





**Die Bedeutung der Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Kaliumkanäle  
vom IK- und BK-Typ für die  
Entstehung und Therapie von Brustkrebs**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Friederike Anna Steudel  
aus Heilbronn

Tübingen  
2016



Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls  
Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

07.11.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

JProf. Dr. Robert Lukowski

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth



*Ich halte dafür, daß das einzige Ziel der Wissenschaft darin besteht, die Mühseligkeit der menschlichen Existenz zu erleichtern.*

Bertolt Brecht, Leben des Galilei



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	XIII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klassifizierung und Therapie nach S3-Leitlinie.....	1
1.1.3 Herausforderungen der Antitumorthherapie und „Onkokanäle“ als neue Arzneimittelzielstrukturen.....	3
1.2 Kaliumkanäle.....	5
1.2.1 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (K <sub>Ca</sub> ).....	5
1.2.1.1 Der Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit (IK).....	6
1.2.1.2 Der Calcium- und spannungsaktivierte Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit (BK).....	9
1.3 Kaliumkanäle und ihre Funktion im Mammakarzinom.....	12
1.3.1 Pathophysiologische Grundlagen der Tumorigenese.....	12
1.3.1.1 Rolle von K <sup>+</sup> -Kanälen für Zellzyklus, Wachstum und Proliferation.....	14
1.3.1.2 Rolle von K <sup>+</sup> -Kanälen bei der Apoptose.....	20
1.3.1.3 Rolle von K <sup>+</sup> -Kanälen bei der Migration und Metastasierung.....	24
1.3.2 Veränderte Signalwege des Mammakarzinoms.....	26
1.3.2.1 HER2 als Bestandteil der HER/ERBB-Familie.....	26
1.3.2.2 Die Ras/MAPK-Signalkaskade.....	27
1.3.2.3 Die PI3K/Akt-Signalkaskade.....	28
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>33</b>
3.1 Mauslinien.....	33
3.2 Geräte und Software.....	36
3.3 Generelles Verbrauchsmaterial.....	37
3.4 Substanzen, Puffer, Lösungen und Medien.....	38
3.4.1 Genotypisierung.....	38
3.4.1.1 DNA-Isolation und PCR.....	38
3.4.1.2 Gelelektrophorese.....	39
3.4.2 <i>In vivo</i> Methoden.....	39
3.4.3 Zellkultur.....	40
3.4.4 RNA-Analytik.....	41
3.4.5 Wachstums- und Zellzyklusanalysen.....	42
3.4.6 Histologische Methoden.....	43
3.4.6.1 AP-Färbung.....	44
3.4.6.2 DAB-Färbung.....	45
3.4.6.3 TUNEL-Färbung.....	45
3.4.7 Biochemische Methoden.....	46
3.4.7.1 Probengewinnung.....	47
3.4.7.2 Gelelektrophorese.....	48
3.4.7.3 Western Blot.....	50
3.4.8 Calcium-Imaging.....	51
<b>4 Methoden.....</b>	<b>53</b>
4.1 Mauszucht.....	53
4.1.1 Tierhaltung und Verpaarung.....	53
4.1.2 Rückzucht.....	53
4.1.3 Genotypisierung.....	54
4.1.3.1 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzenbiopsien.....	54
4.1.3.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion.....	55
4.1.3.3 Detektion der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese.....	56
4.2 <i>In vivo</i> Methoden.....	58
4.2.1 Palpation und Messung der Tumore.....	58
4.2.2 Tötung und Organentnahme.....	59

4.2.3	Behandlung mit dem spezifischen BK-Kanalinhibitor Paxilline.....	59
4.2.3.1	Behandlungsschema .....	59
4.2.3.2	Pharmakokinetische Charakterisierung von Paxilline.....	60
4.2.4	Allotransplantation .....	61
4.3	Zellkultur.....	62
4.3.1	Etablierung primärer Brusttumorzellen als Primärzelllinie.....	62
4.3.2	Passagierung der Primärzelllinien .....	63
4.3.2.1	Aufreinigung der Primärzelllinien .....	64
4.3.3	Kryokonservierung und Auftauen der Primärzelllinien .....	64
4.3.4	G1-Arretierung mittels Serumentzug .....	64
4.4	Patch-Clamp-Analyse .....	65
4.5	RNA-Analytik.....	65
4.5.1	RNA-Isolation.....	65
4.5.2	Umschreiben in cDNA .....	67
4.5.3	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	67
4.6	Wachstumsversuche und Zellzyklusanalysen.....	69
4.6.1	Untersuchung des Wachstumsverhalten der Brusttumorzellen mittels Grid-Platten .....	69
4.6.2	Untersuchung des Wachstumsverhalten der Brusttumorzellen mit dem xCelligence-System.....	70
4.6.3	Zellzyklusanalyse .....	70
4.6.3.1	qRT-PCR-basierte Zellzyklusanalyse .....	71
4.6.3.2	Durchflusszytometrie-basierte Zellzyklusanalyse.....	71
4.7	Histologische Methoden .....	72
4.7.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	73
4.7.2	Immunhistochemische Färbung.....	73
4.7.3	Apoptose-Detektion mit TUNEL-Färbung.....	75
4.8	Biochemische Methoden.....	76
4.8.1	Lyse der Zellen für Proteingewinnung .....	76
4.8.2	Membranpräparation.....	77
4.8.3	Mitochondrien-Isolation .....	77
4.8.4	Proteinbestimmung.....	78
4.8.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	78
4.8.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	79
4.8.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	80
4.8.6	Western Blot .....	81
4.9	Lebendzellbeobachtung von $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen.....	82
4.9.1	Akute Calciumsignale.....	83
4.9.2	Spontane Calciumsignale.....	83
4.10	Statistik .....	84
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>85</b>
5.1	Expressionsanalyse Calcium-aktivierter Kaliumkanäle in murinen Brusttumorzellen und -gewebe .....	85
5.2	Charakterisierung der Funktion des IK-Kanals im murinen Mammakarzinom .....	86
5.2.1	Expressionsanalyse des IK-Kanals in murinen Brusttumorzellen und -gewebe.....	86
5.2.1.1	Nachweis von IK mRNA in MMTV-PyMT Brusttumorproben.....	86
5.2.1.2	Immunhistochemischer Nachweis von IK Protein in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe ...	86
5.2.1.3	Funktionale Charakterisierung der IK-Kanäle in MMTV-PyMT Zellen mittels Patch-Clamp-Methode.....	88
5.2.2	Einfluss des IK-Kanals auf das Wachstumsverhalten muriner Brusttumorzellen.....	90
5.2.2.1	Rolle von IK für das Wachstum muriner MMTV-PyMT Brusttumorzellen .....	90
5.2.2.2	IK-abhängige Zellzyklusanalysen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen .....	92
5.2.3	Einfluss des IK-Kanals auf apoptotische Signalwege in MMTV-PyMT Brusttumorzellen .....	96
5.2.4	Einfluss des IK-Kanals auf $[Ca^{2+}]_i$ -Signale muriner Brusttumorzellen.....	98
5.2.4.1	Rolle von IK für die Amplitude der akuten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale.....	98
5.2.4.2	IK-abhängige Generierung spontaner $[Ca^{2+}]_i$ -Signale .....	100
5.2.5	Effekt der IK-Kanalaktivität auf die Zytostatikasensitivität der murinen Brusttumorzellen .....	102
5.2.6	Einfluss des IK-Kanals auf die murine Tumorigenese <i>in vivo</i> .....	105
5.3	Charakterisierung der Funktion des BK-Kanals im murinen Mammakarzinom .....	111
5.3.1	Expressionsanalyse des BK-Kanals in murinen Brusttumorzellen und -gewebe.....	111
5.3.1.1	Nachweis von BK mRNA in MMTV-PyMT Brusttumorproben.....	111
5.3.1.2	Nachweis von BK Protein in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe mittels Membranpräparation .....	111

5.3.1.3	Immunhistochemischer Nachweis von BK-Protein in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe	113
5.3.1.4	Funktionale Charakterisierung der BK-Kanäle in MMTV-PyMT Zellen mittels Patch-Clamp-Methode	113
5.3.2	Einfluss des BK-Kanals auf das Wachstumsverhalten muriner Brusttumorzellen	116
5.3.2.1	Rolle von BK für das Wachstum muriner Brusttumorzellen	116
5.3.2.2	BK-abhängige Zellzyklusanalysen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen	117
5.3.3	Einfluss des BK-Kanals auf das apoptotische Verhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen	120
5.3.4	Effekt der BK-Kanalaktivität auf die Zytostatikasensitivität muriner Brusttumorzellen	121
5.3.5	Einfluss des BK-Kanals auf die murine Tumorigenese <i>in vivo</i>	123
5.3.5.1	Einfluss der genetischen Ablation des BK-Kanals <i>in vivo</i>	123
5.3.5.2	Einfluss der pharmakologischen Inhibition des BK-Kanals <i>in vivo</i>	127
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>131</b>
6.1	Expressionsanalyse Calcium-aktivierter Kaliumkanäle in murinem Brusttumorgewebe	131
6.2	Charakterisierung von IK-Kanälen im murinen Mammakarzinom	131
6.2.1	MMTV-PyMT Brusttumorproben exprimieren IK-Kanäle	131
6.2.2	IK-Kanäle regulieren das Wachstum muriner Brusttumorzellen <i>in vitro</i>	134
6.2.2.1	Der Zellzyklus von MMTV-PyMT Brusttumorzellen ist von der IK-Kanalaktivität abhängig	134
6.2.2.2	IK-Kanal-abhängige Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase regulieren das Wachstum muriner Brusttumorzellen	136
6.2.2.3	Das IK-abhängige Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen beruht nicht auf einer Involvierung von IK in apoptotische Prozesse	139
6.2.2.4	Die pharmakologische Inhibition des IK-Kanals erhöht die Sensitivität von MMTV-PyMT Brusttumorzellen gegenüber Docetaxel	140
6.2.3	IK-Kanäle können die murine Tumorigenese <i>in vivo</i> beeinflussen	141
6.3	Charakterisierung von BK-Kanälen im murinen Mammakarzinom	144
6.3.1	MMTV-PyMT Brusttumorproben exprimieren BK-Kanäle	144
6.3.2	BK-Kanäle regulieren das Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen <i>in vitro</i>	146
6.3.2.1	Die genetische Ablation von BK hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Ras und p53 in MMTV-PyMT Brusttumorzellen	146
6.3.2.2	Der Zellzyklus von MMTV-PyMT Brusttumorzellen ist von der BK-Kanalaktivität abhängig	147
6.3.2.3	Das BK-abhängige Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen ist teilweise durch eine BK-vermittelte Modulation apoptotischer Prozesse erklärbar	148
6.3.2.4	Die Docetaxelsensitivität von MMTV-PyMT Brusttumorzellen ist nicht von der BK-Kanalaktivität abhängig	149
6.3.3	BK-Kanäle können die murine Tumorigenese <i>in vivo</i> beeinflussen	149
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>155</b>
7.1	Arzneistoffe und Kanalmodulatoren	155
7.2	mRNA-Analyse von MMTV-PyMT Brusttumorgewebe mit der Nanostring-Technologie	157
7.3	Funktion von IK-Kanälen für das Wachstum von MMTV-cNeu Brusttumorzellen	160
7.4	Einfluss des IK-Kanals auf $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von MMTV-cNeu Brusttumorzellen	162
7.5	Generierung von MMTV-PyMT BK-KO Versuchstieren	163
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>165</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>183</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>187</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>189</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>191</b>



## Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau und die zweithäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen. Wenngleich in den letzten Jahren Verbesserungen der Morbidität und Mortalität erreicht werden konnten, bleiben dennoch zahlreiche Herausforderungen bestehen. Hierzu zählen unspezifische Therapieansätze, welche häufig schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich führen, ebenso wie heterogene Genmuster der Tumore sowie interindividuelle genetische Unterschiede der Patienten, die beispielsweise den Arzneistoffmetabolismus betreffen. Daher ist die Identifizierung neuer Arzneistoffzielstrukturen ein zentraler Aspekt der Tumorforschung. In den letzten Jahren wurde entdeckt, dass Kaliumkanäle in Tumoren häufig überexprimiert werden und als sogenannte Onkokanäle maßgeblich zur Malignität dieser Erkrankungen beitragen können. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der Calcium-aktivierten Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) vom IK- und BK-Typ für die Entstehung und das Wachstum des Mammakarzinoms *in vitro* und *in vivo* anhand von Brustkrebsmausmodellen (MMTV-PyMT und MMTV-cNeu) untersucht. In diesen wird die Tumorigenese durch die MMTV-vermittelte Amplifikation des *polyoma virus middle T antigene* bzw. der Rezeptortyrosinkinase *neu* ausgelöst. Ausgehend von diesen Modellen wurden im Rahmen dieser Arbeit MMTV-PyMT bzw. MMTV-cNeu WT, IK-KO bzw. BK-KO Tiere generiert und charakterisiert. Erfolgreich konnten Gewebeproben aus diesen Tieren isoliert und daraus Primärzelllinien mit oder ohne Kanaldefizienz etabliert werden.

Sowohl IK als auch BK lassen sich auf mRNA- und Proteinebene in murinen Brusttumorgeweben aus WT Tieren detektieren, nicht jedoch in entsprechenden KO Proben. Für IK-Kanäle konnte zudem eine Überexpression im Brusttumorgewebe verglichen mit nicht-transformiertem Brustepithel nachgewiesen werden. Patch-Clamp-Analysen zeigten außerdem, dass MMTV-PyMT Brusttumorzellen funktionale IK- und BK-Kanäle exprimieren und die entsprechenden Ströme durch die pharmakologischen Inhibitoren TRAM-34 (IK) bzw. Paxilline (BK) blockierbar sind. Außerdem ist das Wachstum der murinen Brusttumorzellen *in vitro* von der IK- bzw. BK-Kanalaktivität abhängig. So führt eine Inhibition bzw. Ablation von IK zu einer signifikant verminderten Wachstumsrate von MMTV-PyMT sowie MMTV-cNeu Brusttumorzellen. Auch die genetische Ablation des BK-Kanals resultiert in einer signifikant reduzierten Wachstumsrate der MMTV-PyMT Brusttumorzellen. Der Wachstumsphänotyp beruht wahrscheinlich auf einer IK- bzw. BK-abhängigen Regulation des Zellzyklus, denn die pharmakologische Inhibition bzw. genetische Ablation von IK resultieren ebenso wie die BK-Kanaldefizienz in einer signifikanten Reduktion zellzyklusspezifischer Marker. Damit übereinstimmend konnte durch die Behandlung mit TRAM-34 eine mutmaßlich IK-abhängige Akkumulation der MMTV-PyMT Brusttumorzellen in der G1-Phase beobachtet werden. Außerdem ist bekannt, dass das Zellwachstum durch intrazelluläre Calciumsignale ( $[Ca^{2+}]_i$ ) reguliert wird. Interessanterweise war nach pharmakologischer Inhibition bzw. genetischer Ablation von IK in beiden Brusttumorzellmodellen (MMTV-PyMT und MMTV-cNeu) eine signifikante Reduktion der  $Ca^{2+}$ -Signale zu beobachten. BK-Kanäle beeinflussen das Wachstum der Brusttumorzellen zudem durch einen Eingriff in apoptotische Prozesse. So lassen sich in MMTV-PyMT BK-KO Zellen signifikant mehr apoptotische Zellkerne nachweisen als in BK-WT Zellen. IK-Kanäle greifen hingegen nicht über eine Modulation apoptotischer Signalwege in das Wachstum muriner Brusttumorzellen ein. Letztlich wurde auch die Sensitivität der MMTV-PyMT Brusttumorzellen

gegenüber dem Zytostatikum Docetaxel in Abhängigkeit des  $K_{Ca}$ -Kanalstatus untersucht. Mit der Kombination von Docetaxel (in niedriger Dosierung) und dem IK-Inhibitor TRAM-34 ließen sich dabei signifikant bessere Antitumoreffekte erzielen als mit den jeweiligen Wirkstoff-Einzelbehandlungen. Weder die genetische Ablation von IK noch die BK-Kanaldefizienz hatte jedoch einen Einfluss auf die Docetaxel-abhängige Wachstumshemmung.

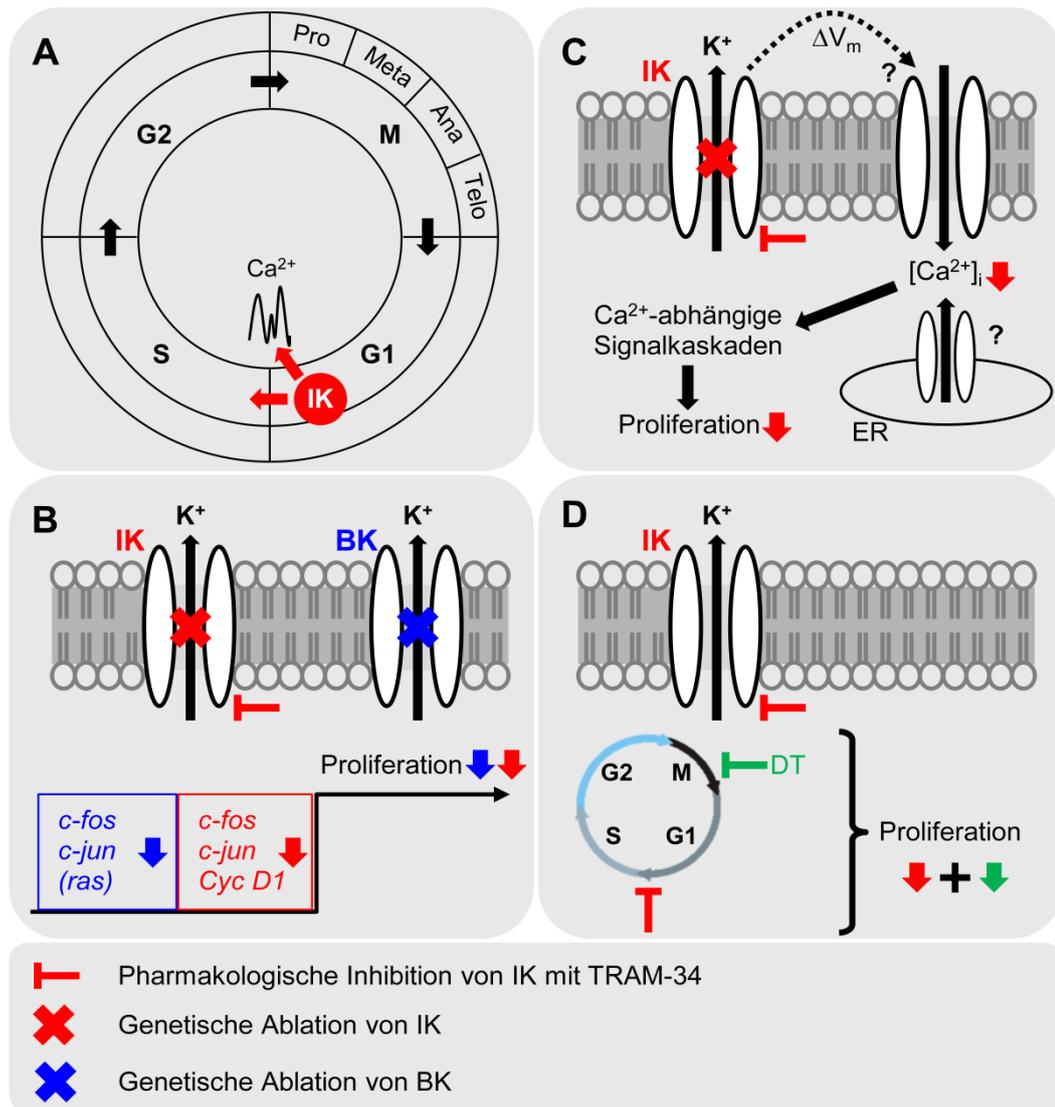
Die *in vitro* Befunde wurden außerdem durch *in vivo* Untersuchungen in tumortragenden Ganztiermodellen unterstützt. Dabei konnte im MMTV-PyMT Mausmodell durch die genetische Ablation des IK-Kanals weder ein Vorteil bezüglich des tumorfreien Überlebens noch bezüglich des Gesamtüberlebens beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war das tumorfreie Überleben in MMTV-PyMT BK-KO Tieren im Vergleich zu den WT Kontrolltieren signifikant verlängert, nicht jedoch das Gesamtüberleben. Durch die pharmakologische Inhibition von BK mit Paxilline konnten weder das tumorfreie Überleben noch das Gesamtüberleben positiv beeinflusst werden. Dieses Ergebnis lässt eine unzureichende Kanalblockade durch Paxilline vermuten, was aber über die pharmakokinetische Charakterisierung des Inhibitors ausgeschlossen werden kann. Die Auswirkung der IK-Kanalablation für Brusttumorentstehung und Brusttumorwachstum wurde zudem in dem MMTV-cNeu Mausmodell untersucht. Hier führte eine IK-Defizienz sowohl zu einer signifikanten Verlängerung des tumorfreien Überlebens als auch des Gesamtüberlebens. Darüber hinaus wurden in FVB/N Tiere orthotop MMTV-PyMT WT, IK-KO bzw. BK-KO Brusttumorzellen transplantiert. In diesem induzierten Modell ergab die Tumordetektion nach Transplantation der IK-KO bzw. BK-KO Zellen eine signifikante Verlängerung des tumorfreien Überlebens.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen, dass IK- und BK-Kanäle in ihrer Funktion als Onkokanäle die Entstehung und das Wachstum muriner Brusttumorzellen und PyMT- sowie cNeu-positive Brusttumoren beeinflussen.  $K_{Ca}$ -Kanäle könnten demnach Arzneistoffzielstrukturen für künftige Tumorthérapie-Konzepte des Mammakarzinoms darstellen.

#### **Einfluss der IK- bzw. BK-Kanalfunktion auf die murine Tumorigenese *in vivo***

Die Pfeile geben eine Verlängerung des Untersuchungskriteriums an. Ein Pfeil nach oben indiziert eine signifikante Verlängerung des Überlebens des KO Tieres im Vergleich zur WT Kontrolle. Die Anzahl der Pfeile repräsentiert das Signifikanzniveau. Ein waagrechter Pfeil indiziert, dass kein signifikanter Unterschied ermittelt wurde. (IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; KO: Knockout; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*)

		MMTV-PyMT	MMTV-cNeu	Allotransplantation
<b>IK-KO</b>	Tumorfreies Überleben	→	↑↑	↑
	Gesamtüberleben	→	↑↑↑	–
	Progression	→	↑	–
<b>BK-KO</b>	Tumorfreies Überleben	↑	–	↑↑
	Gesamtüberleben	→	–	–
	Progression	→	–	–



**Einfluss der IK- bzw. BK-Kanalfunktion auf den Zellzyklus, intrazelluläre Calcium-Signale und die Zytostatika-Sensitivität muriner Brusttumorzellen *in vitro***

(A) IK-Kanäle regulieren den Zellzyklus muriner Brusttumorzellen am G1/S-Übergang über die Veränderung intrazellulärer Calcium-Signale. (B) Die IK- bzw. BK-Kanalaktivität ist eine wichtige Determinante der Proliferation muriner Brusttumorzellen, indem sie die Expression spezifischer Zellzyklusmarker regulieren. (C) IK-Kanäle koordinieren das Wachstum muriner Brusttumorzellen über die Modulation intrazellulärer Calcium-Signale. (D) Durch die pharmakologische Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 kann die Sensitivität muriner Brusttumorzellen gegenüber Docetaxel gesteigert werden. Genaueres im Fließtext. (Pro: Prophase; Meta: Metaphase; Ana: Anaphase; Telo: Telophase; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; Cyc D1: Cyclin D1;  $V_m$ : Membranpotential; ER: Endoplasmatisches Retikulum; DT: Docetaxel; TRAM-34: Triarylmethan-34)



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom wird nach der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, ICD) als bösartige Neubildung der Brustdrüse definiert.

### 1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

In den Vereinigten Staaten werden im Jahr 2016 ca. 250 000 Neuerkrankungen an Brustkrebs bei Frauen erwartet.<sup>1</sup> In Deutschland wurden zuletzt knapp 70 000 Neuerkrankungen diagnostiziert.<sup>2</sup> Damit stellt das Mammakarzinom die häufigste Tumorerkrankung der Frau dar. Schätzungsweise werden in den USA etwa 40 000 Frauen dieses Jahr aufgrund dieser Diagnose letztlich sterben.<sup>1</sup> Insgesamt geht die Mortalität durch verbesserte Früherkennung und gezieltere Therapieansätze in den letzten Jahren allerdings etwas zurück.<sup>1-4</sup> In der Regel sterben die Patientinnen nicht am eigentlichen Primärtumor, sondern aufgrund der daraus resultierenden Metastasen,<sup>5-7</sup> die insbesondere in benachbarten Lymphknoten sowie Knochen, Lunge und Leber, aber auch Gehirn, Gastrointestinaltrakt und Nebenniere auftreten.<sup>7,8</sup> Zwar konnten in den letzten Jahren auch bei fortgeschrittenen Brustkrebserkrankungen Verbesserungen bezüglich Morbidität und Mortalität erzielt werden,<sup>7,9</sup> allerdings bleiben metastasierende Tumore eine der größten Herausforderung der heutigen Krebsforschung.<sup>7,10</sup>

Gewisse exogene und endogene Faktoren können das Risiko für ein Mammakarzinom erhöhen. Entscheidend sind zum Beispiel das Alter, der Lebensort, das Alter bei Menarche und Menopause sowie der ersten Schwangerschaft, physische Aktivität und damit verbunden Übergewicht, Strahlenexposition und die Einnahme von Hormonen. Während bei der Hormonersatztherapie ein deutlich gesteigertes Risiko nachgewiesen wurde, steigt dieses unter Einnahme oraler Kontrazeptiva nur geringfügig.<sup>11</sup> Ca. 10% aller Brusttumore entstehen allerdings im Zusammenhang mit einer positiven Familienanamnese, vor allem wenn bei direkten Verwandten bereits eine Erkrankung diagnostiziert wurde.<sup>2,9,12,13</sup> Wie viele Gene letztlich die Entstehung eines Mammakarzinoms begünstigen, lässt sich auch aufgrund der Heterogenität der Erkrankung zurzeit noch nicht sagen. Die prominentesten Beispiele in diesem Zusammenhang sind Mutationen in den *BRCA1* und *BRCA2*-Genen.<sup>12,14</sup> Bei etwa der Hälfte aller bisher bekannten familiär bedingten Fälle ist eine Veränderung dieser Gene für die Erkrankung verantwortlich.<sup>2</sup>

### 1.1.2 Klassifizierung und Therapie nach S3-Leitlinie

Brustkrebs stellt eine sehr heterogene Tumorentität dar,<sup>7</sup> weshalb verschiedene Subtypen in Abhängigkeit einzelner Biomarker definiert werden. Die Bestimmung dieser Marker erfolgt mittels immunhistologischer Färbungen entsprechender Biopsien (s. Tabelle 1.1). Die Klassifizierung ist essentiell für eine adäquate Therapie, an der sich auch die aktuell gültige S3-Leitlinie (Stand Juni 2012) zur Behandlung des Mammakarzinoms orientiert. Sie gilt offiziell noch bis Juli 2017 und wird zurzeit überarbeitet. In der vorliegenden Arbeit wird die noch gültige Version als Referenz genutzt.<sup>15</sup> Die Marker sind nicht nur prädikative, sondern auch prognostische Faktoren, da mit ihrer Hilfe ein

signifikanter Vorhersagewert für das Eintreten einer pathologischen Komplettremission ermittelt werden kann. Nur für den Proliferationsmarker Ki67 ist der Wert noch nicht ausreichend belegt. Daher empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie, dass zur Subtypisierung als Entscheidungsgrundlage für die systemische Therapie lediglich der Status von Estrogen- und Progesteronrezeptoren sowie von HER2 bestimmt werden soll. Weiterhin sollten vor Therapiebeginn das Alter, der Menopausenstatus und der Tumorgrad bestimmt werden. Die Bestimmung des Tumorgrades erfolgt nach dem sogenannten TNM-System (*tumour*/Tumor, *node*/Lymphknoten, *metastasis*/Metastasierung), anhand dessen Tumorgröße, axillärer Lymphknotenbefall und Fernmetastasen dokumentiert werden.<sup>16</sup>

Prinzipiell stehen zur Behandlung der Mammakarzinomsubtypen verschiedene Therapieansätze zur Verfügung. In Abhängigkeit des Tumorgrades ist eine Operation möglich, an die sich eine adjuvante Strahlentherapie anschließt. Die Radiotherapie wird auch bei inoperablen Tumoren empfohlen und kommt zudem in Kombination mit einer systemischen adjuvanten Therapie zum Einsatz. Zu dieser zählen neben der klassischen Chemotherapie auch die Anwendung endokrin wirkender Substanzen sowie therapeutische Antikörper. Die gängigen Wirkstoffe sind in Tabelle 7.1 (Anhang) dargestellt. Standardmäßig sollte ein Taxan in Kombination mit einem Anthrazyklin unbedingt Bestandteil eines Therapieschemas sein, da dadurch die höchsten Remissionsraten erreicht werden. Im Folgenden soll nun auf die systemische adjuvante Therapie kurz eingegangen werden. Genaue Informationen können der aktuell gültigen S3-Leitlinie entnommen werden.<sup>15</sup> Bei Patientinnen mit ER- oder PR-positiven Tumoren erfolgt eine endokrine Therapie in Abhängigkeit des Menopausenstatus mit dem selektiven Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen bzw. Aromatasehemmern der dritten Generation. Zur Behandlung von Fernmetastasen werden zusätzlich Analoga des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) eingesetzt.<sup>15</sup>

In ca. 20-30% aller Brusttumore ist der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) überexprimiert.<sup>17</sup> Diese Überexpression führt zu aggressiven Brusttumoren mit schlechter Prognose: Betroffene Patientinnen haben ein signifikant höheres Risiko für ein früheres Rezidiv und eine verkürzte Überlebensrate.<sup>18,19</sup> Dies ist auch dadurch bedingt, dass die Amplifikation von HER2 häufig mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für Metastasen in den benachbarten Lymphknoten einhergeht.<sup>20</sup> Mittlerweile stehen mit Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib drei Arzneistoffe zur gezielten Behandlung des HER2-positiven Mammakarzinoms zur Verfügung. Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der sowohl in der Monotherapie als auch in einer Kombinationstherapie eingesetzt werden kann.<sup>21,22</sup> Trastuzumab besteht aus zwei antigen-spezifischen Seiten, die an den Iuxtramembrananteil der extrazellulären Domäne von HER2 binden.<sup>23</sup> Dies verhindert beispielsweise die Dimerisierung des Rezeptors, welche für die Aktivierung nötig ist (s. 1.3.2.1). Darüber hinaus wird ein erhöhter Abbau des Rezeptors über Endozytose oder eine Immunzellaktivierung ausgelöst. Sowohl die Inhibition der Dimerisierung als auch der verstärkte Abbau verhindern letztlich die Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase und blockieren somit die onkogene Signaltransduktion (s. 1.3.2).<sup>23</sup> Seit 2000 ist Trastuzumab in der Europäischen Union zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms zugelassen, seit 2006 kann der Antikörper auch bei nicht-metastasiertem Brustkrebs eingesetzt werden. 2008 kam mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib eine niedermolekulare Struktur (*small molecule*) auf den Markt, die neben HER2 auch den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 1 (*epidermal growth factor receptor 1*, EGFR-1 oder ERB-B1) blockiert.<sup>24</sup> Derzeit ist eine Kombinationstherapie von Trastuzumab mit einer adjuvanten Chemotherapie bei HER2-positiven

Brusttumoren Standard. Beim metastasiertem Mammakarzinom verlängern Trastuzumab und Lapatinib sowohl in der Kombinationstherapie als auch in der Monotherapie die Überlebenszeit.<sup>15</sup> Kürzlich wurde mit Pertuzumab ein sogenannter HER2-Dimerisierungsinhibitor (s. 1.3.2.1) in Kombination mit dem Therapiestandard Trastuzumab beim metastasierendem Mammakarzinom zugelassen. Studien belegen, dass diese Kombination das Überleben der HER2-positiven Brustkrebspatientinnen weiter verbessert (CLEOPATRA-Studie).<sup>25</sup>

#### **Tabelle 1.1 Klassifizierung des Mammakarzinoms**

(Modifiziert nach<sup>17,18</sup>) Der Rezeptorstatus und die Proliferationsmarker werden mittels immunhistochemischer Färbungen von Tumorbiopsien überprüft. Der Therapieplan ist von der Expression der Biomarker abhängig. Genaueres im Fließtext. (ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; HER2: Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2; FISH: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridsierung; CK: Cytokeratin; EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; neg: negativ; pos: positiv; TNP: Dreifach-negativer Phänotyp/*triple-negative phenotype*)

Subtyp	ER	PR	HER2	CK5/6	EGFR	Ki67
Kriterien	>1 % der Tumornuklei	>1 % der Tumornuklei	HercepTest™ Fish Ratio > 2.0	Jede Färbung	Jede Färbung	> 14 % der Tumornuklei
<b>Luminal A</b>	ER oder PR pos		neg	+	+	neg
<b>Luminal B</b>	ER oder PR pos		neg	+	+	pos
<b>Luminal HER2</b>	ER oder PR pos		pos	+	+	+
<b>HER2</b>	neg	neg	pos	+	+	+
<b>Basal</b>	neg	neg	neg	CK5/6 oder EGFR pos		+
<b>TNP</b>	neg	neg	neg	neg	neg	+

### **1.1.3 Herausforderungen der Antitumorthherapie und „Onkokanäle“ als neue Arzneimittelzielstrukturen**

In der Krebsforschung hat man trotz des hohen wirtschaftlichen und wissenschaftlichen Einsatzes immer wieder mit neuen Herausforderungen zu kämpfen. Hierzu zählen unspezifische Therapieansätze, welche häufig schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich führen, ebenso wie heterogene Genmuster der Tumore sowie interindividuelle genetische Unterschiede der Patienten, die beispielsweise den Arzneistoffmetabolismus betreffen. Daher ist die Identifizierung neuer Arzneistoffzielstrukturen ein zentraler Aspekt der Tumorforschung.

Die zuvor erwähnten positiven Ergebnisse der zielgerichteten Therapie mit monoklonalen Antikörpern (s.o.) verdeutlicht die Bedeutung dieser Therapiestrategie. Ein zentraler Bestandteil der heutigen Tumorforschung ist es daher, weitere Zielstrukturen zu identifizieren, welche in Tumoren überexprimiert werden und dadurch zur Malignität der Erkrankung beitragen. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Tumorzellen häufig eine abnormale Expression von Ionenkanälen aufweisen.<sup>26,27</sup> Zumeist lässt sich eine Überexpression dieser Onkokanäle (*Oncochannels*) nachweisen, weswegen ihnen ein hohes onkogenes Potential zugeschrieben wird.<sup>26</sup> Innerhalb der großen Ionenkanalfamilie sind insbesondere Kaliumkanäle als mögliche Arzneistoffzielstrukturen von großem Interesse, da sie

die höchste Variabilität bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrer Rolle bei Tumoren besitzen. Daher wird angenommen, dass für Kaliumkanäle zielgerichtete und damit spezifische Therapien entwickelt werden können.<sup>28,29</sup> Analog zur Überprüfung des Rezeptorstatus könnte man den Behandlungsalgorithmus in Abhängigkeit des Kanalstatus des Patienten optimieren.

Eine weitere Herausforderung der Tumorthherapie, welche die Erforschung neuer Behandlungsstrategien unerlässlich macht, sind die schwerwiegenden Nebenwirkungen, die durch Zytostatika und Strahlentherapie auftreten. Außerdem weisen Tumorzellen heterogene Genmuster auf,<sup>30</sup> wovon auch die am Arzneimittelmetabolismus beteiligten Cytochrom-P-450-Enzyme (CYP-Enzyme) betroffen sind. Ein für die Therapie des Mammakarzinoms relevantes Beispiel ist CYP2D6, welches unter anderem die Umwandlung von Tamoxifen (s. Anhang Tabelle 7.1) in den aktiven Metaboliten Endoxifen katalysiert.<sup>31</sup> Die metabolische Aktivität kann z.B. genetisch bedingt durch sogenannte Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP, *single nucleotide polymorphism*) interindividuell variieren. Dadurch werden die Wirkspiegel von Endoxifen maßgeblich beeinflusst, so dass für sogenannte Langsammetabolisierer (*poor metaboliser*) zu geringe Wirkspiegel erreicht werden. Dies hat weitreichende Folgen für das Ansprechen auf die Therapie sowie das klinische Ergebnis.<sup>32-34</sup> Daher gibt es Forderungen nach einer Verbesserung der personalisierten Medizin. Dies bedeutet etwa, im Vorfeld einer Therapie den CYP2D6-Status zu überprüfen und gegebenenfalls den Therapieplan anzupassen, damit in allen Patientinnen ein ausreichender Antitumoreffekt erzielt wird.<sup>35</sup> Auch für Kaliumkanäle wird postuliert, dass ihre Aktivität durch SNPs verändert wird und sie so das Ansprechen auf die Behandlung beeinflussen können. Beispielsweise werden bestimmte Kaliumkanäle in Brustkrebszellen von Tamoxifen aktiviert und beeinflussen so die Zellproliferation,<sup>36</sup> weswegen sich Variationen auf den Therapieerfolg auswirken könnten. Damit übereinstimmend konnten in einer Kollaboration unseres Arbeitskreises mit dem Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart solche Variationen von Kaliumkanälen als sogenannte Brustkrebsrisiko-Loci identifiziert werden, die sich insbesondere in HER2-positiven Tumoren finden lassen (s. Julia Baranski „Auswirkungen genetischer Varianten von KCNMA1 und KCNN4 auf die Suszeptibilität für Brustkrebs“, Masterarbeit, 2012). Diese Befunde unterstreichen die Rolle der Kaliumkanäle als sogenannte Onkokanäle sowie ihr Potential als Arzneistoffzielstrukturen der Antitumorthherapie.

Brustkrebszellen sind außerdem dazu in der Lage, Resistenzmechanismen gegen Chemotherapeutika zu entwickeln,<sup>37,38</sup> was die Notwendigkeit einer intensivierten Erforschung der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen begründet. Deren Verständnis wird zukünftig bei der Entwicklung wirksamer(er), d.h. zielgerichteter und maßgeschneiderter Therapieansätze, helfen. Auf diesem Gebiet gibt es bereits erste Befunde, dass Kaliumkanäle zu Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika beitragen. So lässt sich durch die Inhibition sogenannter *human ether-a-go-go-related gene*-Kaliumkanäle (hERG-Kanäle) die Zytotoxizität von Arzneistoffen erhöhen, die standardmäßig bei der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) eingesetzt werden.<sup>39</sup>

Kaliumkanäle stellen also potentielle Arzneistoffzielstrukturen dar. Zum einen regulieren sie als Onkokanäle viele tumorspezifische Prozesse wie Proliferation und Metastasierung (s. 1.3.1). Zum anderen könnten durch ihre Adressierung mit selektiven Modulatoren viele Herausforderungen der Therapie von Tumoren und so auch des Mammakarzinoms überwunden werden.<sup>26,28</sup>

In den folgenden Kapiteln soll nun genauer beleuchtet werden, über welche Mechanismen Kaliumkanäle und dabei insbesondere die Subgruppe der Calcium-aktivierten Kaliumkanäle in die Entstehung und Progression von Tumoren eingreifen.

## 1.2 Kaliumkanäle

Ionenkanäle sind Proteine, die in der Lipidmembran von Zellen verankert sind und durch Poren und einen ionischen Gradienten in der Lage sind, Influx und Efflux von Ionen in Zellen zu steuern. Neben Chlorid-, Calcium- und Natriumkanälen gibt es Kaliumkanäle, welche die größte und vielfältigste Ionenkanalgruppe darstellen. Sie üben in zahlreichen physiologischen Prozessen wichtige Funktionen aus: Durch die Regulation des Membranpotentials beeinflussen sie unter anderem die Neurotransmitterfreisetzung, Insulinsekretion und Glattmuskelrelaxation. Daher werden sie mit verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes mellitus,<sup>40</sup> Epilepsie<sup>41</sup> oder dem Long-QT-Syndrom<sup>42</sup> in Verbindung gebracht. Auch bei verschiedenen Tumorentitäten konnten einige Kaliumkanäle bereits als wichtige Faktoren der Tumorigenese, Migration und Metastasierung identifiziert werden (s. 1.3.1). Die Einteilung der Kaliumkanäle erfolgt nach verschiedenen Kriterien. Entscheidend sind die Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TM), ihre Aktivierung und pharmakologische Aspekte. Dabei ergeben sich drei Hauptfamilien mit 2, 4 oder 6 TM, die jeweils nochmal in Untergruppen gegliedert werden. Zur TM2-Familie gehören die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (*inward rectifier potassium channels*,  $K_{IR}$ ) und ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ). Zur TM4-Familie zählen die Kaliumkanäle mit zwei porenformenden Domänen ( $K_{2P}$ ), welche auch unter dem Begriff *leak channels* bekannt sind. Die größte Gruppe stellt die TM6-Familie dar, welche die spannungsabhängigen ( $K_V$ ) und die  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) umfasst.<sup>43,44</sup>

### 1.2.1 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ )

$Ca^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle zeigen eine breite Gewebedistribution. Sie finden sich in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben wie Glattmuskelzellen. Ihre Öffnungswahrscheinlichkeit wird durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht, was durch den daraus resultierenden Kaliumausstrom zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials führt.<sup>45</sup> Dies wiederum wirkt als Feedback auf  $[Ca^{2+}]_i$ , indem in erregbaren Zellen der  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch die Inaktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle wie dem L-Typ Calciumkanal vermindert wird.<sup>46</sup>  $K_{Ca}$  regulieren demnach die Amplitude und Dauer der  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale. Ihre Aktivität ist somit für  $[Ca^{2+}]_i$ -abhängige Signalkaskaden entscheidend (s. auch 1.3.2).<sup>47</sup> Die Kanäle bestehen aus vier porenformenden  $\alpha$ -Untereinheiten, die ihre Rolle in der Zellphysiologie teilweise gewebeabhängig gemeinsam mit auxiliären Untereinheiten erfüllen. Die Zusammensetzung der Proteinkomplexe ist Kennzeichen der großen Variabilität der Kanäle und bestimmt letztlich ihre Eigenschaften und Funktionen.<sup>47-49</sup> Die Klassifizierung der  $K_{Ca}$  erfolgt nach ihrer Leitfähigkeit in  $SK_{Ca}$  (geringe Leitfähigkeit, *small conductance*),  $IK_{Ca}$  (mittlere Leitfähigkeit, *intermediate conductance*) und  $BK_{Ca}$  (hohe Leitfähigkeit, *big conductance*).<sup>40</sup>

$SK$ -Kanäle sind durch die geringste Leitfähigkeit von 4–20 pS charakterisiert. Sie sind spannungsunabhängig, aber sensitiver für  $Ca^{2+}$ -Signale als  $BK$ -Kanäle.<sup>50,51</sup> Sie werden bereits durch  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen 100 und 400 nM aktiviert<sup>52</sup> und generieren dann eine langandauernde Hyperpolarisation, die langsame Nachhyperpolarisation (*slow afterhyperpolarisation*, sAHP).<sup>45,53</sup> Als modulierende Untereinheit wurde Calmodulin identifiziert, das als  $Ca^{2+}$ -Sensor der Kanäle fungiert.<sup>54</sup>

IK-Kanäle zeigen eine mittlere Leitfähigkeit von 20–80 pS<sup>45</sup> und sind auch unter dem Namen SK4 bekannt, da ihre Aminosäuresequenz teilweise mit der Sequenz der SK-Kanäle übereinstimmt und sie ebenfalls spannungsunabhängig sind. Es finden sich jedoch Unterschiede in der Gewebeverteilung, da IK-Kanäle im Gegensatz zu SK-Kanälen vor allem in nicht-neuronalen Geweben identifiziert wurden.<sup>55</sup> So finden sie sich in Blut-, Epithel- und Endothelzellen. Auch bei IK-Kanälen findet sich am C-Terminus die regulatorische Untereinheit Calmodulin.<sup>56</sup>

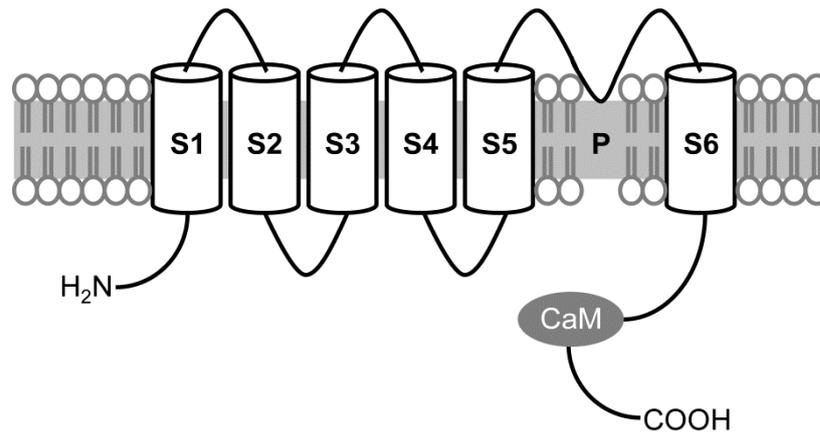
BK-Kanäle besitzen eine hohe Leitfähigkeit von 100–300 pS<sup>57</sup> und nehmen in der Gruppe der Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Kaliumkanäle eine besondere Stellung ein. Sie weisen zum einen eine zusätzliche siebte TM-Region (S0) auf,<sup>58</sup> werden aber aufgrund ihrer sonst ähnlichen Struktur trotzdem zur TM6-Familie gezählt.<sup>40</sup> Zum anderen werden sie sowohl durch [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> als auch durch einen Anstieg des Membranpotentials aktiviert.<sup>59,60</sup>

Auf IK- und BK-Kanäle soll in den folgenden Kapiteln, insbesondere bezüglich ihrer Funktion bei Tumorerkrankungen, genauer eingegangen werden.

### 1.2.1.1 Der Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit (IK)

IK-Kanäle sind auch als SK4, IK<sub>Ca</sub>, K<sub>Ca</sub>3.1, IK-1, IKCa1 oder K<sub>Ca</sub>4 bekannt und werden durch das Gen *KCNN4* codiert.<sup>44,47,61</sup> Sie wurden das erste Mal 1958 als sogenannte Gardos-Kanäle in humanen Erythrozyten identifiziert.<sup>62</sup> Wie bereits erwähnt, zeichnen sich IK-Kanäle durch eine charakteristische Leitfähigkeit und individuelle pharmakologische Eigenschaften aus, können aber aufgrund einer gewissen Sequenzhomologie auch zur SK-Familie (*KCNN1-3*, K<sub>Ca</sub>2.1-3) gezählt werden. Die Aminosäuresequenz dieser Familie entspricht nämlich zu etwa 40–47% der von IK.<sup>44,55,61</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bezeichnung IK gewählt.

IK-Kanäle bestehen aus sechs Transmembrandomänen und bilden funktionale Homotetramere. Sowohl N- als auch C-Terminus liegen im Zytoplasma (s. Abb. 1.1).<sup>61,63</sup> Wie den SK-Kanälen fehlt auch dem IK-Kanal trotz einiger geladener Aminosäuren in S4 ein Spannungssensor. Der K<sup>+</sup>-Efflux wird demnach ausschließlich nach Aktivierung des Kanals durch einen Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> realisiert.<sup>47,53,63,64</sup> Die Porenregion zwischen S5 und S6 stellt die homologe Sequenz zu den übrigen Vertretern der Kaliumkanäle dar.<sup>65</sup> IK-Kanäle besitzen im Gegensatz zu BK-Kanälen keine charakteristischen Calcium-sensitiven Abschnitte (s. 1.2.1.2).<sup>65</sup> Ca<sup>2+</sup> bindet folglich nicht direkt an IK, sondern aktiviert den Kanal über die Bindung an das ubiquitäre Protein Calmodulin (CaM), welches mithilfe von Proteininteraktionsstudien als Sensor für cytoplasmatisches Ca<sup>2+</sup> nachgewiesen wurde und welches mit IK einen stabilen Komplex bildet.<sup>47,54,66,67</sup> Die Interaktion zwischen Kanal und Untereinheit besteht auch in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> dauerhaft über die CaM-Bindestelle, die am proximalen C-Terminus in der Nähe der Pore von IK lokalisiert ist.<sup>54,66,68</sup> Der C-Terminus liegt in Form einer  $\alpha$ -Helix vor, die durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup> an CaM über dessen N-Terminus eine sofortige Konformationsänderung erfährt, was in der Öffnung des Kanals resultiert. Der K<sub>D</sub>-Wert für die Calciumbindung von IK-Kanälen ist identisch mit der Ca<sup>2+</sup>-Affinität von Calmodulin und beträgt etwa 300–500 nM.<sup>47,54,63,65,68,69</sup> IK-Kanäle üben multiple regulatorische Einflüsse auf Ca<sup>2+</sup>-Signale und [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> aus.<sup>47</sup> So führt beispielsweise die Aktivierung von T-Lymphozyten zu einer Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern, worauf sowohl IK- als auch sogenannte CRAC-Kanäle (*Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels*) wie STIM/Orai (*stromal interaction molecule*) aktiviert werden. Der K<sup>+</sup>-Efflux über IK-Kanäle wirkt dabei als Triebkraft für die Aufrechterhaltung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms über diese Kanäle.<sup>70,71</sup>



### Abb. 1.1 Schematische Darstellung des IK-Kanals

Funktionale IK-Kanäle sind Homotetramere, deren Untereinheiten aus sechs Transmembransegmenten bestehen. Die Pore für den K<sup>+</sup>-Efflux befindet sich zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6. Sowohl N- als auch C-Terminus liegen intrazellulär. Calmodulin (CaM) fungiert als Calciumsensor des Kanals. Genaueres im Fließtext. (S: Transmembransegment, P: Pore; CaM: Calmodulin; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit)

IK-Kanäle zeigen eine breite Gewebedistribution in nicht-neuronalen Geweben. Sie werden sowohl in humanen und murinen T-Lymphozyten als auch in B-Lymphozyten sowie in anderen Subtypen hämatopoetischer Zellen exprimiert.<sup>63,71,72</sup> Darüber hinaus konnten sie in Glattmuskel- und Epithelzellen identifiziert werden. Auch in Milz und Plazenta sowie in sekretorischen Organen wie Brust- und Speicheldrüse lässt sich eine IK-Expression nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten in erregbaren Geweben wie Gehirn und ZNS bisher keine IK-Kanäle gefunden werden.<sup>45,47,65,67,73</sup>

Die breite Distribution lässt auf wichtige physiologische und pathophysiologische Funktionen von IK-Kanälen schließen. Dementsprechend weisen IK-Knockoutmäuse (IK-KO) oder WT-Tiere, welche mit IK-Kanalinhhibitoren behandelt wurden, zahlreiche Phänotypen auf. IK-KO Tiere zeigen eine normale Entwicklung und Reproduktion und keine Veränderung bei der Speichelsekretion, obwohl hohe IK-Spiegel in den Speicheldrüsen nachgewiesen wurden.<sup>72</sup> Dafür verantwortlich ist ein kompensatorischer Mechanismus über BK-Kanäle, was zum einen damit begründet wird, dass Zellen aus Speicheldrüsen von IK-KO Zellen einen BK-typischen Strom besitzen, welcher sensitiver gegenüber dem BK-Inhibitor Paxilline ist. Außerdem besitzen weder BK-KO noch IK-KO Tiere eine veränderte Speichelsekretion, allerdings ist diese in BK und IK Doppel-KO Mäusen drastisch reduziert.<sup>72,74</sup> Zudem sezerniert der Darm von IK-KO Mäusen deutlich weniger Flüssigkeit, da durch die IK-Ablation der Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Chlorid-Transport behindert ist. Aufgrund des niedrigeren Wassergehaltes ist der Kot von IK-Knockoutmäusen daher fester.<sup>75,76</sup>

Zudem übernehmen IK-Kanäle wichtige Funktionen bei der Volumenregulation von Erythrozyten, was bei der Behandlung der Sichelzellanämie genutzt wird.<sup>77-81</sup> Patienten mit Sichelzellanämie bilden als Folge einer Mutation abnormes Hämoglobin (Hb), was bei Sauerstoffmangel aufgrund einer starken Polymerisierung zu einem Verlust von Ionen und Wasser in Erythrozyten führt (Dehydratation). Dadurch entstehen rote Blutkörperchen mit einer höheren Dichte, welche eine sichelähnliche Morphologie aufweisen. Patienten mit einer homozygoten Form der Sichelzellanämie leiden daher unter chronischer Anämie sowie Schmerzen und besitzen ein höheres Risiko für Schlaganfälle.<sup>82</sup> IK-Kanäle werden ebenfalls durch einen Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oder Sauerstoffmangel aktiviert und induzieren über den Kaliumverlust auch eine Dehydratation der Erythrozyten.<sup>77,78</sup> Daher wurde anhand eines geeigneten *in vivo* Mausmodells der Sichelzellanämie überprüft, ob IK-Kanäle

potentielle Zielstrukturen für die Behandlung dieser Erkrankung darstellen. Tatsächlich konnte durch die pharmakologische Inhibition von IK eine Verbesserung der Hydratation der murinen Erythrozyten erreicht werden.<sup>77</sup> Aufgrund dieser wichtigen Befunde werden IK-Kanalinhhibitoren daher auch beim Menschen in klinischen Studien zur Behandlung der Sichelzellanämie getestet. So wurde der selektive IK-Blocker Senicapoc (ICA-17043) in klinischen Studien der Phase III verwendet.<sup>79-81</sup>

Darüber hinaus wird eine IK-Kanalinhhibition als vielversprechender Ansatz bei der Behandlung von Asthma bronchiale angesehen.<sup>83</sup> So besitzen IK-KO Mäuse beispielsweise eine verminderte Immunglobulin E-abhängige (IgE) systemische anaphylaktische Antwort.<sup>83,84</sup> Außerdem werden IK-Kanäle in vielen Zelltypen exprimiert, die an der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligt sind, wie beispielsweise in bronchialen Glattmuskelzellen (*bronchial smooth muscle*, BSM-Zellen) oder Mastzellen, und übernehmen dort relevante Funktionen.<sup>83,85</sup> Anhand eines *in vivo* Modells für Asthma bronchiale konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Tiere mit dem spezifischen IK-Kanalinhibitor Triarylmethan-34 (TRAM-34) sowohl das *Remodelling* von BSM-Zellen als auch Kollagenablagerungen beseitigt sowie die Eosinophilie in den Atemwegen verringert.<sup>85</sup>

Auch im kardiovaskulären System hat die genetische Ausschaltung des IK-Kanals Einflüsse: So konnte aufgrund einer verschlechterten Acetylcholin-induzierten Gefäßrelaxation ein leicht erhöhter Blutdruck festgestellt werden.<sup>86</sup> Daher werden IK-Kanäle auch mit Hypertension in Verbindung gebracht.<sup>65</sup> Beim Menschen führt die Applikation des spezifischen Inhibitors Senicapoc allerdings zu keiner Blutdruckerhöhung, die Substanz wird allgemein sehr gut vertragen.<sup>79</sup>

Zudem konnte in einem Mausmodell der Arteriosklerose ein verbesserter Phänotyp nach genetischer Ablation oder pharmakologischer Inhibition von IK mit TRAM-34 erreicht werden.<sup>87</sup> Konkret konnte die Entwicklung von Arteriosklerose durch die IK-Kanalinhhibition verringert werden, indem dadurch die Proliferation und Migration in Plaques von Glattmuskelzellen unterbunden, die Infiltration der Plaques durch Makrophagen und T-Lymphozyten verringert sowie der oxidative Stress reduziert wurden. Trotz wiederholter Applikation von TRAM-34 konnte dabei keine verstärkte Toxizität des Blockers ermittelt werden.<sup>87</sup> Eine weitere Arbeit zeigt zudem, dass die pharmakologische Inhibition die Suszeptibilität von Mäusen gegenüber experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis, einer Modellform der Multiplen Sklerose, moduliert.<sup>88</sup> Diese Arbeiten reflektieren wichtige Vorteile bei der Adressierung von IK-Kanälen als Arzneistoffzielstrukturen: Es stehen hochselektive Inhibitoren zur Verfügung, die gleichzeitig eine gute Verträglichkeit aufweisen. Zudem sind Verteilung und Plasmaspiegel bereits sehr gut *in vivo* charakterisiert.<sup>87,88</sup> In den Tabelle 7.2 und Tabelle 7.3 (Anhang) sind einige gängige Inhibitoren von IK-Kanälen und ihre  $K_D$ -Werte zusammengestellt, darunter auch das Derivat TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol), welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde und einen sehr selektiven IK-Kanalinhibitor darstellt.<sup>89,90</sup>

Zusammengenommen stellen IK-Kanäle aufgrund ihrer pathophysiologischen Bedeutung potentiell vielversprechende Zielstrukturen für Arzneistoffe dar. Wie bereits in Kapitel 1.1.3 erwähnt, könnte man sich dies auch aufgrund ihrer Funktion als Onkokanäle in der Antitumorthherapie zunutze machen.<sup>26,28</sup> Dies ist auch dadurch bedingt, dass spezifische Inhibitoren mit guter Verträglichkeit für experimentelle Studien zur Verfügung stehen. Damit übereinstimmend konnte bereits in einigen Tumorentitäten wie dem Glioblastom, Lungen- und Pankreaskrebs, aber auch beim Mammakarzinom ein Zusammenhang zwischen Tumorprogression und IK-Kanälen identifiziert werden.<sup>29,91,92</sup> Da die Charakterisierung von IK-Kanälen bei der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms ein

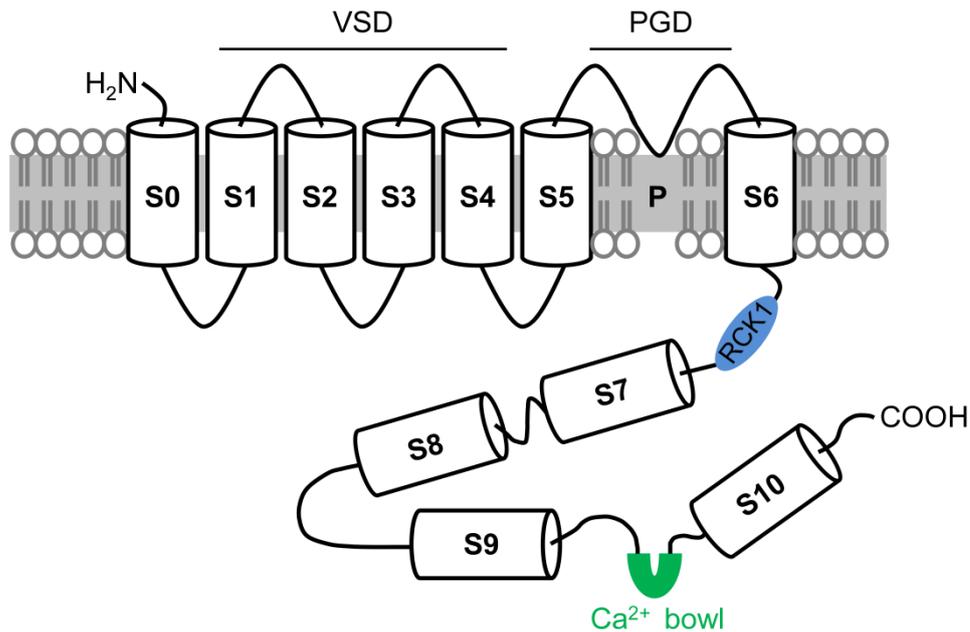
zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, wird in Kapitel 1.3.1 auf diese Zusammenhänge genauer eingegangen.

### 1.2.1.2 *Der Calcium- und spannungsaktivierte Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit (BK)*

Für den BK-Kanal finden sich in der Literatur mit MaxiK,  $K_{Ca1.1}$ , KCNMA1 und Slo1 zahlreiche weitere Namen.<sup>47,93-95</sup> Die Bezeichnung Slo1 leitet sich von der Bezeichnung des Gens *Slowpoke* ab, welches in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* für einen orthologen Kanal codiert.<sup>96</sup> Fruchtfliegen mit einer Inaktivierung von Slo1 zeigen einen prägnanten Phänotyp durch eine Störung der Signalwege in Neuronen und muskulären Geweben. So ist bei Fliegen mit einer Mutation des Gens, die eine Aufhebung des Kaliumstroms bewirkt, die Koordinationsfähigkeit und Flugfähigkeit eingeschränkt. Außerdem bleiben die Fliegen bei einem kurzen Hitzeschock für einige Minuten regungslos, was als *sticky feet* Phänomen bezeichnet wird.<sup>97,98</sup>

BK-Kanäle setzen sich aus den porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten und modulierenden  $\beta$ -Untereinheiten zusammen.<sup>99</sup> Vier  $\alpha$ -Untereinheiten bilden ein funktionales Homotetramer. Splicevarianten sowie  $\beta$ -Untereinheiten tragen zu einer breiten funktionellen Diversität bei, die Zusammensetzung des BK-Kanalkomplexes hängt dabei vom Zelltyp und den physiologischen Bedingungen ab.<sup>100,101</sup> Insgesamt gibt es vier  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_1$ – $\beta_4$ ), die von vier verschiedenen Genen codiert werden.<sup>48,49,102</sup> Sie bestehen aus 2 TM-Domänen (TM1 und TM2), zwischen denen eine große extrazelluläre Schleife liegt. Sowohl N- als auch C-Terminus sind jedoch intrazellulär lokalisiert. Die Interaktion mit der  $\alpha$ -Untereinheit des Kanals verläuft dabei über TM1 mit S1 und S2 beziehungsweise über die extrazelluläre Region von TM2 mit S0.<sup>103,104</sup> Des Weiteren wurde kürzlich eine weitere Gruppe modulierender Untereinheiten identifiziert, die sich strukturell und funktional von den  $\beta$ -Untereinheiten unterscheiden. Sie werden als  $\gamma$ -Untereinheiten oder auch *leucine-rich repeat containing*-Proteine (LRRC-Proteine) bezeichnet. Mittlerweile sind vier Subtypen (LRRC26, LRRC52, LRRC55 und LRRC38) bekannt, die gewebespezifisch exprimiert werden und so in unterschiedlicher Weise Funktionalität und Aktivität des BK-Kanalkomplexes beeinflussen.<sup>105,106</sup>

Die  $\alpha$ -Untereinheiten bestehen aus sieben Transmembrandomänen (S0–S7) und vier weiteren intrazellulären hydrophoben Segmenten (S7–S10) (s. Abb. 1.2).<sup>48</sup> Durch die zusätzliche Domäne S0 liegt der N-Terminus des Kanals extrazellulär. Die Domänen S1–S4 stellen den spannungssensitiven Abschnitt (*voltage sensor domain*, VSD) dar; die Pore liegt zwischen S5 und S6 (*pore gate domain*, PGD).<sup>57</sup> In der cytoplasmatischen Region des Kanals findet sich die regulatorische Domäne für die Kaliumleitfähigkeit (*regulator of conductance*, RCK).<sup>107</sup> In RCK1 ist neben der sogenannten  $Ca^{2+}$  *bowl* eine der beiden  $Ca^{2+}$ -Bindungsstellen lokalisiert.<sup>108</sup>



**Abb. 1.2 Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals**

Funktionale BK-Kanäle sind Homotetramere, deren Untereinheiten aus sieben Transmembransegmenten bestehen. Die Pore für den Kaliumefflux befindet sich zwischen dem S5 und S6 Segment (PGD). Der C-Terminus befindet sich intrazellulär, während der N-Terminus aufgrund der zusätzlichen S0 Transmembrandomäne extrazellulär lokalisiert ist. S1–S4 stellen den spannungssensitiven Abschnitt dar (VSD). Vier weitere hydrophobe Segmente sind intrazellulär lokalisiert. Hier finden sich auch die Calcium-sensitiven Abschnitte in der RCK1 sowie der  $Ca^{2+}$  bowl. Genauer im Fließtext. (S: Transmembransegment; P: Pore; RCK1: Domäne für Kaliumleitfähigkeit/regulator of conductance of potassium; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; VSD: Spannungsabhängige Domäne/voltage sensor domain; PGD: Porendomäne/pore gate domain)

Die zwei Bindungsstellen für  $Ca^{2+}$  in der zytoplasmatischen Region des BK-Kanals regulieren die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals. Zuerst wurde dabei die  $Ca^{2+}$  Bowl identifiziert, ein aspartatreicher Abschnitt zwischen den Domänen S9 und S10.<sup>109</sup> Mutationen in der  $Ca^{2+}$ -Bowl reduzieren die Sensitivität des BK-Kanals für  $Ca^{2+}$ , eine Restsensitivität bleibt jedoch bestehen. Daher wurde eine weitere Bindungsstelle für  $Ca^{2+}$  postuliert,<sup>109,110</sup> welche 2002 mit der RCK1-Domäne identifiziert wurde.<sup>108</sup> Neben der Aktivierung durch  $Ca^{2+}$  wurde eine Sensitivität der RCK1-Domäne für  $Mg^{2+}$  ausgemacht, wobei  $Mg^{2+}$  ebenfalls den Kanal aktiviert. Man geht von zwei verschiedenen Aktivierungswegen von  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  aus.<sup>111,112</sup> Dabei reguliert  $Mg^{2+}$  die Interaktion zwischen der VSD und der cytosolischen Domäne, um den Kanal zu aktivieren.<sup>113</sup> Zusätzlich kann die Calciumsensitivität des BK-Kanals durch die akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten reguliert werden: So führt beispielsweise eine genetische Ablation der  $\beta$ 1-Einheit zu einer verminderten  $Ca^{2+}$ -Sensitivität.<sup>65</sup> Abgesehen von der  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals von Spannungsänderungen abhängig. Bei einer niedrigen  $[Ca^{2+}]_i$  verhält sich der BK wie ein rein spannungsabhängiger  $K^+$ -Kanal.<sup>65</sup> Die spannungssensitive Domäne befindet sich in den Abschnitten S1–S4, wobei vor allem charakteristische Sequenzen mit positiv geladenen Argininresten als typische Erkennungsmerkmale spannungssensitiver Domänen in spannungsabhängigen Kaliumkanälen gelten.<sup>57</sup> Im BK-Kanal finden sich Spannungssensoren in S4,<sup>60,114</sup> S2 und S3.<sup>115</sup> Generell ist die Spannungsaktivierung unabhängig von einer möglichen Calciumbindung, allerdings kann bei einer gleichzeitigen Calciumbindung die Spannungssensitivität zu niedrigen Membranpotentialen verschoben werden.<sup>65,116</sup> Sowohl die spannungsabhängige als auch die  $Ca^{2+}$ -vermittelte Aktivierung

des Kanals verlaufen über eine allosterische Konformationsänderung. Dabei werden zwei Zustände des Kanals angenommen: der geschlossene (C-C) und offene Zustand (O-O). Beide Aktivierungswege laufen fast unabhängig voneinander ab und führen zur Kanalaktivierung. Die Öffnungswahrscheinlichkeit steigt dabei bei konstanter Spannung und erhöhter Calciumkonzentration und umgekehrt.<sup>116-119</sup> Eine weitere Regulationsmöglichkeit des BK sind reversible De-/Phosphorylierungen sowie De-/Palmitoylierungen.<sup>120,121</sup> Die Phosphorylierung des BK-Kanals durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bzw. cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ist dabei besonders gut untersucht. cAMP signalisiert über die Proteinkinase A (auch cAMP-abhängige Proteinkinase), cGMP über die Proteinkinase G (auch cGMP-abhängige Proteinkinase, cGK). Die Aktivierung der cAMP- bzw. cGMP-abhängigen Kinasen führt letztlich zu einer Aktivierung des BK-Kanals, was in einer Hyperpolarisation resultiert.<sup>122,123</sup> Eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C an S685 reduziert dagegen dessen Öffnungswahrscheinlichkeit und verhindert außerdem eine Aktivierung durch die Proteinkinase G oder A.<sup>124</sup> BK-Kanäle sind ubiquitär verbreitet. Sie finden sich vor allem in Zellen des ZNS sowie in neuroendokrinen Zellen des Pankreas, in der Nebenniere, in Glattmuskelzellen und in Mitochondrien von Kardiomyozyten.<sup>46,125-128</sup> Im ZNS konnten sie unter anderem in dendritischen Zellen und an Präsynapsen identifiziert werden, an denen sie über einen negativen Feedbackmechanismus  $\text{Ca}^{2+}$ - und Neurotransmitter-vermittelte Aktionspotentiale regulieren.<sup>129,130</sup> Auch in Purkinje-Zellen des Kleinhirns wurden BK-Kanäle detektiert, in welchen diese die schnelle Nachhyperpolarisation nach einem Aktionspotential koordinieren.<sup>131</sup> In den Glattmuskelzellen kontraktile Organe wie Atemwege, Harnblase, Gefäße und *Corpus cavernosum* regulieren BK Kanäle den Myotonus.<sup>132-134</sup> Zuerst werden über vasokonstriktische Substanzen spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aktiviert. Durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kommt es zu einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , was in der Kontraktion glatter Muskelzellen und somit einer Vasokonstriktion resultiert. Aufgrund des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs wird auch die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals erhöht. Im Zuge des daraus resultierenden  $\text{K}^+$ -Ausstroms kommt es dann zu einer Hyperpolarisation der Membran, wodurch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle schließen und der Muskeltonus sinkt.<sup>93,126,132</sup> So übernehmen BK-Kanäle wichtige Funktionen bei der Blutdruckregulation, der Urinausscheidung sowie der Peniserektion.<sup>126,132,135,136</sup> Die breite Distribution lässt auf wichtige physiologische und pathophysiologische Funktionen von BK-Kanälen schließen. Dementsprechend weisen BK-Knockoutmäuse (BK-KO) zahlreiche Phänotypen auf. In Purkinje-Zellen von BK-KO Tieren wurde beispielsweise aufgrund der Kanaldefizienz eine starke Verminderung der Zellaktivität gefunden, die sich in motorischen Störungen und Ataxie äußert.<sup>131</sup> Wie bereits erwähnt, regulieren BK-Kanäle in diesen Zellen die schnelle Nachhyperpolarisation. Durch das Fehlen des Kanals bleibt die Depolarisation bestehen, so dass  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in einem inaktiven Zustand verweilen. Dies resultiert in einer verminderten intrinsischen Aktivität der cerebellären Purkinje-Zellen.<sup>131</sup> Auch die BK-Defizienz in Glattmuskelzellen hat einen erheblichen Einfluss auf den Phänotyp von BK-KO Tieren.<sup>126</sup> So resultiert ein Fehlen oder eine Dysfunktion von BK in vaskulären Glattmuskelzellen aufgrund der ausbleibenden Hyperpolarisation in der verlängerten Gefäßkontraktion und dadurch in einem erhöhten Blutdruck. Auch die cGMP-vermittelte Relaxation glatter Muskelzellen bleibt bei einer BK-Defizienz aus. Des Weiteren zeigen BK-KO Mäuse einen erhöhten Aldosteronspiegel (Hyperaldosteronismus), was durch  $\text{Na}^+$ - und Wasserretention ebenfalls zu dem zuvor beschriebenen Bluthochdruck der BK Mausmutanten beiträgt.<sup>126</sup>

Außerdem wird dem BK-Kanal eine wichtige Funktion bei der Peniserektion zugeschrieben. In glatten Muskelzellen des *Corpus cavernosum* wird BK durch die cGKI phosphoryliert. Dies führt zur Vasodilatation und somit zu einem erhöhten Blutfluss in den Schwellkörper, was für die Erektion essentiell ist. Ein Fehlen des BK-Kanals in diesen Zellen führt hingegen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermehrt zu Kontraktionen, während im Gegenzug weniger Relaxationen in präkontrahierten Glattmuskelzellen beobachtet wurden. Daher postuliert die Arbeitsgruppe um *Mark Nelson*, dass eine BK-Kanalablation zu erektiler Dysfunktion führt.<sup>132,135</sup> Des Weiteren bewirkt die Deletion von BK in Glattmuskelzellen eine erhöhte Kontraktilität der Blasenmuskulatur und Urinfrequenz, was in Reizblasensymptomatik und Harninkontinenz resultiert.<sup>136</sup> Weitere Krankheitsbilder, die mit einer BK-Kanalablation oder -dysfunktion assoziiert werden, sind Hörverlust<sup>137</sup> sowie neurologische Fehlfunktionen, die in motorischen Defiziten resultieren.<sup>131</sup>

Zusammengenommen stellen BK-Kanäle aufgrund ihrer pathophysiologischen Bedeutung vielversprechende Zielstrukturen für Arzneistoffe dar. Daher wurde in letzter Zeit intensiv erforscht, ob man sich dies aufgrund der potentiellen Funktion der BK-Kanäle als Onkokanäle (s. auch 1.1.3) auch in der Antitumortherapie zunutze machen kann.<sup>26,28</sup> Dafür spricht auch, dass einige spezifische Inhibitoren wie das Indolditerpen Paxilline (PAX) (s. Anhang Tabelle 7.4 und Tabelle 7.5) zur Verfügung stehen, die bereits in experimentellen Studien *in vivo* verwendet wurden.<sup>138,139</sup> Eine Involvierung von BK-Kanälen in die Tumorentstehung und -progression konnte bereits für einige Entitäten wie Gehirn-, Ovarial- und auch Brusttumoren gezeigt werden.<sup>29</sup> Die Charakterisierung von BK-Kanälen im murinen Mammakarzinom war ein zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit, weshalb die Zusammenhänge zwischen der BK-Kanalfunktion und der Brustkrebsentstehung in Kapitel 1.3.1 genauer beleuchtet werden sollen.

## 1.3 Kaliumkanäle und ihre Funktion im Mammakarzinom

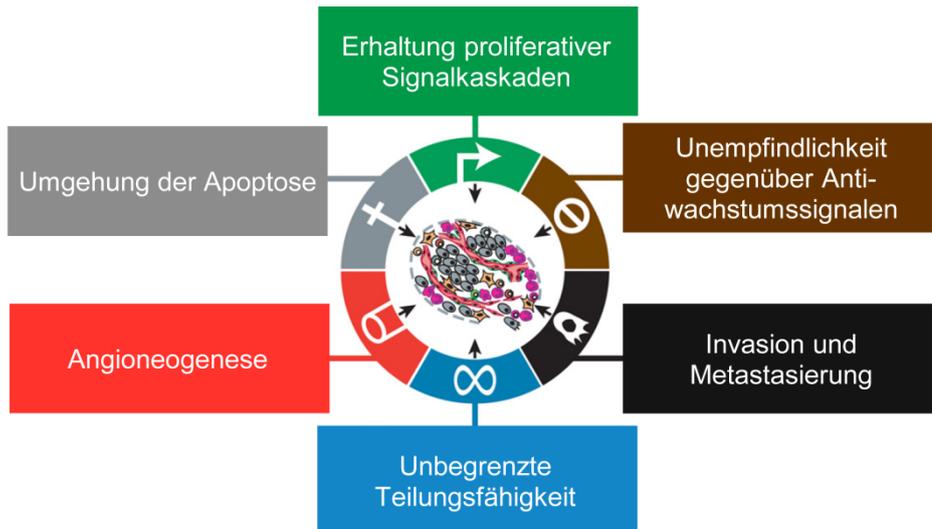
### 1.3.1 Pathophysiologische Grundlagen der Tumorigenese

Tumore werden als Erkrankungen verstanden, bei denen dynamische Prozesse des Genoms ablaufen. Die Transformation des Gewebes lässt sich in zwei Kategorien gliedern: Aktivierende Mutationen (*gain of function*) betreffen Protoonkogene, die dadurch entweder amplifiziert oder in ihrer Aktivität so gesteigert werden, dass sie die Tumorigenese begünstigen. Gleichzeitig finden sich inaktivierende Mutationen (*loss of function*) bei Tumorsuppressorgenen, wodurch z.B. eine Wachstumskontrolle nicht mehr möglich ist.<sup>140,141</sup> Selten ist dabei eine einzelne Mutation für solche Aktivierungen oder Funktionsverluste verantwortlich. Vielmehr sind kumulative Schritte und Mutationen notwendig.<sup>141-143</sup> Durch die Mutationen erwerben Tumorzellen im Zuge der sogenannten malignen Transformation Fähigkeiten, die sie von gesundem Gewebe unterscheiden und abgrenzen. Diese Fähigkeiten wurden von *Hanahan* und *Weinberg* als die sogenannten *Hallmarks of Cancer* (Kennzeichen von Krebs) definiert (s. Abb. 1.3).<sup>141,144</sup> Hierzu zählen das Umgehen der Apoptose, das Vorhandensein eigener Wachstumssignale, Insensitivität gegenüber Antiwachstumssignalen, ein unbegrenztes Teilungspotential, die Fähigkeit zur Angiogeneese sowie das Eindringen in fremdes Gewebe mit anschließender Metastasenbildung.<sup>141</sup> Später wurden diese charakteristischen Merkmale noch um weitere Kennzeichen erweitert: Veränderung des Zellmetabolismus für eine effektive neoplastische

Proliferation sowie eine Unsichtbarkeit gegenüber dem Immunsystem, insbesondere gegenüber T- und B-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen.<sup>144</sup>

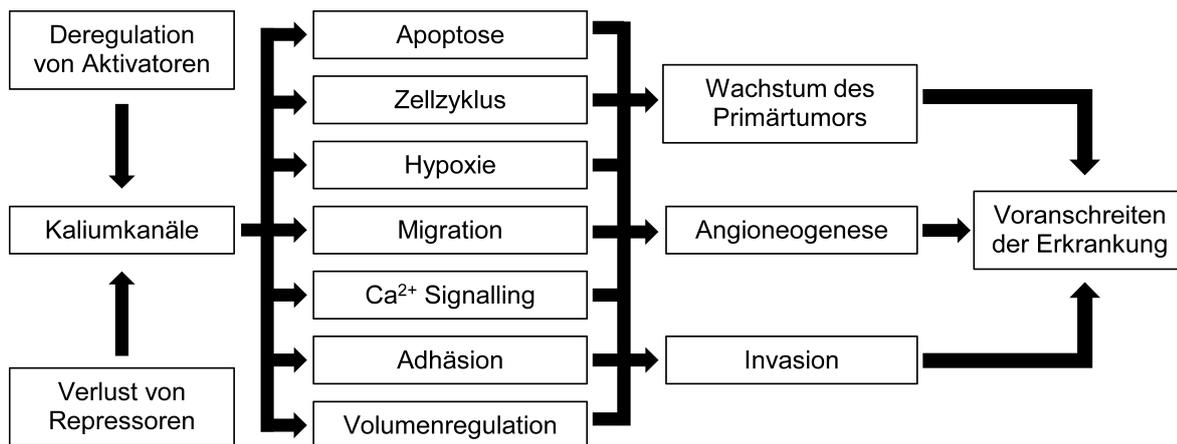
Kaliumkanäle greifen in viele dieser *Hallmarks of Cancer* regulativ ein und übernehmen dabei als Onkokanäle wichtige Funktionen bei der Entartung der Krebszellen (s. Abb. 1.4).<sup>26,28,145</sup> Sie gelten daher als Zielstrukturen für innovative Therapien des Mammakarzinoms und anderer Tumorentitäten. Dies ist unter anderem auch dadurch bedingt, dass sie als membranständige Proteine leicht zugänglich sind und ihre Pharmakologie gut beschrieben ist.<sup>28,61,145</sup> Typische Mechanismen, die von der Aktivität der Kanäle abhängen, sind die Regulation der Apoptose, des Zellzyklus, der Hypoxie, der Migration, der  $[Ca^{2+}]_i$ -abhängigen Signalkaskaden, der Adhäsion sowie des Volumens (s. **Abb.** 1.4).<sup>28,145-147</sup> Interessanterweise tragen Kaliumkanäle selten durch spezifische Mutationen zur Entartung von Zellen bei. Vielmehr wirkt ihre Überexpression *per se* onkogen, wobei transkriptionelle, post-translationale und epigenetische Ursachen zu einem veränderten Expressionslevel beitragen können.<sup>28,29</sup> Beispielsweise lässt sich für IK-Kanäle, deren Funktion bei der Tumorigenese des Mammakarzinoms im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, in verschiedenen Tumorentitäten eine Überexpression beobachten. So sind in Endometriumkarzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe sowohl IK mRNA als auch Protein stark hochreguliert.<sup>148</sup> Auch in verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien sowie in humanen Prostatakarzinombiopsien können hohe Spiegel von IK mRNA und Protein identifiziert werden.<sup>149</sup> Weitere Beispiele sind Gewebeproben bzw. humane Zelllinien aus Pankreastumoren sowie dem hepatozellulären Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC).<sup>150,151</sup> Auch in Brusttumorbiopsien wurde teilweise eine Hochregulation von IK beobachtet, welche dann zusätzlich mit einer schlechten Prognose assoziiert wird.<sup>152,153</sup> Ebenfalls werden BK-Kanäle, deren Rolle im Mammakarzinom im Zuge dieser Arbeit charakterisiert wurde, in einigen Tumoren überexprimiert. Dies konnte in einer hormon-insensitiven Prostatakarzinomzelllinie sowie teilweise in humanen Biopsien nachgewiesen werden.<sup>29,154</sup> Weitere Beispiele sind Gehirntumore und Ovarialkarzinome.<sup>29</sup> Auch in Biopsien aus hochgradigen Brusttumoren, deren Profil zudem mit einer schlechten Prognose korreliert, können erhöhte BK-Level beobachtet werden.<sup>155</sup>

Es wird deutlich, dass IK- und BK-Kanäle entscheidende Funktionen bei der Entstehung von Tumoren und auch des Mammakarzinoms übernehmen. Für ein besseres Verständnis soll daher in den kommenden Abschnitten die Rolle von Kaliumkanälen, mit einem Fokus auf IK- und BK-Kanälen, bei Tumoren genauer beleuchtet werden.



**Abb. 1.3 Charakteristische erworbene Fähigkeiten von Tumorzellen (*Hallmarks of Cancer*)**

(Modifizierte Abbildung<sup>144</sup>) Tumorzellen unterscheiden sich von nicht-malignen Zellen durch typische Charakteristika, die sie im Laufe eines malignen Transformationsprozesses erwerben. Die Fähigkeiten beinhalten eigenständige Wachstumssignale, die Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumssignalen, Gewebeeinfiltration und Metastasierung, ein unbegrenztes Teilungspotential, die Fähigkeit zur Angiogenese sowie das Umgehen der Apoptose. Genauer im Fließtext.



**Abb. 1.4 Potentielle Einflüsse von Kaliumkanälen auf tumorspezifische Prozesse und mögliche Folgen** (modifiziert<sup>28</sup>)

### 1.3.1.1 Rolle von $K^+$ -Kanälen für Zellzyklus, Wachstum und Proliferation

Wie bereits erwähnt, finden sich bei Tumoren fundamentale Veränderungen in der genetischen Kontrolle der Zellteilung, die zu einer unbeschränkten Zellproliferation führen können.<sup>156,157</sup>

Grundlage der Wachstums- und Proliferationsvorgänge ist der Zellzyklus, der sich als hochkomplexer Prozess in vier Hauptphasen (G1-, S-, G2- und M-Phase) gliedert (s. Abb. 1.5). Letztere wird nochmal in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt und beinhaltet den eigentlichen Teilungsschritt, die Mitose. G1-, S- und G2-Phase werden auch als Interphase bezeichnet.<sup>157</sup> Nach der M-Phase kann sich eine Zelle entweder erneut teilen oder in G0, den sogenannten Ruhezustand, übergehen. In der G1-Phase (Übergangsphase, *gap phase*) wird die DNA-Synthese der Zelle vorbereitet. Sie stellt einen kritischen Abschnitt des Zellzyklus dar, denn diese Phase bestimmt, ob eine Zelle weiter proliferiert oder in einen Ruhezustand übergeht und gegebenenfalls differenziert. In der S-Phase (Synthesephase) findet nun die DNA-Replikation statt. Bevor eine Zelle zum eigentlichen

Teilungsschritt übergeht, findet eine erneute Übergangsphase, die G<sub>2</sub>-Phase, statt. Der Eintritt in die M-Phase ist dann nur möglich, wenn die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen ist.

Die einzelnen Phasenübergänge werden streng von entsprechenden Proteinen kontrolliert, um einen korrekten Ablauf der Zellteilung zu ermöglichen, mögliche Schäden zu detektieren und zu beheben.<sup>158</sup> Diese Mechanismen an den Kontrollpunkten, die auch als *checkpoints* bezeichnet werden, sind hochkomplex reguliert. An diesen wird überprüft, ob eventuelle Schäden durch Reparaturmechanismen behoben werden können. In einer irreversibel geschädigten Zelle wird sonst die Apoptose ausgelöst (s. auch 1.3.1.2). Die Schlüsselstrukturen der Zellzykluskontrolle sind Komplexe aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDK). CDKs sind Serin/Threonin-Kinasen, die nach der Bindung des entsprechenden Cyclins aktiviert werden. Diese Strukturen und ihre Funktion sind in Eukaryoten hochkonserviert.<sup>159</sup> Bei Tumoren finden sich häufig Defekte in diesen Kontrollmechanismen, was in der Folge zu einer unkontrollierten Zellteilung führt. Ebenfalls sind Änderungen des Membranpotentials, des Zellvolumens sowie der  $[Ca^{2+}]_i$  essentielle Faktoren der Zellzyklusprogression (s.u.). Über diese Mechanismen können Kaliumkanäle den Zellzyklus und damit die Proliferation von Zellen modulieren.<sup>28</sup> Dies lässt sich sowohl in nicht-malignen Zellen wie T-Lymphozyten als auch in Tumorzellen beobachten.<sup>160,161</sup> Beispielsweise führt die Inhibition von BK-Kanälen in Glioblastomzellen zu einer Arretierung der Zellen in der S-Phase, was in einer reduzierten Zellzahl resultiert.<sup>161</sup> Durch die Blockade von IK-Kanälen kann wiederum in Endometriumskarzinomzellen eine Arretierung am G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Übergang beobachtet werden, was ebenfalls zu einer verminderten Proliferation führt.<sup>148</sup> Des Weiteren können Kaliumkanäle über eine Interaktion mit mitogenen Strukturen wie Cyclinen das Wachstum von Zellen beeinflussen.<sup>29,158,162,163</sup> Interessanterweise lässt sich vor der Mitose eine deutliche Änderung des Zellvolumens sowie der Zellform beobachten. Kaliumkanäle stellen zentrale Strukturen der Volumenregulation dar und können über den Kaliumstrom und damit verbunden über die Kontrolle der intrazellulären Osmolarität den Wasserfluss über die Membran ermöglichen.<sup>29</sup> In den folgenden Abschnitten soll nun der Einfluss der Kaliumkanäle auf das Membranpotential, das Zellvolumen, die Zellzykluskontrolle und somit auf den Zellzyklus und die Proliferation von Zellen genauer dargestellt werden.

Das Membranpotential gilt als wichtiger biometrischer Parameter der Zelle. Änderungen des Membranpotentials ermöglichen über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen die adäquate Progression durch den Zellzyklus.<sup>158,162</sup> Zum einen zeigen Zellen wie Neurone, die natürlicherweise stark hyperpolarisierte Ruhemembranpotentiale aufweisen, häufig nur sehr geringe proliferative Aktivität. Zum anderen kann durch einen Anstieg des Membranpotentials der Übergang der Zellen von der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase und somit die Proliferation ausgelöst werden.<sup>158</sup> Generell weisen Tumorzellen ein höheres Ruhemembranpotential auf, was ihren proliferativen Phänotyp zusätzlich unterstreicht.<sup>29,151,164,165</sup> Die Veränderung des Membranpotentials während des Zellzyklus stellt darüber hinaus einen Schlüsselfaktor für den G<sub>1</sub>/S- sowie G<sub>2</sub>/M-Übergang dar: Dem Eintritt in die S-Phase und der damit verbundenen DNA-Synthese geht häufig eine Hyperpolarisation voraus, die dann kurz vor der Mitose aufgehoben wird und in eine Depolarisation übergeht.<sup>162</sup> Entsprechend konnte in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 gezeigt werden, dass sich das Membranpotential im Verlauf des Zellzyklus stetig ändert.<sup>158,165,166</sup>

Kaliumkanäle beeinflussen als zentrale Komponenten das Membranpotential<sup>145</sup> und können hierüber unter anderem Zellzyklus und Proliferation regulieren (s. Abb. 1.5 A+B).<sup>28</sup> Sie generieren etwa die

Membranhyperpolarisation, die für die Initiierung der G1-Phase essentiell ist.<sup>167</sup> Wie bereits zuvor erwähnt, besitzen proliferierende Zellen wie Krebszellen generell ein positiveres Ruhemembranpotential,<sup>29</sup> was auch mit einer veränderten Expression bestimmter Kaliumkanäle in Verbindung gebracht wird.<sup>168</sup> Damit übereinstimmend lassen sich während des Zellzyklus in den einzelnen Phasen unterschiedliche Expressionslevel oder Aktivitäten einzelner Kaliumkanäle, z.B. für IK- oder BK-Kanäle, beobachten.<sup>29,162,166,169,170</sup> Häufig führt daher eine Inhibition von Kaliumkanälen über die Änderung des Membranpotentials zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase und damit zur einer reduzierten Proliferation. Dies kann am Beispiel der hERG-Kanäle verdeutlicht werden, welche erst ab einem Ruhemembranpotential von etwa 60 mV geöffnet sind.<sup>168</sup> Daher wird postuliert, dass ihre Überexpression zu einem depolarisierten Ruhemembranpotential und somit zum Übergang in einen proliferativen Status beiträgt.<sup>168</sup> Ein solcher Mechanismus konnte unter anderem bei der Charakterisierung der hERG-Kanäle bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) gezeigt werden.<sup>171</sup> So können hERG-Kanäle in sogenannten mononukleären Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) im Ruhezustand nicht detektiert werden. Jedoch führt eine Stimulation der PBMC mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu einer raschen Hochregulation von hERG. Diese Aktivierung wird als essentiell für die Proliferation der PBMC angesehen, welche durch die pharmakologische Inhibition von hERG reduziert werden kann. Auch in verschiedenen AML-Zelllinien, in welchen hERG aufgrund der proliferativen Eigenschaften dieser Zellen dauerhaft exprimiert wird, kann ein antiproliferativer Effekt über eine G1-Arretierung durch die hERG-Blockade beobachtet werden.<sup>171</sup> Ebenso konnte in MCF-7 Brusttumorzellen gezeigt werden, dass Kaliumkanäle über die Regulation des Membranpotentials die Proliferation koordinieren.<sup>165-167,172</sup> Diese Zellen weisen während des G1/S-Übergangs eine Hyperpolarisation auf, die auf einer erhöhten relativen Permeabilität für  $K^+$  beruht.<sup>172</sup> Es wird angenommen, dass der Phasenübergang und somit auch die Proliferation der Zellen unter anderem über  $K_{ATP}$ -Kanäle koordiniert werden, da durch die pharmakologische Inhibition dieser Kanäle eine Arretierung in der G0/G1-Phase beobachtet werden kann.<sup>167,172</sup>

Für IK- und BK-Kanäle konnte nachgewiesen werden, dass sie über die Regulation des Membranpotentials den Zellzyklus bzw. die Proliferation von MCF-7 Zellen regulieren können.<sup>166,170</sup> Die Inhibition von IK-Kanälen führt in Zellen, welche sich am G1/S-Übergang befinden, z.B. zu einer Depolarisation des Membranpotentials und zu einer Inhibition der Proliferation. Daher wird angenommen, dass IK-Kanäle in MCF-7 Zellen insbesondere an diesem Phasenübergang das Membranpotential regulieren.<sup>166</sup> Im Gegensatz dazu bewirkt eine Blockade des BK-Kanals eine leichte Depolarisation und Akkumulation der MCF-7 Zellen in der S-Phase, jedoch konnte dadurch kein antiproliferativer Effekt beobachtet werden.<sup>170</sup>

Über die Änderung des Membranpotentials kann der Kaliumstrom zudem die Triebkraft für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom sein (s. Abb. 1.5 B).  $[Ca^{2+}]_i$  ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff und Calciumbindende Proteine werden schon lange als relevanter Faktor für die Zellproliferation angesehen.<sup>28,159</sup> Intrazelluläres Calcium ist ein ubiquitärer sekundärer Botenstoff, der auch in der Brustdrüse eine Vielzahl physiologischer Prozesse beeinflusst.<sup>159,173</sup> In ruhenden Zellen beträgt  $[Ca^{2+}]_i$  etwa 100 nM, eine Stimulation der Zellen kann zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  auf über 1  $\mu$ M führen.<sup>174</sup> Etliche onkogene Faktoren nehmen  $[Ca^{2+}]_i$ -vermittelt Einfluss auf Wachstum und Überleben von Brustkrebs- und anderen Tumorzellen.<sup>175,176</sup> Dementsprechend können Veränderungen des  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalling zur

Transformation von gesunden zu Krebszellen beitragen.<sup>173,177</sup> Eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in Tumorzellen kann von Neurotransmittern, Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren ausgehen.<sup>159,175,176,178</sup>  $Ca^{2+}$  kann in der Folge entweder direkt an entsprechende Zielproteine binden und diese aktivieren oder die entsprechenden Signale über  $Ca^{2+}$ -bindende Proteine wie Calmodulin vermitteln.<sup>159,177</sup> Diese Signale werden in Abhängigkeit lokaler, übergangsweise auftretenden Oszillationen von  $[Ca^{2+}]_i$  reguliert, welche auch als  $Ca^{2+}$ -Transienten bezeichnet werden. Sie können entweder durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder durch den Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  generiert werden. Interessanterweise findet sich in Tumorzellen kein typisches Oszillationsmuster.<sup>159,173,179,180</sup> Bekannt ist, dass  $[Ca^{2+}]_i$  und Calcium-bindende Proteine in den Zellzyklus involviert sind. Insbesondere während der G1-Phase, des G1/S-Übergangs, des G2/M-Übergangs sowie zwischen Meta- und Anaphase lassen sich die zuvor beschriebenen transienten Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  sowie  $Ca^{2+}$ -Oszillationen beobachten (s. Abb. 1.5 A+B).<sup>159,174,181,182</sup> Die Oszillationen regulieren die Expression und Aktivität mitogener Kontrollstrukturen des Zellzyklus und garantieren dadurch die Zellzykluspassage (s.u.). Dementsprechend führt eine Störung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase zu einer veränderten Proliferation.<sup>174,177</sup>

In Prostatakarzinomzellen bewirkt eine IK-Aktivierung eine Hyperpolarisation des Membranpotentials, wodurch  $Ca^{2+}$ -Kanäle aus der *transient receptor potential* Familie (TRP-Kanäle) vom Typ V6 (TRPV6) öffnen und dadurch einen Calciumeinstrom ermöglichen. Durch eine Inhibition von IK kann daher eine Inhibition der Proliferation der Prostatakarzinomzellen beobachtet werden.<sup>183</sup> Auch in Pankreaskarzinomzellen lässt sich eine Wachstumsinhibition durch eine IK-Blockade nachweisen, welche ähnlich begründet wird.<sup>150</sup> So konnte durch eine artifizielle Erhöhung des extrazellulären Calciums ein verstärkter  $Ca^{2+}$ -Einstrom erreicht werden, wodurch die Wachstumsinhibition über die IK-Hemmung zumindest teilweise aufgehoben werden konnte.<sup>150</sup> Wie bereits zuvor erwähnt, kann durch die Blockade von IK-Kanälen in MCF-7 Brusttumorzellen ebenfalls eine Proliferationsinhibition über eine Depolarisation des Membranpotentials erreicht werden. Zusätzlich lässt sich dabei auch eine Reduktion von  $[Ca^{2+}]_i$  beobachten, welche vermutlich durch eine funktionale Kopplung von IK mit TRPC1-Kanälen bedingt ist.<sup>153,166</sup>

Auch können Kaliumkanäle mit mitogenen Kontrollstrukturen des Zellzyklus interagieren (s. Abb. 1.5 C). Wie bereits erwähnt, zählen hierzu die Cycline.<sup>177</sup> Ihre Expression steigt und fällt im Laufe des Zellzyklus in Abhängigkeit der Zellzyklusphase, wodurch sie periodisch die CDKs aktivieren, deren Spiegel während des gesamten Zyklus konstant bleiben. Über die Aktivierung der CDKs laufen dann Signalkaskaden für einen korrekten Verlauf des Zellzyklus ab.<sup>157</sup> Insbesondere der G1/S-Übergang ist ein kritischer Punkt, der unter anderem von Cyclin D1 reguliert wird, welches direkt durch Wachstumsfaktor-induzierte Stimuli aktiviert wird.<sup>177,184</sup> Nach ihrer Aktivierung in der frühen G1-Phase phosphorylieren D-Cyclin-abhängige CDKs beispielsweise das Retinoblastom Tumorsuppressorgen (pRb). Für viele Strukturen der Zellzykluskontrolle lässt sich eine abnormale Expression oder Transformation in humanen Tumoren nachweisen, so z.B. für Cyclin D1 oder pRb in Brusttumoren.<sup>185-187</sup> Am häufigsten lassen sich in Tumoren jedoch Mutationen (*loss of function*) des Tumorsuppressorgens p53 beobachten,<sup>140,141,188,189</sup> welches unter physiologischen Bedingungen den G1/S-Übergang kontrolliert, bei DNA-Schäden sofort aktiviert wird und in Abhängigkeit weiterer Strukturen die CDKs inhibieren kann. Dadurch wird eine G1-Arretierung der Zellen erreicht und die DNA-Reparatur ausgelöst. Im Falle eines nicht behebbaren Schadens kann p53 als Zellzyklusregulator

auch als Induktor der Apoptose fungieren.<sup>157,189</sup> Weitere wichtige Strukturen im frühen Zellzyklus sind die sogenannten *immediate early genes*, die unter anderem auch in Brustkrebszellen unmittelbar nach Wachstumsfaktorstimulation in der G1-Phase vorübergehend aktiviert werden. Ihre Expressionslevel sind in Ruhephasen extrem niedrig, steigen aber innerhalb kürzester Zeit nach entsprechenden extrazellulären Signalen an.<sup>175,190</sup> Konkrete Beispiele sind *c-fos* und *c-jun*, die unter anderem den Übergang aus der Ruhephase G0 in die G1-Phase ermöglichen und bei einer Inhibition den Eintritt in die S-Phase unterbinden.<sup>191,192</sup> Die Strukturen greifen über eine Dimerisierung zum *activator protein 1* (AP-1) unter anderem regulatorisch in die Transkription verschiedener Gene ein; *c-jun* ist anders als *c-fos* auch zur Bildung von Homodimeren fähig. Viele der regulierten Gene wie beispielsweise *Cyclin D1* und *pRb* sind in die Entstehung und Progression von Tumoren involviert (s.o.). Auch die Transkription von Regulatoren der Apoptose wie *Bcl-2* (*B-cell lymphoma*) oder *Bcl-XL* sowie der Invasion und Metastasierung wird von AP-1 kontrolliert.<sup>193</sup> In vielen Tumoren wie Ovarialkarzinom, Melanom, Kolonkarzinom und auch im Mammakarzinom finden sich Veränderungen von *c-fos* und *c-jun*.<sup>193,194</sup> Die Expression der *immediate early genes* sowie die Aktivierung bestimmter Zellzyklusproteine wie *pRb* werden außerdem durch die zuvor beschriebenen  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen koordiniert.<sup>174,177,195</sup> Des Weiteren kann durch  $[Ca^{2+}]_i$  die  $Ca^{2+}$ /CaM-abhängige Kinase (CaMK) aktiviert werden, welche in der Folge ebenfalls die Expression von *c-fos* und *c-jun* sowie *Cyclin D1* reguliert. Gemeinsam mit der Phosphatase Calcineurin wird die CaMK außerdem für die Repression des endogenen CDK-Inhibitors p21 benötigt.<sup>174</sup>

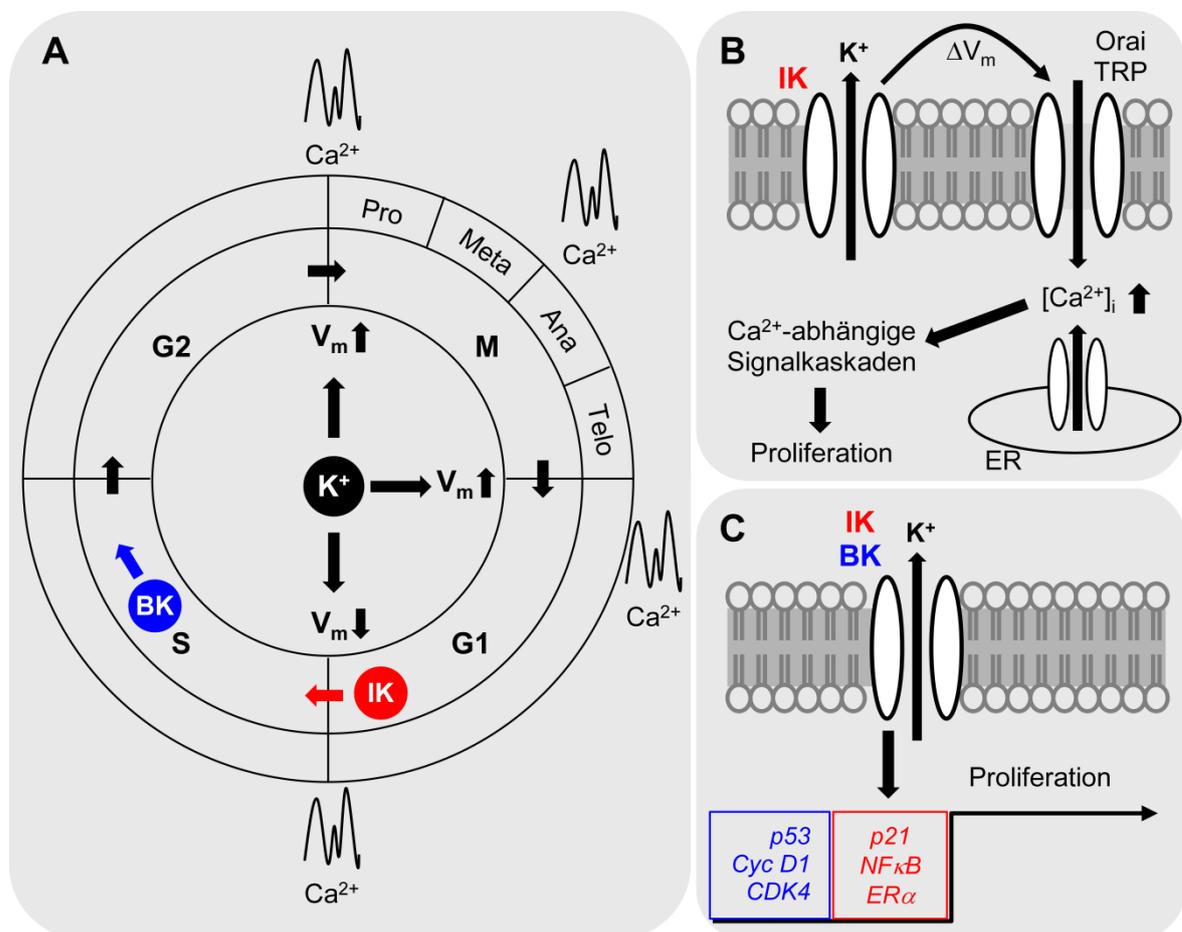
Kaliumkanäle können mit den oben erwähnten Zellzyklusstrukturen durch nicht-kanonische Funktionen, die unabhängig von ihrer Kaliumpermeabilität sind, interagieren. Sie greifen dadurch in Signalkaskaden ein, die final zum Beispiel die Transkription bestimmter Onkogene oder Tumorsuppressorgene koordinieren. Die genauen Mechanismen, wie Kaliumkanäle diese Prozesse regulieren, sind jedoch noch nicht bekannt.<sup>29,145</sup> Jedoch sind sowohl für IK- und BK-Kanäle in verschiedenen Tumorentitäten bereits erste Befunde über Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren oder Zellzyklusproteinen beschrieben (s. Abb. 1.5 C).

Beispielsweise übernehmen IK-Kanäle in Prostatakarzinomzellen wichtige Funktionen bei der Proliferation über eine Interaktion mit p21, einem endogenen CDK-Inhibitor.<sup>149,183,196</sup> In der Folge der pharmakologischen Inhibition von IK mit Clotrimazol bzw. TRAM-34 wird p21 induziert, wodurch die Proliferation der Zellen inhibiert wird. Damit übereinstimmend lässt sich durch die Behandlung der Zellen mit dem IK-Kanalöffner 1-Ethylbenzimidazolinon (1-EBIO) eine Stimulation der Proliferation beobachten.<sup>149,183</sup> Zudem konnte die Proliferation einer humanen HCC-Zelllinie durch eine pharmakologische Inhibition mit TRAM-34 reduziert werden.<sup>151</sup> In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass dieser Effekt vermutlich auf einer verminderten Expression des ER- $\alpha$  und des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF $\kappa$ B) beruht.<sup>197</sup> NF $\kappa$ B stellt einen Interaktionspartner von AP-1 dar (s.o.),<sup>198</sup> so dass IK-Kanäle in HCC-Zellen indirekt auch die AP-1-regulierte Transkription beeinflussen können.

Die pharmakologische Inhibition von BK-Kanälen in HeLa-Zellen sowie in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 bewirkt eine Arretierung in der G1-Phase und somit eine Wachstumsinhibition, welche mit einer erhöhten Expression von p53 einhergeht.<sup>199</sup> Jedoch beschreibt dieselbe Arbeitsgruppe in einer anderen Arbeit für die Ovarialkarzinomzellen genau den entgegengesetzten Effekt: So konnten sie durch die Behandlung der Zellen mit dem BK-Kanalöffner NS1619 ebenfalls eine Proliferationsinhibition aufgrund einer erhöhten p53-Expression beobachten.<sup>200</sup>

Die genaue Funktion von BK bei der Proliferation dieser Zellen bleibt somit noch ungeklärt. In einer weiteren Publikation zeigte die Arbeitsgruppe von *Ouadid-Ahidouch*, dass BK-Kanäle durch eine funktionale Kopplung mit IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (Inositoltriphosphat-Rezeptoren) die Proliferation von MCF-7 Zellen über eine G1-Arretierung koordinieren.<sup>201</sup> Dieser Effekt wird über verringerte Spiegel von Cyclin D1 und CDK4 vermittelt.<sup>201</sup> Ebenfalls wird eine Interaktion von BK mit Caveolin-1 beschrieben, welches unter anderem Prozesse wie Zellzyklus und Invasion reguliert. So führt die Inhibition von Caveolin-1 zu einer Aktivierung von BK und damit zu einer verstärkten Proliferation von MCF-7 Zellen.<sup>202</sup>

Zusammenfassend zeigen die Publikationen, dass IK- und BK-Kanäle sowie Kaliumkanäle generell wichtige Aufgaben beim Wachstum und der Proliferation von Tumorzellen übernehmen, was ihre Funktion als Onkokanäle und ihr Potential als mögliche Arzneistoffzielstrukturen weiter unterstreicht.



**Abb. 1.5 Kaliumkanal-vermittelte Regulationsmöglichkeiten der Zellproliferation**

(Vereinfacht<sup>28,29,157,158</sup>) Kaliumkanäle können den Zellzyklus und somit die Proliferation über (A) das Membranpotential, (B) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Signale und (C) nicht-kanonische Funktionen regulieren. (A) Für den G1/S-Übergang ist eine Hyperpolarisation essentiell, die auf einer erhöhten relativen Permeabilität für Kalium beruht. Diese Hyperpolarisation wird beispielsweise durch IK-Kanäle vermittelt. BK-Kanäle hingegen regulieren die Progression durch die S-Phase. Am G2/M-Übergang sowie nach der Mitose lässt sich eine Depolarisation der Membran beobachten, welche ebenfalls durch Kaliumströme reguliert wird. Darüber hinaus treten zu Beginn der G1-Phase sowie an den Phasenübergängen G1/S, G2/M sowie zwischen Meta- und Anaphase charakteristische [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Oszillationen auf. Diese sind essentiell für eine adäquate Zellzyklusprogression. (B) Die Regulation der Ca<sup>2+</sup>-Signale erfolgt ebenfalls über Kaliumkanäle, da der Kaliumstrom über die Änderung des Membranpotentials die Triebkraft für den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ist. Somit beeinflussen sie Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalwege, welche in der Folge wiederum die Zellproliferation koordinieren. (C) Kaliumkanäle können zudem über nicht-kanonische Funktionen mit Zellzyklusproteinen interagieren. Diese Mechanismen sind unabhängig von der

Kaliumpermeabilität und bis jetzt noch weitgehend unklar. In verschiedenen Tumorentitäten konnte beispielsweise ein Einfluss der BK-Kanalaktivität auf die Expression von *p53*, *Cyclin D1* oder der *CDK4* beobachtet werden. IK-Kanäle beeinflussen hingegen die Transkription von *p21*, *NFκB* sowie *ERα*. Genaueres im Fließtext. (Pro: Prophase; Meta: Metaphase; Ana: Anaphase; Telo: Telophase; M: Mitose; Vm: Membranpotential; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; TRP: Transient receptor potential; ER: Endoplasmatisches Retikulum; CDK: Cyclin-abhängige Kinase/cyclin-dependent kinase; NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; ERα: Estrogenrezeptor α)

### 1.3.1.2 Rolle von $K^+$ -Kanälen bei der Apoptose

Ein häufig in der Forschung adressiertes Charakteristikum von Tumorzellen ist eine gesteigerte Resistenz gegenüber der Apoptose, welche aus einer Störung der Balance von pro- und anti-apoptotischen Faktoren zugunsten der Antiapoptose resultiert. Kaliumkanäle können durch Interaktion mit diesen Proteinen einige der notwendigen apoptotischen Schritte regulieren.

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, um irreversibel geschädigte Zellen gezielt zu entfernen.<sup>203,204</sup> Sie geschieht als natürlicher Prozess während der Entwicklung eines Organismus und tritt darüber hinaus als Verteidigungsmechanismus bei Immunreaktionen oder anderen Noxen auf.<sup>205,206</sup> Mögliche auslösende Faktoren sind Hypoxie und Hitze sowie Bestrahlung und bestimmte Arzneistoffe, was man sich auch in der Antitumorthherapie zunutze macht.<sup>205</sup> Die Apoptose zeichnet sich durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen aus. Typische morphologische Kriterien sind das Abrunden der Zelle, die Kondensation und Fragmentierung des Zellkerns sowie der Kontaktverlust zu benachbarten Zellen und der Extrazellulärmatrix.<sup>203,204</sup> Auf biochemischer Ebene lassen sich die durch Hydrolyse entstehenden DNA-Fragmente, die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) und weitere spezifische proteolytische Prozesse detektieren.<sup>203,204</sup> Die Apoptose wird über intrazelluläre Signalkaskaden durch sogenannte Cystein-Asparaginsäure-spezifische Proteasen (Caspasen) zellspezifisch koordiniert, so dass nicht betroffene Zellen nicht beschädigt werden.<sup>189,203,207</sup> Letztlich werden die im Zuge des Absterbens gebildeten apoptotischen Körper (*apoptotic bodies*) von Phagozyten entfernt.<sup>203</sup> Caspasen sind hochspezifische Cystein-Proteasen, die als inaktive Vorläuferenzyme in Zellen vorliegen und dabei keine oder geringe proteolytische Aktivität zeigen.<sup>203,207</sup> Nach ihrer Aktivierung schneiden die Enzyme die wichtigsten Bestandteile des Zytoskeletts, so z.B. die Komponenten des Actin-Mikrofilaments wie Actin und Actin-assoziierte Proteine wie Myosin und Tubuline. Es wird angenommen, dass diese gezielte Auflösung des Zytoskeletts die bei der Apoptose typischen abgerundeten Zellkörper verursacht.<sup>203</sup>

Nach heutigem Standpunkt werden drei Hauptwege der Apoptose unterschieden, der extrinsische Weg (Todesrezeptor Weg) und der intrinsische Weg (mitochondrialer Weg) sowie der Granzym-Weg (s. Abb. 1.6). Zwar unterscheiden sich die Kaskaden in ihrer Aktivierung, allerdings führen alle zu einer Aktivierung verschiedener Caspasen, insbesondere der wichtigsten Effektorcaspasen Caspase 3, 6 und 7.<sup>203-205,208</sup> Der extrinsische Weg wird über die Bindung eines entsprechenden Liganden an den korrespondierenden transmembranären Todesrezeptor (*death receptor*, DR) induziert.<sup>203-205</sup> Die dadurch ausgelöste Signalkaskade aktiviert final die Caspase 8, welche nun proteolytisch die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktiviert.<sup>208</sup> Der intrinsische Weg wird durch Stimuli aktiviert, die nicht Rezeptor-vermittelt ablaufen. Mögliche Auslöser des intrinsischen Signalwegs sind einerseits der Verlust bestimmter Wachstumsfaktoren, Hormone oder Zytokine, andererseits auch Bestrahlung, Hypoxie, Toxine, freie Radikale oder virale Infektionen. Durch die daraus entstehenden DNA-Schäden wird p53 aktiviert, welches die Balance zugunsten der proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie verschiebt.<sup>189</sup> Diese interagieren direkt mit den Mitochondrien und verändern dadurch

die innere Mitochondrienmembran, was in der Öffnung mitochondrialer Poren, dem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials und der Freisetzung weiterer proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom C in das Cytosol resultiert.<sup>205</sup> Cytochrom C selbst bildet mit dem Apoptose-auslösendem Faktor-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*, APAF-1) und der Pro-Caspase 9 das sogenannte Apoptosom, über das die aktive Form der Caspase 9 entsteht. Aktive Caspase 9 aktiviert ihrerseits die Effektorcaspasen 3, 6 und 7, was letztlich zur Auflösung der Zellstruktur führt (s.o.).<sup>189,203-205,208</sup> Theoretisch kann auch eine Interaktion zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg über die Caspase 8-vermittelte Spaltung des Proteins *BH3 interacting domain death agonist* (BID) erfolgen. Das daraus resultierende tBID, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, kann einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und somit den intrinsischen Signalweg auslösen (s.u.).<sup>203,205,208</sup> Die Apoptose kann zudem durch  $[Ca^{2+}]_i$  initiiert und reguliert werden, wenngleich die genaue Funktion von  $Ca^{2+}$  kontrovers diskutiert wird.<sup>174,179,180,209</sup> Die pro- bzw. antiapoptotische Wirkung von  $[Ca^{2+}]_i$  ist stark von der  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration abhängig. Das Kriterium für ein  $Ca^{2+}$ -abhängiges apoptotisches Signal ist ein Konzentrationsanstieg, der nicht das zytotoxische Level erreicht und daher nicht zu Nekrose führen könnte.<sup>173,180,210</sup> Im Zuge des programmierten Zelltods wirkt es dagegen als Aktivator für Effektorproteine der Apoptose wie etwa für Caspasen (s.o.)<sup>179,180,210</sup> oder für die Transporterenzyme von Phosphatidylserin.<sup>210</sup> Außerdem kann  $[Ca^{2+}]_i$  die mitochondriale Cytochrom C-Freisetzung (s.o.) erhöhen und somit das apoptotische Signal amplifizieren.<sup>209</sup> Auch eine direkte Interaktion mit Bcl-2 ist beschrieben.<sup>211</sup>

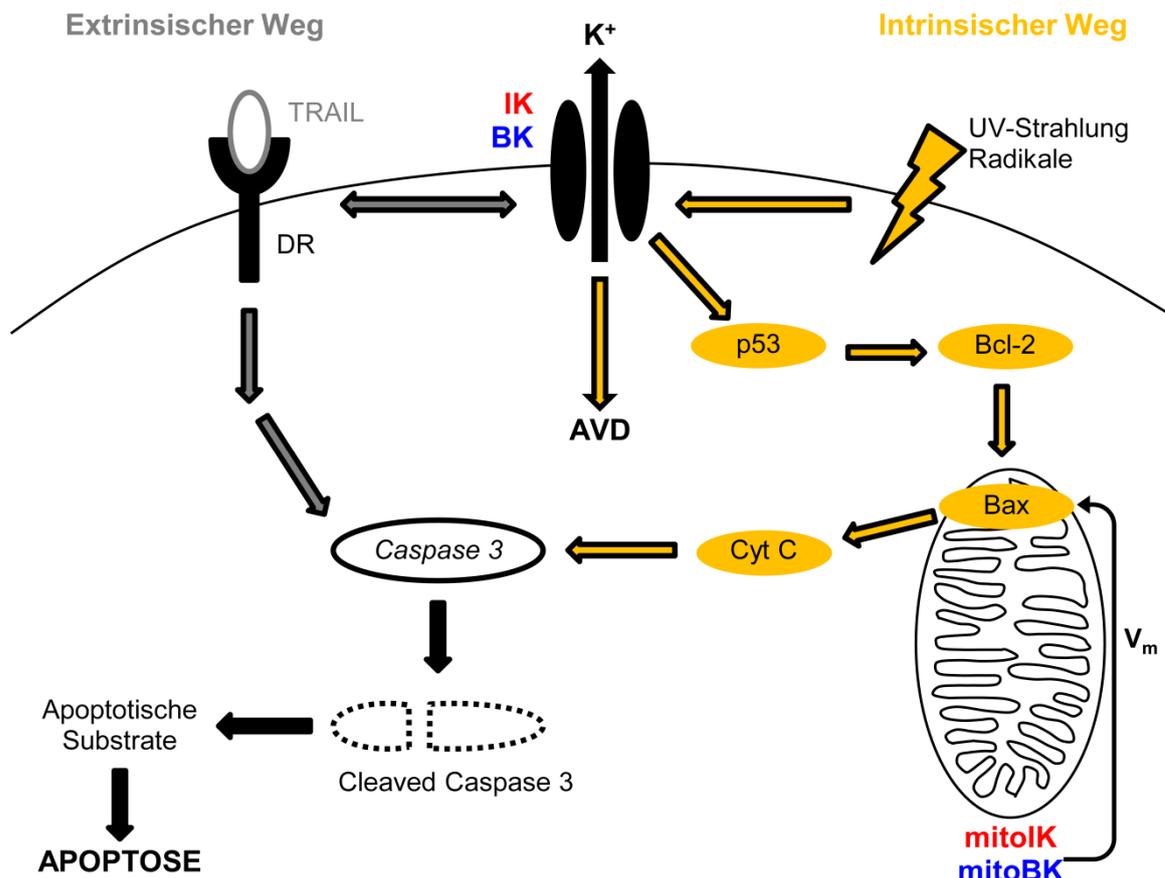
Kaliumkanäle und auch  $K_{Ca}$  können an vielen Punkten der hochkomplexen apoptotischen Signalwege eingreifen, wenngleich kein spezifischer Subtyp für alle Tumorentitäten ausfindig gemacht werden kann.<sup>212</sup> So können Kaliumkanäle sowohl mit dem intrinsischen als auch mit dem extrinsischen Signalweg interagieren. Damit übereinstimmend lässt sich zu Beginn der Apoptose eine Volumenreduktion beobachten (*apoptotic volume decrease*, AVD),<sup>163,212,213</sup> die mit einer Bewegung von Ionen über die Plasmamembran und damit einem passiven Transport von Wasser über Aquaporine verbunden ist. Damit übereinstimmend finden sich häufig reduzierte intrazelluläre Kaliumspiegel aufgrund des Kaliumeffluxes. Eine veränderte Kaliumkanalexpression oder -aktivität kann folglich die Volumenreduktion beeinträchtigen.<sup>28,145,163,212</sup> Beispielsweise sind  $K_v$ -Kanäle in der AML-Zelllinie ML-1 an den ersten Schritten der mitochondrialen Signalkaskade beteiligt.<sup>214</sup> So induziert eine UV-Bestrahlung in diesen Zellen eine starke Hochregulation der Kanäle, was in der Folge c-jun-terminale Kinasen (JNK) aktiviert.<sup>214</sup> JNK lösen bekanntlich über den intrinsischen Signalweg die Apoptose aus.<sup>215,216</sup> Darüber hinaus führt die pharmakologische Inhibition von SK2-Kanälen in MCF-7 Zellen zu einer Reduktion von Bcl-2 sowie einer Aktivierung von Caspase 7 und Caspase 9, nicht jedoch von Caspase 8. Dies impliziert eine Involvierung von SK2 in den intrinsischen Signalweg in MCF-7 Zellen.<sup>217</sup> Eine weitere Arbeit zeigt, dass für die Induktion der Apoptose durch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in verschiedenen Tumorzelllinien, darunter auch in der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3, die Aktivität von hERG-Kanälen essentiell ist.<sup>218</sup>

Auch IK- und BK-Kanäle können die Apoptose von Tumorzellen regulieren. Wie in Kapitel 1.3.1.1 beschrieben, ist beispielsweise eine Interaktion von BK-Kanälen mit p53 in HeLa-Zellen sowie in einer Ovarialkarzinomzelllinie bekannt. Die pharmakologische Inhibition mit IbTx führt in der Folge nicht nur zu einem antiproliferativen Effekt, sondern induziert auch die Apoptose über eine erhöhte Expression von p53, p21 und Bax.<sup>199</sup> Interessanterweise beobachtete dieselbe Arbeitsgruppe durch die Behandlung der Ovarialkarzinomzelllinien mit dem BK-Kanalöffner NS1619 ebenfalls eine Induktion

der Apoptose über p53, p21 und Bax.<sup>200</sup> Die genaue Funktion von BK-Kanälen bei der Apoptose bleibt in diesen Zellen somit ungeklärt. Außerdem können BK und IK über eine Regulation des AVD in apoptotische Signalwege von Tumorzellen eingreifen.<sup>213</sup> So vermitteln IK-Kanäle in Gliomzellen die Volumenreduktion, welche über den mitochondrialen Signalweg induziert wird. Dies konnte durch eine Behandlung der Zellen mit Staurosporin (STS) gezeigt werden. STS ist ein Induktor des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs<sup>219,220</sup> und induziert einen schnellen globalen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , was zu einer Öffnung der IK-Kanäle und somit zur apoptotischen Volumenreduktion führt.<sup>213</sup> Im Gegensatz dazu wird eine Volumenreduktion über den Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (*tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand*, TRAIL), welcher durch Bindung an den Todesrezeptor den extrinsischen Signalweg auslöst, über BK-Kanäle reguliert.<sup>213</sup> Damit übereinstimmend konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass die zusätzliche Behandlung mit PAX von TRAIL-resistenten Gliomzellen wieder zu einer Apoptoseinduktion über TRAIL führt. Dies ist bedingt durch eine Hochregulation des TRAIL-Rezeptors DR5, was final in einer verstärkten Aktivierung der Caspase 3 resultiert.<sup>221</sup> Dass eine Kombination mit Kanalinhhibitoren zu einer Induktion der Apoptose über TRAIL führen kann, ist auch für IK-Kanäle in humanen Melanomzellen beschrieben.<sup>222</sup> TRAM-34 führt in diesen Zellen zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase, apoptotische Signalwege bleiben nach alleiniger TRAM-34 Applikation jedoch unbeeinflusst. Eine Kombination mit TRAIL hingegen bewirkt eine starke Induktion der Apoptose sowohl in TRAIL-sensitiven als auch in TRAIL-resistenten Zelllinien: Dies betrifft einerseits den extrinsischen Signalweg (s. Abb. 1.6), da eine erhöhte Expression von DR4 und DR5 detektiert werden konnte. Andererseits kann durch die Kombination in den intrinsischen Weg über eine Änderung des Mitochondrienmembranpotential eingegriffen werden, wodurch Cytochrom C, der Apoptose-induzierende Faktor (*apoptosis inducing factor*, AIF) und SMAC (*second mitochondrial activator of caspases*) ins Cytosol freigesetzt werden. Damit übereinstimmend wurde ebenfalls eine veränderte Aktivität der Caspasen 3 und 9 nachgewiesen.<sup>222</sup> In der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 konnte hingegen auch durch die alleinige Behandlung mit TRAM-34 ein antiapoptotischer Effekt über einen noch ungeklärten Mechanismus beobachtet werden.<sup>223</sup> Interessanterweise wurde in epidermoiden Krebszellen jedoch gezeigt, dass eine pharmakologische Inhibition von IK die Sensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin vermindert.<sup>224</sup> Cisplatin bewirkt in diesen Zellen normalerweise eine Reduktion der Zellviabilität über eine Induktion der Caspasen 3 und 7. Durch die gleichzeitige Applikation von Clotrimazol oder TRAM-34 können jedoch sowohl die Zellviabilität erhöht als auch die Caspaseaktivität reduziert werden.<sup>224</sup> Zudem ist bekannt, dass Zoledronat in MDA-MB-231 Zellen die Apoptose induziert, was mit einer Aktivierung von BK-Kanälen einhergeht.<sup>225</sup> Dies wird vermutlich über einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  sowie einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials koordiniert, da beide Prozesse sowohl durch die Behandlung mit Zoledronat als auch mit dem BK-Kanalöffner NS1619 ausgelöst werden.<sup>225</sup> IK und BK werden außerdem auch in Mitochondrien von Zellen exprimiert und könnten so den intrinsischen Signalweg über die Regulation des mitochondrialen Membranpotentials koordinieren. Beispielsweise konnten in der inneren Mitochondrienmembran einer humanen Kolonkarzinomzelllinie sowie in HeLa-Zellen IK-Kanäle (mitoIK<sub>Ca</sub>) identifiziert werden, die zur Regulation des Membranpotentials und somit zur Induktion des intrinsischen Signalwegs beitragen könnten.<sup>226,227</sup> Auch BK-Kanäle konnten bereits in Mitochondrien von Gliomzellen nachgewiesen werden. Diese mitoBK<sub>Ca</sub>-Kanäle regulieren ebenfalls das Membranpotential und koordinieren somit auch dessen Zusammenbruch nach einem apoptotischen

Stimulus.<sup>228</sup> Sowohl IK- als auch BK-Kanäle könnten demnach direkt die Freisetzung von Cytochrom C und die anschließende Caspasenaktivierung beeinflussen.

Kaliumkanäle und darunter auch IK- und BK-Kanäle sind also zusammengenommen für einen adäquaten Ablauf der Apoptose wichtig. Dadurch tragen sie essentiell zur Malignität von Tumorzellen bei, in welchen die Apoptose bekanntermaßen dereguliert ist (s.o.).



**Abb. 1.6 Kaliumkanal-vermittelte Regulationsmöglichkeiten der Apoptose**

(Vereinfacht<sup>201,207,210,215,221,222</sup>) Die Apoptose kann durch zwei Signalwege eingeleitet werden. Der **extrinsische Weg** wird durch die Bindung eines Todesliganden, z.B. TRAIL, an den korrespondierenden Todesrezeptor (DR) aktiviert. Der **intrinsische Weg** (mitochondrialer Weg) wird durch Stimuli wie UV-Strahlung oder Radikale induziert und führt zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Beide Signalwege aktivieren final die Caspase 3 durch proteolytische Spaltung, worauf die Zellstruktur letztlich zerstört wird. Von Kaliumkanälen ist bekannt, dass sie sowohl mit dem extrinsischen als auch mit dem intrinsischen Signalweg interagieren können. Beispielsweise wird eine TRAIL-vermittelte Volumenreduktion über BK-Kanäle reguliert. Darüber hinaus führt eine Inhibition des BK-Kanals zu einer Hochregulation von p53 sowie Bax und somit zu einer Aktivierung des mitochondrialen Signalweges. Des Weiteren lassen sich in der inneren Mitochondrienmembran IK- und BK-Kanäle nachweisen, welche über eine Regulation des mitochondrialen Membranpotentials ebenfalls den intrinsischen Signalweg koordinieren können. Außerdem ist bekannt, dass Kaliumkanäle die sogenannte apoptotische Volumenreduktion (AVD) vermitteln, welche bei der Induktion der Apoptose von essentieller Bedeutung ist. Genauer im Fließtext. (TRAIL: *tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand*; DR: Todesrezeptor/*death receptor*; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; AVD: Apoptotische Volumenreduktion/*apoptotic volume decrease*; Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*; Cyt C: Cytochrom C; V<sub>m</sub>: Membranpotential; mito: Mitochondrien)

### 1.3.1.3 Rolle von $K^+$ -Kanälen bei der Migration und Metastasierung

Wenngleich es kein Bestandteil der vorliegenden Arbeit war, die Funktion von IK- und BK-Kanälen bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen zu charakterisieren, soll ihre Rolle bei diesen Prozessen dennoch an dieser Stelle kurz beleuchtet werden. Schließlich ist die Metastasierung von Tumorzellen eine der größten Herausforderungen in der heutigen Tumorthapie und ist klinisch enorm bedeutend, denn bei etwa 90% aller Patienten sind die Metastasen für den Tod verantwortlich.<sup>29,141,144</sup> Die Metastasierung beschreibt einen hochkomplexen Prozess, der Migration, Invasion und Adhäsion beinhaltet, und als Schlüsseleigenschaft bösartiger Tumorerkrankungen zu verstehen ist. Metastasierende Zellen müssen sich aus dem Zellverband des Ursprungsgewebes, dem Primärtumor, lösen und in die Lymph- oder Blutbahn gelangen, um so fremdes Gewebe zu infiltrieren und Absiedlungen zu bilden.<sup>29,145</sup> Für eine gezielte Migration und Infiltration sind spezifische hapto- und chemotaktische Signale, intrazelluläre Signalkaskaden, eine motorische Aktivität der Zelle über eine Volumenreduktion und Integrität des Zytoskeletts sowie ein Ablösen von der Extrazellulärmatrix und im Anschluss die Reorganisation der Zelle notwendig.<sup>26</sup> Ionenkanäle können in all diese Vorgänge involviert sein, spielen aber insbesondere bei der Regulation des Zellvolumens eine essentielle Rolle.<sup>26,145,229</sup> Dies ist bei der Migration insofern von Bedeutung, als dass die Integrität des Zytoskeletts stark vom Zellvolumen abhängt.<sup>229</sup> Um Gewebearrrieren zu überwinden, müssen sich Tumorzellen kurzfristig lokal morphologisch verändern, was auch als morphologische Polarität bezeichnet wird.<sup>26,229</sup> Konkret bedeutet dies, dass der vordere Teil der Zelle mit der Bewegung beginnt und dadurch als sogenannte Lamellopodien aus dem restlichen Zellkörper hinausragt (*protrusion*), verbunden mit einem lokalem, isoosmotischen Anstieg des Zellvolumens. Der hintere Teil der Zelle muss nun nachrücken (*retraction*), was durch eine lokale, isoosmotische Reduktion des Zellvolumens garantiert wird.<sup>147</sup> Genau über diese Änderungen des Zellvolumens tragen Ionenkanäle und so auch Kaliumkanäle zu einem invasiven Phänotyp bei. Damit wird auch begründet, warum Kaliumkanäle in fast allen migrierenden Zelltypen wie Leukozyten und Tumorzellen nachgewiesen werden konnten.<sup>145,147,229</sup> Dementsprechend konnte für viele Tumorentitäten gezeigt werden, dass  $K^+$ -Onkokanäle an der Zellmigration und Metastasierung beteiligt sind.<sup>26</sup>

In der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 übernehmen hERG-Kanäle über die Kontrolle des Membranpotentials sowie des  $Ca^{2+}$ -Einstroms wichtige Funktionen bei der Zellmigration.<sup>230</sup> So kann durch die Inhibition bzw. den siRNA-vermittelten *knockdown* von hERG die Migration der Zellen reduziert werden. Dies geschieht aufgrund der Depolarisation des Membranpotentials sowie eines reduzierten  $Ca^{2+}$ -Einstroms, welcher auf einer Interaktion von hERG mit Orail-Kanälen beruht.<sup>230</sup> Auch in kolorektalen Tumoren ist die Aktivität von hERG-Kanälen eine wichtige Determinante für einen invasiven Phänotyp.<sup>231</sup> Zum einen lassen sich in invasiveren Subtypen höhere hERG-Proteinlevel beobachten. Zum anderen kann durch eine hERG-Überexpression das Migrationspotential entsprechender Zelllinien gesteigert werden.<sup>231</sup> In Melanomzellen wurden SK3-Kanäle als essentielle Faktoren der Zellmotilität ausgemacht.<sup>232</sup> Die Motilität wird über die SK3-vermittelte Hyperpolarisation der Membran erreicht, worüber vermutlich ein Einstrom von  $Ca^{2+}$  ermöglicht wird. Durch einen *knockdown* von SK3 kann die Motilität der Zellen inhibiert werden. Ob SK3-Kanäle die Motilität auch über eine Volumenregulation beeinflussen, ist noch ungeklärt.<sup>232</sup> Auch für Brusttumore konnte eine Beteiligung von SK3-Kanälen an der Migration nachgewiesen werden.<sup>233</sup> Dies wurde darüber gezeigt, dass SK3 in der metastasierenden Zelllinie MDA-MB-435s, nicht aber in Brusttumorzelllinien mit geringer migratorischer Kapazität, wie beispielsweise MCF-7, exprimiert

wird. Während ein *knockdown* bzw. eine pharmakologische Inhibition in MDA-MB-435s zu einer geringeren Migration führt, kann durch eine induzierte SK3-Expression in MCF-7 Zellen die Migration ausgelöst werden.<sup>233</sup> Die Koordination der Zellmigration erfolgt in MDA-MB-435s Zellen über einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ , welcher von SK3 durch eine Interaktion mit Orai1 kontrolliert wird.<sup>234</sup> IK-Kanäle werden in vielen migrierenden Zelltypen gefunden, so auch in nicht malignen Immunzellen. Ihr möglicher Beitrag zur Migration und Metastasierung von Tumorzellen wird meist mit einer entsprechenden Überexpression begründet. Häufig kann dabei durch eine Kanalinhhibition oder -ablation eine verringerte Metastasierung erreicht werden.<sup>147</sup> IK-Kanäle regulieren durch den Kaliumausstrom insbesondere die *retraction* der Zelle, was durch eine gezielte Inhibition von IK am vorderen bzw. hinteren Abschnitt der Zelle gezeigt werden konnte.<sup>29,229</sup> In Gliomzellen ist ihr Beitrag zur Migration und Metastasierung bereits sehr detailliert in der Literatur beschrieben: Die erhöhte Expression der Kanäle führt zu einem migratorischen Phänotyp und wird häufig über eine Interaktion mit entsprechenden Zytokinen und Chemokinen oder durch eine Volumenreduktion vermittelt.<sup>26,91,92,235,236</sup> Die Aktivierung der IK-Kanäle kann unter anderem über  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen erfolgen, welche durch Wachstumsfaktor-vermittelte Stimuli induziert werden.<sup>235</sup> Die Beteiligung von IK-Kanälen an der Migration von Glioblastomzellen konnte damit übereinstimmend auch *in vivo* bestätigt werden.<sup>237</sup> Auch in Melanomzellen konnte durch ChTx eine reduzierte Migration erreicht werden, was zumindest teilweise auf eine Involvierung von IK-Kanälen in Metastasierungsprozesse dieser Tumorentität schließen lässt.<sup>238</sup> Des Weiteren ist eine erhöhte Expression von *KCNN4* mit der epithelial-mesenchymalen Transition humaner Kolonkarzinomzellen assoziiert. Dieser Vorgang führt zu einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten und fördert somit die Migration der Zellen.<sup>239</sup> Auch in der Brusttumorzelllinie MDA-MB-231 konnte durch den siRNA-vermittelten *knockdown* bzw. die pharmakologische Inhibition von IK die Anzahl migrierender Zellen signifikant reduziert werden.<sup>223</sup> Von BK-Kanälen ist bekannt, dass sie mit einigen Faktoren der Extrazellulärmatrix wie Cortactin oder fokalen Adhäsionskinasen (FAK) interagieren und somit zur Metastasierung beitragen können.<sup>240</sup> Insbesondere beim infiltrierenden Phänotyp des Glioblastoms wird BK-Kanälen eine wichtige Funktion zugeschrieben. Ihr Beitrag zum Metastasierungspotential ist dabei zelltypabhängig: So modulieren sie beispielsweise lediglich die Migration von Gliomzellen, nicht aber die von Microglia.<sup>147</sup> BK-Kanäle wirken als promigratorische Faktoren, denn eine Inhibition kann die Migration verhindern.<sup>241,242</sup> Der Eingriff von BK in das Migrationsverhalten wird unter anderem durch eine Aufrechterhaltung erhöhter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spiegel über eine Interaktion mit TRMP8<sup>243</sup> sowie muskarinergen Signalwegen erreicht.<sup>244</sup> Therapeutisch relevant ist insbesondere die Tatsache, dass die laut Leitlinie eingesetzte Bestrahlung von Glioblastomen zu einer radioinduzierten Migration *in vitro* und *in vivo* führt. Dies wird möglicherweise über BK-Kanäle und eine Induktion der CaMKII vermittelt.<sup>139,245</sup> Auch in Brusttumoren wird BK-Kanälen eine wichtige Funktion bei der Migration und Metastasierung zugeschrieben. Sowohl BK mRNA als auch Protein werden in hohen Mengen in der gehirnmastasierten Zelllinie MDA-MB-361 gefunden.<sup>246</sup> In der eigentlich nicht-metastasierenden Zelllinie MCF-7 kann darüber hinaus eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von BK das Invasionspotential erhöhen. Daher wird BK-Kanälen eine wichtige Rolle beim Metastasierungsverhalten von Brusttumorzellen zugeschrieben. Dafür verantwortlich ist wohl eine Splicevariante des BK, deren Expression sowohl zu einer erhöhten Proliferation als auch Invasion führt.<sup>246</sup> Vermutlich wird der veränderte invasive Phänotyp von MCF-7 Zellen durch die zuvor

beschriebene Interaktion mit Caveolin-1 ausgelöst (s. 1.3.1.1), da die Inhibition dieser Struktur zu einer erhöhten Aktivität von BK führt und somit die Invasion der Zellen begünstigt.<sup>202</sup>

Zusammenfassend zeigen die Befunde der Literatur, dass funktionale IK- und BK-Kanäle sowie weitere Kaliumkanäle für die Migration und einen invasiven Phänotyp von Tumorzellen essentiell sind. Da dieses *hallmark* eine der größten Herausforderungen der heutigen Tumorthherapie darstellt, ist die Erforschung Kaliumkanal-vermittelter Eingriffe in die Metastasierung von großer Bedeutung.

### 1.3.2 Veränderte Signalwege des Mammakarzinoms

In den folgenden Kapiteln sollen für ein besseres Verständnis kurz die Ras/MAPK- sowie die PI3K/Akt-Signalkaskaden vorgestellt werden. Diese sind in Tumoren und so auch Brusttumoren häufig verändert, wodurch sie zur Malignität der Erkrankung beitragen. Darüber hinaus sind sie für die onkogene Transformation des Brustgewebes der Mausmodelle verantwortlich, welche im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden (s. 3.1).

#### 1.3.2.1 HER2 als Bestandteil der HER/ERBB-Familie

HER2 gehört zur ERBB-Familie, welche aus insgesamt vier eng verwandten Genen besteht, die alle für strukturell ähnliche Rezeptortyrosinkinasen codieren.<sup>247-249</sup> Hierzu zählen ERBB (HER), ERBB-2 (HER2, *neu*), ERBB-3 (HER3) und ERBB-4 (HER4). ERBB codiert für den Prototypen des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (*epidermal growth factor receptor*, EGF). Die Proteine der HER-Familie werden in vielen verschiedenen Geweben exprimiert.<sup>20,249</sup> In der Brustdrüse regulieren sie normalerweise Wachstum sowie Differenzierung.<sup>247</sup> Insbesondere HER2 wird eine wichtige Funktion bei der malignen Transformation des Brustgewebes zugeschrieben (s. 1.3.2.1).

Allerdings können auch von anderen Subtypen Überexpression und Amplifikation in Brusttumoren nachgewiesen werden, so z.B. für ERBB.<sup>17,247,250-252</sup> Eine ERBB-3 Überexpression wurde sogar mehrfach in Brusttumoren gefunden. Diese beruht allerdings nicht auf einer Genamplifikation, sondern vielmehr auf einer gesteigerten Gentranskription. Obwohl hohe ERBB-3 Spiegel mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für Metastasen in Lymphknoten assoziiert sind, scheint eine klinische Bedeutung der ERBB-3 Überexpression, beispielsweise als Prognosefaktor, zum jetzigen Zeitpunkt unwahrscheinlich.<sup>253,254</sup> Dennoch wird vermutet, dass dieser Rezeptor eine wichtige Funktion bei der Dimerisierung des klinisch relevanten HER2 übernimmt (s.u.). Interessanterweise ist eine hohe Expression von ERBB-4 in Brusttumoren ungewöhnlich.<sup>247,255</sup> Dieser Rezeptorsubtyp wird jedoch häufig in ER-positiven Tumoren (s. 1.1.2) nachgewiesen und wird daher sogar eher mit einer positiven Prognose in Verbindung gebracht.<sup>256,257</sup>

EGF-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne, einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Insgesamt sind über zwölf verschiedene Liganden bekannt,<sup>249,258</sup> unter anderem EGF und der Transformierende Wachstumsfaktor (*tumour growth factor*, TGF- $\alpha$ ).<sup>247</sup> Die Liganden können dabei unterschiedliche Präferenzen für die einzelnen Rezeptorsubtypen aufweisen.<sup>247</sup> Auch eine indirekte Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren ist möglich. Allen Subtypen gemein ist, dass sie nach der Bindung des Liganden Homo- oder Heterodimere bilden, was zu einer Transphosphorylierung der intrazellulären Domäne führt.<sup>247,249,259</sup> Durch die anschließende Phosphorylierung werden diverse intrazelluläre Proteine (s.u.) aktiviert, die als sogenannte sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) weitere

Signalkaskaden aktivieren (s. Abb. 1.7). Auch eine Interaktion mit weiteren Transmembranproteinen und den damit verbundenen Signalwegen ist durch die Tyrosin-Phosphorylierung möglich.<sup>247,249</sup>

Im Folgenden soll nun genauer auf den Rezeptorsubtyp HER2 eingegangen werden, da insbesondere diesem nach heutigem Forschungsstand eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs zugeschrieben wird. HER2 ist in 20–30% der Brusttumoren überexprimiert, und die Überexpression korreliert mit einer schlechten Prognose (s. 1.1.2). Darüber hinaus wird das onkogene Potential der Rezeptortyrosinkinase auch in der *in vivo* Forschung intensiv in entsprechenden Mausmodellen, wie beispielsweise im MMTV-cNeu Mausmodell (s. 3.1), genutzt.

Interessant ist, dass die alleinige Überexpression in Zelllinien bzw. Veränderung in Mausmodellen ausreicht, um eine Transformation und Metastasierung zu erzielen, obgleich eine Überexpression des entsprechenden Liganden nicht detektierbar ist.<sup>247,260,261</sup> Vielmehr wird angenommen, dass HER2 im Gegensatz zu ERBB-1 oder ERBB-4 dauerhaft aktiv ist und nicht in einer inaktiven und aktiven Konformation vorliegt. Dies wurde mithilfe von Kristallstrukturanalysen gezeigt.<sup>258,262,263</sup> Die dauerhafte Aktivierung von HER2 erfolgt demnach nicht über die Bindung eines spezifischen Liganden, sondern über eine Dimerisierung mit den anderen Subtypen, nachdem an diese der Ligand gebunden hat. HER2 mimiert folglich den Liganden-gebundenen Status der anderen Rezeptoren.<sup>258,263</sup> Neben der Komplexierung mit ERBB-1 wird insbesondere der Dimerisierung von HER2 mit ERBB-3 eine entscheidende Funktion bei der Tumorigenese zugeschrieben, da ERBB-3 dadurch das onkogene Potential von HER2 weiter steigert und zudem am häufigsten in Brusttumoren detektiert wird.<sup>264</sup> ERBB-3 ist nämlich zum einen dazu in der Lage, Signaltransduktionsproteine vom Src-Typ zu binden, welche wiederum den Ras/MAPK-Signalweg aktivieren (s.u.). Zum anderen ist ERBB-3 ein wichtiger Induktor der PI3K/Akt-Signalkaskade (*Ak transforming factor*) (s.u.), welche die Transformation, Apoptose sowie das Invasionspotential von Zellen reguliert.<sup>265</sup> Diese Kaskade wird wie auch die Ras/MAPK-Signalkaskade über die Dimerisierung von ERB-Rezeptoren ausgelöst, wodurch Transkriptionsfaktoren wie c-fos, c-jun, c-myc oder NFκB aktiviert werden.<sup>248</sup> Die Abhängigkeit dieser Signalwege von der HER2-Aktivität wird umso deutlicher, da eine Induktion dieser Gene durch eine Herunterregulation von HER2 ausbleibt.<sup>264</sup> Auch eine Interaktion von HER2 mit Src-Kinasen wird diskutiert.<sup>249</sup> In den Kapiteln 1.3.2.2 und 1.3.2.3 wird auf die MAPK- und die PI3K/Akt-Signalwege etwas genauer eingegangen.

Mögliche Folgen der deregulierten HER2-Signalkaskaden betreffen beispielsweise die Zellpolarität und Zelladhäsion. Durch die Überexpression wird außerdem ein invasiver Phänotyp der Brusttumorzellen begünstigt. Darüber hinaus wird auch ein verändertes Proliferationsverhalten beobachtet, welches auf einer Deregulation der Zellzykluskontrolle beruht, insbesondere am G1/S-Übergang. Zwei Strukturen, deren Aktivität durch HER2 beeinflusst wird und die als Zellzyklusregulatoren fungieren, sind beispielsweise Cyclin D1 (s. 1.3.1.1) und p27.<sup>249</sup>

### 1.3.2.2 Die Ras/MAPK-Signalkaskade

Einer der Hauptsignalwege, welcher durch die Dimerisierung von HER2 mit anderen Subtypen, insbesondere mit EGFR,<sup>249</sup> stimuliert wird, ist die Ras/MAPK-Signalkaskade (auch ERK-Kaskade, s. Abb. 1.7). Die Dimerisierung führt zu einer Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosindomänen, an die das Adapterprotein *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) über seine SH2-Domäne andocken kann. Über die SH3-Domäne bindet es an *mammalian homologue of the son of sevenless* (SOS), einem Guanosinnukleotid-Austauschfaktor (*guanosine triphosphate exchange factor*, GEF),

und bildet mit diesem einen Komplex, über den Ras durch die Umwandlung von Guanosindiphosphat (GDP) in Guanosintriphosphat (GTP) aktiviert wird. Eine Inaktivierung erfolgt durch GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase activating proteins*, GAP-Proteine), welche die Hydrolyse von GTP zu GDP katalysieren. Ras kann nun Effektorenzyme wie die Serin/Threonin-Kinase Raf (*receptor activation factor*) aktivieren, welche wiederum die Kinasen *mitogen extracellular signal kinase* MEK1 und MEK2 phosphoryliert. Dies bewirkt unter anderem die Phosphorylierung der Kinasen *mitogen-activated protein kinase* 1 und 2 (MAPK), welche auch als *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) bekannt sind und die Zellproliferation regulieren.<sup>23,266</sup> Die HER-vermittelte Aktivierung ist vermutlich nicht nur für die Transmission des Signals essentiell, sondern auch für das Ausmaß der Stimulation entscheidend.<sup>264</sup> Dies nimmt wiederum Einfluss auf die Expression von Transkriptionsfaktoren wie c-jun und c-fos und deren Dimerisierung zu AP-1 (s. auch 1.3.1.1) und weitere Prozesse wie Proliferation, Differenzierung oder Überleben.<sup>198,249,264,266-268</sup>

Mutationen in der Ras/MAPK-Signalkaskade können Ras selbst betreffen: In Tumoren finden sich sehr häufig Mutationen in allen drei Isoformen von Ras (*hras*, *nras*, *kras*), die dadurch eine erhöhte GTPase-Aktivität aufweisen. Ebenfalls ist möglich, dass Veränderungen an früheren Stellen der Signalkaskade auftreten können, wie beispielsweise eine Amplifikation von HER2, die dann zu einer verstärkten Aktivierung des Signalweges führen können. Auch Mutationen von Ras-Effektorproteinen sind möglich.<sup>266</sup>

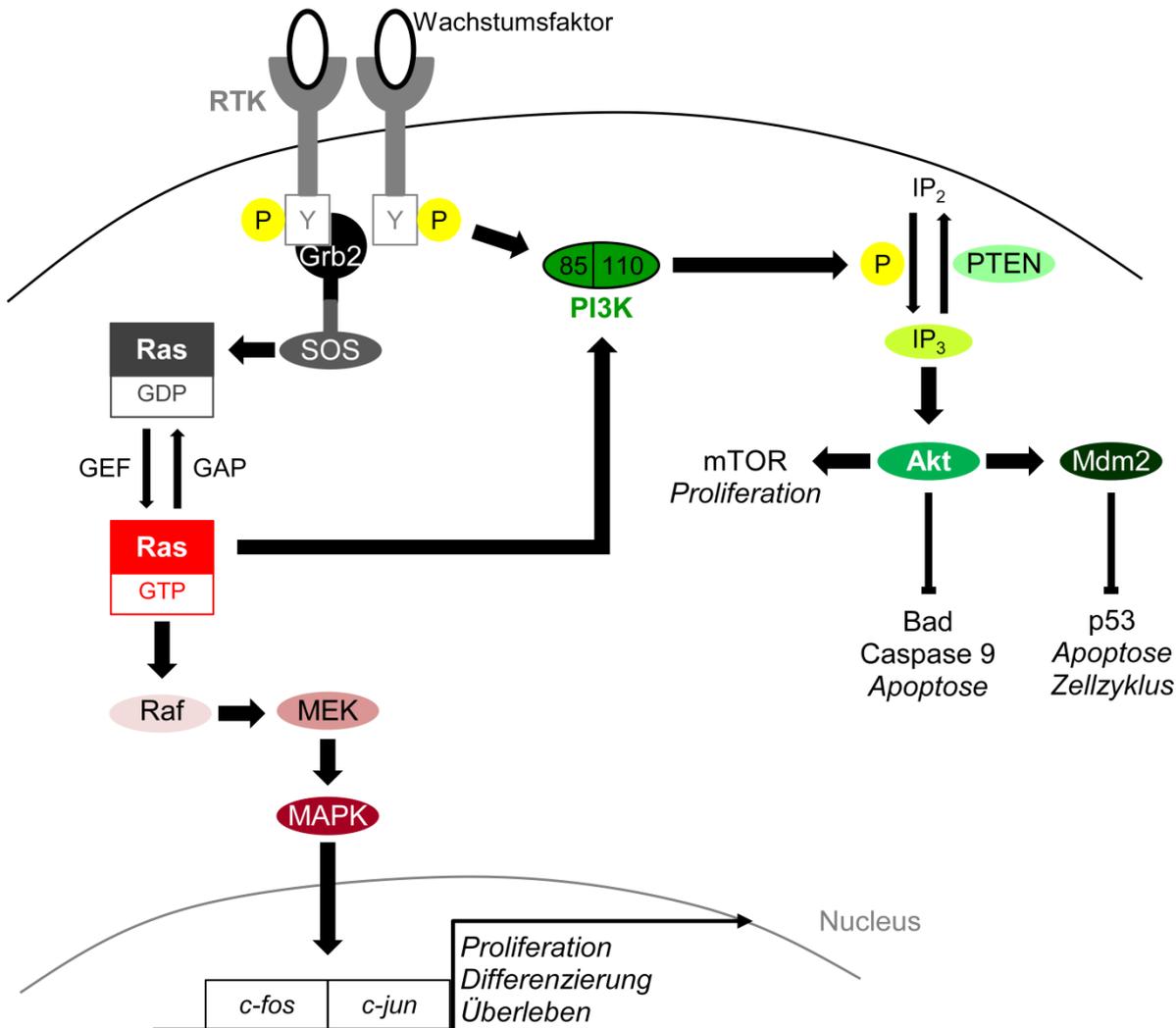
Unter anderem können auch IK-Kanäle durch die Ras/MAPK-Signalkaskade aktiviert werden.<sup>269,270</sup> Dies ist für Fibroblasten bekannt, in welchen die Wachstumsfaktor-vermittelte Aktivierung von Ras/MAPK IK-Kanäle induziert, wodurch das Wachstum und die Proliferation der Zellen koordiniert werden.<sup>270,271</sup> Auch für eine Glioblastomzelllinie wird postuliert, dass IK-Kanäle über Ras/MAPK funktional aktiviert werden. Jedoch bedarf es für eine genaue Charakterisierung dieses Signalwegs weiterer Experimente.<sup>269</sup> Darüber hinaus ist *KCNN4* in murinen HER2-positiven Mammatumoren im Vergleich zu nicht-transformiertem Gewebe hochreguliert, was eine wichtige Funktion von IK in diesen Tumoren vermuten lässt.<sup>272</sup>

### 1.3.2.3 Die PI3K/Akt-Signalkaskade

Der PI3K/Akt-Signalweg sowie damit zusammenhängende Signalkaskaden sind wichtig für die Internalisierung der Effekte externer Wachstumsfaktoren und von Rezeptortyrosinkinasen wie HER2.<sup>273</sup> Ebenfalls kann PI3K durch Ras aktiviert werden (s. Abb. 1.7).<sup>266</sup> Dadurch werden das Wachstum und Überleben sowie das Invasionspotential von Zellen reguliert. Eine verstärkte Aktivierung führt daher zu Wachstumsvorteilen, Metastasierung und häufig auch zu Therapieresistenz. Es sind verschiedene Isoformen von PI3K bekannt, wobei die PI3K der Klasse I am ausführlichsten beschrieben ist. Die Isoformen bestehen meist aus einer regulatorischen Domäne (p85, p65 oder p101) sowie einer katalytischen p110-Domäne und phosphorylieren nach ihrer Aktivierung über Wachstumsfaktorrezeptoren Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>), welches wiederum an Akt bindet und dieses phosphoryliert.<sup>23,249,273-275</sup> Akt ist auch als Proteinkinase B bekannt und aktiviert oder inaktiviert durch Phosphorylierung wiederum etliche Zielstrukturen, welche für verschiedene Zellprozesse verantwortlich sind. Beispielsweise inhibiert Akt durch Phosphorylierung proapoptotische Faktoren wie Bad oder die Pro-Caspase 9 und begünstigt somit durch die Unterdrückung der Apoptose das Überleben der Zellen. Dies wird durch die Inaktivierung von p53 über die Phosphorylierung von *mouse double minute 2 homolog* (MDM2)

unterstützt. Zellproliferation und Zellzyklus reguliert Akt unter anderem durch die Interaktion mit *mechanistic target of rapamycin* (mTOR).<sup>273,275</sup> Darüber hinaus kann es in Zellzyklusprozesse auch über die Interaktion mit p53 eingreifen.<sup>273</sup> Bei Tumoren können neben der Amplifikation von HER2 auch Veränderungen der Signalmoleküle für die Entartung verantwortlich sein. So ist der Gegenspieler von PI3K, die Phosphatase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), sehr häufig von aktivitätsreduzierenden Mutationen betroffen, aber auch PI3K und Akt selbst können durch Amplifikation oder Mutationen in ihrer Aktivität gesteigert werden.<sup>273,274</sup>

Ähnlich wie bei der MAPK-Signalkaskade kann auch über PI3K eine verstärkte Aktivierung durch eine Überexpression von HER2 beobachtet werden. Die zuvor erwähnte Regulation über die Heterodimerisierung von HER2 mit ERBB-3 ist für diesen Weg besonders essentiell, da nur ERBB-3 die regulatorische p85-Untereinheit von PI3K rekrutieren kann. Für die Aktivierung von PI3K wiederum ist HER2 essentiell.<sup>264</sup> Damit übereinstimmend wird die Transformation von Zellen, welche HER2 überexprimieren, auch mit einer verstärkten Phosphorylierung von HER3 und somit einer verstärkten Aktivierung von PI3K und Akt assoziiert.<sup>249</sup> Viele Arzneistoffe, die heutzutage eingesetzt werden, greifen als sogenannte Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren in die oben beschriebenen Signalkaskaden ein. Dazu zählt das bereits beschriebene Lapatinib zur Behandlung des HER2-positiven Mammakarzinoms. Alternativ kann der Rezeptor mithilfe therapeutischer Antikörper, beispielsweise Trastuzumab und Pertuzumab, adressiert werden (s. 1.1.2). Indirekt greifen diese Wirkstoffe in die oben beschriebenen Kaskaden und die davon abhängige Transformation und Mutation der Zellen ein.



**Abb. 1.7 HER-abhängige Signalkaskaden bei Tumoren**

Nach Bindung des entsprechenden Wachstumsfaktors dimerisieren zwei Rezeptortyrosinkinasen (RTK) vom HER-Typ zu Homo- oder Heterodimeren. Für den Subtyp HER2 sind keine spezifischen Liganden beschrieben, allerdings können an diesen beispielsweise weitere Vertreter der HER-Familie wie HER1 oder HER3 binden. In der Folge kommt es zu einer Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen (Y), woraufhin verschiedene Signalkaskaden stimuliert werden. Links dargestellt ist der **RAS/MAPK-Signalweg**. Über das Adapterprotein Grb2 wird das GTP-Austauschprotein SOS aktiviert, welches durch die Übertragung von GTP das G-Protein Ras aktiviert. Ras ist in vielen Tumoren mutiert und gilt daher als Onkogen. In weiteren Schritten werden Raf und MEK phosphoryliert und letztlich die MAP-Kinase, welche die Transkription verschiedener Faktoren reguliert, welche für Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen verantwortlich sind. Ras kann außerdem den **PI3K/Akt-Signalweg** aktivieren, welcher darüber hinaus auch direkt durch die Autophosphorylierung der Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert werden kann. Die PI3K phosphoryliert IP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub>, wodurch die Proteinkinase B (Akt) aktiviert wird, welche ihrerseits Strukturen wie mTOR, Bad, die Caspase 9 oder p53 phosphoryliert und dadurch Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Zellzyklus reguliert. In Tumoren finden sich häufig maligne Veränderungen in beiden Signalwegen. Genauer im Fließtext. (RTK: Rezeptortyrosinkinase; P: Phosphorylierung; Y: Tyrosin; Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*; SOS: *son of sevenless*; GDP: Guanosindiphosphat; GEF: *guanosine triphosphate exchange factor*; GAP: *GTPase activating protein*; MEK: *mitogen extracellular kinase*; MAPK: *mitogen-activated protein kinase*; PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase; IP<sub>2</sub>: Inositoldiphosphat; IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat; PTEN: *phosphatase and tensin homolog*; mTOR: *mechanistic target of rapamycin*; Mdm2: *mouse double minute 2 homolog*)

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Funktion(en) von Kaliumkanälen vom IK- und BK-Typ bei Brustkrebs. Hierbei steht die Identifikation der zellulären Signalwege, über die IK bzw. BK die Entstehung und das Wachstum von Brustkrebs beeinflussen, im Vordergrund. Zellproliferation und Apoptosemechanismen als wichtige Determinanten der Tumorentstehung und des Tumorwachstums sollen dabei in IK- (IK-KO) und BK-defizienten (BK-KO) tumortragenden Brustkrebsmäusen und deren Wildtypwurfgeschwistern charakterisiert werden, um letztlich die kausale Rolle der Kaliumkanäle bei diesen Prozessen *in vivo* zu etablieren. Diese grundlegenden Untersuchungen werden durch neue Therapieansätze mit  $K_{Ca}$ -Kanalblockern in Monotherapie und als Komponente einer Kombinationstherapie mit gängigen Brustkrebs-Therapeutika ergänzt.

Konkret standen folgende Aspekte zur möglichen onkogenen Rolle von IK und BK im Fokus der vorliegenden Arbeit:

- i. Untersuchungen zum Einfluss der genetischen bzw. pharmakologischen Inhibition von IK und BK auf das tumorfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben von MMTV-PyMT und MMTV-cNeu Brustkrebsmäusen.
- ii. Bedeutung und Auswirkungen des genetischen Hintergrunds der Versuchstiere auf die Tumorentstehung und das Tumorwachstum.
- iii. Charakterisierung des Wachstumsverhaltens, der Zellzyklusregulation, von Apoptosemechanismen sowie  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalwegen in primären Brusttumorzellen aus MMTV-PyMT WT und IK-KO und BK-KO Tieren.
- iv. Analyse der Zytostatikasensitivität primärer Brusttumorzellen aus dem MMTV-PyMT Mausmodell in Kombinationstherapie mit gängigen Chemotherapeutika und  $K_{Ca}$ -Kanalblockern bzw. nach einer genetischen Ablation der Kanäle.



## 3 Material

### 3.1 Mauslinien

Mauslinie	Genetische Bezeichnung	Herkunft
MMTV-PyMT	FVB/N-Tg <sup>(MMTV-PyVT)634Mul/J</sup>	Jackson Laboratory <sup>§</sup>
MMTV-cNeu	FVB/N-Tg <sup>(MMTVneu)202Mul/J</sup>	Jackson Laboratory <sup>§</sup>
BK	Kcnma1 <sup>tm1Ruth</sup>	Prof. Ruth, Universität Tübingen
IK	Kcnn4 <sup>tm1.1Jele</sup>	Prof. Ruth, Universität Tübingen
FVB/N	FVB/NCrl	Charles River
C57Bl/6	C57Bl6/NCrl	Charles River

<sup>§</sup>Die Tiere sind auf einem FVB/N-Hintergrund kommerziell bei Jackson Laboratory erwerblich und in Deutschland über Charles River zu beziehen.

#### **FVB/N-Tg<sup>(MMTV-PyVT)634Mul/J</sup>**

MMTV-PyMT (FVB/N-Tg<sup>(MMTV-PyVT)634Mul/J</sup>) Tiere exprimieren das *polyoma virus middle T antigene* (PyMT) unter der Kontrolle des brustgewebespezifischen Mausmammatumovirus-Promotors (*mouse mammary tumour virus*, MMTV). Dies führt im FVB/N Mäusestamm in einem Alter von durchschnittlich etwa 60 Tagen zu multifokalen Tumoren der Brustdrüse.

Die Tumorinduktion wird über das funktionale *middle T antigene* vermittelt,<sup>276</sup> das selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, allerdings Protoonkogene in ihrer Aktivität moduliert.<sup>277</sup> Unter anderem assoziiert es mit Tyrosinkinase der c-src Familie (c-src, c-yes und fyn), wodurch stabile Komplexe entstehen. Im Zuge der Phosphorylierung von PyMT durch die Tyrosinkinase wird deren spezifische Aktivität gesteigert.<sup>278-281</sup> Eine Sonderstellung scheint dabei allerdings *fyn* einzunehmen, da *fyn* das Antigen bindet, aber nicht phosphoryliert und damit auch keine Aktivitätssteigerung induziert.<sup>279,281</sup> In Src-defizienten Mäusen konnte zudem beobachtet werden, dass eine brustgewebespezifische Expression von PyMT nur selten Tumore auslöst.<sup>282</sup> Im Gegenzug reicht eine alleinige konstitutive Aktivierung von *Src* nur selten aus, um die Entwicklung einer Hyperplasie des Brustgewebes in ein invasives Karzinom zu fördern.<sup>283</sup> Daraus wird deutlich, dass PyMT für die maligne Transformation zahlreiche Faktoren rekrutieren muss.

So wurde als weiterer Interaktionspartner des *middle T antigene* die PI3K identifiziert (s. 1.3.2.3), die ebenfalls Bestandteil des o.g. Komplexes ist.<sup>284</sup> PI3K aktiviert in der Folge die Serin/Threonin-Kinase Akt,<sup>273,285</sup> wodurch proapoptische Proteine wie Bad oder die Caspase 9 phosphoryliert und inhibiert werden.<sup>286,287</sup> Die Bindung des Antigens an PI3K erfolgt über die 85 kDa-Untereinheit der Kinase. Dafür essentiell ist ein charakteristisches Motiv des Antigens, die aus den Aminosäuren Asparagin, Prolin, Threonin und Tyrosin bestehende NPTY-Sequenz. Über diese kann PyMT zudem mit dem Src-Homolog SHC interagieren, welches in die Aktivierung von *Ras* involviert ist.<sup>277</sup> Auch PyMT selbst kann diesen Signalweg aktivieren.<sup>288,289</sup> Bei der Interaktion mit PI3K und SHC entsteht ein Komplex, der eine weitere Untereinheit der PI3K beinhaltet, die neben SHC und dem Antigen ebenfalls phosphoryliert wird.<sup>277</sup> Dass sowohl die Aktivierung von Src als auch von PI3K für die PyMT-induzierte Transformation notwendig ist, konnte durch eine Mutation von PyMT gezeigt werden.

Mutiertes PyMT kann Src oder PI3K nicht binden, wodurch auch eine effiziente Transformation des Brustgewebes nicht mehr möglich ist.<sup>290,291</sup>

Die Interaktionen aus den *in vitro* Befunden betonen die klinische Relevanz des MMTV-PyMT Modells: Obwohl PyMT in humanen Brusttumorzellen nicht exprimiert wird, interagiert es mit der Src-Signalkaskade und der PI3K, welche bekanntermaßen im humanen Mammakarzinom pathologisch verändert sind.<sup>292</sup> Darüber hinaus ist die Expression von PyMT in den Tieren mit einem erhöhten Level von *c-myc* assoziiert,<sup>292-294</sup> welches in amplifizierten chromosomalen Regionen lokalisiert ist, die bei Brustkrebs gefunden wurden.<sup>295</sup>

Der frühe Entstehungszeitpunkt der Tumore macht das MMTV-PyMT Mausmodell zu einem praktikablen Werkzeug in der präklinischen Forschung. Darüber hinaus sind die Tumore bezüglich ihrer Genexpression weniger heterogen als die Karzinome anderer Modelle: So können die meisten MMTV-PyMT Tumore als lumbale, solide Adenokarzinome klassifiziert werden (s. 1.1.2).<sup>296</sup> Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass das PyMT-Onkogen über eine Lentiviren-vermittelte Expression auch andere Brusttumorsubtypen induzieren kann.<sup>297</sup> Der MMTV-Promotor bewirkt insbesondere die PyMT-Expression in hormonsensitiven Brustepithelzellen, während über Lentiviren auch in weiteren Zelltypen eine Expression von PyMT ausgelöst werden kann.<sup>297</sup> *Lin et al.* haben darüber hinaus eine eigene, mausspezifische Einteilung der Tumore in vier Stadien nach histologischen Kriterien sowie der Präsenz verschiedener Biomarker erstellt (s. Tabelle 3.1).<sup>292</sup> Mit dieser Studie lässt sich die klinische Relevanz des Modells weiter belegen: Ähnlich wie beim Menschen korreliert auch bei MMTV-PyMT Tieren der Verlust von Estrogen- und Progesteronrezeptoren mit der malignen Transformation des Gewebes. Im Gegenzug findet sich im späten Stadium eine erhöhte Expression von ErbB2/Neu sowie Cyclin D1.<sup>292</sup> Diese Vorgänge korrelieren auch in humanen Brusttumoren mit einer schlechten Prognose.<sup>5,264,295,298</sup>

Das MMTV-PyMT Modell ist außerdem ein hervorragendes Werkzeug zur Untersuchung des Metastasierungsverhaltens von Brustkrebs, da ca. 90% der Tiere bereits im Alter von 100 Tagen multiple Lungenmetastasen entwickelt. Die Tatsache, dass die Metastasierung die heutzutage häufigste Todesursache des Mammakarzinoms darstellt,<sup>141,299</sup> unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit dieses Mausmodells für die Forschung.

Entscheidend für den Entstehungszeitpunkt der Tumore im MMTV-PyMT Mausmodell ist der genetische Hintergrund der Tiere, was auf veränderte Genexpressionsmuster zurückzuführen ist.<sup>300,301</sup>

So verschiebt sich beispielsweise dieser Zeitpunkt im C57Bl/6 Mausstamm von etwa 92 Tagen auf durchschnittlich 53 Tage in Mäusen auf dem FVB-Hintergrund.<sup>300,302</sup>

### **Tabelle 3.1 Stadieneinteilung der Brusttumore von MMTV-PyMT Mäusen**

(Modifiziert nach<sup>292</sup>) Anhand spezifischer Biomarker, die immunhistochemisch nachgewiesen werden, lassen sich vier Stadien unterscheiden. Die Überprüfung des Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie von neu, dem murinen Homolog des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors 2, entspricht den Biomarkern beim Menschen (s. auch Tabelle 1.1). Genauer im Fließtext. (ER: Estrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*).

Status	Hyperplasie	Adenom	Frühes Karzinom	Spätes Karzinom
ER	++	+++	++	+/-
PR	+	++	+/-	-
Neu (T/D)	~1	↑	↑↑	↑↑↑
Cyclin D1	+	+	++	+++

**FVB/N-Tg<sup>(MMTV<sup>neu</sup>)202Mul/J</sup>**

MMTV-cNeu Tiere (FVB/N-Tg<sup>(MMTV<sup>neu</sup>)202Mul/J</sup>) exprimieren über den MMTV-Promotor brustgewebespezifisch die Rezeptortyrosinkinase *neu*,<sup>17</sup> bei der es sich um das Rattenhomolog des HER2 handelt (s. 1.3.2.1).<sup>303,304</sup> Wie in 1.3.2.1 beschrieben, führt eine Überexpression von HER2 bei ca. 20–30% der Patienten zu Brusttumoren mit einer schlechten Prognose, weshalb es sich bei diesem Modell um ein klinisch hochrelevantes Tiermodell für das Mammakarzinom handelt.<sup>249</sup> Auf einem FVB/N-Hintergrund entwickeln die Tiere durchschnittlich in einem Alter von 205 Tagen Brusttumore.<sup>260</sup> Wie im MMTV-PyMT Mausmodell hängt auch bei diesen Tieren der Entstehungszeitpunkt vom genetischen Hintergrund des Mausstamms ab, ein Befund, der auch im hiesigen Arbeitskreis bestätigt werden konnte (s. Severine Stehling „Untersuchung der Rolle von Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanälen in der Entstehung von Tumoren und deren Chemoresistenz“, Dissertationsschrift, Universität Tübingen, 2014).

HER2-regulierte Signalkaskaden sind in Kapitel 1.3.2 ausführlich beschrieben. Prinzipiell muss zwischen der Rattenisoform *neu* und dem Rezeptor des Menschen unterschieden werden, obwohl gleiche Signalwege aktiviert werden.<sup>249</sup> Beim Menschen reicht für eine gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität nach heutigem Standpunkt eine alleinige Amplifikation und Überexpression aus, während für die *neu*-induzierte Transformation Mutationen notwendig sind. So lässt sich beispielsweise die aktivierte Form von *neu* auf eine Punktmutation in der Transmembrandomäne zurückführen: Der Austausch von Valin zu Glutaminsäure (V664E) begünstigt die Dimerisierung und erhöht somit die Rezeptortyrosinkinaseaktivität.<sup>305,306</sup> Dieses mutierte Onkogen wird auch als *neuT* bezeichnet und wurde bereits erfolgreich zur Induktion von Mammakarzinomen in Mäusen verwendet.<sup>249,307</sup> Auch beim Menschen könnte theoretisch eine Mutation in der Transmembrandomäne von HER2 zu einer erhöhten Kinaseaktivität führen, jedoch finden diese Vorgänge nicht spontan statt und konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden. Dagegen steigert eine Überexpression beispielsweise die Invasion und das onkogene Potential von MCF-7 Brustkrebszellen.<sup>249</sup>

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete MMTV-cNeu Modell beruht auf einer zunächst nicht-aktivierten Form des Onkogens.<sup>260</sup> Hier sind vielmehr somatische Mutationen in entsprechenden Regionen des Extrazellulärbereichs für die Tumorigenese verantwortlich, über die eine Dimerisierung und damit verbunden die erhöhte intrinsische Tyrosinkinaseaktivität begünstigt werden. Die Aktivität der hier verwendeten Tyrosinkinase ist primär nicht von konkreten Punktmutationen abhängig, sondern wird vielmehr durch somatische Deletionen in der Extrazellulärdomäne gesteigert, wodurch *de novo* Tyrosinphosphorylierungen verschiedener zellulärer Proteine ausgelöst werden.<sup>260,308</sup> Es wird daher vermutet, dass weitere Mutationen notwendig sind, die nicht direkt den Rezeptor betreffen.<sup>249,260</sup> Die Tumorigenese des MMTV-cNeu Modells wird unter anderem über eine EGFR-vermittelte Transaktivierung des *neu* Protoonkogens ausgelöst: So führt eine Überexpression des EGFR-Liganden TGF- $\alpha$  und von *neu* zu verstärkter Tumorbildung bei den Tieren.<sup>309</sup>

Durch die MMTV-vermittelte Amplifikation zellulärer *cNeu* Signalwege kommt es bei 50% der Weibchen (auf dem FVB/N Hintergrund) nach durchschnittlich 205 Tagen zur spontanen Entwicklung von monofokalen Brusttumoren. Alle Tumore zeigten dabei eine erhöhte Expression von *cNeu*. Außerdem entwickeln einige Tiere Lungenmetastasen, die ebenfalls verstärkt *cNeu* mRNA exprimieren.<sup>260</sup>

**BK (*Kcnma1*<sup>tm1Ruth</sup>)**

Die BK-Knockout-Mauslinie (BK-KO, *Kcnma1*<sup>tm1Ruth</sup>) wurde am hiesigen Institut mittels homologer Rekombination über die Cre/loxP-Technik<sup>310-312</sup> generiert und etabliert. Die Deletion befindet sich in Exon 8 des *KCNMA1*-Gens, welches für die Porenregion des Kanals codiert (s. Abb. 1.2).<sup>131</sup> Die Tiere standen ursprünglich nur auf einem C57Bl/6-Hintergrund zur Verfügung und wurden im Zuge der Rückzucht mit Mäusen vom FVB/N-Stamm verpaart (s. 4.1.2). Die Nachkommen der Rückzucht (n = 6) wurden mit den zuvor beschriebenen Tumor-Mausmodellen verpaart, um tumortragende Wurf- und Altersgeschwister der folgenden Genotypen für die Versuche zu generieren: MMTV-PyMT BK-WT und MMTV-PyMT BK-KO. Details zur Generierung der Tiere finden sich in Kapitel 4.1.

**IK (*Kcnn4*<sup>tm1.1Jele</sup>)**

Die IK-Knockout-Mauslinie (IK-KO, *Kcnn4*<sup>tm1.1Jele</sup>) wurde am hiesigen Institut ebenfalls mittels homologer Rekombination über die Cre/loxP-Technik generiert und etabliert. Dabei wurde Exon 2 deletiert, welches für die Porenregion des Kanals codiert (s. Abb. 1.1).<sup>313</sup> Da ursprünglich keine IK-KO Tiere auf dem FVB/N-Hintergrund zur Verfügung standen, wurden die IK-defizienten Tiere im Rahmen dieser Arbeit vom SV129-Hintergrund auf einen FVB/N-Hintergrund zurückgekreuzt (s. 4.1.2). Die Nachkommen dieser Rückkreuzung (n = 6) wurden mit den zuvor beschriebenen Tumor-Mausmodellen (s.o.) verpaart, um tumortragende Wurf- und Altersgeschwister der folgenden Genotypen für die Versuche zu generieren: MMTV-PyMT IK-WT und MMTV-PyMT IK-KO. Details zur Generierung dieser Tiere sind in Kapitel 4.1 beschrieben.

**3.2 Geräte und Software**

Gerät/Software	Hersteller
Absaugpumpe KNF Laborport	Neuberger
Analysenwaage BP 2100 S	Sartorius
Brutschränke Zellkultur xCelligence	Binder HERA cell
Einfriergerät ( <i>Mr. Frosty</i> )	NALGENE <sup>TM</sup>
Elektrophoresekammer (Genotypisierung)	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mini-Protean (SDS-PAGE)	Bio-Rad
Ettan Dige Imager Ettan Dige Immer 1.0 (Software) ImageQuant TL 7.0 (Software)	GE Healthcare
FACS Canto Flow Cytometer FACSDiva (Software)	BD Biosciences
FlowJo 7.6.1 (Software): Analyseprogramm für Durchflusszytometrie	TreeStar
Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100 Fluoreszenzlampe XBO 75 Shutter Kamera Spot Inside Software VisiView	Carl Zeiss Carl Zeiss Visitron Visitron Visitron
Geldetektionsgerät (Agarosegele) BioDoc Analyze	Biometra
Laborrührwerk EUROSTAR power-b	IKA Labortechnik
Magnetische Heizplatte 50383	Heidolph
Mikroskop für Zellkultur	Wilovert S, Hund Wetzlar

Mikroskop Axiovert 200 M (Invers) Filter: Weißbalancefilter 000000-155-789 Neutralfilter N 0,50 467857-0000-000 Neutralfilter N 0,25 467849-0000-000 Kamera AxioCam MRc Rev.3 AxioVision Rel. 4.8 (Software)	Carl Zeiss
PCR-Maschinen Mastercycler Mastercycler Gradient	Eppendorf
pH-Elektrode Blue Line 18 pH 3mol/l KCl	Schott
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Photometer Nanophotometer Biophotometer	Implen Eppendorf
Pinzetten, Präparationsbesteck	FST
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Abimed
Pipetten für RNA (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Discovery Comfort
Pipettierhilfe PipettBoy accujet	Brand
qPCR Maschine CFX Connect® qPCR-Software Bio-Rad CFX Manager	Bio-Rad
Reinstwasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore Quantum
Rotor/Reagenzglasrotator GFL 3025	Hilab
Schüttelgerät Unimax 1010	Heidolph Instruments
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus
Stromquelle Standard PowerPack P25	Biometra
Thermoschüttler Thermomixer compact	Eppendorf
UltraTurrax T8	IKA Labortechnik
Ultrazentrifuge SS34 RCSC plus	Sorvall
Waage BP 2100 S	Sartorius
Wasserbad SW-20C	julabo
xCelligence RTCA DP	Roche
Zentrifugen Centrifuge 5804 Centrifuge 5417C	Eppendorf

### 3.3 Generelles Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Eppendorfreaktionsgefäß 1,5 ml 2 ml	0030 12.0.086 72.695.500	Eppendorf Sarstedt
Petrischalen (unsteril)	82.1473.001	Sarstedt
Pipettenspitzen (gestopft) 10 µl 20 µl 200 µl 1000 µl	765288 774288 739288 740288	Greiner Bio one
Pipettenspitzen (ungestopft) 10 µl 20-200 µl 1000 µl	70.1116 70.760.012 70.762.010	Sarstedt
Stripetten 2 ml 5 ml 10 ml 25 ml 50 ml	4486 4487 4488 4489 4490	Corning

Wägeschalen Rotilabo	Klein Groß	1878.2 1884.1	Carl Roth
Zählkammern C-Chip Disposable Hemocytometer		PDHC-N01	Merck Millipore
Zellkulturgefäße	Flasche 25 cm <sup>2</sup> Flasche 75 cm <sup>2</sup> Flasche 175 cm <sup>2</sup> Petrischale 55 cm <sup>2</sup>	430639 430641 431080 430167	Corning
Zentrifugationsröhrchen	15 ml (klein) 50 ml (groß)	430766 430921	Corning

### 3.4 Substanzen, Puffer, Lösungen und Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurde generell autoklaviertes, demineralisiertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet.

#### 3.4.1 Genotypisierung

##### 3.4.1.1 DNA-Isolation und PCR

##### Allgemeine Substanzen und Materialien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 8418	Sigma-Aldrich
dNTPs	K039.1	Carl Roth
High Pure PCR Template Preparation Kit	11796828001	Roche
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	07-KK7352-02	PeqLab
Taq-Puffer (10 x)	11 271 318 001	Roche
Taq-DNA-Polymerase	11 435 094 001	Roche

##### Primer

Mauslinie	Primertyp	Sequenz von 5'--3'
MMTV-PyMT	F1	GGA AGC AAG TAC TTC ACA AGG G
	R1	GGA AAG TCA CTA GGA GCG GG
	F <sub>ctrl</sub>	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	R <sub>ctrl</sub>	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
MMTV-cNeu	F1	TTT CCT GCA GCA GCC TAC GC
	R1	CGG AAC CCA CAT CAG GCC
	F <sub>ctrl</sub>	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	R <sub>ctrl</sub>	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
IK	F1	TAA GTG CTT GCT GAG TCT GGA
	F2	CAG GAA GCA CAG GCA CTG C
	R	AGG AGA GTG ACT GTA GGT GAG
BK	F1	TGG TCT TCT TCA TCC TCG GG
	F2	AAG GGC CAT TTT GAA GAC GTC
	R	CCA GCC ACA GTG TTT GTT GG

→ Das Primer-Lyophilisat wurde in autoklaviertem dH<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst und dann auf eine Konzentration von 20 μM eingestellt.

### 3.4.1.2 Gelelektrophorese

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
2-Log-DNA-Ladder	32000-S	New England Biolabs
Biozym LE Agarose	840004	Biozym Scientific
Borsäure	6943.3	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	8043.2	Carl Roth
Ethidiumbromid	E1510	Sigma-Aldrich
Ficoll <sup>®</sup> 400	CN90.3	Carl Roth
Tris	5429.2	Carl Roth
Xylencyanol	X4126	Sigma-Aldrich

0,5 M EDTA pH 8,0	
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	186,1 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit NaOH auf pH 8,0 einstellen	

10 x TBE-Puffer	
Tris	108 g (890 mM)
Borsäure	55 g (890 mM)
0,5 M EDTA pH 8,0	40 ml (20 mM)
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

Xylencyanol-Lösung	
Xylencyanol	100 mg
dH <sub>2</sub> O	2 ml
→ im Ultraschallbad 15 min lösen	

1 x TBE-Puffer	
10 x TBE-Puffer	100 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

Bromphenolblau-Lösung	
Bromphenolblau	110 mg
dH <sub>2</sub> O	2 ml

6 x Ladepuffer	
Ficoll	9 g
0,5 M EDTA pH 8,0	12 ml
10 x TBE-Puffer	30 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 47 ml
Xylencyanol-Lösung	1,5 ml
Bromphenolblau-Lösung	1,3 ml
→ Ficoll, EDTA und 10 x TBE für 1h bei 60°C rühren	
→ mit dH <sub>2</sub> O auf 47 ml auffüllen	
→ Zugabe der Farbstofflösungen	

DNA-Längenstandard	
2-Log-DNA-Ladder	20 µl
6 x Ladepuffer	40 µl
dH <sub>2</sub> O	180 µl

Agarosegel 2% / 3%	
Biozym LE Agarose	6 g / 9 g
Ethidiumbromid	30 µl
1 x TBE-Puffer	300 ml

### 3.4.2 In vivo Methoden

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Ampuwa <sup>®</sup> (Wasser für Injektionszwecke)	7610894 (PZN)	Fresenius Kabi
Bepanthen <sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe	1578681 (PZN)	Bayer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 8418	Sigma-Aldrich
Ethanol, absolut p.a.	34963	Sigma Aldrich
Heizplatte	-	Trixie
Kanüle 30G (0.3 mm x 13 mm)	304000	BD
Ketamin 50mg/ml O.K. Ampullen	7538443 (PZN)	Ratiopharm
Novaminsulfon Tropfen 500 mg/ml	7387887 (PZN)	1A Pharma
NaCl-Lösung 0,9%	0809109 (PZN)	Fresenius Kabi
Nahtmaterial (Ethilon, schwarz monofil, 3/8 Kreis Rundkörper Nadel, 7-0)	E7466 H	Ethicon

Paxilline (PAX)	BML-KC155-0000	Enzo Life Sciences
Phosphat-gepufferte Lösung (PBS)	14190094	Life Technologies
Schieblehre (Digital Caliper)	-	Kraftixx
Skalpell (Feather Disposable) Nr. 21	02.001.30.021	Feather Safety Razor Co., Ltd.
Spritze 1 ml Luer BD Plastipak	300013	BD
Xylazin 20 mg/ml (Rompun <sup>®</sup> 2%)	1320422 (PZN)	Bayer Health Care
Wattestäbchen, steril	3204	CareLiv Produkte OHG

<b>DMSO:Wasser 9:1</b>	
DMSO	9 Volumenteile
dH <sub>2</sub> O	1 Volumenteil
→ steril herstellen	

<b>PAX-Stocklösung</b>	
PAX	25 mg
DMSO:Wasser 9:1	833 µl

<b>Narkoselösung</b>	
Ketamin 50 mg/ml	2 ml (10 mg/ml)
Xylazin 20 mg/ml	0,5 ml (1 mg/ml)
NaCl-Lösung 0.9%	7,5 ml

<b>Novaminsulfonlösung 50 mg/ml</b>	
Novaminsulfon 500 mg/ml	1 ml
Ampuwa	Ad 10 ml

### 3.4.3 Zellkultur

#### Allgemeine Substanzen und Materialien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
10 x Trypsin	15400054	Life Technologies
Collagenase D	11 088 866 001	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max <sup>TM</sup>	D2650	Sigma-Aldrich
Kryogefäße CryoTube <sup>TM</sup> 1,8 ml	363632	Nunc
Fetales Kälberserum (FCS)	10270106	Life Technologies
Modified Improved Minimal Essential Medium (IMEM) mit Phenolrot	A1048901	Life Technologies
Modified Improved Minimal Essential Medium (IMEM) ohne Phenolrot	A1048801	Life Technologies
Isopropanol	9866.2	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	15140122	Life Technologies
Phosphat-gepufferte Lösung (PBS)	14190094	Life Technologies
Skalpell (Feather Disposable) No. 21	02.001.30.021	Feather Safety Razor Co., Ltd.
Zellsieb 40 µm Nylon	352340	Corning

<b>Zellkulturmedium</b>	
IMEM mit Phenolrot	475 ml
FCS	25 ml
Pen/Strep	5 ml

<b>Collagenase-Lösung</b>	
Collagenase D	10 mg
IMEM mit Phenolrot	10 ml

<b>1 x Trypsin</b>	
10 x Trypsin	1 ml
PBS	9 ml

<b>Kryomedium</b>	
DMSO Hybri-Max <sup>TM</sup>	20%
Zellkulturmedium	Nach Bedarf

**Wirkstofflösungen**

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 8418	Sigma-Aldrich
Docetaxel	D-800	Alomone Labs
Ethanol, absolut p.a.	34963	Sigma Aldrich
Triarylmethan-34	-	Pharm. Chemie, Universität Tübingen (JProf. Dr. Pierre Koch)

TRAM-34 5 mM	
TRAM-34	17,242 mg
Ethanol, absolut p.a.	10 ml
→ 1 ml-Aliquots bei -20°C lagern	

TRAM-34 100 µM	
TRAM-34 5 mM	20 µl
Zellkulturmedium	980 µl

Docetaxel 10 mM	
Docetaxel	5 mg
DMSO	619 µl
→ 10 µl-Aliquots bei -20°C lagern	

Docetaxel 100 µM	
Docetaxel 10 mM	10 µl
Zellkulturmedium	990 µl

Docetaxel 1 µM	
Docetaxel 100 µM	100 µl
Zellkulturmedium	9,9 ml

Docetaxel 100 nM	
Docetaxel 1 µM	100 µl
Zellkulturmedium	900 µl

Docetaxel 10 nM	
Docetaxel 100 nM	100 µl
Zellkulturmedium	900 µl

**3.4.4 RNA-Analytik****Allgemeine Materialien und Substanzen**

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
96-Loch-Platte	MLL-9601	Bio-Rad
Chloroform	372978	Sigma-Aldrich
DEPC-behandeltes Wasser (DEPC-Wasser)	T143	Carl Roth
DNase I recombinant, RNase free (DNase)	04716728001	Roche
Ethanol, absolut p.a.	34963	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	10270106	Life Technologies
Folie zum Abkleben der Platte	MSB-1001	Bio-Rad
iScript™ cDNA Synthesekit	170-8891	Bio-Rad
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
PeqGOLD RNA pure™	30-1010	PeqLab
Phosphat-gepufferte Lösung (PBS)	14190094	Life Technologies
Präzisionswischtücher (Kimberley Clark)	AA64.1	Carl Roth
Primer	s.u.	Eurofins mwg
SYBR® green Supermix	170-8882	Bio-Rad

Ethanol 75%	
Ethanol, absolut p.a.	75%
DEPC-Wasser	Nach Bedarf

**Primer**

Zielstruktur	Primertyp	Sequenz von 5'--3'
β-Actin	F R	GAC GGC CAG GTC ATC ACT AT CCA CAG GAT TCC ATA CCC AAG
BK	F R	GAC GCC TCT TCA TGG TCT TC TAG GAG CCC CCG TAT TTC TT
c-fos	F R	ACT ACC ATT CCC CAG CCG AC TCT GCG CAA AAG TCC TGT GT
c-jun	F R	CCA AGA ACG TGA CCG ACG AG GCG TGT TCT GGC TAT GCA GT
Cyclin D1	F R	CCT TTG TGG CCC TCT GTG C CTC CCA GCA GCT ACC ATG GA
hras	F R	TGT GGA TGA GTA TGA CCC TAC GA TCG AGA ATA TCC AAG AGA CAG GT
IK	F R	ATG TGG GGC AAG ATT GTC TG GTG TTT CTC CGC CTT GTT GA
kras	F R	TGT GGA TGA GTA TGA CCC TAC GA TCG AGA ATA TCC AAG AGA CAG GT
nras	F R	AAA CAT CAG CCA AGA CCC GG TTA TGC TGC CGA ATC TCA CG
p53	F R	TCA CAG CAC ATG ACG GAG GT CCA CCC GGA TAA GAT GCT GG
SK1	F R	TGT ACC ACG CCC GAG AGA TC TCC AGC GAG ATC AGG GAC AC
SK2	F R	TCT CTC CAC GAT CAT CCT GCT CTG CTC CAT TGT CCA CCA TGA
SK3	F R	CGC CTA TCA CAC AAG GGA AGT ACG CTC GTA GGT CAT GGC TA

→ Das Primer-Lyophilisat wurde in DEPC-behandeltem Wasser in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst und für die PCR 1:50 in DEPC-behandeltem Wasser verdünnt.

**3.4.5 Wachstums- und Zellzyklusanalysen**

Die Primer und das Material für die qPCR-basierten Zellzyklusanalysen sind in Kapitel 3.4.4 gelistet.

**Allgemeine Materialien und Substanzen**

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
10 x Trypsin	15400054	Life Technologies
E-Plate 16 (E-Platten)	2801032	Omni Life Science
Ethanol, absolut p.a.	34963	Sigma-Aldrich
Röhrchen für Durchflusszytometrie (BD Falcon Tube 5 ml)	352054	BD Biosciences
Filter 70 μm für BD Falcon Tube 5 ml	340636	BD Biosciences
μ-dishes grid-500 (Grid-Platten)	81166	ibidi
Phosphat-gepufferte Lösung (PBS)	14190094	Life Technologies
Propidiumiodidlösung (PI) 1 mg/ml	P4684	Sigma-Aldrich
RNase, DNase frei (24 mg/ml)	R4262	Sigma-Aldrich
Triton X-100	3051.2	Carl Roth

<b>Ethanol 70%</b>	
Ethanol, absolut p.a.	7 ml
dH <sub>2</sub> O	3 ml

<b>Triton X-100 0,3%</b>	
Triton X-100	1,5 ml
PBS	500 ml
→ einrühren, Lagerung bei 4°C	

<b>PI-Färbelösung</b>	
Triton X-100 0,3%	10 ml (0,1 %)
PI 1 mg/ml	0,3 ml (10 µg/ml)
RNAse, DNase frei	0,125 ml (100 µg/ml)
PBS	Ad 30 ml

### 3.4.6 Histologische Methoden

#### Allgemeine Materialien und Substanzen

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	6908.4	Carl Roth
Aluminiumfolie	2596.1	Carl Roth
Ammoniak (NH <sub>3</sub> ) 30-33 %	P093.2	Carl Roth
Aquatex <sup>®</sup> aqueous mounting agent	363123S	VWR
Bovines Serumalbumin (BSA)	8076.2	Carl Roth
Deckgläser L24 x 60 mm	L426.1	Carl Roth
DePeX mounting medium	3612540	VWR
DNase	04716728001	Roche
Eosin-G-Lösung (0,5%)	X833.1	Carl Roth
Essigsäure 100 %	3738.5	Carl Roth
Ethanol, absolut p.a.	34963	Sigma-Aldrich
Fettstift (ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen)	H-4000	Vector Laboratories
Glasobjektträger Superfrost <sup>®</sup> Plus	J1800AMNZ	Thermo Scientific
Glycin	3908.3	Carl Roth
Hämatoxyllin-Lösung nach Harris	X903.2	Carl Roth
µ-Kammer auf Glasobjektträger	81201	ibidi
Klingen	MX35	Thermo Scientific
Levamisol	SP-5000	Vector Laboratories
L-Lysin x 1 H <sub>2</sub> O	420751	Carl Roth
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O (MgCl <sub>2</sub> )	1.05833.1000	Merck
Methanol	4627.2	Carl Roth
Neg-50 <sup>™</sup> Einbettmedium	6502	Thermo Scientific
Normales Ziegen Serum (NGS)	S-100	Vector Laboratories
Paraformaldehyd (PFA)	0335.2	Carl Roth GmbH
Phosphat-gepufferte Lösung (PBS)	14190094	Life Technologies
D(+)-Saccharose	4621.2	Carl Roth
Toluol	7115.1	Carl Roth
Tris	5429.2	Carl Roth
Triton X-100	3051.2	Carl Roth
Tween 20 <sup>®</sup>	9127.1	Carl Roth
Wasserstoffperoxid-Lösung (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	8070.4	Carl Roth

<b>PFA 4%</b>	
PFA	20 g
PBS	500 ml
→ auf 60°C unter Rühren erhitzen, bis eine klare Flüssigkeit entsteht	

<b>Saccharose 5%</b>	
D(+)-Saccharose	0,5 g
PBS	10 ml

<b>Saccharose 10%</b>	
D(+)-Saccharose	1 g
PBS	10 ml

<b>Saccharose 20%</b>	
D(+)-Saccharose	2 g
PBS	10 ml

<b>Triton X-100 0,3 %</b>	
Triton X-100	1,5 ml
PBS	
→ einrühren, Lagerung bei 4°C	

<b>Blockierungslösung</b>	
BSA	1 g
Glycin	0,2 g
Lysin	0,2 g
Triton X-100 0,3%	Ad 100 ml
→ 10 ml-Aliquots, Lagerung bei -20°C	
→ kurz vor Gebrauch NGS hinzugeben	

### Primärantikörper

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Anti-BK (RoCl)	-	Pharm. Institut, Pharmakologie, Universität Tübingen
Anti-IK (SK4-2)	-	Pharm. Institut, Pharmakologie, Universität Tübingen

### Sekundärantikörper

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Biotinylierter Anti-Kaninchen IgG	BA-1000	Vector Laboratories
Biotinylierter Anti-Maus IgG	BA-9200	Vector Laboratories

#### 3.4.6.1 AP-Färbung

##### Lösungen und Puffer

<b>Tris-HCl 100 mM pH 8,2</b>	
Tris	12,114 g
Tween 20 <sup>®</sup>	0,1 %
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit NaOH auf pH 8,2 einstellen	

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung 1%</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	333 µl
PBS	10 ml

### Kits

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Vectastain <sup>®</sup> ABC-AP-Kit Standard Alkaline Phosphatase (für ABC-AP-Arbeitslösung)	AK 5000	Vector Laboratories
Vector <sup>®</sup> Blue Alkaline Phosphatase Substrat Kit III (für AP-Substrat-Lösung)	SK 5300	Vector Laboratories

### Kit-Lösungen

<b>ABC-AP-Arbeitslösung</b>	
Reagenz A	50 µl
Reagenz B	50 µl
PBS	5 ml
→ 30 min im Dunkeln vorinkubieren	

<b>AP-Substrat-Lösung</b>	
Reagenz 1	100 µl
Reagenz 2	100 µl
Reagenz 3	100 µl
Levamisol	2 Tropfen
Tris-HCl 100 mM pH 8,2	5 ml

- 1 Tropfen aus dem jeweiligen Kit entspricht 50 µl.  
 → 1 Tropfen aus dem jeweiligen Kit entspricht 50 µl.

### 3.4.6.2 DAB-Färbung

#### Lösungen und Puffer

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung 3%	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	200 µl
Methanol	400 µl
PBS	2 ml

#### Kits

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Vectastain <sup>®</sup> Elite ABC HRP Kit, Peroxidase, Standard (für ABC-Reagenz)	PK-6100	Vector Laboratories
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (für DAB-Substrat-Lösung)	SK-4100	Vector Laboratories

#### Kit-Lösungen

ABC-Reagenz	
Reagenz A	50 µl
Reagenz B	50 µl
PBS	5 ml
→ 30 min im Dunkeln vorinkubieren	

DAB-Substrat-Lösung	
Buffer Stock	100 µl
DAB Stock	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µl
dH <sub>2</sub> O	5 ml

→ Die Lösungen sind im entsprechenden Kit vorhanden  
 → 1 Tropfen aus dem jeweiligen Kit entspricht 50 µl.

### 3.4.6.3 TUNEL-Färbung

#### Kits und enthaltene Lösungen

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
ApopTag <sup>®</sup> Plus Peroxidase <i>In Situ</i> Apoptosis Detection Kit	S7101	Merck Millipore

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Equilibrierungspuffer	#90416	Merck Millipore
Reaktionspuffer	#90417	
TdT Enzym	#90418	
Stop/Waschpuffer → Vor Verwendung mit 34 ml dH <sub>2</sub> O verdünnen	#90419	
Anti-Digoxigenin Peroxidase Konjugat	#90420	
DAB-Substrat	#90423	
DAB Verdünnungspuffer	#90424	

#### Puffer und Lösungen

Die Mengen sind für 1 Well einer µ-Kammer (ibidi) angegeben.

Ethanol-Essigsäure	
Ethanol, absolut p.a.	2 Teile
Essigsäure	1 Teil

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	6 µl
PBS	54 µl

TdT-Lösung	
TdT Enzym	16,5 µl
Reaktionspuffer	38,5 µl

Peroxidase-Substrat	
DAB-Substrat	1,5 µl
DAB Verdünnungspuffer	73,5 µl

<b>Tris 1 M pH 7,2</b>	
Tris	12,1 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml

<b>MgCl<sub>2</sub> 1M</b>	
MgCl <sub>2</sub>	20,3 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml

<b>DN-Puffer</b>	
Tris 1 M pH 7,2	3 ml (30 mM)
MgCl <sub>2</sub> 1 M	400 µl (4 mM)
dH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml

<b>DTT 1M</b>	
DTT	15,4 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml

<b>DN-Puffer DTT</b>	
DTT 1 M	1 µl
DN-Puffer	10 ml

<b>DNase-Lösung</b>	
DNase	50 µl
DN-Puffer DTT	450 µl

### 3.4.7 Biochemische Methoden

#### Allgemeine Materialien und Substanzen

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
6-Aminocapronsäure	037K0045	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.2	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	0163.2	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
cOmplete Mini, EDTA frei (Proteaseinhibitoren)	11836153001	Roche
cOmplete, EDTA frei (Proteaseinhibitoren)	11 873 580 001	Roche
Coomassie-Brilliant-Blue G250	3862.2	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8418	Sigma-Aldrich
Ethanol, absolut p.a.	34963	Sigma-Aldrich
Glas-Teflon-Potter 2 cm <sup>3</sup>	-	EuroStar power-b, IKA Labortechnik
Glas-Teflon- Potter 5 cm <sup>3</sup>	-	EuroStar power-b, IKA Labortechnik
Glycerin	3783.1	Carl Roth
Glycin	3908.3	Carl Roth
HEPES	9105.3	Carl Roth
Isopropanol	9866.2	Carl Roth
Küvetten	613101	Greiner Bio-One
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O (MgCl <sub>2</sub> )	1.05833.1000	Merck
Mannitol	4175.1	Serva
Membran Immobilon <sup>®</sup> Millipore PVDF	T831.1	Carl Roth
Methanol	4627.2	Carl Roth
Milchpulver, Blotting grade	T145.1	Carl Roth
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	8043.2	Carl Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	K305	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	9265.3	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	5136.2	Carl Roth
Natriumfluorid (NaF)	P756.1	Carl Roth
Natriumpyrophosphat (NaPP)	T883.1	Carl Roth
Natriumvanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	450243	Sigma-Aldrich
Phosphat-gepufferte Lösung	14190094	Life Technologies
Phosphorsäure (84,5%)	6366.1	Carl Roth
Proteinmarker PeqGold IV	27-2110	PeqLab
Rotilabo Filterpapiere (Dicke 0,35 mm)	CL67.1	Carl Roth

Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (37,5:1)	3029.2	Carl Roth
D(+)-Saccharose	4621.2	Carl Roth
Staurosporin (STS)	9953	Cell Signalling Technologies
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2637.3	Carl Roth
Tris	5429.2	Carl Roth
Triton X-100	3051.2	Carl Roth
Tween 20 <sup>®</sup>	9127.1	Carl Roth

<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1 M</b>	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	184 mg
dH <sub>2</sub> O	Ad 10 ml
→ mit NaOH auf pH 10,0 4 einstellen	

<b>Triton X-100 10%</b>	
Triton X-100	5 ml
dH <sub>2</sub> O	50 ml

### 3.4.7.1 Probengewinnung

#### Lösungen und Puffer für Gesamtproteinlysate

<b>NaCl 1,5 M</b>	
NaCl	1,7532 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 200 ml

<b>NaPP 0,2 M</b>	
NaPP	
dH <sub>2</sub> O	Ad 20 ml

<b>NaF 1 M</b>	
NaF	839,8 mg
dH <sub>2</sub> O	Ad 20 ml

<b>EDTA 1 M</b>	
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	74,448 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 200 ml
→ zuerst 100 ml dH <sub>2</sub> O hinzugeben	
→ zum Lösen pH-Wert mit NaOH auf 10,0	
→ restliches Wasser ergänzen	

<b>HEPES 1 M</b>	
HEPES	47,662 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 200 ml
→ mit NaOH auf pH 7,4 einstellen	

<b>Lysepuffer L</b>	
NaCl 1,5 M	1 ml
NaPP 0,2 M	500 µl
NaF 1M	100 µl
Triton X-100 10%	1 ml
HEPES 1M	500 µl
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,1 M	200 µl
EDTA 1 M	10 µl
dH <sub>2</sub> O	Ad 10 ml
→ vor Gebrauch 1 Tablette cOmplete Mini, EDTA-frei pro 10 ml hinzugeben	

#### Lösungen und Puffer für Membranpräparation

<b>MgCl<sub>2</sub> 1 M</b>	
MgCl <sub>2</sub>	20,33 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml
→ autoklavieren	

<b>Tris 1 M pH 8 bzw. pH 7,4</b>	
Tris	121,14 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 8 bzw. pH 7,4 einstellen	

<b>Lysepuffer P</b>	
Tris 1 M pH 8	100 ml
MgCl <sub>2</sub>	1 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ Lagerung bei 4°C	
→ vor Gebrauch 1 Tablette cOmplete Mini, EDTA frei pro 10 ml hinzugeben	

<b>Saccharosepuffer</b>	
Saccharose	85,6 g (250 mM)
Tris 1 M pH 7,4	10 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ Lagerung bei 4°C	
→ vor Gebrauch 1 Tablette cOmplete EDTA frei pro 50 ml hinzugeben	

### Lösungen und Puffer für Mitochondrien-Isolation

<b>STS 1 mM</b>	
Staurosporin	250 µg
DMSO	0,536 ml

<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-PBS</b>	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,1 M	40 µl
PBS	40 ml

<b>HEPES 0,5 M</b>	
HEPES	23,831 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 200 ml

<b>EDTA 0,5 M</b>	
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	37,224 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 200 ml

<b>Tris 0,1 M pH 7,5</b>	
Tris	15,76 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

<b>Isolationspuffer</b>	
Mannitol	2,72 g
HEPES 0,5 M	1 ml
EDTA 0,5 M	20 µl
BSA	0,05 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 50 ml
→ vor Gebrauch 1 Tablette cOmplete Mini, EDTA frei pro 10 ml hinzugeben	

<b>Lysepuffer M</b>	
Tris 0,1 M pH 7,5	10 ml
NaCl	0,438 g
NaF	0,021 g
EDTA 0,5 M	100 µl
dH <sub>2</sub> O	Ad 50 ml

### Lösungen und Kits für Proteinbestimmung

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Total Protein Kit, Micro-Lowry, Peterson's Modification	TP0300-1KT	Sigma-Aldrich

<b>Bradford-Lösung</b>	
Coomassie-Brilliant-Blue G250	100 mg
Phosphorsäure (84,5%)	50 µl
Ethanol, absolut p.a.	50 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

<b>Lysepuffer M + Triton X-100</b>	
Triton X-100 10%	5 ml
Lysepuffer M	45 ml

#### 3.4.7.2 Gelelektrophorese

##### Lösungen und Puffer

<b>10 x Elphor</b>	
Tris	630 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit NaOH auf pH 8,3 einstellen	

<b>1 x Elphor</b>	
10 x Elphor	100 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

<b>4 x Laemmli</b>	
SDS	5 g
Tris	2,4 g
Glycerin	40 ml
Bromphenolblau	4 mg
dH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml
→ mit HCl auf pH 6,7 einstellen	
→ 1 ml-Aliquots auf -20°C einfrieren	

<b>1 x Laemmli</b>	
4 x Laemmli	25 µl
dH <sub>2</sub> O	75 µl

<b>Tris 1,8 M pH 8,8</b>	
Tris	218,052 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit NaOH auf pH 8,8 einstellen	
→ autoklavieren	

<b>Tris 0,6 M pH 6,8</b>	
Tris	72,684 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit NaOH auf pH 6,8 einstellen	
→ autoklavieren	

<b>SDS 10%</b>	
SDS	10 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml

<b>APS 30%</b>	
APS	15 g
dH <sub>2</sub> O	50 ml

### Gele

<b>Trenngel 17,5%</b>	
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	9,7 ml
Tris 1,8 M pH 8,8	3,6 ml
dH <sub>2</sub> O	3,4 ml
SDS 10 %	167 µl
TEMED	12 µl
APS 30%	56,6 µl
→ für 4 Gele	

<b>Trenngel 11,5%</b>	
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	6,5 ml
Tris 1,8 M pH 8,8	3,6 ml
dH <sub>2</sub> O	6,5 ml
SDS 10 %	167 µl
TEMED	20 µl
APS 30%	66,6 µl
→ für 4 Gele	

<b>Sammelgel 5%</b>	
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	0,83 ml
Tris 0,6 M pH 6,8	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	3,6 ml
SDS 10%	50 µl
TEMED	10 µl
APS 30 %	20 µl
→ für 2 Gele	

### 3.4.7.3 Western Blot

#### Lösungen und Puffer

Anode 1-Puffer	
Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 10,4 einstellen	

Anode 2-Puffer	
Tris	3,6 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 10,4 einstellen	

Kathodenpuffer	
Tris	3 g
6-Aminocaprinsäure	5,8 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 7,6 einstellen	

10 x TBST	
Tris	12,1 g
NaCl	82,3 g
Tween 20 <sup>®</sup>	5 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 8,0 einstellen	

1 x TBST	
10 x TBST	100 ml
dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
→ steril filtrieren	

Milchpuffer 5 %	
Milchpulver	5 g
1 x TBST	100 ml

Antikörperverdünnungslösung	
BSA	5%
Natriumazid	0,05%
1 x TBST	Nach Bedarf

#### Primärantikörper

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Anti $\alpha$ -Tubulin	#3873	Cell Signaling
Anti-K <sub>Ca</sub> 1.1 (1184-1200)	APC-107	Alomone Labs
Anti CaMKII (pan)	#3362	Cell Signaling
Anti Caspase-3 (8G10)	#9665	Cell Signaling
Anti Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E)	#9664	Cell Signaling
Anti COX IV	#4844	Cell Signaling
Anti Cytochrom C (D18C7)	#11940	Cell Signaling
Anti GAPDH (14C10)	#2118	Cell Signaling
Anti HSP60 (H-300)	sc-13966	Santa Cruz Biotechnology
Anti phospho-CaMKII (Thr286)	#3361	Cell Signaling
Anti Zyxin (H-200)	sc-15338	Santa Cruz Biotechnology

#### Sekundärantikörper

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Anti-Maus Cy3 (Amersham <sup>™</sup> ECL <sup>™</sup> Plex goat- $\alpha$ -mouse IgG Cy <sup>™</sup> 3)	PA43009	GE Healthcare Life Sciences
Anti-Kaninchen Cy3 Amersham <sup>™</sup> ECL <sup>™</sup> Plex goat- $\alpha$ -rabbit IgG Cy <sup>™</sup> 3)	28-9011-06	GE Healthcare Life Sciences
Anti-Kaninchen Cy5 Amersham <sup>™</sup> ECL <sup>™</sup> Plex goat- $\alpha$ -rabbit IgG Cy <sup>™</sup> 5)	PA45011	GE Healthcare Life Sciences

### 3.4.8 Calcium-Imaging

#### Allgemeine Substanzen und Materialien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O (CaCl <sub>2</sub> )	5239.1	Carl Roth
Calciummessschälchen (CellView Zellkulturschale, PS, 35/10 MM, Glasboden)	627860	Greiner Bio-One
D(+)-Glucose x H <sub>2</sub> O	1.04074.1000	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	10270	Life Technologies
FURA-2-Acetoxymethylester (FURA-2-AM)	344906	Merck Millipore
HEPES	9105.3	Carl Roth
Immersionsöl Immersol 518 F fluoreszenzfrei	444960	Zeiss
Kaliumchlorid (KCl)	6781.	Carl Roth
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O (MgCl <sub>2</sub> )	1.05833.1000	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	HN00.3	Carl Roth
Triarylmethan-34 (TRAM-34)	-	Pharm. Chemie, Universität Tübingen (JProf. Dr. Koch)

Inkubationspuffer	
HEPES	14,28 g
NaCl	14,5 g
KCl	0,74 g
D(+)-Glucose x H <sub>2</sub> O	2 g
MgCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,406 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 2000 ml
→ mit NaOH auf pH 7,4 einstellen	
→ steril filtrieren und unter Sterilwerkbank in 50 ml-Aliquots pipettieren	
→ bei 4°C lagern	

Serumpuffer	
CaCl <sub>2</sub> 1 M	90 µl
FCS	2,5 ml
Inkubationspuffer	47,5 ml

CaCl <sub>2</sub> 1 M	
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	14,7 g
dH <sub>2</sub> O	Ad 100 ml
→ mit NaOH auf pH 7,4 einstellen	
→ Unter Sterilwerkbank steril filtrieren	
→ 1 ml- bzw. 15-ml Aliquots bei 20°C lagern	

Calciumpuffer 1,8 mM	
CaCl <sub>2</sub> 1 M	90 µl
Inkubationspuffer	50 ml

Serumpuffer TRAM-34 10 µM	
Serumpuffer	50 ml
TRAM-34 5 mM	100 µl



## 4 Methoden

### 4.1 Mauszucht

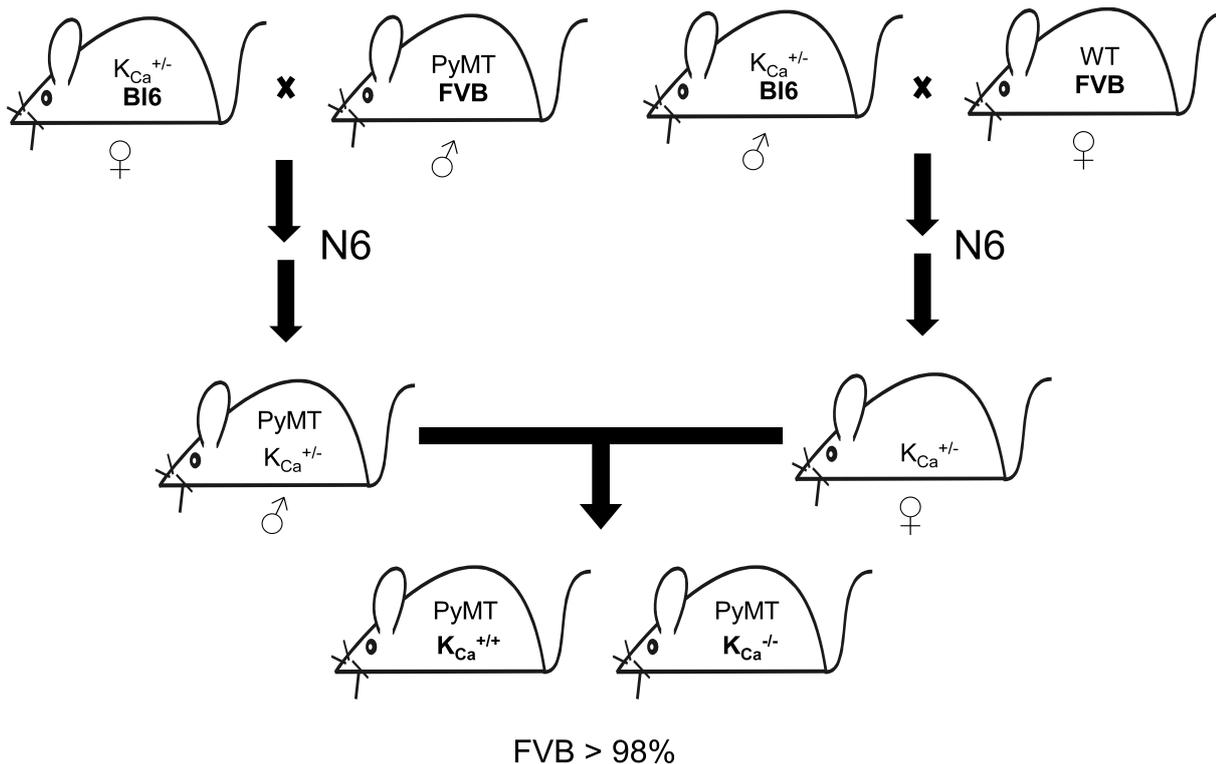
#### 4.1.1 Tierhaltung und Verpaarung

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden am Institut für Pharmazie der Universität Tübingen in der Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie gemäß der tierschutzrechtlichen Bestimmungen gezüchtet. Die Mäuse wurden unter kontrollierten Bedingungen bei  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  Raumtemperatur und  $55 \pm 5\%$  Luftfeuchtigkeit in S1-Tierhaltungsräumen (spezifisch pathogenfrei, SPF) gehalten. Die Haltung erfolgte in 2-er oder 3-er Gruppen in einem offenen SPF-Haltungssystem in entsprechenden Käfigen (Makrolon Typ II) bei einem standardisierten Tag/Nacht-Rhythmus (12 h/12 h). Die Mäuse hatten dabei jederzeit freien Zugang zu Standarddiätpellets und Wasser *ad libitum*. Die Haltungsbedingungen galten auch für Tiere, die sich in einem Versuch befanden. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzbehörde (Regierungspräsidium Tübingen) unter Beachtung der deutschen Tierschutzgesetze genehmigt.

Die Verpaarung wurde in den gleichen Tierräumen und damit unter den gleichen Umweltbedingungen durchgeführt wie die allgemeine Haltung. Allerdings wurden dazu speziell für die Zucht ausgelegte Käfige (Makrolon Typ III) eingesetzt. In der Regel wurde ein Männchen (mind. 8 Wochen) mit 1–2 Weibchen (ab 6 Wochen) in Dauerverpaarungen zusammengesetzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden genotypisiert (s. 4.1.3) und ab einem Alter von 3–4 Wochen von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

#### 4.1.2 Rückzucht

In der Literatur ist beschrieben, dass der genetische Hintergrund einen erheblichen Einfluss auf die Transformation des Brustgewebes und somit auf den Entstehungszeitpunkt sowie die Progression des Tumors hat (s. 3.1). Auch im hiesigen Arbeitskreis konnte gezeigt werden, dass weibliche MMTV-cNeu Mäuse auf einem gemischten Hintergrund (25% FVB; 37,5% SV129; 37,5% C57Bl/6) erst sehr viel später Tumore als auf einem reinen FVB-Hintergrund entwickeln (s. Severine Stehling „Untersuchung der Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanälen in der Entstehung von Tumoren und deren Chemoresistenz“, Dissertationsschrift, Universität Tübingen, 2014). IK-KO und BK-KO Tiere (s. 3.1) standen allerdings ursprünglich nur auf einem SV129- bzw. C57Bl/6-Hintergrund zur Verfügung. Um den Untersuchungszeitraum sowie das Beobachtungs- und Interventionsintervall einzugrenzen, wurden diese daher zuerst auf einen FVB/N-Hintergrund zurückgekreuzt. Dazu wurden BK-KO und IK-KO Tiere über sechs Generationen mit reinen FVB/N Wildtyptieren (100%) verpaart, so dass sich mit jedem Verpaarungsschritt der ursprüngliche genetische Hintergrund des Mausstamms (C57Bl/6) um 50% verringerte (s. auch Abb. 4.1). Heterozygote Weibchen der Generation N5 wurden letztlich mit männlichen MMTV-PyMT bzw. MMTV-cNeu Tieren (ebenfalls FVB/N) verpaart, so dass die Nachkommen aus dieser Zucht einen FVB-Anteil von  $> 98\%$  aufwiesen. Zur finalen Generierung der Versuchstiere wurden dann männliche MMTV-PyMT bzw. MMTV-cNeu Tiere, die bzgl. BK bzw. IK heterozygot sind, mit ebenfalls heterozygoten BK<sup>+/-</sup> oder IK<sup>+/-</sup> Weibchen verpaart. Die Elterntiere sowie die möglichen Nachkommen dieser Verpaarungsschritte sind in Abb. 4.1 gezeigt.



#### Abb. 4.1 Verpaarungsschema der Rückzucht

Heterozygote Tiere ( $K_{Ca}^{+/-}$ ) vom Bl6-Hintergrund wurden mit Mäusen vom FVB-Stamm (100%) verpaart, wodurch sich mit jedem Verpaarungsschritt der Bl6-Anteil um 50% verringerte. Nach insgesamt sechs Verpaarungsschritten (N6) beträgt der FVB-Anteil der  $K_{Ca}^{+/-}$  Elterntiere somit > 98%. Die Tiere dieser Generation wurden für die Generierung der Versuchstiere (weibliche MMTV-PyMT  $K_{Ca}^{+/+}$  bzw. weibliche MMTV-PyMT  $K_{Ca}^{-/-}$ , Anteil jeweils 6,25%) verwendet. Das Verpaarungsschema ist hier stellvertretend für MMTV-PyMT Tiere gezeigt und gilt analog für MMTV-cNeu Mäuse. Genaueres im Fließtext. ( $K_{Ca}$ : Calcium-aktivierter Kaliumkanal vom BK- oder IK-Typ, Bl6: C57Bl/6, PyMT: *polyoma virus middle T antigene*; FVB: Friend Virus B; MMTV: Mausmammatumovirus)

### 4.1.3 Genotypisierung

Zur Identifikation der Eltern- und Versuchstiere wurde routinemäßig deren Genotyp bestimmt. Dazu wurde den Mäusen im Alter von 2–4 Wochen ein Ohrclip angebracht und eine Schwanzspitzenbiopsie von 1–2 mm in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Aus dieser Biopsie wurde dann die DNA zur Analyse mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Die einzelnen Schritte werden in den kommenden Abschnitten beschrieben.

#### 4.1.3.1 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzenbiopsien

Zur DNA-Isolierung standen zwei kommerziell erwerbliche Kits zur Verfügung, das *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche-Kit, s. 3.4.1.1) und das *KAPA Mouse Genotyping Kit* (KAPA-Kit, s. 3.4.1.1).

Mit dem Roche-Kit wurde die Schwanzspitze (s.o.) zuerst mit 200  $\mu$ l *Tissue Lysis Buffer* und 40  $\mu$ l Proteinase K über Nacht bei 55°C in einem Thermoschüttler bei 500 rpm inkubiert. Die Bestandteile des Puffers bewirken eine Zerstörung der Zellmembran, während die Proteinase K als Endo- und Exopeptidase Proteine des Zelllysats abbaut sowie mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) endogene DNAsen inaktiviert. Am Folgetag wurden Gewebereste zusätzlich mit einer sterilen

Pipettenspitzen (200 µl) mechanisch zerkleinert, bevor 200 µl *Binding Buffer* und 100 µl Isopropanol hinzugegeben wurden. Anschließend wurden zelluläre Bestandteile durch einen 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 14 000 rpm sedimentiert und abgetrennt. Die DNA im Überstand wurde dann in ein neues Polypropylen-Filterröhrchen (im Kit enthalten) mit Silica-Kügelchen, an welche die Nukleinsäuren in Anwesenheit von Guanidin mit hoher Affinität binden, überführt. Guanidin ist im *Binding Buffer* enthalten. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 500 µl Waschpuffer und die Zentrifugation für 1 min bei 8 000 rpm. Die DNA verleiht dabei auf der Säulenmatrix, während Verunreinigungen im Durchfluss aufgefangen und entfernt werden. Letztlich wurde die DNA mit 200 µl Elutionspuffer bei 70°C eluiert. Der Puffer enthält Tris in einer Konzentration von 10 mM, wodurch die Wechselwirkungen zwischen DNA und Silica-Säule gelöst werden. Die eluierte DNA konnte nun direkt verwendet werden oder kurzfristig bei 4°C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung wurden die DNA-Proben bei -20°C gelagert werden.

Das KAPA-Kit besteht aus dem *KAPA Express Extract Enzyme* (1 U/µl) (Extraktionsenzym), dem *KAPA Express Extract Buffer* (10 x) (Extraktionspuffer) sowie dem *KAPA2G Fast Genotyping Mix* (KAPA2G), welcher die DNA-Polymerase, Reaktionspuffer mit Ladepuffer, Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und Magnesiumchlorid enthält. Zuerst wurde ein Mastermix zur DNA-Isolation hergestellt: Dieser bestand pro Probe aus 2 µl des Extraktionsenzym, 10 µl des Extraktionspuffers und 88 µl dH<sub>2</sub>O. Die Schwanzspitzenbiopsien wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) in 100 µl des Mastermixes bei 75°C und 500 rpm für 10 min in einem Thermoschüttler inkubiert. In diesem Schritt werden die Zellen lysiert, Nukleasen und Proteine degradiert sowie die DNA freigesetzt. Dann folgte die Inaktivierung des Extraktionsenzym bei 95°C und 500 rpm für 5 min. Im Anschluss wurden die Proben kurz zentrifugiert (*short*) und der Überstand, welcher die DNA enthielt, in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die Proben wurden entweder direkt verwendet oder kurzfristig bei 4°C gelagert.

#### **4.1.3.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion**

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion können bestimmte DNA-Abschnitte enzymatisch *in vitro* vervielfältigt werden.

Die Nukleotidsequenz des gewünschten DNA-Abschnittes muss bekannt sein. Dieser wird durch zwei Oligonukleotide (Primer) flankiert, in dem diese mit jeweils einem der Stränge des Abschnittes hybridisieren. Einer der Primer, der sogenannte Vorwärtsprimer (*forward primer*, F), hybridisiert an das 3'-Ende auf dem kodierenden Strang, während der andere Primer als Rückwärtsprimer (*reverse primer*, R) an das 3'-Ende des Komplementärstranges bindet. Die Primer (s. 3.4.1.1) waren so gestaltet, dass die genetischen Veränderungen der Mauslinien identifiziert werden konnten und beispielsweise eine Unterscheidung zwischen WT und KO möglich war. Eine Rehybridisierung der Einzelstränge wurde durch einen Primerüberschuss verhindert. In Anwesenheit von dNTPs synthetisiert dann eine spezielle, hitzebeständige DNA-Polymerase den komplementären Strang in 5'-3'-Richtung zum primerflankierten Abschnitt. Bei Verwendung des Roche-Kits wurde dazu die DNA-Polymerase I des Bakteriums *Thermus aquaticus* eingesetzt, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Das KAPA-Kit beinhaltet eine spezielle DNA-Polymerase (*KAPA2G Fast Hot Start DNA Polymerase*), die durch eine hohe einmalige Starttemperatur aktiviert wird und deren Temperaturoptimum ebenfalls bei 72°C liegt.

In Abhängigkeit der DNA-Isolationsmethode war eine unterschiedliche Probenvorbereitung für die PCR notwendig. Der *KAPA2G Fast Genotyping Mix* (KAPA2G) enthält wie erwähnt bereits DNA-Polymerase, Reaktions- und Ladepuffer, dNTPs und Magnesiumchlorid, während für Proben, welche mit dem Genotypisierungskit von Roche isoliert wurden, noch dNTPs und Taq-Polymerase hinzupipettiert werden mussten. Ebenfalls unterschieden sich die benötigten DNA- und Primervolumina in Abhängigkeit der zu vervielfältigenden Sequenz. Die entsprechenden Primersequenzen sind in Kapitel 3.4.1.1 gelistet. Die Pipettierschemata sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Zuerst wurde die DNA in einem Eppendorf-PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt und dann mit dem Mastermix ergänzt. Für Proben, die mit dem Roche-Kit isoliert worden waren, wurden 5 µl DNA mit 45 µl Mastermix ergänzt, mit dem KAPA-Kit wurden zu 1 µl DNA 25 µl Mastermix hinzupipettiert. Die Proben wurden gut gemischt, in einen Mastercycler (s. 3.2) gestellt und die PCR gestartet. Der Ansatz wurde zunächst auf 94°C erhitzt, um die DNA-Doppelhelix durch Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen und somit der Basenpaarungen in zwei Einzelstränge zu zerlegen. Durch das Abkühlen der Proben auf 57°C wurde die Hybridisierung der Primer ermöglicht (*annealing*). Im Anschluss wurde die DNA durch die Polymerase mit den dNTPs bei 72°C amplifiziert (Elongation). Insgesamt wurde das gesamte Protokoll 30 Mal wiederholt, wobei mit jedem Schritt die DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt wurde.

#### **4.1.3.3 Detektion der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese**

Mithilfe der Gelelektrophorese können die zuvor amplifizierten DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Der Vorteil ist, dass alle Nukleotideinzelbausteine ähnliche Massen besitzen und aufgrund der Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen sind. In einem Agarosegel wandern die DNA-Moleküle folglich umgekehrt proportional zu ihrer Größe zum Pluspol. Das Gel wird während der Auftrennung von 1 x TBE-Puffer (s. 3.4.1.2) überschichtet, welcher durch einen pH-Wert von 8,0 den polyanionischen Zustand der DNA garantiert. Die Größen der PCR-Fragmente wurden über einen DNA-Längenstandard (*2-Log DNA-Ladder*, s. 3.4.1.2) ermittelt.

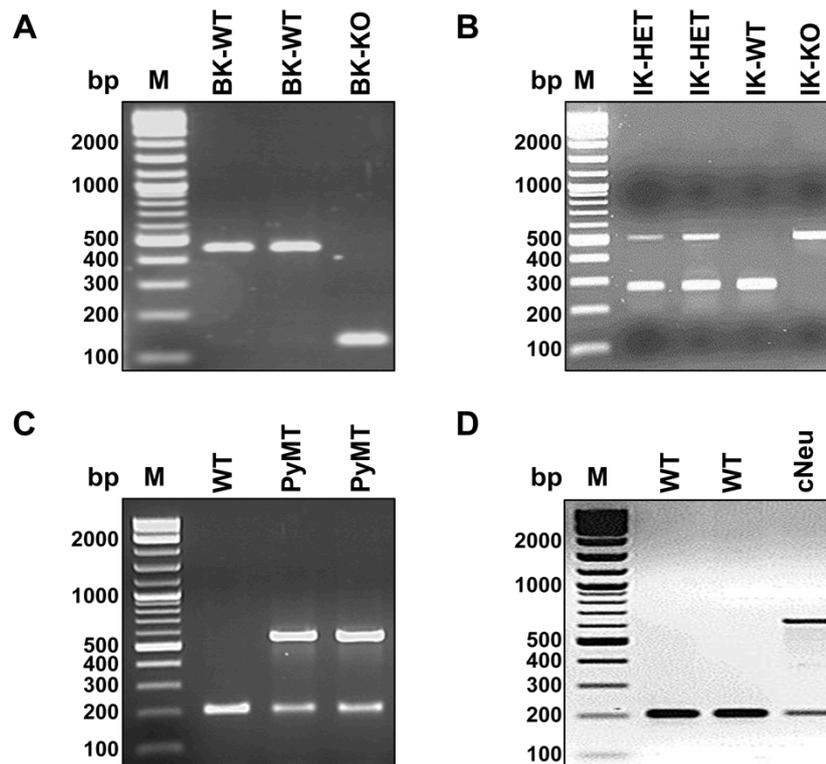
Zur Genotypisierung wurden 2%ige Agarosegele (s. 3.4.1.2) eingesetzt. Zuerst wurde dazu Agarose in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle durch Erhitzen gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf einem Magnetrührer abgekühlt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (s. 3.4.1.2) versetzt, welches in die DNA interkaliert. Die finale Konzentration von Ethidiumbromid betrug 0,1 µg/ml. Währenddessen wurde ein Gelschlitten vorbereitet, in den Kämme eingesetzt wurden, so dass beim Aushärten des Gels (nach ca. 30 min) Taschen entstanden, in die dann die Proben pipettiert werden konnten. Proben, welche mit KAPA-Kit hergestellt worden waren (s.o.), konnten direkt auf das Gel aufgetragen werden. Wurden die Proben mit dem Kit von Roche isoliert, mussten diese erst mit 6-fach konzentriertem Ladepuffer (s. 3.4.1.2) im Verhältnis 5:1 gemischt werden. Dieser Puffer verhindert aufgrund seiner hohen Viskosität, dass die Proben nach dem Beladen aus den Geldaschen austreten. Der Laufpuffer enthält außerdem zwei Farbstoffe: Die Größen von Xylencyanol (800 bp) und Bromphenolblau (100 bp) konnten genutzt werden, um die Laufweite der Proben zu überprüfen. Zusätzlich wurden in eine Tasche 12 µl des DNA-Längenstandards (s. 3.4.1.2) pipettiert.

Im Anschluss wurde eine Spannung von 80 V für etwa 15 min angelegt, bis die Proben die Geltaschen verlassen hatten. Dann wurde die Spannung auf 120–130 V erhöht. Die Gesamtdauer der Elektrophorese betrug ca. 1–2 Stunden. Danach konnten die DNA-Banden aufgrund des interkalierten Ethidiumbromid durch UV-Licht in einem Geldetektionsgerät (s. 3.2) sichtbar gemacht werden und die Banden den Versuchstieren zugeordnet werden. Abb. 4.2 zeigt repräsentative Abbildungen der PCR-Fragmente der Genotypen, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 4.1 Pipettierschemata zur DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die DNA wurde aus Schwanzspitzenbiopsien mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* oder dem *KAPA Mouse Genotyping Kit* isoliert. Im Anschluss wurde die DNA mit geeigneten Puffern und Primern in einem Mastercycler bei einem definierten Temperaturprogramm amplifiziert. Genauer im Fließtext. (BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*; DNA: Desoxyribonukleinsäure; F: Vorwärtsprimer, R: Rückwärtsprimer; CTRL: Kontrolle; dNTPs: Desoxynukleotidtriphosphate)

<i>High Pure PCR Template Preparation Kit</i>					
		<b>BK</b>	<b>IK</b>	<b>MMTV-PyMT</b>	<b>MMTV-cNeu</b>
	DNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
	dH <sub>2</sub> O	34,8 µl	34,8 µl	34,8 µl	34,8 µl
	Taq-Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Primer	F1	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
	F2	1 µl	1 µl	-	-
	R	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
	F <sub>ctrl</sub>	-	-	1 µl	1 µl
	R <sub>ctrl</sub>	-	-	1 µl	1 µl
	dNTPs	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
	Taq-Polymerase	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
<i>KAPA Mouse Genotyping Kit</i>					
		<b>BK</b>	<b>IK</b>	<b>MMTV-PyMT</b>	<b>MMTV-cNeu</b>
	DNA	1 µl	1,5 µl	1 µl	1 µl
	dH <sub>2</sub> O	8,5 µl	10,75 µl	7,5 µl	7,5 µl
	KAPA2G	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Primer	F1	1 µl	0,5 µl	1 µl	1 µl
	F2	1 µl	0,5 µl	-	-
	R	1 µl	0,5 µl	1 µl	1 µl
	F <sub>ctrl</sub>	-	-	1 µl	1 µl
	R <sub>ctrl</sub>	-	-	1 µl	1 µl
	DMSO	1 µl	0,25 µl	1 µl	1 µl



**Abb. 4.2 Genotypisierung und Identifizierung der Versuchstiere mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Die amplifizierte DNA wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, so dass die PCR-Fragmente detektiert werden konnten. **(A)** BK-Mauslinie. Heterozygote Tiere zeigen beide PCR-Fragmente. **(B)** IK-Mauslinie. **(C)** Nachweis des MMTV-PyMT Transgens. Es wurde zusätzlich ein Kontrollfragment (200 bp) koamplifiziert, das in allen DNA-haltigen Proben genotypunabhängig gebildet wird. **(D)** MMTV-cNeu Mauslinie. Auch hier wurde das Kontrollfragment koamplifiziert. (bp: Basenpaare; M: Marker; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; HET: heterozygot; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*; MMTV: Mausmammatumovirus)

## 4.2 *In vivo* Methoden

### 4.2.1 Palpation und Messung der Tumore

MMTV-PyMT Weibchen wurden ab einem Alter von 40 Tagen wöchentlich auf Tumore untersucht, da ab diesem Alter eine Entstehung von Tumoren möglich ist (s. 3.1). Dazu wurde das Tier mit der linken Hand fixiert und mit dem rechten Zeigefinger jede Brustdrüse einzeln abgetastet. Sobald ein Knoten tastbar war, wurde die entsprechende Drüse auf einem Vordruck beziffert und der Zeitpunkt notiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Tier drei Mal wöchentlich auf neue Tumore und Wachstum untersucht. MMTV-cNeu Weibchen wurde erst ab einem Alter von 120 Tagen untersucht, da dieses Modell im Schnitt erst nach 205 Tagen Tumore entwickelt (s. 3.1). Die Palpation erfolgte vor und nach Auftreten eines Tumors wöchentlich. Die entsprechende Brustdrüse und der Zeitpunkt wurden ebenfalls notiert. Die Tumorgöße wurde nach der Tumordetektion einmal (MMTV-cNeu) bzw. drei Mal (MMTV-PyMT) mithilfe einer digitalen Schieblehre (s. 3.2) erfasst, um das Wachstum der Tumoren sowie das Abbruchkriterium von 15 mm Tumordurchmesser zu erfassen. Bei einem maximalen Tumordurchmesser von 15 mm wurde der Versuch durch Euthanasie des Tieres beendet (s. 4.2.2). Dies galt auch für Tiere, die der Fellpflege nicht mehr nachkamen oder sonstige Auffälligkeiten im Verhalten aufzeigten, die auf Beschwerden und Leiden des Tieres hinweisen.

## 4.2.2 Tötung und Organentnahme

Alle Tiere wurden mit CO<sub>2</sub> eingeschläfert. Dies erfolgte durch langsames Einleiten des Gases in ihrem vertrauten Haltungskäfig bei geschlossenem Käfigdeckel. Die Maus wird dadurch zuerst bewusstlos. Nach Eintreten des Todes wurde das Gewicht bestimmt und anschließend wurden die Organe entnommen.

Hierzu wurde die Maus auf den Rücken gelegt und an den Vorder- und Hinterläufen fixiert. Das Fell wurde anschließend mit einer Pinzette angehoben und mit einer Präparierschere ein kleiner Schnitt in das Fell gesetzt, bevor das Fell längs mit einem geraden Schnitt aufgeschnitten wurde. Daraufhin konnte das Fell vorsichtig von der Bauchdecke mithilfe einer Pinzette abgezogen werden, wodurch die Brustdrüsen bzw. Tumore bereits frei zugänglich waren. Für die Entnahme eines Brusttumors wurde dieser mithilfe eines Skalpell (No.21, s. 3.4.2) von Fell und Bauchdecke vorsichtig gelöst. Im Anschluss wurde das Gewebe in einer unsterilen Petrischale mit PBS gewaschen und dann mit einer Analysenwaage gewogen und die Größe in zwei Dimensionen (Länge und Breite) mit einer digitalen Schieblehre erfasst. Dadurch kann mithilfe der Formel  $(\text{Länge} \times \text{Länge} \times \text{Breite})/2$  das Tumolvolumen berechnet werden.<sup>314</sup>

Für die Entnahme weiterer Organe wie Leber und Lunge wurde die Bauchdecke ebenfalls mit einem Längsschnitt aufgeschnitten. Für die Leber wurden die versorgenden Blutgefäße vorsichtig mit einer Schere abgetrennt und auch die Verbindung zu weiteren Organen wurde gelöst. Die Leber wurde dann mit einer Pinzette vorsichtig entnommen. Zur Entnahme der Lunge wurden zuerst das Zwerchfell und anschließend der Rippenbogen durchtrennt. Durch Anheben des Rippenbogens war die Lunge direkt zugänglich. Die umgebenden Gefäße wurden durchtrennt und die Lunge vorsichtig mit einer Pinzette entnommen. Alle entnommenen Organe wurden im Anschluss kurz in einer unsterilen Petrischale mit PBS gewaschen.

Die Gewebeproben wurden im Anschluss entweder für die Etablierung einer Zellkultur (s. 4.3.1), für die RNA-Isolation (s. 4.5) oder für immunhistochemische Färbungen (s. 4.7) aufbereitet. Das Vorgehen dafür ist in den entsprechenden Kapiteln beschrieben. Dieses war identisch für alle Tumormodelle und unabhängig vom Kanalstatus (WT oder KO) des Tieres.

## 4.2.3 Behandlung mit dem spezifischen BK-Kanalinhibitor Paxilline

Es sollte überprüft werden, ob eine pharmakologische Inhibition des BK-Kanals mit dem spezifischen Blocker Paxilline (PAX) (s. Tabelle 7.4 Anhang) das Tumorwachstum weiblicher MMTV-PyMT Mäuse beeinflusst. Die Substanz wurde in DMSO:Wasser (9:1 V/V) so gelöst, dass sich eine Dosierung von 8 mg/kg Körpergewicht ergab.<sup>138</sup> Die Injektion erfolgte intraperitoneal (i.p.) bei einem Injektionsvolumen zwischen 40 und 70 µl. Da jedoch das Trägermaterial einen hohen Anteil des toxischen Lösemittels DMSO enthielt, wurde zuerst ein Vorversuch mit Wildtypieren (C57Bl/6) durchgeführt.

### 4.2.3.1 Behandlungsschema

Weibliche MMTV-PyMT Mäuse wurden wie in 4.1 beschrieben generiert und genotypisiert. Anschließend wurden die Weibchen in zwei Kohorten eingeteilt und ab einem Alter von 40 Tagen für insgesamt 4 Wochen zwei Mal täglich (alle 12 Stunden) behandelt: Gruppe A erhielt das Vehikel DMSO:Wasser 9:1, während Gruppe B mit dem Inhibitor PAX behandelt wurde. Die Dosierung betrug 8 mg/kg Körpergewicht (KG) (s.o.). Zur Bestimmung der zu injizierenden Menge wurden die

Tiere daher einmal wöchentlich gewogen und die Injektionsmenge entsprechend angepasst. Es wurde eine Stocklösung mit 30 µg/µl hergestellt (s. 3.4.2), die am jeweiligen Versuchstag auf das benötigte Volumen verdünnt wurde. Für jeden Wochentag wurde das benötigte Volumen der PAX-Stocklösung für alle Probanden in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) pipettiert und bis zur Verwendung auf -20°C gelagert. Am jeweiligen Versuchstag wurde die Stocklösung aufgetaut und mit DMSO:Wasser 9:1 auf eine Konzentration von 3,2 µg/µl verdünnt (Injektionslösung), so dass sich die Injektionsvolumina zwischen 40 und 70 µl bewegten. Im Anschluss wurde die Injektionslösung mit einer 1 ml-Spritze aufgezogen und mit einer Kanüle (30G) i.p. injiziert.

Während der Behandlung wurden die Tiere wie in 4.2.1 beschrieben untersucht, um eine mögliche Tumorentstehung zu erfassen. Nach der 4-wöchigen Behandlung wurden die Tiere noch bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums palpirt und dann mit CO<sub>2</sub> eingeschläfert (s. 4.2.2). Zusätzlich wurde die Wirksamkeit von Paxilline durch die klinische Untersuchung mithilfe motorischer Tests (s.u.) sowie durch die makroskopische Beobachtung der Tiere überprüft. Paxilline ist eine ZNS-gängige Substanz, weshalb die Applikation zu motorischen Störungen mit Ataxie führt, wie es auch für BK-KO Tiere beschrieben ist (s. 1.2.1.2).

#### 4.2.3.2 *Pharmakokinetische Charakterisierung von Paxilline*

Zur pharmakokinetischen Charakterisierung und Wirksamkeit von Paxilline wurden verschiedene Tests zur Überprüfung der motorischen Fähigkeiten der injizierten Tiere durchgeführt.

##### **Gittertest**

Beim Gittertest handelt es sich um eine Abwandlung des in der Literatur beschriebenen *screen*-Tests.<sup>315</sup> Die Tiere wurden aus dem Käfig entnommen und von innen an das Gitter gesetzt. Die Sicherheit und Haltung des Tieres am Gitter wurde nach den Kriterien in Tabelle 4.2 bewertet und die Punktzahl entsprechend notiert. Eine hohe Punktzahl entspricht einer stark eingeschränkten Motorik des Tieres. Die Tiere wurden jede Stunde für insgesamt 5 Stunden nach der Injektion untersucht.

**Tabelle 4.2 Scoring des Gittertests**

Punkte	Bewertung
0	Das Tier ist sehr sicher und springt sicher und selbständig in den Käfig zurück.
1	Das Tier zeigt leichte Unsicherheiten am Gitter (beispielsweise kein direktes Greifen des Gitters mit den Pfoten). Kann alleine in den Käfig zurück, der Prozess ist jedoch leicht verlangsamt. Das Tier ist in der Lage, alleine an das Gitter zurückzukehren.
2	Das Tier zeigt starke Unsicherheiten am Gitter, insbesondere beim Greifen eines neuen Gitterstabes. Teilweise werden die Bewegungen sogar abgebrochen. Das Tier gelangt trotz mehrmaliger Eigenversuche nicht selbständig in den Käfig zurück.
3	BK-KO Tier. Das Tier kann sich nicht halten und fällt sofort in den Käfig zurück.

##### **Gangtest**

Der Gangtest stellt eine modifizierte Form des *Tremorassays* dar.<sup>316</sup> Das Gitter wurde abgenommen und die Tiere wurden für 1 min kontinuierlich beobachtet. Es wurden Bewegungsintensität und Gangsicherheit des Tieres beobachtet. Ebenfalls wurde überprüft, ob ein eher unbewegliches Tier durch kurzes Anstoßen zur Bewegung gezwungen werden kann oder ob dies zu einem Tremor führt. Die Parameter wurden mit einer entsprechenden Punktzahl korreliert (s. Tabelle 4.3). Die Tiere

wurden zu definierten Zeitpunkten nach der Injektion untersucht (10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h). Dies wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt, sodass auch überprüft werden konnte, ob sich das Verhalten über einen längeren Zeitraum verändert.

**Tabelle 4.3 Scoring des Gangtests**

Punkte	Bewertung
0	Das Tier bewegt sich fast die gesamte Zeit ohne Unsicherheiten und Auffälligkeiten im Käfig. Auch Anstoßen bewirkt keine Änderung.
1	Das Tier bewegt sich, weist jedoch Unsicherheiten im Gang auf (Hinterläufe werden ähnlich wie bei einem Känguru bewegt). Ein Anstoßen kann eventuell zu einer Verstärkung des Tremors führen.
2	Das Tier bewegt sich wenig. Auch in Ruhe kann ein Tremor erkannt werden, der durch Anstoßen noch verstärkt wird.
3	BK-KO Tier

#### 4.2.4 Allotransplantation

Bei weiblichen FVB/N WT Mäusen wurde in einem Alter von 12 Wochen eine orthotope Allotransplantation mit MMTV-PyMT Brusttumorzellen in die vierte rechte Brustdrüse durchgeführt.<sup>317,318</sup> Die Zellen waren zuvor aus Brusttumoren von MMTV-PyMT WT, IK-KO bzw. BK-KO Tieren isoliert und aufgereinigt worden (s. 4.2.2 und 4.3.1). Die Versuchstiere wurden zufällig in drei Gruppen eingeteilt und es wurden entweder MMTV-PyMT WT, IK-KO oder BK-KO Zellen in die vierte Brustdrüse implantiert. Vor Versuchsbeginn wurde eine Heizplatte auf 37°C erwärmt, um ein Auskühlen der Tiere während des Eingriffs zu verhindern. Zusätzlich wurde je ein großes Zentrifugationsröhrchen mit PBS bzw. Ethanol 70% gefüllt und ein Wattestäbchen darin getränkt. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt (s. 4.3.2) und in einer Konzentration von  $10^6/50 \mu\text{l}$  in PBS in einem Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bis zur Transplantation auf Eis gelagert. Die Mäuse wurden gewogen und dann zur Narkoseeinleitung sukzessive mit  $10 \mu\text{l/g KG}$  der Narkoselösung (Ketamin 10 mg/ml und Xylazin 1 mg/ml in NaCl-Lösung 0,9%, s. 3.4.2) i.p. mit einer 30G-Kanüle injiziert. Die finale Dosierung betrug somit für Ketamin 100 mg/kg KG und für Xylazin 10 mg/kg. Nachdem eine ausreichende Tiefe der Narkose über das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes bestätigt wurde (kein Reflex nach ca. 20 min), wurden die Tiere mit Leukosilk<sup>®</sup> auf der Heizplatte fixiert, die Augen mit Bepanthen<sup>®</sup> versehen, um ein Austrocknen zu verhindern, und das Fell um die vierte rechte Brustdrüse vorsichtig mit einem Skalpell entfernt. Nach der Desinfektion der Stelle mit 70%igem Ethanol wurde mit einem Skalpell ein Schnitt von ca. 10 mm rechts neben der Brustdrüse gesetzt, um einen Zugang zur Drüse zu erhalten. Dieser Zugang wurde vorsichtig mit einem PBS-getränkten Wattestäbchen gereinigt. Nun wurde die Brustdrüse mit einer chirurgischen Klemme herausgezogen und fixiert. Die Zellsuspension wurde invertiert, in eine 1 ml-Spritze aufgezogen und über eine Kanüle (30G) wurden  $10^6$  Zellen (in  $50 \mu\text{l}$  PBS) in die Drüse injiziert. Nach dem Zurückschieben der Brustdrüse wurde die Wunde mit Einzelheften geschlossen. Die postanalgetische Versorgung der Tiere erfolgte für einen Tag mit Novaminsulfon (200 mg/kg KG s.c., 30G-Kanüle) gemäß der Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV SOLAS).<sup>319</sup> Während der etwa zweistündigen Aufwachphase wurde durch eine Wärmelampe ein Auskühlen der Tiere verhindert. Eine Woche nach der Operation wurde

begonnen, die Tiere dreimal wöchentlich zu palpieren (s. 4.2.1), um eine mögliche Tumorentstehung zu erfassen. Das Wachstum der Tumore wurde mit einer digitalen Schieblehre dokumentiert, sobald eine messbare Größe erreicht war. Beim Erreichen des Abbruchkriteriums (Maximaldurchmesser 15 mm) wurde das Tier euthanasiert (s. 4.2.2).

### 4.3 Zellkultur

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten Medien und Lösungen in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Es wurde unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank gearbeitet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte grundsätzlich bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank.

#### 4.3.1 Etablierung primärer Brusttumorzellen als Primärzelllinie

Zuerst wurden unter sterilen Bedingungen 20 ml Zellkulturmedium in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen (s. 3.3) vorgelegt und auf Eis gestellt. Ebenfalls wurden zwei Zentrifugationsröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 15 ml mit 10 ml IMEM mit Phenolrot (s. 3.4.3) gefüllt. In diesen wurde jeweils 1 mg/ml Collagenase D (s. 3.4.3) gelöst. Auch diese Röhrchen wurden auf Eis gelagert. Es wurden Zellen aus tumortragenden weiblichen MMTV-PyMT BK-WT und BK-KO sowie MMTV-PyMT IK-WT und IK-KO isoliert. Ebenfalls wurden Zellen aus tumortragenden MMTV-cNeu Wildtypmäusen isoliert (s. 3.1). Die Entnahme des Tumors ist in 4.2.2 beschrieben. Nach Waschen des Tumors in PBS in einer unsterilen Petrischale wurde ein gut differenziertes Tumorstück mit einer Größe von etwa 5 mm Durchmesser mit einem Skalpell (No.21, s. 3.4.2) in kleinere Stücke geschnitten. Diese wurden mit einer Pinzette in das Zentrifugationsröhrchen mit 20 ml Zellkulturmedium überführt. Unter der Sterilwerkbank wurden die Tumorstücke dann in eine sterile Petrischale überführt und mit einem Skalpell und einer Pinzette weiter zerkleinert. Im Anschluss wurden die Stücke in eine der Collagenase-Lösungen überführt und in einem Wasserbad bei 37°C für 11 min inkubiert. Jede Minute wurde das Röhrchen vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde die Suspension zuerst mit einer 10 ml- und dann mit einer 5 ml-Stripette auf- und abgezogen, um eine weitere Dissoziation des Gewebes zu erreichen. Daraufhin wurde die Tumorstücke über ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 µm (s. 3.4.3) in ein großes Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Suspension wurde dann für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die übrigen Tumorstücke wurden mit einer Pinzette vom Zellsieb abgenommen, in das zweite Röhrchen mit Collagenase-Lösung überführt und der Vorgang entsprechend wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit einer 5 ml-Stripette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit einer Pipette (1000 µl) in 1 ml Zellkulturmedium suspendiert und dann in eine Petrischale (55 cm<sup>2</sup> Fläche) überführt. Mit vorgewärmtem Zellkulturmedium wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden dann im Brutschrank kultiviert. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, der bei frisch isolierten Zellen bis zur ersten Passage (s. 4.3.2) täglich wiederholt wurde. Dafür wurde das Medium mit einer 10 ml-Stripette abgenommen, in ein kleines Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurden 10 ml PBS in die Petrischalen pipettiert und die Zellen im Brutschrank gelagert. Nach der Zentrifugation wurde das PBS abgenommen und verworfen. 7 ml des Überstandes wurden mit einer 10 ml-Stripette abgenommen, mit 3 ml frischem Medium ergänzt und auf die Zellen pipettiert. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen passagiert (s.u.). Ab Passage 4 und nach der Aufreinigung (s. 4.3.2.1) wurden die Zellen für Experimente verwendet.

### 4.3.2 Passagierung der Primärzelllinien

Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen mittels Trypsinierung passagiert. Die verwendeten Volumina sind von der Größe des Zellkulturgefäßes abhängig und in Tabelle 4.4 dargestellt.

Das Medium wurde mit einer Absaugpumpe abgenommen und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Um die Zellen aus dem Kulturgefäß und dem Zellverband zu lösen, wurden die Zellen für 5–7 min mit 1 x Trypsin (s. 3.4.3) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen mit der Handfläche gegen das Gefäß wurde eine vollständige Ablösung erreicht, was unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von Zellkulturmedium in einem entsprechenden Volumen (s. Tabelle 4.4) inaktiviert. Dazu wurde das Medium mit einer Stripette in das Gefäß pipettiert, dieses kurz geschwenkt und die Zellsuspension wieder mit der Stripette aufgenommen und in ein Zentrifugationsröhrchen entsprechender Größe überführt. Die Zellsuspension wurde daraufhin für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand mit der Absaugpumpe abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde suspendiert und in einem definierten Volumen verdünnt. Daraufhin wurden die Zellen gezählt. Die Zellsuspension wurde dazu noch einmal gut durchmischt, dann 10 µl abgenommen, in eine Neubauer-Zählkammer (s. 3.4.3) überführt und anschließend die Zellzahl gemäß Protokoll bestimmt.<sup>320</sup> Die Suspension konnte dann auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden und die Zellen in entsprechender Anzahl in Abhängigkeit des jeweiligen Experimentes ausgebracht werden.

Wurden die Zellen nicht für ein entsprechendes Experiment verwendet, wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und verworfen und frisches Zellkulturmedium hinzugegeben.

Für alle Experimente wurden Zellen der Passagen 4-13 verwendet.

#### Tabelle 4.4 Verwendete Zellkulturgefäße

Dargestellt sind die Fläche der Gefäße und das benötigte Volumen an Zellkulturmedium. Dieses gilt sowohl für die Kultivierung als auch für die Inaktivierung des 1 x Trypsin, dessen benötigtes Volumen zum Ablösen der Zellen in der rechten Spalte gelistet ist. (cm: Zentimeter; ml: Milliliter)

Zellkulturgefäß	Kultivierungsfläche [cm <sup>2</sup> ]	Zellkulturmedium [ml]	1 x Trypsin [ml]
Flasche	25	5	1
Flasche	75	15	3
Flasche	175	20	5
Petrischale	55	10	2
Grid-Platte	3,5	2	-
Calciummessschälchen	8,7	2	-
µ-Kammer (pro Loch)	0,56	0,2	-

#### 4.3.2.1 *Aufreinigung der Primärzelllinien*

Im Zuge der Etablierung einer Primärzelllinie werden neben den eigentlichen Tumorzellen auch weitere Zelltypen, beispielsweise Fibroblasten, isoliert. Diese sind deutlich größer als die Tumorzellen und müssen vor den eigentlichen Experimenten entfernt werden. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass sich Fibroblasten bei einer Trypsinbehandlung schneller ablösen als die Tumorzellen.

Zur Aufreinigung der Zellen wurde das Medium abgenommen und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Hälfte des eigentlichen Volumens an 1 x Trypsin (s. Tabelle 4.4) auf die Zellen pipettiert und diese für maximal 2 min inkubiert. Dabei erfolgte eine durchgehende Kontrolle unter dem Mikroskop, bei der bereits eine Ablösung einzelner Fibroblasten sichtbar war. Nach sehr vorsichtigem Klopfen gegen das Kulturgefäß wurde das Trypsin mit dem entsprechenden Volumen an Zellkulturmedium inaktiviert und diese fibroblastenhaltige Mischung verworfen. Die Zellen wurden anschließend noch einmal mit PBS gewaschen und daraufhin wieder in Zellkulturmedium im Brutschrank kultiviert. Dieser Vorgang ließ sich mehrfach wiederholen, sollte jedoch nicht öfter als alle zwei Tage erfolgen.

#### 4.3.3 **Kryokonservierung und Auftauen der Primärzelllinien**

Die aufgereinigten Primärzelllinien wurden in einem geeigneten Maß expandiert und anschließend direkt für Experimente verwendet oder zur dauerhaften Lagerung kryokonserviert.

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben trypsiniert und gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/0,5 ml eingestellt. Je 0,5 ml wurden in ein Kryogefäß (s. 3.4.3) pipettiert. Zusätzlich wurden 0,5 ml Kryomedium (Zellkulturmedium mit 20% DMSO, s. 3.4.3) hinzupipettiert, so dass sich eine Endkonzentration von 10% DMSO ergab. Dies verhindert die Kristallwasserbildung und die damit verbundene Schädigung der Zellen. Anschließend wurden die Gefäße in ein Einfriergerät (*Mr. Frosty*) gestellt. Dieses ist mit Isopropanol gefüllt, um eine gleichmäßige Abkühlung von  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  zu gewährleisten. Die Zellen wurden für 24 Stunden darin auf  $-80^\circ\text{C}$  gelagert und anschließend in eine normale Box umgelagert und weiterhin bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen für 3 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut. Währenddessen wurde ein kleines Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml Zellkulturmedium gefüllt. Aus diesem wurden 3 ml Medium mit einer Stripette abgenommen und dazu die aufgetaute Zellsuspension aufgezogen, so dass das DMSO sofort verdünnt wurde. Die Suspension wurde wieder zurück in das Zentrifugationsröhrchen pipettiert und anschließend bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, die Zellen suspendiert und in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die gesamte Zellsuspension wurde dann in eine Petrischale ( $55 \text{ cm}^2$ ) überführt. Anschließend erfolgte die Kultivierung im Brutschrank. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt (s.o.).

#### 4.3.4 **G1-Arretierung mittels Serumentzug**

Bei bestimmten Experimenten wurde eine Arretierung der Zellen in der G1-Phase durch einen Serumentzug vorgenommen.<sup>321,322</sup>

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben trypsiniert und für 24 Stunden kultiviert. Daraufhin wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Kultivierung in IMEM ohne Phenolrot (s. 3.4.3) für 72 Stunden im Brutschrank. Anschließend

wurden die Zellen restimuliert. Das phenolrot- und serumfreie IMEM wurde abgenommen und verworfen und die Zellen wieder in Zellkulturmedium  $\pm$  Inhibitor bzw. Zytostatikum (s. 3.4.3) für die entsprechenden Zeiträume kultiviert. Diese Zeitspannen sind in den jeweiligen Experimenten angegeben.

#### 4.4 Patch-Clamp-Analyse

Zur funktionalen Charakterisierung der Kanäle und zur Überprüfung der Selektivität der Inhibitoren wurden von Dr. Benjamin Stegen in einer Kooperation mit der Radioonkologie der Universität Tübingen Patch-Clamp-Analysen durchgeführt (s. Benjamin Stegen „Die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanälen für die Radioresistenz des Glioblastoms“, Dissertationsschrift, Universität Tübingen, 2015). Mithilfe der Patch-Clamp-Technik können die Ströme einzelner Ionenkanäle gemessen werden, ohne dass elektrochemische Gradienten der beteiligten Ionen verändert werden.<sup>323</sup> Dazu wird eine Messpipette aus Glas auf eine intakte Zelle gebracht, so dass ein niederohmiger Widerstand am Pipettenrand entsteht. Die Glaspipette enthält eine leitfähige Salzlösung, die je nach Versuchsaufbau variiert. In die Lösung taucht ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht. Leichtes Ansaugen der Pipette auf der Zelloberfläche führt in der Folge zu einer Gigaohmversiegelung, dem sog. *gigaseal*. An diesem „Fleck“ (*patch*) können beim Anlegen einer definierten Spannung nun Ströme bis zu  $10^{-2}$  A gemessen werden. Durch den hohen Widerstand des *gigaseals* fließt genau der Strom, welcher durch einen Ionenkanal innerhalb des *patches* fließt, auch durch die Messpipette und kann über eine Elektrode und einen Verstärker beobachtet werden. In dieser sogenannten *cell attached configuration* kann der Strom eines einzelnen Kanals erfasst werden. Das Anlegen eines Unterdrucks ermöglicht die Öffnung des *patches*, ohne dass der *gigaseal* bricht. In dieser Konfiguration werden die Ströme nun von der gesamten Zelloberfläche abgeleitet, weshalb dies auch als *whole cell configuration* bezeichnet wird. Beide Konfigurationen wurden im Rahmen dieser Arbeit benutzt, um IK- bzw. BK-spezifische Ströme zu detektieren. Es wurden sowohl WT- als auch KO-Zellen in An- oder Abwesenheit des jeweils selektiven Inhibitors untersucht.

#### 4.5 RNA-Analytik

Für die RNA-Analytik wurden sowohl Zellen als auch Gewebeproben verwendet. Der Arbeitsplatz wurde für alle Schritte gründlich mit 70%igem Ethanol gereinigt, um eine mögliche Kontamination mit RNAsen zu verhindern. Regelmäßig wurde dies auch während der Arbeitsschritte wiederholt. Alle Gefäße wurden vor der Verwendung ebenfalls mit Ethanol desinfiziert. Es wurde grundsätzlich mit Diethyldicarbonat-behandeltem Wasser (DEPC) gearbeitet. DEPC wird zur Inaktivierung von RNAsen verwendet.

##### 4.5.1 RNA-Isolation

Die Isolation der mRNA erfolgte unter RNA-freien Bedingungen auf Basis der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Guanidinthiocyanat bewirkt die Lyse der Zellen, Phenol dient zur Aufnahme der RNA.<sup>324,325</sup>

Die Tumorgewebeproben wurden wie in 4.2.2 beschrieben aus den Tieren entnommen und auf ein Gewicht von ca. 100 mg eingestellt. Für eine direkte Verwendung wurden die Proben in ein Eppendorfreaktionsgefäß (2 ml) überführt. Alternativ konnten die Proben auch bis zur Verwendung

eingefroren werden. Dazu wurden sie in ein Kryogefäß überführt und dann kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss erfolgte die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Für die Isolation wurden auch diese Proben in ein Eppendorfreaktionsgefäß (2 ml) überführt und in 1 ml PeqGOLD RNA pure<sup>TM</sup> (s. 3.4.4) mit einem Ultraturrax für ca. 2 min homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Für Zellproben wurden die Zellen trypsiniert und gezählt (s. 4.3.2).  $5 \times 10^6$  Zellen wurden dann in einer Petrischale ( $55 \text{ cm}^2$ ) ausgebracht und für 24 Stunden kultiviert. Je nach Versuchsaufbau erfolgte dann entweder ein Serumentzug mit anschließender Restimulation (s. 4.3.4) oder eine direkte RNA-Isolation. Die Zellen wurden für die Isolation zwei Mal mit PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden unter unsterilen Bedingungen durchgeführt. 1 ml PeqGOLD RNA pure<sup>TM</sup> wurde mit einer Pipette (1000  $\mu\text{l}$ ) direkt auf die Zellen gegeben. Mit der Pipettenspitze wurde daraufhin das PeqGOLD RNA pure<sup>TM</sup> mehrfach aufgezogen und immer wieder auf die Zellen pipettiert. Währenddessen wurde auch der Boden der Petrischale mit der Spitze immer wieder abgefahren, um die Lyse der Zellen sowie die Freisetzung der RNA mechanisch zu unterstützen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension aufgenommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß (2 ml) überführt. Eine kurzfristige Lagerung auf Eis war möglich, bis alle Proben homogenisiert waren.

Nach der Homogenisierung wurden Gewebeproben und Zellproben identisch weiterverarbeitet. Zunächst wurden die Homogenate für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform überführt, die Mischung sofort mit einem Vortexer homogenisiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13 000 rpm für 5 min wurde die mittlere, wässrige Phase vorsichtig entnommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß pipettiert. Dies wurde mit dem 0,7-fachen Volumen an Isopropanol gemischt und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  zur Präzipitation gelagert. Am Folgetag wurden die Proben bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der RNA wurde mit 75%igem Ethanol (in DEPC-behandeltem Wasser, s. 3.4.4) gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13 000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 min. Erneut wurde der Überstand verworfen und der Waschschrift wurde wiederholt. Daraufhin wurden Gefäß und Pellet auf einem Präzisionswischtuch für ca. 30 min getrocknet: Isopropanolrückstände wurden entfernt, indem das geöffnete Reaktionsgefäß mit der Öffnung nach unten auf das Tuch gestellt wurde. Im Anschluss wurde das Pellet in 53  $\mu\text{l}$  Wasser bei  $56^{\circ}\text{C}$  für 10 min in einem Thermoschüttler bei 500 rpm inkubiert, um die RNA zu lösen. Mit einem Nanophotometer (Implen) wurde dann die RNA-Konzentration bestimmt. Dafür wurde drei Mal je 1  $\mu\text{l}$  der Probe gemessen. Die Werte wurden notiert und der Mittelwert bestimmt.

Eine Kontamination der Proben durch Spuren genomischer DNA wurde mithilfe eines DNase-Verdau beseitigt. Dafür wurde ein Verdauansatz aus 5  $\mu\text{l}$  DNase (s. 3.4.4) und 6  $\mu\text{l}$  Wasser pro 50  $\mu\text{l}$  Probe angesetzt und für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Thermoschüttler bei 500 rpm inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte in einem Thermoschüttler bei 500 rpm für 5 min bei  $80^{\circ}\text{C}$ . Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration mit Wasser auf 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt. Die Proben wurden entweder direkt umgeschrieben und dabei auf Eis verarbeitet oder auf  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 4.5.2 Umschreiben in cDNA

Das Umschreiben der RNA wurde mit dem iScript™ cDNA Synthesekit (s. 3.4.4) durchgeführt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Dazu wurde die RNA-Probe mit 5xiScript™, Reverser Transkriptase (RT) und Wasser in einem Eppendorfreaktionsgefäß gemischt (+RT-Probe). Für jede Probe wurde auch eine Negativkontrolle ohne RT angefertigt, in der das Volumen der RT durch Wasser ersetzt wurde (-RT-Probe). Die Volumina sind in Tabelle 4.5 angegeben.

**Tabelle 4.5 Pipettierschema zum Umschreiben von RNA in cDNA mit Reverser Transkriptase**  
(RNA: Ribonukleinsäure; µg: Mikrogramm; µl: Mikroliter; RT: Reverse Transkriptase)

	+RT-Probe	-RT-Probe
<b>RNA (0,1 µg/µl)</b>	5 µl	5 µl
<b>5xiScript™</b>	4 µl	4 µl
<b>Reverse Transkriptase (RT)</b>	1 µl	-
<b>Wasser</b>	10 µl	11 µl

Die RNA wurde anschließend in einem Thermocycler (Mastercycler) nach einem definierten Temperaturprotokoll in cDNA umgeschrieben. Im ersten Schritt erfolgt die Anlagerung der Primer bei 25°C für 5 min: Oligo-dT-Nukleotide sowie Random-Hexamer-Oligonukleotide sind als Primer bereits im Mastermix enthalten. Im darauffolgenden Schritt erfolgte dann das eigentliche Umschreiben durch die Reverse Transkriptase bei 42°C für 30 min, woran sich die Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 85°C anschloss. Im Anschluss wurden die Proben mit 180 µl Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 µl verdünnt.

### 4.5.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR, *quantitative real-time polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, die zusätzlich eine Quantifizierung des DNA-Gehalts ermöglicht. Das allgemeine Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben.

Die qRT-PCR wurde mit dem SYBR® green Supermix durchgeführt (s. 3.4.4). Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Der SYBR® green Supermix enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® green, eine geeignete Taq-Polymerase, dNTPs sowie spezielle Puffersysteme und Stabilisatoren. Dieser wird dann mit der cDNA und einem entsprechenden Primerpaar (s. 3.4.4) für die zu untersuchende Struktur gemischt. Die Primer wurden mithilfe der Online-Software Primer 3 unter definierten Bedingungen entworfen: Zum einen durfte die Primerlänge 23 bp nicht überschreiten, zum anderen sollte die Schmelztemperatur zwischen 58°C und 64°C liegen. Außerdem wurde aufgrund der kurzen Reaktionszeiten eine Fragmentgröße zwischen 70 und 120 bp festgelegt.

Je 2 µl cDNA wurden in ein Loch einer 96-Loch-Platte pipettiert und mit 18 µl eines Mastermixes ergänzt. Der Mastermix enthielt das benötigte Primerpaar, den SYBR® green Supermix und Wasser (s. Tabelle 4.6). Von den +RT-Proben wurden dabei immer Triplikate, von den -RT-Proben Unikate pipettiert. Um die mRNA-Menge später relativ zu quantifizieren, wurde jede Probe zwei Mal auf die Lochplatte aufgetragen und davon einmal mit einem Mastermix versehen, welcher das Primerpaar für

$\beta$ -Actin als Referenzgen (interner Standard) enthielt, welches unabhängig vom Versuchsaufbau und den pharmakologischen Behandlungen exprimiert wird. Ebenfalls wurden Negativproben mit Wasser anstelle von cDNA für jedes verwendete Primerpaar pipettiert, um die Primerspezifität zu überprüfen.

**Tabelle 4.6 Pipettierschema für die qRT-PCR (Mastermix)**

(cDNA: cyclische Desoxyribonukleinsäure;  $\mu$ l: Mikroliter)

Substanz	Volumen
cDNA	2 $\mu$ l
SYBR <sup>®</sup> green Supermix	10 $\mu$ l
Vorwärtsprimer (F, <i>forward</i> )	3 $\mu$ l
Rückwärtsprimer (R, <i>reverse</i> )	3 $\mu$ l
Wasser	2 $\mu$ l

Danach wurde die Platte in die qRT-PCR-Maschine (CFX Connect<sup>®</sup>) gestellt und die Reaktion gemäß des Protokolls in Tabelle 4.7 gestartet. Der Farbstoff SYBR<sup>®</sup> green interkaliert mit hoher Affinität in die DNA, wodurch sein Fluoreszenzsignal ungefähr 1000-fach amplifiziert wird.<sup>326</sup> Während der Reaktion nimmt der Produktgehalt mit jedem Amplifikationszyklus exponentiell zu und wird dabei über den Opticon-Cycler in Echtzeit detektiert. Durch die Darstellung der Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenzahl erhält man einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Es wurde für die Auswertung ein Schwellenwert bestimmt, an dem der lineare Bereich der Kurve überschritten wurde. Durch den Schnittpunkt des Graphen und Schwellenwerts konnte die Zykluszahl ermittelt werden, ab der ein signifikanter Unterschied zwischen eigentlichem Fluoreszenzsignal und Hintergrundfluoreszenz vorlag. Dieser Wert wird auch als C(t)-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet und wird für die zu untersuchende Struktur sowie das Referenzgen bestimmt. Damit konnte der  $\Delta$ C(t)-Wert bestimmt werden, der sich unter der Annahme der DNA-Verdopplung aus folgender Formel berechnen lässt:  $\Delta C(t) = 2^{C(t)_{\text{Referenzgen}} - C(t)_{\text{Zielgen}}}$ . Im Anschluss wurden die Proben zusätzlich auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen, um mögliche Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen und die Primerspezifität zu überprüfen (s. auch 4.1.3.3).

**Tabelle 4.7 Programm der qRT-PCR**

(min: Minute; sec: Sekunde)

Vorgang	Zeit
Initiale Denaturierung	1 min
Denaturierung (98°C)	5 sec
Primeranlagerung (58°C)	15 sec
Elongation (72°C)	30 sec
Fluoreszenzmessung → 40 Zyklen wiederholen	
Schmelzkurvenerstellung 0,5°C Schritte 58°C–95°C	Je 1 sec
Kühlung (4°C)	Maximal 1 Tag

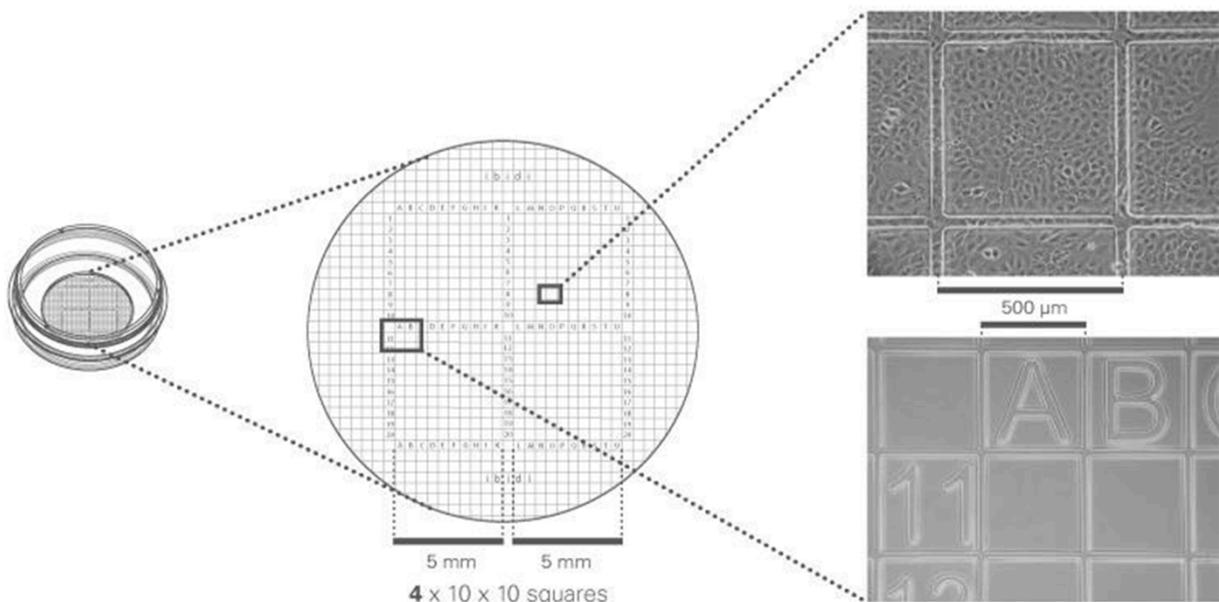
## 4.6 Wachstumsversuche und Zellzyklusanalysen

Das Wachstum der Zellen wurde mit Grid-Platten (*grid plates*) oder alternativ mit der impedanzbasierten xCelligence-Methode erfasst (s. 4.6.1 bzw. 4.6.2). Die Zellzyklusanalyse wurde mit qRT-PCR basierten Methoden (s. 4.6.3.1) oder mit Durchflusszytometrie (s. 4.6.3.2) durchgeführt.

### 4.6.1 Untersuchung des Wachstumsverhalten der Brusttumorzellen mittels Grid-Platten

Die Grid-Platten  $\mu$ -dishes *grid-500* bieten  $3,5 \text{ cm}^2$  Wachstumsfläche mit einem Koordinatensystem in Form eines Gitters, das durch Buchstaben und Zahlen markiert ist. Einmal definierte Stellen im Zellrasen lassen sich so zu einem späteren Zeitpunkt leicht wiederfinden (s. Abb. 4.3). Die Größe eines Quadranten beträgt  $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ .

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben passagiert und gezählt. Die Konzentration der Zellsuspension wurde auf 80 000 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml Zellkulturmedium wurde pro Schälchen vorgelegt und durch 1 ml Zellsuspension ergänzt. Nach 24-stündiger Kultivierung im Brutschrank wurde die G1-Arretierung durchgeführt (s. 4.3.4).

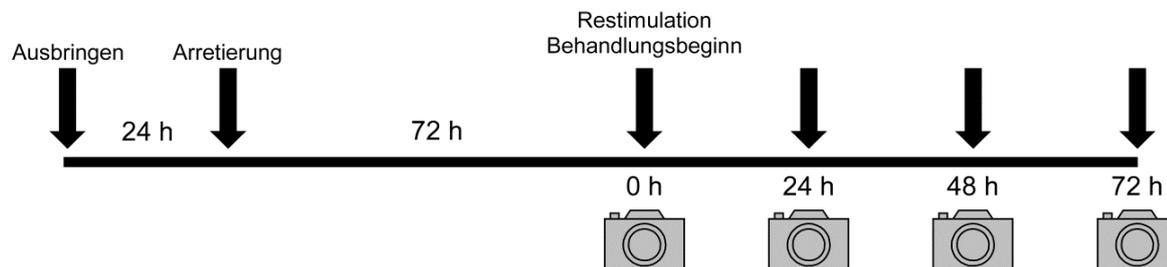


**Abb. 4.3 Koordinatensystem der Grid-Platten**

Es sind insgesamt vier Felder (*squares*) mit jeweils  $10 \times 10$  Quadranten eingezeichnet. Genaueres im Fließtext. (Quelle: ibidi GmbH).

Direkt vor der Restimulation wurden mit dem Mikroskop (Inverses Mikroskop Axiovert 200 M) (s. 3.2) in der 10-fachen Vergrößerung Bilder von definierten Stellen im Zellrasen angefertigt. Für jede Schale wurden zwei Ausschnitte mit jeweils vier Quadranten ausgewählt (Gesamtfläche  $1 \text{ mm}^2$ ), die eine annähernd identische Konfluenz besaßen. Die Koordinaten wurden entsprechend notiert. Dieser Zeitpunkt wurde als  $t = 0 \text{ h}$  definiert. Danach erfolgte die Restimulation mit Zellkulturmedium oder mit Zellkulturmedium plus Wirkstoffen bzw. dem entsprechenden Vehikel. Für alle Wirkstoffe wurde eine 10-fach konzentrierte Zwischenlösung erstellt (s. 3.4.3), die dann im Schälchen 1:10 auf die finale Konzentration verdünnt wurde. Die Zellen wurden im weiteren Verlauf des Experiments bei Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert. An insgesamt vier aufeinanderfolgenden Tagen wurden alle 24 Stunden weitere Bilder angefertigt, so dass sich vier Dokumentationszeitpunkte

ergaben (0–72 h) (s. Abb. 4.4). Alle Schalen wurden unter dem inversen Mikroskop (s.o.) betrachtet und das Wachstum mithilfe der Farbkamera AxioCam MRc Rev.3 dokumentiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl anhand der Bilder für jeden Zeitpunkt mit der ImageJ Software (ImageJ 1.46) bestimmt. Für die Auswertung wurden alle Werte (24–72 h) auf den Ausgangszellwert (0 h) normiert.



**Abb. 4.4 Zeitverlauf der Wachstumsuntersuchungen mittels Grid-Platten**

Die Zellen wurden trypsiniert und gezählt. 80 000 Zellen wurden in einer Grid-Platte ausgebracht und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Eine G1-Arretierung wurde durch einen 72-stündigen Serumentzug erreicht. Es wurden dann von definierten Koordinaten Bilder angefertigt. Die Zellen wurden dann mit Zellkulturmedium ± Kanalinhibitor restimuliert. Alle 24 Stunden wurde das Wachstum erneut dokumentiert. Die Zellen wurden anschließend mit der ImageJ 1.46 Software ausgezählt. Genauereres im Fließtext. (h: Stunden)

#### 4.6.2 Untersuchung des Wachstumsverhalten der Brusttumorzellen mit dem xCelligence-System

Das xCelligence-System basiert auf Impedanzmessungen, wodurch kontinuierlich quantitative Informationen über den Status von Zellen in Echtzeit gewonnen werden können. Sowohl das Proliferations- und Migrationsverhalten als auch die Viabilität können erfasst werden. Das System misst die Änderung der Impedanz und somit den Status der Zellen über Mikroelektroden, die sich an der Unterseite der Kultivierungsplatten (E-Platten, s. 3.4.5) befinden. Darüber wird ein Zellindex (ZI) berechnet.<sup>327</sup> Die Messapparatur mit den Sensoren (Roche, s. 3.2) wird während der Messung in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben passagiert und gezählt. Die Zellsuspension wurde auf 10 000/100 µl eingestellt. Dann wurden 80 µl bzw. 100 µl Zellkulturmedium in jedes Loch einer E-Platte vorgelegt. Die Platte wurde zur Hintergrundmessung in die Messapparatur eingesetzt. In jedes Loch wurden im Anschluss 100 µl der zuvor eingestellten Zellsuspension pipettiert. Die Platte wurde dann wieder in die Messapparatur gestellt und die Messung wurde für 72 Stunden gestartet. Der Zellstatus wurde alle 15 min erfasst. Sollte der Effekt eines Kanalinhibitors untersucht werden, wurden nach 24 h 20 µl einer 10-fach konzentrierten Wirkstofflösung bzw. *Lösungsmittel* pro Loch hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Daten mit der RTCA Software (*Real-Time Cell Analyser*) von Roche und Microsoft Excel ausgewertet.

#### 4.6.3 Zellzyklusanalyse

Mithilfe der Zellzyklusanalyse wurde untersucht, ob mögliche Unterschiede im Wachstumsverhalten auf einer Veränderung des Zellzyklus beruhen. Dazu wurden die Expressionslevel bestimmter Zellzyklusmarker zu definierten Zeitpunkten mittels qRT-PCR (s. auch 4.5) untersucht. Eine weitere Validierung dieser Versuche erfolgte nach Färbung der DNA mit Propidiumiodid (PI) und anschließender Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie.

#### 4.6.3.1 *qRT-PCR-basierte Zellzyklusanalyse*

Verschiedene Proteine werden in Abhängigkeit der Zellzyklusphase exprimiert, so dass über ihr Expressionslevel auf den Zellzyklusstatus der Zelle geschlossen werden kann. Typische Zellzyklusmarker sind die *immediate early genes* c-fos und c-jun (s. 1.3.1.1) sowie p53 und Cyclin D1.

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben trypsiniert und gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Für jede Kondition wurde eine Petrischale ( $55 \text{ cm}^2$ ) mit  $5 \times 10^6$  Zellen benötigt. Folglich wurde 1 ml der Zellsuspension in die Schale pipettiert und mit Zellkulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde eine G1-Arretierung durchgeführt (s. 4.3.4). Nach 72 Stunden wurden die Proben für bestimmte Zeitintervalle (0,5 h, 1,5 h und 24 h) mit oder ohne den IK-Kanalinh inhibitor TRAM-34  $10 \mu\text{M}$  restimuliert. Zusätzlich wurde eine weitere Schale als Basalwert nicht restimuliert (0 h). Daraufhin wurde die RNA gemäß des Protokolls in 4.5 isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben (s. 4.5.2). Die Expression der Zielgene zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde dann mittels qRT-PCR (s. 4.5.3) bestimmt.

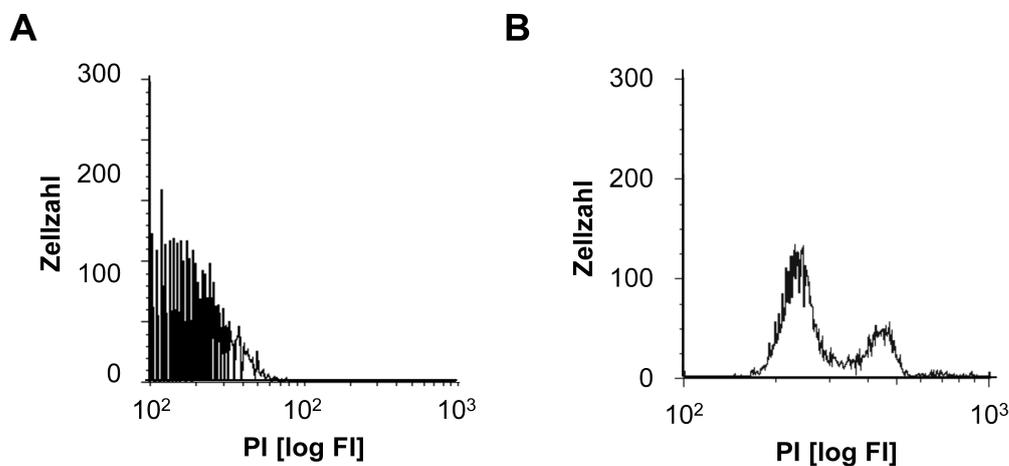
#### 4.6.3.2 *Durchflusszytometrie-basierte Zellzyklusanalyse*

Die Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie wurde wie beschrieben durchgeführt.<sup>328</sup> Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ist eine Methode, um Zellen anhand ihrer Art, Größe und Komplexität zu analysieren. Im Analysegerät passieren die Zellen einen Lichtstrahl, dessen Licht sie je nach Beschaffenheit unterschiedlich streuen. Außer durch Streuung können die Zellen auch durch vorherige Fluoreszenzfärbungen mit entsprechenden Antikörpern genauer charakterisiert und differenziert werden. Ebenfalls können fluoreszierende DNA-Interkalatoren wie Propidiumiodid (PI) eingesetzt werden. PI wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und besitzt das Absorptionsmaximum bei 617 nm. Durch die interkalierenden Eigenschaften des Farbstoffs kann bei einer entsprechenden Vorbehandlung der Zellen (s.u.) auf den DNA-Gehalt der Zelle geschlossen werden. Im Zuge des Zellzyklus kommt es im Verlauf von G1- über S- und G2-Phase bis zur eigentlichen Mitose zu einer Verdopplung des Chromosomensatzes (s. 1.3.1.1). Dadurch steigt auch die Fluoreszenzintensität von PI an, was sich in einer Rechtsverschiebung des Zellzyklushistogramms darstellt (s. Abb. 4.5). So kann die Anzahl der Zellen bestimmt werden, die sich in den einzelnen Phasen des Zyklus befindet.

Zuerst wurden die Zellen wie in 4.3.2 beschrieben passagiert und gezählt. Die Konzentration wurde auf  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml wurde in eine Petrischale pipettiert und auf 10 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Für jede Kondition wurde ein Triplikat angefertigt. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde ein Serumentzug zur G1-Arretierung durchgeführt (s. 4.3.4). Die Proben wurden danach für 24, 48 oder 72 Stunden restimuliert. Dazu wurde entweder reines Zellkulturmedium verwendet oder TRAM-34  $10 \mu\text{M}$  hinzugefügt.

Zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten wurden die Zellen trypsiniert, wie in 4.3.2 beschrieben. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet suspendiert, in PBS aufgenommen und anschließend wurden die Zellen gezählt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1000 rpm wurde die Zellzahl auf  $10^6/0,5 \text{ ml}$  eingestellt. 0,5 ml dieser Zellsuspension wurden in ein kleines Zentrifugationsröhrchen überführt und durch die Zugabe von 4,5 ml Ethanol 70% (s. 3.4.5) fixiert. Die Proben wurden vor der PI-Färbung 24 Stunden oder länger bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Zellen wurden anschließend bei 300 g für 5 min sedimentiert und der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 5 ml PBS suspendiert, bei 300 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen. Nach dem Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 ml PI-Färbelösung (s. 3.4.5) suspendiert und über einen 70 µm-Filter (s. 3.4.5) in ein Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt. Standardmäßig wurde eine Probe als Negativkontrolle mitgeführt, die in Färbelösung ohne PI suspendiert wurde. Durch das Fehlen von PI treten keine fluoreszenzpositiven Signale in diesen Zellen auf. Dadurch konnte der Bereich der Fluoreszenzintensität ermittelt werden, welcher PI-negative bzw. PI-positive Zellen repräsentiert. PI-negative Zellen konnten im Bereich der Fluoreszenzintensität  $> \log 10^2$  detektiert werden, ein positives PI-Signal findet sich somit erst ab einer Fluoreszenzintensität von  $\log 10^2$ . In der Färbelösung wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann in einem FACSCanto Flow-Zytometer mit der FACSDiva Software analysiert. Die Auswertung wurde mit FlowJo 7.6.1 durchgeführt.



**Abb. 4.5 Ungefärbte und PI-gefärbte Zellen zur Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten Zellzyklusanalyse**

Die Proben wurden zur Einteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt. Standardmäßig wurde eine Probe als Negativkontrolle mitgeführt, die nicht mit PI behandelt wurde. Durch das Fehlen von PI treten keine fluoreszenzpositiven Signale in diesen Zellen auf. Dadurch konnte Bereich der Fluoreszenzintensität ermittelt werden, welcher PI-negative bzw. PI-positive Zellen repräsentiert (A) Ungefärbte Proben zeigen eine unspezifische Fluoreszenzintensität für PI (PI [log FI]) unter  $10^2$ . (B) PI-gefärbte Proben zeigen eine positive Färbung mit einer Fluoreszenzintensität von ca.  $10^2$  bis  $10^3$ . (PI: Propidiumiodid; FI: Fluoreszenzintensität)

## 4.7 Histologische Methoden

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Brusttumore wie in 4.2.2 beschrieben entnommen und anschließend mit einem Skalpell (No.21, s. 3.4.2) auf eine Größe von 7,5 cm x 7,5 cm zurechtgeschnitten. Zur Fixierung wurden die Gewebeproben in PFA 4% in PBS (s. 3.4.6) in einem kleinen Zentrifugationsröhrchen aufgenommen und für drei Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe einmal mit PBS gewaschen. Danach folgte ein Sucrosegradient zur Kryoprotektion des Gewebes: Nach einer Stunde in 5% Saccharose folgte eine Inkubation des Gewebes über Nacht in 10% Saccharose und abschließend für 24 Stunden in 20% Saccharose (s. 3.4.6). Danach wurden die Proben in Aluminiumfolie in Neg-50<sup>TM</sup> Einfriermedium (s. 3.4.6) auf -80 °C für mindestens 24 Stunden eingefroren.

Direkt vor jedem Experiment wurden die Gewebeproben auf Eis kurz aufgetaut und anschließend auf eine Temperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  gebracht. Dann wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von  $10\ \mu\text{m}$  mithilfe des Microm HM 560 (Thermo Fisher Scientific) angefertigt. Die Messertemperatur betrug  $-21^{\circ}\text{C}$ . Jeder Schnitt wurde auf einem Glasobjektträger fixiert. Insgesamt konnten pro Objektträger vier Schnitte aufgenommen werden; auf jedem Objektträger wurden dabei sowohl WT- als auch KO-Schnitte fixiert.

Für die Färbung von Zellen wurden diese wie in 4.3.2 beschrieben zuerst passagiert und gezählt. Für die TUNEL-Färbung (s. 4.7.3) wurde eine Verdünnung mit 50 000 Zellen/100  $\mu\text{l}$  verwendet, für die HE-Färbung (s. 4.7.1) wurde die Suspension auf 100 000 Zellen/100  $\mu\text{l}$  eingestellt. Dann wurden in jedes Loch einer  $\mu$ -Kammer auf einem Glasobjektträger 100  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium vorgelegt und durch 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension ergänzt. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert und im Falle der HE-Färbung (s. 4.7.1) sofort verwendet. Zur Bestimmung der Apoptose mittels TUNEL-Färbung (s. 4.7.3) wurden die Zellen zuerst mittels Serumentzug in der G1-Phase arretiert (s. 4.3.4). Die Zellen wurden dann entweder ohne Restimulation fixiert (s.u.) oder mit Zellkulturmedium für 24, 48 oder 72 Stunden restimuliert. Die Fixierung war für alle Zellproben identisch. Vor und nach der Fixierung der Zellen für 10 min mit 200  $\mu\text{l}$  4% PFA bei Raumtemperatur erfolgten jeweils drei Waschschrte mit 200  $\mu\text{l}$  PBS. Nach der Färbung wurden alle Schnitte und gefärbten Zellen mit einem inversen Mikroskop betrachtet. Die Fotos wurden mit der Farbkamera AxioCam MRc Rev.3 angefertigt, die Auswertung erfolgte mit der Software Axiovision Rel. 4.8.

#### 4.7.1 Hämatoxyllin-Eosin Färbung

Hämatoxyllin färbt saure bzw. basophile Strukturen, insbesondere Zellkern mit DNA und das raue endoplasmatische Retikulum (ER), blau. Eosin hingegen bewirkt eine Rotfärbung basischer bzw. acidophiler Strukturen der Zelle, z.B. von Zellplasmaproteinen oder Mitochondrien. Das Vorgehen war für histologische Schnitte oder fixierte Zellen identisch. Bei den  $\mu$ -Kammern wurde die Gummierung, über welche die einzelnen Kompartimente entstehen, entfernt. Alle Schritte wurden mithilfe von Glasfärbekammern durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

Zuerst wurden die Schnitte mit einem Ethanolgradienten (50%, 70%, 90%, 100%, 90%, 70%, 50% V/V) behandelt. Dazu wurden diese für jeweils 2 min in der jeweiligen Verdünnung inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte mit autoklaviertem, demineralisiertem Wasser. Dann wurden die Objektträger in Hämatoxyllin-Lösung nach Harris (s. 3.4.6) für 5 sec inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten mit Leitungswasser wurden die Objektträger für 30 sec in 0,1%ige  $\text{NH}_3$ -Lösung getaucht. Es folgte ein weiterer Waschschrte für 5 min mit Leitungswasser, bevor die Objektträger für 10 min in Eosin-G-Lösung (s. 3.4.6) inkubiert wurden. Nach fünf Waschschrten mit Leitungswasser wurde die Färbung mit Ethanol 80% für 2 min differenziert. Die Schnitte bzw. Zellen wurden dann durch Inkubation in 100%igem Ethanol für 3 min und in Toluol für 5 min dehydriert. Anschließend wurden die Objektträger mit einem Deckglas (60 mm) und DePeX (s. 3.4.6) eingebettet und für 24 Stunden zum Aushärten bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.7.2 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbungen wurden nur mit Kryoschnitten durchgeführt. Mithilfe von Antikörper-basierten Methoden können Proteine spezifisch detektiert werden. Die Detektion beruht auf der spezifischen Bindung der Primärantikörper an das nachzuweisende Epitop über eine Antigen-

Antikörper-Reaktion. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode basiert auf dem Avidin-Biotin-System. Dazu wird ein biotinylierter Sekundärantikörper eingesetzt, der an den Primärantikörper bindet. Diese Strukturen werden dann mit Avidin-biotinylierten Enzymkomplexen versehen. Avidin zeigt eine hohe Affinität zu Biotin, so dass die Enzymkomplexe an den biotinylierten Sekundärantikörper binden. Über die Enzymkomponente wird dann der gesamte Komplex sichtbar gemacht, indem ein gefärbtes Produkt entsteht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Enzyme verwendet, die alkalische Phosphatase (AP), sowie eine Peroxidase zur DAB-Färbung (Diaminobenzidin).

Zuerst wurden die Schnitte mit dem Fettstift (*ImmEdge Hydrohobic Barrier Pen*, s. 3.4.6) umrandet und dann noch einmal für 15 min in PFA 4% (600 µl pro Schnitt) fixiert. Nach zwei Waschschritten für 5 min mit jeweils 1 ml PBS wurden sie in 1 ml 1%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (s. 3.4.6) für 10 min inkubiert. Drei Waschschriffe mit 1 ml PBS für jeweils 5 min folgten, bevor unspezifische Bindungen durch eine einstündige Inkubation in Blockierungslösung (600 µl pro Schnitt, s. 3.4.6) blockiert wurden. Die Schnitte wurden dann mit dem Primärantikörper (in Blockierungslösung, 600 µl pro Schnitt, s. 3.4.6) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte drei Mal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (in Blockierungslösung, 600 µl pro Schnitt, s. 3.4.6) für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Ab diesem Schritt unterschied sich das Vorgehen für die AP-Färbung und die DAB-Färbung. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen und die verwendete Methode sind in Tabelle 4.8 angegeben.

**Tabelle 4.8 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper zur immunhistochemischen Färbung**

(BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; DAB: Diaminobenzidin; AP: Alkalische Phosphatase)

Primärantikörper			Sekundärantikörper	
Zielstruktur	Verdünnung	Methode	Spezies	Verdünnung
BK	1:400	DAB	Anti-Kaninchen	1:1000
	1:600			
IK	1:750	AP	Anti-Kaninchen	1:1000
	1:1000			

### AP-Färbung

Während der Inkubation mit dem Sekundärantikörper konnte bereits die ABC-AP-Arbeitslösung (s. 3.4.6.1) vorbereitet werden. Diese enthält den Avidin-Biotin-Enzym Komplex und wird für 30 min im Dunkeln vorinkubiert. Anschließend wurden die Schnitte noch drei Mal mit PBS gewaschen und in der ABC-AP-Arbeitslösung (800 µl pro Schnitt) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBS wurden die Schnitte mit dem AP-Substrat (800 µl pro Schnitt, s. 3.4.6.1) im Dunkeln inkubiert. Die Inkubationszeit ist von der enzymatischen Umsetzung des Substrates, der Gewebeart, Zielstruktur und den Antikörpern abhängig und beträgt in der Regel 10-20 min, sollte jedoch nicht länger als 45 min erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Blaufärbung i.d.R. nach ca. 15 min detektiert werden. Die Färbung wurde daraufhin für 5 min mit Leitungswasser gestoppt. Danach wurde ein Deckglas (60 mm) mit Aquatex<sup>®</sup> (s. 3.4.6.1) beschichtet und auf den Objektträger gelegt. Dieser wurde über Nacht bei 4°C zum Aushärten gelagert.

### DAB-Färbung

Während der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde das ABC-Reagenz vorbereitet (s. 3.4.6.2) und für 30 min im Dunkeln vorinkubiert. Die Schnitte wurden dann für 30 min in 800 µl ABC-Reagenz im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Schnitte einmal kurz und drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 800 µl DAB-Substrat-Lösung (s. 3.4.6.2) auf die Objektträger pipettiert und die Schnitte bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert. Die Farbentwicklung wurde i.d.R. nach 6–8 min beendet und sollte für eine spezifische Färbung generell nicht länger als 10 min erfolgen. Die Färbung wurde durch Waschen der Schnitte mit Leitungswasser gestoppt. Zur Dehydration wurden die Schnitte dann für 5 min in Ethanol 80% (V/V), für 5 min in Ethanol 100% und für 5 min in Toluol inkubiert. Anschließend wurde ein Deckglas (60 mm) mit Eindeckmedium DePeX (s. 3.4.6) auf dem Objektträger fixiert und dieser über Nacht zum Aushärten bei 4°C gelagert.

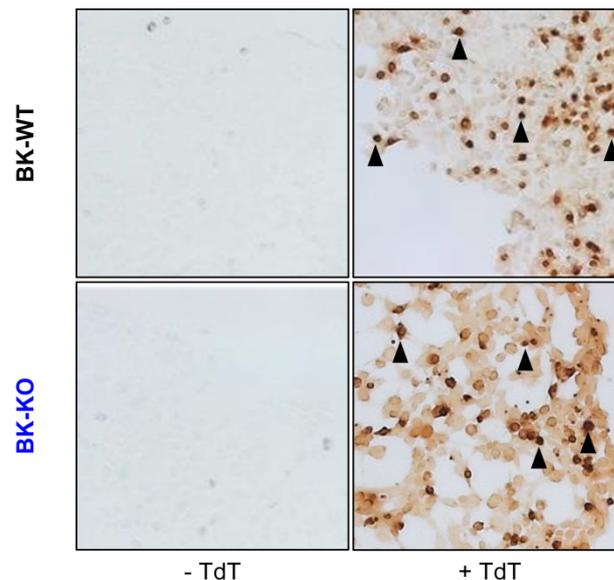
### 4.7.3 Apoptose-Detektion mit TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung (*TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling*) ist eine Möglichkeit, apoptotische Zellkerne zu detektieren. Die Methode basiert darauf, dass im Zuge der Apoptose die DNA fragmentiert wird, wodurch freie 3'OH-Enden an den Bruchenden zugänglich werden. An diese können mithilfe des Enzyms *terminal desoxynucleotidyl transferase* (TdT) markierte Nukleotide gekoppelt werden. Diese Nukleotide sind mit Digoxigenin markiert und können in der Folge mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper einen entsprechenden Komplex bilden. Der Antikörper wiederum ist an ein Peroxidase-Reportermolekül konjugiert, welche einen Farbstoff nach Zugabe umsetzen kann, so dass die DNA-Fragmente sichtbar werden.

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht und zu den entsprechenden Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden fixiert. Für jedes Experiment wurde ebenfalls eine Positivkontrolle angefertigt. Dazu wurden die Zellen vor der Fixierung mit DN-Puffer DTT (200 µl pro Loch, s. 3.4.6.3) für 5 min bei Raumtemperatur vorbehandelt. Dann wurden die Zellen in DNase-Lösung (s. 3.4.6.3) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (100 µl pro Loch). Es folgten fünf Waschschrte mit PBS (200 µl pro Loch) und anschließend die Fixierung mit PFA 4% (s.o.).

Zur Färbung wurde das *ApopTag<sup>®</sup> Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* verwendet (s. 3.4.6.3). Alle verwendeten Lösungen wurden auf Eis aufgetaut und während der Verwendung auf Eis gelagert. Nach der Fixierung (s.o.) wurden die Zellen zur Permeabilisierung in Ethanol-Essigsäure (s. 3.4.6.3) für 5 min bei -20°C inkubiert (200 µl pro Loch) und dann zwei Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Die endogene Peroxidase wurde dann durch eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (s. 3.4.6.3) (200 µl pro Loch) inaktiviert. Erneut wurden die Zellen dann zwei Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Dann wurde für 10 sec 75 µl Equilibrierungspuffer pro Loch bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach der Equilibrierung wurde der Puffer abgenommen und es wurden sofort 55 µl TdT-Lösung (s. 3.4.6.3) bzw. als Negativkontrolle Wasser pro Loch hinzugegeben. Die Zellen wurden damit für eine Stunde bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Dann wurde die Lösung abgenommen und die Zellen wurden mit 200 µl Stop/Waschpuffer (s. 3.4.6.3) pro Loch für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Anti-Digoxigenin Peroxidase Konjugat (s. 3.4.6.3) auf Raumtemperatur erwärmt. Die Zellen wurden anschließend drei Mal für jeweils 1 min mit 200 µl PBS gewaschen. Daraufhin wurden 65 µl des Anti-Digoxigenin Peroxidase Konjugats in jedes Loch pipettiert und die Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Es folgen vier Waschschrte mit 200 µl PBS. Zur Farbentwicklung

wurden dann pro Loch 75  $\mu\text{l}$  Peroxidase-Substrat (s. 3.4.6.3) hinzugegeben und die Zellen wurden dann im Dunkeln in einer Färbekammer gelagert. Nach etwa 10 min war eine Braunfärbung zu beobachten. Generell sollte die Inkubation mit dem Peroxidase Substrat nicht länger als 20 min erfolgen. Zum Stoppen der Färbung wurden die Zellen dreimal mit autoklaviertem, demineralisiertem Wasser ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) gewaschen und dann für 5 min bei Raumtemperatur in  $\text{dH}_2\text{O}$  inkubiert. Das Wasser wurde abgenommen, die Gummierung entfernt und der Objektträger mit einem mit Aquatex<sup>®</sup> beschichteten Deckgläschen eingebettet. Die Objektträger wurden über Nacht zur Aushärtung bei 4°C gelagert.



**Abb. 4.6 TUNEL-Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellkerne von MMTV-PyMT Brusttumorzellen**

Die Zellen wurden wie in 4.7.3 beschrieben behandelt. Im Zuge der Apoptose wird die DNA fragmentiert, so dass 3'-OH-Enden frei zugänglich werden. Diese können mithilfe des Enzyms TdT mit Digoxigenin-markierten Nukleotiden markiert werden, welche mit einem spezifischen Anti-Digoxigenin-Antikörper einen braunen Komplex bilden können. In der linken Spalte sind die Negativkontrollen für die beiden Genotypen BK-WT und BK-KO gezeigt, welche ohne das Enzym durchgeführt wurden. Erwartungsgemäß konnte in diesen Proben keine Braunfärbung detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten durch die Zugabe von DNase als Positivkontrolle (rechte Spalte) in beiden Genotypen braune Zellkerne detektiert werden. Ausgewählte Kerne sind durch schwarze Pfeilspitzen gekennzeichnet. (BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout; TdT: *terminal deoxynucleotidyl transferase*; TUNEL: *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*; MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*; DNA: Desoxyribonukleinsäure)

## 4.8 Biochemische Methoden

### 4.8.1 Lyse der Zellen für Proteingewinnung

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben trypsinisiert und gezählt. Pro Kondition wurden 15–20  $\times 10^6$  Zellen auf einer Zellkulturflasche (175  $\text{cm}^2$ ) ausgebracht. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in der G1-Phase arretiert (s. 4.3.4). Es erfolgte die Restimulation für 0,5 bzw. 1,5 Stunden. Eine Probe wurde unstimuliert belassen (0 h). Die Proben wurden dann zuerst trypsinisiert und nach Protokoll zentrifugiert (s. 4.3.2). Das Pellet wurde suspendiert und in 5 ml PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in ein kleines Zentrifugationsröhrchen überführt und erneut bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde dann in Lysepuffer L (s. 3.4.7.1) aufgenommen und mit einer Pipette suspendiert. Das Volumen des Puffers

hing dabei von der Größe des Pellets ab: Ein etwa 2 mm hohes Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer L aufgenommen, suspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) transferiert. Nun erfolgte die Lyse für 30 min auf Eis. Die Proben wurden im Anschluss für 15 min bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Anschließend wurde der Proteingehalt der Probe mit der Bradford-Methode bestimmt (s. 4.8.4.1) und die Proben wurden auf dieselbe Konzentration eingestellt.

#### 4.8.2 Membranpräparation

Membranständige Proteine wie Ionenkanäle bedürfen einer besonderen Aufreinigung, um über biochemische Methoden detektiert zu werden. Sie können über spezifische Membranpräparationen angereichert werden.

Die Tumorproben wurden wie in 4.2.2 beschrieben entnommen und kurz in eiskaltem PBS gewaschen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zuerst wurde das Gewebe in ein Rundbodenröhrchen überführt und in Lysepuffer P (s. 3.4.7.1) mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Pro 100 mg Gewebe wurden 1,2 ml Puffer eingesetzt. Die Suspension wurde dann für mindestens 20 min bei -80°C eingefroren und im Anschluss auf Eis wieder aufgetaut. Mit einem Glas-Teflon-Potter (s. 3.4.7) wurde die Suspension dann homogenisiert. Danach wurden pro 1 ml Suspension 5 ml Saccharosepuffer (s. 3.4.7.1) hinzugegeben. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 1000 g für 20 min. Der Überstand wurde abgenommen, in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und die Proben wurden bei 13 000 rpm und 4°C für 20 min in einer Ultrazentrifuge (SS34) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Saccharosepuffer suspendiert. Danach wurden Zentrifugationsröhrchen und Glas-Teflon-Potter jeweils mit 100–200 µl Saccharosepuffer gespült und die Suspension erneut mit dem Glas-Teflon-Potter homogenisiert. Dann wurde die Proteinkonzentration mithilfe der Bradford-Methode (s. 4.8.4.1) bestimmt und die Konzentrationen der einzelnen Proben wurden angeglichen. Die Proben wurden dann im Idealfall sofort verwendet oder maximal über Nacht bei -80°C gelagert.

#### 4.8.3 Mitochondrien-Isolation

Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ist ein wichtiger Schritt bei der Apoptose (s. 1.3.1.2). Ein möglicher Einfluss der IK-Kanalaktivität auf die Apoptose wurde daher durch eine Isolation der Mitochondrien und anschließender Detektion von Cytochrom C in der cytosolischen Fraktion mittels SDS-Gelelektrophorese (s. 4.8.5) und Western Blot (s. 4.8.6) untersucht.

Die Zellen wurden trypsiniert, gezählt (s. 4.3.2) und  $5 \times 10^6$  Zellen wurden pro Petrischale (55 cm<sup>2</sup>) ausgebracht. Für jede Kondition wurden insgesamt zehn Petrischalen benötigt. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit TRAM-34 10 µM oder Vehikel behandelt. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit Staurosporin (STS) 1 µM mitgeführt. Diese Substanz löst bekanntermaßen die Apoptose über eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien aus.<sup>219,329</sup> Die STS Behandlungsdauer war auf vier Stunden limitiert, wohingegen TRAM-34 behandelte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (4, 24 und 48 h) untersucht wurden.

Die Zellen wurden dann mit einmal mit PBS gewaschen und nach Protokoll trypsiniert (s. 4.3.2). Währenddessen wurde für jede Kondition ein großes Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml Zellkulturmedium bereitgestellt. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 2 ml Zellkulturmedium pro Petrischale verwendet und die Zellsuspension in das bereitgestellte große Zentrifugationsröhrchen mit

Zellkulturmedium überführt. Jede Petrischale wurde noch zwei Mal mit 2 ml Zellkulturmedium gewaschen, um die Aufnahme aller Zellen zu ermöglichen. Medium, welches nicht mit der Stripette abgenommen werden konnte, wurde zusätzlich mit einer Pipette (1000 µl) abgenommen und ebenfalls in das entsprechende Zentrifugationsröhrchen pipettiert. Die Proben wurden dann bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde zwei Mal mit eiskaltem  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -PBS (s. 3.4.7.1) gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten nun auf Eis. Das Zellpellet wurde in der fünffachen Menge an Isolationspuffer (s. 3.4.7.1) aufgenommen.

Für die Homogenisierung wurde eine Kombination aus manueller Homogenisierung für 30 sec und elektrischer Homogenisierung mit einem Laborrührwerk (s. 3.2) für 30 sec gewählt, da dies zu einer bestmöglichen Trennung der mitochondrialen und cytosolischen Fraktion führte. Die Proben wurden dann in eiskalte Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und anschließend für die Aufreinigung der Mitochondrien verschiedenen Zentrifugationsschritten unterzogen. Durch die 10-minütige Zentrifugation bei 1000 g und 4°C konnten Zellkerne und Zelltrümmer abgetrennt werden. Sowohl die mitochondriale als auch die cytosolische Fraktion waren nach diesem Schritt im Überstand enthalten, der vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) transferiert wurde. Die Proben wurden dann für 15 min bei 14 000 g und 4°C zentrifugiert. Die mitochondriale Fraktion war nun als kleines Pellet sichtbar. Der Überstand mit der cytosolischen Fraktion wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Das Pellet mit den Mitochondrien wurde dann zwei Mal mit 250 µl Isolationspuffer über einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 14 000 rpm für 4 min bei 4°C gewaschen und letztlich in 25 µl Isolationspuffer gelöst. Anschließend wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben (beide Fraktionen) nach der Lowry-Methode bestimmt (s. 4.8.4.2). Cytosolische Proben wurden so eingestellt, dass später 40 µg Proteinmenge aufgetragen werden konnten. Für mitochondriale Proben wurde die Konzentration so adaptiert, dass 30 µg aufgetragen werden konnten.

#### **4.8.4 Proteinbestimmung**

##### **4.8.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bradford-Methode ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen.<sup>330</sup> 5 µl Probe werden mit 95 µl demineralisiertem Wasser direkt in einer Küvette verdünnt und anschließend für 5 min mit 1 ml Bradford-Lösung bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Lösung enthält unter anderem den Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250, der in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Die unkomplexierte Form des Farbstoffs ist rot und besitzt ein Absorptionsmaximum von 470 nm. Komplexiert der Farbstoff Proteine, wird er in einer blauen, unprotonierten Sulfonatform stabilisiert, wodurch sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption kann folglich bei 595 nm photometrisch gemessen werden und somit auf die Proteinkonzentration geschlossen werden. Hierzu muss lediglich eine Kalibriergerade mit Lösungen bekannter Proteinkonzentration angefertigt und gemessen werden, über welche dann der Proteingehalt der Proben bestimmt werden kann.

Jede Probe wurde insgesamt drei Mal gemessen und anschließend der Mittelwert bestimmt. Grundsätzlich wurden alle Konzentrationen immer auf den Wert der Probe eingestellt, für welche der niedrigste Wert ermittelt wurde.

#### 4.8.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Proben, die im Zuge der Mitochondrienisolation generiert wurden, wurde eine alternative Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes genutzt, da diese eine noch höhere Sensitivität aufwies. Die sogenannte Lowry-Methode<sup>331,332</sup> beruht auf zwei Reaktionen: Zuerst bildet sich auf Basis der Biuret-Reaktion durch die Bindung von Proteinen an  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung ein blauvioletter, quadratisch-planarer Komplex. Im zweiten Schritt wird dann  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, wodurch das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz, bei dem es sich um eine Mischung aus Molybdätophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure handelt, zu Molybdänblau reduziert. Die dadurch entstehende blaue Farbe kann zur Bestimmung der Proteinkonzentration photometrisch gemessen werden.

Die Proteinbestimmung wurde mit *Total Protein Kit*, *Micro-Lowry*, *Peterson's Modification* (s. 3.4.7.1) durchgeführt. Dieses enthält das Lowry-Reagenz als Pulver, Desoxycholat-Lösung (DOC), Trichloressigsäure-Lösung (TCA), das *Folin & Ciocalteu's* Phenolreagenz und den BSA-Proteinstandard. Die Substanzen wurden nach Anleitung in der Produktbeschreibung bearbeitet. Die dort benannte Folin & Ciocalteu's Phenolreagenz-Arbeitslösung wird im Folgenden als Folin-Reagenz bezeichnet. Zuerst wurde eine BSA-Standardreihe hergestellt (s. Tabelle 4.9), mit der im Anschluss eine Regressionsgerade als Referenz erstellt wurde. 5  $\mu\text{l}$  der mitochondrialen Fraktion wurden dann mit 20  $\mu\text{l}$  Lysepuffer M mit Triton X-100 verdünnt (s. 3.4.7.1). Triton X-100 bewirkt eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Die cytosolische Fraktion wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt (5  $\mu\text{l}$  in 45  $\mu\text{l}$  Lysepuffer M). Die Verdünnungen wurden gut gemischt und anschließend in 500  $\mu\text{l}$  demineralisiertem Wasser verdünnt. Die BSA-Standards (s. Tabelle 4.9) und Proben wurden anschließend mit 500  $\mu\text{l}$  Lowry-Reagenz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden pro Probe 250  $\mu\text{l}$  Folin-Reagenz hinzugefügt und die Proben für 30 min inkubiert. Zuerst wurden dann die BSA-Standards als Triplikate mit dem Photometer gemessen, um die Standardkurve zu berechnen. Die Proben wurden dann ebenfalls gemessen und im Verhältnis zur BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration errechnet. Für die finale Konzentration wurde dann zusätzlich noch der Verdünnungsfaktor 1:100 herausgerechnet.

**Tabelle 4.9 Pipettierschema für die BSA-Standardkurve zur Proteinbestimmung nach Lowry**  
(BSA: Bovines Serumalbumin)

BSA-Standardlösung [ $\mu\text{l}$ ]	Wasser [ $\mu\text{l}$ ]	Proteinkonzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
31,25	968,75	12,5
62,5	937,5	25
125	875	50
250	750	100
500	500	200

#### 4.8.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe und Ladung in einem elektrischen Feld. Die zu analysierenden Proteine bilden mit Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) negativ geladene Komplexe, die ein konstantes Verhältnis zwischen Ladung und Masse aufweisen. Außerdem bewirkt SDS eine Denaturierung der Proteine und unterbindet Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und somit die Bildung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Das verwendete Gel ist eine Polyacrylamidmatrix mit definierter Porengröße, in der die Protein-SDS-Komplexe dann durch ein elektrisches Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Die Gele wurden entweder am Vortag oder direkt am Versuchstag hergestellt. Dazu wurde eine Gelgießapparatur zusammengesetzt, welche aus zwei Glasplatten besteht, die in einem Plastikkonstrukt zusammengehalten werden. Zwischen den Glasplatten bleibt ein Spalt bestehen. Auf einen Halter wurden Gummimatten gelegt und das Glasplattenkonstrukt auf die Matten gestellt und in einer entsprechenden Halterung befestigt. In dieser Apparatur konnte nun das Gel hergestellt werden. Zuerst wurde ein Trenngel (s. 3.4.7.2) in einem Becherglas hergestellt. Die Radikalstarter wurden erst kurz davor hinzugegeben und die Mischung danach zügig zwischen die Glasplatten mit einer Stripette pipettiert, so dass etwa 75% der Höhe gefüllt waren. Die Dichte des Trenngels richtete sich dabei nach der Größe der zu untersuchenden Proteine. Für kleinere Proteine wurde ein dichteres, höherprozentiges Trenngel hergestellt, während größere Proteine über ein niedrigprozentiges Trenngel aufgetrennt wurden. Nach Pipettieren der Mischung wurde zusätzlich noch Isopropanol 100% über die Mischung zwischen die Glasplatten pipettiert, um glatte einheitliche Linie des Gels zu erhalten. Außerdem verhindert dies, dass Radikale, die den Gelpuffern zur Polymerisierung zugesetzt werden, durch Luftsauerstoff abgefangen werden können. Nach ca. einer Stunde war das Gel auspolymerisiert und der Isopropanol wurde vollständig abgenommen. Nun wurde die Mischung für das Sammelgel hergestellt (s. 3.4.7.2), das für alle Experimente identisch war. Die Mischung wurde direkt auf das Trenngel pipettiert und es wurde sofort ein Kamm eingesetzt, damit bei der Polymerisierung Taschen entstanden, in die später die Proben pipettiert werden konnten. Auch für das Sammelgel betrug die Zeit zur Auspolymerisierung etwa eine Stunde. Wurden die Gele nicht direkt verwendet, wurden sie bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, wobei die Gele konstant feuchtgehalten werden mussten.

Die Proben wurden wie zuvor beschrieben in Abhängigkeit des Versuchsvorhabens aufbereitet. Das Vorgehen bei der SDS-Gelelektrophorese war prinzipiell für alle Versuchsansätze identisch. Zuerst wurden alle Proben mit 4 x Laemmli versehen (s. 3.4.7.2) und für 10 min bei 95°C in einem Thermoschüttler bei 500 rpm inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erzielen.

Währenddessen wurden die Glasplatten mit den Gelen mit demineralisiertem Wasser kurz gewaschen und der Kamm vorsichtig entfernt. Dann wurden die Platten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, die aus einem äußeren Plastikgehäuse und aus einem inneren Teil mit Elektroden besteht. Die Platten wurden im inneren Teil fixiert und dieser mit 1 x Elphor (s. 3.4.7.2) bis zum Rand gefüllt. Anschließend wurde dieser in das Plastikgehäuse eingesetzt und dieses ebenfalls mit 1 x Elphor gefüllt, so dass der elektrodenverbindende Draht Kontakt zur Flüssigkeit hatte.

In die äußeren Taschen wurden nun 12 µl des Proteinmarker (s. 3.4.7.2) aufgetragen und in die weiteren Taschen die Proben mit einem Volumen von 25 µl. Für die Proben wurde dazu eine Hamilton-Spritze benutzt. Waren nicht alle Taschen mit Proben zu füllen, wurden in diese 1 x Laemmli (20 µl pro Tasche) pipettiert, um eine gerade Lauffront zu erhalten. Nun wurde an die

Elektrophoreseapparatur eine Stromquelle angeschlossen, an der für den Einlauf der Proben in das Sammelgel eine Spannung von 80 V angelegt wurde. Sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis eine ausreichende Auftrennung der Proteine anhand des Markers, der farbstoffmarkierte Proteine einer definierten Größe enthält, erkennbar war. Die Stromquelle wurde dann ausgeschaltet und der Einsatz aus der Kammer entnommen. Die Glasplatten mit dem Gel wurden vorsichtig mit demineralisiertem Wasser abgespült und eine der Platten vorsichtig angehoben und entfernt. Durch weiteres vorsichtiges Spülen konnte das Gel von der unteren Glasplatte gelöst und auf die Membran für den Western Blot übertragen werden (s. u.).

#### 4.8.6 Western Blot

Durch den Western Blot werden Proteine durch Elektrophorese von einem Gel auf eine Membran übertragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hydrophobe Membranen aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) verwendet, an welche die Proteine durch den angelegten Strom über hydrophobe Wechselwirkungen binden. Die Membran wird anschließend in verschiedenen Antikörperlösungen inkubiert, wodurch die zuvor per Gelelektrophorese (s. 4.8.5) aufgetrennten Proteine detektiert werden können.

Nach der Gelelektrophorese (s.o.) wurden Filterpapiere und eine PVDF-Membran vorbereitet. Fünf Filterpapiere wurden mit Anode 1-Puffer, drei mit Anode 2-Puffer und weitere fünf mit Kathodenpuffer getränkt. Die Membran wurde kurz mit Methanol befeuchtet und vor dem Auflegen kurz in Anode 2-Puffer getaucht. Danach erfolgte folgende Anordnung: Filterpapiere mit Anode 1-Puffer, Filterpapiere mit Anode 2-Puffer, Membran, Gel, Filterpapiere mit Kathodenpuffer. Pro Membran wurde für eine Stunde eine Stromstärke von 80 mA angelegt, die dann für 15 min auf 150 mA erhöht wurde. Wurden zwei Membranen gleichzeitig in einer Kammer geblottet, musste die Stromstärke entsprechend verdoppelt werden.

Die Membran wurde dann für eine Stunde in Milchpuffer 5% (s. 3.4.7.3) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dies und alle Waschschrte wurden auf einem Schüttelgerät bei 60 Umdrehungen pro min durchgeführt und die Schälchen mit Alufolie abgedeckt. Anschließend erfolgten drei Waschschrte für jeweils 10 min in 1 x TBST (s. 3.4.7.3). Danach wurde die Membran in ein großes Zentrifugationsröhrchen transferiert. Dieses enthielt den Primärantikörper gegen das Zielprotein (s. Tabelle 4.10) in Antikörperblockierungslösung (s. 3.4.7.3). Die Inkubation der Membranen mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Rotor.

Am Folgetag wurde die Membran erneut drei Mal mit 1 x TBST für 10 min gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem geeigneten fluorophorgekoppeltem Sekundärantikörper (in 1 x TBST) (s. Tabelle 4.10) für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Rotor. Im Anschluss wurde die Membran noch drei Mal mit 1 x TBST für je 10 min gewaschen und dann zwischen Präzisionswischtüchern getrocknet. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ETTAN DIGE Imager. Die Auswertung und Quantifizierung der Proteinmenge wurden mit ImageQuant TL 7.0 durchgeführt.

**Tabelle 4.10 Konzentrationen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Western Blot-Analyse**

<b>Primärantikörper</b> (in Antikörperverdünnungslösung)			
<b>Antikörper/Zielprotein</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Größe [kDa]</b>
$\alpha$ -Tubulin	1:1000	Maus	52
CaMKII	1:200	Kaninchen	50, 60
Caspase 3	1:1000	Kaninchen	17, 19, 35
Cleaved Caspase 3	1:1000	Kaninchen	17, 19
COX IV	1:1000	Kaninchen	17
Cytochrom C	1:200	Kaninchen	14
GAPDH	1:1000	Kaninchen	37
HSP 60	1:200	Kaninchen	60
Phospho-CaMKII	1:200	Kaninchen	50
Zyxin	1:200	Kaninchen	82
<b>Sekundärantikörper</b> (in 1 x TBST)			
<b>Antikörper</b>	<b>Fluorophor/Kanal</b>	<b>Verdünnung</b>	
Anti-Kaninchen	Cy5	1:2000	
Anti-Kaninchen	Cy3	1:2000	
Anti-Maus	Cy5	1:2000	

#### 4.9 Lebendzellbeobachtung von $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen

Intrazelluläre Calciumsignale wurden mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2-Acetoxymethylester (FURA-2-AM) detektiert. Durch die Veresterung kann FURA-2-AM die Zellmembran passiv passieren und wird intrazellulär durch Esterasen sofort in die eigentlich bindungsfähige Form FURA-2 gespalten. FURA-2 komplexiert  $Ca^{2+}$ -Ionen in einem 1:1-Verhältnis, wodurch sich die benötigte Anregungswelle von 380 nm auf 340 nm für das Extinktionsmaximum des Indikators verschiebt. Dies kann zur Bestimmung der relativen  $[Ca^{2+}]_i$  bzw. Konzentrationsänderung verwendet werden. Das Verhältnis der Emissionsraten nach Anregung bei 340 nm (FURA-2- $Ca^{2+}$  Komplex) und 380 nm (freies FURA-2) (FL 340/380) entspricht dieser Konzentration.<sup>333</sup>

Es wurden zwei verschiedene Versuchsaufbauten gewählt, die als akute und spontane Calciumsignale definiert sind (s.u.). Für beide Experimenttypen wurden die Zellen zuerst wie in beschrieben trypsinisiert und gezählt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit Zellkulturmedium auf 80 000/1 ml eingestellt. 1 ml Zellkulturmedium wurde in ein Calciummessschälchen (s. 3.4.8) vorgelegt und durch 1 ml Zellsuspension ergänzt. Die Proben wurden nun entweder am Folgetag für die akuten Messungen einem Serumentzug (s. 4.3.4) unterzogen oder für spontane Messungen über verschiedene Zeiträume kultiviert und dann gemessen (s. 4.9.1 und 4.9.2).

Für beide Experimente wurde die identische Messapparatur verwendet. Es wurden lediglich verschiedene Puffer verwendet. Die Messapparatur besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop mit einem 20x Objektiv, an das eine Kamera (Spot Inside, s. 3.2) angeschlossen ist, welche über die Software VisiView für die jeweilige Anregungswellenlänge (340 nm bzw. 380 nm) während der Messung alle zwei Sekunden ein Bild anfertigt.

Die Messapparatur erlaubte die Applikation verschiedener Puffer (s. 3.4.8). So konnte beispielsweise der Einfluss von TRAM-34 auf  $[Ca^{2+}]_i$  sowie auf transiente  $Ca^{2+}$ -Oszillationen getestet werden. Die Puffer wurden generell auf 37°C erwärmt und über einen Schlauch in einen Plastikring geleitet, der direkt in das Messschälchen gesetzt werden konnte. Eine Pumpe zog überschüssigen Puffer ab. Im Vorfeld wurden die Schläuche mit dem jeweiligen Puffer gut durchspült.

Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Bildersequenz. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen für jede Anregungswellenlänge (340 bzw. 380 nm) für jeden Messzeitpunkt mit der Software ImageJ 1.46 ermittelt. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (FL ratio 340/380) wurde im Anschluss über die Messzeit aufgetragen.

#### 4.9.1 Akute Calciumsignale

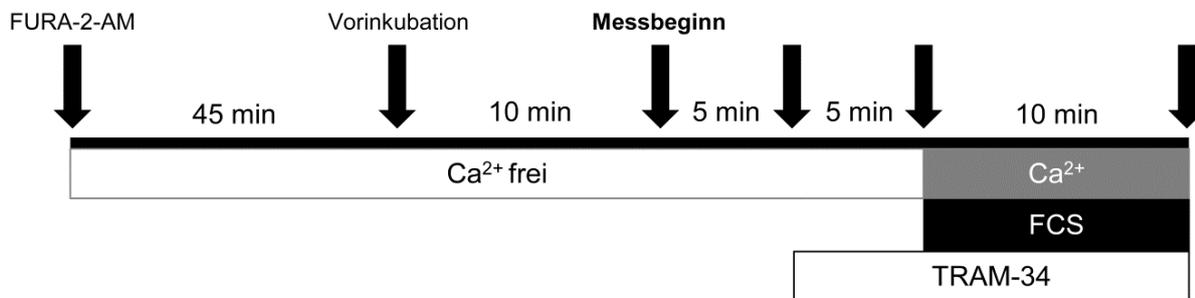
Nach dem Serumentzug (s. 4.3.4) wurden die Zellen mit 2 ml Inkubationspuffer gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Inkubationspuffer und 2,5 µl FURA-2-AM wurden die Zellen für 45 min im Brutschrank inkubiert, um eine Aufnahme von FURA-2-AM in die Zellen zu gewährleisten.

Währenddessen wurde die Messapparatur vorbereitet und die Schläuche mit den Puffern durchspült (s. auch Abb. 4.7). Auf das Objektiv wurde ein Tropfen Immersionsöl pipettiert (s. 3.4.8). Das Messschälchen wurde dann in die Messapparatur eingespannt und der Ring in das Schälchen eingesetzt, so dass die Proben mit Puffer durchspült wurden. In den ersten zehn Minuten wurden alle Proben mit Inkubationspuffer gespült, um überschüssiges FURA-2-AM zu entfernen und die Zellen an die Umgebungsbedingungen zu gewöhnen. Danach begann die eigentliche Mess- und Dokumentationsphase. Zuerst wurden die Zellen unter dem Einfluss des Inkubationspuffers (ohne TRAM-34) beobachtet. In Abhängigkeit des Experiments (s. Abb. 4.7) erfolgte dies für 5 oder 10 min. Wurde lediglich ein Pufferwechsel von Inkubationspuffer auf Calciumpuffer 1,8 mM oder Serumpuffer (s. 3.4.8) durchgeführt, erfolgte dieser Wechsel nach 10 min. Das Messintervall nach dem Pufferwechsel betrug ebenfalls 10 min. Wurde der Einfluss von TRAM-34 untersucht, wurde dieses bereits nach 5 min Messzeit in Inkubationspuffer zugeführt. Dadurch wurden die Kanäle abgesättigt.<sup>89</sup> Erneut nach 5 min erfolgte dann der Wechsel auf Serumpuffer (mit Inhibitor) für weitere 10 min. Somit ergab sich für alle Ansätze eine Gesamtmesszeit von 20 min, in der insgesamt 600 Bilder für jede Anregungswellenlänge erstellt wurden.

#### 4.9.2 Spontane Calciumsignale

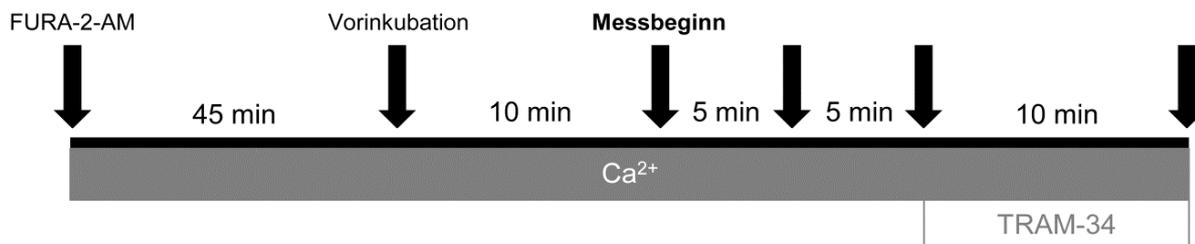
Für spontane Calciumsignale wurden die Zellen ohne vorherigen Serumentzug für 24, 48 oder 72 Stunden kultiviert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Zellen einmal mit 2 ml Calciumpuffer 1,8 mM (s. 3.4.8) gewaschen. Dann wurden die Zellen für 45 min in 1 ml Calciumpuffer 1,8 mM mit 2,5 µl FURA-2-AM im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurde die Messapparatur wie in 4.9 beschrieben vorbereitet. Die Zellen wurden dann in die Apparatur eingespannt und für 10 min mit Calciumpuffer 1,8 mM superfundiert, um überschüssiges FURA-2-AM zu entfernen (s. Abb. 4.8). Dann wurde die Messung gestartet: Es wurde zuerst  $Ca^{2+}$ -haltiger Inkubationspuffer zugeführt. Nach

10 min wurde der Puffer entweder beibehalten oder auf  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Inkubationspuffer mit TRAM-34  $10 \mu\text{M}$  gewechselt. Unabhängig von der Vorbehandlung wurde ein Pufferwechsel durchgeführt, um Einflüsse des Wechsels auf die Oszillationen generell besser beurteilen zu können. Wie bei den akuten Signalen ergab sich dadurch auch hier eine Gesamtmesszeit von 20 min mit insgesamt 600 Bildern für jede Anregungswellenlänge.



**Abb. 4.7 Zeitverlauf der Messung akuter Calciumsignale**

Die Zellen wurden trypsiniert und nach 24 Stunden arretiert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit FURA-2-AM für 45 min bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert und anschließend in die Messapparatur eingespannt. Nach einer 10-minütigen Vorinkubation zum Auswaschen überschüssigen FURA-2-AM wurde die Messung gestartet und die Puffer gemäß der Versuchsanordnung superfundiert. Genauer im Fließtext. (FURA-2-AM: FURA-2-Acetoxy-methylester; min: Minute; FCS: Fetales Kälberserum; TRAM-34: Triarylmethan-34).



**Abb. 4.8 Zeitverlauf der Messung spontaner Calciumsignale**

Die Zellen wurden trypsiniert und für 24, 48 oder 72 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden dann mit FURA-2-AM für 45 min bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert und anschließend in die Messapparatur eingespannt. Nach einer 10-minütigen Vorinkubation zum Auswaschen überschüssigen FURA-2-AM wurde die Messung gestartet und die Puffer gemäß der Versuchsanordnung superfundiert. Genauer im Fließtext. (FURA-2-AM: FURA-2-Acetoxy-methylester; min: Minute; FCS: Fetales Kälberserum; TRAM-34: Triarylmethan-34).

## 4.10 Statistik

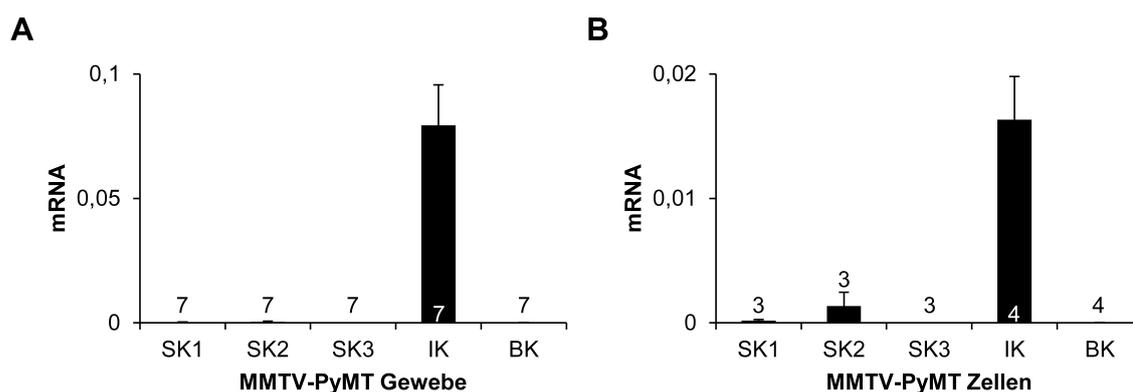
Statistische Methoden wurden mithilfe von Microsoft Excel, der InStat Software sowie GraphPad QuickCalc durchgeführt. Die jeweiligen Tests sind bei den entsprechenden Ergebnissen gekennzeichnet.

In den Ergebnisdigrammen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. P-Werte  $< 0,05$  gelten als signifikant,  $< 0,01$  als hochsignifikant und  $< 0,001$  als höchstsignifikant und sind in den Diagrammen mit Sternen (\*), Rauten (#) oder Paragraphen (§) gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Nicht-signifikante Unterschiede sind nicht besonders gekennzeichnet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Expressionsanalyse Calcium-aktivierter Kaliumkanäle in murinen Brusttumorzellen und -gewebe

Zunächst wurde die Expression der  $K_{Ca}$ -Kanalfamilie in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe und -zellen mittels qRT-PCR (s. 4.5) untersucht. In MMTV-PyMT Brusttumorgewebe (s. Abb. 5.1 A) wurde das höchste mRNA-Level für IK gemessen, während die Abundanz der BK mRNA sowie der SK1-3 mRNA 200-2500-fach niedriger ausfällt. In MMTV-PyMT Brusttumorzellen konnte eine ähnliche Verteilung der relativen Expression beobachtet werden (s. Abb. 5.1 B). SK1 und SK3 mRNA sind kaum nachweisbar, wohingegen die SK2 mRNA-Spiegel deutlich höher lagen. Auch in Brusttumorzellen konnte das höchste Expressionslevel für IK ermittelt werden. BK-Kanal mRNA wird hingegen nur zu einem geringen Ausmaß exprimiert. MMTV-PyMT Brusttumorgewebe sowie -zellen sind folglich IK positiv, während andere Subtypen der  $K_{Ca}$ -Kanalfamilie nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert werden.



**Abb. 5.1 mRNA-Expression von  $K_{Ca}$ -Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen und -gewebe**

Die Expression der  $K_{Ca}$ -Subtypen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen und -gewebe wurde mittels qRT-PCR (s. 4.5) untersucht. Die Probengewinnung und Aufreinigung der Gewebe ist in den Kapiteln 4.2.2 und 4.3.1 beschrieben. Alle mRNA-Spiegel wurden auf den internen Standard  $\beta$ -Actin normiert. **(A)** In MMTV-PyMT Brusttumorgewebe lässt sich die mRNA aller  $K_{Ca}$ -Subtypen nachweisen, allerdings in einem unterschiedlichen Ausmaß. Dabei wurden für die IK mRNA die höchsten Level ( $0,0794 \pm 0,0163$ ) und entsprechend niedrigere Level für BK ( $0,0051 \times 10^{-2} \pm 3,624 \times 10^{-5}$ ) sowie für SK1-3 (SK1:  $0,0003 \pm 0,0001$ ; SK2:  $0,0004 \pm 0,0003$ ; SK3:  $0,0033 \times 10^{-2} \pm 0,0013 \times 10^{-2}$ ) ermittelt. **(B)** In MMTV-PyMT Brusttumorzellen lässt sich eine ähnliche Verteilung der relativen Expression beobachten. So weisen die Zellen sehr hohe IK mRNA-Level ( $0,0163 \pm 0,0035$ ), moderate SK2 mRNA-Level ( $0,0014 \pm 0,0011$ ) und eher niedrige SK1 ( $0,0002 \pm 0,0001$ ) bzw. SK3 ( $0,0027 \times 10^{-3} \pm 0,0004 \times 10^{-3}$ ) und BK mRNA-Level ( $0,015 \times 10^{-2} \pm 6,3326 \times 10^{-6}$ ) auf. (mRNA: messenger Ribonukleinsäure; SK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal geringer Leitfähigkeit; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal hoher Leitfähigkeit; MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*).

## 5.2 Charakterisierung der Funktion des IK-Kanals im murinen Mammakarzinom

### 5.2.1 Expressionsanalyse des IK-Kanals in murinen Brusttumorzellen und -gewebe

Die Expression der IK-Kanäle in murinen Brusttumorproben wurde auf mRNA-Ebene mithilfe von qRT-PCR (s. 4.5) und auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Methoden (s. 4.7.2) untersucht. Darüber hinaus wurde eine funktionale Charakterisierung der Kanäle in Brusttumorzellen unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik (s. 4.4) durchgeführt. Die Spezifität der verwendeten Primer, Antikörper und Inhibitoren wurde dabei durch die Verwendung entsprechender IK-KO Proben standardmäßig kontrolliert.

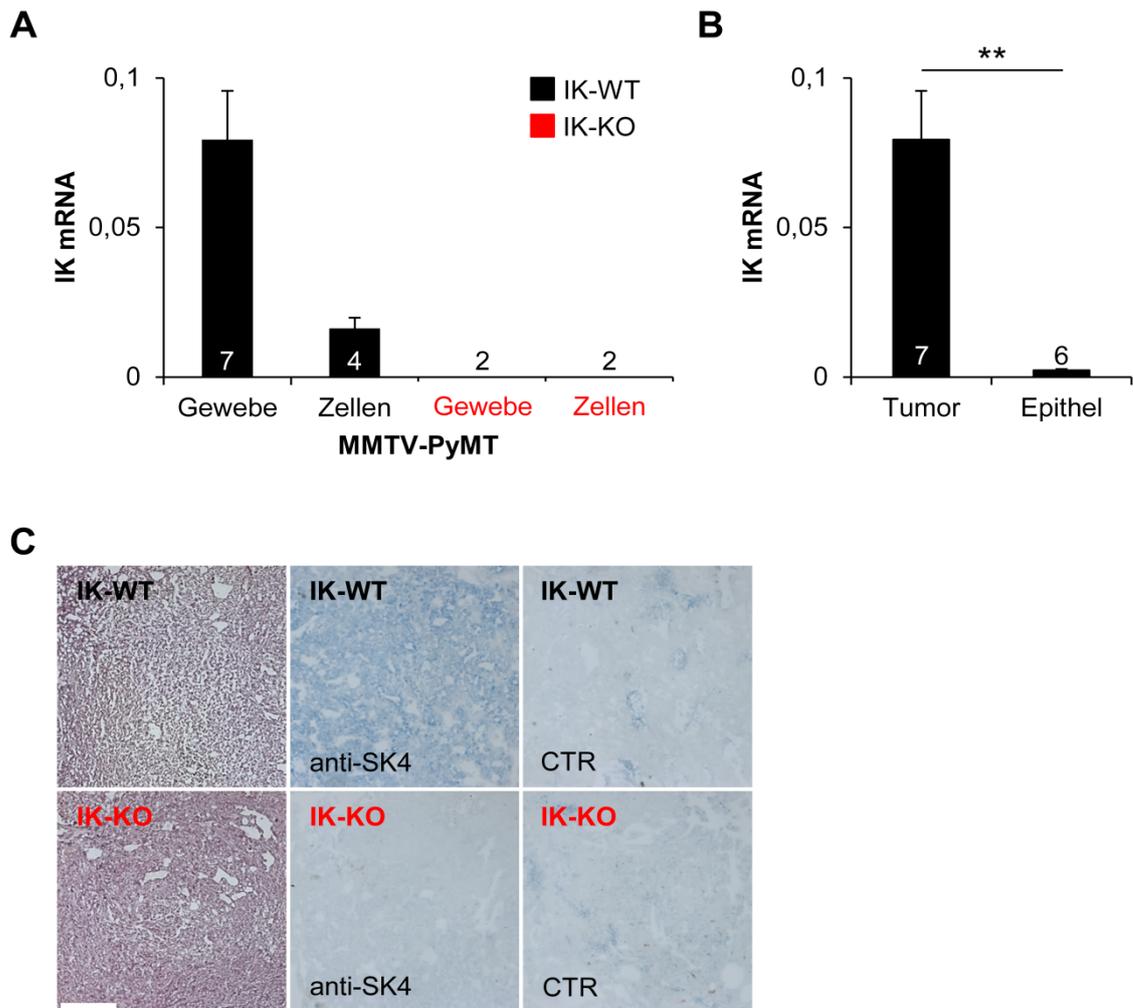
#### 5.2.1.1 Nachweis von IK mRNA in MMTV-PyMT Brusttumorproben

In Übereinstimmung mit Abb. 5.1 war in MMTV-PyMT IK-WT Brusttumorzellen ( $0,0163 \pm 0,0035$ ) sowie -gewebe ( $0,0794 \pm 0,0163$ ) ein hohes IK mRNA-Level nachweisbar, während in den entsprechenden IK-KO Proben keine spezifischen qRT-PCR Signale detektiert werden konnten (s. Abb. 5.2 A). Offensichtlich führt dabei die Transformation des Brustdrüsengewebes durch die Überexpression von PyMT zur vermehrten IK mRNA-Expression: In gesundem Brustepithelgewebe aus IK-WT Mäusen vom FVB/N Hintergrund war das IK Expressionslevel entsprechend signifikant niedriger (s. Abb. 5.2 B).

#### 5.2.1.2 Immunhistochemischer Nachweis von IK Protein in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe

Zum immunhistochemischen Nachweis von IK in Kryoschnitten wurden AP-basierte Färbungen durchgeführt (s. 4.7.2). Die Spezifität des verwendeten Primärantikörpers (SK4-2, s. 3.4.6) wurde standardmäßig durch die Verwendung von Tumorgewebeschnitten aus MMTV-PyMT IK-KO Mäusen überprüft. Zur besseren histologischen Abgrenzung des Tumorgewebes von gesundem Brustgewebe wurden HE-Färbungen von Parallelschnittserien durchgeführt (s. 4.7.1).

Die Ergebnisse der Färbung sind in Abb. 5.2 C dargestellt. Mit dem IK-Antikörper (1:1000) konnten in Brusttumorgewebeschnitten von MMTV-PyMT IK-WT Tieren spezifische Signale detektiert werden (s. Abb. 5.2 C). Erwartungsgemäß waren MMTV-PyMT IK-KO Brusttumorgewebeschnitte IK-negativ. Zur weiteren Kontrolle der Färbung wurden standardmäßig auch Schnitte mitgeführt, welche ohne IK-Primärantikörper inkubiert wurden. Durch anschließende Zugabe des Sekundärantikörpers (1:1000) und der Enzymsubstrate zu diesen Proben konnte weder in IK-WT noch in IK-KO ein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Eine Bindung des Sekundärantikörpers an unspezifische Epitope konnte somit ausgeschlossen werden.



**Abb. 5.2 Expressionsanalyse von IK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen und -gewebe**

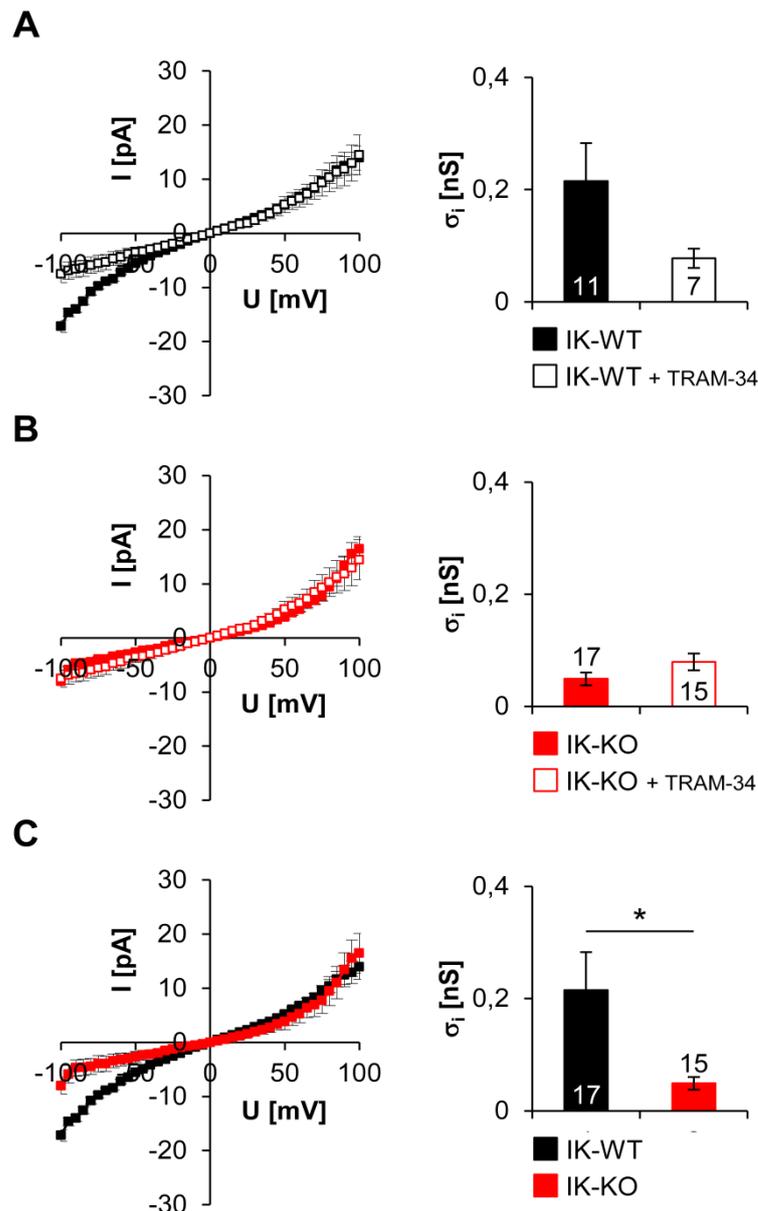
Die IK Expression wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (s. 4.5) und auf Proteinebene mithilfe immunhistochemischer Färbungen von Kryoschnitten (s. 4.7.2) untersucht. Parallel wurden standardmäßig Gewebe und Zellen aus IK-KO Tieren analysiert. Die mRNA-Expressionslevel wurden auf den internen Standard  $\beta$ -Actin normiert. **(A)** Sowohl IK-WT Brusttumorgewebe als auch -zellen exprimieren hohe IK mRNA Spiegel (schwarze Balken). In Gewebeprobeen konnte ein Expressionslevel von  $0,0794 \pm 0,0163$ , in Zellen von  $0,0163 \pm 0,0035$  detektiert werden. Die Spezifität der verwendeten Primer wurde mithilfe entsprechender IK-KO Proben überprüft, in welchen erwartungsgemäß kein IK-Signal erfasst werden konnte (rote Balken). **(B)** Vergleich der mRNA-Expression von IK in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe mit der Expression in nicht-transformiertem, d.h. gesundem, Brustepithelgewebe aus FVB/N IK-WT Mäusen. Wie bereits in (A) gezeigt, wurde für MMTV-PyMT Brusttumorgewebe ein IK Expressionslevel von  $0,0794 \pm 0,0163$  ermittelt. In Brustepithelgewebe aus IK-WT Tieren vom FVB/N-Hintergrund ist das IK mRNA-Level mit  $0,0023 \pm 0,0005$  hingegen signifikant erniedrigt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben. Ein p-Wert von  $**p < 0,01$  entspricht einem hochsignifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. **(C)** Nachweis der IK Proteindistribution in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe mittels immunhistochemischer Färbung von Kryoschnitten. Verwendet wurde die AP-Methode (s. 4.7.2). Es wurden sowohl MMTV-PyMT IK-WT Brusttumorgewebe (obere Bildreihe, schwarze Beschriftung) als auch IK-KO Brusttumorgewebe untersucht (untere Bildreihe, rote Beschriftung). Für jeden Genotyp wurde außerdem eine repräsentative H&E-Färbung ausgewählt (jeweils linke Spalte). Zum Nachweis von IK wurden die Zellen mit dem spezifischen IK-Primärantikörper (SK4-2; Verdünnung 1:1000) angefärbt (jeweils mittlere Spalte). Dabei konnte in IK-WT Brusttumorschnitten ein positives Signal für IK in Form einer Blaufärbung detektiert werden (oberes mittleres Bild). Erwartungsgemäß war in den IK-KO Brusttumorschnitten kein spezifisches IK Signal nachweisbar (unteres mittleres Bild). Standardmäßig wurden bei jeder Färbung Schnitte mitgeführt, welche ohne Primärantikörper inkubiert wurden (jeweils rechte Spalte, CTR). Diese Kontrollen zeigten nach Zugabe des Sekundärantikörpers und Farbsubstrats keine Färbung, so dass eine Bindung des Sekundärantikörpers an unspezifische Epitope ausgeschlossen werden kann ( $N = 2-3$ ) (IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; mRNA: messenger Ribonukleinsäure; WT: Wildtyp; KO: Knockout; MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*; CTR: Kontrolle)

### 5.2.1.3 Funktionale Charakterisierung der IK-Kanäle in MMTV-PyMT Zellen mittels Patch-Clamp-Methode

Die Patch-Clamp-Methode (s. 4.4) erlaubt die funktionale Charakterisierung von Ionenkanälen. Diese Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Sektion Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen von Dr. Benjamin Stegen durchgeführt. Es wurden IK-Ströme in MMTV-PyMT IK-WT in An- oder Abwesenheit des selektiven Inhibitors TRAM-34  $10 \mu\text{M}$  (s. 3.4.3) sowie in IK-KO Zellen untersucht.

In der *cell attached configuration* (s. 4.4) konnten in MMTV-PyMT IK-WT Zellen bei einem niedrigen Membranpotential typische IK-Ströme detektiert werden, die zudem durch TRAM-34 hemmbar waren. Die Einwärtsleitfähigkeit  $\sigma_i$  wurde durch die pharmakologische Inhibition von IK von  $0,2149 \pm 0,0677 \text{ nS}$  auf  $0,0774 \pm 0,0171 \text{ nS}$  verringert (s. Abb. 5.3 A), führte aber nicht zu einer vollständigen Aufhebung des Kaliumstroms. Im Gegensatz dazu waren in MMTV-PyMT IK-KO Zellen keine TRAM-34 sensitiven Ströme nachweisbar. Die Einwärtsleitfähigkeit in unbehandeltem IK-KO Zellen war im Vergleich zu unbehandelten IK-WT Zellen signifikant geringer ( $0,0490 \pm 0,0112 \text{ nS}$ ) (s. Abb. 5.3 B+C) und wurde nicht von der TRAM-34 Behandlung beeinflusst ( $0,0790 \pm 0,0148 \text{ nS}$ ) (s. Abb. 5.3 B).

MMTV-PyMT Zellen exprimieren folglich funktionale IK-Kanäle, deren Aktivität durch den spezifischen Blocker TRAM-34 inhibiert wird. In IK-negativen MMTV-PyMT Zellen ließen sich dagegen keine Effekte von TRAM-34 auf die Einwärtsleitfähigkeit beobachten.



**Abb. 5.3 Funktionale Charakterisierung von IK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen mittels Patch-Clamp-Technik**

Die Analysen wurden in einer Kooperation mit der Sektion Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen von Dr. Benjamin Stegen durchgeführt. Die IK-Ströme wurden in MMTV-PyMT IK-WT und IK-KO Zellen in An- oder Abwesenheit des spezifischen Inhibitors TRAM-34 charakterisiert. Die Messung erfolgte in 5 mV-Schritten von -100 bis +100 mV. Die Einwärtsleitfähigkeit  $\sigma_i$  wurde über die lineare Regression zwischen -90 mV und -55 mV bestimmt. **(A)** MMTV-PyMT IK-WT Zellen (schwarzer Balken) exprimieren funktionale IK-Kanäle mit einer Einwärtsleitfähigkeit  $\sigma_i$  von  $0,2149 \pm 0,0677$ , die durch TRAM-34 (10  $\mu$ M) auf  $0,0774 \pm 0,0171$  nS reduziert wird (weißer Balken). **(B)** In IK-KO Zellen waren keine IK-spezifischen Ströme und entsprechend keine TRAM-34 sensitive Komponente in der Einwärtsleitfähigkeit beobachtbar.  $\sigma_i$  beträgt für IK-KO  $0,0490 \pm 0,0112$  nS (roter Balken) und nach Applikation von TRAM-34  $0,0790 \pm 0,0148$  nS (weißer Balken). **(C)** Die Einwärtsleitfähigkeiten von IK-WT und IK-KO Zellen wurden verglichen und dafür ein signifikanter Unterschied ermittelt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben. Ein p-Wert von  $*p < 0,05$  entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. (I: Stromstärke; pA: Picoampère; U: Spannung; mV: Millivolt;  $\sigma_i$ : Einwärtsleitfähigkeit; nS: Nanosiemens; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; TRAM-34: Triarylmethan-34; KO: Knockout)

## 5.2.2 Einfluss des IK-Kanals auf das Wachstumsverhalten muriner Brusttumorzellen

Nach Verifizierung der IK Expression sowie der Darstellung der TRAM-34 sensitiven Einwärtsleitfähigkeit in den MMTV-PyMT Brusttumorzellen war es zunächst ein Ziel, den Einfluss von IK auf das Wachstumsverhalten der Brusttumorzellen zu charakterisieren. Dies wurde sowohl über eine pharmakologische Inhibition mit TRAM-34 als auch über eine genetische Ablation von IK erreicht.

### 5.2.2.1 Rolle von IK für das Wachstum muriner MMTV-PyMT Brusttumorzellen

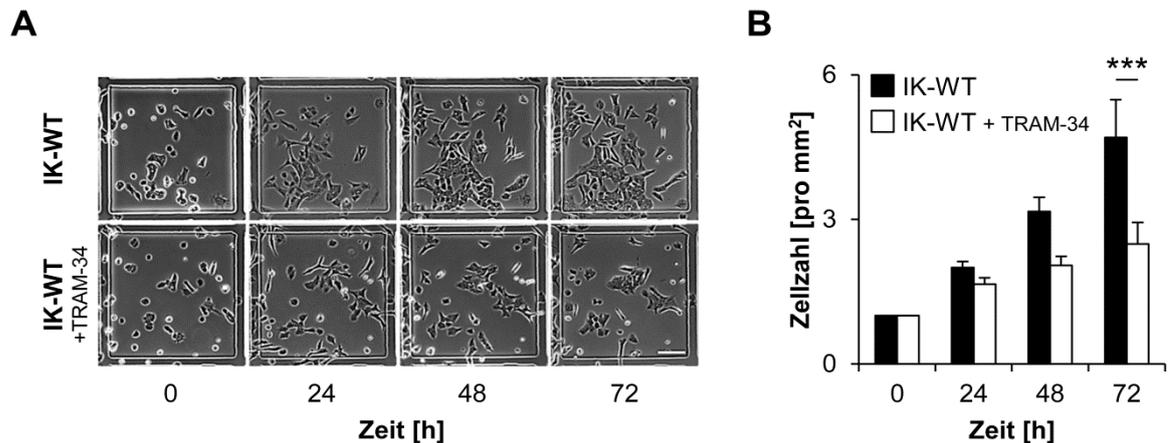
Die Wachstumsanalysen wurden mithilfe sog. Grid-Platten durchgeführt (s. 4.6.1). Die ermittelten Zellzahlen wurden auf die Ausgangszellzahl der jeweiligen Behandlungsgruppe bzw. des entsprechenden Genotyps ( $t = 0$  h) normalisiert.

Bereits makroskopisch ließ sich bei MMTV-PyMT Zellen erkennen, dass eine pharmakologische Inhibition von IK zu einem verminderten Wachstum führt (s. Abb. 5.4 A). Die Bestimmung der Zellzahl ergab nach Normalisierung der Daten, dass sich unbehandelte Zellen nach 24 Stunden um den Faktor  $2,00 \pm 0,13$  vermehrt hatten (s. Abb. 5.4 B). In den behandelten Zellen lag dieser Wert bei  $1,65 \pm 0,14$  und zeigte sich damit bereits zu diesem frühen Zeitpunkt deutlich reduziert. Nach 48-stündiger Kultivierungszeit hatte sich die Anzahl der unbehandelten Zellen mehr als verdreifacht ( $3,16 \pm 0,30$ ), wohingegen sich die Zahl der TRAM-34 behandelten Zellen lediglich verdoppelt hatte ( $2,04 \pm 0,19$ ). Die Unterschiede in den Zellzahlen zwischen den Behandlungsgruppen wurden 72 Stunden nach Versuchsbeginn noch deutlicher: Unbehandelte Zellen hatten sich um den Faktor  $>4,5$  ( $4,70 \pm 0,78$ ) vermehrt, während die Zahl der behandelten Zellen im Vergleich zum Ausgangsniveau nur um den Faktor  $2,49 \pm 0,45$  zugenommen hatte.

Ein Vergleich des Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT IK-WT und IK-KO Zellen konnte die Ergebnisse der Wachstumsversuche  $\pm$  TRAM-34 bestätigen (s. Abb. 5.5). Zu allen Untersuchungszeitpunkten ( $t = 24$  bis  $72$  h) war die IK-KO Zellzahl im Vergleich zu den WT Zellen signifikant reduziert.

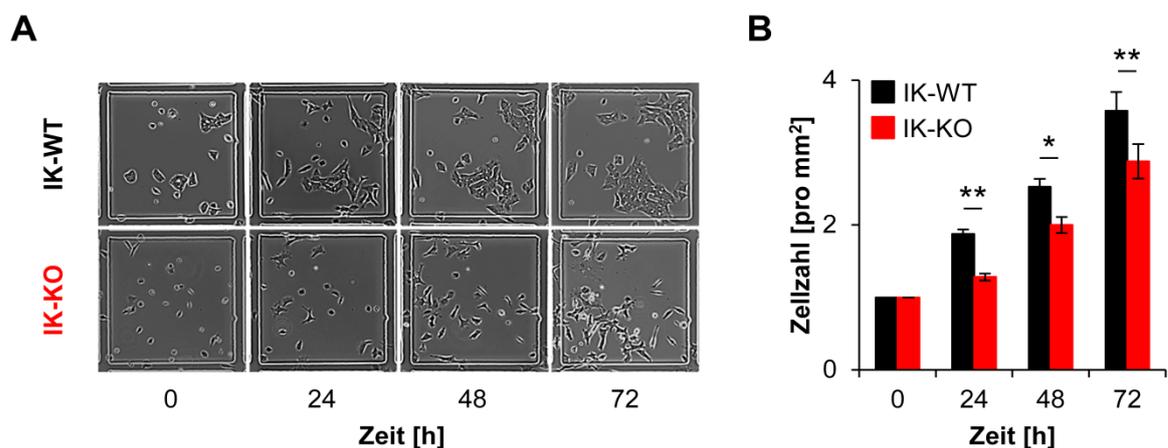
Die Wachstumsuntersuchungen wurden alternativ auch mit Brusttumorzellen aus dem MMTV-cNeu Mausmodell durchgeführt. Auch in diesem *in vitro* Modell führte die Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 zu einem verringertem Wachstum der Zellen (s. Anhang Abb. 7.1 und Abb. 7.2)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die pharmakologische Inhibition als auch die genetische Ablation des IK-Kanals die Wachstumseigenschaften muriner Brusttumorzellen negativ beeinflusst.



**Abb. 5.4** Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34

Die Zellen wurden mithilfe von Grid-Platten (s. 4.6.1) untersucht, welche durch ein festes Koordinatensystem die Beobachtung definierter Stellen über einen längeren Zeitraum erlauben. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen durch einen 72-stündigen Serumentzug arretiert. Im Anschluss erfolgte die Restimulation in Ab- oder Anwesenheit von TRAM-34 10  $\mu$ M ( $t = 0$  h). Alle 24 Stunden wurden über einen Gesamtzeitraum von 72 Stunden jeweils von denselben vier Quadranten Bilder angefertigt. Im Anschluss wurden die Zellen mit ImageJ gezählt und auf den Wert von  $t = 0$  h normiert. **(A)** Die Abbildungen zeigen jeweils einen repräsentativen Quadranten (Seitenlänge 0,5 mm) für jeden Zeitpunkt und Behandlung. Bereits makroskopisch lässt sich erkennen, dass durch die pharmakologische Inhibition von IK mit TRAM-34 nach 72 Stunden weniger Zellen vorhanden sind als unter Kontrollbedingungen. **(B)** Die Auszählung ergab, dass sowohl die Anzahl unbehandelter (schwarze Balken) als auch behandelte Zellen (weiße Balken) mit steigender Kultivierungsdauer generell zunahm. Bereits nach 24 Stunden konnte jedoch in unbehandelten Zellen eine etwas höhere Zunahme erfasst werden. Nach 72-stündiger Behandlung konnte eine signifikant höhere Wachstumsrate in unbehandelten Zellen ( $4,70 \pm 0,78$ ) im Vergleich zu TRAM-34 behandelten Zellen detektiert werden ( $2,49 \pm 0,45$ ). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 10$ ). Ein  $p$ -Wert von  $***p < 0,001$  entspricht einem höchstsignifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. (mm<sup>2</sup>: Quadratmillimeter; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; TRAM-34: Triarylmethan-34; h: Stunden).



**Abb. 5.5** Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen nach genetischer Ablation des IK-Kanals

Die Zellen wurden mithilfe von Grid-Platten (s. 4.6.1) untersucht, welche durch ein festes Koordinatensystem die Beobachtung definierter Stellen über einen längeren Zeitraum erlauben. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen durch einen 72-stündigen Serumentzug arretiert. Im Anschluss erfolgte die Restimulation. Alle 24 Stunden wurden über einen Gesamtzeitraum von 72 Stunden jeweils von denselben vier Quadranten Bilder angefertigt. Im Anschluss wurden die Zellen mit ImageJ gezählt und auf den Wert von  $t = 0$  h normiert. **(A)** Die Abbildungen zeigen jeweils einen repräsentativen Quadranten (Seitenlänge 0,5 mm) für jeden Zeitpunkt

und jede Behandlung. Bereits makroskopisch lässt sich erkennen, dass die genetische Ablation von IK zu einer geringeren Zellzahl im Vergleich zu IK-WT führt. **(B)** Die Auszählung ergab, dass sowohl die Zellzahl von IK-WT (schwarze Balken) als auch von IK-KO (rote Balken) mit steigender Kultivierungsdauer zunahm. Zu allen Zeitpunkten führte die IK Ablation zu signifikant geringeren Zellzahlen. Nach 24 Stunden ergab sich für die IK-WT Zellen ein Wachstumsindex von  $1,87 \pm 0,07$ , wohingegen der entsprechende Wert der IK-KO Zellen bei  $1,28 \pm 0,05$  lag. Nach 48 Stunden hatten sich IK-WT Zellen um den Faktor  $2,53 \pm 0,07$  vermehrt, IK-defiziente Zellen um  $2,00 \pm 0,11$ . Nach 72 Stunden betrug die Wachstumsrate der IK-WT und IK-KO Zellen bei  $3,58 \pm 0,26$  bzw.  $2,88 \pm 0,24$ . Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 30-31$ ). Ein p-Wert von  $*p < 0,05$  entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, ein p-Wert von  $**p < 0,01$  einen hochsignifikanten Unterschied. ( $\text{mm}^2$ : Quadratmillimeter; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout; h: Stunden)

### 5.2.2.2 *IK-abhängige Zellzyklusanalysen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen*

Die in 5.2.2.1 erhobenen Daten lassen vermuten, dass das IK-abhängige Wachstum muriner Brusttumorzellen aus einer Veränderung des Zellzyklus resultiert. Daher wurden Zellzyklusmarker zu definierten Kultivierungszeitpunkten mittels qRT-PCR bestimmt. Diese Analysen wurden durch Durchflusszytometrie-basierte Zellzyklusanalysen unterstützt (s. 4.6.3.1 bzw. 4.6.3.2).

Für die qRT-PCR-basierte Zellzyklusanalyse wurden die Zellen arretiert und anschließend für bestimmte Zeiträume (0 h, 0,5 h und 24 h) mit Zellkulturmedium  $\pm$  TRAM-34  $10 \mu\text{M}$  restimuliert. Verglichen wurden entweder unbehandelte mit TRAM-34 behandelten Zellen oder IK-WT mit IK-KO Zellen. Zur Kontrolle wurde eine Probe unstimuliert belassen (0 h).

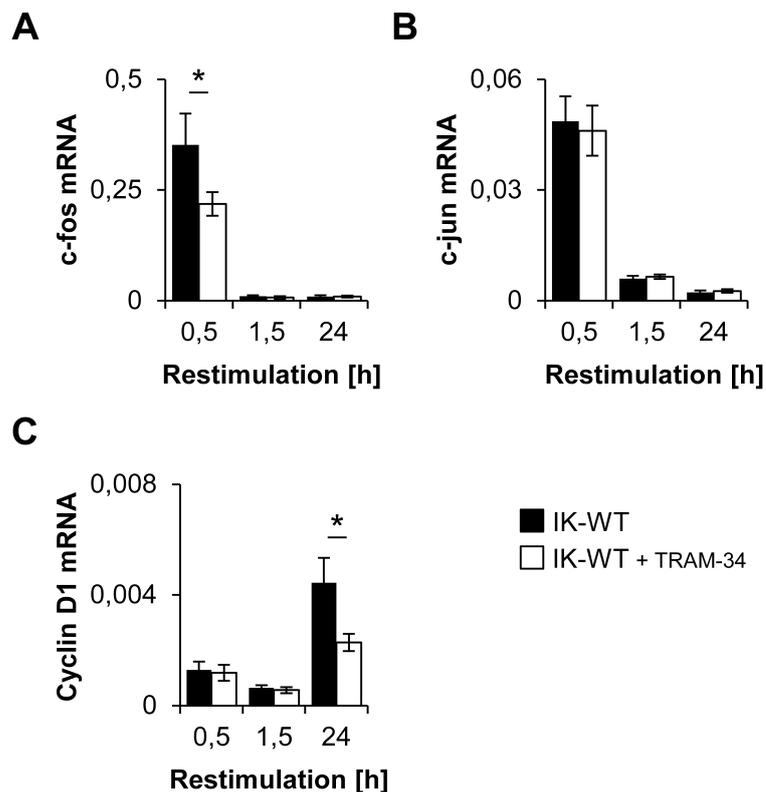
Abb. 5.6 zeigt den Einfluss von TRAM-34 auf die Expression der Zellzyklusmarker c-fos, c-jun und Cyclin D1. Sowohl in unbehandelten als auch behandelten Zellen lassen sich nach einer Restimulationsdauer von 0,5 h die höchsten mRNA-Expressionslevel für c-fos und c-jun nachweisen. Die pharmakologische Inhibition von IK mittels TRAM-34 reduzierte das c-fos mRNA-Level zu diesem Zeitpunkt ( $0,2184 \pm 0,0267$ ) im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $0,3522 \pm 0,0701$ ) signifikant. Auf die c-jun Expression hatte die pharmakologische Inhibition des IK-Kanals zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Einfluss. Die Cyclin D1 mRNA Spiegel wurden zu den frühen Kultivierungszeitpunkten durch die Behandlung mit TRAM-34 ebenfalls nicht beeinflusst, nach 24-stündiger Restimulation zeigte sich in unbehandelten Zellen mit  $0,0045 \pm 0,0009$  jedoch ein signifikant höheres Expressionslevel als in TRAM-34 behandelten Zellen ( $0,0023 \pm 0,0003$ ).

Die Ergebnisse aus der qRT-PCR-basierten Zellzyklusanalyse mit TRAM-34 wurden durch Durchflusszytometrieanalysen unterstützt. Auch für diese Experimente wurden die Zellen nach 72-stündiger Serumdeprivation für 24, 48 bzw. 72 h restimuliert (s. 4.3.4) und mit TRAM-34 bzw. Ethanol als Vehikel behandelt. Die Proben wurden anschließend mit PI gefärbt und der DNA-Gehalt über die Messung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs ( $\log \text{FI PI}$ ) bestimmt.

Nach 24-stündiger Kultivierung befanden sich  $70,80 \pm 2,08\%$  der gemessenen unbehandelten Zellen in der G1-Phase. Durch die Behandlung mit TRAM-34 war die Anzahl der Zellen in dieser Phase signifikant erhöht ( $77,03 \pm 1,42\%$ ) (s. Abb. 5.7 A), was auf eine frühe Unterbrechung des Zellzyklus hindeutet und somit die verminderte Wachstumsrate (s. Abb. 5.4) erklärt. In Übereinstimmung mit diesem Befund war die Zahl der Zellen in der S- und G2-Phase nach TRAM-34 Behandlung reduziert, jedoch erreichten diese Unterschiede nicht das Signifikanzniveau. Nach 48- und 72-stündiger Kultivierung waren generell keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen mehr detektierbar (s. Abb. 5.7 B+C). Abb. 5.7 D zeigt repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse, in denen die Zellzahl über der Fluoreszenzintensität von

PI aufgetragen ist. Mithilfe der Software FlowJo konnten die Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen eingeteilt und quantifiziert werden.

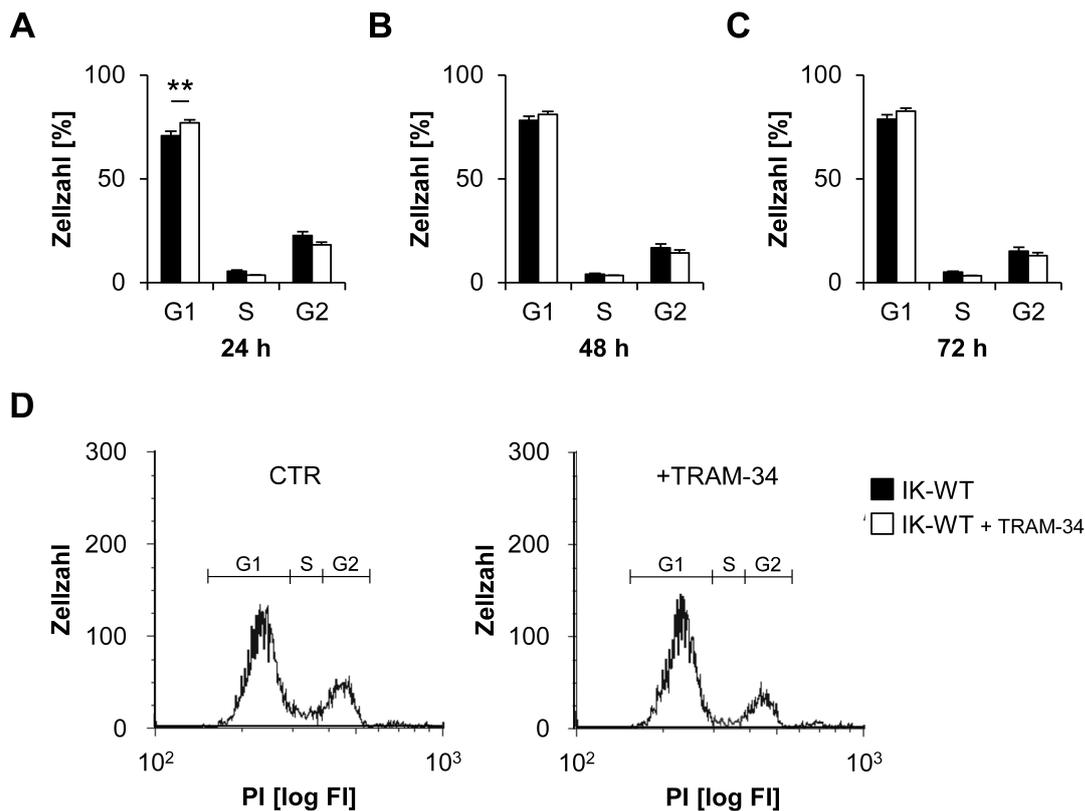
Um die pharmakologische Hemmung der IK-Aktivität als Ursache für die beobachteten Wachstums- und Zellzykluseffekte (s. Abb. 5.4 und Abb. 5.6) zu bestätigen, wurde die mRNA-Expression der teilweise TRAM-34 sensitiven Zellzyklusmarker in den MMTV-PyMT IK-WT Zellen auch mit IK-defizienten MMTV-PyMT Zellen verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 5.8 dargestellt. Nach einer Restimulation von 0,5 h war in beiden Genotypen ein signifikanter Anstieg der Expressionslevel der *immediate early genes* c-fos und c-jun erkennbar (s. Abb. 5.8 A+B). Mit steigender Kultivierungsdauer fiel das Expressionslevel erwartungsgemäß wieder ab. Sowohl das Expressionslevel von c-fos (s. Abb. 5.8 A) als auch von c-jun (s. Abb. 5.8 B) war in IK-WT im Vergleich zu IK-defizienten Zellen signifikant erhöht. Für Cyclin D1 (s. Abb. 5.8 C), das als *delayed early* Gen ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Zellzyklus spielt, konnte zwar für beide Genotypen eine zyklische Expression in Abhängigkeit der Kultivierungszeit ermittelt werden, jedoch unterschieden sich die Expressionslevel zwischen den beiden Genotypen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte.



**Abb. 5.6 Einfluss der pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 auf die mRNA-Expression bestimmter Zellzyklusmarker**

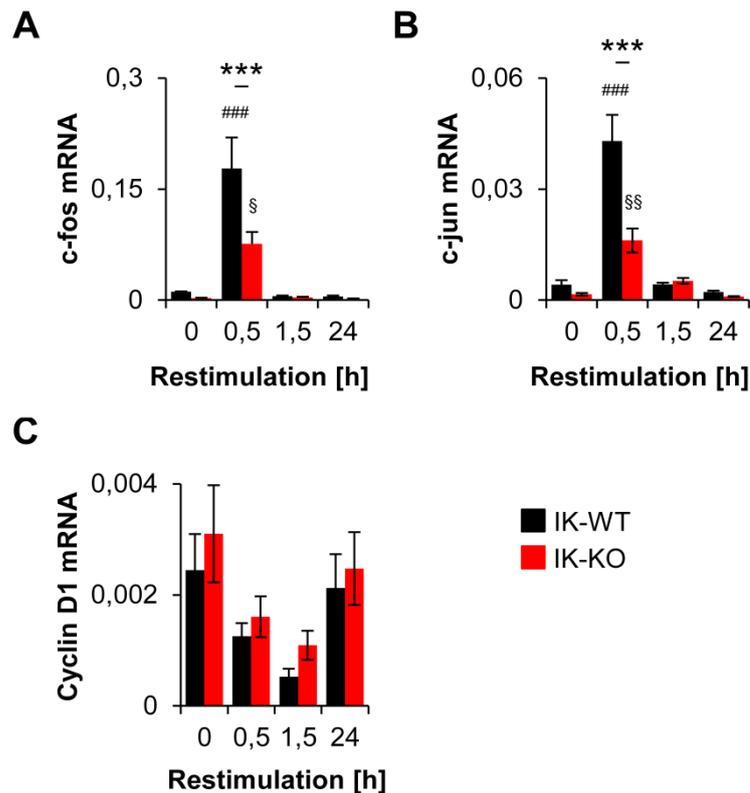
Es wurde die mRNA-Expression bestimmter Zellzyklusmarker zu definierten Zeitpunkten in MMTV-PyMT Brusttumorzellen in Abwesenheit (schwarze Balken) und Anwesenheit des spezifischen IK-Kanalinhibitors TRAM-34 (weiße Balken) mittels qRT-PCR untersucht. Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht und anschließend durch einen 72-stündigen Serumentzug in der G1-Phase arretiert. Dann erfolgte die Restimulation für die jeweils angegebenen Zeitintervalle mit oder ohne Inhibitor. Dann wurde die mRNA wie in 4.5 beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Alle Werte wurden auf den internen Standard  $\beta$ -Actin normiert. (A) Beide Behandlungen führen nach einer halbstündigen Restimulation zu einem Anstieg des *immediate early gene* c-fos. Allerdings war das mRNA Level in unbehandelten Zellen ( $0,3522 \pm 0,0701$ ) im Vergleich zu behandelten Zellen ( $0,2184 \pm 0,0267$ ) signifikant erhöht. Bei längeren

Kultivierungszeiten fiel das Expressionslevel in beiden Genotypen ab. **(B)** In beiden Konditionen konnte durch die Restimulation nach 0,5 h ein Anstieg der mRNA-Expression des *immediate early gene* *c-jun* erreicht werden. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt führte die Kanalinhibition zu Unterschieden in der Regulation des Zellzyklusmarkers. **(C)** Es konnte eine zyklische Expression von Cyclin D1 in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer in beiden Konditionen nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden konnte für beide Gruppen ein Anstieg der mRNA-Expression detektiert werden, der in unbehandelten Zellen ( $0,0044 \pm 0,0009$ ) signifikant erhöht war (+ TRAM-34:  $0,0023 \pm 0,0003$ ). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 4-5$ ). Ein p-Wert von  $*p < 0,05$  entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. (h: Stunden; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; TRAM-34: Triarylmethan-34; h: Stunden)



**Abb. 5.7 Zellzyklusanalyse von MMTV-PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mittels PI-basierter Durchflusszytometrie**

Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben ausgebracht und anschließend mittels Serumentzug in der G1-Phase arretiert (s. 4.3.4). Anschließend erfolgte die Restimulation in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Anwesenheit des spezifischen IK-Kanalinhibitors TRAM-34 und schließlich die Fixierung der Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten (s. 4.6.3.2). Die Fluoreszenzintensität von Propidiumiodid (PI [log FI]) wurde mithilfe des FACSCanto Cytometer bestimmt und mit der Software FlowJo ausgewertet. **(A)** Nach 24-stündiger Kultivierung konnte eine signifikant höhere Anzahl TRAM-34 behandelte Zellen ( $70,80 \pm 2,08\%$  vs.  $77,03 \pm 1,42\%$ ) in der G1-Phase ermittelt werden, was auf eine Verlangsamung des Zellzyklus hindeutet und somit die verminderte Wachstumsrate der behandelten Zellen (s. Abb. 5.4) zumindest teilweise erklärt. Auch in der S- und G2-Phase zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Zellen, allerdings erreichten diese Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen jeweils nicht das Signifikanzniveau. **(B)** Auch nach 48 Stunden befanden sich mehr TRAM-34 behandelte Zellen als unbehandelte Zellen in der G1-Phase. Jedoch war die zuvor beobachtete Differenz (s. A) zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant. **(C)** Nach 72-stündiger Restimulation führte die Behandlung mit TRAM-34 ebenfalls zu einer verstärkten, aber nicht signifikant erhöhten Akkumulation der Zellen in der G1-Phase verglichen mit unbehandelten Zellen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 9-12$ ). Ein p-Wert von  $**p < 0,01$  entspricht einem hochsignifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. **(D)** Repräsentative Histogramme. Aufgetragen ist die Zellzahl gegenüber der Fluoreszenzintensität von PI. Mithilfe der Software FlowJo konnten die Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen G1, S und G2 eingeteilt werden. Unbehandelte Zellen (linkes Bild, CTR) zeigten einen geringeren Anteil in der G1-Phase im Vergleich mit TRAM-34 behandelten Zellen (rechtes Bild). (h: Stunden; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; TRAM-34: Triarylmethan-34; CTR: Kontrolle; PI: Propidiumiodid; FI: Fluoreszenzintensität)



**Abb. 5.8 Einfluss der genetischen Ablation des IK-Kanals auf die mRNA Expression bestimmter Zellzyklusmarker**

Es wurde die mRNA-Expression bestimmter Zellzyklusmarker zu definierten Zeitpunkten in MMTV-PyMT IK-WT (schwarze Balken) und IK-KO Zellen (rote Balken) mittels qRT-PCR untersucht. Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht und anschließend durch einen 72-stündigen Serumentzug in der G1-Phase arretiert. Dann erfolgte die Restimulation für die jeweils angegebenen Zeitintervalle. Dann wurde die mRNA wie in 4.5 beschrieben isoliert, umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Alle Werte wurden auf den internen Standard  $\beta$ -Actin relativiert. **(A)** In beiden Genotypen wurde nach einer halbstündigen Restimulation ein Anstieg des *immediate early gene* c-fos detektiert. Allerdings war das mRNA Level in IK-WT ( $0,1777 \pm 0,0419$ ) im Vergleich zu IK-KO Zellen ( $0,0762 \pm 0,0158$ ) signifikant erhöht. Bei längeren Kultivierungszeiten fiel das Expressionslevel der Marker in beiden Genotypen wieder auf das niedrige Ausgangsniveau ab. **(B)** In beiden Genotypen konnte durch die Restimulation nach 0,5 h ein Anstieg der mRNA-Expression des *immediate early gene* c-jun erfasst werden. In IK-WT Zellen ( $0,0430 \pm 0,0070$ ) war der Spiegel allerdings signifikant höher als in IK-defizienten Zellen ( $0,0161 \pm 0,0032$ ). Mit steigender Kultivierungsdauer wurde ein Abfall des c-jun Expressionslevel in beiden Genotypen beobachtet. **(C)** Es konnte eine zyklische Expression von Cyclin D1 in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer für beide Genotypen nachgewiesen werden. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte war allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen den IK-WT und IK-KO Zellen detektierbar. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 5-6$ ). Ein p-Wert von  $***p < 0,001$  entspricht einem höchstsignifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Ein p-Wert von  $###p < 0,001$  entspricht einem höchstsignifikanten Unterschied zwischen den restimulierten WT-Zellen zum entsprechenden Nullwert. Ein p-Wert von  $§p < 0,05$  entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den restimulierten KO-Zellen zum entsprechenden Nullwert. (h: Stunden; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)

Eine Durchflusszytometrie-basierte Zellzyklusanalyse wurde durchgeführt, führte aber zu sehr variablen Ergebnissen. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass sich IK-WT Zellen und IK-KO Zellen bereits morphologisch leicht unterscheiden (s. auch 4.6.3.2). MMTV-PyMT IK-KO Zellen sind etwas größer und besitzen zudem dendritenähnliche Fortsätze. Bei der Durchflusszytometrie hat die Beschaffenheit der Zellen einen erheblichen Einfluss auf die Analyse, weshalb die Daten an dieser Stelle keine eindeutigen Aussagen zulassen.

Zusammengenommen lassen die Daten darauf schließen, dass eine Blockade bzw. die vollständige Ausschaltung von IK in MMTV-PyMT Brusttumorzellen zu einer Veränderung des Zellzyklus führt. Dies konnte anhand einer veränderten Expression bestimmter Zellzyklusmarker über qRT-PCR-basierte Nachweise sowie nach pharmakologischer Inhibition und genetischer Ablation von IK gezeigt werden. Die Ergebnisse der pharmakologischen Inhibition konnte zudem durch Durchflusszytometrie-basierte Zellzyklusuntersuchungen bestätigt werden.

### **5.2.3 Einfluss des IK-Kanals auf apoptotische Signalwege in MMTV-PyMT Brusttumorzellen**

Die Behandlung von MMTV-PyMT Brusttumorzellen mit TRAM-34 führt zu einer geringeren Wachstumsrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen (s. Abb. 5.4). Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte eine proapoptotische Wirkung (s. 1.3.1.2) von TRAM-34 sein. Während der Apoptose findet über den intrinsischen Signalweg eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol statt, welches dann wiederum die Effektorcaspase 3 aktiviert (s. 1.3.1.2). Daher wurde überprüft, ob die Behandlung von TRAM-34 zu einem positiven Cytochrom C-Signal und zu einer Spaltung der Caspase 3 in der cytosolischen Fraktion führt.

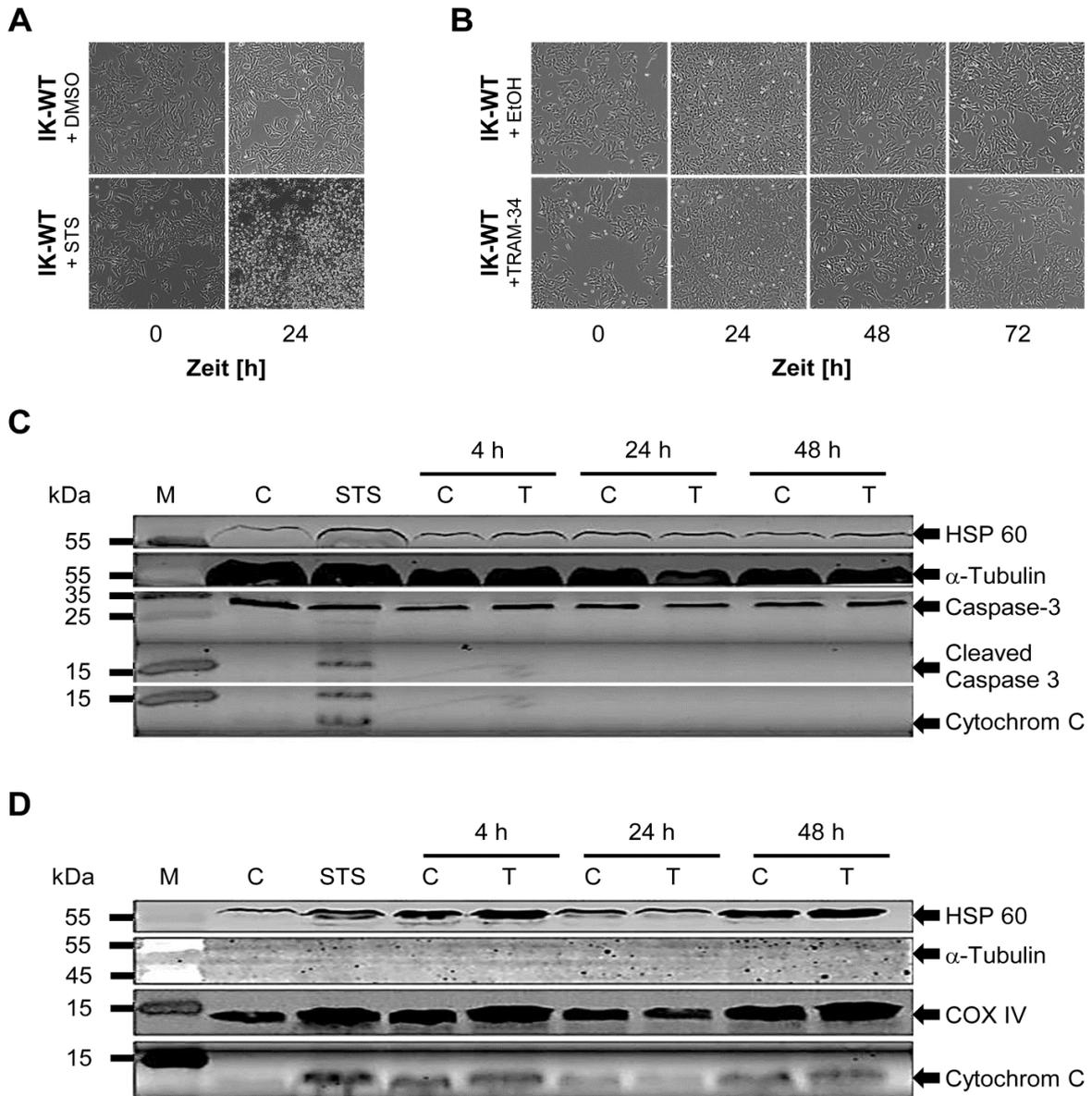
Die Zellen wurden über unterschiedliche Zeiträume (4, 24, 48 h) mit TRAM-34 bzw. Ethanol als Vehikel inkubiert. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle STS (4 h) verwendet, welches bekanntermaßen den intrinsischen Signalweg aktiviert (s. 1.3.1.2).<sup>219,220</sup> Die Zellen wurden wie in 4.8.3 beschrieben aufgearbeitet und in cytosolische und mitochondriale Fraktion getrennt. Die Proteine wurden dann über SDS-PAGE (s. 4.8.5) aufgetrennt und mittels Western Blot (s. 4.8.6) auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Detektion von Cytochrom C und Caspase 3 bzw. der gespaltenen Caspase 3 als Apoptosemarker über spezifische Antikörper (s. 3.4.7.3). Zusätzlich wurden die Zellen mikroskopisch betrachtet, da ein Abrunden und daraus resultierendes Ablösen der Zellen bereits auf apoptotische Vorgänge hinweisen.

Die mikroskopische Analyse ergab, dass die Behandlung mit STS nach 4 h zu einem Abrunden und folglich zu einem Ablösen der Zellen führt (s. Abb. 5.9 A). Unter Kontrollbedingungen waren die Zellen nach vierstündiger Inkubation dagegen unverändert. Im Gegensatz zu STS konnten durch die Behandlung mit TRAM-34 zu keinem der untersuchten Behandlungszeitpunkte morphologische Veränderungen in Form eines Abrundens oder Ablösens der Zellen beobachtet werden. Erwartungsgemäß hatte auch die Inkubation der Zellen mit dem entsprechenden Vehikel keine morphologischen Auswirkungen (s. Abb. 5.9 B).

In der cytosolischen Fraktion (s. Abb. 5.9 C) konnte erwartungsgemäß durch die Behandlung der Zellen mit STS ein positives Signal für Cytochrom C bei 14 kDa und für die gespaltene Caspase 3 bei 17 kDa und 19 kDa detektiert werden. In den Kontrollproben war dagegen keine entsprechende Bande erkennbar. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von TRAM-34 zu keinem Behandlungszeitpunkt zu einer Freisetzung von Cytochrom C in das Cytosol und damit übereinstimmend auch nicht zur proteolytischen Aktivierung der Caspase 3. In allen Proben war dagegen die inaktive Vorstufe der Caspase 3 (35 kDa) nachweisbar.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle und Marker für die cytosolische Fraktion. Entsprechend war die korrespondierende  $\alpha$ -Tubulin Bande auf einer Höhe von 55 kDa nur in den cytosolischen Proben detektierbar (s. Abb. 5.9 C+D). Erwartungsgemäß konnte in der mitochondrialen Fraktion (s. Abb. 5.9 E) in allen Proben auf einer Höhe von 14 kDa ein positives Signal für Cytochrom C nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle diente das mitochondriale

Protein COX IV, welches ebenfalls in den mitochondrialen Proben durchgängig detektiert wurde. Die Abwesenheit von  $\alpha$ -Tubulin in den mitochondrialen Fraktionen spricht für eine ausreichende Trennung der cytosolischen und mitochondrialen Zellkompartimente.

Die pharmakologische IK-Kanalinhinderung in MMTV-PyMT Brusttumorzellen durch TRAM-34 führt also nicht zu einer Interaktion mit dem intrinsischen Signalweg der Apoptose. Proapoptische Effekte der IK-Kanalblockade sind demnach keine entscheidende Komponente des durch TRAM-34 verminderten Zellwachstums.



**Abb. 5.9 Einfluss der pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals auf das apoptotische Verhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen**

Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytosol gilt als Nachweis für die Induktion des intrinsischen Signalwegs der Apoptose (s. auch 1.3.1.2). Die Zellen wurden wie in 4.8.3 beschrieben behandelt und anschließend isoliert, aufgereinigt und in cytosolische und mitochondriale Fraktion aufgetrennt. **(A)** Die Behandlung der Zellen mit Staurosporin (STS) führt nach 4 h zu einem Abrunden und Ablösen der Zellen. STS wird als Positivkontrolle eingesetzt, da es bekanntlich den intrinsischen Signalweg der Apoptose auslöst (s. auch 1.3.1.2). **(B)** Die Behandlung von MMTV-PyMT Zellen mit dem IK-Kanalinhibitor TRAM-34 führt zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu morphologischen Änderungen der Zellen. **(C)** Durch die Behandlung mit STS konnte erwartungsgemäß in der cytosolischen Fraktion eine Bande bei 14 kDa detektiert werden, was dem erwarteten Molekulargewicht von Cytochrom C entspricht. Unter STS-stimulierten Bedingungen wurde auch die proteolytische Aktivierung der Caspase 3 (*Cleaved Caspase 3*) durch 17 und 19 kDa große Proteinfragmente

erfasst. Im Gegensatz dazu konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in den Proteinproben TRAM-34 behandelter Zellen cytosolisches Cytochrom C oder die aktivierte Caspase 3 nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle für die cytosolische Fraktion wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet. HSP 60 gilt als mitochondrialer Marker. **(D)** In der mitochondrialen Fraktion konnte erwartungsgemäß in allen Proben ein positives Signal für Cytochrom C detektiert werden. Als Ladungskontrollen dienten die mitochondrialen Marker COX IV (17 kDa) und HSP 60 (60 kDa). Die Reinheit der mitochondrialen Fraktion wurde durch die Inkubation der Membran mit dem cytosolischen Marker  $\alpha$ -Tubulin bestätigt. (IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; DMSO: Dimethylsulfoxid; STS: Staurosporin; EtOH: Ethanol; TRAM-34 :Triarylmethan-34; h: Stunden; kDa: Kilodalton; M: Marker, C: Kontrolle; T: TRAM-34; HSP 60: Hitzeschockprotein 60; COX IV: Cytochrom C-Oxidase IV)

## 5.2.4 Einfluss des IK-Kanals auf $[Ca^{2+}]_i$ -Signale muriner Brusttumorzellen

$[Ca^{2+}]_i$ -Signale übernehmen im Zuge des Zellwachstums und der Zellproliferation wichtige Funktionen (s. 1.3.1).<sup>174,334</sup> Auch  $K^+$ -Ionenkanäle, darunter insbesondere  $K_{Ca}$ , sind bekanntermaßen wichtige Determinanten der Dynamik zellulärer  $Ca^{2+}$ -Signale.<sup>29</sup> Daher sollte untersucht werden, ob die pharmakologische Inhibition bzw. genetische Ablation des IK-Kanals zu veränderten  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen in murinen Brusttumorzellen führt. Dazu wurden zwei verschiedene experimentelle Konfigurationen, die auf der Bestimmung akuter bzw. spontaner Calciumsignale beruhen, angewendet (s. Abb. 4.7 bzw. Abb. 4.8).

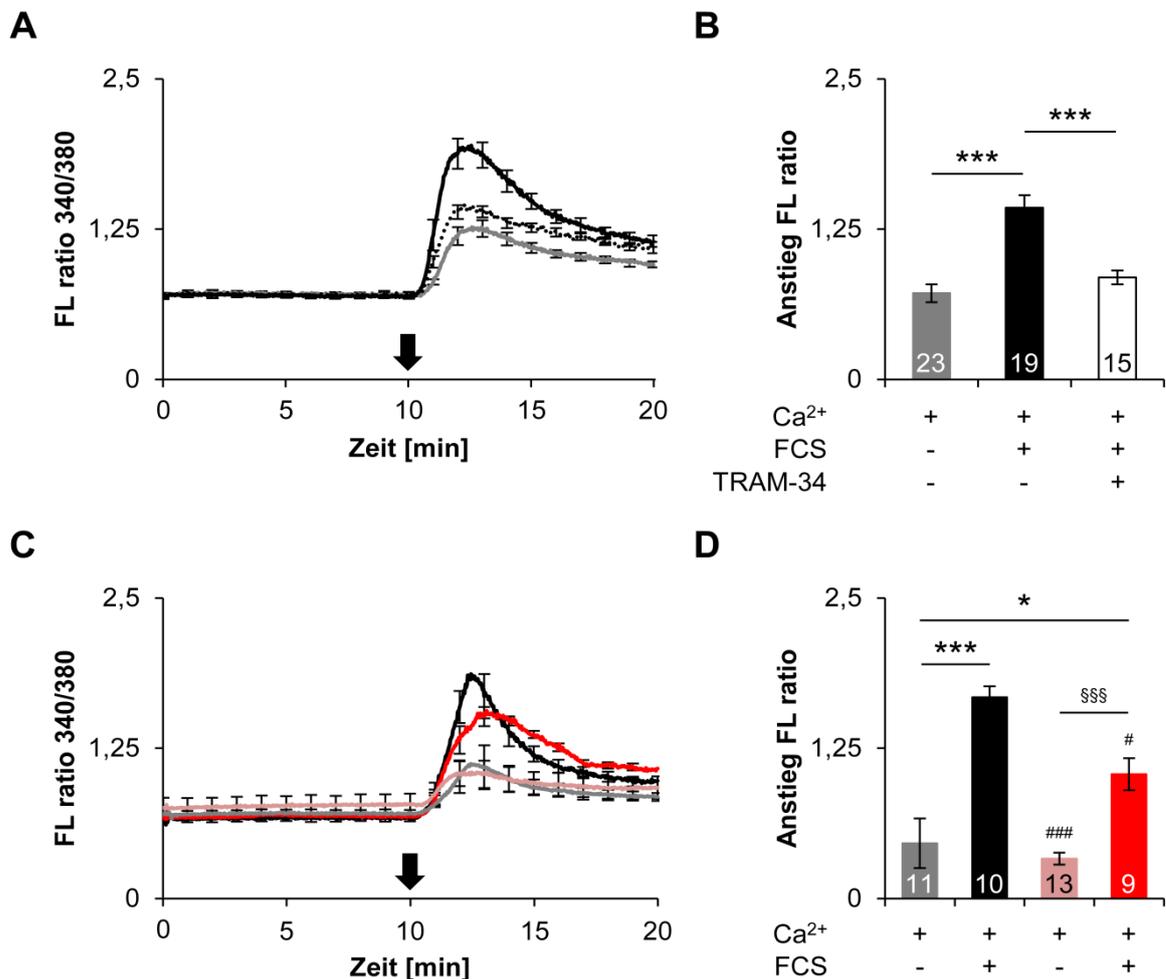
### 5.2.4.1 Rolle von IK für die Amplitude der akuten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale

Ein möglicher Einfluss der IK-Kanäle auf seruminduzierte Veränderungen von  $[Ca^{2+}]_i$  in murinen Brusttumorzellen wurde in einem Setup ermittelt, das auf akut evozierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen basiert. Dazu werden die Zellen wie in 4.9 beschrieben arretiert und anschließend gemessen. Für alle Messungen wurde das Basalniveau durch Inkubation der Zellen mit  $Ca^{2+}$ -freiem Inkubationspuffer bestimmt und der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nach den Behandlungen anschließend auf den Ausgangswert relativiert.

Abb. 5.10 A zeigt den Einfluss der pharmakologischen IK-Kanalinhibition auf die  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in MMTV-PyMT IK-WT Zellen. Die Zellen wurden zuerst für 10 min in  $Ca^{2+}$ -freiem Inkubationspuffer (s. 3.4.8) gemessen. In diesem Zeitraum bleibt das Fluoreszenzverhältnis des ratiometrischen  $Ca^{2+}$ -Sensors FURA-2 340/380 (FL-Ratio 340/380) und somit  $[Ca^{2+}]_i$  konstant. Eine anschließende Superfusion mit Calciumpuffer führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses um  $0,7167 \pm 0,0746$ , was auf eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  schließen lässt. Dieser Effekt lässt sich durch serumhaltigen Superfusionspuffer (enthält 5% FCS), also die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit  $Ca^{2+}$  und Serum, signifikant auf  $1,4283 \pm 0,1043$  steigern. Der seruminduzierte Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Amplitude wird durch die pharmakologische Inhibition von IK in Gegenwart von TRAM-34 signifikant reduziert ( $0,8484 \pm 0,0570$ ). In Abb. 5.10 B sind die Spitzen der  $[Ca^{2+}]_i$ -Amplituden nach den einzelnen Behandlungen bezogen auf das Basalniveau dargestellt.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob die genetische Ablation des IK-Kanals  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in MMTV-PyMT Brusttumorzellen beeinflusst (s. Abb. 5.10 C). Auch hier wurden die Anstiege auf das Basalniveau normiert (s. Abb. 5.10 D). Durch die Superfusion mit serumfreien Calciumpuffer steigt das FURA-2 340/380 Fluoreszenzverhältnis in IK-WT Zellen um  $0,4592 \pm 0,2070$  und in IK-KO Zellen um  $0,3321 \pm 0,0497$  an. Das Fehlen des IK-Kanals hat demnach zumindest keinen signifikanten Einfluss auf den  $Ca^{2+}$ -Influx nach vorheriger  $Ca^{2+}$ -Deprivation. Analog zu den vorangegangenen Experimenten (s. Abb. 5.10 A+B) führte der Serumpuffer in beiden Genotypen zu einem signifikanten Anstieg des FURA-2 340/380 Fluoreszenzverhältnisses. Der serumabhängige Anstieg der

$[Ca^{2+}]_i$ -Amplitude war zudem in IK-WT Zellen ( $1,6726 \pm 0,0939$ ) im Vergleich zu IK-KO Zellen ( $1,0343 \pm 0,1326$ ) signifikant größer. Offensichtlich beeinflusst die genetische Ablation des IK-Kanals das Ansprechen der Brusttumorzellen auf seruminduzierte Calciumsignale.



**Abb. 5.10 Einfluss der IK-Kanalaktivität auf akute  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von MMTV-PyMT Brusttumorzellen**

Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht und anschließend mittels Serumentzug in der G1-Phase arretiert (s. 4.3.4).  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale wurden mithilfe von FURA-2 detektiert. Der Versuchsaufbau für die Messung der akuten  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale ist in Kapitel 4.9.1 beschrieben. **(A+B)** Einfluss der pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 auf akute  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale. **(A)** Die Zellen wurden zuerst mit  $Ca^{2+}$ -freiem Inkubationspuffer inkubiert. Nach 10 min wurde ein Pufferwechsel durchgeführt (schwarzer Pfeil). Durch die Superfusion der Zellen mit Calciumpuffer (graue Linie) konnte ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden. Dieser Anstieg konnte in Gegenwart von  $Ca^{2+}$  (1,8 mM) und Serum (5%; schwarze Linie) noch gesteigert werden. Eine gleichzeitige Inhibition des IK-Kanals (gestrichelte Linie) verringerte den seruminduzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ -Amplitude. (s. auch Hoang Y Nguyen, Diplomarbeit) **(B)** Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration wurde für jede Kondition auf das Basalniveau normalisiert. Die Analyse ergab, dass durch die Superfusion der Zellen mit  $Ca^{2+}$  und Serum (schwarzer Balken) ein signifikant höherer Anstieg ( $1,4283 \pm 0,1043$ ) von  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit  $Ca^{2+}$  ( $0,7167 \pm 0,0746$ ) (grauer Balken) erreicht wurde. Die Co-Applikation des IK-Kanalinhibitors TRAM-34 mit  $Ca^{2+}$  und Serum (weißer Balken) verringerte diesen Anstieg wiederum signifikant ( $0,8484 \pm 0,0570$ ). **(C+D)** Einfluss der genetischen Ablation des IK-Kanals auf akute  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale. **(C)** Die Zellen wurden zuerst mit  $Ca^{2+}$ -freiem Inkubationspuffer inkubiert. Nach 10 min wurde ein Pufferwechsel durchgeführt (schwarzer Pfeil). Durch die Superfusion von IK-WT Zellen mit Calciumpuffer (graue Linie) konnte ein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden ( $0,4592 \pm 0,2070$ ). Dieser Anstieg konnte durch die zusätzliche Applikation von Serum (schwarze Linie) signifikant gesteigert werden ( $1,6726 \pm 0,0939$ ). Auch in IK-KO Zellen führte die Applikation von Calcium zu einem Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$ -Signals ( $0,3321 \pm 0,0497$ ) (rosa Linie), welcher durch Co-Superfusion von  $Ca^{2+}$  mit Serum signifikant gesteigert werden konnte ( $1,0343 \pm 0,1326$ ) (rote Linie). **(D)** Der Anstieg von

$[Ca^{2+}]_i$  wurde für jede Kondition auf das Basalniveau normalisiert. Durch die gleichzeitige Applikation von  $Ca^{2+}$  und Serum konnte in IK-WT Zellen (schwarzer Balken) ein signifikant höherer Anstieg im Vergleich zur alleinigen Applikation von Calcium (grauer Balken) erfasst werden. Auch in IK-KO Zellen (rosa Balken vs. roter Balken) konnte eine solche Tendenz beobachtet werden. Interessanterweise stieg jedoch das Calciumsignal bei gleichzeitiger Superfusion mit Calcium und Serum in IK-WT Zellen signifikant höher an als in IK-KO Zellen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur (A+B: N = 15-23; C+D: N = 9-13). Ein p-Wert von  $*p < 0,05/***p < 0,001$  entspricht einem signifikanten/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den angegebenen Versuchsgruppen. Ein p-Wert von  $\#p < 0,05/###p < 0,001$  entspricht einem signifikanten/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den  $Ca^{2+}$  und serumbehandelten IK-WT Zellen und den  $Ca^{2+}$ -behandelten bzw. den  $Ca^{2+}$  und serumbehandelten IK-KO Zellen. Ein p-Wert von  $§§§p < 0,001$  entspricht einem höchstsignifikanten Unterschied zwischen den angegebenen Versuchsgruppen. ( $[Ca^{2+}]_i$ : Intrazelluläre Calciumkonzentration; FL ratio: Fluoreszenzverhältnis; min: Minute; FCS: Fetales Kälberserum; TRAM-34: Triarylmethan-34)

Auch diese Ergebnisse konnten in einem alternativen Brusttumormodell bestätigt werden. In MMTV-cNeu Zellen konnte ebenfalls durch die Applikation von Calciumpuffer ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration beobachtet werden. Die Superfusion mit Serumpuffer führt auch in diesen Zellen zu einem signifikant erhöhten  $Ca^{2+}$ -Anstieg, der wiederum TRAM-34 sensitiv ist (s. Anhang Abb. 7.3). Ein direkter Vergleich zwischen MMTV-cNeu IK-WT und IK-KO Zellen war nicht möglich, da die Etablierung der MMTV-cNeu positiven IK-KO Brusttumormodell Zellen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Dies ist dadurch bedingt, dass MMTV-cNeu Mäuse erst mit durchschnittlich 205 Tagen Brusttumore entwickeln<sup>260</sup> und die Rückzucht entsprechender IK-KO Tiere (s. 4.1.2) zudem über ein Jahr in Anspruch nahm.

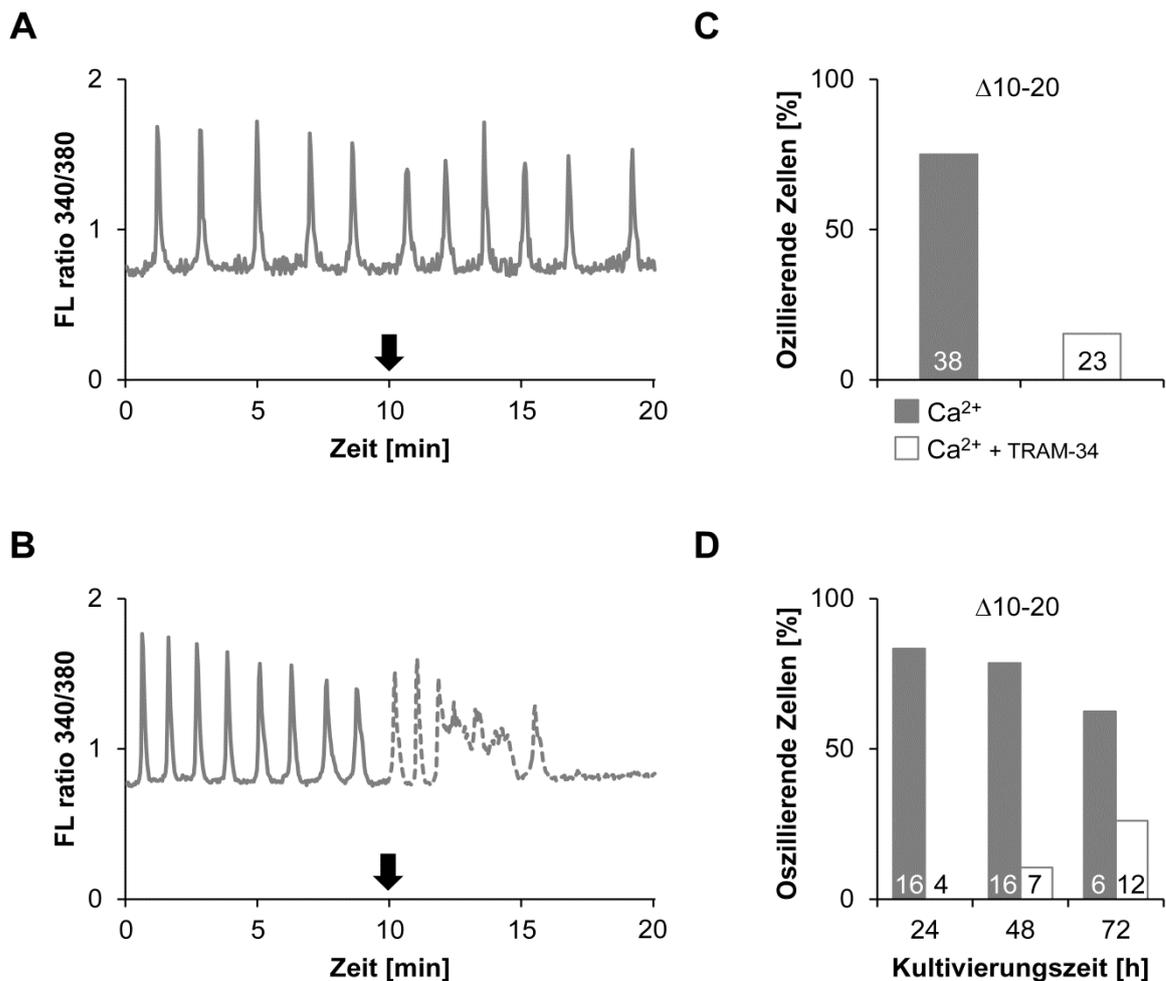
Eine veränderte bzw. fehlende IK-Kanalaktivität führt folglich zu einem verminderten seruminduzierten Calciumsignal in murinen Brusttumorzellen.

#### 5.2.4.2 *IK-abhängige Generierung spontaner $[Ca^{2+}]_i$ -Signale*

Spontane Calciumsignale wurden ohne Arretierung der Zellen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten (24, 48 und 72 h) bestimmt. Die Zellen wurden hierfür wie in 4.9.2 beschrieben ausgebracht und anschließend gemessen.

Die Behandlung der Zellen mit Calciumpuffer führt während des ersten Messintervalls ( $\Delta 0-10$  min) in ca. 12% Prozent der Zellen zu typischen Oszillationen von  $[Ca^{2+}]_i$ . Für die weitere Auswertung und Behandlung wurden nur diese Zellen mit spontanen  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen betrachtet. Zunächst wurde überprüft, inwiefern die Oszillationen durch eine Behandlung der Zellen mit TRAM-34 beeinflusst werden. Dazu wurde in der zweiten Messhälfte ( $\Delta 10-20$  min) entweder Calciumpuffer oder Calciumpuffer mit TRAM-34 10  $\mu$ M superfundiert. Abb. 5.11 A+B zeigt zwei repräsentative Oszillationsspuren von Zellen, die in der zweiten Messhälfte entweder mit Calciumpuffer (A) oder mit Calciumpuffer + TRAM-34 (B) behandelt wurden. Offensichtlich führt die Applikation von TRAM-34 zu einer deutlichen Reduktion der Amplitude, was bis zu einer Sistierung des Signals führen kann. Um quantitative Aussagen über diesen Befund machen zu können, wurde für jede Kondition die Anzahl der oszillierenden Zellen in dem Messintervall  $\Delta 0-10$  min bestimmt und auf 100% gesetzt. Anschließend wurde bestimmt, wie viele dieser Zellen unter den verschiedenen Behandlungen in dem Messintervall von  $\Delta 10-20$  min noch oszillierten. Für beide Konditionen ( $\pm$  TRAM-34) wurde zu jedem Zeitpunkt eine Reduktion der Anzahl oszillierender Zellen beobachtet. Durch die IK-Kanalinhibition war unabhängig von der Kultivierungsdauer eine Reduktion der oszillierenden Zellen (15,38%) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (75%) zu beobachten (s. Abb. 5.11 C). Auch eine detaillierte

Auswertung der verschiedenen Messzeitpunkte (24 bis 72 h) ergab, dass die IK-Kanalinhhibition zu einer Reduktion der oszillierenden Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte (s. Abb. 5.11 D). So war durch die TRAM-34 Behandlung nach 24 Stunden keine oszillierende Zelle mehr detektierbar. Bei alleiniger Superfusion der Zellen mit dem Calciumpuffer lag die Zahl der in  $\Delta 10-20$  min noch oszillierenden Zellen dagegen bei 83,33%. Nach 48 Stunden stieg der Wert in TRAM-34 behandelten Zellen auf 10,53% an, während 78,57% der unbehandelten Zellen spontane  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen zeigten. Nach 72-stündiger Kultivierung bleibt die Zahl der oszillierenden Zellen ohne Behandlung mit 62,5% hoch und durch die Kanalinhhibition reduzierte sich dieser Wert auf 26,09% (s. Abb. 5.11 D).



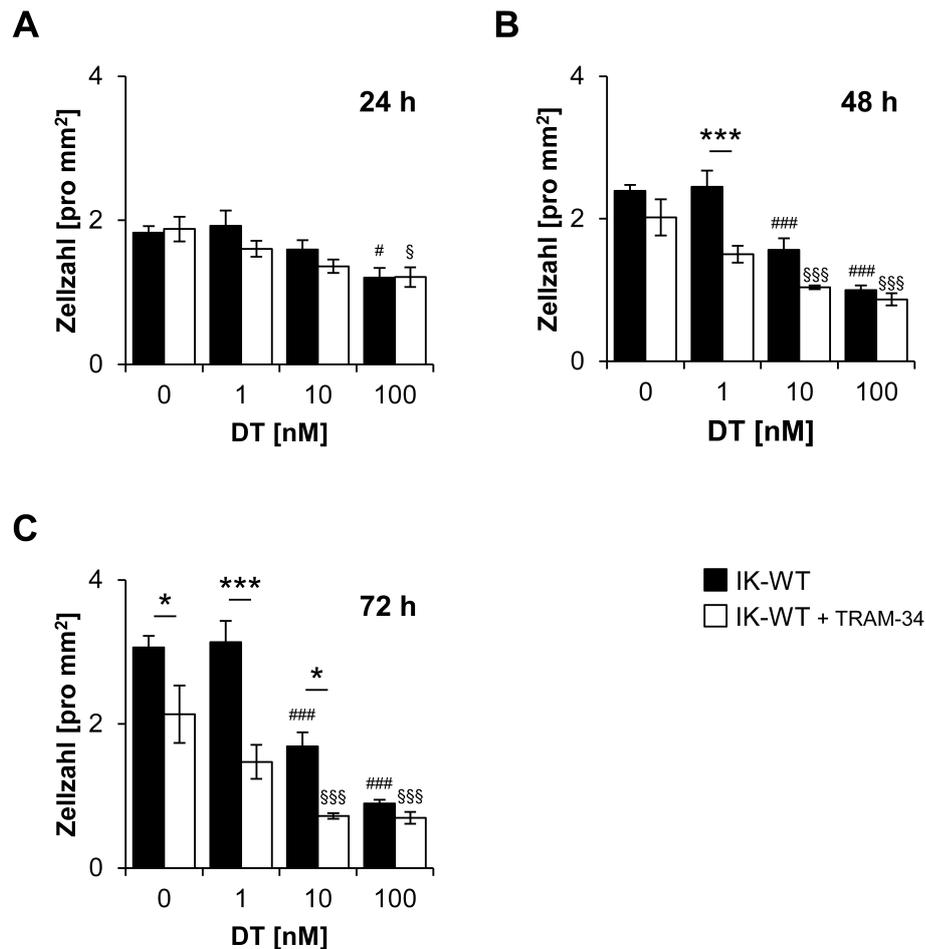
**Abb. 5.11 Einfluss der IK-Kanalaktivität auf spontane  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in MMTV-PyMT Brusttumorzellen**  
Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht. Die Erfassung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale erfolgte mittels FURA-2 nach 24-, 48- und 72-stündiger Kultivierung. Der Versuchsaufbau für die Messung der spontanen  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale ist in Kapitel 4.9.2 beschrieben. (A+B) Repräsentative  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von MMTV-PyMT Brusttumorzellen in (A) Abwesenheit oder (B) Anwesenheit des spezifischen IK-Kanalinhbibitors TRAM-34 (gestrichelte Linie). (C) Es wurde die Anzahl der noch oszillierenden Zellen in der zweiten Messhälfte ( $\Delta 10-20$ ) für alle Kultivierungszeitpunkte bestimmt. Durch die Applikation von  $Ca^{2+}$ -haltigem Inkubationspuffer (grauer Balken) in der zweiten Messhälfte wurden noch 75% oszillierende Zellen erfasst, während durch die Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 nur noch 17,33% der Zellen Oszillationen zeigten. (D) Die Anzahl der oszillierenden Zellen wurde für jeden Kultivierungszeitpunkt und jede Behandlung einzeln betrachtet. Zu allen Zeitpunkten wurde durch die Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 in der zweiten Messhälfte eine geringere Anzahl oszillierender Zellen beobachtet. (s. auch Hoang Y Nguyen, Diplomarbeit) ( $[Ca^{2+}]_i$ : Intrazelluläre Calciumkonzentration; FL ratio: Fluoreszenzverhältnis; min: Minute; FCS: Fetales Kälberserum; TRAM-34: Triarylmethan-34; h: Stunden)

### 5.2.5 Effekt der IK-Kanalaktivität auf die Zytostatikasensitivität der murinen Brusttumorzellen

Therapieresistenz gegenüber klassischen Zytostatika ist ein häufiges klinisches Phänomen.<sup>335,336</sup> Da die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, dass das Wachstum muriner Brusttumorzellen von der IK-Kanalaktivität abhängt (s. Abb. 5.4 und Abb. 5.5), sollte nun untersucht werden, ob die Inhibition bzw. Ablation von IK auch das Ansprechen der Zellen auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel (DT) positiv beeinflussen können. Die Untersuchung erfolgte mit den bereits eingeführten Grid-Platten (s. 4.6.1). Die Zellen wurden dazu wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht, arretiert und anschließend restimuliert. Dazu wurden die Zellen entweder mit Docetaxel, TRAM-34 oder einer Kombination der beiden Wirkstoffe behandelt. Des Weiteren wurde auch das Wachstum der IK-KO Zellen unter Docetaxel Behandlung untersucht. Es wurden drei verschiedene Docetaxel-Konzentrationen (1, 10 und 100 nM) eingesetzt.<sup>337</sup>

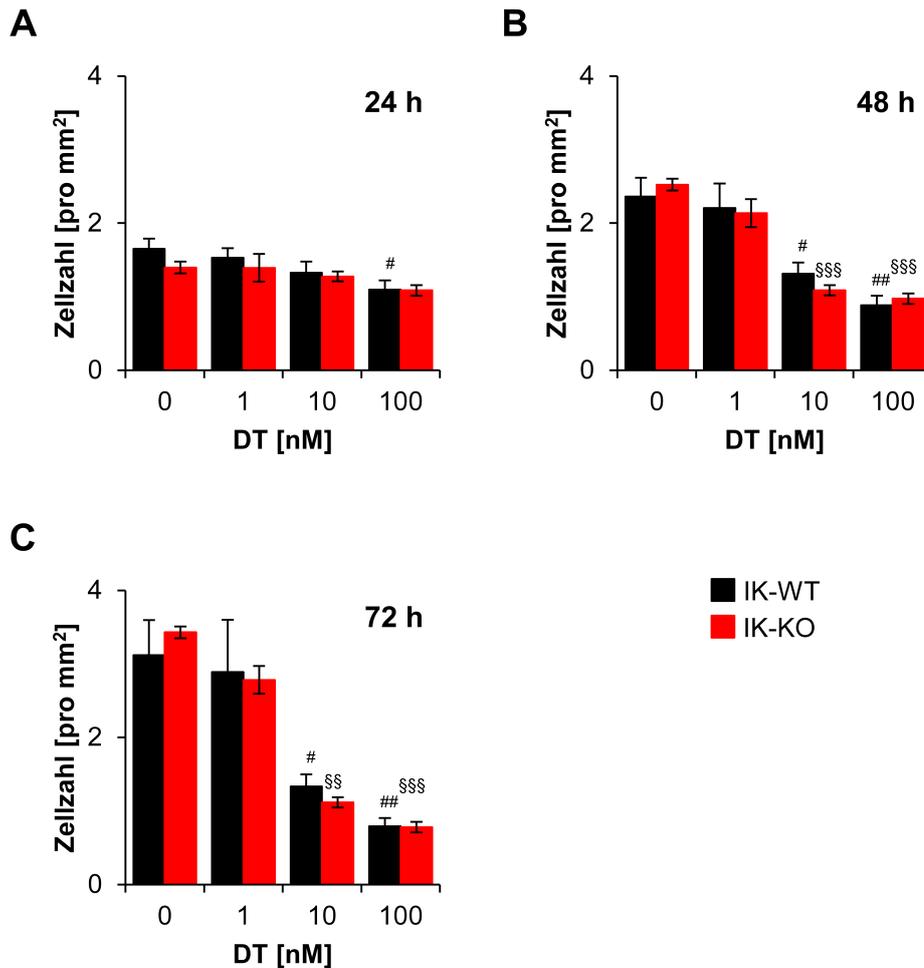
Abb. 5.12 zeigt die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung von MMTV-PyMT Brusttumorzellen mit TRAM-34 und Docetaxel. Wie bereits in Abb. 5.4 gezeigt, führte die Behandlung mit TRAM-34 nach 72 Stunden zu einem signifikant reduzierten Wachstum (s. Abb. 5.12 C). Die alleinige Applikation von DT 1 nM hatte nach 72 Stunden keinen Effekt auf das Wachstum ( $3,14 \pm 0,30$ ). Jedoch konnte durch die Kombinationsbehandlung mit TRAM-34 eine signifikant reduzierte Wachstumsrate erreicht werden ( $1,45 \pm 0,24$ ). Durch die Behandlung der Zellen mit DT 100 nM und 10 nM konnte bereits nach 24 (100 nM) bzw. 48 Stunden (10 nM) eine signifikante Reduktion der Zellzahl erzielt werden (s. Abb. 5.12 A+B). Nach 72 Stunden beträgt die Wachstumsrate durch die Behandlung mit DT 10 nM noch  $1,69 \pm 0,20$ , mit DT 100 nM noch  $0,90 \pm 0,05$ . Interessanterweise kann durch die gleichzeitige Applikation von TRAM-34 der Effekt der Behandlung mit DT 10 nM noch signifikant gesteigert werden. Nach 72 Stunden ist diese Kombinationsbehandlung mit einer Wachstumsrate von  $0,72 \pm 0,04$  sogar effektiver als die alleinige Applikation von DT 100 nM (s. Abb. 5.12 C).

Auch in den IK-defizienten Brusttumorzellen wurde die Docetaxelsensitivität überprüft (s. Abb. 5.13). Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen gezeigt (s. Abb. 5.12), konnte durch die alleinige Behandlung von IK-WT Zellen mit DT 1 nM keine Reduktion der Wachstumsrate erreicht werden (s. Abb. 5.13 C). Durch die Applikation von DT 100 nM ließ sich jedoch wie zuvor bereits nach 24 Stunden eine signifikante Verringerung der Zellzahl beobachten (s. Abb. 5.13 A). Nach 72 Stunden war der Effekt am größten (s. Abb. 5.13 C). Zudem konnte nach 48 Stunden durch DT 10 nM eine signifikante Reduktion des Wachstums erfasst werden (s. Abb. 5.13 B), was ebenfalls den in Abb. 5.12 gezeigten Daten entspricht. Ähnliche Befunde ließen sich auch für IK-KO Zellen beobachten: Durch die Behandlung mit DT 10 nM und 100 nM konnte ein signifikanter Unterschied der Wachstumsrate zu unbehandelten IK-KO Zellen ermittelt werden. Interessanterweise konnte jedoch im Gegensatz zur gleichzeitigen pharmakologischen Inhibition des IK (s. Abb. 5.12) mit keiner der verwendeten DT-Konzentrationen eine signifikant veränderte Wachstumsrate zwischen den beiden Genotypen bestimmt werden (s. Abb. 5.13 A-C).



**Abb. 5.12 Einfluss der pharmakologischen IK-Kanalinhhibition auf das Ansprechen von MMTV-PyMT Brusttumorzellen auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel**

Die Untersuchung erfolgte mithilfe der Grid-Platten. Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht, mittels Serumentzug in der G1-Phase arretiert und anschließend mit Docetaxel (DT) ± TRAM-34 behandelt. Dieser Zeitpunkt wurde als  $t = 0$  h definiert. Pro Schale wurde zu diesem Zeitpunkt von zwei definierten Koordinaten mit vier Quadranten ähnlicher Konfluenz ein Bild angefertigt. Dieser Vorgang wurde für dieselben Koordinaten alle 24 Stunden wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und auf den Wert von  $t = 0$  h normiert. Schwarze Balken zeigen Zellen, die ohne den spezifischen IK-Kanalinhistor TRAM-34 behandelt wurden, während weiße Balken Zellen repräsentieren, welche mit TRAM-34 behandelt wurden. Die Konzentration des Zytostatikums DT ist ebenfalls angegeben. **(A)** Nach 24-stündiger Restimulation führte die Behandlung mit der höchsten Docetaxel-Konzentration sowohl in TRAM-34 unbehandelten als auch in TRAM-34 behandelten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. **(B)** Die Kombinationsbehandlung von TRAM-34 mit Docetaxel 1 nM ist der alleinigen Applikation von Docetaxel signifikant überlegen. Ebenfalls kann in beiden Konditionen (± TRAM-34) ab einer Docetaxel Konzentration von 10 nM eine signifikante Reduktion der Zellzahl beobachtet werden. **(C)** Nach 72-stündiger Restimulation führt die Inhibition des IK-Kanals zu einer signifikant reduzierten Zellzahl. Die Kombinationstherapie ist folglich unabhängig von der Docetaxel-Konzentration immer effektiver als die alleinige Behandlung mit dem Zytostatikum. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 5-10$ ). Ein  $p$ -Wert von  $*p < 0,05$ / $***p < 0,001$  entspricht einem signifikanten/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den angegebenen Versuchsgruppen. Ein  $p$ -Wert von  $\#p < 0,05$ / $###p < 0,001$  entspricht einem signifikanten/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und DT-behandelten Zellen. Ein  $p$ -Wert von  $\$p < 0,05$ / $$$$p < 0,001$  entspricht einem signifikanten/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den TRAM-34 behandelten und co-behandelten Zellen. (DT: Docetaxel; nM: nanomolar; h: Stunden; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; TRAM-34: Triarylmethan-34)



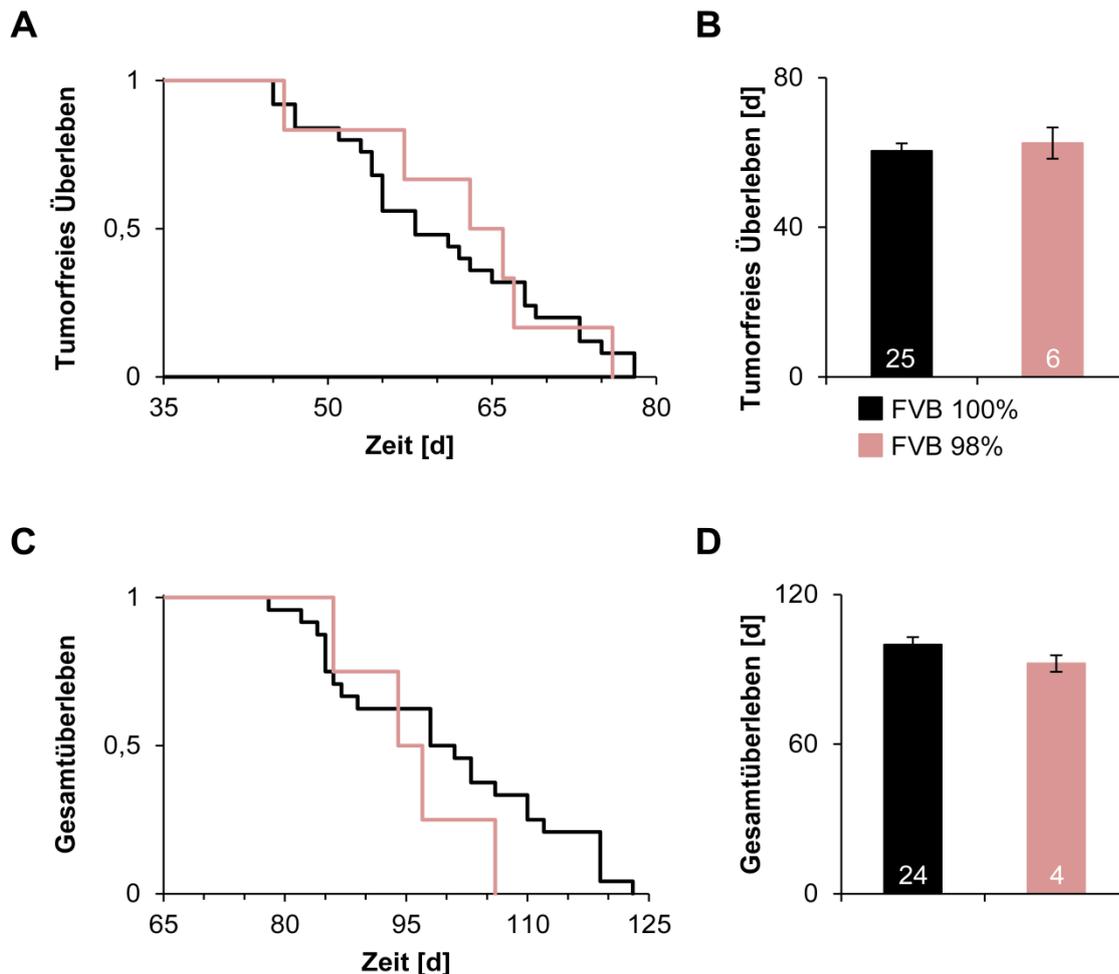
**Abb. 5.13 Einfluss der genetischen IK-Kanalablation auf das Ansprechen von MMTV-PyMT Brusttumorzellen auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel**

Die Untersuchung erfolgte mithilfe der Grid-Platten. Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht, mittels Serumentzug in der G1-Phase arretiert und anschließend mit der entsprechenden Docetaxel-Konzentration restimuliert. Dieser Zeitpunkt wurde als  $t = 0$  h definiert. Pro Schale wurde zu diesem Zeitpunkt von zwei Stellen mit vier Quadranten ähnlicher Konfluenz ein Bild angefertigt und die Koordinaten notiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde dieser Vorgang für die bereits definierten Koordinaten wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und auf den Wert von  $t = 0$  h normiert. IK-WT Zellen sind durch schwarze Balken dargestellt, IK-KO Zellen durch rote Balken. **(A)** Nach 24-stündiger Restimulation führte die Behandlung mit Docetaxel ab einer Konzentration von 10 nM in beiden Genotypen zu einer leichten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu unbehandelten Zellen. In IK-WT Zellen konnte durch die Applikation der höchsten Docetaxel-Konzentration (100 nM) eine signifikante Reduktion der Wachstumsrate erreicht werden ( $1,65 \pm 0,14$  vs.  $1,10 \pm 0,12$ ). **(B)** In beiden Genotypen führen Behandlungen mit Docetaxel 10 nM (WT:  $1,31 \pm 0,15$ ; KO:  $1,09 \pm 0,04$ ) bzw. 100 nM (WT:  $0,88 \pm 0,13$ ; KO:  $0,97 \pm 0,04$ ) nach 48-stündiger Kultivierung zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums verglichen mit unbehandelten Zellen (WT:  $2,36 \pm 0,26$ ; KO:  $2,52 \pm 0,33$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen konnte nicht beobachtet werden. **(C)** In beiden Genotypen führen Behandlungen mit Docetaxel 10 nM (WT:  $1,33 \pm 0,16$ ; KO:  $1,12 \pm 0,05$ ) bzw. 100 nM (WT:  $2,89 \pm 0,71$ ; KO:  $2,78 \pm 0,69$ ) nach 72-stündiger Kultivierung zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums verglichen mit unbehandelten Zellen (WT:  $3,12 \pm 0,49$ ; KO:  $3,43 \pm 0,57$ ). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 6-7$ ). Ein p-Wert von # $p < 0,05$ /## $p < 0,01$  entspricht einem signifikanten/hochsignifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und DT-behandelten IK-WT Zellen. Ein p-Wert von \$\$\$ $p < 0,01$ /\$\$\$\$ $p < 0,001$  entspricht einem hochsignifikanten/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und DT-behandelten IK-KO Zellen. (DT: Docetaxel; nM: nanomolar; h: Stunden; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout).

### 5.2.6 Einfluss des IK-Kanals auf die murine Tumorigenese *in vivo*

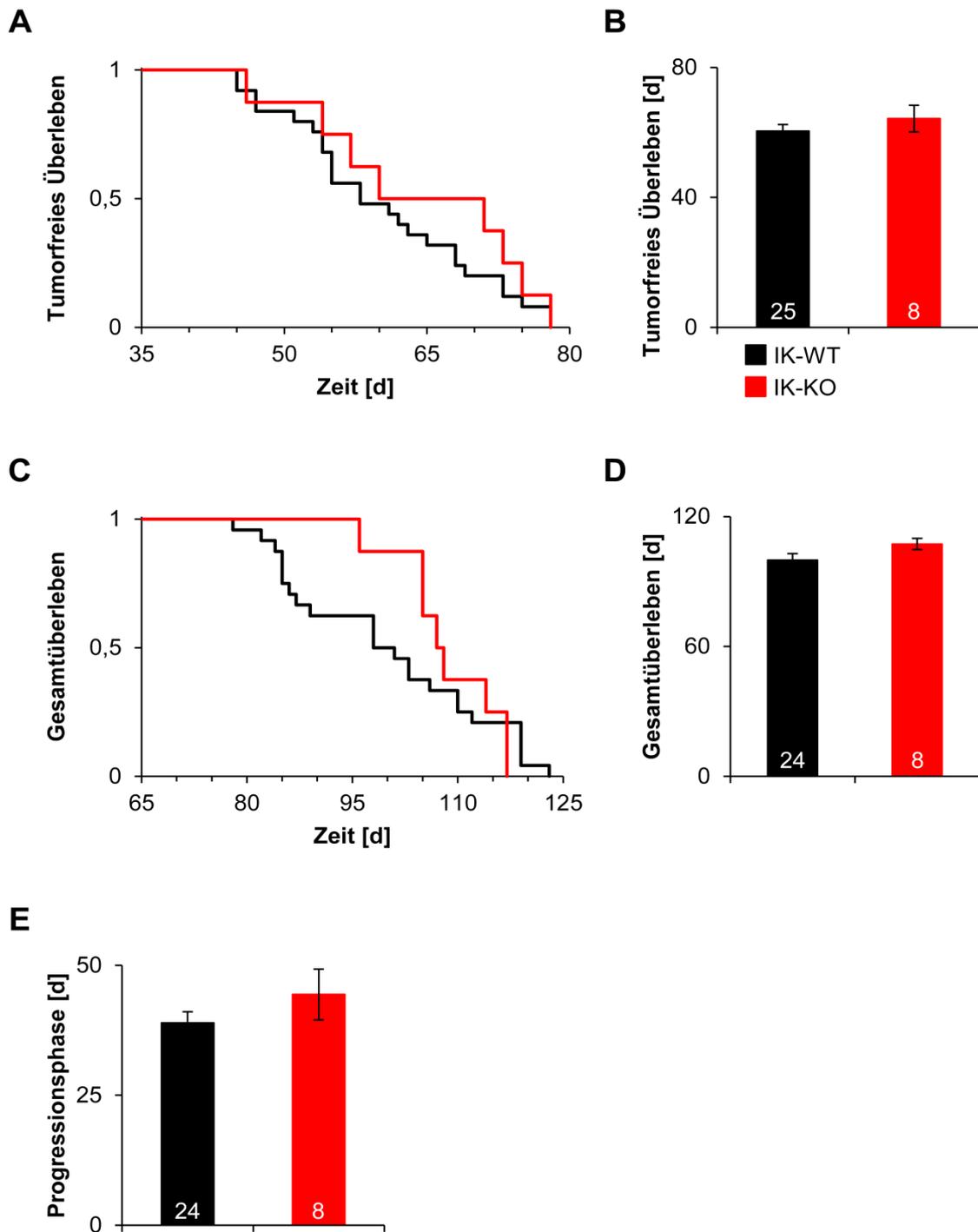
In den vorangehenden Abschnitten wurde die Funktion des IK-Kanals für das Wachstum und  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale *in vitro* ausführlich charakterisiert. Die Bedeutung dieser Ergebnisse sollte nun anhand geeigneter Ganztiermodelle *in vivo* validiert werden. Hierfür wurden etablierte Mausmodelle, das MMTV-PyMT und MMTV-cNeu Mausmodell, verwendet. Details zu diesen Mauslinien und deren Haltung sowie Genotypisierung sind in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.3 beschrieben. Ziel war es letztlich, die Bedeutung des IK für die Tumorigenese in MMTV-PyMT und MMTV-cNeu Tieren zu untersuchen. Für diese Versuche wurden IK-defiziente tumoranfällige bzw. tumortragende MMTV-PyMT und MMTV-cNeu Mäuse mit den entsprechenden Mäusen vom IK Wildtyp verglichen. Da der genetische Hintergrund einen erheblichen Einfluss auf die Tumorentstehung hat, wurden zuerst IK-KO Tiere vom C57Bl/6- auf einen FVB-Hintergrund zurückgekreuzt (s. 4.1.2). Dadurch wurden MMTV-PyMT IK-WT Tiere sowie IK-KO mit einem FVB-Anteil > 98% generiert. Nun sollte überprüft werden, ob durch diese Rückzucht der Entstehungszeitpunkt der Tumore beschleunigt werden kann. Daher wurde der Zeitpunkt der Tumorentstehung von MMTV-PyMT IK-WT Tieren aus der Rückzucht mit dem von MMTV-PyMT bzw. MMTV-cNeu WT Tieren mit einem 100%igen FVB-Hintergrund verglichen (s. Abb. 5.14). Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass sowohl das tumorfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben in zurückgekreuzten MMTV-PyMT IK-WT und MMTV-PyMT Tieren auf reinem FVB-Hintergrund identisch ist (s. Abb. 5.14 A+C). Die Analyse erfolgte mit dem Log-Rank-Test. MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) entwickeln durchschnittlich nach  $60 \pm 2$  Tagen den ersten Tumor. Bei MMTV-PyMT Tieren (FVB 98%) konnte nach durchschnittlich  $63 \pm 4$  Tagen das erste Mal ein Tumor getastet werden (s. Abb. 5.14 B). Das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors) wurde für reine FVB Tiere nach  $100 \pm 3$  Tagen erreicht, bei zurückgekreuzten Tieren wurde dieser Zeitpunkt nach  $92 \pm 3$  Tagen erreicht (s. Abb. 5.14 D). Diese Daten belegen, dass ein FVB-Anteil von über 98% ausreicht, um eine Beschleunigung des Tumorwachstums zu erzielen, welches dem von MMTV-PyMT Tieren (FVB 100%) entspricht.

Im Folgenden wurde der Einfluss der genetischen Ablation des IK-Kanals auf das tumorfreie Überleben sowie auf das Gesamtüberleben von MMTV-PyMT Tieren untersucht (s. Abb. 5.15). Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen keinen signifikanten Vorteil für MMTV-PyMT IK-KO bezüglich des tumorfreien Überlebens (s. Abb. 5.15 A). IK-WT Tiere entwickeln nach  $60 \pm 2$  Tagen den ersten Tumor, IK-KO Tiere nach  $64 \pm 4$  Tagen (s. Abb. 5.15 B). Auch das Gesamtüberleben lässt sich durch die genetische Ablation des IK-Kanals nicht signifikant beeinflussen (s. Abb. 5.15 C): MMTV-PyMT IK-WT Tiere erreichen nach  $100 \pm 3$  Tagen das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors), MMTV-PyMT IK-KO Mäuse nach  $107 \pm 3$  Tagen (s. Abb. 5.15 D). Ebenfalls wurde die Tumorprogression bestimmt, also die Zeitspanne zwischen Erstpalpation und Abbruchkriterium (s. Abb. 5.15 E). Auch diese war durch das Fehlen des IK-Kanals nicht signifikant verändert und betrug für MMTV-PyMT IK-WT Tiere  $39 \pm 2$  Tage und für IK-KO Tiere  $44 \pm 5$  Tage.



**Abb. 5.14 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) und MMTV-PyMT Tiere (FVB > 98%)**

Da der genetische Hintergrund von Mäusen einen erheblichen Einfluss auf die Tumorentstehung hat, wurden IK-WT und IK-KO Tiere über sechs Generationen auf einen FVB/N-Hintergrund zurückgekreuzt (FVB-Anteil > 98%) (s. 4.1.2). Die Rückzucht wurde durch einen Vergleich der MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) (schwarze Kurven und Balken) mit MMTV-PyMT Tieren (FVB 98%) (rosa Kurven und Balken) überprüft. Für alle hier gezeigten Versuche wurden daher zunächst nur Wildtypgeschwister der generierten IK-KO mit MMTV-PyMT Tieren (FVB 100%) verglichen. Haltung und Genotypisierung der Tiere sind in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.3 beschrieben. Die Palpation der Tumore erfolgte nach dem Protokoll in 4.2.1. **(A)** Die Kaplan-Meier-Kurven belegen, dass das tumorfreie Überleben zwischen MMTV-PyMT (FVB 100%) und MMTV-PyMT (FVB > 98%) Tieren nicht signifikant verändert ist. **(B)** Das mittlere tumorfreie Überleben ist für die beiden Kohorten nicht verändert. MMTV-PyMT Mäuse (FVB 100%) entwickeln nach  $60 \pm 2$  Tagen den ersten Tumor, MMTV-PyMT Tiere (FVB > 98%) nach  $63 \pm 4$  Tagen. **(C)** Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass das Gesamtüberleben der beiden Kohorten nicht signifikant verschieden ist. **(D)** Das mittlere Gesamtüberleben ist für beide Gruppen nicht signifikant verändert. MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) erreichen nach  $100 \pm 3$  Tagen das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors), MMTV-PyMT Tiere aus der Rückzucht nach  $92 \pm 3$  Tagen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Log-Rank-Test (A+C) bzw. mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben (B+D). (d: Tage; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; RZ: Rückzucht)

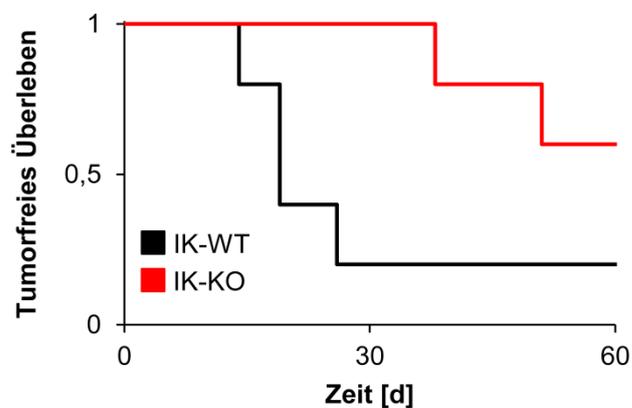


**Abb. 5.15** Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT IK-WT Tiere und MMTV-PyMT IK-KO Tiere

Die Tiere wurden wie in 4.1 beschrieben gezüchtet und genotypisiert. Anschließend erfolgten die Untersuchungen zur Tumorentstehung und dem Tumorwachstum von MMTV-PyMT IK-WT (schwarz) und IK-KO (rot) Tieren gemäß des in 4.2.1 beschriebenen Protokolls. **(A)** Die Kaplan-Meier-Kurven belegen, dass sich das tumorfreie Überleben der MMTV-PyMT IK-WT und IK-KO Tieren nicht signifikant unterscheidet. **(B)** Das mittlere tumorfreie Überleben ist für die beiden Kohorten nicht verändert. MMTV-PyMT IK-WT Tiere entwickeln nach  $60 \pm 2$  Tagen den ersten Tumor, MMTV-PyMT IK-KO Tiere nach  $64 \pm 4$  Tagen. **(C)** Die Kaplan-Meier Darstellung des Gesamtüberlebens der beiden Kohorten sowie **(D)** das mittlere Gesamtüberleben zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. MMTV-PyMT IK-WT Tiere erreichen nach  $100 \pm 3$  Tagen das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors), MMTV-PyMT IK-KO Tiere nach  $107 \pm 3$  Tagen. **(E)** Die Zeitspanne zwischen Erstpalpation und Erreichen des Abbruchkriteriums wurde als Progressionsphase definiert. Auch hier hatten IK-defiziente MMTV-PyMT Tiere mit  $44 \pm 5$  Tagen keinen signifikanten Vorteil gegenüber den entsprechenden WT-Kontrollen ( $39 \pm 2$  Tage). Die statistische Auswertung

der Daten erfolgte mit dem Log-Rank-Test (A+C) bzw. mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben (B+D+E). (d: Tage; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)

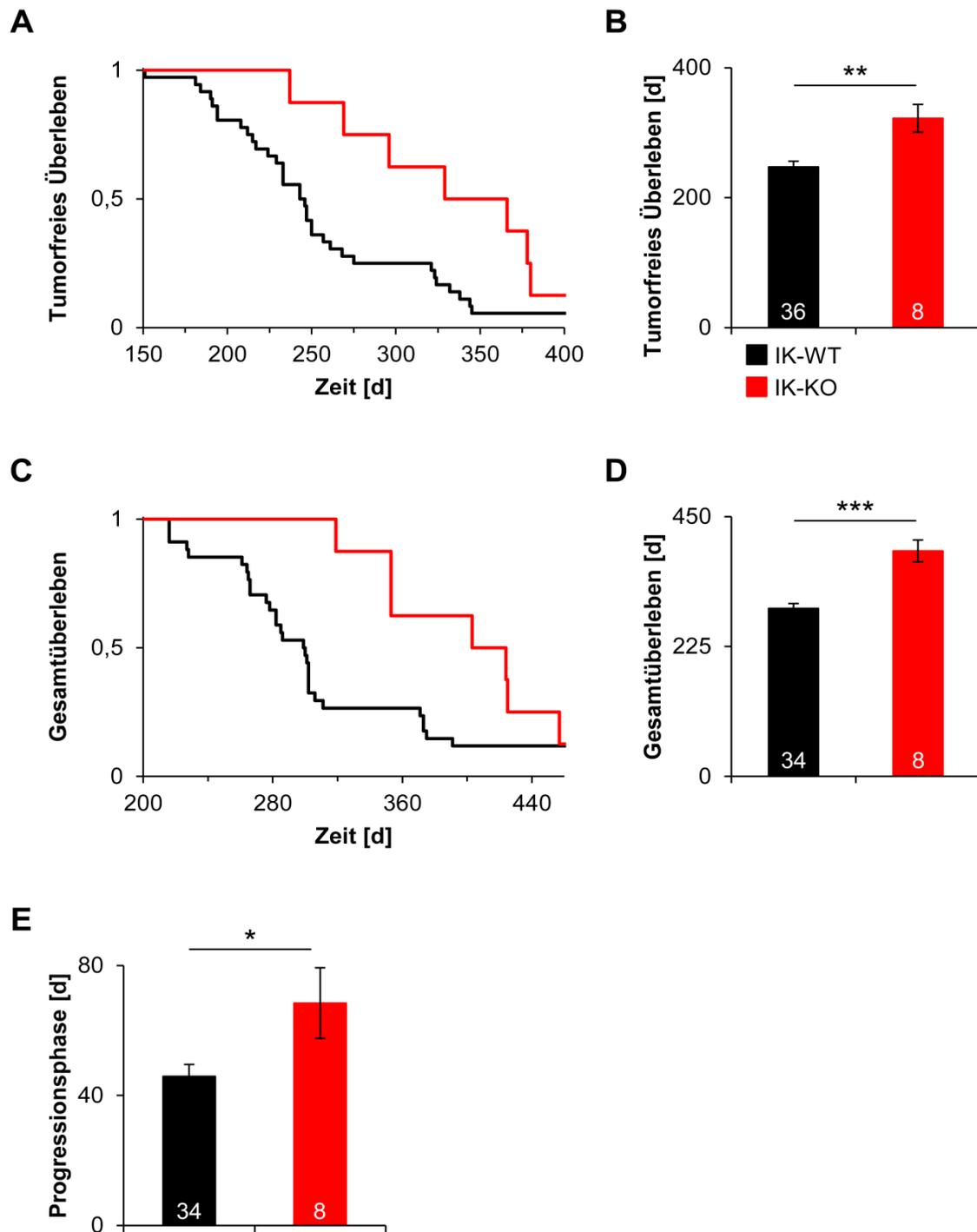
Da IK-Kanäle bekanntlich auch in Zellen des Immunsystems wie T- und B-Lymphozyten exprimiert werden und deren Aktivität maßgeblich regulieren,<sup>61,64,338-340</sup> könnte ein möglicher positiver Effekt der IK-Kanalablation durch eine unzureichende Aktivierung des Immunsystems verschleiert werden. Diese Hypothese wurde daher mithilfe einer orthotopen Allotransplantation von MMTV-PyMT IK-WT bzw. IK-KO Zellen in FVB/N Wildtypiere überprüft (s. 4.2.4). In Abb. 5.16 sind die vorläufigen Befunde dieses Experimentes dargestellt. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt, dass während eines Beobachtungszeitraumes von 60 Tagen nur zwei Tiere, in welche IK-KO Zellen transplantiert worden waren, einen Tumor entwickelt hatten. Bei den entsprechenden Kontrolltieren waren es bereits vier Tiere. Zudem war das tumorfreie Überleben in IK-KO transplantierten Tieren signifikant verlängert. (IK-WT:  $20 \pm 2$  Tage; IK-KO:  $45 \pm 7$  Tage) (s. Abb. 5.16).



**Abb. 5.16 Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach orthotoper Allotransplantation von MMTV-PyMT IK-WT bzw. IK-KO Brusttumorzellen in FVB/N Wildtypiere Tiere**

Die orthotopie Allotransplantation der Tumorzellen erfolgte wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben. Anschließend erfolgten die Untersuchungen zur Tumorentstehung und dem Tumorwachstum nach dem Protokoll in 4.2.1. Tiere, welche mit MMTV-PyMT IK-WT Zellen transplantiert wurden (IK-WT), sind schwarz dargestellt. Tiere, welche mit MMTV-PyMT IK-KO Zellen transplantiert wurden (IK-KO), sind rot dargestellt. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt ein signifikant verlängertes tumorfreies Überleben nach der Transplantation von IK-KO Zellen ( $45 \pm 7$  Tage) verglichen mit den entsprechenden IK-WT Kontrolltieren ( $20 \pm 2$  Tage) während des Beobachtungszeitraumes von 60 Tagen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Log-Rank-Test (N = 5). (IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal; WT: Wildtyp; KO: Knockout, d: Tage).

Zusätzlich wurde ein möglicher Einfluss der IK-Kanalablation in einem alternativen Mausmodell, dem MMTV-cNeu Modell, untersucht. Die Kaplan-Meier-Kurven belegen, dass das tumorfreie Überleben von MMTV-cNeu IK-KO Tieren im Vergleich zu den IK-WT Kontrolltieren signifikant verlängert ist (s. Abb. 5.17 A). So entwickeln MMTV-cNeu IK-WT Tiere bereits nach  $247 \pm 9$  Tage einen Tumor, IK-KO Tiere erst nach  $322 \pm 21$  Tagen (s. Abb. 5.17 B). Auch bezüglich des Gesamtüberlebens konnte durch die genetische Ablation von IK ein signifikanter Vorteil beobachtet werden (s. Abb. 5.17 C). Während MMTV-cNeu IK-WT Tiere bereits nach  $291 \pm 9$  Tagen das Abbruchkriterium erreichen (15 mm Maximaldurchmesser), ist dies bei IK-defiziente Tieren erst nach  $391 \pm 19$  Tagen der Fall (s. Abb. 5.17 D). Damit übereinstimmend war auch die Tumorprogression, also die Zeitspanne von Entstehungszeitpunkt bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums, in IK-defizienten MMTV-cNeu Tieren signifikant verlängert (IK-WT:  $46 \pm 4$  Tage; IK-KO:  $68 \pm 11$  Tage) (s. Abb. 5.17 E).



**Abb. 5.17 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-cNeu IK-WT Tiere und MMTV-cNeu IK-KO Tiere**

Die Tiere wurden wie in 4.1 beschrieben gezüchtet und genotypisiert. Anschließend erfolgten die Untersuchungen zur Tumorentstehung und dem Tumorwachstum von MMTV-cNeu IK-WT (schwarz) und IK-KO (rot) Tieren nach dem in 4.2.1 beschriebenen Protokoll. **(A)** Die Kaplan-Meier-Kurven belegen, dass das tumorfreie Überleben der MMTV-PyMT IK-KO verglichen mit IK-WT Tieren signifikant verlängert ist. **(B)** Das mittlere tumorfreie Überleben ist durch die genetische Ablation des IK-Kanals signifikant verlängert. MMTV-cNeu IK-WT Tiere entwickeln nach  $247 \pm 9$  Tagen den ersten Tumor, MMTV-PyMT IK-KO Tiere nach  $322 \pm 21$  Tagen. **(C)** Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens in IK-defizienten MMTV-cNeu Mäusen verglichen mit den IK-WT Kontrolltieren. **(D)** Das mittlere Gesamtüberleben ist in MMTV-PyMT IK-KO Tieren mit  $391 \pm 19$  Tagen verglichen mit IK-WT Tieren ( $291 \pm 9$  Tage) signifikant verlängert (Abbruchkriterium 15 mm Maximaldurchmesser des Tumors). **(E)** Die Zeitspanne zwischen Erstpalpation und Erreichen des Abbruchkriteriums wurde als Progressionsphase definiert. Auch hier hatten IK-defiziente MMTV-cNeu Tiere mit  $68 \pm 11$  Tagen einen signifikanten Vorteil gegenüber den

entsprechenden WT-Kontrollen ( $46 \pm 4$  Tage). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Log-Rank-Test (A+C) bzw. mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben (B+D+E). Ein p-Wert von \* $p < 0,05$ /\* $p < 0,05$ /\*\* $p < 0,001$  entspricht einem signifikanten/hochsignifikanten/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. (d: Tage; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)

## 5.3 Charakterisierung der Funktion des BK-Kanals im murinen Mammakarzinom

### 5.3.1 Expressionsanalyse des BK-Kanals in murinen Brusttumorzellen und -gewebe

Zuerst wurde die BK-Kanalexpression in MMTV-PyMT Brusttumorzellen und -gewebe nachgewiesen. Dies wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (s. 4.5) und auf Proteinebene über Membranpräparationen (s. 4.8.2) sowie mit immunhistochemischen Methoden (s. 4.7.2) ermittelt. Außerdem wurde über die Patch-Clamp-Technik (s. 4.4) überprüft, ob MMTV-PyMT Brusttumorzellen funktionale BK-Kanäle mit bekannten Eigenschaften exprimieren, die zudem durch den selektiven Inhibitor Paxilline hemmbar sind.

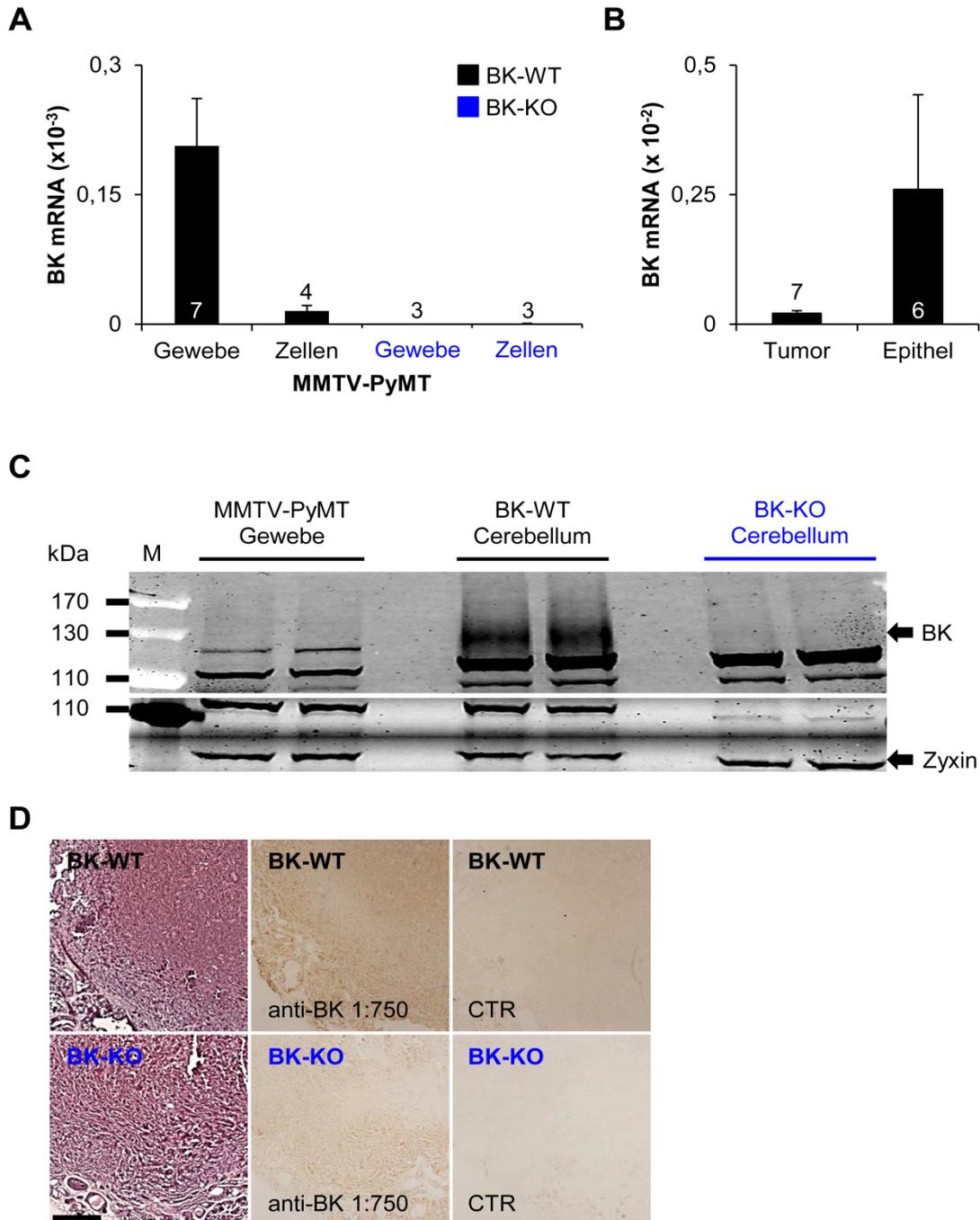
#### 5.3.1.1 Nachweis von BK mRNA in MMTV-PyMT Brusttumorproben

Die mRNA wurde wie in 4.5 beschrieben aus Gewebe bzw. Zellen isoliert, aufgereinigt und anschließend über qRT-PCR vervielfältigt. Die verwendeten Primer sind in 3.4.4 aufgeführt. Jede Probe wurde auf den internen Standard  $\beta$ -Actin normiert. Sowohl in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe als auch in -zellen konnten im Vergleich zu gesundem Brustepithel aus FVB/N-WT Mäusen nur sehr geringe BK mRNA Spiegel detektiert werden (s. Abb. 5.18 A+B). Erwartungsgemäß war in den korrespondierenden BK-KO Zellen und Gewebe jedoch kein spezifisches BK mRNA-Signal detektierbar (s. Abb. 5.18 A). Diese Befunde implizieren, dass BK mRNA im Zuge der Transformation des Brustdrüsenorgans herunterreguliert wird.

#### 5.3.1.2 Nachweis von BK Protein in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe mittels Membranpräparation

Mittels Membranpräparation, anschließender SDS-Gelelektrophorese und Western Blot sollte die Expression des BK-Kanals auf Proteinebene in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe untersucht werden. Um die Spezifität des Primäantikörpers zu überprüfen, wurden Membranproteinpräparationen aus dem Cerebellum von BK-WT und BK-KO Mäusen verwendet. Die Gewebeprobe wurde wie in 4.8.2 beschrieben entnommen und aufgereinigt. Nach der Auftrennung der Proteine über die SDS-PAGE (s. 4.8.5) wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert und diese wurde mit dem spezifischen BK-Antikörper RoCl (1:500) inkubiert (s. 3.4.7.3).

In MMTV-PyMT Brusttumorgewebe konnte eine spezifische Bande auf einer Höhe von ca. 130 kDa nachgewiesen werden, was dem Molekulargewicht des BK-Kanals entspricht (s. Abb. 5.18 C). Diese prominente Bande war auch in unterschiedlichen Proteinproben der BK-WT Cerebella nachweisbar, wohingegen Cerebella-Proben aus BK-KO Tieren kein entsprechendes Western Blot-Signal aufzeigten. Als Ladungskontrolle wurde Zyxin (1:200, 72 kDa) verwendet.



**Abb. 5.18 Expressionsanalyse von BK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen und -gewebe**

Die BK Expression wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (s. 4.5) und auf Proteinebene mithilfe der Membranpräparation und anschließendem Western Blot (s. 4.8.2) sowie immunhistochemischer Färbungen von Kryoschnitten (s. 4.7.2) untersucht. Standardmäßig wurden Gewebe und Zellen aus BK-KO Tieren mitgeführt. Die mRNA-Expressionslevel wurden auf den internen Standard  $\beta$ -Actin normiert. **(A)** Sowohl MMTV-PyMT BK-WT Brusttumorgewebe als auch -zellen exprimieren geringe Spiegel BK mRNA (schwarze Balken). In Gewebeprobe konnte ein Expressionslevel von  $0,2064 \times 10^{-3} \pm 0,0550 \times 10^{-3}$ , in Zellen von  $0,0152 \times 10^{-3} \pm 0,0063 \times 10^{-3}$  detektiert werden. Die Spezifität der verwendeten Primer wurde mithilfe entsprechender BK-KO Proben überprüft, in welchen erwartungsgemäß kein spezifisches BK mRNA/cDNA-Signal amplifiziert werden konnte (blaue Balken). **(B)** Der Vergleich von nicht-transformiertem Brustepithel aus FVB/N WT-Mäusen mit MMTV-PyMT Brusttumorgewebe ergab ein niedrigeres BK mRNA-Level für das Brusttumorgewebe ( $0,2064 \times 10^{-3} \pm 0,0550 \times 10^{-3}$  vs.  $0,2599 \times 10^{-2} \pm 0,1830 \times 10^{-2}$ ). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben. **(C)** Der Nachweis von BK-Protein in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe erfolgte mit der Membranpräparation und anschließendem Western Blot (s. 4.8.2). Die Inkubation der geblotteten Proben mit dem spezifischen BK-Primärantikörper RoCl (1:500) ergab ein spezifisches Signal auf einer Höhe von ca. 130 kDa in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe, was dem

erwarteten Molekulargewicht des BK-Kanals entspricht. Als Kontrollen wurden die Cerebella aus BK-WT und BK-KO Tieren mitgeführt. In den BK-WT Proben konnte ebenfalls BK-Protein nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß waren Proben aus BK-KO Tieren BK-Kanal negativ. Als Ladungskontrolle wurde Zyxin verwendet. (N = 2) **(D)** Der Nachweis von BK Protein in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe erfolgte außerdem mittels immunhistochemischer Färbung von Kryoschnitten. Verwendet wurde die DAB-Methode (s. 4.7.2). Es wurden sowohl Schnitte aus MMTV-PyMT BK-WT Brusttumorgewebe (obere Bildreihe, schwarze Beschriftung) als auch BK-KO Brusttumorgewebe gefärbt (untere Bildreihe, blaue Beschriftung). Für jeden Genotyp wurde eine H&E-Färbung angefertigt (linke Spalte). Zum Nachweis von BK wurden die Gewebeschnitte mit dem spezifischen BK-Primärantikörper RoCl 1:750 angefärbt (mittlere Spalte). Dabei konnte in BK-WT Schnitten ein positives Signal für BK in Form einer Braunfärbung detektiert werden (oberes mittleres Bild). Erwartungsgemäß blieben BK-KO Brusttumorschnitten ungefärbt (unteres mittleres Bild). Standardmäßig wurden bei jeder Färbung Schnitte mitgeführt, welche ohne Primärantikörper inkubiert wurden (rechte Spalte, CTR). In diesen konnte nach Zugabe des Sekundärantikörpers und Farbsubstrats keine Färbung detektiert werden, so dass eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden kann (N = 3). (BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; mRNA: messenger Ribonukleinsäure; WT: Wildtyp; KO: Knockout; MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigen*; kDa: Kilodalton; M: Marker; CTR: Kontrolle)

### 5.3.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von BK-Protein in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe

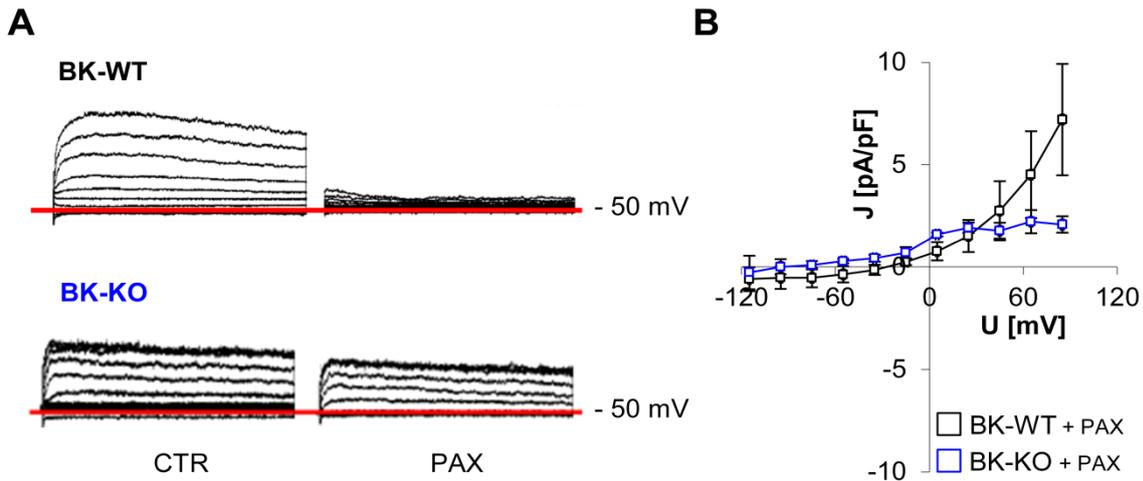
Die Ergebnisse der Membranpräparation wurden durch immunhistochemische Färbungen von Kryoschnitten unterstützt. Die Spezifität des Primärantikörpers (RoCl, s. 3.4.6) wurde in diesem Experiment durch die Verwendung von MMTV-PyMT BK-KO Brusttumorgewebe überprüft. Zum Nachweis des BK-Kanals wurde die DAB-Methode verwendet (s. 4.7.2). Außerdem wurden die Serienschnitte zur besseren Identifikation der Tumoren mit Hämatoxyllin und Eosin angefärbt (s. 4.7.1).

In BK-WT Gewebe konnte eine Braunfärbung detektiert werden (s. Abb. 5.18 D, oberes mittleres Bild). Im Gegensatz dazu wurde in BK-KO Geweben erwartungsgemäß keine Färbung nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden standardmäßig bei den Färbungen auch Schnitte mitgeführt, welche ohne BK-Primärantikörper inkubiert wurden. Durch Zugabe des Sekundärantikörpers und der Enzymsubstrate zu diesen Schnitten konnte weder in BK-WT noch in BK-KO ein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers lässt sich so ausschließen.

### 5.3.1.4 Funktionale Charakterisierung der BK-Kanäle in MMTV-PyMT Zellen mittels Patch-Clamp-Methode

In einer Kooperation mit der Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen wurden von Dr. Benjamin Stegen funktionale Analysen zur BK-Kanalexpression in MMTV-PyMT Brusttumorzellen mittels Patch-Clamp-Technik durchgeführt.

Abb. 5.19 A zeigt exemplarische Ganzzellströme (*whole cell configuration*, s. 4.4) in MMTV-PyMT BK-WT (oben) sowie BK-KO Brusttumorzellen (unten). Die Messung erfolgte in 20 mV-Schritten von -100 bis +100 mV bei einem Haltepotential von -50 mV. Nur in MMTV-PyMT BK-WT Zellen konnte durch die Zugabe von PAX 2  $\mu$ M eine Reduktion des Kaliumstroms beobachtet werden. Abb. 5.19 B zeigt die paxillinesensitive Fraktion J (pA/pF), welche durch die Subtraktion der Stromdichte in unbehandelten Zellen von der Stromdichte in PAX-behandelten Zellen bestimmt werden kann. Diese ist in MMTV-PyMT BK-WT Zellen ( $7,2100 \pm 2,7160$  pA/pF) erwartungsgemäß deutlich höher als BK-KO Zellen ( $2,0817 \pm 0,4013$  pA/pF).

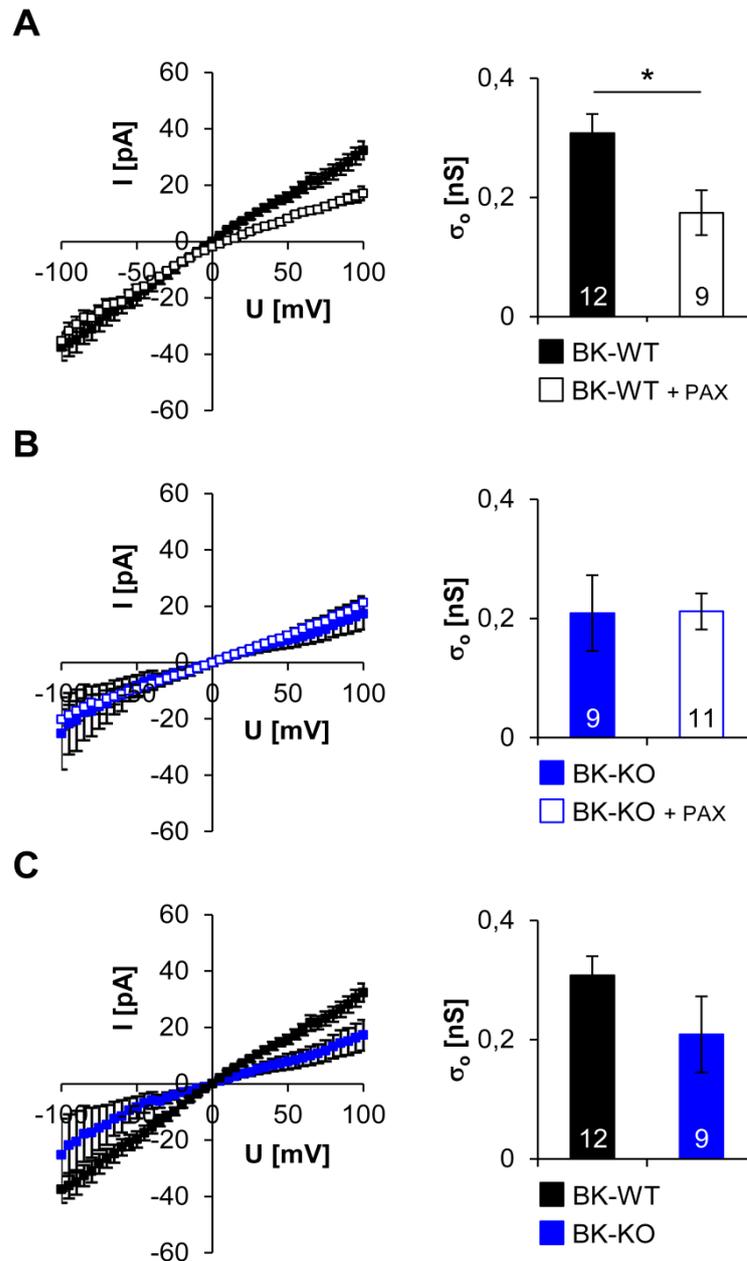


**Abb. 5.19 Funktionale Charakterisierung von BK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen mittels Patch-Clamp-Technik (*whole cell configuration*)**

Die Analysen wurden in einer Kooperation mit der Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen von Dr. Benjamin Stegen durchgeführt (s. 4.4). **(A)** Exemplarische Ganzzellströme einer MMTV-PyMT BK-WT Zelle (oben) und einer MMTV-PyMT BK-KO Zelle (unten) unter Kontrollbedingungen (links) und nach Zugabe des BK-Kanal Inhibitors Paxilline (rechts). Die Messung erfolgte in 20 mV-Schritten von -100 bis +100 mV bei einem Haltepotential von -50 mV. Paxilline führt ausschließlich in den MMTV-PyMT BK-WT Zellen zu einer Inhibition der BK-Kaliumströme. **(B)** In MMTV-PyMT BK-WT Zellen kann eine höhere PAX-sensitive Fraktion J ( $7,2100 \pm 2,7160$  pA/pF) als in BK-KO Zellen ( $2,0817 \pm 0,4013$  pA/pF) beobachtet werden. (BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout; PAX: Paxilline; mV: Millivolt; J: PAX-sensitive Fraktion; pA: Picoampère; pF: Picofarad)

Über die *cell attached configuration* (s. 4.4) wurden in MMTV-PyMT BK-WT Zellen ebenfalls BK-typische Ströme detektiert ( $0,3076 \pm 0,0320$  pA). Die Auswärtsleitfähigkeit  $\sigma_o$  konnte zudem durch Paxilline signifikant reduziert werden ( $0,1743 \pm 0,0377$  pA) (s. Abb. 5.20 A). BK-KO Zellen (s. Abb. 5.20 B) besitzen hingegen einen deutlich geringere Auswärtsleitfähigkeit ( $0,2089 \pm 0,0637$  pA), die erwartungsgemäß durch Paxilline nicht verändert wird ( $0,2119 \pm 0,0302$  pA). Abb. 5.20 C zeigt den Vergleich der Auswärtsleitfähigkeiten der beiden Genotypen. Insgesamt waren die Auswärtsströme in den BK-defizienten Zellen geringerer, jedoch erreichte der Unterschied zwischen den Genotypen nicht das Signifikanzniveau.

Die Expressionsanalysen zeigen zusammengenommen, dass sowohl MMTV-PyMT Brusttumorzellen als auch -gewebe funktionale BK-Kanäle exprimieren, die durch PAX hemmbar sind. In den entsprechenden BK-KO Proben wurden mittels unterschiedlicher Nachweismethoden keine spezifischen BK-Kanalsignale detektiert (s. Abb. 5.18, Abb. 5.19 und Abb. 5.20).



**Abb. 5.20 Funktionale Charakterisierung von BK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen mittels Patch-Clamp-Technik (*cell attached configuration*)**

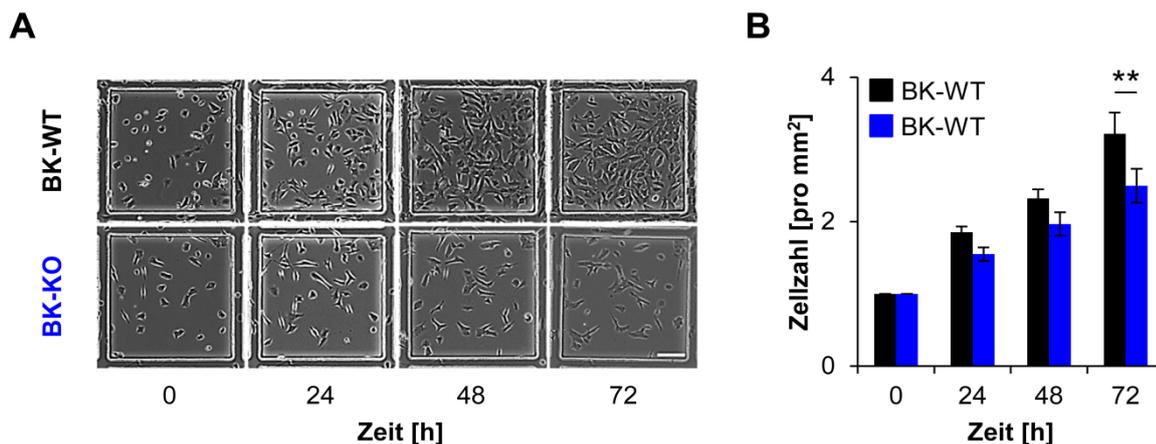
Die Analysen wurden in einer Kooperation mit der Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen von Dr. Benjamin Stegen durchgeführt (s. 4.4). Es wurden BK-Ströme in MMTV-PyMT BK-WT und BK-KO Zellen in An- oder Abwesenheit des spezifischen Inhibitors PAX untersucht. Die Messung erfolgte in 5 mV-Schritten von -100 bis +100 mV. Die Auswärtsleitfähigkeit  $\sigma_o$  wurde über die lineare Regression zwischen 65 mV und 100 mV bestimmt. **(A)** MMTV-PyMT BK-WT Zellen (schwarzer Balken) exprimieren funktionale BK-Kanäle mit einer Auswärtsleitfähigkeit  $\sigma_o$  von  $0,3076 \pm 0,0320$  pA, die PAX signifikant auf  $0,1743 \pm 0,0377$  pA reduziert (weißer Balken). **(B)** In BK-KO Zellen (blauer Balken) lassen sich weder spezifische BK-Ströme ( $0,2089 \pm 0,0637$  pA) noch eine Reduktion der Auswärtsleitfähigkeit durch PAX detektieren (weiße Balken) ( $0,2119 \pm 0,0302$  pA). **(C)** Die Auswärtsleitfähigkeiten von BK-WT und BK-KO Zellen wurden verglichen und kein signifikanter Unterschied ermittelt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben. Ein p-Wert von  $*p < 0,05$  entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. (I: Stromstärke; pA: Picoampère; U: Spannung; mV: Millivolt;  $\sigma_o$ : Auswärtsleitfähigkeit; nS: Nanosiemens; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; PAX: Paxilline; KO: Knockout)

### 5.3.2 Einfluss des BK-Kanals auf das Wachstumsverhalten muriner Brusttumorzellen

#### 5.3.2.1 Rolle von BK für das Wachstum muriner Brusttumorzellen

Ein möglicher Einfluss der BK-Kanalfunktion auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen wurde mithilfe der Grid-Platten (s. 4.6.1) untersucht. Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht und anschließend mittels Serumentzug arretiert (s. 4.3.4). Bereits makroskopisch lässt sich ein vermindertes Wachstum der MMTV-PyMT BK-KO Zellen erkennen (s. Abb. 5.21 A). Die Zellzahl wurde zu jedem Zeitpunkt für den jeweiligen Genotyp bestimmt und auf den Ausgangswert ( $t = 0$  h) normalisiert (s. Abb. 5.21 B). Nach 24 Stunden war die Wachstumsrate von BK-WT Zellen ( $1,86 \pm 0,08$ ) im Vergleich zu BK-KO Zellen ( $1,55 \pm 0,09$ ) bereits erhöht. Dieser Befund konnte 48 Stunden (BK-WT  $2,32 \pm 0,13$  vs. BK-KO  $1,97 \pm 0,16$ ) und 72 Stunden (BK-WT  $3,22 \pm 0,29$  vs. BK-KO  $2,50 \pm 0,24$ ) nach der Restimulation der Zellen bestätigt werden.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass eine genetische Ablation des BK-Kanals zu einem verminderten Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen führt.



**Abb. 5.21** Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen nach genetischer Ablation des BK-Kanals

Die Zellen wurden mithilfe von Grid-Platten (s. 4.6.1) untersucht, welche durch ein festes Koordinatensystem die Beobachtung definierter Stellen über einen längeren Zeitraum erlauben. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen durch einen 72-stündigen Serumentzug arretiert. Im Anschluss erfolgte die Restimulation. Alle 24 Stunden wurden über einen Gesamtzeitraum von 72 Stunden jeweils von denselben vier Quadranten Bilder angefertigt. Im Anschluss wurden die Zellen mit ImageJ gezählt und auf den Wert von  $t = 0$  h normiert. (A) Die Abbildungen zeigen einen der vier ausgezählten Quadranten (Durchmesser 0,5 mm) für jeden Zeitpunkt und jeden Genotyp. Bereits makroskopisch lässt sich erkennen, dass die genetische Ablation von BK zu einer geringeren Zellzahl im Vergleich zu BK-WT führt. (B) Die Auszählung ergab, dass sowohl die Zellzahl von BK-WT (schwarze Balken) als auch von BK-KO (blaue Balken) mit steigender Kultivierungsdauer zunahm. Zu allen Zeitpunkten konnte eine höhere Wachstumsrate für BK-WT Zellen erfasst werden. Dieser Unterschied erreichte nach 72 Stunden das Signifikanzniveau ( $3,22 \pm 0,29$  vs.  $2,50 \pm 0,24$ ). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 10-11$ ). Ein  $p$ -Wert von  $**p < 0,01$  entspricht einem hochsignifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. ( $\text{mm}^2$ : Quadratmillimeter; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout; h: Stunden)

### 5.3.2.2 BK-abhängige Zellzyklusanalysen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen

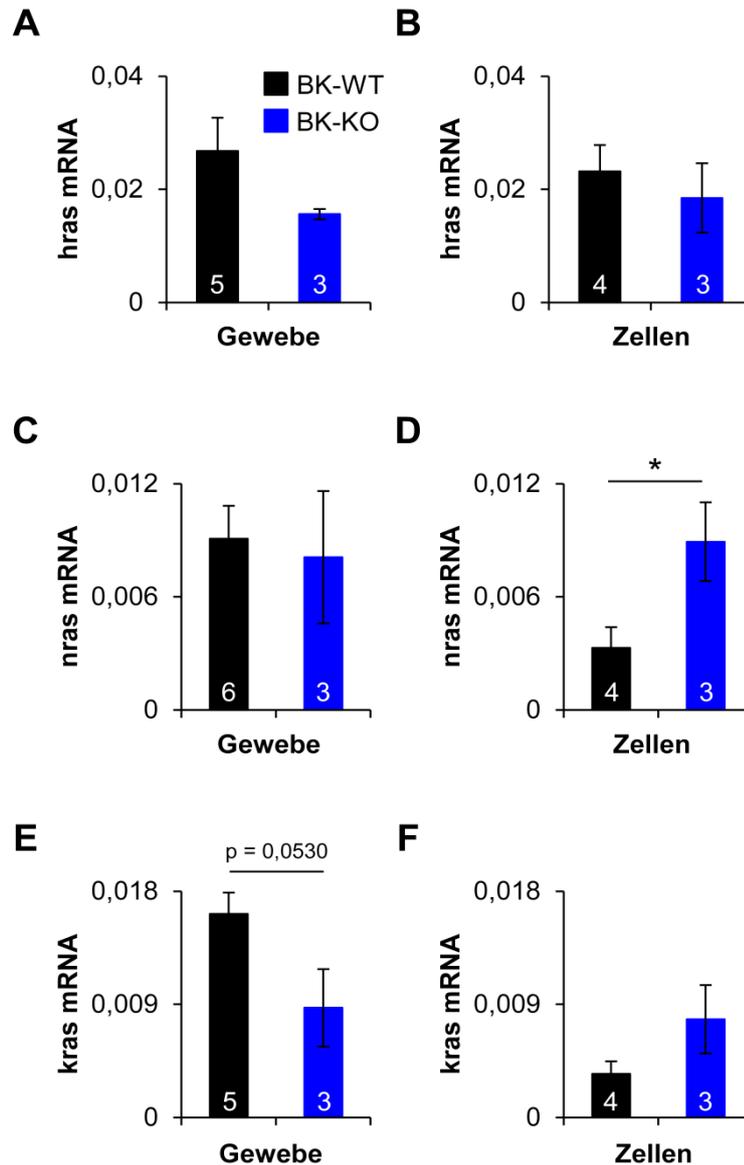
Die Ablation des BK-Kanals in MMTV-PyMT Brusttumorzellen führt also zu einer verminderten Wachstumsrate (s. 5.3.2.1). Dies könnte unter anderem dadurch bedingt sein, dass BK-Kanäle mit Zellzyklus-regulierenden Strukturen interagieren und darüber die Proliferation von Tumorzellen maßgeblich beeinflussen. Beispielsweise führt eine veränderte BK-Kanalaktivität in HeLa-Zellen sowie Endometriumkarzinomzellen zu einer reduzierten Proliferation, was unter anderem durch eine Interaktion von BK mit p53 bedingt ist.<sup>199</sup> Des Weiteren wurde berichtet, dass die Ras-vermittelte Induktion von Raf für die Induktion von BK-Kanälen in murinen Fibroblasten notwendig ist.<sup>246,341</sup>

Zuerst wurde die basale mRNA-Expression von p53 sowie der Ras-Subtypen *nras*, *kras* und *hras* in MMTV-PyMT Brusttumorproben in Abhängigkeit der BK-Kanalexpression mittels qRT-PCR untersucht. Wie in Abb. 5.22 dargestellt, konnte keine konstante Tendenz für eine unterschiedliche Expression der Ras-Subtypen in BK-WT und BK-KO Proben ermittelt werden. So war beispielsweise das  $\beta$ -Actin normierte Expressionslevel von *kras* in MMTV-PyMT BK-WT Brusttumorgewebe etwa doppelt so hoch ( $0,0162 \pm 0,0017$ ) wie in BK-KO Gewebe ( $0,0087 \pm 0,0031$ ), der Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Im Gegenzug konnte in MMTV-PyMT BK-KO Zellen ( $0,0089 \pm 0,0021$ ) eine signifikante Hochregulation von *nras* im Vergleich zu BK-WT Zellen ( $0,0033 \pm 0,0011$ ) beobachtet werden. Auch die Expressionsanalysen des Tumorsuppressorgens p53 zeigten in Abhängigkeit der BK-Kanalexpression keinen signifikanten Unterschied in Brusttumorgewebe oder Zellen (s. Abb. 5.23 A+B).

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die verminderte Wachstumsrate in MMTV-PyMT BK-KO Zellen (s. Abb. 5.21) auf einer veränderten Expression von p53 sowie der *immediate early genes* *c-fos* und *c-jun* in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer beruht. Dazu wurden die Zellen wie in 4.6.3.1 beschrieben ausgebracht, arretiert und für verschiedene Zeiträume (0,5 h, 1,5 h, 24 h) restimuliert. Eine Probe wurde jeweils zur Kontrolle unstimuliert belassen ( $t = 0$  h). Die Bestimmung der Expressionslevel erfolgte im Anschluss mittels qRT-PCR und Normierung auf den internen Standard  $\beta$ -Actin (s. 4.5).

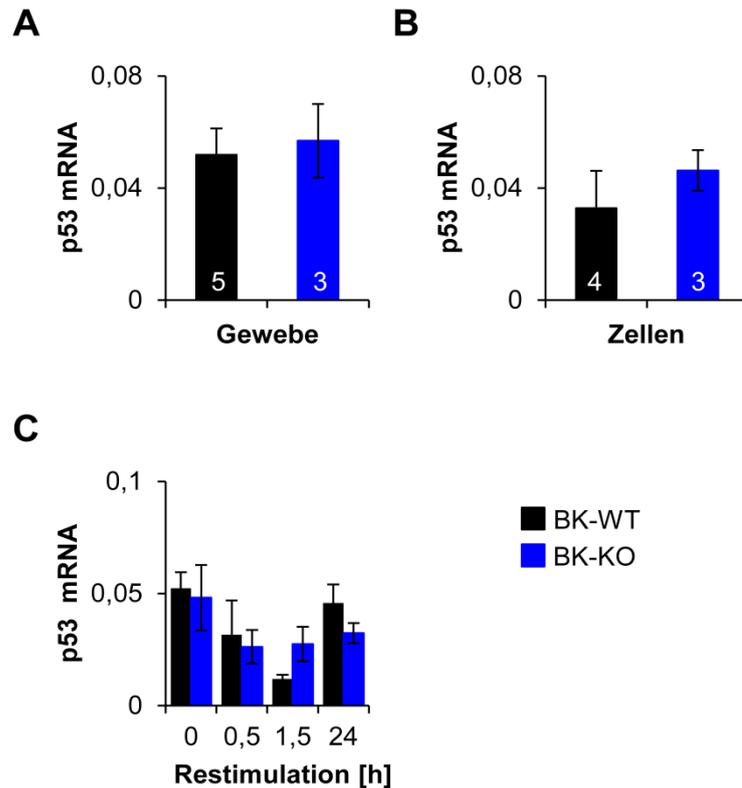
Abb. 5.23 C zeigt die Expressionslevel von p53 in BK-WT und BK-KO Zellen zu den entsprechenden Kultivierungszeitpunkten. In BK-WT Zellen konnte eine zyklische Expression beobachtet werden, das niedrigste Expressionslevel wurde nach 1,5 h ermittelt ( $0,0130 \pm 0,0008$ ). Zu diesem Zeitpunkt wurde in BK-KO Zellen mit  $0,0130 \pm 0,0008$  ein deutlich erhöhter p53 mRNA-Spiegel detektiert, jedoch erreichte der Unterschied nicht das Signifikanzniveau. Auffällig war zudem, dass die p53 mRNA-Level in BK-KO nicht nennenswert von der Kultivierungsdauer abhingen.

In Abb. 5.24 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse für *c-fos* und *c-jun* dargestellt. Für beide Zellzyklusmarker war eine zyklische Expression in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer zu beobachten. Durch die Restimulation konnte in BK-WT Zellen ein signifikanter Anstieg der *c-fos* mRNA nach 0,5 Stunden im Vergleich zur Kontrolle ( $t = 0$  h) detektiert werden, nicht jedoch in BK-KO Zellen (s. Abb. 5.24 A). Zusätzlich war der Anstieg in BK-WT Zellen ( $0,2752 \pm 0,0766$ ) verglichen mit BK-KO Zellen signifikant höher ( $0,1019 \pm 0,0511$ ). Für *c-jun* konnte hingegen in beiden Genotypen ein signifikanter Anstieg durch die Restimulation nach 0,5 Stunden bestimmt werden (s. Abb. 5.24 B). Dennoch war auch das *c-jun* Expressionslevel zu diesem Zeitpunkt in BK-KO Zellen ( $0,0197 \pm 0,0029$ ) im Vergleich zu BK-WT Zellen ( $0,0420 \pm 0,0066$ ) signifikant niedriger.



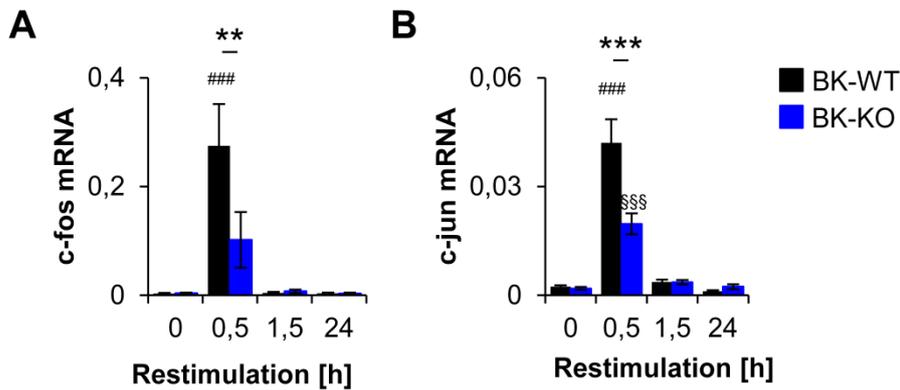
**Abb. 5.22 Expressionsanalyse der Isoformen des Onkogenes Ras in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe und -zellen**

Die mRNA wurde wie in 4.5 beschrieben aus BK-WT (schwarz) und BK-KO Proben (blau) isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Alle Werte wurden auf den internen Standard  $\beta$ -Actin normiert. **(A)** In MMTV-PyMT BK-WT Brusttumorgewebe konnte ein höheres hras mRNA-Expressionslevel ( $0,0268 \pm 0,0058$ ) als in BK-KO Gewebe ( $0,0156 \pm 0,0009$ ) detektiert werden. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. **(B)** Auch in BK-WT Zellen ( $0,0232 \pm 0,0046$ ) konnte im Vergleich zu BK-KO Zellen ( $0,0185 \pm 0,0061$ ) ein leicht höheres hras-Level erfasst werden. Auch hier war der Unterschied allerdings nicht signifikant. **(C)** Das Expressionslevel der Isoform nras war in Brusttumorgewebe beider Genotypen annähernd identisch (WT:  $0,0091 \pm 0,0018$ ; KO:  $0,0081 \pm 0,0035$ ). **(D)** Auf Zellebene konnte in BK-KO Proben ( $0,0089 \pm 0,0021$ ) eine signifikant höhere nras mRNA-Menge als in WT-Zellen ( $0,0033 \pm 0,0011$ ) detektiert werden. **(E)** Das kras Expressionslevel war in BK-WT Gewebe ( $0,0162 \pm 0,0017$ ) verglichen mit BK-KO Gewebe ( $0,0087 \pm 0,0031$ ) erhöht, der Unterschied erreichte jedoch knapp nicht das Signifikanzniveau. **(F)** BK-KO Zellen ( $0,0078 \pm 0,0027$ ) wiesen im Vergleich zu BK-WT Zellen ( $0,0035 \pm 0,0010$ ) ein höheres kras mRNA-Level auf, doch auch hier war der Unterschied nicht signifikant. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben. Ein p-Wert von  $*p < 0,05$  entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. (mRNA: messenger Ribonukleinsäure; BK: Calcium-aktivierter mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)



**Abb. 5.23 Expressionsanalyse des Tumorsuppressorgens p53 in MMTV-PyMT BK-WT und BK-KO Proben**

Die Proben wurden wie in 4.5 beschrieben isoliert, umgeschrieben und anschließend mittels qRT-PCR analysiert. Alle Werte wurden auf den internen Standard  $\beta$ -Actin normiert. BK-WT Proben sind durch schwarze Balken, BK-KO Proben durch blaue Balken repräsentiert. **(A)** Es wurde die p53-Expression in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe analysiert, allerdings konnte kein signifikanter Unterschied aufgrund der BK-Kanalablation erfasst werden. **(B)** Auch in Zellen konnte kein unterschiedliches p53 mRNA-Expressionslevel durch die BK-Defizienz beobachtet werden. **(C)** Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht und anschließend durch einen 72-stündigen Serumentzug in der G1-Phase arretiert (s. 4.3.4). Dann erfolgte die Restimulation für die jeweils angegebenen Zeitintervalle. Anschließend erfolgten die mRNA-Isolation und die Analyse der Expression mittels qRT-PCR (s. 4.5). Nach 1,5-stündiger Restimulation konnte in BK-KO Zellen ein erhöhtes p53 mRNA-Expressionslevel ( $0,0311 \pm 0,0096$ ) im Vergleich zu BK-WT Zellen ( $0,0130 \pm 0,0008$ ) beobachtet werden. Der Unterschied erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben (A+B) bzw. dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 5-6$ ) (C). (mRNA: messenger Ribonukleinsäure; h: Stunden; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)



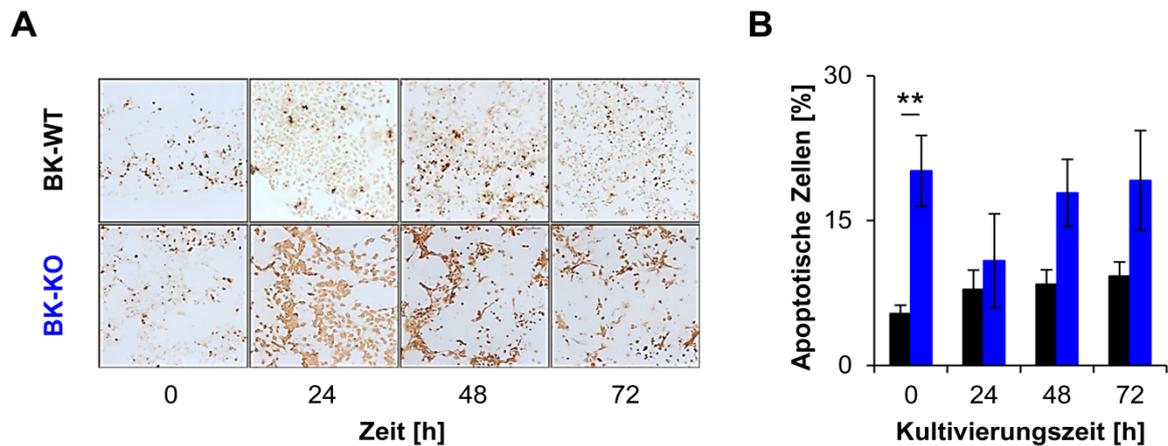
**Abb. 5.24 Einfluss der genetischen Ablation des BK-Kanals auf die mRNA Expression bestimmter Zellzyklusmarker**

Es wurde die mRNA-Expression bestimmter Zellzyklusmarker zu definierten Zeitpunkten in MMTV-PyMT BK-WT (schwarze Balken) und BK-KO Zellen (blaue Balken) mittels qRT-PCR untersucht. Die Zellen wurden wie in 4.6.3.1 beschrieben ausgebracht und anschließend durch einen 72-stündigen Serumentzug in der G1-Phase arretiert (s. 4.3.4). Dann erfolgte die Restimulation für die jeweils angegebenen Zeitintervalle. Dann wurde die mRNA wie in 4.5 beschrieben isoliert, umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Alle Werte wurden auf den internen Standard  $\beta$ -Actin relativiert (**A**) In beiden Genotypen wurde nach einer halbstündigen Restimulation ein Anstieg des *immediate early gene* c-fos detektiert. Allerdings war das mRNA Level in BK-WT ( $0,2752 \pm 0,0419$ ) im Vergleich zu BK-KO Zellen ( $0,1019 \pm 0,0511$ ) signifikant erhöht. Bei längeren Kultivierungszeiten fiel das Expressionslevel in beiden Genotypen wieder ab. (**B**) In beiden Genotypen konnte durch die Restimulation nach 0,5 h ein Anstieg der mRNA-Expression des *immediate early gene* c-jun erfasst werden. In BK-WT Zellen ( $0,0420 \pm 0,0066$ ) war das seruminduzierte Expressionsniveau allerdings signifikant höher als in BK-defizienten Zellen ( $0,0197 \pm 0,0029$ ). Mit steigender Kultivierungsdauer wurde ein Abfall des c-jun Expressionslevel in beiden Genotypen beobachtet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 3-4$ ). Ein p-Wert von  $**p < 0,01$  bzw.  $***p < 0,001$  entspricht einem hoch- bzw. höchstsignifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Ein p-Wert von  $###p < 0,001$  entspricht einem höchstsignifikanten Unterschied zwischen den restimulierten WT-Zellen zum entsprechenden Nullwert. Ein p-Wert von  $§§§p < 0,001$  entspricht einem höchstsignifikanten Unterschied zwischen den restimulierten KO-Zellen zum entsprechenden Nullwert. (h: Stunden; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)

### 5.3.3 Einfluss des BK-Kanals auf das apoptotische Verhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen

Die genetische Ablation von BK bewirkt eine verminderte Wachstumsrate von MMTV-PyMT Brusttumorzellen (s. Abb. 5.21). Dies könnte darauf beruhen, dass BK-Kanäle in Tumorzellen zur Umgehung apoptotischer Prozesse, einem sogenannten *Hallmark of Cancer*,<sup>141,144</sup> beitragen. Für einige Tumorentitäten ist bereits bekannt, dass BK-Kanäle in apoptotische Vorgänge involviert sind.<sup>199,213,221</sup> Daher wurde mithilfe der TUNEL-Methode (s. 4.7.3) überprüft, ob das verminderte Wachstum von MMTV-PyMT BK-KO Zellen auch durch eine Veränderung der Apoptose bedingt ist. Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht und arretiert (s. 4.3.4). Anschließend wurden die Zellen über verschiedene Zeiträume restimuliert (24, 48, 72 h). Eine Probe wurde nicht restimuliert (0 h). In jedem Versuch wurden eine Positivkontrolle (Auslösen der DNA-Fragmentierung durch DNase, s. 4.7.3) sowie eine Negativkontrolle (ohne TdT-Enzym) standardmäßig mitgeführt. In Abb. 4.6 sind repräsentative Aufnahmen der Positiv- und Negativkontrolle gezeigt. Die Zellen wurden fixiert und gefärbt (s. 3.4.6.3). Unter dem Mikroskop lassen sich Apoptose-positive Zellen durch eine Braunfärbung des Zellkerns identifizieren. Abb. 5.25 A zeigt repräsentative Bilder für jeden Genotyp zu den jeweiligen Zeitpunkten. Zur Evaluierung wurden pro Loch und somit pro Genotyp und Zeitwert drei repräsentative Aufnahmen erstellt. Es wurde sowohl die Anzahl positiver Zellen als auch die Gesamtzellzahl bestimmt. Dieses Vorgehen erlaubt es, für jeden Kultivierungszeitpunkt die

relative Anzahl der TUNEL-positiven Zellen zu bestimmen. (s. Abb. 5.25 B). Zu allen Untersuchungszeitpunkten wurden mehr apoptotische Zellkerne in BK-KO Zellen als in BK-WT Zellen detektiert. In nicht-restimulierten BK-WT Zellen betrug der Anteil apoptotischer Zellkerne  $5,34 \pm 0,90\%$ , in BK-KO Zellen lag dieser Wert bei  $20,14 \pm 3,67\%$ .



**Abb. 5.25 Einfluss der BK-Kanalexpression auf das apoptotische Verhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen**

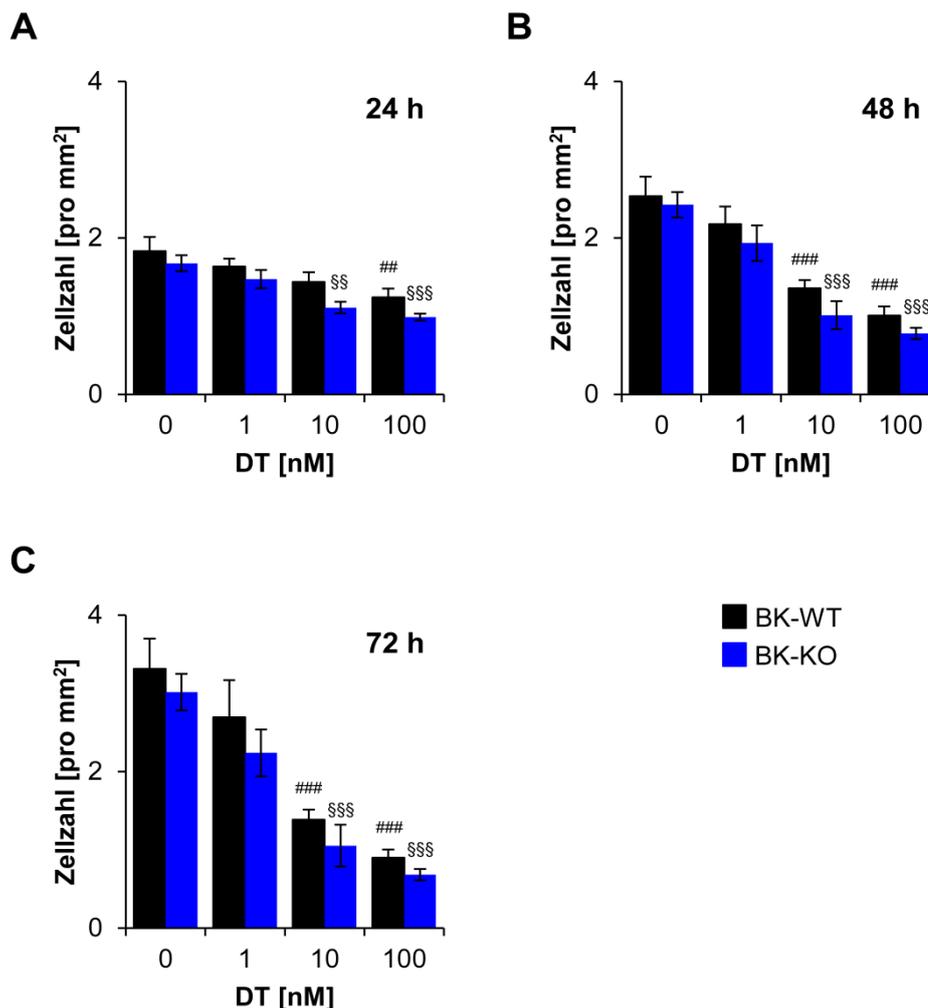
Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht. Nach der G1-Arretierung durch einen 72-stündigen Serumentzug (s. 4.3.4) wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten restimuliert und anschließend das Ausmaß der Apoptose über die TUNEL-Färbung (s. 4.7.3) erfasst. (A) Repräsentative Abbildungen der Genotypen zu den einzelnen Kultivierungszeitpunkten. (B) Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnten in BK-KO Zellen (blaue Balken) mehr apoptotische Zellkerne als in BK-WT Zellen (schwarze Balken) detektiert werden. Zum Zeitpunkt der Restimulation ( $t = 0$  h) erreichte der Unterschied zwischen BK-WT ( $5,34 \pm 0,90\%$ ) und BK-KO ( $20,14 \pm 3,67\%$ ) Zellen das Signifikanzniveau. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ( $N = 3$ ). Ein p-Wert von  $**p < 0,01$  entspricht einem hochsignifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. (h: Stunden; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)

### 5.3.4 Effekt der BK-Kanalaktivität auf die Zytostatikasensitivität muriner Brusttumorzellen

Vorangegangene Arbeiten implizieren, dass die Aktivität von Kaliumkanälen und so auch von BK-Kanälen eine wichtige Determinante der Zytostatikasensitivität ist.<sup>39,342</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher das Ansprechen der MMTV-PyMT BK-WT bzw. BK-KO Brusttumorzellen auf eine Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel (DT) untersucht. Hierfür wurden die Zellen wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht, arretiert und anschließend auf sogenannten Grid-Platten restimuliert (s. 4.6.1). Insgesamt wurde das Wachstumsverhalten der Zellen in Gegenwart von drei unterschiedlichen Docetaxel Konzentrationen (1, 10 und 100 nM) überprüft.<sup>337</sup>

Abb. 5.26 zeigt die Ergebnisse der Behandlung von MMTV-PyMT BK-WT und BK-KO Zellen mit Docetaxel. Unter Kontrollbedingungen war die Wachstumsrate in BK-KO Zellen geringer, erreichte jedoch im Vergleich zu Abb. 5.21 nicht das Signifikanzniveau. Dies könnte durch die etwas geringere Versuchszahl bedingt sein. Insbesondere in BK-WT Zellen wurde in Abb. 5.26 eine geringere Wachstumsrate als in Abb. 5.21 beobachtet. Die Behandlung mit DT 100 nM führte bereits nach 24 Stunden zu einer signifikant verminderten Wachstumsrate in beiden Genotypen (WT:  $1,83 \pm 0,18$  vs.  $1,24 \pm 0,12$ ; KO:  $1,67 \pm 0,10$  vs.  $0,99 \pm 0,04$ ) (s. Abb. 5.26 A). Zudem konnte nach 72 Stunden im Vergleich zu den zytostatikafreien Kontrollbedingungen (WT:  $3,31 \pm 0,3851$ ; KO:  $3,01 \pm 0,23$ ) durch die Applikation von Docetaxel 100 nM (WT:  $0,90 \pm 0,11$ ; KO:  $0,68 \pm 0,07$ ) eine signifikant verminderte Wachstumsrate unabhängig von der BK-Kanalexpression erfasst werden. Allerdings

konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ermittelt werden, wengleich für BK-KO Zellen eine geringere Zellzahl ermittelt wurde (s. Abb. 5.26 C). Interessanterweise konnte zudem mit DT 10 nM in BK-KO Zellen ( $1,11 \pm 0,08$ ) bereits nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur zytostatikafreien Kontrolle ( $1,67 \pm 0,10$ ) erfasst werden (s. Abb. 5.26 A), in BK-WT Zellen jedoch erst nach 48 Stunden (s. Abb. 5.26 B). Zudem ließ sich nach 72 Stunden in beiden Versuchsgruppen durch die Applikation von DT 10 nM eine signifikante Wachstumsreduktion beobachten. Diese war in BK-KO Zellen ( $1,05 \pm 0,27$ ) höher als in BK-WT Zellen ( $1,38 \pm 0,13$ ), allerdings war sie nicht signifikant verändert (s. Abb. 5.26 C). Die Behandlung mit DT 1 nM bewirkte zwar zu allen Zeitpunkten in beiden Genotypen eine Reduktion der Zellzahl verglichen mit der entsprechenden Kontrolle, jedoch war diese zu keinem Zeitpunkt signifikant (s. Abb. 5.26 A-C).



**Abb. 5.26 Einfluss der genetischen BK-Kanalablation auf das Ansprechen von MMTV-PyMT Brusttumorzellen auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel**

Die Untersuchung erfolgte mithilfe der Grid-Platten (s. 4.6.1). Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht, mittels Serumentzug in der G1-Phase arretiert (s. 4.3.4) und anschließend mit der entsprechenden Docetaxel-Konzentration restimuliert. Dieser Zeitpunkt wurde als  $t = 0$  h definiert. Pro Schale wurden zu diesem Zeitpunkt von zwei Stellen mit vier Quadranten ähnlicher Konfluenz ein Bild angefertigt und die Koordinaten notiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde dieser Vorgang für die bereits definierten Koordinaten wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und auf den Wert von  $t = 0$  h normiert. BK-WT Zellen sind durch schwarze Balken dargestellt, BK-KO Zellen durch blaue Balken. (A) Nach 24-stündiger Restimulation führte die Behandlung mit Docetaxel 100 nM in beiden Genotypen zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu unbehandelten Zellen (WT:  $1,83 \pm 0,18$  vs.  $1,24 \pm 0,12$ ; KO:  $1,67 \pm 0,10$  vs.  $0,99 \pm 0,04$ ). In

BK-KO Zellen konnte bereits ab einer Konzentration von Docetaxel 10 nM eine signifikante Reduktion der Wachstumsrate im Vergleich zur zytostatikafreien Kontrollbedingung erreicht werden ( $1,11 \pm 0,08$ ). **(B)** In beiden Genotypen führen Behandlungen mit Docetaxel 10 nM (WT:  $1,36 \pm 0,11$ ; KO:  $1,01 \pm 0,18$ ) bzw. 100 nM (WT:  $1,01 \pm 0,12$ ; KO:  $0,78 \pm 0,07$ ) nach 48-stündiger Kultivierung zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums verglichen mit unbehandelten Zellen (WT:  $2,53 \pm 0,2479$ ; KO:  $2,4230 \pm 0,16$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen konnte nicht beobachtet werden. **(C)** In beiden Genotypen führen Behandlungen mit Docetaxel 10 nM (WT:  $1,38 \pm 0,13$ ; KO:  $1,01 \pm 0,27$ ) bzw. 100 nM (WT:  $0,90 \pm 0,11$ ; KO:  $0,68 \pm 0,07$ ) nach 72-stündiger Kultivierung zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums verglichen mit unbehandelten Zellen (WT:  $3,31 \pm 0,39$ ; KO:  $3,01 \pm 0,23$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen konnte nicht beobachtet werden. Eine signifikante Wachstumsreduktion zwischen den beiden Genotypen unter Kontrollbedingungen konnte nicht ermittelt werden. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur (N = 8-9). Ein p-Wert von  $p < 0,01$  entspricht einem hoch-/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und DT-behandelten BK-WT Zellen. Ein p-Wert von  $p < 0,01$  entspricht einem hochsignifikanten/höchstsignifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und DT-behandelten BK-KO Zellen. (DT: Docetaxel; nM: nanomolar; h: Stunden; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)

### 5.3.5 Einfluss des BK-Kanals auf die murine Tumorigenese *in vivo*

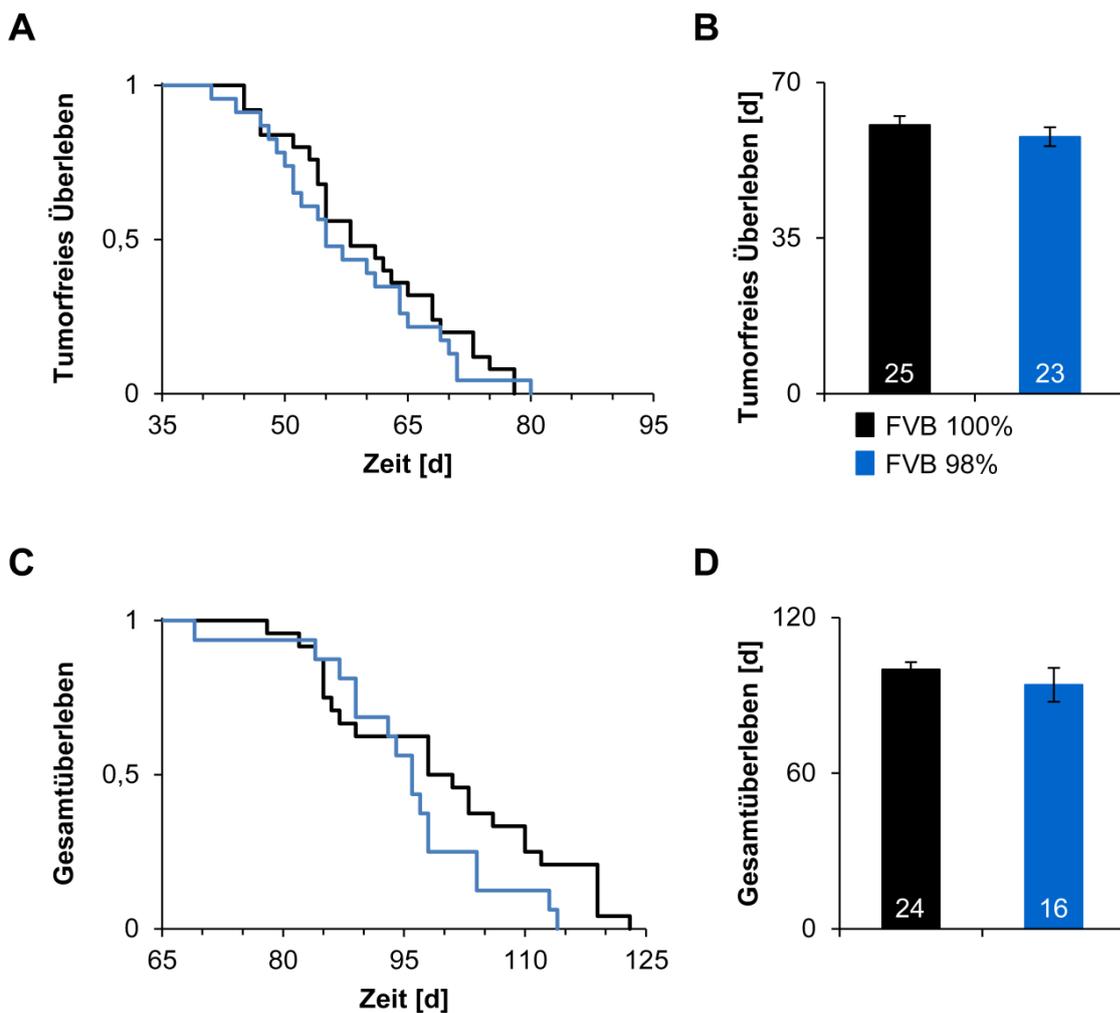
Die Funktion des BK-Kanals auf die Tumorigenese wurde *in vitro* in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die BK-Kanalaktivität maßgeblich zum Wachstum muriner Brusttumorzellen beiträgt (s. Abb. 5.21). Die Bedeutung dieser Ergebnisse sollten nun anhand des MMTV-PyMT Mausmodells *in vivo* überprüft werden. Details zur Mauslinie und ihrer Haltung sowie Genotypisierung sind in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.3 beschrieben. So sollte die Bedeutung von BK für die Tumorigenese in MMTV-PyMT Mäusen untersucht werden. Dazu wurden tumoranfällige bzw. tumortragende MMTV-PyMT Tiere mit Kanalablation mit den entsprechenden BK-WT Tieren verglichen.

#### 5.3.5.1 Einfluss der genetischen Ablation des BK-Kanals *in vivo*

Da der genetische Hintergrund einen erheblichen Einfluss auf die Tumorentstehung hat, wurden zuerst BK-KO Tiere vom C57Bl/6- auf einen FVB-Hintergrund zurückgekreuzt (s. 4.1.2). Dadurch wurden MMTV-PyMT IK-WT Tiere sowie IK-KO mit einem FVB-Anteil  $> 98\%$  generiert. Nun sollte überprüft werden, ob durch diese Rückzucht der Entstehungszeitpunkt der Tumore beschleunigt werden kann. Daher wurde der Zeitpunkt der Tumorentstehung von MMTV-PyMT BK-WT Tieren aus der Rückzucht mit dem von MMTV-PyMT bzw. MMTV-cNeu WT Tieren mit einem 100%igen FVB-Hintergrund verglichen (s. Abb. 5.27). Die Analyse erfolgte mit dem Log-Rank-Test. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass sich weder das tumorfreie Überleben noch das Gesamtüberleben zwischen den beiden Versuchsgruppen unterscheiden (s. Abb. 5.27 A+C). MMTV-PyMT BK-WT Tiere (FVB 100%) entwickeln nach  $60 \pm 2$  Tagen den ersten Tumor. Bei MMTV-PyMT BK-WT Tieren (FVB 98%) konnte nach durchschnittlich  $58 \pm 2$  Tagen das erste Mal ein Tumor getastet werden (s. Abb. 5.27 B). Das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors) erreichten die MMTV-PyMT Foundertiere (FVB 100%) nach  $100 \pm 3$  Tagen, die zurückgekreuzten Tiere nach  $94 \pm 7$  Tagen (s. Abb. 5.27 D). Diese Daten belegen, dass ein FVB-Anteil von über 98% ausreicht, um eine Beschleunigung des Tumorwachstums zu erreichen, welches dem von MMTV-PyMT Tieren (FVB 100%) entspricht.

Im Folgenden wurde dann der Einfluss der genetischen Ablation des BK-Kanals auf das tumorfreie Überleben von MMTV-PyMT Mäusen untersucht. Die Kaplan-Meier-Kurven der beiden Genotypen zeigen, dass eine genetische Ablation des BK-Kanals zu einem Vorteil bezüglich des tumorfreien

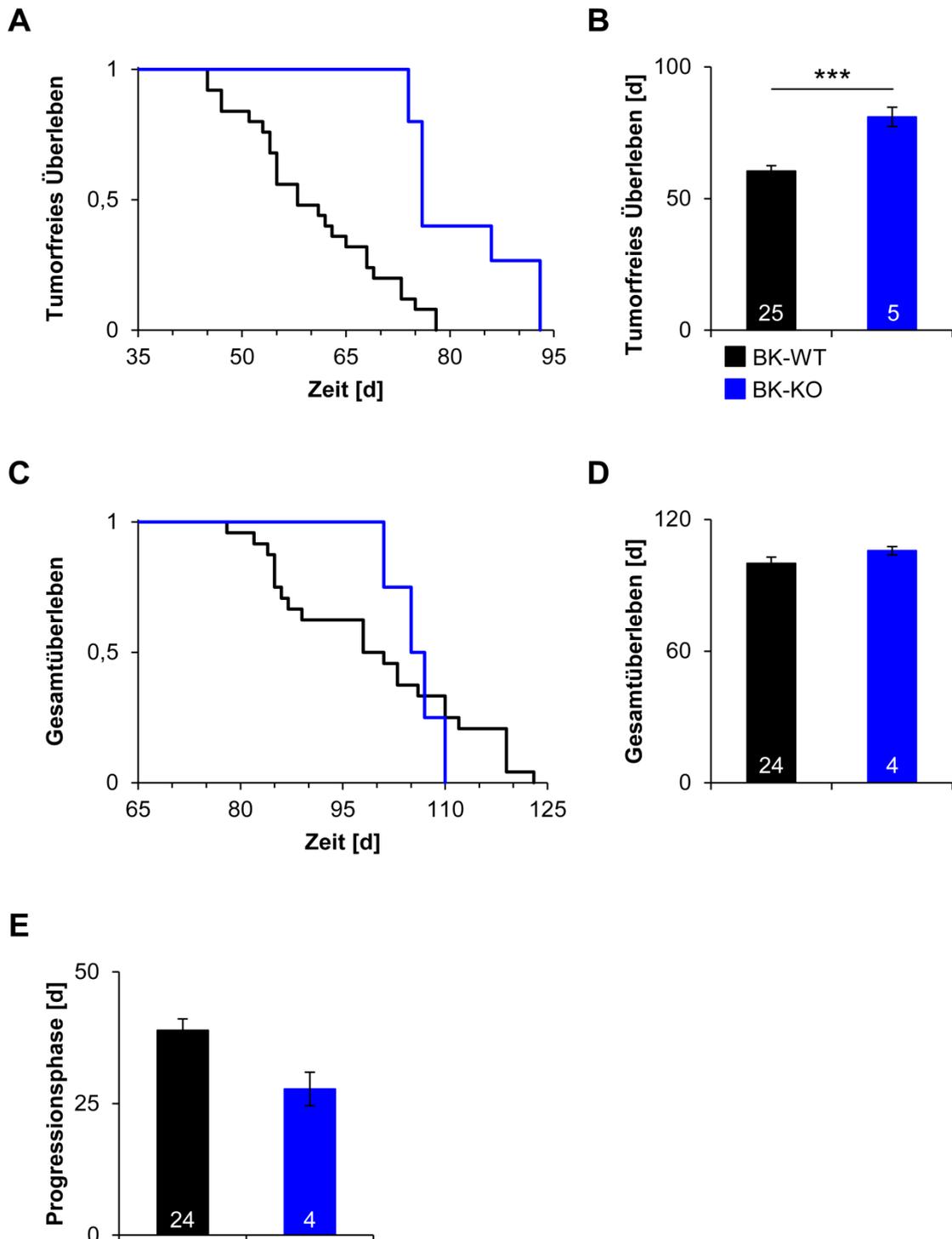
Überlebens führt (s. Abb. 5.28 A). So entwickeln MMTV-PyMT BK-WT Tiere bereits nach  $60 \pm 2$  Tagen den ersten Tumor, MMTV-PyMT BK-KO erst nach  $81 \pm 4$  Tagen (s. Abb. 5.28 B). Auch die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben bestätigen einen initialen Überlebensvorteil BK-KO Tiere, allerdings bleibt dieser Effekt nicht bis zum Ende des Beobachtungszeitraums bestehen (s. Abb. 5.28 C). Folglich ist das Erreichen des Abbruchkriteriums (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors) in BK-KO Tieren mit  $106 \pm 2$  im Vergleich zu BK-WT Tieren ( $100 \pm 3$  Tage) nicht signifikant verlängert (s. Abb. 5.28 D). Interessanterweise ist damit die Zeitspanne zwischen dem Entstehungszeitpunkt des Tumors und dem Erreichen des Abbruchkriteriums in BK-KO Mäusen mit  $28 \pm 3$  Tagen gegenüber BK-WT Mäusen ( $39 \pm 2$  Tage) sogar verringert (s. Abb. 5.28 E).



**Abb. 5.27 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) und MMTV-PyMT Tiere (FVB > 98%)**

Da der genetische Hintergrund von Mäusen einen erheblichen Einfluss auf die Tumorentstehung hat, wurden BK-WT und BK-KO Tiere über sechs Generationen auf einen FVB/N-Hintergrund zurückgekreuzt (FVB-Anteil > 98%) (s. 4.1.2). Die Rückzucht wurde durch einen Vergleich der MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) (schwarze Kurven und Balken) mit MMTV-PyMT Tieren (FVB 98%) (hellblaue Kurven und Balken) überprüft. Für alle hier gezeigten Versuche wurden daher zunächst nur Mäuse vom BK-WT miteinander verglichen. Haltung und Genotypisierung der Tiere sind in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.3 beschrieben. Die Palpation der Tumore erfolgte nach dem Protokoll in 4.2.1. (A) Die Kaplan-Meier-Kurven belegen, dass das tumorfreie Überleben für MMTV-PyMT (FVB 100%) und MMTV-PyMT BK-WT Tieren (FVB 98%) nicht signifikant verändert ist. (B) Das mittlere tumorfreie Überleben ist für die beiden Kohorten nicht verändert. MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) entwickeln nach  $60 \pm 2$  Tagen den ersten Tumor, MMTV-PyMT Tiere (FVB 98%) nach  $58 \pm 2$  Tage. (C) Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass das Gesamtüberleben der beiden Kohorten nicht signifikant

verschieden ist. **(D)** Das mittlere Gesamtüberleben ist für beide Gruppen identisch. MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) erreichen nach  $100 \pm 3$  Tagen das Abbruchkriterium, MMTV-PyMT Tiere (FVB 98%) nach  $94 \pm 7$  Tagen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Log-Rank-Test (A+C) bzw. mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben (B+D). (d: Tage; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; RZ: Rückzucht)

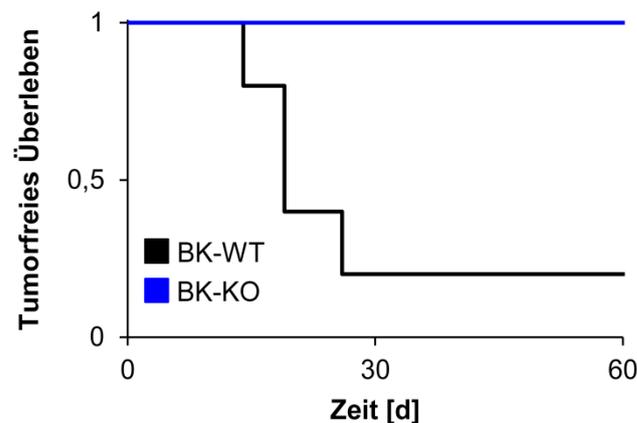


**Abb. 5.28 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT BK-WT Tiere und MMTV-PyMT BK-KO Tiere**

Die Tiere wurden wie in 4.1.1 und 4.1.3 beschrieben gezüchtet und genotypisiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung von MMTV-PyMT BK-WT (schwarz) und BK-KO (blau) Tieren nach dem Protokoll in 4.2.1. **(A)** Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen einen Vorteil bezüglich des tumorfreien Überlebens für MMTV-PyMT BK-KO Tiere, welcher das Signifikanzniveau erreicht. **(B)** Das mittlere tumorfreie Überleben ist in BK-KO Tieren mit  $81 \pm 4$  Tagen im Vergleich zu BK-WT Tieren ( $60 \pm 2$  Tage) signifikant verlängert. **(C)** Die Kaplan-

Meier-Kurven zeigen keinen Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens für einen der beiden Genotypen. **(D)** Das mittlere Gesamtüberleben ist durch die genetische Ablation des BK-Kanals nicht verändert. BK-WT Tiere erreichen nach  $100 \pm 3$  Tagen das Abbruchkriterium (15 mm Durchmesser des Tumors), BK-KO Tiere nach  $106 \pm 2$  Tagen. **(E)** Als Progressionsphase wird der Zeitraum von der Erstpalpation des Tumors bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums bezeichnet. Durch Fehlen des BK-Kanals beträgt dieser Zeitraum  $28 \pm 3$  Tage. BK-WT Tiere erreichen nach  $39 \pm 2$  Tagen nach der Erstpalpation das Abbruchkriterium. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Log-Rank-Test (A+C) bzw. mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben (B+D+E). Ein p-Wert von  $***p < 0,001$  entspricht einem höchstsignifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. (d: Tage; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout)

Wie Abb. 5.28 zeigt, wurden insgesamt lediglich fünf MMTV-PyMT BK-KO Versuchstiere generiert (s. auch Anhang Abb. 7.4). BK-KO Tiere besitzen demnach wohl auf dem FVB-Hintergrund durch ungeklärte Mechanismen einen Entwicklungsnachteil. Daher wurde ein alternatives Mausmodell verwendet, welches auf der orthotopen Allotransplantation von Tumorzellen in FVB/N Wildtypiere beruht. Dazu wurden den Tieren entweder MMTV-PyMT BK-WT oder BK-KO Brusttumorzellen in die vierte Brustdrüse transplantiert (s. 4.2.4). In Abb. 5.29 sind die vorläufigen Befunde dieses Experimentes dargestellt. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt, dass während des Beobachtungszeitraumes von 60 Tagen keines der Tiere, in welche BK-KO Zellen transplantiert worden waren, einen Tumor entwickelt hatte. Bei den entsprechenden Kontrolltieren waren es bereits vier Tiere. Dadurch war das tumorfreie Überleben in BK-KO transplantierten Tieren signifikant verlängert. (BK-WT:  $20 \pm 2$  Tage) (s. Abb. 5.16).



**Abb. 5.29 Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach orthotoper Allotransplantation von MMTV-PyMT BK-WT bzw. BK-KO Brusttumorzellen in FVB/N Wildtypiere Tiere**

Die orthotope Allotransplantation der Tumorzellen erfolgte wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben. Anschließend erfolgten die Untersuchungen zur Tumorentstehung und dem Tumorwachstum nach dem Protokoll in 4.2.1. Tiere, welche mit MMTV-PyMT BK-WT Zellen transplantiert wurden (BK-WT), sind schwarz dargestellt. Tiere, welche mit MMTV-PyMT BK-KO Zellen transplantiert wurden (BK-KO), sind blau dargestellt. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt, dass die Transplantation von BK-WT Zellen während des Beobachtungszeitraumes von 60 Tagen zu einer durchschnittlichen Tumorentstehung nach  $20 \pm 2$  Tagen führt. Tiere, welche mit BK-KO Zellen transplantiert wurden, entwickeln hingegen keinen Tumor. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Log-Rank-Test (N = 5). (BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; KO: Knockout, d: Tage)

### 5.3.5.2 Einfluss der pharmakologischen Inhibition des BK-Kanals *in vivo*

Wie in Kapitel 5.3.5.1 gezeigt, führt eine genetische Ablation des BK-Kanals zu einem verlängerten tumorfreien Überleben von MMTV-PyMT Mäusen. Auch die präliminären Befunde der orthotopen Allotransplantation lassen eine protektive Funktion der BK-Kanalablation vermuten (s. Abb. 5.29). Daher wurde untersucht, ob die pharmakologische Inhibition des BK-Kanals ebenfalls das tumorfreie Überleben positiv beeinflusst.

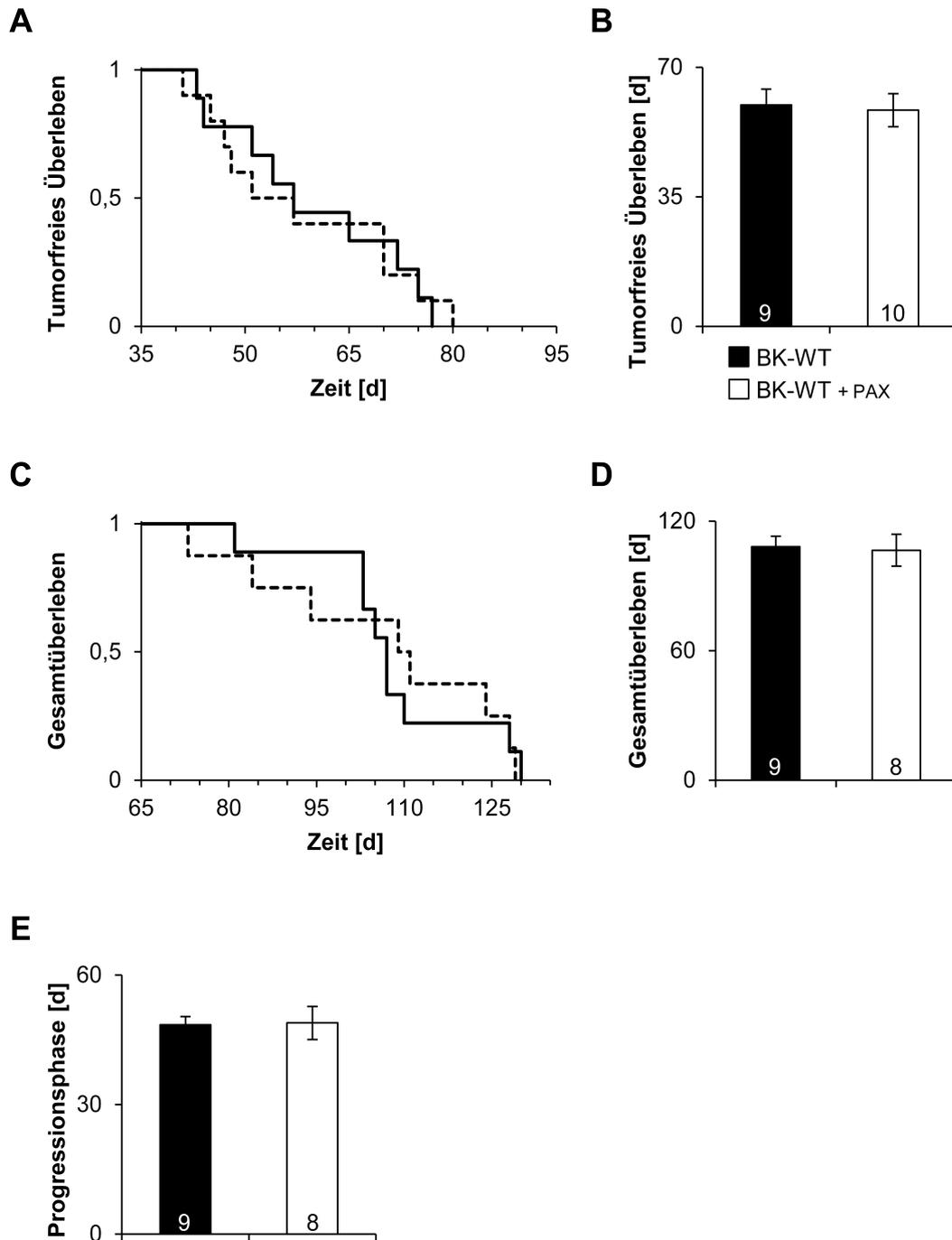
#### Behandlung von MMTV-PyMT WT Tieren mit Paxilline

Ab einem Alter von 40 Tagen wurden MMTV-PyMT WT Tiere für vier Wochen zwei Mal täglich mit dem selektiven BK-Kanalinhistor Paxilline (PAX) in einer Dosierung von 8 mg/kg Körpergewicht (s. 4.2.3.1) bzw. Vehikel (DMSO:Wasser 9:1) i.p. injiziert.<sup>138</sup> Wie zuvor wurden das tumorfreie Überleben und Gesamtüberleben über das Erreichen des Abbruchkriteriums (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors) erfasst.

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass mit der pharmakologischen Inhibition des BK-Kanals im Gegensatz zur genetischen Ablation keine Verlängerung des tumorfreien Überlebens erreicht werden kann (s. Abb. 5.30 A). Bei unbehandelten Tieren lässt sich nach  $60 \pm 4$  Tagen der erste Tumor palpieren, bei behandelten Tieren nach  $58 \pm 4$  Tagen (s. Abb. 5.30 B). Auch das Gesamtüberleben ist mit  $108 \pm 5$  Tagen (unbehandelt) und  $107 \pm 7$  Tagen (PAX) bei beiden Gruppen identisch (s. Abb. 5.30 C). Folglich war auch die Progressionsphase, also der Zeitraum zwischen Erstpalpation und Erreichen des Abbruchkriteriums, durch die genetische Ablation von BK nicht verändert (Kontrolle:  $48 \pm 2$  Tage; PAX:  $49 \pm 4$  Tage) (s. Abb. 5.30 E).

#### Pharmakokinetische Charakterisierung von Paxilline

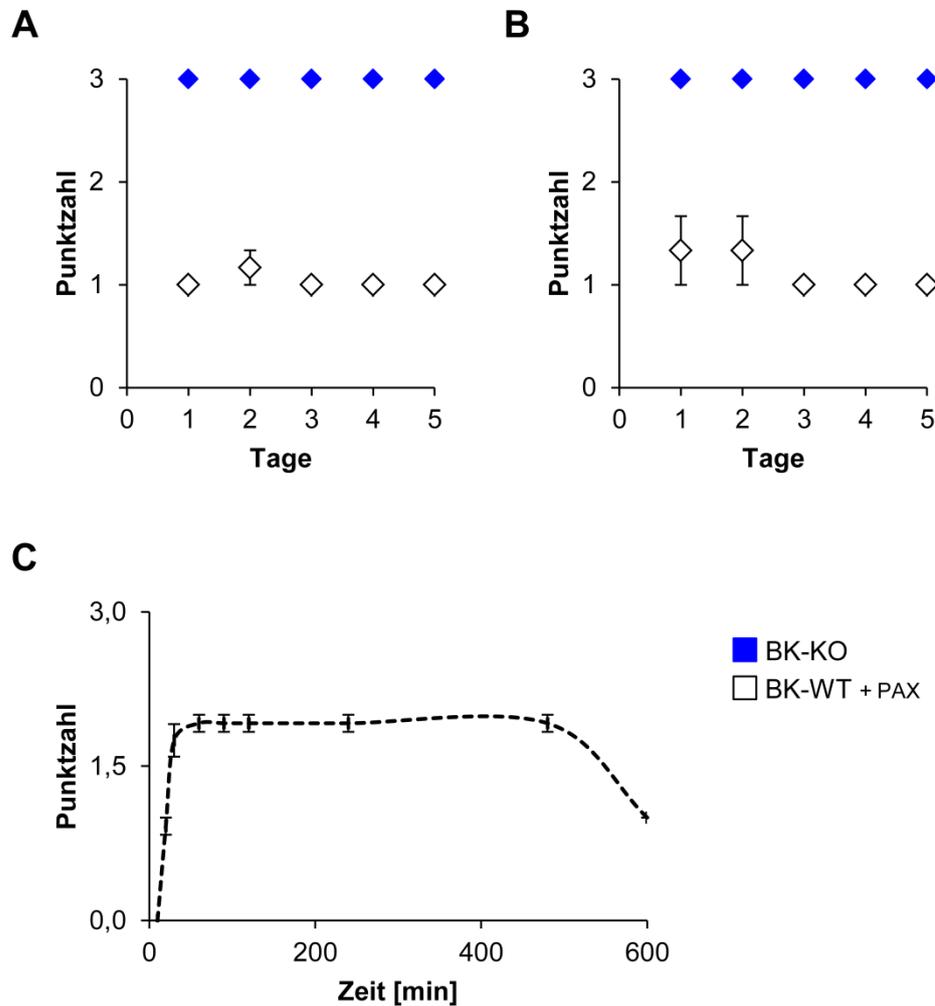
Die Wirksamkeit von Paxilline wurde anhand des Gittertests bzw. Gangtests überprüft (s. 4.2.3.2), da es als ZNS-gängige Substanz durch die BK-Kanalblockade motor koordinative Störungen wie Tremor und Ataxie auslöst.<sup>131</sup> In allen PAX-behandelten Tieren konnte eine Verschlechterung im Rahmen des Gittertest beobachtet werden (s. Abb. 5.31 A). Ebenfalls zeigten diese Tiere ein weniger koordiniertes Verhalten beim Gangtest (s. Abb. 5.31 B). BK-KO Tiere erzielten jedoch sowohl im Gitter- als auch im Gangtest eine höhere Punktzahl. Ebenfalls wurde mithilfe des Gangtests die Kinetik der ZNS-Symptomatik der PAX-Wirkung überprüft. Die Tiere wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Injektion nach dem Protokoll in 4.2.3.2 untersucht. Nach 20 min konnte bereits ein Anstieg der Punktzahl und somit des Tremors erfasst werden. Paxilline flutet folglich schnell im ZNS an. Die Punktzahl blieb für die einzelnen Probanden bis 6 Stunden nach der Injektion konstant und fiel nach 10 Stunden wieder ab (s. Abb. 5.31 C). Es dauert folglich etwa 20 min, bis PAX seine Wirkdauer im zentralen Nervensystem entfaltet. Die Wirkdauer der Substanz beträgt im ZNS zwischen 6 und 10 Stunden. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass PAX über diesen Zeitraum auch in der Peripherie und somit auch in Tumorzellen BK-Kanäle inhibiert, so dass theoretisch eine ausreichende Antitumorwirkung erzielt werden kann.



**Abb. 5.30 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT Tiere nach der Behandlung mit dem spezifischen BK-Kanalinhistor Paxilline**

Die Tiere wurden wie in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.3 beschrieben gezüchtet und genotypisiert. Ab einem Alter von 40 Tagen wurden die Tiere mit dem spezifischen BK-Kanalinhistor Paxilline (PAX) (Dosierung 8 mg/kg Körpergewicht) bzw. dem entsprechenden Vehikel zwei Mal täglich i.p. injiziert.<sup>138</sup> Die Untersuchung der Tiere erfolgte gemäß des Protokolls in 4.2.3.1. PAX-behandelte Tiere sind durch gestrichelte Linien bzw. weiße Balken dargestellt. Die entsprechenden Kontrolltiere sind durch schwarze Linien und Balken repräsentiert. **(A)** Die Kaplan-Meier-Kurven belegen, dass das tumorfreie Überleben durch die pharmakologische Inhibition des BK-Kanals nicht signifikant verändert ist. **(B)** Das mittlere tumorfreie Überleben ist für die beiden Kohorten nicht verändert. Tiere aus der Kontrollgruppe entwickeln nach  $60 \pm 4$  Tagen den ersten Tumor, PAX-behandelte Tiere nach  $58 \pm 4$  Tagen. **(C)** Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass das Gesamtüberleben der beiden Kohorten nicht signifikant verschieden ist. **(D)** Das mittlere Gesamtüberleben ist für beide Gruppen identisch. Behandelte Tiere erreichen nach  $108 \pm 5$  Tagen das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors), PAX-

behandelte Tiere nach  $107 \pm 7$  Tagen. **(E)** Die Zeitspanne zwischen Erstpalpation und Erreichen des Abbruchkriteriums wird als Progressionsphase definiert. Auch hier hatten PAX-behandelte MMTV-PyMT Tiere mit  $49 \pm 4$  Tagen keinen signifikanten Vorteil gegenüber den entsprechenden Kontrollen ( $48 \pm 2$  Tage). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Log-Rank-Test (A+C) bzw. mit dem t-Test (ungepaart) für unabhängige Stichproben (B+D+E). (d: Tage; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; PAX: Paxilline)



**Abb. 5.31** Pharmakokinetische Charakterisierung von Paxilline mithilfe des Gitter- und Gangtests

Die Tiere wurden wie in 4.2.3.1 beschrieben mit Paxilline 8 mg/kg KG i.p. injiziert<sup>138</sup> und anschließend nach den Protokollen in 4.2.3.2 untersucht. **(A)** Auswertung des Gittertests nach Paxilline-Injektion. Ein Wert von 0 im Gittertest entspricht einer nicht vorhandenen motor koordinativen Störung, ein Wert von 3 entsprechend einem stark ausgeprägten Phänotyp. BK-KO Tiere (blau) wurden als Kontrolle eingesetzt.<sup>131</sup> PAX-behandelte Tiere (weiß) erreichen eine Punktzahl von 1, was auf eine ZNS-Wirkung von PAX aufgrund der Störung der motor koordinativen Fähigkeiten hindeutet. **(B)** Auswertung des Gangtests nach Paxilline-Injektion. Eine Punktzahl  $> 0$  im Gangtest impliziert eine Störung der motor koordinativen Fähigkeiten. BK-KO Tiere (blau) wurden als Kontrolle eingesetzt. In allen PAX-behandelten Tieren konnte an jedem Versuchstag eine Punktzahl von mindestens 1 beobachtet werden, was auf eine Einschränkung der Motor koordinierung aufgrund der BK-Kanalblockade im ZNS hinweist. **(C)** Der Gangtest wurde zu definierten Zeitpunkten (10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h) nach der Injektion durchgeführt und die Punktzahl für jeden Probanden notiert. 20 Minuten nach der Injektion von Paxilline konnte bereits ein Anstieg der Punktzahl beobachtet werden. Die Störung der Motor koordinierung hielt bis 6 Stunden nach der Injektion an. (N = 3). (BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; KO: Knockout; WT: Wildtyp; PAX: Paxilline)



## 6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mausmodelle für Brustkrebs etabliert, anhand derer die *in vivo* Funktion von IK- und BK-Kanälen für die Entstehung und das Wachstum der murinen Mammakarzinome charakterisiert werden konnte (s. 3.1). Ebenfalls gelang es, sowohl aus MMTV-PyMT WT als auch aus IK-KO bzw. BK-KO Tieren Brusttumorzellen zu isolieren (s. 4.2.2). Anhand der gewonnenen Gewebe und der hieraus abgeleiteten Primärzelllinien (s. 4.3.1) war es möglich, die mechanistische Bedeutung der Kanäle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege, Proliferation und Apoptose aufzuklären.

### 6.1 Expressionsanalyse Calcium-aktivierter Kaliumkanäle in murinem Brusttumorgewebe

Mithilfe der qRT-PCR wurde das mRNA-Expressionsprofil unterschiedlicher  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Subtypen in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe und -zellen untersucht.

Sowohl in Gewebe als auch in Zellen konnten nur sehr geringe Expressionslevel für die Vertreter der Subtypen der SK-Unterfamilie detektiert werden (s. Abb. 5.1). In Übereinstimmung mit der Literatur<sup>217</sup> war dabei das Expressionslevel des SK2-Kanals in den Brusttumorzellen am höchsten. So wurde SK2 bereits in den humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und BT-474 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene detektiert, nicht jedoch in MDA-MB-231 Zellen.<sup>217</sup> Primär werden SK-Kanäle in neuronalen Geweben exprimiert, allerdings wurden auch SK3-Kanäle außerhalb des ZNS nachgewiesen, etwa in Glattmuskelzellen und Endothelzellen sowie verschiedenen Tumorzellen.<sup>47,67,233,343</sup> Verschiedene Berichte deuten auf eine Bedeutung von SK3 in Melanomzellen hin. Auch scheinen humane Brustkrebszelllinien im Vergleich zu gesunden Zellen verstärkt SK3-Kanäle zu exprimieren, welche durch die Regulation des Membranpotentials möglicherweise zu dem invasivem Phänotyp der Zellen beitragen.<sup>232,233,344,345</sup> In MMTV-PyMT Brusttumorzellen konnten hingegen nur sehr geringe SK3 mRNA-Spiegel beobachtet werden (s. Abb. 5.1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der SK-Unterfamilie in MMTV-PyMT Brusttumorzellen jedoch nur auf mRNA-Ebene charakterisiert. Ob beispielsweise SK2-Kanäle in MMTV-PyMT Brusttumorzellen auch eine funktionale Bedeutung haben, wurde nicht analysiert.

### 6.2 Charakterisierung von IK-Kanälen im murinen Mammakarzinom

#### 6.2.1 MMTV-PyMT Brusttumorzellen exprimieren IK-Kanäle

Die Expression des IK-Kanals wurde in den MMTV-PyMT Brusttumorbiospien mittels mRNA-Analyse (s. 4.5) sowie auf Proteinebene über immunhistochemische Färbungen nachgewiesen (s. 4.7.2). Die Expressionsbefunde wurden durch die Darstellung charakteristischer IK-Ströme mittels Patch-Clamp-Analysen in primären MMTV-PyMT Brusttumorzellen ergänzt (s. 4.4).

Sowohl im Tumorgewebe als auch in den MMTV-PyMT Brusttumorzellen waren im Vergleich zu nicht-transformiertem Brustgewebe sehr hohe IK Expressionslevel detektierbar (s. Abb. 5.2). Die Spezifität der für diese Analysen verwendeten Primer (s. 3.4.4) wurde über entsprechende Proben aus IK-KO Tieren überprüft, in denen erwartungsgemäß kein Signal erfasst werden konnte. Im Brusttumorgewebe wurden dabei höhere IK mRNA-Spiegel detektiert als in den Brusttumorzellen.

Vermutlich exprimieren neben den Tumorzellen auch Endothel-, Blut- und Glattmuskelzellen sowie stromale Fibroblasten IK-Kanäle.<sup>47,67,87</sup> Die in isolierten Brusttumorzellen nachgewiesene IK mRNA ist dabei ein erster Hinweis auf eine autonome Bedeutung des IK-Kanals in den transgenen MMTV-PyMT Zellen. In der Regel führt eine Überexpression von Ionenkanälen und so auch von IK im Zuge der Transformation zu einer höheren Malignität von Tumoren.<sup>28,29</sup> Dementsprechend finden sich beispielsweise in Endometriumkarzinomen,<sup>148</sup> Prostatakarzinomen<sup>183</sup> und Pankreaskarzinomen<sup>150</sup> erhöhte IK mRNA-Level. Auch in humanen Mammakarzinomen lässt sich häufig eine Überexpression von IK nachweisen.<sup>29,152</sup> Der Expressionsvergleich von gesundem Brustgewebe aus FVB/N WT Tieren und MMTV-PyMT Brusttumorgewebe bestätigt eine signifikante Erhöhung der IK mRNA im Brusttumorgewebe (s. Abb. 5.2 B), was auf eine wichtige Funktion des IK-Kanals bei der malignen Transformation des Brustgewebes hinweist. Von anderen Kaliumkanälen wie hERG, K<sub>2p</sub>9.1 oder G-Protein-gekoppelten K<sub>ir</sub>-Kanälen (GIRK) ist ebenfalls bekannt, dass sie in malignem Gewebe verstärkt exprimiert werden.<sup>346</sup> Auch die IK-Kanalexpression korreliert häufig mit dem Tumorgrad und der Metastasierung in die Lymphknoten.<sup>152</sup> Dies bedeutet konkret, dass insbesondere in hochgradigen Tumoren (Grad III) eine erhöhte IK Expression beobachtet wird. Interessanterweise ist ein hohes Metastasierungspotential mit einem verringerten IK-Level assoziiert. Damit übereinstimmend wurde in Lymphknotenmetastasen humaner Mammakarzinome nur eine sehr geringe IK-Kanalexpression beobachtet.<sup>152</sup> Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben stammten alle aus Tumoren mit höchstem Tumorgrad.<sup>292</sup> Interessant wäre daher, die IK-Expression in MMTV-PyMT Brusttumoren in Abhängigkeit des Tumorgrades zu untersuchen. Gerade für dieses Mausmodell ist die Transformation des Brustgewebes über insgesamt vier Stadien ausführlich charakterisiert (s. Tabelle 3.1).<sup>292</sup> Außerdem lassen sich die Tumore dieses Modells in verschiedene Subtypen in Abhängigkeit bestimmter Tumormarker ähnlich wie beim Menschen klassifizieren. Es könnte darüber überprüft werden, ob die erhöhte IK-Kanalexpression bei allen diesen Subtypen auftritt oder nur auf bestimmte beschränkt ist.

Da anhand der mRNA-Analyse aber keine Aussage über die Proteinexpression getroffen werden kann, wurden immunhistochemische Färbungen des MMTV-PyMT Brusttumorgewebes durchgeführt. Die IK Expression wurde aufgrund der gewählten Methode durch eine Blaufärbung in den Schnitten erfasst. Die Spezifität des Primär- sowie Sekundärantikörpers wurde durch die Verwendung entsprechender Schnitte aus IK-KO Gewebe bzw. durch das Mitführen von Schnitten, welche ohne Primärantikörper inkubiert wurden, nachgewiesen (s. Abb. 5.2 C). Zusätzlich wurden für beide Genotypen Kryoschnitte mittels H&E-Färbung angefärbt, um mögliche strukturelle Unterschiede zu untersuchen (s. Abb. 5.2 C). Eine genaue Lokalisierung von IK innerhalb der Zellen wurde nicht charakterisiert.

Ein alleiniger Nachweis der Proteinexpression von Kanälen gibt jedoch noch keine Auskunft über ihre Funktionalität. In der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 konnten bereits funktionale IK-Kanäle detektiert werden, die mit TRAM-34 inhibiert werden können.<sup>152,166</sup> In anderen Tumorentitäten, insbesondere in Gliomen<sup>347,348</sup> und Pankreaskarzinomen,<sup>150</sup> wurden ebenfalls funktionale IK-Kanalströme detektiert. Daher wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen Patch-Clamp-Analysen mit den isolierten Brusttumorzellen aus MMTV-PyMT IK-WT und IK-KO Tieren in Ab- bzw. Anwesenheit des selektiven Inhibitors TRAM-34 durchgeführt (s. 3.4.3). Über die *cell attached configuration* (s. 4.4) konnten in IK-WT Zellen typische IK-Ströme detektiert werden, deren Einwärtsleitfähigkeit mit TRAM-34 reduziert

werden konnte (s. Abb. 5.3 A). Die Selektivität des Inhibitors wurde durch die Applikation von TRAM-34 auf IK-KO Zellen überprüft, in welchen dadurch keine Veränderung der Einwärtsleitfähigkeit beobachtet werden konnte (s. Abb. 5.3 B). Der Vergleich der Ströme in IK-WT und IK-KO Zellen zeigte eine signifikante Reduktion der Einwärtsleitfähigkeit durch die IK-Kanalablation (s. Abb. 5.3 C) Jedoch bewirkten weder die IK-Kanaldefizienz noch die pharmakologische Inhibition mit TRAM-34 eine vollständige Aufhebung des Kaliumstroms. TRAM-34 besitzt eine hohe Selektivität für IK-Kanäle.<sup>89,90</sup> Daher könnten beispielsweise Kaliumkanäle der  $K_{ir}$ -Familie, welche G-Protein-aktivierte  $K_{ir}$  (GIRK) sowie  $K_{ATP}$  umfasst,<sup>44</sup> verantwortlich sein, welche wie der IK-Kanal auch bei negativen Membranpotentialen geöffnet sind und TRAM-34 insensitiv sind. Nach unserem Wissensstand wurde die Funktion dieser Kanäle bis jetzt noch nicht im MMTV-PyMT Mausmodell beschrieben, allerdings wurden die Expression und teilweise auch die Funktion von  $K_{ir}$ - und  $K_{ATP}$ -Kanälen bei Brustkrebs zumindest *in vitro* beschrieben. So ist von den Subtypen  $K_{ir2.2}$ ,  $K_{ir3.1}$ ,  $K_{ir6.1}$  sowie  $K_{ir6.2}$  bekannt, dass sie in Brusttumoren überexprimiert werden.<sup>29</sup> Die Expression und Funktionalität von  $K_{ATP}$ -Kanälen in MCF-7 Zellen wurde bereits mehrfach mithilfe spezifischer Inhibitoren beschrieben. So sind sie essentiell für die Progression durch die G1-Phase und regulieren darüber hinaus die Proliferation der Zellen. In Abwesenheit von Serum und Wachstumsfaktoren ist das antiproliferative Potential von Glibenclamid erwartungsgemäß geringer.<sup>165,167,349,350</sup> GIRK1 wiederum wird insbesondere in Brusttumoren überexprimiert, welche Absiedlungen in Lymphknoten bilden.<sup>351</sup> In humanen MCF-7 Brusttumorzellen wurde zudem eine zellzyklusabhängige Expression des IK-Kanals beobachtet,<sup>166</sup> was aber im Rahmen dieser Arbeit in dem MMTV-PyMT Brusttumorzellmodell nicht überprüft wurde. Wie bereits beschrieben, konnte für MMTV-PyMT Brusttumorgewebe ein erhöhtes IK mRNA-Level verglichen mit nicht-transformiertem Gewebe beobachtet werden (s. Abb. 5.2 B). Ein Nachweis der Überexpression von IK-Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Onkogene tragen zudem meist über eine verstärkte Aktivierung (*gain of function*) oder Funktionsverluste (*loss of function*) als Folge gezielter Punktmutationen zur Malignität von Tumoren bei.<sup>140,141</sup> Für Kaliumkanäle wird hingegen bis jetzt angenommen, dass sie die Tumorentstehung und die Tumorentwicklung aufgrund ihrer Überexpression und nicht etwa aufgrund mutierter Kanalvarianten beeinflussen.<sup>28</sup> Möglicherweise exprimieren MMTV-PyMT Brusttumoren jedoch mutierte IK-Kanäle, welche daher beispielsweise eine veränderte Calciumsensitivität aufweisen und so die Tumorigenese fördern könnten. Allerdings kann anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde der Patch-Clamp-Analysen (s. Abb. 5.3) sowie der Untersuchungen zu den IK-abhängigen Calcium-Signalen (s. 5.2.4) diesbezüglich keine Aussage getroffen werden. Darüber hinaus ist denkbar, dass SNPs die IK-Kanalaktivität modulieren können. So wurden im Rahmen einer Kollaboration unseres Arbeitskreises mit dem Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart genetische Variationen von IK als Brustkrebs-Loci identifiziert (s. Julia Baranski „Auswirkungen genetischer Varianten von KCNMA1 und KCNN4 auf die Suszeptibilität für Brustkrebs“, Masterarbeit, 2012).

Zusammengenommen implizieren diese Befunde, dass IK-Kanäle eine wichtige Funktion bei der malignen Transformation von murinem sowie humanem Brustgewebe übernehmen.

## 6.2.2 IK-Kanäle regulieren das Wachstum muriner Brusttumorzellen *in vitro*

Der Einfluss der IK-Kanalaktivität wurde mithilfe von Wachstumsanalysen in Grid-Platten sowohl über eine genetische Ablation als auch über eine pharmakologische Inhibition mit TRAM-34 untersucht. Frühere Studien haben das Wachstum von Brusttumorzellen in Abhängigkeit der IK-Kanalaktivität nur mit selektiven Inhibitoren oder über einen siRNA-vermittelten *knockdown* untersucht.<sup>166,223</sup> Diese Befunde können jedoch durch eine nicht ausreichende Selektivität des Inhibitors oder eine zu geringe Effizienz des *knockdown* beeinflusst werden. Durch die genetische Ablation besitzen IK-Kanäle jedoch überhaupt keine Funktionalität mehr. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl die Blockade als auch die genetische Ablation des IK-Kanals eine signifikante Reduktion der Wachstumsrate der MMTV-PyMT Brusttumorzellen bewirken (s. Abb. 5.4 und Abb. 5.5). Ebenfalls konnte durch die Behandlung von MMTV-cNeu Brusttumorzellen mit TRAM-34 eine signifikant verminderte Wachstumsrate beobachtet werden (s. Anhang Abb. 7.1 und Abb. 7.2). Die IK-Kanalaktivität ist also für das Wachstum muriner Brusttumorzellen wichtig. Generell werden zwei Mechanismen diskutiert, über welche Ionenkanäle das Wachstum und die Proliferation regulieren. Zum einen greifen sie in die Progression des Zellzyklus ein, zum anderen beeinflussen sie das Wachstum über die Regulation homöostatischer Parameter wie  $[Ca^{2+}]_i$ , pH-Wert und Zellvolumen.<sup>27,29</sup> Zur Zellzyklusprogression tragen sie über die Kontrolle des Membranpotentials, des Zellvolumens sowie der Expression Zellzyklus-regulierender Proteine ein.<sup>165</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob sowohl der Zellzyklus als auch die  $Ca^{2+}$ -Homöostase von MMTV-PyMT Brusttumorzellen von der IK-Kanalaktivität abhängen. Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Rolle des IK-Kanals für apoptotische Prozesse in MMTV-PyMT Zellen analysiert. Wenngleich das Membranpotential über Kaliumkanäle reguliert wird und zudem ein wichtiger Parameter der Zellzyklusprogression ist,<sup>27</sup> wurde ein IK-abhängige Änderung des Membranpotentials im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

### 6.2.2.1 Der Zellzyklus von MMTV-PyMT Brusttumorzellen ist von der IK-Kanalaktivität abhängig

Es wurden zwei verschiedene Methoden gewählt, um den Einfluss von IK-Kanälen auf den Zellzyklus von MMTV-PyMT Zellen zu analysieren. Zum einen wurde die Expression Zellzyklus-regulierender Strukturen auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit der IK-Kanalaktivität mittels qRT-PCR untersucht (s. 4.6.3.1). Zum anderen wurde über Durchflusszytometrie-basierte Analysen der Einfluss von IK auf die Zellzyklusprogression charakterisiert (s. 4.6.3.2).

Bereits für MCF-7 Brusttumorzellen wurde gezeigt, dass eine pharmakologische Inhibition von IK aufgrund einer Veränderung der Zellzyklusprogression zu einer Reduktion der Proliferation führt.<sup>166,223</sup> Dies wurde außerdem für Endometriumkarzinomzellen nachgewiesen, in welchen die pharmakologische Inhibition sowie der *knockdown* von IK eine reduzierte Proliferation mit G0/G1-Arrest bewirken.<sup>148</sup> Für die hier untersuchten MMTV-PyMT Zellen konnte ein vergleichbarer Mechanismus bestätigt werden. Eine Restimulation für 0,5 Stunden bewirkte unabhängig von Genotyp oder Behandlung erwartungsgemäß einen Anstieg der Zellzyklusmarker c-fos und c-jun (s. Abb. 5.6 und Abb. 5.8). Dies wird durch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren ausgelöst, welche die Expression der *immediate early genes* stimulieren und somit einen Übergang aus dem Ruhezustand G0 in die G1-Phase induzieren.<sup>175,190-192</sup> Dadurch führen Wachstumsfaktoren letztlich auch zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, welcher durch Dimerisierung von c-fos und c-jun

gebildet wird.<sup>193,352</sup> Zu den Zielstrukturen von AP-1 zählen neben proliferativen Strukturen wie EGFR, Cyclin D1 und pRb auch apoptotische Faktoren wie Bcl-2, FasL oder Fas sowie das an beiden Prozessen beteiligte p53.<sup>193,353,354</sup> Interessanterweise waren die mRNA-Spiegel der *immediate early genes* nach pharmakologischer Inhibition oder genetischer Ablation der IK-Kanalaktivität zum Zeitpunkt  $t = 0,5$  h signifikant vermindert (s. Abb. 5.6 und Abb. 5.8). Darüber hinaus führte die Blockade von IK mittels TRAM-34 zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase (s. Abb. 5.7), was mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden konnte. Eine Arretierung der Zellen am G1/S-Übergang durch die IK-Kanalblockade stimmt mit der Überlegung überein, dass sich die Zellen für den Phasentransit zu diesem Zeitpunkt in einem hyperpolarisierten Zustand befinden, was einen Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  auslöst, IK-Kanäle öffnet und so den Zellen letztlich den Übergang in die S-Phase ermöglicht.<sup>27</sup> Die IK-Kanalaktivität ist in MMTV-PyMT Brusttumorzellen folglich für die Expression von c-fos und c-jun wichtig und somit voraussichtlich auch für die Expression bzw. Aktivität von AP-1. Eine Inhibition oder Ablation von IK führt demnach zu einer reduzierten Transkription der o.g. Strukturen wie Cyclin D1 oder pRb, was das verminderte Wachstum unter diesen Bedingungen erklärt. Seit längerem wird bereits ein Einfluss von Wachstumsfaktoren und Hormonen auf die Aktivität von AP-1 und damit verbundene Prozesse wie Proliferation und Migration diskutiert.<sup>194,352</sup> So bewirkt eine Inhibition der AP-1 Aktivität in MCF-7 Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine reduzierte Proliferation, ohne allerdings Apoptosesignalwege zu beeinflussen.<sup>352</sup> Auch eine direkte Inhibition von c-fos und c-jun führt zu einer Veränderung des Zellzyklus und somit zu einer veränderten Proliferation,<sup>353</sup> was die Ergebnisse dieser Arbeit zusätzlich unterstützt.

Die Transkription von c-fos und c-jun und dadurch auch die Aktivität von AP-1 werden unter anderem über den Ras/MAPK-Signalweg moduliert (s. 1.3.1.1), welcher in Tumoren häufig dereguliert ist.<sup>354</sup> Im Gegenzug stehen auch Erk, p38 und JNK unter der transkriptionellen Kontrolle von AP-1.<sup>354</sup> Da Ras zudem die PI3K/Akt-Signalkaskade moduliert,<sup>266</sup> welche im MMTV-PyMT Mausmodell die Tumorigenese auslöst,<sup>284</sup> ist eine Interaktion von Kaliumkanälen mit Ras über *immediate early genes* denkbar. Von einigen Kaliumkanälen, wie z.B.  $K_v3.1$ , ist ebenfalls bereits bekannt, dass sie über den PI3K/Akt- sowie Ras/MAPK-Signalweg (s. auch 1.3.2) aktiviert werden und dadurch Zellen aus dem G0-Zustand in die G1-Phase übergehen können.<sup>27</sup> Außerdem wird diskutiert, dass Kaliumkanäle selbst wachstumsfaktorabhängige Signalwege über ERK und Akt aktivieren können.<sup>27</sup> Auch IK-Kanäle könnten diese Signalkaskaden auf verschiedenen Ebenen modulieren. In Brusttumorzellen wurde bisher weder eine Interaktion von IK mit Ras/MAPK noch mit PI3K/Akt beschrieben. Jedoch sind solche Mechanismen beispielsweise aus Fibroblasten bekannt, in welchen der IK-Kanal (Fibroblasten-IK, FIK) als multifunktionales Wachstumsfaktor-reguliertes Signalmolekül beschrieben ist.<sup>270,271</sup> Hier führt die Stimulation mit Wachstumsfaktoren bzw. die Aktivierung von Ras oder Raf zu einer Hochregulation des IK-Kanals, welcher dann Wachstum, Proliferation und Differenzierung reguliert. Dies bestätigt die Bedeutung des IK-Kanals für den Ras/MAPK-Signalweg in Fibroblasten.<sup>270,271</sup> Zudem wurde in zwei Prostatakarzinomzelllinien ein Kaliumstrom identifiziert, dessen Stromdichte der in Fibroblasten sehr ähnelt.<sup>355</sup> Auch hier wird die IK-Kanalaktivität daher mit der Wachstumsregulation über eine Interaktion mit der Ras/MAPK-Signalkaskade in Verbindung gebracht.<sup>355</sup> In einer Glioblastomzelllinie konnte eine Verringerung des IK-Stroms allerdings nicht mit der Aktivität von ERK assoziiert werden.<sup>269</sup> Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die IK-abhängige Aktivität von Erk MMTV-PyMT Brusttumorzellen über den Phosphorylierungsstatus untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche sind jedoch bislang noch nicht aussagekräftig.

Ähnlich wie  $K_{V3.1}$ -Kanäle (s.o.) könnten IK-Kanäle auch direkt mit der PI3K/Akt-Signalkaskade interagieren und so möglicherweise das Wachstum von MMTV-PyMT Zellen beeinflussen. PI3K-abhängige Signalwege vermitteln in B-Lymphozyten bei Serumstimulation eine Verstärkung der IK-Kanalaktivität sowie eine erhöhte Kanalexpression auf der Zelloberfläche.<sup>356</sup> In einem Modell der diabetischen Nephropathie sind IK-Kanäle außerdem an autophagischen Prozessen über diesen Signalweg beteiligt.<sup>357</sup> Dies könnte über Veränderungen von  $[Ca^{2+}]_i$  geschehen, was unter anderem über IK-Kanäle reguliert wird. Allgemein wird  $[Ca^{2+}]_i$  eine essentielle Rolle bei der Regulation von Wachstumsprozessen von Tumorzellen zugeschrieben.<sup>174</sup> Das verminderte Wachstum und die Zellzyklusverschiebungen von MMTV-PyMT Zellen unter IK-Kanalblockade bzw. -ablation könnten demnach auch auf einer Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase beruhen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von MMTV-PyMT Brusttumorzellen (und MMTV-cNeu) in Abhängigkeit der IK-Kanalaktivität gemessen (s. 4.9).

#### **6.2.2.2 IK-Kanal-abhängige Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase regulieren das Wachstum muriner Brusttumorzellen**

In den MMTV-PyMT Brusttumorzellen waren akute  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale (ausgelöst durch Serum, d.h. Wachstumsfaktoren) durch eine genetische Ablation bzw. nach pharmakologischer Inhibition der IK-Kanalaktivität reduziert (s. Abb. 5.10). Auch spontane  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, die wahrscheinlich für eine koordinierte Progression des Zellzyklus essentiell sind (s. 1.3.1.1), konnten durch die IK-Kanalinhibition mit TRAM-34 reduziert werden (s. Abb. 5.11). Ebenfalls wurde versucht, die Anzahl spontaner  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in Abhängigkeit der IK-Kanalexpression zu untersuchen. Da allerdings sowohl in IK-WT als auch in IK-KO Zellen generell nur bei sehr wenigen Zellen solche Oszillationen beobachtet werden können, konnte eine mögliche Reduktion durch die IK-Kanalablation nicht herausgearbeitet werden.

Bisher nimmt man an, dass Kaliumkanäle unter anderem über die Hyperpolarisation des Membranpotentials den Einstrom von  $Ca^{2+}$  fördern und der dadurch bedingte Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  zur Proliferation der Zellen führt.<sup>27,163</sup> Des Weiteren finden sich wichtige Calciumspeicher auch innerhalb der Zelle, wie beispielsweise im ER oder in Mitochondrien.<sup>27</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine blockierte bzw. fehlende IK-Kanalaktivität  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale reduziert und hierüber vermutlich das Wachstum der MMTV-PyMT Brusttumorzellen beeinflusst (s.o. und 5.2.2.1). Diese Hypothese wird durch die Analyse der  $Ca^{2+}$ -Transienten in MMTV-cNeu Brusttumorzellen gestützt (s. Anhang Abb. 7.3). Auch in diesen ist ein seruminduzierter Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nach der Applikation von TRAM-34 signifikant vermindert und führt in der Folge zu einer geringeren Wachstumsrate (s. Anhang Abb. 7.1 und Abb. 7.2). Dies könnte darüber vermittelt werden, dass  $[Ca^{2+}]_i$  essentiell an einzelnen Phasenübergängen im Zellzyklus (G1/S und G2/M) beteiligt ist.<sup>174</sup> Insbesondere am Übergang von der G1- in die S-Phase sind  $Ca^{2+}$ -Oszillationen essentiell.<sup>174</sup> Eine IK-abhängige Reduktion der  $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten in diesem Zellzyklusabschnitt würde demnach direkt die Zellzyklusprogression beeinflussen. Damit übereinstimmend konnten eine G1-Arretierung von MMTV-PyMT Brusttumorzellen sowie geringere Spiegel der *immediate early genes* c-fos und c-jun bei geringerer oder fehlender IK-Kanalaktivität detektiert werden (s.o. und 5.2.2.2). Ihre Expression und somit auch die Aktivität von AP-1 ist ebenfalls von  $[Ca^{2+}]_i$  abhängig (s.o.).<sup>174,177</sup> IK-Kanäle könnten folglich also auch die Aktivität von AP-1 über  $Ca^{2+}$  regulieren. Eine direkte Interaktion IK-vermittelter Signalwege und AP-1 ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Allerdings ist bekannt, dass AP-1 mit Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie interagiert, welche wiederum über  $[Ca^{2+}]_i$

reguliert werden.<sup>198</sup> Eine Aktivierung von Immunzellen geht beispielsweise mit einem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg einher. Über die CaM-vermittelte Induktion von Calcineurin wird NFAT dephosphoryliert.<sup>198</sup> Der IK-Kanal könnte folglich über einen noch ungeklärten Mechanismus indirekt über eine Beeinflussung von  $[Ca^{2+}]_i$  in die NFAT- und somit auch AP-1-abhängige Transkription eingreifen und so das Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen regulieren. Im Gegenzug könnten auch AP-1 und NFAT die Aktivität bzw. Expression von IK-Kanälen kontrollieren. Für T-Lymphozyten ist beispielsweise bekannt, dass sich ein Regulationselement für NFAT/AP-1 im 5'-flankierenden Bereich des IK-Gens befindet.<sup>338</sup> Interessant wäre daher, den Phosphorylierungsstatus von NFAT sowie die Aktivität von AP-1 in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe und -zellen in Abhängigkeit der IK-Kanalaktivität zu untersuchen.

Allgemein könnten  $Ca^{2+}$ /CaM-regulierte Einflüsse auf die Proliferation über IK-Kanäle moduliert werden. Zum einen stellt CaM die  $Ca^{2+}$ -sensitive Domäne des Kanals dar und ist damit maßgeblich für seine Aktivität entscheidend.<sup>47</sup> Zum anderen bewirkt ein veränderter oder fehlender IK-Kanalstrom in MMTV-PyMT Zellen eine Reduktion von  $[Ca^{2+}]_i$  (s. 5.2.4) und hierüber vermutlich eine Arretierung der Zellen in der G1-Phase (s. 5.2.2.2). IK-Kanäle könnten demnach die Aktivität  $Ca^{2+}$ /CaM-abhängiger Proteine koordinieren, die häufig in die Proliferation von Krebszellen involviert sind.<sup>177</sup> Eine Modulation Ras-kontrollierter Signalwege ist denkbar, da  $Ca^{2+}$  unter anderem Ras über eine Interaktion mit dem GTP-Austauscherprotein GEF aktivieren und so nachgeschaltete Prozesse über Raf bzw. PI3K regulieren kann (s. 1.3.2).<sup>177,358</sup> Generell weisen intrazelluläres  $Ca^{2+}$  und Ras bezüglich der Regulation der Zellzyklusprogression einige Parallelen auf: Beide werden für den Übergang aus G0 in G1 benötigt und sind dann außerdem am Ende der G1-Phase für den Eintritt in die S-Phase essentiell. Vermutlich wird die pRb-vermittelte Zellzykluskontrolle und somit der Phasenübergang sowohl über  $Ca^{2+}$  als auch über Ras reguliert, indem beide für die Phosphorylierung von pRb benötigt werden.<sup>174,177</sup> Auch IK-Kanäle regulieren den G1/S-Übergang in MMTV-PyMT Brusttumorzellen, was über die Veränderungen der Zellzyklusmarker (s. Abb. 5.6 und Abb. 5.8) bzw. die Arretierung der TRAM-34 behandelten Zellen in der G1-Phase (s. Abb. 5.7) gezeigt wurde. Durch die gleichzeitige Beeinflussung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale könnten sie demnach auch die Zellzykluskontrolle in Abhängigkeit des pRb-Phosphorylierungsstatus koordinieren.  $Ca^{2+}$ /CaM aktiviert außerdem die CaMK, deren Inhibition zu einer Blockade der Zellzyklusprogression führt, unter anderem bedingt durch einen Verlust von Cyclin D1.<sup>174</sup> Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, den Phosphorylierungsstatus und somit die Aktivität der CaMK (pCaMK) in Abhängigkeit der IK-Kanalaktivität zu detektieren (s. 1.3.1, Daten nicht gezeigt). Allerdings sind die Befunde bislang noch nicht aussagekräftig. Dennoch ist dies ein wahrscheinlicher Mechanismus, über den IK-Kanäle in die  $Ca^{2+}$ -vermittelte Regulation der Tumorzellproliferation eingreifen. Für BK-Kanäle konnte ein solcher Zusammenhang bereits in Glioblastomzellen gezeigt werden.<sup>359</sup> Über diesen Weg könnten, wie zuvor erwähnt, auch Calcineurin und NFAT aktiviert werden (s.o.).

Welche Calciumkanäle nun IK-abhängig die  $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase von MMTV-PyMT Brusttumorzellen regulieren, ist noch unklar und muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Potentielle Strukturen in diesem Zusammenhang könnten in der Plasmamembran der Zelle befindliche  $Ca^{2+}$ -Ionenkanäle oder Ionenaustauscher sein sowie intrazellulär lokalisierte Komponenten der Calciumspeicher am ER.<sup>360</sup> Es ist bekannt, dass die IK-vermittelte Hyperpolarisation bzw. der Efflux der  $K^+$ -Ionen TRP-Kanäle oder STIM/Orai1 aktiviert.<sup>174</sup> Über eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Marc Freichel von der Universität Heidelberg konnte eine Reihe potentieller  $Ca^{2+}$ -Kanäle

dieser Familien in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe auf mRNA-Ebene detektiert werden (s. Anhang Tabelle 7.6). Mit TRMP3 wurde ein Kanal identifiziert, der in einem hohen Ausmaß in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe exprimiert wird, permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$  ist<sup>361</sup> und für den mit Mefenamensäure ein vergleichsweise selektiver Inhibitor<sup>362</sup> zur Verfügung stand. Daher wurde im Rahmen eines Teilprojektes, welches im Zuge der medizinischen Doktorarbeit von Eric Illison am hiesigen Lehrstuhl durchgeführt wurde, überprüft, ob TRPM3-Kanäle Interaktionspartner von IK in MMTV-PyMT Brusttumorzellen darstellen (s. Eric Illison „Die Rolle von SK4 und TRPM3 für die Proliferation von MMTV PyMT Brusttumorzellen“, Dissertationsschrift, Universität Tübingen, 2016). Durch die pharmakologische Inhibition von TRPM3 konnte eine Reduktion von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  detektiert werden, jedoch wurde das Wachstum dadurch nicht beeinflusst. Auch eine gleichzeitige Blockade von TRMP3 und IK wirkte sich weder synergistisch auf das Wachstum noch auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase aus. Von anderen TRP-Kanälen ist hingegen bekannt, dass sie unter anderem die NFAT-abhängige Gentranskription regulieren.<sup>174</sup> Hierzu gehört ein weiterer Vertreter der TRP-Kanäle, nämlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable TRPV6, welchem beim Prostatakarzinom aufgrund dieser Interaktion eine wichtige Funktion zugeschrieben wird.<sup>363</sup> Interessanterweise konnte in einer Prostatakarzinomzelllinie gezeigt werden, dass IK-Kanäle durch die Hyperpolarisation des Membranpotentials den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über TRPV6 auslösen.<sup>183</sup> Eine Überexpression von TRPV6 wurde auch schon in Brusttumorgewebe, insbesondere in invasiven Subtypen und Zelllinien, nachgewiesen.<sup>364,365</sup> Auch in MMTV-PyMT Brusttumorzellen könnten IK-Kanäle den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über TRPV6 regulieren, welcher dann in der Folge der Inhibition bzw. Ablation reduziert wird.

Eine mögliche Interaktion von IK-Kanälen mit sogenannten CRAC-Kanälen wie STIM/Orai, welche den sog. *store operated calcium entry* (SOCE) regulieren (s. 1.3.1), ist ebenfalls denkbar. Orai ist der eigentliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, dessen Aktivierung über STIM-Proteine reguliert wird.<sup>71,366</sup> Diese sind in der Membran des ER lokalisiert und gelten als die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren des SOCE, da sie durch die Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des ER aktiviert werden.<sup>71,367</sup> Neben STIM und Orai wird auch IK-Kanälen eine Funktion bei der Aktivierung des SOCE zugeschrieben.<sup>368</sup> In T-Lymphozyten sind IK-Kanäle beispielsweise als amplifizierende Strukturen des CRAC-Stroms beschrieben. Durch die Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wird IK aktiviert und trägt über die Hyperpolarisation der Membran zu einem gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei.<sup>368</sup> Diesem Prozess könnte eine direkte Interaktion des IK-Kanals mit Orai zugrunde liegen, denn in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-435s bildet der strukturverwandte SK3-Kanal einen Komplex mit dem Subtyp Orai1, über welchen SK3 einen konstitutiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kontrolliert und somit die Migration und Metastasierung der Zellen fördert.<sup>234</sup> Ein solcher Komplex könnte auch eine Erklärung für die reduzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in IK-defizienten bzw. TRAM-34 behandelten murinen Brusttumorzellen sein (s. Abb. 5.10 und Abb. 5.11). Aufschlussreich könnten zukünftige Versuche mit Inhibitoren des STIM/Orai-regulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und deren Rolle für die Wachstumsregulation bzw.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in MMTV-PyMT IK-KO Zellen sowie TRAM-34 behandelten Zellen sein. Als pharmakologische Modulatoren der STIM/Orai Komplexe stehen 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), SKF-96365 und Bistrifluoromethylpyrazol (BTP2) zur Verfügung, welche jedoch wie alle derzeit verfügbaren STIM/Orai Inhibitoren auch einen Einfluss auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom TRP-Typ sowie auf  $\text{K}^+$ -Kanäle haben.<sup>366</sup> Alternativ bzw. ergänzend zu der pharmakologischen STIM/Orai-Modulation kann eine Entleerung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Speicher mit Thapsigargin<sup>369</sup> vorgenommen werden, um dann zu überprüfen,

inwiefern ein anschließender SOCE durch die Inhibition bzw. Ablation von IK verändert ist. Mit dieser Methode wurde ein vergleichbarer Mechanismus zum Beispiel in Chondrozyten aufgedeckt.<sup>370</sup> Auch T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen wird über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom eine Funktion bei der Proliferation von Brusttumorzellen zugeschrieben.<sup>360</sup> Diese Kanäle sind schon bei sehr niedrigen Membranpotentialen geöffnet und insbesondere in der S-Phase vor dem Eintritt in die G2/M-Phase aktiv. Zwei mögliche, allerdings entgegengesetzte Aktivierungen der T-Typ Kanäle werden in diesem Zusammenhang diskutiert, die sowohl vom Membranpotential als auch von Kaliumkanälen abhängig sind. In Zellen, welche in der G0-Phase stark hyperpolarisiert sind, lässt sich eine hohe Kaliumkanalaktivität nachweisen. CDKs blockieren die Kaliumströme, worauf aufgrund der dadurch ausgelösten Depolarisation der Zellmembran T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle öffnen, sodass  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen auftreten. Darüber werden wiederum  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle aktiviert, die anschließend eine weitere Hyperpolarisation der Membran bewirken. Dies ist beispielsweise für Glattmuskelzellen beschrieben. Im Gegensatz dazu steht die Theorie, dass Zellen, welche in der G0-Phase depolarisiert sind, in diesem Zustand inaktive T-Typ Calciumkanäle besitzen. Als Folge der verminderten CDK-Aktivität werden Kaliumkanäle aktiviert, so dass über die daraus resultierende Hyperpolarisation T-Typ Calciumkanäle den Refraktärzustand verlassen und eine erneute Aktivierung möglich ist. Daher wird postuliert, dass die Inhibition der Kaliumströme die Zellproliferation blockiert, was bereits in Melanomzellen, T-Lymphozyten und Brustkrebszellen bestätigt werden konnte.<sup>360</sup> Ein ähnlicher Mechanismus könnte der IK-vermittelten Wachstumsregulation in MMTV-PyMT Brusttumorzellen zugrunde liegen. In Kombination mit einem spezifischen Inhibitor für T-Typ Calciumkanäle könnte diese Theorie überprüft werden. Hierzu kann Mibefradil<sup>360</sup> oder alternativ das Neuroleptikum Pimozid<sup>371</sup> als Inhibitor verwendet werden. Von letzterem ist bereits bekannt, dass es eine Wachstumsinhibition von MCF-7 Brusttumorzellen bewirkt.<sup>371</sup> Dies ist jedoch durch einen zusätzlichen Mechanismus bedingt, welcher unabhängig von der Blockade von T-Typ Calciumkanälen ist.<sup>372</sup>

### **6.2.2.3 Das IK-abhängige Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen beruht nicht auf einer Involvierung von IK in apoptotische Prozesse**

Genotyp- und behandlungsbedingte Wachstumsunterschiede zwischen den Brusttumorzellen können zusätzlich durch Änderungen der Apoptosesignalwege bedingt sein. Daher wurden die Zellen mit TRAM-34 bzw. der Positivkontrolle STS behandelt (s. 4.8.3). Bereits makroskopisch ließ sich durch die Behandlung mit STS eine Abrundung und ein Ablösen der Zellen aus dem Zellverband beobachten (s. Abb. 5.9 A), wogegen dies unter einer Behandlung mit TRAM-34 nicht beobachtet wurde (s. Abb. 5.9 B). Abrunden und Ablösen der Zellen sind bereits typische Charakteristika für die Induktion der Apoptose.<sup>203,204,373</sup> Damit übereinstimmend ließ sich durch eine 4-stündige Behandlung der Zellen mit STS sowohl eine positive Bande für Cytochrom C als auch für die aktivierte Form der Caspase 3 (*Cleaved Caspase 3*) in der cytosolischen Fraktion beobachten (s. Abb. 5.9 C). Diese Hauptereignisse der Apoptose waren nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 jedoch unverändert (s. Abb. 5.9 C). Eine Aktivierung des intrinsischen Signalweges der Apoptose durch TRAM-34 kann also ausgeschlossen werden. Theoretisch wäre ein Eingriff in den extrinsischen Signalweg denkbar, was jedoch aufgrund der fehlenden Bande für die aktivierte Caspase 3 unwahrscheinlich ist.<sup>204,208</sup> Das verminderte Wachstum durch die reduzierte bzw. fehlende IK-Kanalaktivität (5.2.2.1) beruht also vermutlich auf einem reinen antiproliferativen Effekt. Somit haben auch die IK-abhängigen Veränderungen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  keinen Einfluss auf die Apoptose muriner Brusttumorzellen (s. 5.2.4).

Generell ist über die Rolle des IK-Kanals bei apoptotischen Vorgängen in Brustkrebszellen bisher nur wenig bekannt. Lediglich in der Zelllinie MDA-MB-231 konnte durch die pharmakologische Inhibition von IK eine Induktion der Apoptose beobachtet werden.<sup>223</sup> Die in dieser Publikation verwendete Konzentration von TRAM-34 war mit 20  $\mu\text{M}$  allerdings doppelt so hoch wie in der vorliegenden Arbeit.<sup>223</sup> Für Melanomzellen konnte ebenfalls eine Involvierung des IK-Kanals in die Apoptose gezeigt werden, allerdings nur in Kombination mit TRAIL, einem Aktivator des extrinsischen Signalwegs.<sup>222</sup> Interessanterweise führt eine Kobehandlung mit TRAIL und TRAM-34 sowohl in TRAIL-sensitiven als auch TRAIL-insensitiven Zelllinien zur Apoptose. Darüber hinaus lässt sich auch eine Beeinflussung des intrinsischen Signalwegs durch TRAM-34 beobachten.<sup>222</sup> Es ist also denkbar, dass TRAM-34 in Kombination mit gängigen Zytostatika oder apoptoseinduzierenden Substanzen die Apoptose oder andere Regulationsmechanismen in Tumorzellen synergistisch beeinflussen kann. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die Kombination von TRAM-34 mit Docetaxel zu einer Reduktion der Anzahl von MMTV-PyMT Brusttumorzellen führt (s. 4.6.1).

#### **6.2.2.4 Die pharmakologische Inhibition des IK-Kanals erhöht die Sensitivität von MMTV-PyMT Brusttumorzellen gegenüber Docetaxel**

Kombinationstherapien von Zytostatika werden häufig eingesetzt, um das Nebenwirkungsrisiko über Dosisreduktionen bei gleich bleibender Therapieeffektivität zu minimieren und so eine zusätzliche Belastung der Patienten möglichst gering zu halten.<sup>374-376</sup> Es wurde daher untersucht, ob durch eine Inhibition bzw. Ablation des IK-Kanals das Ansprechen von MMTV-PyMT Brusttumorzellen auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel verbessert werden kann. Docetaxel gehört als Taxan nach der S3-Leitlinie zur Standardtherapie des Mammakarzinoms.<sup>84</sup> Es fungiert als Mitoseinhibitor, indem es den Abbau des Spindelapparates blockiert.<sup>15,31,337</sup>

Tatsächlich konnte durch die zusätzliche Applikation von TRAM-34 eine erhöhte Sensitivität der MMTV-PyMT Brusttumorzellen gegenüber Docetaxel ermittelt werden (s. Abb. 5.12). So war die Zellzahl in Anwesenheit von Docetaxel (10 nM) und TRAM-34 sogar geringer als mit einer hohen Docetaxelkonzentrationen (100 nM). Interessanterweise hatte die genetische Ablation von IK in MMTV-PyMT Brusttumorzellen keinen Einfluss auf das Ansprechen gegenüber Docetaxel (s. Abb. 5.13). Möglicherweise verhindert die Kompensation durch andere Kaliumkanäle in den IK-negativen MMTV-PyMT Brusttumorzellen eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Docetaxel. Dies könnten beispielsweise BK-Kanäle oder die strukturverwandten SK2-Kanäle sein, deren Expression in MMTV-PyMT Brusttumorzellen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen wurde (s. Abb. 5.1). Inwiefern eine Überexpression von SK2 zu einem veränderten Wachstum von Brusttumorzellen führt, wurde jedoch nicht untersucht. Zudem ist bekannt, dass auch humane Brusttumorzelllinien SK3-Kanäle exprimieren.<sup>233</sup> Jedoch zeigen die vorliegenden Daten nur sehr geringe SK3 Expressionslevel in MMTV-PyMT Brusttumorproben (s. Abb. 5.1), was eine Kompensation über SK3 unwahrscheinlich macht. Bei einer pharmakologischen Inhibition des IK und damit einer akuten Reduktion der IK-Kaliumströme sind aufgrund des verhältnismäßig kurzen Expositions- und Beobachtungsintervalls entsprechende Kompensationsmechanismen nicht zu erwarten.

Es konnte zudem vielmehr eine Reduktion der Zellzahl als eine Wachstumsinhibition durch die Kombinationsbehandlung beobachtet werden. Docetaxel löst über die Inhibition des Spindelapparates in der M-Phase eine sogenannte mitotische Katastrophe in humanen Brusttumorzelllinien aus.<sup>337,377</sup> So führt bereits eine Konzentration von 10 nM zu einem Absterben der Zellen. Zusätzlich wird auch ein

Eingriff in reguläre apoptotische Vorgänge beschrieben.<sup>337</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen noch mit Docetaxel 1 nM ergänzt. In Anwesenheit von TRAM-34 ist bereits diese Konzentration ausreichend, um eine Reduktion der Zellzahl von MMTV-PyMT Brusttumorzellen zu erreichen (s.o.). Wie die Befunde dieser Arbeit zeigen, bewirkt TRAM-34 über die IK-Kanalinhhibition eine Arretierung von MMTV-PyMT Brusttumorzellen in der G1-Phase (s. Abb. 5.6 und Abb. 5.7). Durch die gleichzeitige Behandlung mit dem Kanalinhibitor TRAM-34 und dem Mitosehemmstoff Docetaxel werden also sowohl Zellen in der G1-Phase als auch in der G2/M-Phase erfasst, was den synergistischen Effekt der Kombinationsbehandlung erklären könnte. Dieser Therapieansatz könnte demnach aufgrund der geringeren Docetaxel-Konzentration dazu beitragen, schwerwiegende Nebenwirkungen des Zytostatikums zu reduzieren. Letztlich deuten die Befunde zur Kombinationsbehandlung von TRAM-34 und Docetaxel darauf hin, dass dadurch auch Therapieresistenzen gegenüber Docetaxel überwunden werden könnten. Resistenzmechanismen gegenüber Taxanen aufgrund von zellauswärts gerichteten ABC-Transportern bzw. einer Strukturänderung der  $\beta$ -Untereinheit von Tubulin lassen sich in Tumoren häufig nachweisen.<sup>31</sup> Dass Therapieresistenzen durch Kaliumkanäle reguliert werden und durch eine Inhibition der Kaliumkanalaktivität überwunden werden können, ist beispielsweise für hERG-Kanäle in Leukämiezellen beschrieben.<sup>39</sup>

Ob eine Co-Applikation von TRAM-34 generell eine höhere Sensitivität von MMTV-PyMT Brusttumorzellen gegenüber Zytostatika bewirkt, ist derzeit unklar. Beispielsweise wäre die Kombination von TRAM-34 mit einem Zytostatikum wie dem Antimetaboliten 5-Fluorouracil oder dem zytostatischen Antibiotikum Doxorubicin interessant, welche nicht direkt in die Regulation des Zellzyklus eingreifen (s. auch Anhang Tabelle 7.1).<sup>15,31</sup>

Zusammengenommen unterstreichen die *in vitro* Daten die wichtige Funktion des IK-Kanals für die Proliferation von MMTV-PyMT Brusttumorzellen. IK-Kanäle werden in murinem Brusttumorgewebe überexprimiert und regulieren das Wachstum der Zellen über einen Eingriff in Zellzyklusprozesse sowie die  $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase (s.o.). IK bewirkt über einen verstärkten  $K^+$ -Ausstrom vermutlich eine Hyperpolarisation, was letztlich einen transienten Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt. Sowohl wachstumsfaktorinduzierte als auch spontane  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale zeigten sich sensitiv gegenüber der pharmakologischen oder genetischen Modulation der IK-Kanalaktivität. Somit könnten IK-Kanäle möglicherweise als Komponenten der Wachstumsfaktor-regulierten Ras/MAPK- und PI3K/Akt-Signalkaskaden fungieren.<sup>27</sup> Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Behandlung von Brusttumorzellen mit Docetaxel in Kombination mit einer pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals das Zellwachstum günstig beeinflusst.

### 6.2.3 IK-Kanäle können die murine Tumorigenese *in vivo* beeinflussen

Die Funktion von IK-Kanälen bei Brustkrebs wurde bis jetzt ausführlich mithilfe von *in vitro* Systemen untersucht. Nach heutigem Wissenstand steht eine Charakterisierung der Rolle von IK für die Tumorentwicklung und das Therapieansprechen in *in vivo* Modellen des Mammakarzinoms aus. Ein Bestandteil dieser Arbeit war es daher, den Einfluss des IK auf die Tumorigenese anhand geeigneter Mausmodelle zu überprüfen. Da der genetische Hintergrund der Tiere eine entscheidende Determinante der Tumorentwicklung ist,<sup>301,302</sup> wurden zuerst IK-KO Tiere mit einem C57Bl/6-Hintergrund über insgesamt sechs Generationen (n = 6) auf einen FVB-Hintergrund

zurückgekreuzt (s. 4.1.2). Für die letztlichen Versuchstiere ergab sich somit ein FVB-Anteil von über 98%. Inwiefern dieser FVB-Anteil zu einem identischen tumorfreien Überleben sowie Gesamtüberleben führt, wurde durch den Vergleich der transgenen IK-WT Tiere aus der Rückzucht mit MMTV-PyMT Tieren auf einem reinem FVB-Hintergrund deutlich. Für MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) ist in der Literatur ein mittleres tumorfreies Überleben von 53 bzw. 57 Tagen beschrieben,<sup>300,302</sup> auf einem C57Bl/6-Hintergrund verschiebt sich dieser Wert auf 92 Tage.<sup>302</sup> Die eigenen Kaplan-Meier-Kurven belegen, dass der FVB-Anteil von über 98% ausreicht, um ein identisches tumorfreies Überleben sowie Gesamtüberleben wie in MMTV-PyMT Tieren (FVB 100%) zu erzielen. Die Tiere entwickelten nach  $60 \pm 2$  Tagen (FVB 100%) bzw.  $63 \pm 4$  Tagen (FVB 98%) den ersten Tumor (s. Abb. 5.14 A+B). Das Gesamtüberleben war mit  $100 \pm 3$  Tagen (FVB 100%) bzw.  $92 \pm 3$  Tagen (FVB 98%) ebenfalls nicht verändert (s. Abb. 5.14 C+D). Mithilfe des Log-Rank-Testes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ermittelt werden.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die genetische Ablation des IK-Kanals zu einer Verlängerung des tumorfreien Überlebens bzw. Gesamtüberlebens in MMTV-PyMT Tieren führt (s. Abb. 5.15). Durch die Analyse der Kaplan-Meier-Kurven konnte mithilfe des Log-Rank-Testes kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der IK-Kanalexpression ermittelt werden. So entwickelten MMTV-PyMT IK-WT nach  $60 \pm 2$  Tagen den ersten Tumor, MMTV-PyMT IK-KO Tiere nach  $64 \pm 4$  Tagen (s. Abb. 5.15 A+B). Auch das Gesamtüberleben war zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant verändert: MMTV-PyMT IK-WT Tiere erreichen nach  $100 \pm 3$  Tagen das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser des Tumors), MMTV-PyMT IK-KO Mäuse nach  $107 \pm 3$  Tagen (s. Abb. 5.15 C+D). Die Analyse der Progressionsphase ergab damit übereinstimmend ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen (s. Abb. 5.15 E).

Aufgrund der überzeugenden *in vitro* Daten zur Rolle von IK in den Brusttumorzellen (s. Abb. 5.4, Abb. 5.5, Abb. 5.6, Abb. 5.7, Abb. 5.8, Abb. 5.10 und Abb. 5.11) waren die Ergebnisse in den MMTV-PyMT Tieren unerwartet. Mehrere Gründe können jedoch dafür verantwortlich sein, dass die globale Ausschaltung des IK-Kanals letztlich keine Auswirkung auf die Tumorigenese im MMTV-PyMT Mausmodell hat.

Die Komplexität der Kaliumkanalexpression in MMTV-PyMT Brusttumorzellen bzw. dem Mausmodell ist generell unzureichend verstanden. Aus unseren eigenen Experimenten wissen wir, dass im MMTV-PyMT Brusttumorgewebe BK-Kanäle und SK2-Kanäle exprimiert werden (s. Abb. 5.19, Abb. 5.20 und Abb. 5.1). Inwiefern diese Kanäle über eine Expressions- bzw. Aktivitätssteigerung *in vivo* der IK-Ablation entgegenwirken, ist derzeit allerdings noch unklar. Darüber hinaus lassen sich zumindest in humanen Brusttumorzelllinien weitere Vertreter der Kaliumkanalfamilie wie SK3-Kanäle,<sup>233</sup>  $K_{ATP}$ -Kanäle,<sup>350</sup> oder  $K_{ir}$ -Kanäle<sup>378</sup> nachweisen, welche zumindest teilweise die Funktionen von IK-Kanälen übernehmen könnten.

Da die Tumorigenese im MMTV-PyMT Mausmodell sehr schnell verläuft und die Entstehung von Tumoren außerdem bereits sehr früh einsetzt (ab 53 bzw. 57 Tagen),<sup>300,302</sup> könnte der Antitumoreffekt der IK-Kanalaktivität zu schwach sein, um letztlich Auswirkung auf die Überlebenskurven zu haben.

Im hiesigen Arbeitskreis wurde bereits das MMTV-cNeu Mausmodell auf einem gemischten Hintergrund in Abhängigkeit der IK-Kanalexpression untersucht. Dieses ist durch eine langsamere Tumorprogression charakterisiert (s. Severine Stehling „Untersuchung der Rolle von  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanälen in der Entstehung von Tumoren und deren Chemoresistenz“, Dissertationsschrift, Universität Tübingen, 2014). Die Analyse der Kaplan-Meier-Kurven ergab eine signifikante

Verlängerung des mittleren tumorfreien Überlebens für die IK-defizienten Brusttumortiere. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes (nach 80 Wochen) hatte sich der Unterschied jedoch nivelliert. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das MMTV-cNeu Mausmodell auf einem FVB-Hintergrund (FVB-Anteil > 98%) reanalysiert (s. Abb. 5.17). Dabei zeigten die Kaplan-Meier-Kurven, dass sowohl das tumorfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben durch die IK-Kanalablation signifikant verlängert waren. Bei MMTV-cNeu IK-WT Tieren konnte nach  $247 \pm 9$  Tagen ein Tumor getastet werden, bei IK-KO Tieren erst nach  $322 \pm 21$  Tagen (s. Abb. 5.17 A+B). Das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser) wurde von MMTV-cNeu IK-KO Tieren nach  $391 \pm 19$  Tagen erreicht, von den WT Kontrolltieren hingegen bereits nach  $219 \pm 9$  Tagen (s. Abb. 5.17 C+D). Dadurch war auch die Progressionsphase in IK-defizienten MMTV-cNeu Tieren mit  $68 \pm 11$  Tagen signifikant verlängert (IK-WT:  $46 \pm 4$  Tage, s. Abb. 5.17 E). Diese Befunde unterstreichen die wichtige Funktion des IK-Kanals sowohl bei der Entstehung als auch bei der Progression des murinen Mammakarzinoms. Sowohl im MMTV-PyMT Mausmodell als auch im MMTV-cNeu Mausmodell wird die Tumorigenese jedoch durch ähnliche Signalkaskaden ausgelöst (s. 3.1). Interessant wäre es daher, die Auswirkung der IK-Kanalablation in einem alternativen Modell zu studieren, etwa in dem MMTV-Wnt-1 Modell, in welchem die Tumorigenese auf einer Bindung von *Wingless-Int1* (Wnt) an den *Frizzled*-Rezeptor beruht.<sup>379</sup> Dies führt zur Inhibition eigentlich konstitutiv aktiver Kinasen, welche in der Folge  $\beta$ -Catenin nicht mehr phosphorylieren und somit dessen Expression stabilisieren und verstärken. Durch die Assoziation mit E-Cadherin reguliert  $\beta$ -Catenin beispielsweise die Transkription von c-myc oder Cyclin D1.<sup>6,379,380</sup> Durch die Generierung von MMTV-Wnt-1 positiven IK-KO Tieren könnte überprüft werden, inwiefern die Wnt1-abhängige Tumorigenese möglicherweise über IK das tumorfreie sowie das Gesamtüberleben beeinflusst.

Ein eigentlicher positiv zu bewertender Antitumoreffekt der IK-Kanalablation auf die Tumorigenese und auf das Tumorwachstum im MMTV-PyMT Modell könnte zudem durch eine veränderte Aktivität des Immunsystems verschleiert werden. So werden humane und murine IK-Kanäle in mindestens drei wichtigen Immunzelltypen, d.h. T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen, exprimiert und beeinflussen maßgeblich deren Aktivität.<sup>61</sup> So steigt bei einer Aktivierung von T-Lymphozyten durch Mitogene die Anzahl der IK-Kanäle signifikant an.<sup>61,63,338,339</sup> Sie übernehmen in diesen Zellen in der Folge wichtige Funktionen bei der Proliferation, vermutlich über die Regulation des Membranpotentials sowie von  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen.<sup>64,340</sup> IK-Kanalinhibitoren werden daher als potentielle Arzneistoffe bei Autoimmunerkrankungen, Entzündungsreaktionen und als Immunsuppressiva nach Transplantationen angesehen.<sup>61,381</sup> Diese Annahme wurde anhand eines Allotransplantationsmodell überprüft (s. 4.2.4). Hierfür wurden FVB/N WT Tiere orthotop mit IK-negativen oder IK-positiven MMTV-PyMT Brusttumorzellen transplantiert. Die präliminären Kaplan-Meier-Kurven über einen Beobachtungszeitraum von 60 Tagen zeigen, dass das tumorfreie Überleben in Tieren, in welche mit IK-KO Zellen transplantiert wurden, mit  $45 \pm 7$  Tagen verglichen mit den Wildtypkontrollen ( $20 \pm 2$  Tage) signifikant verlängert ist (s. Abb. 5.16).

Darüber hinaus sollten die erhobenen Daten zur Kombinationsbehandlung von Docetaxel mit TRAM-34 *in vitro* (s.o.) durch ein geeignetes *in vivo* Modell überprüft werden. In Anbetracht dieser Ergebnisse wäre zu erwarten, dass durch die zusätzliche Inhibition des IK-Kanals niedrigere Konzentrationen des Zytostatikums für gleiche Effekte ausreichen. Dadurch könnten schwerwiegende Nebenwirkungen reduziert werden. Von der IK-Kanalinhibition sind keine allzu starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu erwarten. So wird beispielsweise ein alternativer

IK-Kanalblocker Senicapoc bereits in klinischen Studien der Phase III zur Behandlung der Sichelzellanämie eingesetzt.<sup>79,80</sup> Auch die *in vivo* Anwendung von TRAM-34 ist in der Literatur bereits über einen längeren Zeitraum (2-12 Wochen) beschrieben, in welchem die ein- oder zweimal tägliche Applikation 120 mg/kg KG sehr gut toleriert wird.<sup>87,382</sup> Für die Behandlung mit Docetaxel empfiehlt die Literatur eine ein- oder zweimal wöchentliche i.p. Injektion von 10 mg/kg KG, welche über einen Gesamtzeitraum von vier Wochen erfolgen kann.<sup>383,384</sup> MMTV-PyMT IK-WT Tiere könnten folglich mit einer Kombination aus TRAM-34 (120 mg/kg KG, s.c., täglich, s.o.) und Docetaxel (10 mg/kg KG, i.p., einmal wöchentlich) behandelt werden und das Tumorstadium sowie das Gesamtüberleben der Tiere untersucht werden. Außerdem könnten MMTV-PyMT IK-KO Tiere mit Docetaxel entsprechend des Protokolls behandelt werden und mit MMTV-PyMT IK-WT Tieren verglichen werden. Dadurch könnten die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Daten gestützt werden (s. Abb. 5.12).

Die *in vivo* Ergebnisse zeigen eine wichtige Funktion des IK-Kanals für die Tumorigenese und das Tumorstadium im MMTV-cNeu Mausmodell und im Allotransplantationsmodell, nicht jedoch im MMTV-PyMT Modell. Somit konnten zumindest teilweise die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Befunde bestätigt werden.

## 6.3 Charakterisierung von BK-Kanälen im murinen Mammakarzinom

### 6.3.1 MMTV-PyMT Brusttumorproben exprimieren BK-Kanäle

Die Expression von BK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorproben wurde sowohl auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (s. 4.5) als auch auf Proteinebene über immunhistochemische Färbungen sowie in Membranproteinpräparationen nachgewiesen (s. 4.7.2 bzw. 4.8.2). Des Weiteren wurden mittels Patch-Clamp-Analysen funktionale BK-Kanäle in den MMTV-PyMT Brusttumorzellen identifiziert, deren Aktivität durch den selektiven Kanalinhistor PAX blockiert werden kann (s. 4.4).

Auf mRNA-Ebene konnten in den MMTV-PyMT Brusttumorproben im Vergleich zu IK (s. Abb. 5.2 A) nur sehr geringe BK Expressionslevel nachgewiesen werden (s. Abb. 5.18 A). Die Spezifität der Primer wurde durch die Untersuchung entsprechender BK-KO Proben überprüft, in welchen erwartungsgemäß keine BK mRNA-Transkripte detektierbar waren. In primären MMTV-PyMT Brusttumorzellkulturen war der BK mRNA-Spiegel niedriger als im Brusttumorgewebe (s. Abb. 5.18 A). Dieser Befund deutet daraufhin, dass neben den Tumorzellen selbst noch weitere Zelltypen (z.B. vaskuläre Glattmuskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen) BK-Kanäle exprimieren.<sup>125,126,385</sup>

In Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten konnte BK mRNA auch in humanen Brusttumorproben sowie MCF-7, MDA-MB-231 oder MDA-MB-361 Brusttumorzelllinien nachgewiesen werden.<sup>155,170,246</sup> In MCF-7 Zellen wurde zudem eine zellzyklusabhängige Expression des BK mit einem starken Signal am Ende der G1-Phase beobachtet.<sup>170</sup> Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen weiter, dass das BK-Kanalprotein in murinen Mammakarzinomen exprimiert wird (s. Abb. 5.18 C+D). Die Spezifität des verwendeten BK-Antikörpers wurde durch Brusttumorgewebe aus BK-KO Tieren überprüft, in welchem sich erwartungsgemäß kein BK-Signal nachweisen ließ.

Überraschenderweise waren jedoch die BK mRNA-Spiegel in gesundem Brustgewebe höher als im Brusttumorgewebe der MMTV-PyMT Mäuse (s. Abb. 5.18 B). Normalerweise lässt sich in Tumoren, wie beispielsweise in Gliomen, mit steigendem Tumorstadium eine höhere Expression von BK

nachweisen.<sup>386</sup> Auch in humanen Mammakarzinomen korrelieren erhöhte Expressionslevel für Kaliumkanäle häufig mit der Malignität der Erkrankung.<sup>29</sup> Insbesondere sehr aggressive Subtypen des Mammakarzinoms weisen häufig hohe BK mRNA-Spiegel auf.<sup>155,246</sup> So lassen sich in der nicht-metastasierenden Zelllinie MCF-7 signifikant geringere BK mRNA-Expressionslevel als in der metastasierten Brustkrebszelllinie MDA-MB-361 und als in humanen Brusttumorproben beobachten.<sup>246</sup> Bekanntermaßen besitzen auch die Brusttumore von MMTV-PyMT Mäusen ein hohes Metastasierungspotential,<sup>293</sup> so dass höhere BK mRNA-Level in diesen Karzinomen zu erwarten wären. In der Literatur finden sich jedoch auch Befunde, welche das Ergebnis der vorliegenden Arbeit stützen. So konnte die Arbeitsgruppe um *Lukas Bubendorf* eine Amplifikation des *KCNMA1* Gens und damit verbunden eine Überexpression von BK mRNA und Protein nur in 23 von 1200 untersuchten Brusttumorbiopsien nachweisen.<sup>155</sup> Weitere Arbeiten implizieren sogar, dass das Brusttumorgewebe signifikant weniger BK-Protein als gesundes Brustgewebe exprimiert.<sup>387</sup> Darüber hinaus ist bekannt, dass die Expression von  $K_v1.5$ -Kanälen im Lymphom bzw. Gliom sowie die  $K_v7.1$  Level im Kolonkarzinom invers mit der Malignität korrelieren.<sup>29</sup> Generell ist zu berücksichtigen, dass der alleinige Nachweis der BK mRNA-Transkripte keine direkten Schlussfolgerungen auf die Proteinexpression und damit auf die Funktionalität der Kanäle erlaubt. So könnte es beispielsweise sein, dass MMTV-PyMT Brusttumorgewebe geringere BK mRNA-Mengen aufweisen, allerdings auf Proteinebene eine alternative Splicevariante exprimieren, welche zu einem veränderten Kaliumstrom führt und dadurch zur malignen Transformation des Brustgewebes beiträgt. In Glioblastomen ist mit dem gBK bereits eine tumorspezifische Isoform beschrieben worden, welche aufgrund einer verkürzten intrazellulären Sequenz bereits bei niedrigeren Membranpotentialen aktiviert wird.<sup>161</sup> Allerdings wurde kein Vergleich der BK-Kanalexpression auf Proteinebene mit anderen Brusttumorsubtypen oder gesundem Brustgewebe durchgeführt. Ebenso könnte die Funktion von BK in MMTV-PyMT Brusttumorzellen durch eine veränderte Expression der modulierenden  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Untereinheiten beeinflusst werden.<sup>47,105,106</sup> Auch ist denkbar, dass die Kanalaktivität durch SNPs moduliert werden könnte. Im Rahmen einer Kollaboration unseres Arbeitskreises mit dem Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart konnten Variationen von BK als Brustkrebs-Loci identifiziert werden (s. Julia Baranski „Auswirkungen genetischer Varianten von *KCNMA1* und *KCNN4* auf die Suszeptibilität für Brustkrebs“, Masterarbeit, 2012).

Mithilfe der Patch-Clamp-Technik wurde im nächsten Schritt gezeigt, dass BK-Kanäle in MMTV-PyMT Brusttumorzellen funktional sind. Diese Experimente wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. Benjamin Stegen von der Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Sowohl über die *whole cell configuration* (s. Abb. 5.19) als auch über die *cell attached configuration* (s. Abb. 5.20) wurden in MMTV-PyMT BK-WT Zellen BK-typische Ströme detektiert, deren Auswärtsleitfähigkeit durch PAX blockiert werden konnte. Diese Stromkomponente war erwartungsgemäß in BK-KO Zellen nicht nachweisbar (s. Abb. 5.20 B). Auch in der humanen Zelllinie MCF-7 konnten zellzyklusabhängig BK-Ströme identifiziert werden, die pharmakologisch durch IbTx gehemmt werden können.<sup>170</sup>

Die im Rahmen der Expressionsanalyse erhobenen Daten lassen gemeinsam mit den Ergebnissen aus der Literatur darauf schließen, dass BK-Kanäle eine wichtige Funktion im Zuge der malignen Transformation des Brustgewebes sowohl bei der Maus als auch beim Menschen übernehmen.

### 6.3.2 BK-Kanäle regulieren das Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen *in vitro*

Die genetische Ablation des BK-Kanals führt zu einer verminderten Wachstumsrate von MMTV-PyMT Brusttumorzellen (s. Abb. 5.21). Im Zuge der Diplomarbeit von Hoang Y Nguyen wurde zudem die Auswirkung der pharmakologische Kanalinhibition mittels PAX auf das Wachstum untersucht (s. Hoang Y Nguyen „Rolle von SK4- und BK-Kanälen für das Wachstum von MMTV PyMT Brusttumorzellen“, Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2013). Diese hatte allerdings keinen wachstumsinhibierenden Effekt, obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit in MMTV-PyMT Brusttumorzellen PAX-sensitive Ströme identifiziert wurden (s. Abb. 5.19 und Abb. 5.20). In der Literatur ist häufiger beschrieben, dass sich Kanalströme in Tumorzellen durch selektive Inhibitoren blockieren lassen, dies in der Folge aber das Zellwachstum nicht beeinflusst. Dies ist beispielsweise für die Glioblastomzelllinie U251 bekannt, in welcher die Applikation von PAX 2  $\mu\text{M}$  einerseits zu einer fast vollständigen Aufhebung des BK-Stromes führt.<sup>348</sup> Andererseits kann selbst mit höheren Konzentrationen von PAX (10  $\mu\text{M}$ ) kein Einfluss auf die Proliferation beobachtet werden. Letztlich konnte das Wachstum nach einer BK-Kanalinhibition nur in serumfreiem Medium reduziert werden.<sup>348</sup> Auch humane Brusttumorzelllinien exprimieren BK-Kanäle, welche mit einem selektiven Inhibitor wie PAX oder IbTx inhibiert werden können, allerdings wird das Zellwachstum dadurch nicht verändert.<sup>170,346,388</sup> In diesen konnte nur nach Stimulation des Zellwachstums mit ATP und damit verbunden über einen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die anschließende BK-Kanalblockade ein antiproliferativer Effekt beobachtet werden.<sup>388</sup> In einer anderen Arbeit wurde hingegen durch die pharmakologische Inhibition sowie den siRNA-vermittelten *knockdown* ein antiproliferativer Effekt in einigen humanen Brustkrebszelllinien beobachtet.<sup>155</sup> Offensichtlich bedarf es für die Aufklärung der tatsächlichen Funktion des BK-Kanals für die Proliferation von Brustkrebszellen weiterer Studien, welche nicht wie bisher auf der pharmakologischen Blockade bzw. dem *knockdown* basieren. Inhibitoren können schließlich weitere Angriffspunkte besitzen und eine Behandlung mit siRNA führt häufig lediglich zu einer Herunterregulation, nicht aber zu einer vollständigen Ausschaltung der Zielstruktur. Insofern sind die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Primärzellsysteme mit genetischer Ablation des BK-Kanals richtungsweisend, da diese definitiv keine funktionalen BK-Kanäle exprimieren. In der Tat führt das Fehlen des BK-Kanals zu einer signifikant reduzierten Wachstumsrate von MMTV-PyMT Brusttumorzellen im Vergleich zu BK-WT Zellen (s. Abb. 5.21). Folglich sind endogene BK-Kanäle essentiell für das maligne Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen.

#### 6.3.2.1 Die genetische Ablation von BK hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Ras und p53 in MMTV-PyMT Brusttumorzellen

Wie bereits in Kapitel 1.3.1.1 beschrieben, können Ionenkanäle Wachstum und Proliferation unter anderem über einen Eingriff in den Zellzyklus regulieren (s.o.). BK-Kanäle interagieren zudem in Fibroblasten mit dem Ras/Raf-Signalweg.<sup>246,341</sup> Ob endogene BK-Kanäle das Wachstum der MMTV-PyMT Brusttumorzellen ebenfalls über eine Regulation der Ras-Expression beeinflussen, wurde anhand der mRNA-Expression der Ras-Subtypen (*hras*, *nras*, *kras*) in Abhängigkeit der BK-Kanalexpression mittels qRT-PCR überprüft. Es konnte jedoch keine konstante Tendenz für eine unterschiedliche mRNA-Expression der Ras-Subtypen in BK-WT und BK-KO Proben ermittelt werden (s. Abb. 5.22). So war beispielsweise das Expressionslevel von *kras* in MMTV-PyMT BK-WT

Brusttumorgewebe etwa doppelt so hoch wie in BK-KO Gewebe, der Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Im Gegenzug konnte in MMTV-PyMT BK-KO Zellen eine signifikante Hochregulation von *nras* im Vergleich zu BK-WT Zellen beobachtet werden. Generell erlaubt diese Analyse auf mRNA-Ebene keine Rückschlüsse auf Änderungen der Proteinfunktion. Da zunächst nur die Ras mRNA-Basallevel der Subtypen bestimmt wurden, ist derzeit auch unklar, ob die Expression von Ras in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer möglicherweise BK-abhängig reguliert wird. Die Aktivität von Ras in BK-WT bzw. BK-KO Proben könnte außerdem mithilfe spezieller Enzymassays untersucht werden.<sup>389,390</sup> Auch *downstream*-Effektoren des Ras-Signalwegs wie PIP<sub>2</sub>, PI3K und PTEN könnten durch die BK-Kanalaktivität beeinflusst sein.<sup>155</sup>

Ebenfalls ist bekannt, dass eine Hemmung der BK-Kanalaktivität in Zervixkarzinom- und Endometriumkarzinomzellen über eine erhöhte Expression von p53 antiproliferativ wirkt.<sup>199</sup> Die p53 Expression ist unter Basalbedingungen nur gering. Im Zuge eines entsprechenden Stimulus, beispielsweise bei DNA-Schäden, wird es stabilisiert und akkumuliert im Nukleus.<sup>391</sup> Der Vergleich von BK-WT Brusttumorproben und entsprechenden BK-KO Proben zeigte lediglich eine Tendenz für eine höhere p53 mRNA-Expression nach BK Ablation (s. Abb. 5.23 A+B). Änderungen in der p53 Expression scheinen also nicht für das langsamere Wachstumsverhalten der MMTV-PyMT BK-KO Zellen verantwortlich zu sein. Letztlich wird die Aktivität von p53 über translationale Modifikationen beeinflusst, insbesondere über Phosphorylierungen, Acetylierungen oder Ubiquitinierungen.<sup>391</sup> Phosphorylierungen und Acetylierungen betreffen insbesondere mutiertes p53 und bewirken eine Stabilisierung und Akkumulation im Nukleus.<sup>391</sup> Demnach könnte der Phosphorylierungs- oder Acetylierungsstatus von p53 in Abhängigkeit der BK-Kanalexpression bzw. -aktivität variieren. Ein solcher Nachweis wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

#### **6.3.2.2 *Der Zellzyklus von MMTV-PyMT Brusttumorzellen ist von der BK-Kanalaktivität abhängig***

Durch die Restimulation mit Serum konnte eine zyklische Expression von p53 zu den untersuchten Zeitpunkten in beiden Genotypen ermittelt werden (s. Abb. 5.23 C). Erwartungsgemäß war das Expressionslevel unter unstimulierten Bedingungen (t = 0 h) sowohl in BK-WT als auch in BK-KO Zellen am höchsten, da ein Serumentzug zu einer Induktion von p53 führt.<sup>392</sup> Nach Serumstimulation war zwischen den Genotypen kein signifikanter Unterschied im p53 Level erkennbar.

Im Gegensatz dazu ist die mRNA-Expression der *immediate early genes* *c-fos* und *c-jun* von der BK-Expression abhängig. So konnte in beiden Genotypen nach einer Serumrestimulation von 30 min erwartungsgemäß ein Anstieg der *c-fos* und *c-jun* mRNA beobachtet werden (s. Abb. 5.24). Jedoch stellte sich dieser Anstieg in den BK-KO Zellen signifikant geringer dar. Eine Beteiligung von BK-Kanälen an der Zellzyklusregulation von Tumorzellen ist für die Gliomzelllinie D54-MG beschrieben.<sup>161</sup> Hier führt eine BK-Kanalblockade durch IbTx über eine Arretierung der Zellen in der S-Phase zu einer Inhibition des Wachstums.<sup>242</sup> Die untersuchten *immediate early genes* *c-fos* und *c-jun* werden allerdings unmittelbar zu Beginn der G1-Phase durch eine Wachstumsfaktorstimulation gebildet.<sup>175,190-192</sup> Da die BK-Kanalexpression in MMTV-PyMT Brusttumorzellen zu einer verminderten Expression von *c-fos* und *c-jun* führt, regulieren BK-Kanäle in diesem Zelltyp vermutlich eher den G1/S-Übergang. Bis jetzt wurde eine Interaktion von BK-Kanälen mit *c-fos* und *c-jun* bzw. dem Dimerisierungsprodukt AP-1 in Tumorzellen allerdings noch nicht beschrieben. Jedoch ist bekannt, dass PAX die Expression von *c-fos* im somatosensorischen Cortex von Mäusen reduziert.<sup>393</sup> Des Weiteren wäre ein indirekter Mechanismus über NFAT denkbar, welches einen

Transkriptionspartner von AP-1 darstellt (s.o.) und von dem bereits Interaktionen mit BK bekannt sind. Beispielsweise führt eine Aktivierung des NFAT-Subtyps NFATc3 in Glattmuskelzellen dazu, dass die  $\beta 1$ -Untereinheit von BK herunterreguliert wird, wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des BK-Kanals verringert wird.<sup>394</sup> Durch die Untersuchung von Zellzyklusmarkern, welche typischerweise in der S-Phase exprimiert werden, könnte überprüft werden, ob BK-Kanäle wie in Gliomzellen (s.o.) auch in MMTV-PyMT Brusttumorzellen für die Progression durch die S-Phase essentiell sind. Hierzu zählen beispielsweise Cyclin E oder Cyclin A, welche während des G1/S-Übergangs bzw. während der Progression durch die S-Phase aktiv sind.<sup>157</sup> Insbesondere die Expression von Cyclin E ist von Interesse, da der G1/S-Übergang auch von der Aktivität von p53 abhängig ist,<sup>157</sup> für dessen Expression zumindest eine Tendenz zu höheren Spiegeln in MMTV-PyMT BK-KO Zellen gezeigt werden konnte (s.o.). Zudem lassen sich am G1/S-Übergang in der Regel eine Hyperpolarisation des Membranpotentials sowie eine hohe Kaliumpermeabilität beobachten,<sup>158</sup> was eine Beteiligung von BK-Kanälen impliziert.

### **6.3.2.3 Das BK-abhängige Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen ist teilweise durch eine BK-vermittelte Modulation apoptotischer Prozesse erklärbar<sup>^</sup>**

BK-Kanälen werden in unterschiedlichen Tumorentitäten sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen zugeschrieben.<sup>199,200,213,225</sup> Im Rahmen dieser Arbeit führte die BK-Kanalablation zu einer geringeren Wachstumsrate der MMTV-PyMT Zellen (s. Abb. 5.21), was u.a. auf eine antiapoptotische Rolle des BK hinweist. Diese Hypothese wurde daher mithilfe der TUNEL-Färbung (s. 4.7.3) überprüft, welche die Detektion von DNA-Fragmenten in apoptotischen Zellkernen ermöglicht. Zu allen Beobachtungszeitpunkten konnten in BK-KO Zellen mehr apoptotische Zellkerne detektiert werden als in Wildtypzellen (s. Abb. 5.25). Zum Zeitpunkt der Restimulation, also nach 72-stündigem Serumentzug, war der Unterschied signifikant. Es scheint also, dass die Zellen aufgrund des Fehlens des BK-Kanals sensitiver auf den Serumentzug reagieren, welcher in den Zellen zu einer G1-Arretierung führt. Für den Eintritt in die S-Phase, welcher durch die Restimulation induziert wird, ist die Aktivierung sogenannter *checkpoint*-Proteine notwendig.<sup>157</sup> Diese Proteine erkennen und reparieren DNA-Schäden oder lösen in irreparabel geschädigten Zellen den apoptotischen Zelltod aus. Möglicherweise hängen die Aktivierung der *checkpoint*-Proteine und anschließende Reparaturmechanismen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen von der BK-Kanalaktivität ab. Ein Fehlen des BK-Kanals könnte demnach dazu führen, dass diese Reparaturmechanismen in Folge des Serumentzugs stark eingeschränkt sind und dadurch in diesen Zellen verstärkt die Apoptose ausgelöst wird. Dies könnte erklären, warum BK-KO Zellen eine geringere Wachstumsrate aufweisen (s. Abb. 5.21). Eines dieser *checkpoint*-Proteine ist beispielsweise p53 (s. 1.3.1.1),<sup>157</sup> welches in BK-KO Zellen nach 1,5-stündiger Restimulation im Vergleich zu BK-WT Zellen verstärkt exprimiert wird (s. Abb. 5.23 C). Auch in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa sowie der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 führt eine BK-Kanalinhibition zu einer Induktion der Apoptose über p53.<sup>199</sup> Über die TUNEL-Färbung kann allerdings nicht überprüft werden, ob BK-Kanäle in den extrinsischen oder intrinsischen Apoptosesignalweg eingreifen (s. 1.3.1.2). Für die Gliomzelllinie D54-MG ist beispielsweise eine Regulation des extrinsischen Signalwegs über BK-Kanäle beschrieben.<sup>213</sup>

#### **6.3.2.4 Die Docetaxelsensitivität von MMTV-PyMT Brusttumorzellen ist nicht von der BK-Kanalaktivität abhängig**

In MMTV-PyMT BK-KO Zellen waren also mehr apoptotische Zellkerne als in BK-WT Zellen detektierbar (s.o.), was eine BK-regulierte Induktion der Apoptose vermuten lässt. Eventuell lässt sich diese auch durch die gleichzeitige Applikation von Zytostatika beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher überprüft, inwiefern der BK-Kanalstatus das Ansprechen der MMTV-PyMT Brusttumorzellen auf eine Behandlung mit dem Taxan Docetaxel beeinflusst.

Sowohl in BK-KO Zellen als auch in BK-WT Zellen konnte durch die Applikation von Docetaxel dosisabhängig eine zytotoxische Wirkung beobachtet werden (s. Abb. 5.26). BK-KO Zellen reagierten bereits zu einem etwas früheren Zeitpunkt (24 h) auf die Behandlung mit Docetaxel (10 nM) als die WT Kontrollen, allerdings konnten zu den Beobachtungszeitpunkten lediglich nichtsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen erfasst werden. Eventuell könnte man zu einem späteren Zeitpunkt einen signifikanten Effekt nachweisen. Nach unserem Wissensstand gibt es allerdings noch keine Arbeiten, welche potentiell synergistische Mechanismen einer BK-Kanalablation bzw. -inhibition mit PAX oder IbTx und Docetaxel oder anderen Zytostatika beschreiben. Für Ovarialkarzinomzellen ist sogar beschrieben, dass ein *knockdown* bzw. eine Inhibition von BK die Resistenz gegenüber Cisplatin erhöht.<sup>342</sup> Gegebenenfalls könnte überprüft werden, ob die gleichzeitige Applikation von PAX die Sensitivität von MMTV-PyMT Brusttumorzellen gegenüber Docetaxel oder anderen Zytostatika steigert.

Zusammengenommen unterstreichen diese Daten die wichtige Funktion des BK-Kanals für die Wachstumskontrolle von MMTV-PyMT Brusttumorzellen *in vitro*. BK-Kanäle werden in murinem Brusttumorgewebe exprimiert und regulieren die Proliferation über einen Eingriff in den Zellzyklus sowie in apoptotische Prozesse (s.o.). Es wurde daher versucht, die Ergebnisse in einem geeigneten *in vivo* Modell zu validieren.

#### **6.3.3 BK-Kanäle können die murine Tumorigenese *in vivo* beeinflussen**

Die Funktion von BK-Kanälen bei Brustkrebs wurde bis jetzt ausführlich anhand von *in vitro* Modellen untersucht. Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war es, die Funktion der BK-Kanalaktivität mithilfe pharmakologischer und genetischer Methoden bei der Tumorigenese *in vivo* anhand geeigneter Mausmodelle zu charakterisieren. Analog zum IK-Modell wurden auch BK-KO Tiere auf einen FVB-Hintergrund über sechs Generationen zurückgekreuzt (s. 4.1.2).

Zuerst wurde überprüft, ob ein FVB-Anteil > 98% ausreicht, um in transgenen WT Wurfgeschwistern aus der Rückzucht ein identisches tumorfreies Überleben sowie Gesamtüberleben wie für MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) zu erzielen (s. Abb. 5.27). Für MMTV-PyMT Tiere mit reinem FVB-Hintergrund ist in der Literatur ein mittleres tumorfreies Überleben von 53 bzw. 57 Tagen beschrieben,<sup>300,302</sup> auf einem C57Bl/6-Hintergrund verschiebt sich dieser Wert auf 92 Tage.<sup>302</sup> Die Kaplan-Meier-Kurven belegen, dass MMTV-PyMT Tiere (FVB 98%) mit  $58 \pm 2$  Tagen ein identisches tumorfreies Überleben aufweisen wie MMTV-PyMT Tiere mit reinem FVB-Hintergrund ( $60 \pm 2$  Tage) (s. Abb. 5.27 A+B). Auch das Gesamtüberleben der Versuchsgruppen war nicht verändert (s. Abb. 5.27 C+D): MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) erreichen nach  $100 \pm 3$  Tagen das Abbruchkriterium (15 mm Maximaldurchmesser), MMTV-PyMT (FVB 98%) nach  $94 \pm 7$  Tagen. Mithilfe des Log-Rank-Testes konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich durch die genetische Ablation des BK-Kanals ein Vorteil bezüglich des tumorfreien Überlebens bzw. Gesamtüberlebens für MMTV-PyMT Tiere ergibt. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen, dass durch das Fehlen des BK-Kanals eine signifikante Verlängerung des tumorfreien Überlebens erreicht wurde (s. Abb. 5.28 A). In BK-WT Tieren war der erste Tumor nach  $60 \pm 2$  Tagen tastbar, in BK-KO Tieren erst nach  $81 \pm 4$  Tagen (s. Abb. 5.28 B). Für das Gesamtüberleben konnte jedoch kein protektiver Effekt durch die BK-Kanalablation ermittelt werden (s. Abb. 5.28 C+D), die Progressionsphase war durch das Fehlen des Kanals sogar verkürzt (s. Abb. 5.28 E). Jedoch wurde auch beobachtet, dass die Entwicklung der BK-KO Tiere auf einem FVB-Hintergrund verglichen mit ihren Wurfgeschwistern (WT bzw. HET) verändert ist. So wurden statistisch weniger transgene Tiere mit BK-Kanaldefizienz generiert (s. Anhang Abb. 7.4). Aus den Verpaarungen von MMTV-PyMT BK-heterozygoten Männchen mit BK-heterozygoten Weibchen Tieren ist in 25% der Nachkommen eine homozygote Ausschaltung des BK-Kanals zu erwarten, von denen wiederum die Hälfte positiv für das PyMT Transgen ist (12,5%). Da lediglich weibliche Tiere bezüglich des Einflusses der BK-Kanalaktivität auf die Tumorigenese untersucht wurden, beträgt die statistische Ausbeute der Versuchstiergenotypen MMTV-PyMT BK-WT und MMTV-PyMT BK-KO jeweils 6,25% (s. Anhang Tabelle 7.7). Abb. 7.4 (Anhang) zeigt allerdings, dass entgegen der erwarteten 6,25% insgesamt nur 4,21% weibliche MMTV-PyMT BK-KO generiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden jedoch 9,81% MMTV-PyMT BK-WT und 16,36% MMTV-PyMT BK-heterozygote Weibchen erhalten. Ein Fehlen des BK-Kanals scheint also insbesondere in MMTV-PyMT FVB/N Weibchen zu einer starken Entwicklungsstörung und damit zu einer hohen prä- oder postnatalen Letalität zu führen. BK-KO Tiere auf einem FVB-Hintergrund waren zum Zeitpunkt ihrer Identifikation mittels Genotypisierung-PCR bereits deutlich kleiner und leichter und sie wiesen unabhängig von der Tumorentwicklung bereits eine geringere Lebenserwartung auf. Von den acht potentiellen Versuchstieren starben bereits drei vor einer Tumorentwicklung im Alter von 64, 77 bzw. 173 Tagen. Ein weiteres BK-KO Tier starb kurz nach Erstpalpation (nach 98 Tage) schon vor Erreichen des Abbruchkriteriums im Alter von 105 Tagen. Offensichtlich ist die Penetranz der BK-abhängigen Entwicklungsschädigung vom genetischen Hintergrund der Mäuse abhängig. Dies führt eventuell zu einem Überlebensnachteil bzw. letztlich einer verkürzten Lebenserwartung. Dass eine BK-Kanalablation auch in nicht-transgenen Tieren in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds zu Entwicklungsstörungen führt, wurde im hiesigen Arbeitskreis für BK-KO Tiere auf einem SV129-Hintergrund beobachtet. Diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Genotypisierung (Alter 3 Wochen) verglichen mit BK-defizienten C57Bl/6-Tieren deutlich kleiner und leichter. Auch in der Literatur wird davon berichtet, dass der genetische Hintergrund einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und pränatale Letalität sowie den Phänotyp von KO Tieren hat.<sup>395,396</sup> BK-Kanäle werden ubiquitär exprimiert und sind daher an der Regulation vieler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt (s. Einleitung). So weisen BK-KO Tiere einen erhöhten Blutdruck und damit verbunden auch einen Hyperaldosteronismus auf.<sup>126</sup> Die Entstehung von Bluthochdruck hängt beispielsweise auch in Mäusen mit einer Defizienz der Cyclooxygenase 2 (COX-2) vom Stamm der untersuchten Tiere ab.<sup>397</sup> Untersuchungen zu Mechanismen, welche die Entwicklung von BK-KO Tieren auf dem FVB-Hintergrund beeinträchtigen, wurden allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Vielmehr wurden alternative Strategien entwickelt, über welche die genannten Nachteile der globalen BK-KO Tieren umgangen werden konnten.

Es wurde beispielsweise begonnen, MMTV-PyMT Brusttumorzellen ohne oder mit BK-Kanaldefizienz in FVB/N Wildtypiere orthotop zu transplantieren (s. 4.2.4), um anschließend das tumorfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben dieser Tiere zu erfassen. Die Empfängertiere der allogenen Transplantation sind genetisch und bezüglich der BK-Kanalexpression identisch (WT). Im Gegensatz zum globalen BK-KO Mausmodell sind daher in diesem Modell keine phänotypischen Nachteile zu erwarten. Unterschiede im Tumorwachstum nach Inokulation der Empfängertiere sollten vielmehr direkt mit dem Genotyp der Brusttumorzellen korrelieren. Die vorläufigen Befunde über einen Beobachtungszeitraum von 60 Tagen zeigen, dass Tiere, in welche MMTV-PyMT BK-KO Zellen transplantiert wurden, vor einer Tumorentstehung geschützt sind (s. Abb. 5.29). Die Wildtypkontrolltiere entwickeln hingegen bereits nach  $20 \pm 2$  Tagen einen Tumor.

Zusätzlich werden im hiesigen Arbeitskreis bereits MMTV-PyMT Tiere auf einem FVB-Hintergrund generiert, welche einen sogenannten konditionalen KO des BK-Kanals aufweisen. Mithilfe der Cre-Rekombinase, welche beispielsweise durch den vorangeschalteten MMTV-Promotor brustgewebespezifisch exprimiert wird,<sup>398</sup> kann dann der BK-Kanal zu einem definierten Zeitpunkt ausschließlich im Brustgewebe ausgeschaltet werden. Zusätzlich kann mithilfe dieses Mausmodells überprüft werden, ob das sogenannte *tumour microenvironment*, also die Umgebung des Tumors,<sup>385</sup> für die Verlängerung des tumorfreien Überlebens bei BK-Kanaldefizienz verantwortlich ist oder ob der Antitumoreffekt der BK-Kanalablation sich in den Brustkrebszellen selbst manifestiert. Das *tumour microenvironment* umfasst viele verschiedene Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Immunzellen und auch Glattmuskelzellen, in welchen BK-Kanäle exprimiert werden.<sup>385</sup> Das Fehlen endothelialer BK-Kanäle könnte in diesem Zusammenhang beispielsweise zu einer verringerten Vaskularisierung, Angiogenese und somit Blutversorgung des Tumors führen. Die Fähigkeit zur Angiogenese ist ein wichtiges Charakteristikum von Tumorzellen,<sup>141,144</sup> da die Versorgung der Tumoren mit Sauerstoff und Nährstoffen über die Gefäße ab einer bestimmten Tumorgröße essentiell ist.

Die Befunde dieser Arbeit zeigen, dass die genetische Ablation von BK sowohl in einem spontanen Mausmodell (MMTV-PyMT, s. Abb. 5.28) als auch im induzierten Modell der Allotransplantation (s. Abb. 5.29) zu einer signifikanten Verlängerung des tumorfreien Überlebens führt. Daher wurde untersucht, ob auch eine pharmakologische Inhibition des Kanals mit PAX einen möglicherweise therapeutisch weiterentwickelbaren Antitumoreffekt hat. MMTV-PyMT Tiere wurden im Rahmen dieser Versuche ab einem Alter von 40 Tagen für insgesamt vier Wochen bereits vor der Tumorentstehung mit dem selektiven BK-Kanalinhibitor zwei Mal täglich i.p. injiziert (s. 4.2.3). Dieses Regime hatte jedoch weder einen Einfluss auf das tumorfreie Überleben noch auf das Gesamtüberleben der Tiere (s. Abb. 5.30). Die Wirksamkeit von PAX wurde mithilfe von Tests zur Motorkoordination überprüft (s. 4.2.3.2). Alle behandelten Tiere zeigten erwartungsgemäß aufgrund der BK-Kanalinhibition im ZNS motor koordinative Einschränkungen mit Tremor und Ataxie (s. Abb. 5.31),<sup>131,138</sup> weshalb eine unzureichende Blockade oder Wirkung des Inhibitors weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Allerdings könnten toxische Wirkungen des Vehikels mit einem DMSO-Anteil von 90% dafür verantwortlich sein, dass die pharmakologische Inhibition zu keiner Verlängerung des tumorfreien Überlebens bzw. Gesamtüberlebens führt. Durch die mehrfachen Injektionen wurden schorfartige Verletzungen beobachtet, welche sich allerdings nicht an der Einstichstelle befanden, sondern an dem Ort, an welchem die Injektionslösung aus der Kanüle austrat. Der Applikationsort wurde daher

regelmäßig gewechselt. Es wurden bereits einige Studien zur toxischen Wirkung von DMSO bei i.p. Langzeitapplikationen (3-12 Wochen) veröffentlicht.<sup>399-401</sup> Auch in diesen Arbeiten wird von Exsudationen aufgrund der wiederholten Injektionen berichtet, welche durch s.c. Injektionen jedoch reduziert werden können.<sup>399,400</sup> Die Tiere wiesen zudem Unruhe, depressives Verhalten und allgemeine Schwäche und bei höheren Dosen auch Anämie auf.<sup>399</sup> Es ist auch bekannt, dass eine i.p. Injektion von 32% bzw. 64% DMSO (in Saline) zu einer Reduktion der lokomotorischen Aktivität von Mäusen führt.<sup>402</sup> Die von *Caujolle et al.* verwendete Dosierung von DMSO betrug pro Applikation 2,5g/kg KG.<sup>136</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tiere jedoch einer höheren Menge DMSO pro Injektion ausgesetzt. Generell muss davon ausgegangen werden, dass die Behandlungsphase für die Tiere schmerzhaft und mit einer erheblichen Belastung verbunden war. Psychische Belastungen und Stress werden schon länger als Risikofaktoren für Krebs diskutiert. Ratten entwickeln beispielsweise nach einem Stressstimulus früher Tumore und besitzen eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit als Kontrolltiere.<sup>403</sup> Zudem wird beschrieben, dass auch bei Menschen belastende Lebenserfahrungen mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit und höherer Mortalität korrelieren, nicht jedoch die Inzidenz beeinflussen.<sup>404</sup> Dies wird auf eine veränderte Expression von Zytokinen und damit verbunden mit einer verschlechterten Immunantwort zurückgeführt.<sup>403,405</sup> Solche Effekte könnten auch einen potentiell protektiven Effekt der BK-Kanalinhinhibition überdecken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch versucht, die Zusammensetzung des Lösungsmittels schrittweise zu verändern (Daten nicht gezeigt). Allerdings war die Löslichkeit von PAX bereits in einer Mischung mit höherem Wasseranteil (hier: 8:2 Teile DMSO:Wasser) zu gering.

Ein generelles Problem der pharmakologischen BK-Kanalinhinhibition sind die erheblichen Nebenwirkungen aufgrund der ubiquitären Expression des Kanals. Neben motorischen Einschränkungen ist bei potentiell behandelten Patienten unter anderem auch mit einem Anstieg des Blutdrucks zu rechnen.<sup>126,131</sup> In Abhängigkeit des Subtyps handelt es sich beim Mammakarzinom jedoch um eine Tumorentität mit einer vergleichsweise hohen 5-Jahres-Überlebensrate.<sup>1</sup> Somit wäre nur für eine bestimmte Subgruppe mit schlechter Prognose und nachgewiesener BK-Kanalüberexpression eine Therapie mit einem BK-Inhibitor gerechtfertigt. Durch einen Wirkstoff, welcher die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, könnten zumindest die schwerwiegenden ZNS-Nebenwirkungen ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ist noch nicht geklärt, ob der protektive Effekt der Kanalablation nur durch über die Tumorzellen selbst oder beispielsweise auch über die Glattmuskelzellen der Gefäße und das *tumour microenvironment* vermittelt wird (s.o.). Wäre das Fehlen in den Tumorzellen für diese Wirkung verantwortlich, wäre ein Inhibitor denkbar, welcher speziell den BK-Kanal in diesen Zellen adressiert. Ein vergleichbarer Ansatz wurde beispielsweise mit der Kopplung eines Zytostatikums an den monoklonalen Antikörper Trastuzumab (s. 1.1.2) realisiert.<sup>406</sup> Trastuzumab bindet an HER2-positive Brusttumorzellen, so dass das Zytostatikum nach Internalisierung spezifisch in diesen Zellen den apoptotischen Zelltod auslöst, was die zielgerichtete Therapie begünstigt.<sup>406</sup> Denkbar wäre also eine analoge Formulierung mit PAX, welche zur Behandlung von Tumoren mit einer nachgewiesenen BK-Kanalüberexpression eingesetzt werden kann. Dadurch würden BK-Kanäle insbesondere in Brusttumorzellen blockiert, so dass das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen durch PAX stark reduziert werden könnte.

Wenngleich durch die Applikation von Docetaxel *in vitro* kein positiver Effekt der BK-Kanalablation auf die Wachstumsrate der Brusttumorzellen erfasst werden konnte, ist es dennoch möglich, dass mit einem anderen Zytostatikum ein synergistischer Effekt durch die gleichzeitige BK-Kanalinhinhibition

erreicht werden kann, so dass für beide Substanzen die Dosis und somit das Nebenwirkungsrisiko reduziert werden kann. *In vivo* Anwendungen von Docetaxel bei Mäusen sind in Kapitel 6.2.3 ausführlich beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Funktion des BK-Kanals auf die Tumorigenese des murinen Mammakarzinoms *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Funktionale BK-Kanäle regulieren das Wachstum von MMTV-PyMT Brusttumorzellen über einen Eingriff in Zellzyklusprozesse und apoptotische Vorgänge. Auch in *in vivo* Modellen konnte eine wichtige Funktion von BK für die Tumorigenese bestätigt werden. Im globalen MMTV-PyMT Mausmodell konnte durch den genetischen KO ein protektiver Effekt bezüglich des tumorfreien Überlebens beobachtet werden. Ein Einfluss auf das Gesamtüberleben konnte nicht erfasst werden, was allerdings unter anderem durch die verminderte Lebenserwartung von BK-KO Tieren auf einem FVB-Hintergrund bedingt ist. In einem alternativen Mausmodell konnte mittels Allotransplantation bestätigt werden, dass die genetische Ablation von BK zu einer Verlängerung des tumorfreien Überlebens führt.



## 7 Anhang

### 7.1 Arzneistoffe und Kanalmodulatoren

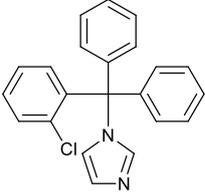
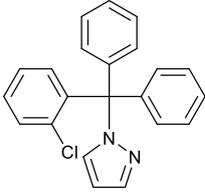
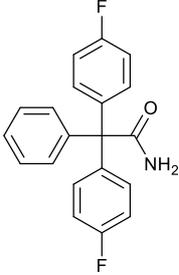
**Tabelle 7.1 Zugelassene Wirkstoffe zur Behandlung des Mammakarzinoms**

(Zusammenstellung<sup>15,31</sup>) In Abhängigkeit des Tumorsubtyps wird eine endokrine oder gezielte Therapie in Kombination mit einer Chemotherapie angewandt. Klassische Therapieschemata der Chemotherapie sind beispielsweise FEC (5-Fluorouracil/Epirubicin/Cyclophosphamid) oder TAC (Taxan/Adriamycin (Doxorubicin)/Cyclophosphamid). (SERM: Selektiver Estrogenrezeptormodulator/*selective estrogen-receptor modulator*; HER2: Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2)

Chemotherapie		
Wirkprinzip	Substanzklasse	Wirkstoff
Antimetabolite	Pyrimidinanaloga	5-Fluorouracil
Alkylantien	Stickstofflost-Derivate	Cyclophosphamid Melphalan Chlorambucil
Mitosehemmstoffe	Vincaalkaloide	Vincristin Vinorelbin
	Taxane	Paclitaxel Docetaxel
Zytostatische Antibiotika	Anthracycline	Doxorubicin Epirubicin
	Sonstige	Mitoxantron
Endokrine Therapie		
Wirkprinzip	Substanzklasse	Wirkstoff
Hypothalamushormone	Gonadorelinanaloga	Leuprorelin
Antiestrogene	ER-Antagonisten	Fulvestrant
	SERM	Tamoxifen
	Aromatasehemmer	Exemestan Anastrozol Letrozol
Gezielte Therapie (HER2)		
Wirkprinzip	Wirkstoff	
Monoklonaler Antikörper	Trastuzumab Perzutumab	
Tyrosinkinaseinhibitor	Lapatinib	

**Tabelle 7.2 Nicht-peptidische Inhibitoren für IK-Kanäle**

Die einzelnen Substanzen unterscheiden sich sowohl in Selektivität, Potenz und Angriffspunkt am Kanal. ( $K_D$ : Dissoziationskonstante; CYP450: Cytochrom P450-Enzym; nM: nanomolar; TRAM-34: Triarylmethan-34; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit)

Nicht-peptidische IK-Kanalinhhibitoren				
Bezeichnung	Strukturformel	$K_D$ -Wert	Selektivität	Referenz
Clotrimazol		70 nM	CYP450-Interaktion	64,407
TRAM-34		20-25 nM	Sehr hoch	89,90
Senicapoc (ICA-17043)		11 nM	Sehr hoch	80

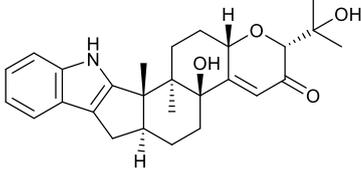
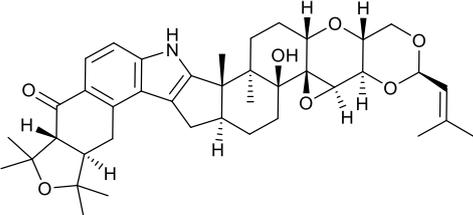
**Tabelle 7.3 Peptidische Inhibitoren für IK-Kanäle**

Die einzelnen Substanzen unterscheiden sich sowohl in Selektivität, Potenz und Angriffspunkt am Kanal. ( $K_D$ : Dissoziationskonstante; CYP450: Cytochrom P450-Enzym; nM: nanomolar; TRAM-34: Triarylmethan-34; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit;  $K_V$ : spannungsabhängige Kaliumkanäle; Glu: Glutamat; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit)

Peptidische IK-Kanalinhhibitoren			
Bezeichnung	$K_D$ -Wert	Selektivität	Referenz
Charybdotoxin (ChTx)	10 nM	BK-Kanäle $K_V$ -Kanäle	63,64
ChTx-Glu <sup>33</sup>	33 nM	Sehr hoch	63,408

**Tabelle 7.4 Nicht-peptidische Inhibitoren für BK-Kanäle**

Die einzelnen Substanzen unterscheiden sich bzgl. Selektivität, Potenz und Angriffspunkt am Kanal. ( $K_D$ : Dissoziationskonstante; nM: nanomolar; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit)

Nicht-peptidische BK-Kanalinhibitoren				
Bezeichnung	Strukturformel	$K_D$ -Wert	Selektivität	Referenz
Paxilline		1-10 nM	Sehr hoch	409-411
Lolitrem B		4,5 nM	Sehr hoch	138

**Tabelle 7.5 Peptidische Inhibitoren für BK-Kanäle**

Die einzelnen Substanzen unterscheiden sich bzgl. Selektivität, Potenz und Angriffspunkt am Kanal. ( $K_D$ : Dissoziationskonstante; nM: nanomolar; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit)

Peptidische BK-Kanalinhibitoren			
Bezeichnung	$K_D$ -Wert	Selektivität	Referenz
Iberitoxin (IbTx)	1-10 nM	Sehr hoch	412
Charybdotoxin (ChTx)	10-30 nM	gering	413,414

## 7.2 mRNA-Analyse von MMTV-PyMT Brusttumorgewebe mit der Nanostring-Technologie

**Tabelle 7.6 mRNA-Expression verschiedener Zielstrukturen im MMTV-PyMT Brusttumorgewebe**

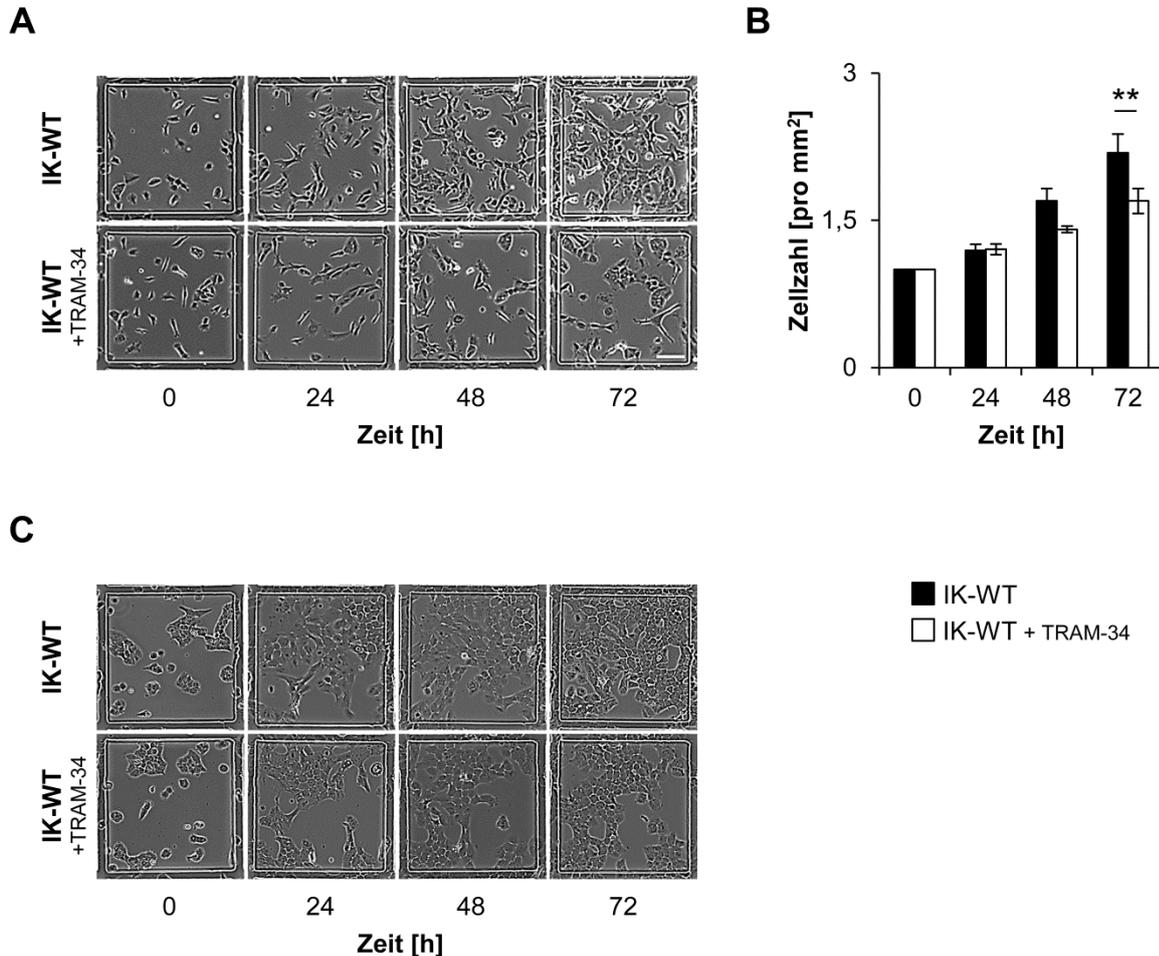
Die mRNA-Expression in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe wurde mithilfe des *NanoString nCounter gene expression* Systems<sup>415</sup> von Dr. Ulrich Kriebs und Prof. Dr. Marc Freichel des pharmakologischen Instituts der Universität Heidelberg im Rahmen einer Kooperation analysiert. Für diese Methode ist anders als bei der qRT-PCR (s. 4.5) kein Umschreiben mit reverser Transkription notwendig. Die mRNA-Moleküle werden direkt quantitativ erfasst. Die RNA wurde wie in 4.5 beschrieben isoliert und anschließend auf eine Konzentration von 250 ng/ $\mu$ l eingestellt. Die Expressionslevel der Zielstrukturen wurden auf fünf Referenzgene normalisiert.

Referenzgene			
Proband		MMTV-PyMT 1	MMTV-PyMT 2
mRNA	Code ( <i>Accession</i> )	Expressionslevel	
$\beta$ -Actin	NM_007393.1	0,8519	1,0000
GAPDH	NM_008084.3	0,9969	1,0000
HPRT	NM_013556.2	1,0000	0,8397
Tbp	NM_013684.3	1,0000	0,9052
Ubiquitin C	NM_019639.4	0,5986	1,0000
		0,8734	0,9466
Zielstrukturen			

Proband		MMTV-PyMT 1	MMTV-PyMT 2
mRNA	Code ( <i>Accession</i> )	Normiertes Expressionslevel	
Ano1	NM_178642.5	10266	10744
Cacna1c	NM_009781.2	46	33
Cacna1d	NM_028981.2	93	81
Cacna1f	NM_019582.2	1	1
Cacna1g	NM_009783.3	94	108
Cacna1h	NM_021415.4	1	1
Cacna1i	NM_001044308.2	1	1
Cacna1s	NM_014193.2	51	1
Cacnb1	NM_031173.3	150	130
Cacnb2	NM_023116.3	1	1
Cacnb3	NM_007581.2	2161	1993
Cacnb4	NM_146123.2	1	1
Col1a1	NM_007742.3	15083	13848
Col3a1	NM_009930.1	35119	29969
Col4a1	NM_009931.2	2972	2937
<b>Kcnma1</b>	<b>NM_001253361.1</b>	<b>43</b>	<b>29</b>
Kenn3	NM_080466.2	41	39
<b>Kcnn4</b>	<b>NM_008433.4</b>	<b>15517</b>	<b>16069</b>
Kent1	NM_175462.3	1	1
Mcoln1	NM_053177.1	541	429
Mcoln2	NM_026656.4	46	54
Mcoln3	NM_134160.1	23	29
Nppa	NM_008725.2	1	1
Nppb	NM_008726.4	1	1
Orai1	NM_175423.3	268	376
Orai2	NM_178751.3	222	148
Orai3	NM_198424.3	273	229
Pkd2	NM_008861.2	958	703
Pkd2l1	NM_181422.3	31	43
Pkd2l2	NM_016927.3	13	10
Sidt1	NM_001159419.1	908	690
Sidt2	NM_172257.3	5815	5574
Stim1	NM_009287.4	384	352
Stim2	NM_001081103.2	2273	1987
Tmem63a	NM_144794.2	2075	2124
Tmem63b	NM_198167.3	2319	2175
Tmem63c	NM_172583.2	1	1
Tpcn1	NM_145853.2	2362	2088

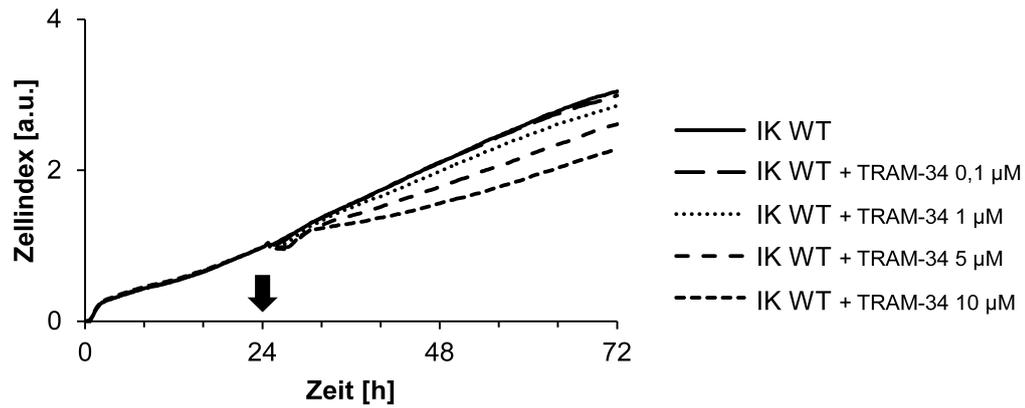
Tpcn2	NM_146206.4	1218	861
Trpa1	NM_177781.4	1	1
Trpc1	NM_011643.2	35	25
Trpc2	NM_011644.2	1	2
Trpc3	NM_019510.2	31	29
Trpc4	NM_016984.2	36	79
Trpc5	NM_009428.2	1	7
Trpc6	NM_013838.2	29	29
Trpc7	NM_012035.2	1	1
Trpm1	NM_001039104.2	7	22
Trpm2	NM_138301.2	57	61
Trpm3	NM_177341.4	514	227
Trpm4	NM_175130.4	758	574
Trpm5	NM_020277.2	4	22
Trpm6	NM_153417.1	401	327
Trpm7	NM_021450.2	1735	1215
Trpm8	NM_134252.3	1	1
Trpv1	NM_001001445.1	1	1
Trpv2	NM_011706.2	89	86
Trpv3	NM_145099.2	1	2
Trpv4	NM_022017.2	78	125
Trpv5	NM_001007572.2	1	1
Trpv6	NM_022413.3	4	2

### 7.3 Funktion von IK-Kanälen für das Wachstum von MMTV-cNeu Brusttumorzellen



**Abb. 7.1** Wachstumsverhalten von MMTV-cNeu Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 (Grid-Platten)

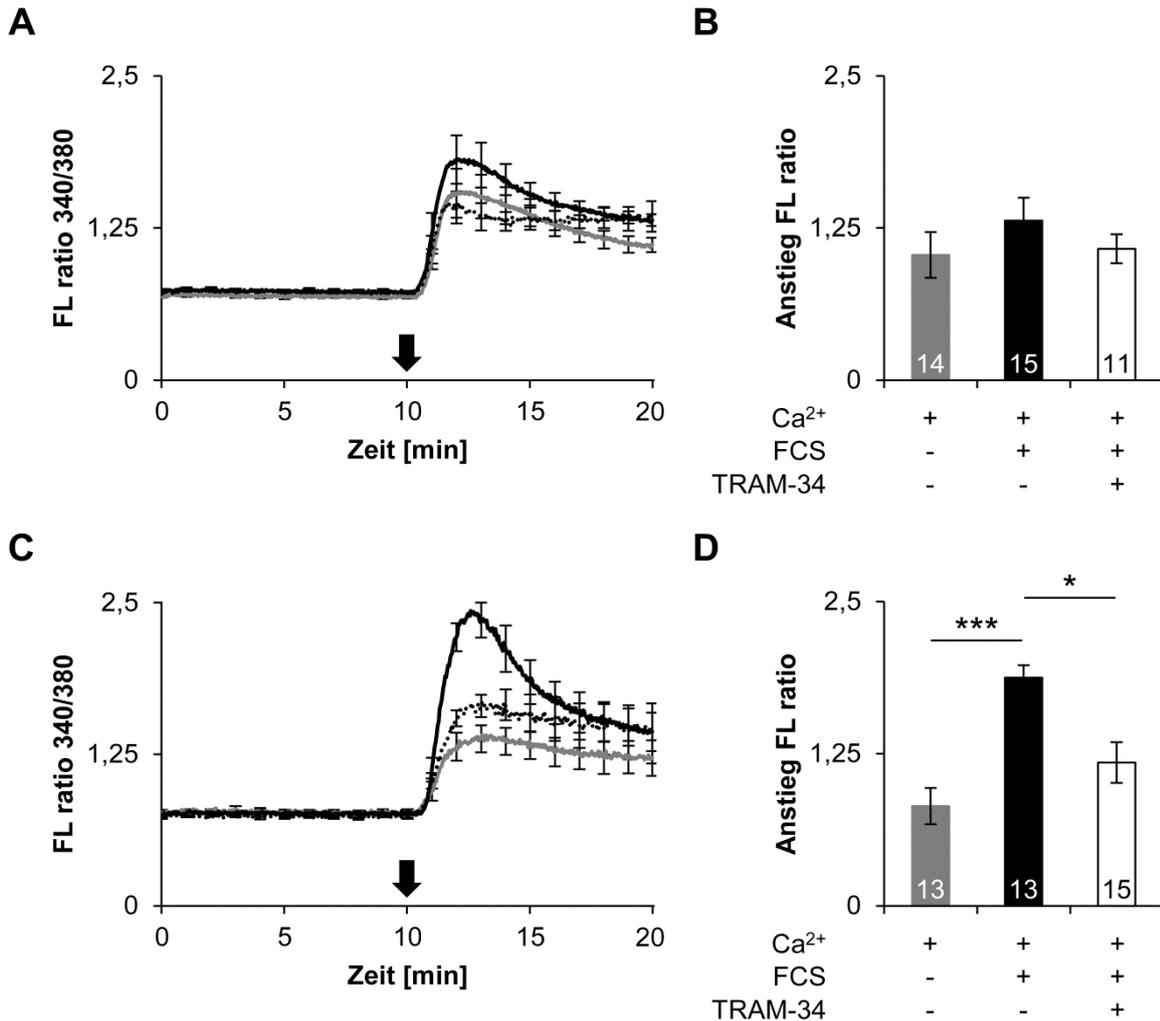
Die Zellen wurden aus (A+B) MMTV-cNeu Tieren mit reinem FVB-Hintergrund sowie (C) MMTV-cNeu Tieren mit gemischtem Hintergrund (s. 4.2.2) isoliert. Anschließend wurde das Wachstum der Zellen mithilfe von Grid-Platten (s. 4.6.1) untersucht, welche durch ein festes Koordinatensystem die Beobachtung definierter Stellen über einen längeren Zeitraum erlauben. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen durch einen 72-stündigen Serumentzug arretiert. Im Anschluss erfolgte die Restimulation in Ab- oder Anwesenheit von TRAM-34 10  $\mu$ M (t = 0 h). Alle 24 Stunden wurden über einen Gesamtzeitraum von 72 Stunden jeweils von denselben vier Quadranten Bilder angefertigt. Im Anschluss wurden die Zellen mit ImageJ gezählt und auf den Wert von t = 0 h normiert. (A) MMTV-cNeu Zellen (FVB 100%) Die Abbildungen zeigen jeweils einen repräsentativen Quadranten (Seitenlänge 0,5 mm) für jeden Zeitpunkt und Behandlung. Bereits makroskopisch lässt sich erkennen, dass durch die pharmakologische Inhibition von IK mit TRAM-34 nach 72 Stunden weniger Zellen vorhanden sind als unter Kontrollbedingungen. (B) Die Auszählung ergab, dass die Anzahl unbehandelter (schwarze Balken) wie auch behandelter Zellen (weiße Balken) mit steigender Kultivierungsdauer generell zunahm. Bereits nach 24 Stunden konnte jedoch in unbehandelten Zellen eine etwas höhere Zunahme erfasst werden. Nach 72-stündiger Behandlung konnte eine signifikant höhere Wachstumsrate in unbehandelten Zellen ( $2,19 \pm 0,19$ ) im Vergleich zu TRAM-34 behandelten Zellen detektiert werden ( $1,70 \pm 0,13$ ). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem One-Way ANOVA Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur (N = 10). Ein p-Wert von  $**p < 0,01$  entspricht einem hochsignifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. (C) MMTV-cNeu Zellen (gemischter Hintergrund) Die Abbildungen zeigen jeweils einen repräsentativen Quadranten (Seitenlänge 0,5 mm) für jeden Zeitpunkt und Behandlung. Bereits makroskopisch lässt sich erkennen, dass durch die pharmakologische Inhibition von IK mit TRAM-34 nach 72 Stunden weniger Zellen vorhanden sind als unter Kontrollbedingungen. Eine Auszählung wurde nicht durchgeführt. (mm<sup>2</sup>: Quadratmillimeter; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; TRAM-34: Triarylmethan-34; h: Stunden)



**Abb. 7.2 Wachstumsverhalten von MMTV-cNeu Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 (xCelligence)**

Die Zellen wurden aus MMTV-cNeu Tieren mit gemischtem Hintergrund (s. 4.2.2) isoliert. Anschließend wurde das Wachstum der Zellen mithilfe des xCelligence-Systems untersucht (s. 4.6.2). Nach 24 Stunden wurde der IK-Kanalinhistor TRAM-34 in den angegebenen Konzentrationen bzw. das Vehikel zugegeben (Pfeil). Die Behandlung mit TRAM-34 führt ab einer Konzentration von 1 μM zu einer reduzierten Wachstumsrate der Brusttumorzellen. (a.u.: Willkürliche Einheiten/*arbitrary units*; h: Stunden; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; TRAM-34: Triarylmethan-34; μM: mikromolar)

## 7.4 Einfluss des IK-Kanals auf $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von MMTV-cNeu Brusttumorzellen



**Abb. 7.3 Einfluss der IK-Kanalaktivität auf akute  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von MMTV-cNeu Brusttumorzellen**

Es wurde der Einfluss der pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 auf akute  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale untersucht. Die Zellen wurden wie in 4.3.2 beschrieben ausgebracht und anschließend mittels Serumentzug in der G1-Phase arretiert (s. 4.3.4).  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale wurden mithilfe von FURA-2 detektiert. Der Versuchsaufbau für die Messung der akuten  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale ist in Kapitel 4.9.1 beschrieben. Die Zellen wurden sowohl aus **(A+B) MMTV-cNeu Tieren mit FVB-Hintergrund** als auch **(C+D) MMTV-cNeu Tieren mit gemischtem Hintergrund** isoliert. **(A)** Die Zellen wurden zuerst mit  $Ca^{2+}$ -freiem Inkubationspuffer inkubiert. Nach 10 min wurde ein Pufferwechsel durchgeführt (schwarzer Pfeil). Durch die Superfusion der Zellen mit Calciumpuffer (graue Linie) konnte ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden. Dieser Anstieg war in Gegenwart von  $Ca^{2+}$  (1,8 mM) und Serum (5%; schwarze Linie) leicht gesteigert. Eine gleichzeitige Inhibition des IK-Kanals (gestrichelte Linie) verringerte den seruminduzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ -Amplitude. **(B)** Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration wurde für jede Kondition auf das Basalniveau normalisiert. Die Analyse ergab, dass durch die Superfusion der Zellen mit  $Ca^{2+}$  und Serum (schwarzer Balken) ein höherer Anstieg ( $1,3116 \pm 0,1857$ ) von  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit  $Ca^{2+}$  ( $1,0279 \pm 0,1873$ ) (grauer Balken) erreicht wurde. Die Co-Applikation des IK-Kanalinhibitors TRAM-34 mit  $Ca^{2+}$  und Serum (weißer Balken) verringerte diesen Anstieg wiederum ( $1,0785 \pm 0,1194$ ). Die Unterschiede erreichen jedoch nicht das Signifikanzniveau. **(C)** Die Zellen wurden zuerst mit  $Ca^{2+}$ -freiem Inkubationspuffer inkubiert. Nach 10 min wurde ein Pufferwechsel durchgeführt (schwarzer Pfeil). Durch die Superfusion der Zellen mit Calciumpuffer (graue Linie) konnte ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden. Dieser Anstieg war in Gegenwart von  $Ca^{2+}$  (1,8 mM) und Serum (5%; schwarze Linie) noch steigerbar. Eine gleichzeitige Inhibition des IK-Kanals (gestrichelte Linie) verringerte den seruminduzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ -Amplitude. **(D)** Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration wurde für jede Kondition auf das Basalniveau normalisiert. Die Analyse ergab, dass durch die Superfusion der Zellen mit  $Ca^{2+}$  und Serum (schwarzer Balken) ein signifikant höherer Anstieg ( $1,8737 \pm 0,1676$ ) von  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zur alleinigen

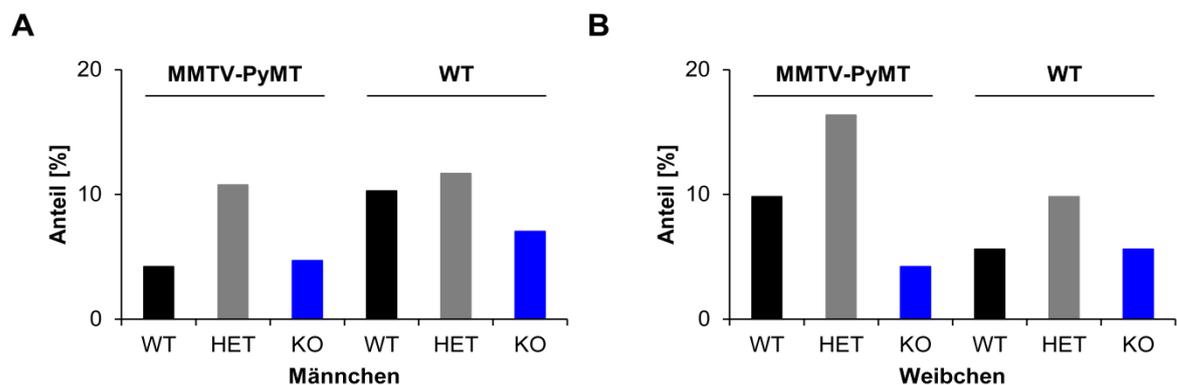
Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0,8184 \pm 0,1492$ ) (grauer Balken) erreicht wurde. Die Co-Applikation des IK-Kanalinhbibitors TRAM-34 mit  $\text{Ca}^{2+}$  und Serum (weißer Balken) verringerte diesen Anstieg wiederum signifikant ( $1,1773 \pm 0,2119$ )

## 7.5 Generierung von MMTV-PyMT BK-KO Versuchstieren

**Tabelle 7.7** Statistische Verteilung der erwarteten Nachkommen nach Mendel

Entsprechend des Gesetzes von Mendel werden 50% BK-heterozygote Tiere und jeweils 25% BK-WT bzw. BK-KO Tiere erwartet. Jeweils die Hälfte dieser Tiere ist wiederum positiv für das PyMT-Transgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich weibliche Tiere untersucht, so dass sich für die jeweiligen Versuchstiere MMTV-PyMT BK-WT und BK-KO (fett markiert) ein Anteil von 6,25% ergibt. (MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; HET: heterozygot; KO: Knockout)

Genotyp	Transgenstatus	Kanalstatus	Anteil
<b>MMTV-PyMT BK-WT</b>	<b>Positiv</b>	<b>Wildtyp (WT)</b>	<b>12,5%</b>
MMTV-PyMT BK-HET	Positiv	Heterozygot (HET)	25%
<b>MMTV-PyMT BK-KO</b>	<b>Positiv</b>	<b>Knockout (KO)</b>	<b>12,5%</b>
BK-WT	Negativ	Wildtyp (WT)	12,5%
BK-HET	Negativ	Heterozygot (HET)	25%
BK-KO	Negativ	Knockout (KO)	12,5%



**Abb. 7.4** Tatsächliche Verteilung der Nachkommen aus der Verpaarung von MMTV-PyMT BK-HET Männchen mit BK-HET Weibchen

Die Tiere wurden wie in 4.1.1 beschrieben verpaart und die Nachkommen anschließend genotypisiert (s. 4.1.3). Die statistisch erwarteten Anteile der Nachkommen sind in Tabelle 7.7 dargestellt. **(A) Männliche Nachkommen.** Es wurden identische Anteile von MMTV-PyMT BK-WT und MMTV-PyMT BK-KO identifiziert. Allerdings wurden wesentlich mehr BK-WT Tiere als BK-KO Tiere generiert. **(B) Weibliche Nachkommen.** Der Anteil von MMTV-PyMT BK-KO Weibchen ist mit 4,21% im Vergleich zu transgenen BK-WT Tieren (9,83%) verringert. Bei nicht transgenen Weibchen wurden erwartungsgemäß gleiche Anteile für BK-WT und BK-KO identifiziert. (MMTV: Mausmammatumovirus; PyMT: *polyoma virus middle T antigene*; BK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit; WT: Wildtyp; HET: heterozygot; KO: Knockout)



## Literaturverzeichnis

- 1 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* **66**, 7-30, doi:10.3322/caac.21332 (2016).
- 2 Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2011/2012. *Zentrum für Krebsregisterdaten* **10. Ausgabe** (2015).
- 3 Murray, C. J. & Lopez, A. D. Measuring the global burden of disease. *The New England journal of medicine* **369**, 448-457, doi:10.1056/NEJMra1201534 (2013).
- 4 DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L. & Jemal, A. Breast cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians* **64**, 52-62, doi:10.3322/caac.21203 (2014).
- 5 Bieche, I. & Lidereau, R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes, chromosomes & cancer* **14**, 227-251 (1995).
- 6 Fantozzi, A. & Christofori, G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast cancer research : BCR* **8**, 212, doi:10.1186/bcr1530 (2006).
- 7 Weigelt, B., Peterse, J. L. & van 't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews. Cancer* **5**, 591-602, doi:10.1038/nrc1670 (2005).
- 8 Pande, S. *et al.* Oncogenic cooperation between PI3K/Akt signaling and transcription factor Runx2 promotes the invasive properties of metastatic breast cancer cells. *Journal of cellular physiology* **228**, 1784-1792, doi:10.1002/jcp.24339 (2013).
- 9 Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **65**, 87-108, doi:10.3322/caac.21262 (2015).
- 10 Wee, Z. N. *et al.* IRAK1 is a therapeutic target that drives breast cancer metastasis and resistance to paclitaxel. *Nature communications* **6**, 8746, doi:10.1038/ncomms9746 (2015).
- 11 Gierisch, J. M. *et al.* Oral contraceptive use and risk of breast, cervical, colorectal, and endometrial cancers: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **22**, 1931-1943, doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0298 (2013).
- 12 McPherson, K., Steel, C. M. & Dixon, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj* **321**, 624-628 (2000).
- 13 Colditz, G. A. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **14**, 768-772, doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0157 (2005).
- 14 Ford, D. *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American journal of human genetics* **62**, 676-689 (1998).
- 15 Leitlinienprogramm-Onkologie. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (Kurzversion). (2012).
- 16 Greene, F. L. & Sobin, L. H. A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC. *Journal of surgical oncology* **99**, 269-272, doi:10.1002/jso.21237 (2009).
- 17 Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-182 (1987).
- 18 Seshadri, R. *et al.* Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 1936-1942 (1993).
- 19 Slamon, D. J. *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-712 (1989).
- 20 Hynes, N. E. & Stern, D. F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1198**, 165-184 (1994).
- 21 Carter, P. *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4285-4289 (1992).
- 22 Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 719-726 (2002).
- 23 Hudis, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *The New England journal of medicine* **357**, 39-51, doi:10.1056/NEJMra043186 (2007).
- 24 Burris, H. A., 3rd. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *The oncologist* **9 Suppl 3**, 10-15 (2004).
- 25 Baselga, J. *et al.* Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* **366**, 109-119, doi:10.1056/NEJMoa1113216 (2012).
- 26 Huber, S. M. Oncochannels. *Cell calcium* **53**, 241-255, doi:10.1016/j.ceca.2013.01.001 (2013).

- 27 Kunzelmann, K. Ion channels and cancer. *The Journal of membrane biology* **205**, 159-173, doi:10.1007/s00232-005-0781-4 (2005).
- 28 Pardo, L. A. & Stuhmer, W. The roles of K(+) channels in cancer. *Nature reviews. Cancer* **14**, 39-48, doi:10.1038/nrc3635 (2014).
- 29 Huang, X. & Jan, L. Y. Targeting potassium channels in cancer. *The Journal of cell biology* **206**, 151-162, doi:10.1083/jcb.201404136 (2014).
- 30 Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869-10874, doi:10.1073/pnas.191367098 (2001).
- 31 Ernst Mutschler, G. G., Heyo K. Kroemer, Sabine Menzel, Peter Ruth. Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH* **10. Auflage** (2013).
- 32 Schroth, W. *et al.* Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 5187-5193, doi:10.1200/JCO.2007.12.2705 (2007).
- 33 Schroth, W. *et al.* CYP2D6 polymorphisms as predictors of outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen: expanded polymorphism coverage improves risk stratification. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 4468-4477, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0478 (2010).
- 34 Kiyotani, K. *et al.* Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 1287-1293, doi:10.1200/JCO.2009.25.7246 (2010).
- 35 Brauch, H., Murdter, T. E., Eichelbaum, M. & Schwab, M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clinical chemistry* **55**, 1770-1782, doi:10.1373/clinchem.2008.121756 (2009).
- 36 Coiret, G., Borowiec, A. S., Mariot, P., Ouadid-Ahidouch, H. & Matifat, F. The antiestrogen tamoxifen activates BK channels and stimulates proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Molecular pharmacology* **71**, 843-851, doi:10.1124/mol.106.028290 (2007).
- 37 Juliano, R. L. & Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta* **455**, 152-162 (1976).
- 38 Doyle, L. A. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15665-15670 (1998).
- 39 Pillozzi, S. *et al.* Chemotherapy resistance in acute lymphoblastic leukemia requires hERG1 channels and is overcome by hERG1 blockers. *Blood* **117**, 902-914, doi:10.1182/blood-2010-01-262691 (2011).
- 40 Sandhiya, S. & Dkhar, S. A. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *The Indian journal of medical research* **129**, 223-232 (2009).
- 41 Schenzer, A. *et al.* Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K+ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 5051-5060, doi:10.1523/JNEUROSCI.0128-05.2005 (2005).
- 42 Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E. & Keating, M. T. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* **81**, 299-307 (1995).
- 43 Goldstein, S. A. *et al.* International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacological reviews* **57**, 527-540, doi:10.1124/pr.57.4.12 (2005).
- 44 Jenkinson, D. H. Potassium channels--multiplicity and challenges. *British journal of pharmacology* **147 Suppl 1**, S63-71, doi:10.1038/sj.bjp.0706447 (2006).
- 45 Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V. & Adelman, J. P. Calcium-activated potassium channels. *Current opinion in neurobiology* **8**, 321-329 (1998).
- 46 Wu, R. S. & Marx, S. O. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: alpha- and beta-subunits. *Kidney international* **78**, 963-974, doi:10.1038/ki.2010.325 (2010).
- 47 Berkefeld, H., Fakler, B. & Schulte, U. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: from protein complexes to function. *Physiological reviews* **90**, 1437-1459, doi:10.1152/physrev.00049.2009 (2010).
- 48 Lu, R. *et al.* MaxiK channel partners: physiological impact. *The Journal of physiology* **570**, 65-72, doi:10.1113/jphysiol.2005.098913 (2006).
- 49 Torres, Y. P., Morera, F. J., Carvacho, I. & Latorre, R. A marriage of convenience: beta-subunits and voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *The Journal of biological chemistry* **282**, 24485-24489, doi:10.1074/jbc.R700022200 (2007).
- 50 Castle, N. A., Haylett, D. G. & Jenkinson, D. H. Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends in neurosciences* **12**, 59-65 (1989).
- 51 Park, Y. B. Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K+ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology* **481 ( Pt 3)**, 555-570 (1994).

- 52 Sah, P. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends in neurosciences* **19**, 150-154 (1996).
- 53 Hirschberg, B., Maylie, J., Adelman, J. P. & Marrion, N. V. Gating of recombinant small-conductance Ca-activated K<sup>+</sup> channels by calcium. *The Journal of general physiology* **111**, 565-581 (1998).
- 54 Xia, X. M. *et al.* Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **395**, 503-507, doi:10.1038/26758 (1998).
- 55 Joiner, W. J., Wang, L. Y., Tang, M. D. & Kaczmarek, L. K. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11013-11018 (1997).
- 56 Jensen, B. S., Strobaek, D., Olesen, S. P. & Christophersen, P. The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Current drug targets* **2**, 401-422 (2001).
- 57 Cui, J., Yang, H. & Lee, U. S. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**, 852-875, doi:10.1007/s00018-008-8609-x (2009).
- 58 Meera, P., Wallner, M., Song, M. & Toro, L. Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 14066-14071 (1997).
- 59 Toro, L., Wallner, M., Meera, P. & Tanaka, Y. Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **13**, 112-117 (1998).
- 60 Cui, J. & Aldrich, R. W. Allosteric linkage between voltage and Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of BK-type mslo1 K(+) channels. *Biochemistry* **39**, 15612-15619 (2000).
- 61 Chou, C. C., Lunn, C. A. & Murgolo, N. J. KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation? *Expert review of molecular diagnostics* **8**, 179-187, doi:10.1586/14737159.8.2.179 (2008).
- 62 Gardos, G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta* **30**, 653-654 (1958).
- 63 Cahalan, M. D., Wulff, H. & Chandy, K. G. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *Journal of clinical immunology* **21**, 235-252 (2001).
- 64 Cahalan, M. D. & Chandy, K. G. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunological reviews* **231**, 59-87, doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00816.x (2009).
- 65 Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E. & Nelson, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* **21**, 69-78, doi:10.1152/physiol.00040.2005 (2006).
- 66 Fanger, C. M. *et al.* Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *The Journal of biological chemistry* **274**, 5746-5754 (1999).
- 67 Stocker, M. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nature reviews. Neuroscience* **5**, 758-770, doi:10.1038/nrn1516 (2004).
- 68 Lee, W. S., Ngo-Anh, T. J., Bruening-Wright, A., Maylie, J. & Adelman, J. P. Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and calmodulin: cell surface expression and gating. *The Journal of biological chemistry* **278**, 25940-25946, doi:10.1074/jbc.M302091200 (2003).
- 69 Keen, J. E. *et al.* Domains responsible for constitutive and Ca<sup>2+</sup>-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 8830-8838 (1999).
- 70 Jensen, B. S. *et al.* Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *The American journal of physiology* **275**, C848-856 (1998).
- 71 Feske, S., Wulff, H. & Skolnik, E. Y. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology* **33**, 291-353, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112212 (2015).
- 72 Begenisich, T. *et al.* Physiological roles of the intermediate conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel Kcnn4. *The Journal of biological chemistry* **279**, 47681-47687, doi:10.1074/jbc.M409627200 (2004).
- 73 Wulff, H., Kolski-Andreaco, A., Sankaranarayanan, A., Sabatier, J. M. & Shakkottai, V. Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Current medicinal chemistry* **14**, 1437-1457 (2007).
- 74 Romanenko, V., Nakamoto, T., Srivastava, A., Melvin, J. E. & Begenisich, T. Molecular identification and physiological roles of parotid acinar cell maxi-K channels. *The Journal of biological chemistry* **281**, 27964-27972, doi:10.1074/jbc.M603871200 (2006).
- 75 Flores, C. A., Melvin, J. E., Figueroa, C. D. & Sepulveda, F. V. Abolition of Ca<sup>2+</sup>-mediated intestinal anion secretion and increased stool dehydration in mice lacking the intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel Kcnn4. *The Journal of physiology* **583**, 705-717, doi:10.1113/jphysiol.2007.134387 (2007).

- 76 Matos, J. E. *et al.* Role of cholinergic-activated KCa1.1 (BK), KCa3.1 (SK4) and KV7.1 (KCNQ1) channels in mouse colonic Cl<sup>-</sup> secretion. *Acta physiologica* **189**, 251-258, doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01646.x (2007).
- 77 De Franceschi, L. *et al.* Treatment with oral clotrimazole blocks Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> transport and reverses erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice. A model for therapy of sickle cell disease. *The Journal of clinical investigation* **93**, 1670-1676, doi:10.1172/JCI117149 (1994).
- 78 Brugnara, C., de Franceschi, L. & Alper, S. L. Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *The Journal of clinical investigation* **92**, 520-526, doi:10.1172/JCI116597 (1993).
- 79 Ataga, K. I. *et al.* Dose-escalation study of ICA-17043 in patients with sickle cell disease. *Pharmacotherapy* **26**, 1557-1564, doi:10.1592/phco.26.11.1557 (2006).
- 80 Ataga, K. I. *et al.* Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood* **111**, 3991-3997, doi:10.1182/blood-2007-08-110098 (2008).
- 81 Ataga, K. I. *et al.* Improvements in haemolysis and indicators of erythrocyte survival do not correlate with acute vaso-occlusive crises in patients with sickle cell disease: a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of the Gardos channel blocker senicapoc (ICA-17043). *British journal of haematology* **153**, 92-104, doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08520.x (2011).
- 82 Ashley-Koch, A., Yang, Q. & Olney, R. S. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *American journal of epidemiology* **151**, 839-845 (2000).
- 83 Bradding, P. & Wulff, H. The K<sup>+</sup> channels K(Ca)<sub>3.1</sub> and K(v)<sub>1.3</sub> as novel targets for asthma therapy. *British journal of pharmacology* **157**, 1330-1339, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00362.x (2009).
- 84 Shumilina, E. *et al.* Blunted IgE-mediated activation of mast cells in mice lacking the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel KCa<sub>3.1</sub>. *Journal of immunology* **180**, 8040-8047 (2008).
- 85 Girodet, P. O. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel-3.1 blocker TRAM-34 attenuates airway remodeling and eosinophilia in a murine asthma model. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **48**, 212-219, doi:10.1165/rcmb.2012-0103OC (2013).
- 86 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. *Circulation research* **99**, 537-544, doi:10.1161/01.RES.0000238377.08219.0c (2006).
- 87 Toyama, K. *et al.* The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa<sub>3.1</sub> contributes to atherogenesis in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3025-3037, doi:10.1172/JCI30836 (2008).
- 88 Reich, E. P. *et al.* Blocking ion channel KCNN4 alleviates the symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *European journal of immunology* **35**, 1027-1036, doi:10.1002/eji.200425954 (2005).
- 89 Wulff, H. *et al.* Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa<sub>1</sub>: a potential immunosuppressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8151-8156 (2000).
- 90 Wulff, H., Gutman, G. A., Cahalan, M. D. & Chandy, K. G. Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa<sub>1</sub>. *The Journal of biological chemistry* **276**, 32040-32045, doi:10.1074/jbc.M105231200 (2001).
- 91 Sciacaluga, M. *et al.* CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity. *American journal of physiology. Cell physiology* **299**, C175-184, doi:10.1152/ajpcell.00344.2009 (2010).
- 92 Ruggieri, P. *et al.* The inhibition of KCa<sub>3.1</sub> channels activity reduces cell motility in glioblastoma derived cancer stem cells. *PloS one* **7**, e47825, doi:10.1371/journal.pone.0047825 (2012).
- 93 Nelson, M. T. & Quayle, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology* **268**, C799-822 (1995).
- 94 Si, H. *et al.* Mitogenic modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in proliferating A7r5 vascular smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* **148**, 909-917, doi:10.1038/sj.bjp.0706793 (2006).
- 95 Hou, S., Heinemann, S. H. & Hoshi, T. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules. *Physiology* **24**, 26-35, doi:10.1152/physiol.00032.2008 (2009).
- 96 Latorre, R. & Brauchi, S. Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel: activation by Ca<sup>2+</sup> and voltage. *Biological research* **39**, 385-401, doi:S0716-97602006000300003 (2006).
- 97 Elkins, T., Ganetzky, B. & Wu, C. F. A Drosophila mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 8415-8419 (1986).
- 98 Atkinson, N. S. *et al.* Molecular separation of two behavioral phenotypes by a mutation affecting the promoters of a Ca-activated K channel. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 2988-2993 (2000).

- 99 Garcia-Calvo, M. *et al.* Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* **269**, 676-682 (1994).
- 100 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. *The Journal of biological chemistry* **280**, 33599-33609, doi:10.1074/jbc.M505383200 (2005).
- 101 Yan, J. *et al.* Profiling the phospho-status of the BKCa channel alpha subunit in rat brain reveals unexpected patterns and complexity. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**, 2188-2198, doi:10.1074/mcp.M800063-MCP200 (2008).
- 102 Orío, P., Rojas, P., Ferreira, G. & Latorre, R. New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **17**, 156-161 (2002).
- 103 Liu, G. *et al.* Locations of the beta1 transmembrane helices in the BK potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10727-10732, doi:10.1073/pnas.0805212105 (2008).
- 104 Wu, R. S. *et al.* Location of the beta 4 transmembrane helices in the BK potassium channel. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 8321-8328, doi:10.1523/JNEUROSCI.6191-08.2009 (2009).
- 105 Yan, J. & Aldrich, R. W. LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature* **466**, 513-516, doi:10.1038/nature09162 (2010).
- 106 Yan, J. & Aldrich, R. W. BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 7917-7922, doi:10.1073/pnas.1205435109 (2012).
- 107 Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. Structure of the RCK domain from the E. coli K<sup>+</sup> channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* **29**, 593-601 (2001).
- 108 Xia, X. M., Zeng, X. & Lingle, C. J. Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**, 880-884, doi:10.1038/nature00956 (2002).
- 109 Schreiber, M. & Salkoff, L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophysical journal* **73**, 1355-1363, doi:10.1016/S0006-3495(97)78168-2 (1997).
- 110 Schreiber, M., Yuan, A. & Salkoff, L. Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nature neuroscience* **2**, 416-421, doi:10.1038/8077 (1999).
- 111 Shi, J. & Cui, J. Intracellular Mg<sup>2+</sup> enhances the function of BK-type Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *The Journal of general physiology* **118**, 589-606 (2001).
- 112 Shi, J. *et al.* Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**, 876-880, doi:10.1038/nature00941 (2002).
- 113 Yang, H. *et al.* Mg<sup>2+</sup> mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18270-18275, doi:10.1073/pnas.0705873104 (2007).
- 114 Diaz, L. *et al.* Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *The Journal of biological chemistry* **273**, 32430-32436 (1998).
- 115 Ma, Z., Lou, X. J. & Horrigan, F. T. Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels. *The Journal of general physiology* **127**, 309-328, doi:10.1085/jgp.200509421 (2006).
- 116 Cox, D. H., Cui, J. & Aldrich, R. W. Allosteric gating of a large conductance Ca-activated K<sup>+</sup> channel. *The Journal of general physiology* **110**, 257-281 (1997).
- 117 Horrigan, F. T., Cui, J. & Aldrich, R. W. Allosteric voltage gating of potassium channels I. Mslo ionic currents in the absence of Ca<sup>2+</sup>. *The Journal of general physiology* **114**, 277-304 (1999).
- 118 Horrigan, F. T. & Aldrich, R. W. Coupling between voltage sensor activation, Ca<sup>2+</sup> binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *The Journal of general physiology* **120**, 267-305 (2002).
- 119 Rothberg, B. S. & Magleby, K. L. Voltage and Ca<sup>2+</sup> activation of single large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels described by a two-tiered allosteric gating mechanism. *The Journal of general physiology* **116**, 75-99 (2000).
- 120 Shipston, M. J. Ion channel regulation by protein palmitoylation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 8709-8716, doi:10.1074/jbc.R110.210005 (2011).
- 121 Tian, L. *et al.* Palmitoylation gates phosphorylation-dependent regulation of BK potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 21006-21011, doi:10.1073/pnas.0806700106 (2008).
- 122 Kume, H., Takai, A., Tokuno, H. & Tomita, T. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature* **341**, 152-154, doi:10.1038/341152a0 (1989).

- 123 Robertson, B. E., Schubert, R., Hescheler, J. & Nelson, M. T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *The American journal of physiology* **265**, C299-303 (1993).
- 124 Zhou, X. B. *et al.* Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8005-8010, doi:10.1073/pnas.0912029107 (2010).
- 125 Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C. & Wei, A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 921-931, doi:10.1038/nrn1992 (2006).
- 126 Sausbier, M. *et al.* Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* **112**, 60-68, doi:10.1161/01.CIR.0000156448.74296.FE (2005).
- 127 Soltysinska, E. *et al.* KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PLoS one* **9**, e103402, doi:10.1371/journal.pone.0103402 (2014).
- 128 Dufer, M. *et al.* BK channels affect glucose homeostasis and cell viability of murine pancreatic beta cells. *Diabetologia* **54**, 423-432, doi:10.1007/s00125-010-1936-0 (2011).
- 129 Marrion, N. V. & Tavalin, S. J. Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by co-localized Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurons. *Nature* **395**, 900-905, doi:10.1038/27674 (1998).
- 130 Wang, Z. W., Saifee, O., Nonet, M. L. & Salkoff, L. SLO-1 potassium channels control quantal content of neurotransmitter release at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Neuron* **32**, 867-881 (2001).
- 131 Sausbier, M. *et al.* Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9474-9478, doi:10.1073/pnas.0401702101 (2004).
- 132 Werner, M. E., Zvara, P., Meredith, A. L., Aldrich, R. W. & Nelson, M. T. Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *The Journal of physiology* **567**, 545-556, doi:10.1113/jphysiol.2005.093823 (2005).
- 133 Bonnet, S. & Archer, S. L. Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension. *Pharmacology & therapeutics* **115**, 56-69, doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.014 (2007).
- 134 Sprossmann, F. *et al.* Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *The FEBS journal* **276**, 1680-1697, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06900.x (2009).
- 135 Werner, M. E., Meredith, A. L., Aldrich, R. W. & Nelson, M. T. Hypercontractility and impaired sildenafil relaxations in the BKCa channel deletion model of erectile dysfunction. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **295**, R181-188, doi:10.1152/ajpregu.00173.2008 (2008).
- 136 Meredith, A. L., Thorneloe, K. S., Werner, M. E., Nelson, M. T. & Aldrich, R. W. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *The Journal of biological chemistry* **279**, 36746-36752, doi:10.1074/jbc.M405621200 (2004).
- 137 Ruttiger, L. *et al.* Deletion of the Ca<sup>2+</sup>-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12922-12927, doi:10.1073/pnas.0402660101 (2004).
- 138 Imlach, W. L. *et al.* The molecular mechanism of "ryegrass staggers," a neurological disorder of K<sup>+</sup> channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **327**, 657-664, doi:10.1124/jpet.108.143933 (2008).
- 139 Edalat, L. *et al.* BK K<sup>+</sup> channel blockade inhibits radiation-induced migration/brain infiltration of glioblastoma cells. *Oncotarget* **7**, 14259-14278, doi:10.18632/oncotarget.7423 (2016).
- 140 Hutchinson, J. N. & Muller, W. J. Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* **19**, 6130-6137, doi:10.1038/sj.onc.1203970 (2000).
- 141 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 142 Hahn, W. C. *et al.* Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464-468, doi:10.1038/22780 (1999).
- 143 Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-170 (1996).
- 144 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 145 Prevarskaya, N., Skryma, R. & Shuba, Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine* **16**, 107-121, doi:10.1016/j.molmed.2010.01.005 (2010).
- 146 Hoffmann, E. K. & Pedersen, S. F. Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways. *Acta physiologica* **202**, 465-485, doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02190.x (2011).
- 147 Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P. J. & Stock, C. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiological reviews* **92**, 1865-1913, doi:10.1152/physrev.00018.2011 (2012).

- 148 Wang, Z. H. *et al.* Blockage of intermediate-conductance-Ca(2+) -activated K(+) channels inhibits progression of human endometrial cancer. *Oncogene* **26**, 5107-5114, doi:10.1038/sj.onc.1210308 (2007).
- 149 Parihar, A. S., Coghlan, M. J., Gopalakrishnan, M. & Shieh, C. C. Effects of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *European journal of pharmacology* **471**, 157-164 (2003).
- 150 Jager, H. *et al.* Blockage of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Molecular pharmacology* **65**, 630-638, doi:10.1124/mol.65.3.630 (2004).
- 151 Yang, X. W. *et al.* Inhibitory effects of blockage of intermediate conductance Ca(2+)-activated K (+) channels on proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban* **33**, 86-89, doi:10.1007/s11596-013-1076-0 (2013).
- 152 Haren, N. *et al.* Intermediate conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels are expressed and functional in breast adenocarcinomas: correlation with tumour grade and metastasis status. *Histology and histopathology* **25**, 1247-1255 (2010).
- 153 Faouzi, M. *et al.* Functional cooperation between KCa3.1 and TRPC1 channels in human breast cancer: Role in cell proliferation and patient prognosis. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.9261 (2016).
- 154 Bloch, M. *et al.* KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene* **26**, 2525-2534, doi:10.1038/sj.onc.1210036 (2007).
- 155 Oeggerli, M. *et al.* Role of KCNMA1 in breast cancer. *PloS one* **7**, e41664, doi:10.1371/journal.pone.0041664 (2012).
- 156 Pines, J. Cell proliferation and control. *Current opinion in cell biology* **4**, 144-148 (1992).
- 157 Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation* **36**, 131-149 (2003).
- 158 Urrego, D., Tomczak, A. P., Zahed, F., Stuhmer, W. & Pardo, L. A. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **369**, 20130094, doi:10.1098/rstb.2013.0094 (2014).
- 159 Kahl, C. R. & Means, A. R. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocrine reviews* **24**, 719-736, doi:10.1210/er.2003-0008 (2003).
- 160 DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S. & Cahalan, M. D. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* **307**, 465-468 (1984).
- 161 Weaver, A. K., Liu, X. & Sontheimer, H. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *Journal of neuroscience research* **78**, 224-234, doi:10.1002/jnr.20240 (2004).
- 162 Blackiston, D. J., McLaughlin, K. A. & Levin, M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell cycle* **8**, 3527-3536, doi:10.4161/cc.8.21.9888 (2009).
- 163 Wang, Z. Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **448**, 274-286, doi:10.1007/s00424-004-1258-5 (2004).
- 164 Marino, A. A. *et al.* Association between cell membrane potential and breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **15**, 82-89 (1994).
- 165 Wonderlin, W. F. & Strobl, J. S. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *The Journal of membrane biology* **154**, 91-107 (1996).
- 166 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. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**, C125-134, doi:10.1152/ajpcell.00488.2003 (2004).
- 167 Woodfork, K. A., Wonderlin, W. F., Peterson, V. A. & Strobl, J. S. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *Journal of cellular physiology* **162**, 163-171, doi:10.1002/jcp.1041620202 (1995).
- 168 Jehle, J., Schweizer, P. A., Katus, H. A. & Thomas, D. Novel roles for hERG K(+) channels in cell proliferation and apoptosis. *Cell death & disease* **2**, e193, doi:10.1038/cddis.2011.77 (2011).
- 169 Crociani, O. *et al.* Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 2947-2955, doi:10.1074/jbc.M210789200 (2003).
- 170 Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Ahidouch, A., Delcourt, P. & Prevarskaya, N. Cell-cycle-dependent expression of the large Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **316**, 244-251, doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.041 (2004).
- 171 Pillozzi, S. *et al.* HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia* **16**, 1791-1798, doi:10.1038/sj.leu.2402572 (2002).

- 172 Wonderlin, W. F., Woodfork, K. A. & Strobl, J. S. Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. *Journal of cellular physiology* **165**, 177-185, doi:10.1002/jcp.1041650121 (1995).
- 173 Lee, W. J., Monteith, G. R. & Roberts-Thomson, S. J. Calcium transport and signaling in the mammary gland: targets for breast cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1765**, 235-255, doi:10.1016/j.bbcan.2005.12.001 (2006).
- 174 Roderick, H. L. & Cook, S. J. Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nature reviews. Cancer* **8**, 361-375, doi:10.1038/nrc2374 (2008).
- 175 Strobl, J. S., Wonderlin, W. F. & Flynn, D. C. Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *General pharmacology* **26**, 1643-1649 (1995).
- 176 Guilbert, A. *et al.* Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *American journal of physiology. Cell physiology* **297**, C493-502, doi:10.1152/ajpcell.00624.2008 (2009).
- 177 Cook, S. J. & Lockyer, P. J. Recent advances in Ca(2+)-dependent Ras regulation and cell proliferation. *Cell calcium* **39**, 101-112, doi:10.1016/j.ceca.2005.10.014 (2006).
- 178 Foreman, M. A., Smith, J. & Publicover, S. J. Characterisation of serum-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in primary bone marrow stromal cells. *Journal of cellular physiology* **206**, 664-671, doi:10.1002/jcp.20521 (2006).
- 179 Sergeev, I. N. Genistein induces Ca<sup>2+</sup> -mediated, calpain/caspase-12-dependent apoptosis in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **321**, 462-467, doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.173 (2004).
- 180 Sergeev, I. N. Calcium signaling in cancer and vitamin D. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **97**, 145-151, doi:10.1016/j.jsbmb.2005.06.007 (2005).
- 181 Santella, L. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochemical and biophysical research communications* **244**, 317-324, doi:10.1006/bbrc.1998.8086 (1998).
- 182 Berridge, M. J. Calcium signalling and cell proliferation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **17**, 491-500, doi:10.1002/bies.950170605 (1995).
- 183 Lallet-Daher, H. *et al.* Intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* **28**, 1792-1806, doi:10.1038/onc.2009.25 (2009).
- 184 Lukas, J., Bartkova, J. & Bartek, J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Molecular and cellular biology* **16**, 6917-6925 (1996).
- 185 Bartkova, J. *et al.* Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *International journal of cancer* **57**, 353-361 (1994).
- 186 Sutherland, R. L. & Musgrove, E. A. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Breast cancer research : BCR* **4**, 14-17 (2002).
- 187 Burkhart, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature reviews. Cancer* **8**, 671-682, doi:10.1038/nrc2399 (2008).
- 188 Gasco, M., Shami, S. & Crook, T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **4**, 70-76 (2002).
- 189 Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. Apoptosis - the p53 network. *Journal of cell science* **116**, 4077-4085, doi:10.1242/jcs.00739 (2003).
- 190 Sheng, M. & Greenberg, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**, 477-485 (1990).
- 191 Kovary, K. & Bravo, R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Molecular and cellular biology* **11**, 4466-4472 (1991).
- 192 Kovary, K. & Bravo, R. Expression of different Jun and Fos proteins during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Molecular and cellular biology* **11**, 2451-2459 (1991).
- 193 Milde-Langosch, K. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *European journal of cancer* **41**, 2449-2461, doi:10.1016/j.ejca.2005.08.008 (2005).
- 194 Milde-Langosch, K. *et al.* The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast cancer research and treatment* **86**, 139-152, doi:10.1023/B:BREA.0000032982.49024.71 (2004).
- 195 Takuwa, N., Zhou, W., Kumada, M. & Takuwa, Y. Ca(2+)-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* **268**, 138-145 (1993).
- 196 Ohya, S. *et al.* Malignancy grade-dependent expression of K<sup>+</sup>-channel subtypes in human prostate cancer. *Journal of pharmacological sciences* **109**, 148-151 (2009).
- 197 Freise, C., Ruehl, M., Seehofer, D., Hoyer, J. & Somasundaram, R. The inhibitor of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels TRAM-34 blocks growth of hepatocellular carcinoma cells via downregulation of estrogen

- receptor alpha mRNA and nuclear factor-kappaB. *Investigational new drugs* **31**, 452-457, doi:10.1007/s10637-012-9879-6 (2013).
- 198 Macian, F., Lopez-Rodriguez, C. & Rao, A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-2489, doi:10.1038/sj.onc.1204386 (2001).
- 199 Han, X. *et al.* Heat shock proteins and p53 play a critical role in K<sup>+</sup> channel-mediated tumor cell proliferation and apoptosis. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* **12**, 1837-1846, doi:10.1007/s10495-007-0101-9 (2007).
- 200 Han, X. *et al.* The potassium ion channel opener NS1619 inhibits proliferation and induces apoptosis in A2780 ovarian cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **375**, 205-209, doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.161 (2008).
- 201 Mound, A., Rodat-Despoix, L., Bougarn, S., Ouadid-Ahidouch, H. & Matifat, F. Molecular interaction and functional coupling between type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and BKCa channel stimulate breast cancer cell proliferation. *European journal of cancer* **49**, 3738-3751, doi:10.1016/j.ejca.2013.07.013 (2013).
- 202 Du, C. *et al.* Caveolin-1 limits the contribution of BKCa channel to MCF-7 breast cancer cell proliferation and invasion. *International journal of molecular sciences* **15**, 20706-20722, doi:10.3390/ijms151120706 (2014).
- 203 Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 231-241, doi:10.1038/nrm2312 (2008).
- 204 Ouyang, L. *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation* **45**, 487-498, doi:10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x (2012).
- 205 Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337 (2007).
- 206 Norbury, C. J. & Hickson, I. D. Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology* **41**, 367-401, doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367 (2001).
- 207 Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. Properties of the caspases. *Biochimica et biophysica acta* **1387**, 17-31 (1998).
- 208 Pope, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Immunology* **2**, 527-535, doi:10.1038/nri846 (2002).
- 209 Boehning, D. *et al.* Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature cell biology* **5**, 1051-1061, doi:10.1038/ncb1063 (2003).
- 210 Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell calcium* **50**, 211-221, doi:10.1016/j.ceca.2011.03.003 (2011).
- 211 Rong, Y. P. *et al.* Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Molecular cell* **31**, 255-265, doi:10.1016/j.molcel.2008.06.014 (2008).
- 212 Burg, E. D., Remillard, C. V. & Yuan, J. X. K<sup>+</sup> channels in apoptosis. *The Journal of membrane biology* **209**, 3-20, doi:10.1007/s00232-005-0838-4 (2006).
- 213 McFerrin, M. B., Turner, K. L., Cuddapah, V. A. & Sontheimer, H. Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death. *American journal of physiology. Cell physiology* **303**, C1070-1078, doi:10.1152/ajpcell.00040.2012 (2012).
- 214 Wang, L., Xu, D., Dai, W. & Lu, L. An ultraviolet-activated K<sup>+</sup> channel mediates apoptosis of myeloblastic leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* **274**, 3678-3685 (1999).
- 215 Tournier, C. *et al.* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870-874 (2000).
- 216 Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252 (2000).
- 217 Abdulkareem, Z. A., Gee, J. M., Cox, C. D. & Wann, K. T. Knockdown of the small conductance Ca(2<sup>+</sup>)-activated K(+) channels is potently cytotoxic in breast cancer cell lines. *British journal of pharmacology* **173**, 177-190, doi:10.1111/bph.13357 (2016).
- 218 Wang, H. *et al.* HERG K<sup>+</sup> channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer research* **62**, 4843-4848 (2002).
- 219 Stepczynska, A. *et al.* Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* **20**, 1193-1202, doi:10.1038/sj.onc.1204221 (2001).
- 220 Xue, L. Y., Chiu, S. M. & Oleinick, N. L. Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. *Experimental cell research* **283**, 135-145 (2003).
- 221 Kang, Y. J. *et al.* Paxilline enhances TRAIL-mediated apoptosis of glioma cells via modulation of c-FLIP, survivin and DR5. *Experimental & molecular medicine* **43**, 24-34, doi:10.3858/emm.2011.43.1.003 (2011).
- 222 Quast, S. A. *et al.* General Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC. *PLoS one* **7**, e39290, doi:10.1371/journal.pone.0039290 (2012).

- 223 Zhang, P. *et al.* Inhibition of SK4 Potassium Channels Suppresses Cell Proliferation, Migration and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *PLoS one* **11**, e0154471, doi:10.1371/journal.pone.0154471 (2016).
- 224 Lee, E. L., Hasegawa, Y., Shimizu, T. & Okada, Y. IK1 channel activity contributes to cisplatin sensitivity of human epidermoid cancer cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **294**, C1398-1406, doi:10.1152/ajpcell.00428.2007 (2008).
- 225 Ma, Y. G. *et al.* Activation of BK(Ca) channels in zoledronic acid-induced apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLoS one* **7**, e37451, doi:10.1371/journal.pone.0037451 (2012).
- 226 De Marchi, U. *et al.* Intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell calcium* **45**, 509-516, doi:10.1016/j.ceca.2009.03.014 (2009).
- 227 Sassi, N. *et al.* An investigation of the occurrence and properties of the mitochondrial intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel mtKCa3.1. *Biochimica et biophysica acta* **1797**, 1260-1267, doi:10.1016/j.bbabi.2009.12.015 (2010).
- 228 Siemen, D., Loupatatzis, C., Borecky, J., Gulbins, E. & Lang, F. Ca<sup>2+</sup>-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochemical and biophysical research communications* **257**, 549-554, doi:10.1006/bbrc.1999.0496 (1999).
- 229 Schwab, A., Nechyporuk-Zloy, V., Fabian, A. & Stock, C. Cells move when ions and water flow. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **453**, 421-432, doi:10.1007/s00424-006-0138-6 (2007).
- 230 Hammadi, M. *et al.* Human ether a-gogo K(+) channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. *Journal of cellular physiology* **227**, 3837-3846, doi:10.1002/jcp.24095 (2012).
- 231 Lastraioli, E. *et al.* hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer research* **64**, 606-611 (2004).
- 232 Chantome, A. *et al.* KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Experimental cell research* **315**, 3620-3630, doi:10.1016/j.yexcr.2009.07.021 (2009).
- 233 Potier, M. *et al.* Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Molecular cancer therapeutics* **5**, 2946-2953, doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0194 (2006).
- 234 Chantome, A. *et al.* Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer research* **73**, 4852-4861, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4572 (2013).
- 235 Catacuzzeno, L. *et al.* Serum-activated K and Cl currents underlay U87-MG glioblastoma cell migration. *Journal of cellular physiology* **226**, 1926-1933, doi:10.1002/jcp.22523 (2011).
- 236 Catacuzzeno, L., Fioretti, B. & Franciolini, F. Expression and Role of the Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel KCa3.1 in Glioblastoma. *Journal of signal transduction* **2012**, 421564, doi:10.1155/2012/421564 (2012).
- 237 D'Alessandro, G. *et al.* KCa3.1 channels are involved in the infiltrative behavior of glioblastoma in vivo. *Cell death & disease* **4**, e773, doi:10.1038/cddis.2013.279 (2013).
- 238 Schwab, A., Reinhardt, J., Schneider, S. W., Gassner, B. & Schuricht, B. K(+) channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **9**, 126-132, doi:16309 (1999).
- 239 Lai, W. *et al.* KCNN4 channels participate in the EMT induced by PRL-3 in colorectal cancer. *Medical oncology* **30**, 566, doi:10.1007/s12032-013-0566-z (2013).
- 240 Ge, L. *et al.* Big Potassium (BK) ion channels in biology, disease and possible targets for cancer immunotherapy. *International immunopharmacology* **22**, 427-443, doi:10.1016/j.intimp.2014.06.040 (2014).
- 241 Kraft, R. *et al.* BK channel openers inhibit migration of human glioma cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **446**, 248-255, doi:10.1007/s00424-003-1012-4 (2003).
- 242 Weaver, A. K., Bomben, V. C. & Sontheimer, H. Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells. *Glia* **54**, 223-233, doi:10.1002/glia.20364 (2006).
- 243 Wondergem, R. & Bartley, J. W. Menthol increases human glioblastoma intracellular Ca<sup>2+</sup>, BK channel activity and cell migration. *Journal of biomedical science* **16**, 90, doi:10.1186/1423-0127-16-90 (2009).
- 244 Bordey, A., Sontheimer, H. & Trouslard, J. Muscarinic activation of BK channels induces membrane oscillations in glioma cells and leads to inhibition of cell migration. *The Journal of membrane biology* **176**, 31-40 (2000).
- 245 Steinle, M. *et al.* Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **101**, 122-126, doi:10.1016/j.radonc.2011.05.069 (2011).
- 246 Khaitan, D. *et al.* Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain. *BMC cancer* **9**, 258, doi:10.1186/1471-2407-9-258 (2009).

- 247 Stern, D. F. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast cancer research : BCR* **2**, 176-183 (2000).
- 248 Holbro, T. & Hynes, N. E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annual review of pharmacology and toxicology* **44**, 195-217, doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440 (2004).
- 249 Moasser, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**, 6469-6487, doi:10.1038/sj.onc.1210477 (2007).
- 250 Neal, D. E. *et al.* Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet* **1**, 366-368 (1985).
- 251 Yasui, W. *et al.* Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *International journal of cancer* **41**, 211-217 (1988).
- 252 Klijn, J. G., Berns, P. M., Schmitz, P. I. & Foekens, J. A. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine reviews* **13**, 3-17, doi:10.1210/edrv-13-1-3 (1992).
- 253 Travis, A. *et al.* C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *British journal of cancer* **74**, 229-233 (1996).
- 254 Lemoine, N. R. *et al.* Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *British journal of cancer* **66**, 1116-1121 (1992).
- 255 Srinivasan, R., Poulosom, R., Hurst, H. C. & Gullick, W. J. Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types. *The Journal of pathology* **185**, 236-245, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199807)185:3<236::AID-PATH118>3.0.CO;2-7 (1998).
- 256 Knowlden, J. M. *et al.* c-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene* **17**, 1949-1957, doi:10.1038/sj.onc.1202107 (1998).
- 257 Bacus, S. S., Chin, D., Yarden, Y., Zelnick, C. R. & Stern, D. F. Type I receptor tyrosine kinases are differentially phosphorylated in mammary carcinoma and differentially associated with steroid receptors. *The American journal of pathology* **148**, 549-558 (1996).
- 258 Sliwkowski, M. X. Ready to partner. *Nature structural biology* **10**, 158-159, doi:10.1038/nsb0303-158 (2003).
- 259 Riese, D. J., 2nd & Stern, D. F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **20**, 41-48, doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<41::AID-BIES7>3.0.CO;2-V (1998).
- 260 Guy, C. T. *et al.* Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10578-10582 (1992).
- 261 Di Fiore, P. P. *et al.* erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* **237**, 178-182 (1987).
- 262 Cho, H. S. *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**, 756-760, doi:10.1038/nature01392 (2003).
- 263 Garrett, T. P. *et al.* The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Molecular cell* **11**, 495-505 (2003).
- 264 Menard, S., Tagliabue, E., Campiglio, M. & Pupa, S. M. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *Journal of cellular physiology* **182**, 150-162, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<150::AID-JCP3>3.0.CO;2-E (2000).
- 265 Vijapurkar, U., Kim, M. S. & Koland, J. G. Roles of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3'-kinase in ErbB2/ErbB3 coreceptor-mediated heregulin signaling. *Experimental cell research* **284**, 291-302 (2003).
- 266 Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **3**, 11-22, doi:10.1038/nrc969 (2003).
- 267 Konstantinopoulos, P. A., Karamouzis, M. V. & Papavassiliou, A. G. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 541-555, doi:10.1038/nrd2221 (2007).
- 268 Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews* **93**, 269-309, doi:10.1152/physrev.00003.2012 (2013).
- 269 Fioretti, B. *et al.* Expression and modulation of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in glioblastoma GL-15 cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **18**, 47-56, doi:10.1159/000095135 (2006).
- 270 Pena, T. L., Chen, S. H., Konieczny, S. F. & Rane, S. G. Ras/MEK/ERK Up-regulation of the fibroblast K<sub>Ca</sub> channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta suppression of myogenesis. *The Journal of biological chemistry* **275**, 13677-13682 (2000).

- 271 Pena, T. L. & Rane, S. G. The fibroblast intermediate conductance K(Ca) channel, FIK, as a prototype  
for the cell growth regulatory function of the IK channel family. *The Journal of membrane biology* **172**,  
249-257 (1999).
- 272 Astolfi, A. *et al.* Gene expression analysis of immune-mediated arrest of tumorigenesis in a transgenic  
mouse model of HER-2/neu-positive basal-like mammary carcinoma. *The American journal of*  
*pathology* **166**, 1205-1216, doi:10.1016/S0002-9440(10)62339-5 (2005).
- 273 Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for  
cancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **4**, 988-1004, doi:10.1038/nrd1902 (2005).
- 274 Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F. & Hirsch, E. PI3K/AKT signaling pathway and  
cancer: an updated review. *Annals of medicine* **46**, 372-383, doi:10.3109/07853890.2014.912836  
(2014).
- 275 Carnero, A. & Paramio, J. M. The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. *Frontiers*  
*in oncology* **4**, 252, doi:10.3389/fonc.2014.00252 (2014).
- 276 Callahan, R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human  
breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **39**, 33-44 (1996).
- 277 Campbell, K. S. *et al.* Polyoma middle tumor antigen interacts with SHC protein via the NPTY (Asn-  
Pro-Thr-Tyr) motif in middle tumor antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
*United States of America* **91**, 6344-6348 (1994).
- 278 Bolen, J. B. *et al.* Enhancement of cellular src gene product associated tyrosyl kinase activity following  
polyoma virus infection and transformation. *Cell* **38**, 767-777 (1984).
- 279 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. *The EMBO journal* **7**, 3845-  
3855 (1988).
- 280 Kornbluth, S., Sudol, M. & Hanafusa, H. Association of the polyomavirus middle-T antigen with c-yes  
protein. *Nature* **325**, 171-173, doi:10.1038/325171a0 (1987).
- 281 Kypta, R. M., Hemming, A. & Courtneidge, S. A. Identification and characterization of p59fyn (a src-  
like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *The EMBO journal* **7**,  
3837-3844 (1988).
- 282 Guy, C. T., Muthuswamy, S. K., Cardiff, R. D., Soriano, P. & Muller, W. J. Activation of the c-Src  
tyrosine kinase is required for the induction of mammary tumors in transgenic mice. *Genes &*  
*development* **8**, 23-32 (1994).
- 283 Webster, M. A., Cardiff, R. D. & Muller, W. J. Induction of mammary epithelial hyperplasias and  
mammary tumors in transgenic mice expressing a murine mammary tumor virus/activated c-src fusion  
gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7849-7853  
(1995).
- 284 Courtneidge, S. A. & Heber, A. An 81 kd protein complexed with middle T antigen and pp60c-src: a  
possible phosphatidylinositol kinase. *Cell* **50**, 1031-1037 (1987).
- 285 Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.  
*Nature reviews. Cancer* **2**, 489-501, doi:10.1038/nrc839 (2002).
- 286 Cardone, M. H. *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**,  
1318-1321 (1998).
- 287 Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death  
machinery. *Cell* **91**, 231-241 (1997).
- 288 Jelinek, M. A. & Hassell, J. A. Reversion of middle T antigen-transformed Rat-2 cells by Krev-1:  
implications for the role of p21c-ras in polyomavirus-mediated transformation. *Oncogene* **7**, 1687-1698  
(1992).
- 289 Raptis, L. *et al.* Cellular ras gene activity is required for full neoplastic transformation by polyomavirus.  
*Journal of virology* **65**, 5203-5210 (1991).
- 290 Webster, M. A. *et al.* Requirement for both Shc and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways  
in polyomavirus middle T-mediated mammary tumorigenesis. *Molecular and cellular biology* **18**, 2344-  
2359 (1998).
- 291 Markland, W. & Smith, A. E. Mutants of polyomavirus middle-T antigen. *Biochimica et biophysica*  
*acta* **907**, 299-321 (1987).
- 292 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. *The American journal of pathology* **163**, 2113-  
2126, doi:10.1016/S0002-9440(10)63568-7 (2003).
- 293 Guy, C. T., Cardiff, R. D. & Muller, W. J. Induction of mammary tumors by expression of  
polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Molecular and*  
*cellular biology* **12**, 954-961 (1992).
- 294 Dawe, C. J. *et al.* Variations in polyoma virus genotype in relation to tumor induction in mice.  
Characterization of wild type strains with widely differing tumor profiles. *The American journal of*  
*pathology* **127**, 243-261 (1987).

- 295 Brison, O. Gene amplification and tumor progression. *Biochimica et biophysica acta* **1155**, 25-41 (1993).
- 296 Herschkowitz, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology* **8**, R76, doi:10.1186/gb-2007-8-5-r76 (2007).
- 297 Smith, B. A. *et al.* Targeting the PyMT Oncogene to Diverse Mammary Cell Populations Enhances Tumor Heterogeneity and Generates Rare Breast Cancer Subtypes. *Genes & cancer* **3**, 550-563, doi:10.1177/1947601913475359 (2012).
- 298 Lapidus, R. G., Nass, S. J. & Davidson, N. E. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **3**, 85-94 (1998).
- 299 Minn, A. J. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**, 518-524, doi:10.1038/nature03799 (2005).
- 300 Lifsted, T. *et al.* Identification of inbred mouse strains harboring genetic modifiers of mammary tumor age of onset and metastatic progression. *International journal of cancer* **77**, 640-644 (1998).
- 301 Qiu, T. H. *et al.* Global expression profiling identifies signatures of tumor virulence in MMTV-PyMT-transgenic mice: correlation to human disease. *Cancer research* **64**, 5973-5981, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0242 (2004).
- 302 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 research* **16**, 193-201, doi:10.1007/s11248-006-9056-9 (2007).
- 303 Schechter, A. L. *et al.* The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* **312**, 513-516 (1984).
- 304 Schechter, A. L. *et al.* The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* **229**, 976-978 (1985).
- 305 Bargmann, C. I., Hung, M. C. & Weinberg, R. A. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* **45**, 649-657 (1986).
- 306 Weiner, D. B. *et al.* Linkage of tyrosine kinase activity with transforming ability of the p185neu oncoprotein. *Oncogene* **4**, 1175-1183 (1989).
- 307 Muller, W. J., Sinn, E., Pattengale, P. K., Wallace, R. & Leder, P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **54**, 105-115 (1988).
- 308 Siegel, P. M., Dankort, D. L., Hardy, W. R. & Muller, W. J. Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors. *Molecular and cellular biology* **14**, 7068-7077 (1994).
- 309 Muller, W. J. *et al.* Synergistic interaction of the Neu proto-oncogene product and transforming growth factor alpha in the mammary epithelium of transgenic mice. *Molecular and cellular biology* **16**, 5726-5736 (1996).
- 310 Sternberg, N. & Hamilton, D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology* **150**, 467-486 (1981).
- 311 Hoess, R. H., Ziese, M. & Sternberg, N. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 3398-3402 (1982).
- 312 Sternberg, N., Sauer, B., Hoess, R. & Abremski, K. Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *Journal of molecular biology* **187**, 197-212 (1986).
- 313 Sausbier, M. *et al.* Distal colonic K(+) secretion occurs via BK channels. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **17**, 1275-1282, doi:10.1681/ASN.2005101111 (2006).
- 314 Tomayko, M. M. & Reynolds, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **24**, 148-154 (1989).
- 315 Coughenour, L. L., McLean, J. R. & Parker, R. B. A new device for the rapid measurement of impaired motor function in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **6**, 351-353 (1977).
- 316 Gallagher, R. T. & Hawkes, A. D. Estimation of neurotoxin levels in perennial ryegrass by mouse bioassay. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **28**, 427-431, doi:10.1080/00288233.1985.10430448 (2012).
- 317 Kocaturk, B. & Versteeg, H. H. Orthotopic injection of breast cancer cells into the mammary fat pad of mice to study tumor growth. *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi:10.3791/51967 (2015).
- 318 DeNardo, D. G. *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer discovery* **1**, 54-67, doi:10.1158/2159-8274.CD-10-0028 (2011).
- 319 GVSOLAS. Gesellschaft für Versuchstierkunde: Schmerztherapie bei Versuchstieren. (2015).
- 320 Bastidas, O. Cell counting with Neubauer chamber, basic hemocytometer usage. *Celeromics* (2013).
- 321 Cooper, S. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 333-340, doi:10.1096/fj.02-0352rev (2003).

- 322 Shin, J. S. *et al.* Serum starvation induces G1 arrest through suppression of Skp2-CDK2 and CDK4 in SK-OV-3 cells. *International journal of oncology* **32**, 435-439 (2008).
- 323 Neher, E. & Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802 (1976).
- 324 Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156-159, doi:10.1006/abio.1987.9999 (1987).
- 325 Chomczynski, P. & Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* **1**, 581-585, doi:10.1038/nprot.2006.83 (2006).
- 326 Dragan, A. I. *et al.* SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of fluorescence* **22**, 1189-1199, doi:10.1007/s10895-012-1059-8 (2012).
- 327 Ke, N., Wang, X., Xu, X. & Abassi, Y. A. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods in molecular biology* **740**, 33-43, doi:10.1007/978-1-61779-108-6\_6 (2011).
- 328 Pozarowski, P. & Darzynkiewicz, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in molecular biology* **281**, 301-311, doi:10.1385/1-59259-811-0:301 (2004).
- 329 Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. & Green, D. R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature cell biology* **2**, 156-162, doi:10.1038/35004029 (2000).
- 330 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
- 331 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**, 265-275 (1951).
- 332 Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical biochemistry* **83**, 346-356 (1977).
- 333 Moore, E. D., Becker, P. L., Fogarty, K. E., Williams, D. A. & Fay, F. S. Ca<sup>2+</sup> imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell calcium* **11**, 157-179 (1990).
- 334 Whitfield, J. F., Bird, R. P., Chakravarthy, B. R., Isaacs, R. J. & Morley, P. Calcium-cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* **22**, 74-91 (1995).
- 335 Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews. Cancer* **5**, 275-284, doi:10.1038/nrc1590 (2005).
- 336 Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* **5**, 219-234, doi:10.1038/nrd1984 (2006).
- 337 Morse, D. L., Gray, H., Payne, C. M. & Gillies, R. J. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* **4**, 1495-1504, doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0130 (2005).
- 338 Ghanshani, S. *et al.* Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *The Journal of biological chemistry* **275**, 37137-37149, doi:10.1074/jbc.M003941200 (2000).
- 339 Partiseti, M., Choquet, D., Diu, A. & Korn, H. Differential regulation of voltage- and calcium-activated potassium channels in human B lymphocytes. *Journal of immunology* **148**, 3361-3368 (1992).
- 340 Khanna, R., Chang, M. C., Joiner, W. J., Kaczmarek, L. K. & Schlichter, L. C. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 14838-14849 (1999).
- 341 Huang, Y. & Rane, S. G. Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. *The Journal of biological chemistry* **269**, 31183-31189 (1994).
- 342 Samuel, P. *et al.* Over-expression of miR-31 or loss of KCNMA1 leads to increased cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**, 2565-2573, doi:10.1007/s13277-015-4081-z (2016).
- 343 Taylor, M. S. *et al.* Altered expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circulation research* **93**, 124-131, doi:10.1161/01.RES.0000081980.63146.69 (2003).
- 344 Clarysse, L. *et al.* cAMP-PKA inhibition of SK3 channel reduced both Ca<sup>2+</sup> entry and cancer cell migration by regulation of SK3-Orai1 complex. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **466**, 1921-1932, doi:10.1007/s00424-013-1435-5 (2014).
- 345 Potier, M. *et al.* The SK3/K(Ca)2.3 potassium channel is a new cellular target for edelfosine. *British journal of pharmacology* **162**, 464-479, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01044.x (2011).
- 346 Ouadid-Ahidouch, H. & Ahidouch, A. K<sup>+</sup> channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *The Journal of membrane biology* **221**, 1-6, doi:10.1007/s00232-007-9080-6 (2008).

- 347 Stegen, B. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-Activated IK K<sup>+</sup> Channel Blockade Radiosensitizes Glioblastoma Cells. *Molecular cancer research : MCR* **13**, 1283-1295, doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0075 (2015).
- 348 Abdullaev, I. F., Rudkouskaya, A., Mongin, A. A. & Kuo, Y. H. Calcium-activated potassium channels BK and IK1 are functionally expressed in human gliomas but do not regulate cell proliferation. *PLoS one* **5**, e12304, doi:10.1371/journal.pone.0012304 (2010).
- 349 Abdul, M., Santo, A. & Hoosein, N. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. *Anticancer research* **23**, 3347-3351 (2003).
- 350 Klimatcheva, E. & Wonderlin, W. F. An ATP-sensitive K(+) current that regulates progression through early G1 phase of the cell cycle in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of membrane biology* **171**, 35-46 (1999).
- 351 Stringer, B. K., Cooper, A. G. & Shepard, S. B. Overexpression of the G-protein inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1) in primary breast carcinomas correlates with axillary lymph node metastasis. *Cancer research* **61**, 582-588 (2001).
- 352 Liu, Y. *et al.* Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene* **21**, 7680-7689, doi:10.1038/sj.onc.1205883 (2002).
- 353 Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology* **4**, E131-136, doi:10.1038/ncb0502-e131 (2002).
- 354 Eferl, R. & Wagner, E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* **3**, 859-868, doi:10.1038/nrc1209 (2003).
- 355 Rane, S. G. The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **269**, 457-463, doi:10.1006/bbrc.2000.2309 (2000).
- 356 Wang, J. *et al.* An intermediate-conductance Ca(2+)-activated K (+) channel mediates B lymphoma cell cycle progression induced by serum. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **454**, 945-956, doi:10.1007/s00424-007-0258-7 (2007).
- 357 Huang, C. *et al.* KCa3.1 mediates dysfunction of tubular autophagy in diabetic kidneys via PI3k/Akt/mTOR signaling pathways. *Scientific reports* **6**, 23884, doi:10.1038/srep23884 (2016).
- 358 Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of molecular medicine* **74**, 589-607 (1996).
- 359 Stegen, B. *et al.* K<sup>+</sup> channel signaling in irradiated tumor cells. *European biophysics journal : EBJ*, doi:10.1007/s00249-016-1136-z (2016).
- 360 Panner, A. & Wurster, R. D. T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell calcium* **40**, 253-259, doi:10.1016/j.ceca.2006.04.029 (2006).
- 361 Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G. & Harteneck, C. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *The Journal of biological chemistry* **278**, 21493-21501, doi:10.1074/jbc.M300945200 (2003).
- 362 Klose, C. *et al.* Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *British journal of pharmacology* **162**, 1757-1769, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01186.x (2011).
- 363 Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V. & Bonkhoff, H. Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* **22**, 7858-7861, doi:10.1038/sj.onc.1206895 (2003).
- 364 Bolanz, K. A., Hediger, M. A. & Landowski, C. P. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Molecular cancer therapeutics* **7**, 271-279, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0478 (2008).
- 365 Dhennin-Duthille, I. *et al.* High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **28**, 813-822, doi:10.1159/000335795 (2011).
- 366 Varnai, P., Hunyady, L. & Balla, T. STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends in pharmacological sciences* **30**, 118-128, doi:10.1016/j.tips.2008.11.005 (2009).
- 367 Bergmeier, W., Weidinger, C., Zee, I. & Feske, S. Emerging roles of store-operated Ca(2+)(+) entry through STIM and ORAI proteins in immunity, hemostasis and cancer. *Channels* **7**, 379-391, doi:10.4161/chan.24302 (2013).
- 368 Gao, Y. D., Hanley, P. J., Rinne, S., Zuzarte, M. & Daut, J. 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* **48**, 19-27, doi:10.1016/j.ceca.2010.06.002 (2010).
- 369 Thastrup, O. *et al.* Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents and actions* **27**, 17-23 (1989).
- 370 Funabashi, K. *et al.* Accelerated Ca<sup>2+</sup> entry by membrane hyperpolarization due to Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activation in response to histamine in chondrocytes. *American journal of physiology. Cell physiology* **298**, C786-797, doi:10.1152/ajpcell.00469.2009 (2010).

- 371 Strobl, J. S., Melkounian, Z., Peterson, V. A. & Hylton, H. The cell death response to gamma-radiation in MCF-7 cells is enhanced by a neuroleptic drug, pimozone. *Breast cancer research and treatment* **51**, 83-95 (1998).
- 372 Bertolesi, G. E. *et al.* The Ca(2+) channel antagonists mibefradil and pimozone inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Molecular pharmacology* **62**, 210-219 (2002).
- 373 Logue, S. E., Elgendy, M. & Martin, S. J. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nature protocols* **4**, 1383-1395, doi:10.1038/nprot.2009.143 (2009).
- 374 Carey, M. P. & Burish, T. G. Etiology and treatment of the psychological side effects associated with cancer chemotherapy: a critical review and discussion. *Psychological bulletin* **104**, 307-325 (1988).
- 375 Lerman, C. *et al.* Effects of coping style and relaxation on cancer chemotherapy side effects and emotional responses. *Cancer nursing* **13**, 308-315 (1990).
- 376 O'Shaughnessy, J. *et al.* Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 2812-2823 (2002).
- 377 Castedo, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825-2837, doi:10.1038/sj.onc.1207528 (2004).
- 378 Plummer, H. K., 3rd, Yu, Q., Cakir, Y. & Schuller, H. M. Expression of inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) and beta-adrenergic regulation of breast cancer cell lines. *BMC cancer* **4**, 93, doi:10.1186/1471-2407-4-93 (2004).
- 379 Li, Y., Hively, W. P. & Varmus, H. E. Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. *Oncogene* **19**, 1002-1009, doi:10.1038/sj.onc.1203273 (2000).
- 380 Howe, L. R. & Brown, A. M. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer biology & therapy* **3**, 36-41 (2004).
- 381 Wulff, H. C. Y. T. L. H. D. O. D. M. G. C. in *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* Vol. 21.5 A538-A539 (2007).
- 382 Grgic, I. *et al.* Selective blockade of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 704-709, doi:10.1161/01.ATV.0000156399.12787.5c (2005).
- 383 Huang, X., Bennett, M. & Thorpe, P. E. A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice. *Cancer research* **65**, 4408-4416, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0031 (2005).
- 384 Ginestier, C. *et al.* CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *The Journal of clinical investigation* **120**, 485-497, doi:10.1172/JCI39397 (2010).
- 385 Albin, A. & Sporn, M. B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature reviews. Cancer* **7**, 139-147, doi:10.1038/nrc2067 (2007).
- 386 Liu, X., Chang, Y., Reinhart, P. H., Sontheimer, H. & Chang, Y. Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 1840-1849 (2002).
- 387 Brevet, M. *et al.* Expression of K<sup>+</sup> channels in normal and cancerous human breast. *Histology and histopathology* **23**, 965-972 (2008).
- 388 Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Le Guennec, J. Y. & Besson, P. Description and role in proliferation of iberiotoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells. *Biochimica et biophysica acta* **1667**, 190-199, doi:10.1016/j.bbame.2004.10.002 (2004).
- 389 Tsai, F. M., Shyu, R. Y. & Jiang, S. Y. RIG1 inhibits the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by suppressing the activation of Ras. *Cellular signalling* **18**, 349-358, doi:10.1016/j.cellsig.2005.05.005 (2006).
- 390 Roy, U. K., Rial, N. S., Kachel, K. L. & Gerner, E. W. Activated K-RAS increases polyamine uptake in human colon cancer cells through modulation of caveolar endocytosis. *Molecular carcinogenesis* **47**, 538-553, doi:10.1002/mc.20414 (2008).
- 391 Bode, A. M. & Dong, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* **4**, 793-805, doi:10.1038/nrc1455 (2004).
- 392 Hasan, N. M., Adams, G. E. & Joiner, M. C. Effect of serum starvation on expression and phosphorylation of PKC-alpha and p53 in V79 cells: implications for cell death. *International journal of cancer* **80**, 400-405 (1999).
- 393 Sheehan, J. J., Benedetti, B. L. & Barth, A. L. Anticonvulsant effects of the BK-channel antagonist paxilline. *Epilepsia* **50**, 711-720, doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01888.x (2009).
- 394 Nieves-Cintrón, M., Amberg, G. C., Nichols, C. B., Molkentin, J. D. & Santana, L. F. Activation of NFATc3 down-regulates the beta1 subunit of large conductance, calcium-activated K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle and contributes to hypertension. *The Journal of biological chemistry* **282**, 3231-3240, doi:10.1074/jbc.M608822200 (2007).

- 395 Wolfer, D. P., Crusio, W. E. & Lipp, H. P. Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends in neurosciences* **25**, 336-340 (2002).
- 396 Doetschman, T. Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods in molecular biology* **530**, 423-433, doi:10.1007/978-1-59745-471-1\_23 (2009).
- 397 Yang, T. *et al.* Influence of genetic background and gender on hypertension and renal failure in COX-2-deficient mice. *American journal of physiology. Renal physiology* **288**, F1125-1132, doi:10.1152/ajprenal.00219.2004 (2005).
- 398 Wagner, K. U. *et al.* Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic research* **10**, 545-553 (2001).
- 399 Willson, J. E., Brown, D. E. & Timmens, E. K. A Toxicologic Study of Dimethyl Sulfoxide. *Toxicology and applied pharmacology* **7**, 104-112 (1965).
- 400 Caujolle, F. M., Caujolle, D. H., Cros, S. B. & Calvet, M. M. Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York Academy of Sciences* **141**, 110-126 (1967).
- 401 Smith, E. R., Hadidian, Z. & Mason, M. M. The single--and repeated--dose toxicity of dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York Academy of Sciences* **141**, 96-109 (1967).
- 402 Castro, C. A., Hogan, J. B., Benson, K. A., Shehata, C. W. & Landauer, M. R. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **50**, 521-526 (1995).
- 403 Reiche, E. M., Nunes, S. O. & Morimoto, H. K. Stress, depression, the immune system, and cancer. *The Lancet. Oncology* **5**, 617-625, doi:10.1016/S1470-2045(04)01597-9 (2004).
- 404 Chida, Y., Hamer, M., Wardle, J. & Steptoe, A. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nature clinical practice. Oncology* **5**, 466-475, doi:10.1038/nponc1134 (2008).
- 405 Holden, R. J., Pakula, I. S. & Mooney, P. A. An immunological model connecting the pathogenesis of stress, depression and carcinoma. *Medical hypotheses* **51**, 309-314 (1998).
- 406 Welslau, M. *et al.* Patient-reported outcomes from EMILIA, a randomized phase 3 study of trastuzumab emtansine (T-DM1) versus capecitabine and lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Cancer* **120**, 642-651, doi:10.1002/cncr.28465 (2014).
- 407 Alvarez, J., Montero, M. & Garcia-Sancho, J. High affinity inhibition of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels by cytochrome P-450 inhibitors. *The Journal of biological chemistry* **267**, 11789-11793 (1992).
- 408 Rauer, H. *et al.* Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1201-1208 (2000).
- 409 Knaus, H. G. *et al.* Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cellular signalling* **6**, 861-870 (1994).
- 410 Knaus, H. G. *et al.* Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* **33**, 5819-5828 (1994).
- 411 Sanchez, M. & McManus, O. B. Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* **35**, 963-968 (1996).
- 412 Giangiacomo, K. M., Garcia, M. L. & McManus, O. B. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* **31**, 6719-6727 (1992).
- 413 Candia, S., Garcia, M. L. & Latorre, R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel. *Biophysical journal* **63**, 583-590, doi:10.1016/S0006-3495(92)81630-2 (1992).
- 414 Gribkoff, V. K. *et al.* Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels. *Molecular pharmacology* **50**, 206-217 (1996).
- 415 Geiss, G. K. *et al.* Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature biotechnology* **26**, 317-325, doi:10.1038/nbt1385 (2008).



## Abkürzungsverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Calciumkonzentration
1-EBIO	1-Ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-on
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
A	Ampère
AIF	Apoptose-induzierender Faktor ( <i>apoptosis inducing factor</i> )
Akt	<i>AK transforming factor</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor</i>
AVD	apoptotische Volumenreduktion ( <i>apoptotic volume decrease</i> )
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BK	Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit ( <i>calcium activated potassium channel with big conductance</i> )
B16	C57Bl/6
bp	Basenpaare
BRCA	Brustkrebs-Gene ( <i>breast cancer genes</i> )
BSM	Bronchiale Glattmuskulatur ( <i>bronchial smooth muscle</i> )
BTP2	Bis(trifluoromethyl)pyrazol
C(t)	<i>Cycle threshold</i>
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin abhängige Kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclinabhängige Kinase ( <i>cyclin dependent kinase</i> )
cGK	Proteinkinase C
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
ChTx	Charybdotoxin
CK	Cytokeratin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRAC	<i>Ca<sup>2+</sup> release-activated calcium channels</i>
CYP450	Cytochrom-P-450 Enzyme
DAB	Diaminobenzidin
DCEBIO	5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazole-2-on
DIABLO	<i>Direct IAP binding protein with low PI</i>
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex ( <i>Death inducing signaling complex</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxy ribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ER	Estrogenrezeptor

ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
F	Vorwärtsprimer ( <i>forward primer</i> )
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne ( <i>Fas-associated protein with death domain</i> )
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FasL	Fas-Ligand
FIK	IK-Kanal in Fibroblasten
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FURA-2-AM	FURA-2-Acetoxymethylester
FVB	<i>Friend Virus B</i>
GAP	GTPase-aktivierende Proteine ( <i>GTPase activating proteins</i> )
gBK	Gliom BK-Kanal
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor ( <i>guanosine triphosphate exchange factor</i> )
GIRK	G-Protein-aktivierte einwärts-rektifizierende Kaliumkanäle
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon/Gonadotropin ( <i>Gonadotropin-releasing hormone</i> )
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
Hb	Hämoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom ( <i>hepatocellular carcinoma</i> )
HE	Hämatoxyllin-Eosin
HER-2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 ( <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
hERG	<i>Human ether-a-go-go-related gene</i>
HET	heterozygot
i.p.	intraperitoneal
IbTx	Iberiotoxin
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor ( <i>insulin-like growth factor</i> )
IK	Calcium-aktiverter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit ( <i>calcium activated potassium channel with intermediate conductance</i> )
K <sub>2P</sub>	Zwei-Poren Kaliumkanäle ( <i>two-pore potassium channels</i> )
K <sub>ATP</sub>	ATP-abhängige Kaliumkanäle ( <i>ATP-sensitive potassium channels</i> )
K <sub>Ca</sub>	Calcium-aktivierte Kaliumkanäle ( <i>calcium-sensitive potassium channels</i> )
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>ir</sub>	einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle ( <i>inward rectifier potassium channels</i> )
K <sub>v</sub>	spannungsabhängige Kaliumkanäle ( <i>voltage-sensitive potassium channels</i> )
KO	Knockout
LRRC	<i>leucine-rich repeat-containing</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MEK	<i>mitogen extracellular signal kinase</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMTV	Mausmammatumovirus ( <i>mouse mammary tumour virus</i> )
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
neg	negativ
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>

NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
nM	nanomolar
nm	Nanometer
Noxa	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NSAR	Nicht-steroidales Antirheumatikum
PAX	Paxilline
PAX	Paxilline
PBS	Phosphate-gepufferte Lösung ( <i>phosphate buffered solution</i> )
pCaMK	phosphorylierte Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PGD	Porendomäne ( <i>pore gate domain</i> )
PI	Propidiumiodid
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
pos	positiv
PR	Progesteronrezeptor
pRb	Retinoblastom-Protein
pS	picoSiemens
PS	Phosphatidylserin
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PUMA	<i>Bcl-2 binding component 3</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PyMT	<i>Polyoma Virus Middle T Antigene</i>
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion ( <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> )
R	Rückwärtsprimer ( <i>reverse primer</i> )
Raf	<i>Receptor activation factor</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
RCK	Regulatorische Domäne für die Kaliumleitfähigkeit ( <i>regulator of conductance of potassium</i> )
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Reverse Transkriptase
RTCA	<i>Real Time Cell Analyser</i>
sAHP	langsame Nachhyperpolarisation ( <i>slow afterhyperpolarisation</i> )
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator ( <i>selective estrogen receptor modulator</i> )
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure ( <i>small interfering ribonucleic acid</i> )
SK	Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit ( <i>calcium activated potassium channel with small conductance</i> )
SK4	Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit ( <i>calcium activated potassium channel with intermediate conductance</i> )
SMAC	<i>Second mitochondrial activator of caspases</i>
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SOS	<i>Mammalian homologue of the son of sevenless</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmemhemmer ( <i>selective serotonin reuptake inhibitors</i> )
STS	Staurosporin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure

---

TdT	<i>terminal desoxynucleotidyl transferase</i>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>tumour growth factor</i> )
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TNM	Tumorklassifizierungssystem (Tumor, Lymphknoten, Metastasierung) ( <i>tumour node metastasis</i> )
TNP	Dreifach negativer Phänotyp ( <i>triple-negative phenotype</i> )
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAM-34	
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPV6	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V type 6</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling</i>
V	Volt
VSD	Spannungssensitive Domäne ( <i>voltage sensor domain</i> )
WT	Wildtyp
ZI	Zellindex
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µM	mikromolar
IgE	Immunglobulin E
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
JNK	c-jun-terminale Kinasen

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Darstellung des IK-Kanals .....	7
Abb. 1.2 Schematische Darstellung der $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals .....	10
Abb. 1.3 Charakteristische erworbene Fähigkeiten von Tumorzellen ( <i>Hallmarks of Cancer</i> ) .....	14
Abb. 1.4 Potentielle Einflüsse von Kaliumkanälen auf tumorspezifische Prozesse und mögliche Folgen .....	14
Abb. 1.5 Kaliumkanal-vermittelte Regulationsmöglichkeiten der Zellproliferation .....	19
Abb. 1.6 Kaliumkanal-vermittelte Regulationsmöglichkeiten der Apoptose .....	23
Abb. 1.7 HER-abhängige Signalkaskaden bei Tumoren .....	30
Abb. 4.1 Verpaarungsschema der Rückzucht .....	54
Abb. 4.2 Genotypisierung und Identifizierung der Versuchstiere mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	58
Abb. 4.3 Koordinatensystem der Grid-Platten .....	69
Abb. 4.4 Zeitverlauf der Wachstumsuntersuchungen mittels Grid-Platten .....	70
Abb. 4.5 Ungefärbte und PI-gefärbte Zellen zur Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten Zellzyklusanalyse .....	72
Abb. 4.6 TUNEL-Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellkerne von MMTV-PyMT Brusttumorzellen .....	76
Abb. 4.7 Zeitverlauf der Messung akuter Calciumsignale .....	84
Abb. 4.8 Zeitverlauf der Messung spontaner Calciumsignale .....	84
Abb. 5.1 mRNA-Expression von $K_{Ca}$ -Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen und -gewebe .....	85
Abb. 5.2 Expressionsanalyse von IK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen und -gewebe .....	87
Abb. 5.3 Funktionale Charakterisierung von IK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen mittels Patch- Clamp-Technik .....	89
Abb. 5.4 Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 .....	91
Abb. 5.5 Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen nach genetischer Ablation des IK-Kanals .....	91
Abb. 5.6 Einfluss der pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 auf die mRNA-Expression bestimmter Zellzyklusmarker .....	93
Abb. 5.7 Zellzyklusanalyse von MMTV-PyMT Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mittels PI-basierter Durchflusszytometrie .....	94
Abb. 5.8 Einfluss der genetischen Ablation des IK-Kanals auf die mRNA Expression bestimmter Zellzyklusmarker .....	95
Abb. 5.9 Einfluss der pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals auf das apoptotische Verhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen .....	97
Abb. 5.10 Einfluss der IK-Kanalaktivität auf akute $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von MMTV-PyMT Brusttumorzellen .....	99
Abb. 5.11 Einfluss der IK-Kanalaktivität auf spontane $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in MMTV-PyMT Brusttumorzellen .....	101
Abb. 5.12 Einfluss der pharmakologischen IK-Kanal-inhibition auf das Ansprechen von MMTV-PyMT Brusttumorzellen auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel .....	103
Abb. 5.13 Einfluss der genetischen IK-Kanal-ablation auf das Ansprechen von MMTV-PyMT Brusttumorzellen auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel .....	104
Abb. 5.14 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) und MMTV-PyMT Tiere (FVB > 98%) .....	106
Abb. 5.15 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT IK-WT Tiere und MMTV-PyMT IK-KO Tiere .....	107
Abb. 5.16 Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach orthotoper Allotransplantation von MMTV-PyMT IK-WT bzw. IK-KO Brusttumorzellen in FVB/N Wildtyp-Tiere .....	108

Abb. 5.17 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-cNeu IK-WT Tiere und MMTV-cNeu IK-KO Tiere .....	109
Abb. 5.18 Expressionsanalyse von BK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen und -gewebe .....	112
Abb. 5.19 Funktionale Charakterisierung von BK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen mittels Patch-Clamp-Technik ( <i>whole cell configuration</i> ) .....	114
Abb. 5.20 Funktionale Charakterisierung von BK-Kanälen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen mittels Patch-Clamp-Technik ( <i>cell attached configuration</i> ) .....	115
Abb. 5.21 Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen nach genetischer Ablation des BK-Kanals .....	116
Abb. 5.22 Expressionsanalyse der Isoformen des Onkogenes Ras in MMTV-PyMT Brusttumorgewebe und -zellen .....	118
Abb. 5.23 Expressionsanalyse des Tumorsuppressorgens p53 in MMTV-PyMT BK-WT und BK-KO Proben .....	119
Abb. 5.24 Einfluss der genetischen Ablation des BK-Kanals auf die mRNA Expression bestimmter Zellzyklusmarker .....	120
Abb. 5.25 Einfluss der BK-Kanalexpression auf das apoptotische Verhalten von MMTV-PyMT Brusttumorzellen.....	121
Abb. 5.26 Einfluss der genetischen BK-Kanalablation auf das Ansprechen von MMTV-PyMT Brusttumorzellen auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Docetaxel .....	122
Abb. 5.27 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT Tiere (FVB 100%) und MMTV-PyMT Tiere (FVB > 98%) .....	124
Abb. 5.28 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT BK-WT Tiere und MMTV-PyMT BK-KO Tiere.....	125
Abb. 5.29 Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach orthotoper Allotransplantation von MMTV-PyMT BK-WT bzw. BK-KO Brusttumorzellen in FVB/N Wildtypiere Tiere.....	126
Abb. 5.30 Kaplan-Meier-Überlebenskurven für MMTV-PyMT Tiere nach der Behandlung mit dem spezifischen BK-Kanalinhibitor Paxilline .....	128
Abb. 5.31 Pharmakokinetische Charakterisierung von Paxilline mithilfe des Gitter- und Gangtests.....	129
Abb. 7.1 Wachstumsverhalten von MMTV-cNeu Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 (Grid-Platten) .....	160
Abb. 7.2 Wachstumsverhalten von MMTV-cNeu Brusttumorzellen nach pharmakologischer Inhibition des IK-Kanals mit TRAM-34 (xCelligence).....	161
Abb. 7.3 Einfluss der IK-Kanalaktivität auf akute $[Ca^{2+}]_i$ -Signale von MMTV-cNeu Brusttumorzellen .....	162
Abb. 7.4 Tatsächliche Verteilung der Nachkommen aus der Verpaarung von MMTV-PyMT BK-HET Männchen mit BK-HET Weibchen .....	163

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Klassifizierung des Mammakarzinoms .....	3
Tabelle 3.1 Stadieneinteilung der Brusttumore von MMTV-PyMT Mäusen .....	34
Tabelle 4.1 Pipettierschemata zur DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	57
Tabelle 4.2 Scoring des Gittertests .....	60
Tabelle 4.3 Scoring des Gangtests .....	61
Tabelle 4.4 Verwendete Zellkulturgefäße .....	63
Tabelle 4.5 Pipettierschema zum Umschreiben von RNA in cDNA mit Reverser Transkriptase .....	67
Tabelle 4.6 Pipettierschema für die qRT-PCR (Mastermix) .....	68
Tabelle 4.7 Programm der qRT-PCR .....	68
Tabelle 4.8 Verwendete Primär- und Sekundäntikörper zur immunhistochemischen Färbung .....	74
Tabelle 4.9 Pipettierschema für die BSA-Standardkurve zur Proteinbestimmung nach Lowry .....	79
Tabelle 4.10 Konzentrationen der verwendeten Primär- und Sekundäntikörper für die Western Blot-Analyse .....	82
Tabelle 7.1 Zugelassene Wirkstoffe zur Behandlung des Mammakarzinoms .....	155
Tabelle 7.2 Nicht-peptidische Inhibitoren für IK-Kanäle .....	156
Tabelle 7.3 Peptidische Inhibitoren für IK-Kanäle .....	156
Tabelle 7.4 Nicht-peptidische Inhibitoren für BK-Kanäle .....	157
Tabelle 7.5 Peptidische Inhibitoren für BK-Kanäle .....	157
Tabelle 7.6 mRNA-Expression verschiedener Zielstrukturen im MMTV-PyMT Brusttumorgewebe .....	157
Tabelle 7.7 Statistische Verteilung der erwarteten Nachkommen nach Mendel .....	163



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2012 bis September 2016 unter wissenschaftlicher Anleitung von JProf. Dr. Robert Lukowski und Prof. Dr. Peter Ruth am Institut für Pharmazie in der Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen erstellt.

Herrn JProf. Dr. Robert Lukowski möchte ich für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie die hervorragende Betreuung während meiner Dissertation danken. Unsere vielen Diskussionen haben mich immer weitergebracht. Herzlichen Dank für Deine Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Peter Ruth danke ich ebenfalls für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Es war mir eine große Freude, bei Ihnen promovieren zu dürfen.

Ein besonders großer Dank gilt allen meinen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises Ruth/Lukowski. Liebe Angelina, Anne, Christina, Corinna, , Julia S., Julia I., Lena, Rebekka, Sandra und lieber Markus - um Euch gebührend zu danken, müsste ich vermutlich eine Dankesrede im Umfang einer Doktorarbeit verfassen.

Bei Benjamin möchte ich mich für die Patch-Clamp-Analyse meiner Zellen bedanken. Auch danke ich allen meinen Praktikanten, die mich während meiner Arbeit tatkräftig im Labor unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön geht natürlich auch an unsere Assistenten im Labor, Michael, Kathrin, Isolde und Clément sowie Loni für die Tierstallararbeit. Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Arbeitskreise Schultz und Drews für die schöne Zeit auf der 7. Ebene.

Auf diesem Wege möchte ich mich auch bei der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Unterstützung während meiner Promotion bedanken. Es war eine herausragende Zeit.

Zum Schluss gilt mein größter Dank meinen Eltern und meinem Bruder und natürlich Andreas. Es lässt sich nicht in Worte fassen, wie sehr ich für Eure Unterstützung dankbar bin und wie froh ich bin, dass es Euch gibt.