprochen (s.u.).

MMTV PyMT Brusttumorzellen wiesen große Mengen an STIM1, STIM2 und insbesondere Orai1 mRNA auf. Ihre Funktionsweise wurde bereits in Kapitel 1.5 beschrieben. Es sind zwei Gruppen von STIM Molekülen bekannt, STIM1 und STIM2. STIM1 kann sowohl im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als auch in geringeren Mengen in der Plasmamembran (PM) nachgewiesen werden, wohingegen STIM2 nur im ER nachgewiesen werden konnte [229, 230]. Im Gegensatz dazu sind von den Orai Molekülen drei Gruppen bekannt, Orai1,



Orai2 und Orai3 [231]. Bereits 2008 konnten Yang et al. zeigen, dass das Zusammenspiel von STIM1 und Orai1 eine wichtige Rolle bei Brusttumoren spielt. Sowohl in vitro für die Tumorzellmigration als auch im Mausmodell für die Metastasierung von Brusttumorzellen sind die Strukturen von essentieller Bedeutung. So konnte zum einen durch pharmakologische Inhibition von STIM1 und Orai1 durch den Inhibitor SKF-96365 eine Abnahme der Metastasierung im Mausmodell erreicht werden. Zum anderen gelang es durch eine Reduktion von STIM1 und Orai1 mittels RNA-Interferenz eine Abnahme der Metastasierung hochgradig metastasierenden humanen Brusttumorzellen in Mäusen zu erreichen [232].

Auch für TRPM7 konnte bereits ein Mitwirken bei der Tumorgenese des Mammakarzinoms nachgewiesen werden. So zeigte sich, dass der TRPM7 unter anderem bei der Proliferation von Brusttumorzellen eine wichtige Rolle einnimmt. So konnte durch Inhibition des TRPM7 durch siRNA in MCF-7 Zelllinien eine Reduktion des basalen  $[Ca^{2+}]_i$  und damit einhergehend eine Reduktion des Zellwachstums erreicht werden [113]. Des Weiteren konnte auch eine Beteiligung des TRPM7 an der Zelladhäsion sowie der Entstehung von Metastasen nachgewiesen werden. In ausgeprägten Primärtumoren konnte eine erhöhte Expression des TRPM7 detektiert werden [113, 177]. All diese Ergebnisse machen den TRPM7 zu einem interessanten und auch potenziell wichtigen Ziel in der Therapie von Brusttumoren. Daher sollten in dieser Richtung weitere Untersuchungen vorgenommen werden, welche das Mitwirken des TRPM7 im Zusammenhang mit Brusttumoren oder Tumoren allgemein bestätigen.

Allerdings ist es momentan noch relativ schwer, Versuche mit spezifischen Inhibitoren durchzuführen, da alle bekannten Substanzen auch andere Strukturen beeinflussen [179-181]. Am vielversprechendsten ist Waixenicin A, was als spezifischer jedoch auch als irreversibler Inhibitor von TRPM7-Kanälen gehandelt wird [184, 185]. Allerdings müssen hierzu noch weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Trotzdem scheinen die TRPM7-Kanäle großes Potential hinsichtlich der Tumorthherapie zu bergen. Eine Alternative zum spezifischen Inhibitor stellen Sphingosine, FTY720 [180], Carvacrol [179], 2-APB [182] und noch eine Reihe anderer Substanzen [233].

Allerdings sind die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit lediglich ein Hinweis darauf, dass die oben erwähnten Strukturen in den Zellen exprimiert werden. Ob bzw. inwiefern sie funktional sind muss erst durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Allerdings lässt sich das Potenzial sowohl von TRPM7-, als auch von STIM/Orai-Kanälen als therapeutische Zielstrukturen für die Behandlung von Brusttumoren sowie Tumoren insgesamt erahnen.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Untersuchungen zur möglichen Interaktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanals SK4 mit dem TRPM3-Kanal, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kationen-Kanal, im MMTV PyMT Brusttumorzellmodell durchgeführt. Diese Analysen sollten teilweise vorangegangene Experimente bestätigen und haben außerdem neue Erkenntnisse bezüglich der mRNA-Expression,  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik sowie Proliferation der Zellen in Abhängigkeit von SK4 und TRPM3 geliefert.

Konkret zeigten quantitativen Untersuchungen zur mRNA Expression von TRPM3 und des verwandten TRPM7-Kanals, dass beide TRPM-Kanäle im nativen MMTV PyMT Brusttumorgewebe abundanter sind als in dem *in vitro* Brusttumorzellmodell, was darauf hinweist, dass TRPM3/7 auch in Zellen des Tumorstromas (Endothelzellen, Tumor-assoziierte Fibroblasten usw.) vorkommen. Versuche mit Mefenaminsäure (MEF), einem NSAR das auch als TRPM3-Kanalinhibitor wirkt, implizieren anti-proliferative Effekte für die pharmakologische Inhibition von TRPM3 in MMTV PyMT Brusttumorzellen. Dieser Effekt erreichte im Vergleich zu unbehandelten Zellen jedoch nicht das Signifikanzniveau. Untersuchungen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik weisen allerdings auf eine Abnahme des Wachstumsfaktor-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nach pharmakologischer Inhibition von TRPM3 durch MEF hin. Analoge Untersuchungen zur pharmakologischen Inhibition des SK4-Kanals mittels TRAM-34 in den MMTV PyMT Brusttumorzellen hatten einen in der Ausprägung ähnlichen jedoch in der Intensität viel stärkeren Effekt auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. In diesem Zusammenhang bestätigte auch die gesteigerte Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nach Applikation von DCEBIO, einem SK4-Kanal Aktivator, die Bedeutung des SK4 Kanals für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik der MMTV PyMT Brusttumorzellen. Die TRAM-34-Applikation führte darüber hinaus zu einer signifikanten Hemmung der MMTV PyMT Brusttumorzellproliferation. Eine gleichzeitige Inhibition von TRPM3 und SK4 mittels MEF und TRAM-34 hatte dagegen keine synergistischen Effekte auf verschiedene Parameter der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase oder das Proliferationsverhalten. Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass die von TRPM3 und SK4 modulierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der MMTV PyMT Brusttumorzellen haben.

Da MEF als NSAR auch COX1/2-abhängige Effekte hat, wurde in einer weiterführenden Versuchsreihe untersucht, inwiefern COX1/2 Hemmung die  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik der nachweislich COX1/2-positiven Brusttumorzellen beeinflusst. Der TRPM3-unabhängige COX1/2 Inhibitor Diclofenac hatte jedoch keinen Effekt auf den Wachstumsfaktor-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass die Hemmung der TRPM3 Kanäle für die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik durch MEF eine übergeordnete Rolle spielt.

Abschließend wurden auch Analysen zu alternativen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanälen in den MMTV PyMT Brusttumorzellen durchgeführt. Die funktionale Bedeutung der im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Nachweise für STIM1, STIM2 und Orai1, welche Teil des sogenannten „*store operated calcium entry*“ sind, für  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik und Proliferation muss aber zukünftigen Untersuchungen überlassen bleiben.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] **Siegel, R., et al.**, *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 9-29.
- [2] **Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer**, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
- [3] **Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald**, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
- [4] **Brinton, L.A., R. Hoover, and J.F. Fraumeni, Jr.**, *Reproductive factors in the aetiology of breast cancer*. Br J Cancer, 1983. **47**(6): p. 757-62.
- [5] **Newcomb, P.A., et al.**, *Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer*. N Engl J Med, 1994. **330**(2): p. 81-7.
- [6] **Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C.**, *Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies*. Lancet Oncol, 2012. **13**(11): p. 1141-51.
- [7] **Thompson, W.D.**, *Genetic epidemiology of breast cancer*. Cancer, 1994. **74**(1 Suppl): p. 279-87.
- [8] **Gambrell, R.D., Jr.**, *Hormones in the etiology and prevention of breast and endometrial cancer*. South Med J, 1984. **77**(12): p. 1509-15.
- [9] **Friedenson, B.**, *BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian*. MedGenMed, 2005. **7**(2): p. 60.
- [10] **Venkitaraman, A.R.**, *Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2*. Cell, 2002. **108**(2): p. 171-82.
- [11] **Miki, Y., et al.**, *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
- [12] **Wooster, R., et al.**, *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 789-92.
- [13] **Noh, J.M., et al.**, *Association between BRCA Mutation Status, Pathological Findings, and Magnetic Resonance Imaging Features in Patients with Breast Cancer at Risk for the Mutation*. J Breast Cancer, 2013. **16**(3): p. 308-14.
- [14] **Slamon, D.J., et al.**, *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
- [15] **Guy, C.T., et al.**, *Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10578-82.
- [16] **Fantozzi, A. and G. Christofori**, *Mouse models of breast cancer metastasis*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(4): p. 212.
- [17] **Lin, E.Y., et al.**, *Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 2113-26.
- [18] **Callahan, R.**, *MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1996. **39**(1): p. 33-44.
- [19] **Lifsted, T., et al.**, *Identification of inbred mouse strains harboring genetic modifiers of mammary tumor age of onset and metastatic progression*. Int J Cancer, 1998. **77**(4): p. 640-4.

- [20] **Davie, S.A., et al.**, *Effects of FVB/NJ and C57Bl/6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice.* Transgenic Res, 2007. **16**(2): p. 193-201.
- [21] **Ellies, L.G., et al.**, *Mammary tumor latency is increased in mice lacking the inducible nitric oxide synthase.* Int J Cancer, 2003. **106**(1): p. 1-7.
- [22] **Guy, C.T., et al.**, *Activation of the c-Src tyrosine kinase is required for the induction of mammary tumors in transgenic mice.* Genes Dev, 1994. **8**(1): p. 23-32.
- [23] **Guy, C.T., R.D. Cardiff, and W.J. Muller**, *Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(3): p. 954-61.
- [24] **Cheng, S.H., et al.**, *Peptide antibodies to the human c-fyn gene product demonstrate pp59c-fyn is capable of complex formation with the middle-T antigen of polyomavirus.* EMBO J, 1988. **7**(12): p. 3845-55.
- [25] **Courtneidge, S.A. and A.E. Smith**, *The complex of polyoma virus middle-T antigen and pp60c-src.* EMBO J, 1984. **3**(3): p. 585-91.
- [26] **Andrechek, E.R. and W.J. Muller**, *Tyrosine kinase signalling in breast cancer: tyrosine kinase-mediated signal transduction in transgenic mouse models of human breast cancer.* Breast Cancer Res, 2000. **2**(3): p. 211-6.
- [27] **Webster, M.A., R.D. Cardiff, and W.J. Muller**, *Induction of mammary epithelial hyperplasias and mammary tumors in transgenic mice expressing a murine mammary tumor virus/activated c-src fusion gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7849-53.
- [28] **Wyckoff, J., et al.**, *A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors.* Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7022-9.
- [29] **Lin, E.Y., et al.**, *Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy.* J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 727-40.
- [30] **Lopez, J.I., et al.**, *CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression.* Cancer Res, 2005. **65**(15): p. 6755-63.
- [31] **Huang, X. and L.Y. Jan**, *Targeting potassium channels in cancer.* J Cell Biol, 2014. **206**(2): p. 151-162.
- [32] **Kunzelmann, K.**, *Ion channels and cancer.* J Membr Biol, 2005. **205**(3): p. 159-73.
- [33] **Overington, J.P., B. Al-Lazikani, and A.L. Hopkins**, *How many drug targets are there?* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(12): p. 993-6.
- [34] **Jenkinson, D.H.**, *Potassium channels--multiplicity and challenges.* Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S63-71.
- [35] **Gutman, G.A., et al.**, *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels.* Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 473-508.
- [36] **Pardo, L.A. and W. Stuhmer**, *The roles of K(+) channels in cancer.* Nat Rev Cancer, 2014. **14**(1): p. 39-48.
- [37] **Ouadid-Ahidouch, H., et al.**, *Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression.* Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(1): p. C125-34.
- [38] **Malhi, H., et al.**, *KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting.* J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26050-7.

- [39] **Klimatcheva, E. and W.F. Wonderlin**, *An ATP-sensitive K(+) current that regulates progression through early G1 phase of the cell cycle in MCF-7 human breast cancer cells*. *J Membr Biol*, 1999. **171**(1): p. 35-46.
- [40] **Patel, A.J. and M. Lazdunski**, *The 2P-domain K+ channels: role in apoptosis and tumorigenesis*. *Pflugers Arch*, 2004. **448**(3): p. 261-73.
- [41] **Mu, D., et al.**, *Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene*. *Cancer Cell*, 2003. **3**(3): p. 297-302.
- [42] **Sandhiya, S. and S.A. Dkhar**, *Potassium channels in health, disease & development of channel modulators*. *Indian J Med Res*, 2009. **129**(3): p. 223-32.
- [43] **Benninger, R.K., et al.**, *Defects in beta cell Ca(2)+ signalling, glucose metabolism and insulin secretion in a murine model of K(ATP) channel-induced neonatal diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2011. **54**(5): p. 1087-97.
- [44] **Schenzer, A., et al.**, *Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K+ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine*. *J Neurosci*, 2005. **25**(20): p. 5051-60.
- [45] **Werner, M.E., et al.**, *Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel*. *J Physiol*, 2005. **567**(Pt 2): p. 545-56.
- [46] **Abdul, M. and N. Hoosein**, *Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer*. *Oncol Rep*, 2002. **9**(5): p. 961-4.
- [47] **Chang, K.W., et al.**, *The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2003. **32**(10): p. 606-11.
- [48] **Farias, L.M., et al.**, *Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6996-7001.
- [49] **O'Grady, S.M. and S.Y. Lee**, *Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(8): p. 1578-94.
- [50] **Jehle, J., et al.**, *Novel roles for hERG K(+) channels in cell proliferation and apoptosis*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e193.
- [51] **Abdul, M. and N. Hoosein**, *Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer*. *Cancer Lett*, 2002. **186**(1): p. 99-105.
- [52] **Suzuki, T. and K. Takimoto**, *Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells*. *Int J Oncol*, 2004. **25**(1): p. 153-9.
- [53] **Jager, H., et al.**, *Blockage of intermediate-conductance Ca2+-activated K+ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro*. *Mol Pharmacol*, 2004. **65**(3): p. 630-8.
- [54] **Hoffmann, E.K.**, *Ion channels involved in cell volume regulation: effects on migration, proliferation, and programmed cell death in non adherent EAT cells and adherent ELA cells*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **28**(6): p. 1061-78.
- [55] **Hoffmann, E.K. and S.F. Pedersen**, *Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011. **202**(3): p. 465-85.
- [56] **Neylon, C.B.**, *Potassium channels and vascular proliferation*. *Vascul Pharmacol*, 2002. **38**(1): p. 35-41.
- [57] **Meera, P., et al.**, *Large conductance voltage- and calcium-dependent K+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 14066-71.

- [58] Vergara, C., et al., *Calcium-activated potassium channels*. Curr Opin Neurobiol, 1998. **8**(3): p. 321-9.
- [59] Blatz, A.L. and K.L. Magleby, *Single apamin-blocked Ca-activated K<sup>+</sup> channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle*. Nature, 1986. **323**(6090): p. 718-20.
- [60] Cui, J., H. Yang, and U.S. Lee, *Molecular mechanisms of BK channel activation*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(5): p. 852-75.
- [61] Shen, K.Z., et al., *Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in Xenopus oocytes: evidence for tetrameric channel formation*. Pflugers Arch, 1994. **426**(5): p. 440-5.
- [62] Oeggerli, M., et al., *Role of KCNMA1 in breast cancer*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41664.
- [63] Chen, L., et al., *Functionally diverse complement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel (BK) alpha-subunits generated from a single site of splicing*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33599-609.
- [64] Berkefeld, H., B. Fakler, and U. Schulte, *Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: from protein complexes to function*. Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1437-59.
- [65] Tseng-Crank, J., et al., *Cloning, expression, and distribution of a Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel beta-subunit from human brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9200-5.
- [66] Behrens, R., et al., *hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family*. FEBS Lett, 2000. **474**(1): p. 99-106.
- [67] Brenner, R., et al., *Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6453-61.
- [68] Uebele, V.N., et al., *Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23211-8.
- [69] Logsdon, N.J., et al., *A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32723-6.
- [70] Weisbrod, D., et al., *SK4 Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel is a critical player in cardiac pacemaker derived from human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(18): p. E1685-94.
- [71] Wulff, H., et al., *Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: a potential immunosuppressant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 8151-6.
- [72] Joiner, W.J., et al., *hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 11013-8.
- [73] Jensen, B.S., et al., *Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 1): p. C848-56.
- [74] Vandorpe, D.H., et al., *cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> channel, mIK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21542-53.
- [75] Dufer, M., et al., *Enhanced glucose tolerance by SK4 channel inhibition in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 2009. **58**(8): p. 1835-43.
- [76] Shumilina, E., et al., *Blunted IgE-mediated activation of mast cells in mice lacking the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel KCa3.1*. J Immunol, 2008. **180**(12): p. 8040-7.



- [77] **Si, H., et al.**, *Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel*. *Circ Res*, 2006. **99**(5): p. 537-44.
- [78] **Parihar, A.S., et al.**, *Effects of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel modulators on human prostate cancer cell proliferation*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **471**(3): p. 157-64.
- [79] **Wang, Z.H., et al.**, *Blockage of intermediate-conductance-Ca(2+) -activated K(+) channels inhibits progression of human endometrial cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(35): p. 5107-14.
- [80] **Nguyen, H.Y., et al.**, *Rolle von SK4- und BK-Kanälen für das Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen*. 2013.
- [81] **Fauzi, M., et al.**, *Intermediate Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels are necessary for prolactin-induced proliferation in breast cancer cells*. *J Membr Biol*, 2010. **234**(1): p. 47-56.
- [82] **Ishii, T.M., et al.**, *A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(21): p. 11651-6.
- [83] **Rodrigues, A.D., et al.**, *Interactions of imidazole antifungal agents with purified cytochrome P-450 proteins*. *Biochem Pharmacol*, 1987. **36**(24): p. 4277-81.
- [84] **Toyama, K., et al.**, *The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(9): p. 3025-37.
- [85] **Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick**, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(7): p. 517-29.
- [86] **Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman**, *The versatility and universality of calcium signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 11-21.
- [87] **Rios, E. and G. Brum**, *Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle*. *Nature*, 1987. **325**(6106): p. 717-20.
- [88] **Ebashi, S.**, *Calcium ions and muscle contraction*. *Nature*, 1972. **240**(5378): p. 217-8.
- [89] **Tsien, R.W., et al.**, *Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation*. *Trends Neurosci*, 1988. **11**(10): p. 431-8.
- [90] **Clapham, D.E.**, *Calcium signaling*. *Cell*, 2007. **131**(6): p. 1047-58.
- [91] **Carafoli, E.**, *Intracellular calcium homeostasis*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 395-433.
- [92] **Cheng, H., et al.**, *Excitation-contraction coupling in heart: new insights from Ca<sup>2+</sup> sparks*. *Cell Calcium*, 1996. **20**(2): p. 129-40.
- [93] **Kirichok, Y., G. Krapivinsky, and D.E. Clapham**, *The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel*. *Nature*, 2004. **427**(6972): p. 360-4.
- [94] **Palty, R., et al.**, *NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 436-41.
- [95] **Catterall, W.A.**, *Voltage-gated calcium channels*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(8): p. a003947.
- [96] **Robert, V., et al.**, *Calcium signalling in T-lymphocytes*. *Biochimie*, 2011. **93**(12): p. 2087-94.
- [97] **Fanger, C.M., A.L. Neben, and M.D. Cahalan**, *Differential Ca<sup>2+</sup> influx, KCa channel activity, and Ca<sup>2+</sup> clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes*. *J Immunol*, 2000. **164**(3): p. 1153-60.
- [98] **Craven, K.B. and W.N. Zagotta**, *CNG and HCN channels: two peas, one pod*. *Annu Rev Physiol*, 2006. **68**: p. 375-401.

- [99] **Bortolotto, Z.A., et al.**, *A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation*. *Nature*, 1994. **368**(6473): p. 740-3.
- [100] **Watkins, J.C. and D.E. Jane**, *The glutamate story*. *Br J Pharmacol*, 2006. **147 Suppl 1**: p. S100-8.
- [101] **Surprenant, A. and R.A. North**, *Signaling at purinergic P2X receptors*. *Annu Rev Physiol*, 2009. **71**: p. 333-59.
- [102] **Putney, J.W., Jr.**, *A model for receptor-regulated calcium entry*. *Cell Calcium*, 1986. **7**(1): p. 1-12.
- [103] **Zhang, S.L., et al.**, *Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(24): p. 9357-62.
- [104] **Feske, S., et al.**, *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 179-85.
- [105] **Lewis, R.S.**, *Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(12).
- [106] **Mignen, O., J.L. Thompson, and T.J. Shuttleworth**, *Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore*. *J Physiol*, 2008. **586**(2): p. 419-25.
- [107] **Brandman, O., et al.**, *STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels*. *Cell*, 2007. **131**(7): p. 1327-39.
- [108] **Monteith, G.R., F.M. Davis, and S.J. Roberts-Thomson**, *Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(38): p. 31666-73.
- [109] **Roderick, H.L. and S.J. Cook**, *Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(5): p. 361-75.
- [110] **Wang, X.T., et al.**, *The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(5): p. 1549-62.
- [111] **Gray, L.S., et al.**, *The role of voltage gated T-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms in mediating "capacitative" Ca<sup>2+</sup> entry in cancer cells*. *Cell Calcium*, 2004. **36**(6): p. 489-97.
- [112] **VanHouten, J., et al.**, *PMCA2 regulates apoptosis during mammary gland involution and predicts outcome in breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(25): p. 11405-10.
- [113] **Guilbert, A., et al.**, *Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(3): p. C493-502.
- [114] **Azimi, I., S.J. Roberts-Thomson, and G.R. Monteith**, *Calcium influx pathways in breast cancer: opportunities for pharmacological intervention*. *British Journal of Pharmacology*, 2014. **171**(4): p. 945-960.
- [115] **Zheng, J.**, *Molecular mechanism of TRP channels*. *Compr Physiol*, 2013. **3**(1): p. 221-42.
- [116] **Montell, C. and G.M. Rubin**, *Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction*. *Neuron*, 1989. **2**(4): p. 1313-23.
- [117] **Montell, C.**, *Molecular genetics of Drosophila vision*. *Bioessays*, 1989. **11**(2-3): p. 43-8.
- [118] **Clapham, D.E.**, *TRP channels as cellular sensors*. *Nature*, 2003. **426**(6966): p. 517-24.

- [119] **Clapham, D.E., et al.**, *International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels*. *Pharmacol Rev*, 2005. **57**(4): p. 427-50.
- [120] **Clapham, D.E., L.W. Runnels, and C. Strubing**, *The TRP ion channel family*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(6): p. 387-96.
- [121] **Wu, L.J., T.B. Sweet, and D.E. Clapham**, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family*. *Pharmacol Rev*, 2010. **62**(3): p. 381-404.
- [122] **Moran, M.M., et al.**, *Transient receptor potential channels as therapeutic targets*. *Nat Rev Drug Discov*, 2011. **10**(8): p. 601-20.
- [123] **Dimke, H., J.G. Hoenderop, and R.J. Bindels**, *Molecular basis of epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport: insights from the TRP channel family*. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 7): p. 1535-42.
- [124] **Nilius, B., G. Owsianik, and T. Voets**, *Transient receptor potential channels meet phosphoinositides*. *EMBO J*, 2008. **27**(21): p. 2809-16.
- [125] **Dong, X.P., X. Wang, and H. Xu**, *TRP channels of intracellular membranes*. *J Neurochem*, 2010. **113**(2): p. 313-28.
- [126] **Erler, I., et al.**, *Ca<sup>2+</sup>-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34456-63.
- [127] **Hoenderop, J.G., et al.**, *Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6*. *EMBO J*, 2003. **22**(4): p. 776-85.
- [128] **Montell, C.**, *The TRP superfamily of cation channels*. *Sci STKE*, 2005. **2005**(272): p. re3.
- [129] **Montell, C., L. Birnbaumer, and V. Flockerzi**, *The TRP channels, a remarkably functional family*. *Cell*, 2002. **108**(5): p. 595-8.
- [130] **Beech, D.J., et al.**, *TRPC channel lipid specificity and mechanisms of lipid regulation*. *Cell Calcium*, 2009. **45**(6): p. 583-8.
- [131] **Hoffmann, C., et al.**, *The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(21): p. 14639-47.
- [132] **Okada, T., et al.**, *Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27359-70.
- [133] **Caterina, M.J., et al.**, *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. *Nature*, 1997. **389**(6653): p. 816-24.
- [134] **Talavera, K., B. Nilius, and T. Voets**, *Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers*. *Trends Neurosci*, 2008. **31**(6): p. 287-95.
- [135] **Vennekens, R., G. Owsianik, and B. Nilius**, *Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(1): p. 18-31.
- [136] **Vriens, J., G. Appendino, and B. Nilius**, *Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels*. *Mol Pharmacol*, 2009. **75**(6): p. 1262-79.
- [137] **Gaudet, R.**, *Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments*. *J Gen Physiol*, 2009. **133**(3): p. 231-7.
- [138] **Rohacs, T. and B. Nilius**, *Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides*. *Pflugers Arch*, 2007. **455**(1): p. 157-68.

- [139] **Zhu, M.X.**, *Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels.* Pflugers Arch, 2005. **451**(1): p. 105-15.
- [140] **Lishko, P.V., et al.**, *The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity.* Neuron, 2007. **54**(6): p. 905-18.
- [141] **Tomita, S., R.A. Nicoll, and D.S. Breddt**, *PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity.* J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. F19-24.
- [142] **Brakeman, P.R., et al.**, *Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors.* Nature, 1997. **386**(6622): p. 284-8.
- [143] **Fagni, L., P.F. Worley, and F. Ango**, *Homer as both a scaffold and transduction molecule.* Sci STKE, 2002. **2002**(137): p. re8.
- [144] **Tu, J.C., et al.**, *Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors.* Neuron, 1998. **21**(4): p. 717-26.
- [145] **Harteneck, C.**, *Function and pharmacology of TRPM cation channels.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2005. **371**(4): p. 307-14.
- [146] **Deeds, J., F. Cronin, and L.M. Duncan**, *Patterns of melastatin mRNA expression in melanocytic tumors.* Hum Pathol, 2000. **31**(11): p. 1346-56.
- [147] **Duncan, L.M., et al.**, *Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis.* Cancer Res, 1998. **58**(7): p. 1515-20.
- [148] **Hunter, J.J., et al.**, *Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (Mlsn1).* Genomics, 1998. **54**(1): p. 116-23.
- [149] **Oancea, E., et al.**, *TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes.* Sci Signal, 2009. **2**(70): p. ra21.
- [150] **Koike, C., et al.**, *TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 332-7.
- [151] **Morgans, C.W., et al.**, *TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(45): p. 19174-8.
- [152] **Shen, Y., et al.**, *A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells.* J Neurosci, 2009. **29**(19): p. 6088-93.
- [153] **Hara, Y., et al.**, *LTRPC2 Ca2+-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death.* Mol Cell, 2002. **9**(1): p. 163-73.
- [154] **Du, J., J. Xie, and L. Yue**, *Intracellular calcium activates TRPM2 and its alternative spliced isoforms.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7239-44.
- [155] **Kraft, R. and C. Harteneck**, *The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview.* Pflugers Arch, 2005. **451**(1): p. 204-11.
- [156] **Lange, I., et al.**, *TRPM2 functions as a lysosomal Ca2+-release channel in beta cells.* Sci Signal, 2009. **2**(71): p. ra23.
- [157] **Perraud, A.L., C. Schmitz, and A.M. Scharenberg**, *TRPM2 Ca2+-permeable cation channels: from gene to biological function.* Cell Calcium, 2003. **33**(5-6): p. 519-31.
- [158] **Perraud, A.L., et al.**, *Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels.* J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 6138-48.

- [159] **Kraft, R., et al.**, *Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(1): p. C129-37.
- [160] **Grimm, C., et al.**, *Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 21493-501.
- [161] **Lee, N., et al.**, *Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3)*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(23): p. 20890-7.
- [162] **Oberwinkler, J., et al.**, *Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(23): p. 22540-8.
- [163] **Wagner, T.F., et al.**, *Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(12): p. 1421-30.
- [164] **Naylor, J., et al.**, *Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction*. *Circ Res*, 2010. **106**(9): p. 1507-15.
- [165] **Grimm, C., et al.**, *Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine [corrected]*. *Mol Pharmacol*, 2005. **67**(3): p. 798-805.
- [166] **Klose, C., et al.**, *Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3*. *British Journal of Pharmacology*, 2011. **162**(8): p. 1757-1769.
- [167] **Ying, Z., et al.**, *Loss of miR-204 expression enhances glioma migration and stem cell-like phenotype*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 990-9.
- [168] **Launay, P., et al.**, *TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization*. *Cell*, 2002. **109**(3): p. 397-407.
- [169] **Hofmann, T., et al.**, *TRPM5 is a voltage-modulated and Ca<sup>2+</sup>-activated monovalent selective cation channel*. *Curr Biol*, 2003. **13**(13): p. 1153-8.
- [170] **Nilius, B., et al.**, *Voltage dependence of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(33): p. 30813-20.
- [171] **Prawitt, D., et al.**, *TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 15166-71.
- [172] **Schmitz, C., et al.**, *Regulation of vertebrate cellular Mg<sup>2+</sup> homeostasis by TRPM7*. *Cell*, 2003. **114**(2): p. 191-200.
- [173] **Voets, T., et al.**, *TRPM6 forms the Mg<sup>2+</sup> influx channel involved in intestinal and renal Mg<sup>2+</sup> absorption*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(1): p. 19-25.
- [174] **Schlingmann, K.P., et al.**, *Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family*. *Nat Genet*, 2002. **31**(2): p. 166-70.
- [175] **Walder, R.Y., et al.**, *Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia*. *Nat Genet*, 2002. **31**(2): p. 171-4.
- [176] **Schlingmann, K.P., et al.**, *Novel TRPM6 mutations in 21 families with primary hypomagnesemia and secondary hypocalcemia*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(10): p. 3061-9.
- [177] **Middelbeek, J., et al.**, *TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis*. *Cancer Res*, 2012. **72**(16): p. 4250-61.
- [178] **Park, H.S., et al.**, *The Pathophysiologic Roles of TRPM7 Channel*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014. **18**(1): p. 15-23.
- [179] **Parnas, M., et al.**, *Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels*. *Cell Calcium*, 2009. **45**(3): p. 300-9.

- [180] **Qin, X., et al.**, *Sphingosine and FTY720 are potent inhibitors of the transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels*. *Br J Pharmacol*, 2013. **168**(6): p. 1294-312.
- [181] **Chen, H.C., et al.**, *Blockade of TRPM7 channel activity and cell death by inhibitors of 5-lipoxygenase*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e11161.
- [182] **Li, M., J. Jiang, and L. Yue**, *Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7*. *J Gen Physiol*, 2006. **127**(5): p. 525-37.
- [183] **Dou, Y., et al.**, *Inhibition of cancer cell proliferation by midazolam by targeting transient receptor potential melastatin 7*. *Oncol Lett*, 2013. **5**(3): p. 1010-1016.
- [184] **Kim, B.J., et al.**, *The role of waixenicin A as transient receptor potential melastatin 7 blocker*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013. **112**(2): p. 83-9.
- [185] **Zierler, S., et al.**, *Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(45): p. 39328-35.
- [186] **McKemy, D.D., W.M. Neuhausser, and D. Julius**, *Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation*. *Nature*, 2002. **416**(6876): p. 52-8.
- [187] **Peier, A.M., et al.**, *A TRP channel that senses cold stimuli and menthol*. *Cell*, 2002. **108**(5): p. 705-15.
- [188] **Tsavalier, L., et al.**, *Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins*. *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3760-9.
- [189] **Dhaka, A., V. Viswanath, and A. Patapoutian**, *Trp ion channels and temperature sensation*. *Annu Rev Neurosci*, 2006. **29**: p. 135-61.
- [190] **Larsson, O. and J. Wejde**, *Dolichol delays G1-arrest for one cell cycle in human fibroblasts subjected to depletion of serum or mevalonate*. *J Cell Sci*, 1992. **103** ( Pt 4): p. 1065-72.
- [191] **Cos, S., J. Recio, and E.J. Sanchez-Barcelo**, *Modulation of the length of the cell cycle time of MCF-7 human breast cancer cells by melatonin*. *Life Sci*, 1996. **58**(9): p. 811-6.
- [192] **Jiang, W., et al.**, *Quantification of Hantaan virus with a SYBR green I-based one-step qRT-PCR assay*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e81525.
- [193] **Chomczynski, P. and N. Sacchi**, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(2): p. 581-5.
- [194] **Kato, M., et al.**, *Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes*. *J Pharm Pharmacol*, 2001. **53**(12): p. 1679-85.
- [195] **Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting**, *Cyclooxygenases 1 and 2*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998. **38**: p. 97-120.
- [196] **Yu, M., et al.**, *Inhibition of TRPM7 channels prevents proliferation and differentiation of human lung fibroblasts*. *Inflamm Res*, 2013. **62**(11): p. 961-70.
- [197] **Ciurtin, C., et al.**, *TRPM3 channel stimulated by pregnenolone sulphate in synovial fibroblasts and negatively coupled to hyaluronan*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010. **11**: p. 111.
- [198] **Inoue, K. and Z.G. Xiong**, *Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway*. *Cardiovasc Res*, 2009. **83**(3): p. 547-57.

- [199] **He, Y., et al.**, *Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II*. *Circ Res*, 2005. **96**(2): p. 207-15.
- [200] **Feske, S., et al.**, *Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signalling in cells of the immune system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **311**(4): p. 1117-32.
- [201] **Wykes, R.C., et al.**, *Functional transient receptor potential melastatin 7 channels are critical for human mast cell survival*. *J Immunol*, 2007. **179**(6): p. 4045-52.
- [202] **Abed, E. and R. Moreau**, *Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation*. *Cell Prolif*, 2007. **40**(6): p. 849-65.
- [203] **Jiang, J., et al.**, *Transient receptor potential melastatin 7-like current in human head and neck carcinoma cells: role in cell proliferation*. *Cancer Res*, 2007. **67**(22): p. 10929-38.
- [204] **Su, L.T., et al.**, *TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(16): p. 11260-70.
- [205] **Mayer, S.I., et al.**, *Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(12): p. 10084-96.
- [206] **Mayer, S.I. and G. Thiel**, *Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB*. *Eur J Cell Biol*, 2009. **88**(1): p. 19-33.
- [207] **Duan, L. and M.H. Cobb**, *Calcineurin increases glucose activation of ERK1/2 by reversing negative feedback*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(51): p. 22314-9.
- [208] **Visegrady, A., et al.**, *Stimulus-dependent control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca(2+) oscillation frequency by the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase*. *Biophys J*, 2001. **81**(3): p. 1398-405.
- [209] **ZhuGe, R., et al.**, *Dynamics of signaling between Ca(2+) sparks and Ca(2+)-activated K(+) channels studied with a novel image-based method for direct intracellular measurement of ryanodine receptor Ca(2+) current*. *J Gen Physiol*, 2000. **116**(6): p. 845-64.
- [210] **Gao, Y.D., et al.**, *Calcium-activated K(+) channel (K(Ca)3.1) activity during Ca(2+) store depletion and store-operated Ca(2+) entry in human macrophages*. *Cell Calcium*, 2010. **48**(1): p. 19-27.
- [211] **Cahalan, M.D.**, *STIMulating store-operated Ca(2+) entry*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(6): p. 669-77.
- [212] **Parrett, M., et al.**, *Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer*. *Int J Oncol*, 1997. **10**(3): p. 503-7.
- [213] **Badawi, A.F. and M.Z. Badr**, *Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and levels of prostaglandin E2 and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in human breast cancer and metastasis*. *Int J Cancer*, 2003. **103**(1): p. 84-90.
- [214] **Hwang, D., et al.**, *Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(6): p. 455-60.
- [215] **Ristimaki, A., et al.**, *Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(3): p. 632-5.
- [216] **Raz, A.**, *Is inhibition of cyclooxygenase required for the anti-tumorigenic effects of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs)? In vitro versus in vivo results and the relevance for the prevention and treatment of cancer*. *Biochem Pharmacol*, 2002. **63**(3): p. 343-7.

- [217] **Duncan, K., et al.**, *NSAIDs induce apoptosis in nonproliferating ovarian cancer cells and inhibit tumor growth in vivo*. *IUBMB Life*, 2012. **64**(7): p. 636-43.
- [218] **Chetrite, G.S., et al.**, *Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000. **72**(1-2): p. 23-7.
- [219] **Agarwal, V.R., et al.**, *Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. **81**(11): p. 3843-9.
- [220] **Miller, W.R., et al.**, *Regulation of aromatase activity within the breast*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997. **61**(3-6): p. 193-202.
- [221] **Simpson, E.R., et al.**, *Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis*. *Endocr Rev*, 1994. **15**(3): p. 342-55.
- [222] **Brodie, A.M., et al.**, *Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001. **79**(1-5): p. 41-7.
- [223] **Brueggemeier, R.W., et al.**, *Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens*. *Cancer Lett*, 1999. **140**(1-2): p. 27-35.
- [224] **Diaz-Cruz, E.S., C.L. Shapiro, and R.W. Brueggemeier**, *Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression and activity in breast cancer cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(5): p. 2563-70.
- [225] **Singh, S., et al.**, *Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **296**(2): p. 600-11.
- [226] **Syme, C.A., et al.**, *Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. **278**(3): p. C570-81.
- [227] **Imaizumi, Y., et al.**, *Ca<sup>2+</sup> images and K<sup>+</sup> current during depolarization in smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder*. *J Physiol*, 1998. **510 ( Pt 3)**: p. 705-19.
- [228] **Morimura, K., et al.**, *Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channel block by openers of intermediate and small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in urinary bladder smooth muscle cells*. *J Pharmacol Sci*, 2006. **100**(3): p. 237-41.
- [229] **Liou, J., et al.**, *STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx*. *Curr Biol*, 2005. **15**(13): p. 1235-41.
- [230] **Zhang, S.L., et al.**, *STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane*. *Nature*, 2005. **437**(7060): p. 902-5.
- [231] **Varnai, P., L. Hunyady, and T. Balla**, *STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry*. *Trends Pharmacol Sci*, 2009. **30**(3): p. 118-28.
- [232] **Yang, S., J.J. Zhang, and X.Y. Huang**, *Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(2): p. 124-34.
- [233] **Chubanov, V., et al.**, *Natural and Synthetic Modulators of the TRPM7 Channel*. *Cells*, 2014. **3**(4): p. 1089-101.



## 7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter Betreuung von Prof. Dr. Klaus Mörike durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch JProf. Dr. Robert Lukowski und Dipl. Pharm. Friederike Steudel.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dipl. Pharm. Friederike Steudel von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch JProf. Dr. Robert Lukowski und Dipl. Pharm. Friederike Steudel eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch Prof. Dr. Klaus Mörike, JProf. Dr. Robert Lukowski und Dipl. Pharm. Friederike Steudel verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Deggenhausertal den, 25.02.2016

.....

Eric Florian Illison

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen dem 01. Januar 2014 und 31. Dezember 2015 unter Anleitung von Prof. Dr. Klaus Mörike an der Medizinischen Fakultät Abteilung Klinische Pharmakologie in Kooperation mit JProf. Dr. Robert Lukowski vom Institut für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Mörike möchte ich mich herzlich für die Aufnahme als Doktorand und das damit entgegengebrachte Vertrauen sowie die Korrektur meiner Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei JProf. Dr. Robert Lukowski für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsutensilien, sowie die gute, enge Zusammenarbeit bedanken. Auch ein großes Dankeschön für die konstruktiven Korrekturvorschläge der Arbeit.

Ein großes Dankeschön gebührt auch Herrn Prof. Dr. Stephan Huber, für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonders herzlicher Dank geht auch an Friederike Steudel, für die hervorragende Betreuung und Zusammenarbeit während meiner Versuchsphase und die Bereitstellung von Zellproben. Darüber hinaus auch möchte ich mich auch für die sprachlichen und inhaltlichen Hilfestellungen bei der Verfassung meiner Arbeit bedanken.

Auch bei meiner Schwester möchte ich mich herzlich für die zahlreichen Nachhilfestunden bei der Bedienung von Excel und Powerpoint, sowie Tipps und Tricks in jeglicher Form bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich natürlich auch an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Arbeitskreise Ruth/Lukowski und Schwab, für die tolle Zeit und die freundliche Aufnahme, die Unterstützung sowie die gute Zusammenarbeit bei den Versuchen aussprechen.

Zum Schluss möchte ich auch noch meinen Eltern von ganzem Herzen danken, da sie mir dies alles, sowohl finanziell als auch durch Ihre seelische und moralische Unterstützung, ermöglicht haben. Ich hab euch lieb!!!

