

Calciumabhängige Kaliumkanäle mit mittlerer Leitfähigkeit (IK) modulieren den Metabolismus von Brustkrebszellen einschließlich der AMPK-gesteuerten Autophagie

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dominic Groß

aus Überlingen

Tübingen

2023

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

Tag der mündlichen Qualifikation: 15.06.2023

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Robert Lukowski

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Entstehung und Charakteristika von Tumoren.....	1
1.1.1 Proliferation und Metastasierung	2
1.1.2 Metabolismus und Energiehomöostase in Tumoren	4
1.1.2.1 Glykolyse und Warburg Effekt.....	4
1.1.2.2 Oxidative Phosphorylierung.....	5
1.1.2.3 Autophagie und AMPK.....	8
1.2 Das Mammakarzinom.....	15
1.2.1 Ätiologie und Epidemiologie.....	15
1.2.2 Klassifizierung und Therapie.....	17
1.2.3 Herausforderungen und neue Therapieansätze	18
1.3 Kaliumkanäle	19
1.3.1 Ca ²⁺ -aktivierte K ⁺ -Kanäle	20
1.3.2 Der Ca ²⁺ -aktivierte K ⁺ -Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit (IK).....	21
1.3.2.1 Struktureller Aufbau und Funktionen von IK.....	21
1.3.2.2 Distribution und Pathophysiologie	23
1.3.2.3 Bedeutung des IKs für die Krebsentstehung und Progression	24
1.3.2.4 Auswirkungen des IK-Kanals auf den Energie-Metabolismus in Tumorzellen.....	27
1.3.2.5 IK Modulatoren.....	28
2 ZIELSETZUNG	30
3 MATERIAL	31
3.1 Mauslinien	31
3.2 Geräte und Software.....	31
3.3 Generelles Verbrauchsmaterial	33
3.4 Substanzen, Puffer, Lösungen und Medien.....	34
3.4.1 Genotypisierung.....	34
3.4.1.1 DNA-Isolation und Amplifikation	34
3.4.1.2 Gelelektrophorese	35
3.4.2 <i>In vivo</i> Methoden.....	36
3.4.3 Zellkultur	36
3.4.3.1 Primärzellgewinnung.....	39
3.4.4 RNA-Analytik	39
3.4.5 Proliferationsanalysen.....	40
3.4.6 Migrations- und Invasionsanalysen.....	40
3.4.7 Histologische Methoden.....	41
3.4.8 Biochemische Methoden.....	43
3.4.8.1 BCA-Proteinbestimmung.....	44
3.4.8.2 Proteingewinnung.....	45
3.4.8.3 Gelelektrophorese	45
3.4.8.4 Western Blot.....	46
3.4.9 Plasmid-Generierung	47
3.4.10 Fluoreszenzbasiertes-Imaging.....	49
3.4.10.1 Analysenpuffer und Sensoren	50
3.4.10.2 Transfektionen.....	52
3.4.10.3 Calcium Messungen (FURA-2).....	52
3.4.10.4 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials.....	52
3.4.10.5 Glukose Aufnahme	53
3.4.11 Extrazellulärer Flux Messungen (Seahorse).....	53

4	METHODEN	55
4.1	Mausmodelle	55
4.1.1	Tierhaltung und Verpaarung	56
4.1.2	Genotypisierung	57
4.1.2.1	DNA-Isolation aus Ohrlochstanzen	57
4.1.2.2	Polymerase Kettenreaktion	58
4.1.2.3	Gelelektrophorese und Detektion	59
4.1.3	Palpation und Wachstumskontrolle der Brusttumoren <i>in vivo</i>	59
4.1.4	Tumor- und Organentnahme	60
4.2	Zellkultur	61
4.2.1	In Kulturnahme von MMTV-PyMT Zellen	62
4.2.2	Mediumwechsel und Passagieren	62
4.2.3	Kryokonservierung und Auftauen	63
4.3	RNA Analytik	64
4.3.1	RNA Isolation	64
4.3.2	cDNA Synthese	64
4.3.3	qRT-PCR und Gelelektrophorese	65
4.4	Wachstumsversuche und Chemotherapie	67
4.4.1	Untersuchung des Wachstumsverhalten mittels Grid-Platten	67
4.4.2	Untersuchung des Wachstumsverhaltens mittels Ki-67	68
4.4.3	Wachstumsverhalten unter Chemotherapie	68
4.5	Migrations- und Invasionsversuche	69
4.5.1	Untersuchung des Migrationsverhalten mittels Scratch-Assay	69
4.5.2	Untersuchung des Migrationsverhalten mittels Boyden-Kammer Assay	70
4.5.3	Untersuchung des Invasionsverhalten mittels Boyden-Kammer Assay	70
4.6	Histologische Methoden	71
4.6.1	Herstellung der Gewebeschnitte	71
4.6.2	HE-Färbung	71
4.6.3	Immunfluoreszenz Färbung	72
4.7	Biochemische Methoden	73
4.7.1	BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung	73
4.7.2	Zellyse und Proteinisolierung	74
4.7.3	Proteinbestimmung nach Bradford	74
4.7.4	Western Blot	74
4.7.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	74
4.7.4.2	Transfer via „semi dry“ Western Blot	75
4.7.4.3	Detektion und Analyse	76
4.8	Klonierung	76
4.8.1	Transformation und Kolonie-PCR	77
4.8.2	Mini-Präparation	78
4.8.3	Maxi-Präparation	78
4.8.4	Sequenzierung	79
4.9	Fluoreszenzbasiertes Imaging	79
4.9.1	Transfektion	79
4.9.2	FRET-basierte Fluoreszenz-Messungen	80
4.9.3	Calcium-Imaging mittels FURA-2	82
4.9.4	Mitochondrielle Membranpotenzial-Messungen mittels TMRM	82
4.9.5	Glukose-Aufnahme mittels 2-NBDG	83
4.10	MTT	83
4.11	Extrazelluläre Flux-Messungen (Seahorse)	84
4.12	Statistik	85

5	ERGEBNISSE	86
5.1	Einfluss des IK-Kanals auf die Brustkrebsentwicklung und das Überleben	86
5.1.1	Auswirkungen des IK-Status auf das Überleben und die Metastasierung <i>in vivo</i>	86
5.1.2	IK-Kanäle modulieren das Wachstum von isolierten MMTV-PyMT Tumorzellen	88
5.1.3	Rolle des IKs für die Migration und Invasion von MMTV-PyMT Tumorzellen <i>in vitro</i>	90
5.2	IK-abhängige Beeinflussung des Brustkrebs-Metabolismus.....	92
5.2.1	Modulation der glykolytischen Aktivität durch den IK-Kanal.....	92
5.2.2	Funktionelle Expression des IK-Kanals erhöht intrazelluläre Laktat- und Pyruvat-Level	94
5.2.3	Genetische Ablation des IKs verringert die zelluläre Glukoseaufnahme <i>in vitro</i>	96
5.2.4	IK-Depletion moduliert multiple Parameter der mitochondrialen Bioenergetik	97
5.2.5	Abwesenheit des IK-Kanals reduziert das mitochondrielle Membranpotenzial	99
5.2.6	Untersuchung der mitochondrialen und cytosolischen ATP-Level in IK-profizienten und -defizienten MMTV-PyMT Tumorzellen	100
5.3	Einfluss des IK-Kanals auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Homöostase in MMTV-PyMT Tumorzellen.....	103
5.3.1	IK-abhängige Modulation der cytosolischen und mitochondrialen Ca ²⁺ -Homöostase	103
5.3.2	IK moduliert die zelluläre Ca ²⁺ -Speicherkapazität in MMTV-PyMT Zellen	105
5.3.3	IK beeinflusst die subzelluläre K ⁺ -Homöostase	107
5.4	Effekt der IK-Kanalaktivität auf die AMPK.....	110
5.4.1	IK-Depletion steigert die AMPK-Aktivität.....	110
5.4.2	Ca ²⁺ -abhängige Aktivierung der AMPK in MMTV-PyMT Tumorzellen	111
5.4.3	Einfluss der AMPK Aktivität auf den Metabolismus IK-profizienter und -defizienter MMTV PyMT Brusttumorzellen	116
5.5	Zusammenhang zwischen IK und Autophagie Signalwegen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen.....	118
5.5.1	Gesteigerte Autophagiemarker-Aktivität in IK-depletierten Brustkrebszellen	118
5.5.1.1	IK beeinflusst pULK1/ULK1-, LC3B- und p62-Status in MMTV-PyMT Brusttumorzellen.....	119
5.5.2	Einfluss des IK-Kanals auf den AKT- und mTORC1-Signalweg	123
5.5.3	Einfluss von Zytostatika auf die Autophagie und das Proliferationsverhalten von MMTV-PyMT WT und IK KO-Zellen	123
6	DISKUSSION	126
6.1	Einfluss des IK-Kanals auf den Metabolismus von Brusttumoren im MMTV-PyMT Modell	126
6.1.1	Relevanz des IK-Kanals für die Glykolyse	127
6.1.2	IK-abhängige Regulation der oxidativen Phosphorylierung	128
6.1.3	IK als Effektor der Ca ²⁺ -Homöostase.....	129
6.1.4	Einfluss des IKs auf die ATP-Konzentration	131
6.2	IK-abhängige Regulation der AMPK-Aktivität	133
6.2.1	Bedeutung der Ca ²⁺ -Homöostase für die AMPK-Aktivität	133
6.2.2	Einfluss des Metabolismus auf die IK-abhängige AMPK-Aktivität.....	134
6.3	IK-vermittelte kompensatorische Aktivierung der Autophagie via AMPK.....	135
6.4	Einfluss des IK-Kanals auf die Proliferation und Migration von Brustkrebszellen	136
6.4.1	Anti-migrative Effekte der IK-Depletion in MMTV-PyMT Brustkrebszellen.....	137
6.5	Limitation der Arbeit und Ausblick	138
7	ZUSAMMENFASSUNG	141
8	LITERATURVERZEICHNIS	144
9	ANHANG	167
9.1	Ergänzende Experimente in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen	167
9.2	Ergänzende Experimente in MMTV-PyMT WT- und BK KO-Zellen	177
	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	187
	DANKSAGUNG	189

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Energiegewinnung einer eukaryotischen Zelle und Interventionsstrategien.	7
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Autophagie.....	12
Abbildung 1.3: Potentielle Einflüsse von K ⁺ -Kanälen auf tumorspezifische Prozesse und die Energiehomöostase	20
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des IK-Kanals.....	22
Abbildung 4.1: Verpaarungsschema zur Generierung der MMTV-PyMT WT und IK KO FVB/N Versuchstiere.....	57
Abbildung 4.2: Schema der Ohrlochstanzung und repräsentatives Genotypisierungsergebnis	59
Abbildung 4.3 Validierung der Primärzellkulturen.....	61
Abbildung 4.4: Koordinatensystem der Grid-Platten	67
Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Scratch-Tests	69
Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Boyden-Migrations- und Invasionsassays.....	70
Abbildung 4.7: Schematische Darstellung eines FRET-basierten Biosensors und repräsentative Messergebnisse	80
Abbildung 5.1: <i>In vivo</i> Charakterisierung des Brustkrebsmodelles in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Mäusen.....	87
Abbildung 5.2: Einfluss des IK-Kanals auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Tumorzellen.....	89
Abbildung 5.3: Einfluss des IK-Kanals auf das Migrationsverhalten von MMTV-PyMT Tumorzellen	91
Abbildung 5.4: Einfluss des IK-Kanals auf die extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR)	93
Abbildung 5.5: Einfluss der IK-Ablation auf die Laktatakkumulation in MMTV-PyMT Brusttumorzellen.....	95
Abbildung 5.6: Einfluss der IK-Ablation auf die Pyruvatkonzentration in MMTV-PyMT Tumorzellen	96
Abbildung 5.7: Glukose Aufnahme in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen.....	96
Abbildung 5.8: Einfluss des IK-Kanals auf den oxidativen Sauerstoffverbrauch (OCR) von MMTV-PyMT Tumorzellen.....	98
Abbildung 5.9: Einfluss der IK-Depletion auf das mitochondrielle Membranpotenzial in MMTV-PyMT Tumorzellen	100
Abbildung 5.10: Einfluss des IK-Kanals auf die mitochondrielle- und cytosolische ATP-Produktion in MMTV-PyMT Tumorzellen.....	102
Abbildung 5.11: Auswirkungen des IK-Kanals auf mitochondrielle- und cytosolische Ca ²⁺ Signale in MMTV-PyMT Tumorzellen.....	104
Abbildung 5.12: Einfluss des IK-Kanals auf die cytosolische Ca ²⁺ -Homöostase und Ca ²⁺ -Speicherung in MMTV-PyMT Tumorzellen.....	106
Abbildung 5.13: Einfluss des IK-Kanals auf die mitochondrielle- und cytosolische K ⁺ -Konzentration in MMTV-PyMT Tumorzellen.....	108
Abbildung 5.14: AMPK-Aktivität unter pharmakologischer-, sowie genetischer Inhibition des IK-Kanals in MMTV-PyMT Tumorzellen.....	111
Abbildung 5.15: Einfluss des IK-Kanals auf die Ca ²⁺ -abhängige AMPK Aktivität.....	113
Abbildung 5.16: Simultane Untersuchung des Einflusses von IK auf die Ca ²⁺ -Homöostase und AMPK Aktivität	114
Abbildung 5.17: Expressionsanalyse Ca ²⁺ -abhängiger AMPK Upstream-Kinasen in MMTV-PyMT WT und IK KO-Zellen.....	115
Abbildung 5.18: Metabolischer Einfluss auf die AMPK-Aktivität von MMTV-PyMT Tumorzellen.....	117
Abbildung 5.19: Aktivitäts-Analyse der AMPK Upstream-Kinase LKB1 in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen..	118
Abbildung 5.20: Auswirkungen der IK-Inhibition auf die Autophagie Induktion in MMTV-PyMT Tumorzellen	120
Abbildung 5.21: LC3B-gekoppelte pH Änderungen in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen.....	122
Abbildung 5.22: Expressionsanalyse von p62 in MMTV-PyMT WT und IK KO-Zellen	122
Abbildung 5.23: Einfluss des IK-Kanals auf den AKT- oder mTORC1-Signalweg in MMTV-PyMT Tumorzellen	124
Abbildung 7.1 Übersicht: Konsequenzen der pharmakologischen oder genetischen Inhibition des IK-Kanals auf die Energie-Homöostase von MMTV-PyMT Tumorzellen.....	142
Abbildung 9.1: Einfluss der IK-Kanal-Modulatoren auf die MMTV-PyMT Zell-Viabilität, sowie die transiente IK Kanal Expression.....	167
Abbildung 9.2: Einfluss des IK-Kanals auf das Metastasierungsverhalten in MMTV-PyMT Tumorzellen und Geweben	168
Abbildung 9.3: Auswirkungen des IK-Kanals auf den autophagischen Flux in MMTV-PyMT Tumorzellen	169
Abbildung 9.4: Effekte der IK-Ablation auf die Proteinkinase B (AKT) in MMTV-PyMT Tumorzellen	170
Abbildung 9.5: Auswirkungen der Zytostatika-Therapie auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT WT und IK KO-Zellen	171
Abbildung 9.6: Auswirkungen der Zytostatika-Therapie auf das Wachstumsverhalten von TRAM-34 behandelten MMTV-PyMT WT-Zellen	173
Abbildung 9.7 KCNN4 emiRFP 670 Plasmidkarte.....	176
Abbildung 9.8: Auswirkungen des BK-Kanals auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Tumorzellen.....	177

Abbildung 9.9: Pharmakologische und genetische BK-Inhibition und dessen Auswirkungen auf das Migrations- und Invasionsverhalten von MMTV-PyMT Tumorzellen	178
Abbildung 9.10: Einfluss des BK-Kanals auf das Metastasierungsverhalten in MMTV-PyMT Tumorzellen und Geweben	180
Abbildung 9.11: Effekte der BK-Depletion auf die AMPK Aktivität in MMTV-PyMT Tumorzellen.....	181
Abbildung 9.12: Gleichzeitiger Einfluss des BK-Kanals auf die Calcium-Homöostase und AMPK Aktivität.....	182
Abbildung 9.13: Auswirkungen des BK-Kanals auf den autophagischen Flux in MMTV-PyMT Tumorzellen.....	184
Abbildung 9.14: Auswirkungen der Zytostatika-Therapie auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT WT- und BK KO-Zellen	185

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung des Mammakarzinoms	17
Tabelle 2: Pipettierschema zur Genotypisierung-PCR	58
Tabelle 3: Füllvolumen pro Zellkulturgefäß	63
Tabelle 4: Pipettierschema zum Umschreiben in cDNA.....	65
Tabelle 5: qPCR-Programmzyklen.....	66
Tabelle 6: Antikörperliste für Western Blot Analysen	76
Tabelle 7: Pipettierschema zur Kolonie-PCR.....	78
Tabelle 8: Mikroskopie-Einstellungen pro transfiziertem Plasmid	81

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
[ATP] _{cyto}	Adenosintriphosphat-Konzentration im Cytosol
[ATP] _{mito}	Adenosintriphosphat-Konzentration im Mitochondrium
[Ca ²⁺] _{cyto}	Cytosolische Calcium-Ionenkonzentration
[Ca ²⁺] _{ER}	Calcium- Ionenkonzentration im Endoplasmatischen Retikulum
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration
[Ca ²⁺] _{mito}	Mitochondrielle Calcium- Ionenkonzentration
[K ⁺] _{cyto}	Intrazelluläre / cytosolische Kalium- Ionenkonzentration
[K ⁺] _{mito}	Mitochondrielle Kalium- Ionenkonzentration
°C	Grad Celcius
µm	Mikrometer
2-DG	2-Desoxyglukose
2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-2-Desoxyglucose
A	Ampere
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
AKT _A	AKT-Aktivitäts Antwort der FRET-Sensors AKTAR
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat abhängige Kinase
AMPK _A	AMPK-Aktivitäts Antwort der FRET-Sensors AMPKAR
ANT	<i>engl.</i> Adenine nucleotide translocator, ATP/ADP-Translokase
ATG	<i>engl.</i> autophagy related genes
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Carboxyatractylosid
AUC	Fläche unter der Kurve, <i>engl.</i> Area under the curve
BAPTA-AM	Zellpermeabler Ca ²⁺ -Chelator
Bay 8002	Inhibitor der Monocarboxylat-Transporter
Bcl-2	<i>engl.</i> B-cell lymphoma 2
BECN1	Beclin1
BET	Brusterhaltende Therapie
BK KO	Knockout des BK-Kanals, MMTV-PyMT ^{tg/+} x BK ^{-/-}
BK-Kanal	Spannungs- und Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit, <i>engl.</i> big conductance K ⁺ channel
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, <i>engl.</i> Bovine serum albumin
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion

Ca ²⁺ -bowl	Ca ²⁺ -Bindetasche im BK-Kanal
CaM	Ca ²⁺ -Calmodulin
CaMBD	Ca ²⁺ -Calmodulin Binde Domaine
CaMKK2	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase 2
CaMKK2	Calmodulin abhängige Kinase 2
cAMP	cyclische Adenosinmonophosphat, <i>engl.</i> Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
CHX	Charybdotoxin
Cl ⁻	Chlorid-Ion
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	<i>engl.</i> Cyclization recombination
CREB	<i>engl.</i> cAMP response element-binding protein
Ct	<i>engl.</i> Cycle threshold
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cyt C	Cytochrom-c
d	Tage
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff der DNA
DEPC	Diethylcarbonat/Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DL	Durchlicht
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate Abkürzungsverzeichnis
DTT	Dithiothreitol
EBSS	<i>engl.</i> Earles balanced salt solution
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration/ Dosis
ECAR	<i>engl.</i> Extracellular acidification rate, Extrazelluläre Ansäuerungsrate
ECM	<i>engl.</i> Extracellular matrix, Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, <i>engl.</i> Ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epitheliale-mesenchymale-Transition
ER	endoplasmatische Retikulum
ERK	<i>engl.</i> p42/p44 extracellular signal-regulated kinase
F	Vorwärtsprimer, <i>engl.</i> Forward primer
F-1,6-P	Fruktose 1,6-Bisphosphat
F-6-P	Fruktose-6-Phosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH	Einfach reduzierte FAD
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid Dihydrid, vollständig reduzierte FAD
FCCP	<i>engl.</i> Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FL	Fluoreszenz
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FST	Fine Science Tools GmbH
FURA-2 (-AM)	Fura-2 (-Acetoxymethylester)
FVB/N	<i>engl.</i> Friend leukemia virus B, verwendete Mauslinie
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffionen / Protonen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HER2	Humaner Epidemialer Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HKII	Hexokinase, Isoform II
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration/ Dosis
IF	Immunfluoreszenz
IFN-γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IK KO	Knockout des IK-Kanals, MMTV-PyMT ^{tg/+} x IK ^{-/-}
IK	Calciumabhängiger Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit
IL	Interleukin
IMM	Innere Mitochondrien Membran
IMS	<i>engl.</i> Intermembrane space, Intermembranraum des Mitochondriums
IP3	Inositoltriphosphat
IP3R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
VI	

K _{ATP} -Kanal	ATP-abhängige Kaliumkanal
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kir-Kanal	Einwärts gleichrichtende Kaliumkanal, <i>engl.</i> Inward rectifier
KO	<i>engl.</i> Knockout
l	Liter
L1	Entspricht dem globalen Gen des IK- oder BK-KO, ^{L1/+ = -/+}
LC3	<i>engl.</i> Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LC3B	<i>engl.</i> Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LDH A / B	Laktatdehydrogenase A / B
LKB1	Leberkinase B1
loxP	<i>engl.</i> Locus of X-over P1
M	Molar
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MEK	<i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase
MET	Mesenchymale-epitheliale-Transition
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
min	Minute
mitoBK	Mitochondrieller BK-Kanal
mitoIK	Mitochondrieller IK-Kanal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MMTV	Maus-Mammatumovirus, <i>engl.</i> mouse mammary tumor virus
Mo25	Maus Protein 25
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore
mRNA	Boten-RNA, <i>engl.</i> Messenger RNA
mTOR	<i>engl.</i> Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1 / C2	<i>engl.</i> Mammalian Target of Rapamycin C1 / C2
mTORC1 _A	mTORC1-Aktivitäts Antwort der FRET-Sensors mTORCAR
mV	Millivolt
Na ⁺	Natriumionen
Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase	Natrium-/Kalium-ATPase (Natrium-Kalium-Pumpe)
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NaOH	Natriumhydroxid
NDS	Normaleserum, <i>engl.</i> Normal donkey serum
NEB	New England Biolabs GmbH
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-Terminus	Amino-Terminus
O ₂	Sauerstoff
OCR	<i>engl.</i> Oxygen consumption rate, Sauerstoffverbrauch
OP	Operation
OS	Gesamtüberleben, <i>engl.</i> Overall survival
OxPhos	Oxidative Phosphorylierung
p	Phosphoryliert (in Bezug auf Western Blot Antikörper)
p62	Ubiquitin-Binde Protein p62/ Sequestosom 1
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>engl.</i> Polymerase chain reaction
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PE	Phosphatidylethanolamin, Konjugat der LC3B II
PEP	Phosphoenolpyruvat
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PGD / P	<i>engl.</i> Pore gating domain, Porenregion
pH	Potential des Wasserstoffs
Pi	Anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pS	Picosiemens
PVDF	Polyvinylidendifluorid

p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PyMT	Polyomavirus middle T antigen
Q	Ubichinon
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR, <i>engl.</i> Real-time quantitative PCR
R	Rückwärtsprimer, <i>engl.</i> Reverse primer
RAF	<i>engl.</i> Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	<i>engl.</i> Rat sarcoma
RCK	<i>engl.</i> Regulator of conductance of K ⁺
RHEB	<i>engl.</i> Ras homolog enriched in brain, mTOR Aktivator
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>engl.</i> Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Thyrosinkinase
s	Sekunde
s/sec	Sekunde
S1	Schutzstufe 1
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, <i>engl.</i> SDS polyacryl-amide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler, <i>engl.</i> Standard error of the mean
Ser	Serin
SGLT	Natrium/Glukose-Cotransporter, <i>engl.</i> Sodium/glucose cotransporter
SK-Kanal	<i>engl.</i> Small conductance calcium-activated potassium channel
SPF	Spezifiziert Pathogen-frei
STRAD	<i>engl.</i> STE20-related kinase adaptor
T	Zeitpunkt
TBE	Tris-Borat-EDTA Abkürzungsverzeichnis
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFS	Tumorfrees Überleben
tg	Transgen
TGFβ1	<i>engl.</i> Transforming growth factor-β1
Thr	Threonin
TM	bzw. TMD Transmembrandomäne
TME	<i>engl.</i> tumor microenvironment (Direkte Umgebung des Tumors)
TNBC	<i>engl.</i> triple negative breast tumors, Triple negative Brusttumor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNM	<i>engl.</i> Tumor-Node-Metastasis, Tumor-Knoten-Metastasen
TRAM-34	Triarylmethane-34, IK-Inhibitor
TSC 1/2	Tuberöse Sklerose Proteine 1/2
tw.	Teilweise
U	Umdrehungen
UICC	<i>franz.</i> Union for international cancer, Tumor-Grading
ULK 1/2	<i>engl.</i> Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
v. a.	Vor allem
V-ATPase	<i>engl.</i> vacuolar-type H ⁺ -ATPase
VE-Wasser	Voll entsalztes Wasser
VSD	<i>engl.</i> Voltage sensor domain, Spannungssensitiver Abschnitt
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation; <i>engl.</i> World Health Organization
WT	Wildtyp, MMTV-PyMT ^{tg/+} × IK ^{+/+}
YFP	<i>engl.</i> Yellow fluorescent protein, Gelb fluoreszierendes Protein
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil
ΔΨ	Transmembranpotential
ΔΨ _{mito}	Mitochondrielles Membranpotential
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Entstehung und Charakteristika von Tumoren

Im Allgemeinen versteht man unter einem Tumor eine entweder benigne oder maligne Neoplasie von körpereigenem Gewebe, welche durch Fehldifferenzierung zu einem uneingeschränkten Wachstum und einer Funktionsmodulation führt (National Cancer Institute). Während benigne Tumore lokal begrenzt und verdrängend wachsen, kommt es bei malignen Tumoren zur lokalen Ausbreitung (Invasion) und/oder zur Absiedelung von Metastasen des Ursprungstumors in anderen Körperregionen. Aufgrund des erhöhten mutagenen Risikos und der damit einhergehenden schlechteren Prognose werden maligne Tumore als „Krebs“ betitelt (National Cancer Institute, GM, 2000a). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit ist mit dem Terminus *Tumor*, stets eine maligne Veränderung gemeint. Während es diverse Hypothesen zur Entstehung von Tumoren gibt, beschreibt eine Theorie eine Fehldifferenzierung als Ursache, welche durch Mutationen spezifischer Gene hervorgerufen wird. Hierbei können bspw. Basenpaare deletiert, integriert oder amplifiziert werden, sowie ganze Chromosomenabschnitte verändert werden (Translokation) (Suzanne Clancy, 2008). Die daraus resultierende Funktionsveränderung des aus dem Gen translatierten Proteins sorgt einerseits für eine neue oder überschießende Funktionsfähigkeit (*gain of function*) oder für eine Verminderung der Proteinfunktion (*loss of function*) (Jung et al., 2015, Gerasimavicius et al., 2021). Alternativ kann durch Translokationen die fälschliche Zusammenführung von Genen oder Genabschnitten auch zu krebserzeugenden Fusions- oder Hybridproteinen führen (Nambiar et al., 2008). Aufgrund der neu gewonnen Wirkungen auf die Teilungsfähigkeit (Proliferation), das Überlebens und die Motilität, verschaffen sich Tumorzellen einen Vorteil gegenüber den gesunden, nicht differenzierten Körperzellen, was schnell zu einer Verdrängung dieser führt (Raumforderung) (Edlich et al., 2005, Harbeck et al., 2019, Nathanson et al., 2001). Je nach zeitlichen- und räumlichem Auftreten des Tumors wird dieser als nicht solider Tumor (ALL, CML, Lymphom), oder solides Blastom (während des menschlichen Entwicklungsstadiums), Sarkom (überwiegend Stütz- und Bindegewebe) oder Karzinom (überwiegend Drüsen- oder Epithelgewebe) unterteilt (Chejfec et al., 1990, Cohen et al., 1991, National Cancer Institute). Zu Letzterem zählt auch das Mammakarzinom, welches eine maligne Fehldifferenzierung der Brustdrüsen beschreibt (Polyak and Kalluri, 2010).

Zusammengefasst werden die funktionalen Änderungen einer Krebszelle in den für alle Tumoren gültigen *Hallmarks of cancer* (Kennzeichen für Krebs) (Hanahan and Weinberg, 2011). Im Detail beschreiben diese (I) das Umgehen des kontrollierten Zelltodes (Apoptose), (II) ein unbegrenzt aktives Wachstums- und (III) Teilungspotenzial, (IV) Insensitivität gegenüber Tumorsuppressoren, (V) die Fähigkeit zur Angiogenese, sowie (VI) der Metastasierung (Hanahan and Weinberg, 2011). Ergänzt wurden diese ursprünglichen sechs „Kennzeichen“ in den letzten Jahren durch die Umgehung der Immunantwort, die Induktion einer pro-tumorösen Inflammation, die Genominstabilität und Mutationen, sowie die Umstellung des Zellmetabolismus (Hanahan and Weinberg, 2011). Im neusten Report aus dem Jahre 2022 nahmen Hanahan et al. außerdem die phänotypische Plastizität (siehe 1.1.1, epithelial-mesenchymaler Übergang (EMT)), die nicht-mutagene epigenetische Umwandlung des Genoms, das polymorphe Mikrobiom und die Fähigkeit der Seneszenz mit in die *Hallmarks of cancer* auf (Hanahan, 2022).

1.1.1 Proliferation und Metastasierung

Der fundamentalste Unterschied einer Krebszelle zum umliegenden Gewebe ist die Fähigkeit des unbegrenzten und schnellen Wachstums (Feitelson et al., 2015, GM, 2000b). Gesteuert wird die Proliferation über verschiedene Signalwege, Wachstumsaktivatoren und -Suppressoren, sowie letztendlich über die Induktion des Zellzyklus. Genetische Veränderungen dieser Kaskaden führen somit zum pro-proliferativen Phänotyp einer Krebszelle. Durch die Mutation von Proto-Onkogenen zu Onkogenen kommt es zur Umgehung von Wachstumssignalen (*gain of function*) (Sarkar et al., 2013, Weinberg, 1996). Ebenso führen Mutationen von Tumorsuppressoren (*loss of function*) zu einem unkontrollierten und nicht limitierten Wachstum der Zellen (Sarkar et al., 2013). Beispielsweise zeigen Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 in vielen Krebsentitäten einen erheblichen Einfluss auf die Proliferation (López-Sáez et al., 1998, Allred et al., 1993, Marei et al., 2021). Ähnlich der Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinase*, CDK), welche maßgeblich am Zellzyklus und damit der Mitose involviert sind, konnte auch p53 als Modulator der G1/M Phase identifiziert werden (López-Sáez et al., 1998, Duronio and Xiong, 2013). Vermittler ist dabei p21, was auch Zielprotein der pro-proliferativen RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskade ist (Duronio and Xiong, 2013, Chang et al., 2003, McCubrey et al., 2007). Auch andere Signalwege wie PI3K/AKT (Fresno Vara et al., 2004, Liang and Slingerland, 2003) oder der Calciumionen (Ca^{2+}) abhängige PKA/cAMP/CREB Signalweg (Zhang et al., 2020, Chuang et al., 2020) können den Zellzyklus beeinflussen. So konnte in Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden, dass eine Blockade des PI3K/AKT und MAPK/ERK Signalweges zu einem Zellzyklusarrest und vermehrter Apoptose führt (Roy et al., 2010). Dieses Beispiel impliziert, dass Veränderungen in Signalwegen oder Mutationen bestimmter Gene meist nicht nur ein einziges *Hallmark of cancer* beeinflussen, sondern sich multifaktoriell äußern. So ist bekannt, dass PI3K/AKT neben proliferativen und apoptotischen Eigenschaften auch Resistenzen gegen Zytostatika fördert (Fresno Vara et al., 2004), oder das Metastasierungsrisiko erhöht (Qiao et al., 2008, Ye et al., 2012).

Die Metastasierung ist bedingt durch das Absondern von einzelnen Zellen oder Zellagglomeraten, deren Transport über das lymphatische- oder Blutbahnsystem verläuft, sowie der Integration dieser Zellen in entfernte Gewebe. Die Initiation der Metastasierung ist durch verminderten Nähr- oder Sauerstofftransport, sowie über Zellintrinsic- oder onkogene Aktivität geregelt (García-Jiménez and Goding, 2019). Kommt es durch das schnelle Wachstum der Tumore zu einer Unterversorgung mit Nährstoffen, oder im späteren Verlauf Sauerstoff (O_2), besitzen Tumore verschiedene Möglichkeiten zur Kompensation (**I–IV**). (**I**) Zunächst können die Zellen in einen energiesparenden Zellzyklus-Arrest (G1-Arrest, G0-Phase, *dormant phase*) übergehen, in dem die Replikation vollständig unterbunden wird (García-Jiménez and Goding, 2019, Butturini et al., 2019, Liu et al., 2010b). Nachteile ergeben sich daraus bei der Therapie, da viele Zytostatika nur proliferative Zellen adressieren können (Butturini et al., 2019). Die Gefahr von Rezidiven wird damit vergrößert. Der durch PERK/eIF2 vermittelte G1-Arrest kann in der Zellkultur durch einen Serumentzug erzwungen werden (Barney et al., 2020, Shin et al., 2008). (**II**) Des Weiteren sind die Zellen in der Lage, das Energiedefizit durch einen gesteigerten Metabolismus oder Selbstverdau von nicht benötigten Organellen oder Proteinen (Autophagie) auszugleichen (García-Jiménez and Goding, 2019, Infantino et al., 2021, Palm, 2021, Lim et al., 2021). (**III**) Im Hinblick auf die Hypoxie kann außerdem der Botenstoff VEGF (*vascular epithelial growth factor*) ausgeschüttet werden, was, entlang des VEGF-Gradienten, zu einer Vaskularisierung führt (Angiogenese) und über lange Sicht den Tumor mit neuen Nährstoffen und O_2 versorgt (Krock et al., 2011, Liao and Johnson, 2007). Die Angiogenese gilt, wie bereits ausgeführt, als wichtiges *Hallmark of cancer*. (**IV**) Die letzte Möglichkeit ist das

Absondern von Zellen, welche sonst durch die Unterversorgung des Primärtumors absterben würden (García-Jiménez and Goding, 2019, Rankin and Giaccia, 2016, Semenza, 2016). Durch die Initiation der Metastasierung kommt es zur Änderung der zellulären Eigenschaften, weg von einem epithelialen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp. Dieser Vorgang wird auch als *epithelial-mesenchymal-transition* (EMT) bezeichnet (García-Jiménez and Goding, 2019). Durch die EMT kommt es zu biochemischen Umbauprozessen, sodass die statischen epithelialen Eigenschaften der Zellen durch motile, mesenchymale ersetzt werden (Kalluri and Weinberg, 2009). Dieser Phänotyp-*Switch* äußert sich in einer verminderten Adhäsion, welche die Motilität einzelner Zellen erhöht und sie letztlich zum Durchdringen von Basalmembranen befähigt (Intravasation, Extravasation) (Lai et al., 2020, Banyard and Bielenberg, 2015). Aufgrund der Reversibilität der EMT (MET) dominiert am „Zielgewebe“ der epitheliale Status der die Mikrometastasen erneut im Wachstum fördert (Kalluri and Weinberg, 2009, Jolly et al., 2017, Bakir et al., 2020). Maßgeblich an der EMT beteiligt sind die Typ-I-Cadherine E und N, welche Ca^{2+} -abhängig die Zell-Zell-Adhäsion regulieren (Loh et al., 2019, Takeichi, 1990) sowie transmembran-lokalisierte Intergrine, welche als Heterodimere neben Zell-Zellkontakten auch Zell-Matrixadhäsion vermitteln (Pan et al., 2018).

Die Tumorzelldissoziation verläuft über die Migration. Nach Induktion der Migration (z. B. durch Unterversorgung mit Nährstoffen/ O_2), sowie über Signale der extrazellulären Matrix (*extra cellular matrix*, ECM) kommt es zur Ausbildung von Lamellipodien (und Filopodien) (Lou et al., 2021). Im zweiten Schritt lösen Integrine die Verbindung dieser Ausstülpungen an spezifische Motive der ECM aus. Dadurch kommt es zur Adhäsion in zellnahen Arealen. Anschließend kommt es durch In- und Efflux von Ionen insbesondere von Kaliumionen (K^+) zur Veränderung des Zellvolumens (Schwab et al., 2012). Durch ein Schrumpfen am Zell-Ende und einen Volumenzuwachs am vorderen Teil der Zelle erfolgt die eigentliche Fortbewegung. Im letzten Schritt kommt es zum Verlust der adhäsiven Fähigkeit des hinteren Teils der Zelle und die nächsten Lamellipodien können gebildet werden (Lou et al., 2021).

Da Proliferation, Migration oder Angiogenese, Energie-verbrauchende Prozesse beschreiben, muss dieses Defizit von den Tumorzellen durch einen verstärkten Metabolismus ausgeglichen werden. Durch *Remodeling*-Prozesse ist die Krebszelle in der Lage, die fehlende Energie zu kompensieren, um so die Energiehomöostase aufrecht zu erhalten, das Wachstum zu ermöglichen und das Überleben zu gewährleisten (Hanahan and Weinberg, 2011). Dafür stehen den Zellen verschiedene Möglichkeiten der Modulation zur Verfügung. Neben der Verstoffwechslung von Lipiden oder Aminosäuren sind Kohlenhydrate in Form von Glukose die Hauptenergiequelle (Czura, 2017, Ye et al., 2020, Chang et al., 2020). Letztere werden durch die Glykolyse unter ATP-Gewinn metabolisiert und tragen unter anderem zur essenziellsten Energie-Produktion der Zelle bei. Wenngleich unter aeroben Bedingungen vermehrt Adenosintriphosphat (ATP) durch die Oxidative Phosphorylierungen (OxPhos) im Mitochondrium produziert wird, ist unter chronischer Hypoxie die Glykolyse zur Kompensation unabdingbar (Hanahan and Weinberg, 2011, Eales et al., 2016). Aufgrund des schnellen Wachstums der Tumore, kommt es oft zur Unterversorgung von (Nährstoffen oder) O_2 und als Folge zu einem *Switch* von aerober OxPhos zu anaerober Glykolyse (Robey et al., 2005). Da in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf dem Metabolismus, der Energiehomöostase und K^+ -Kanälen liegt, wird im folgenden Abschnitt die Energieversorgung von Tumorzellen detailliert beleuchtet.

1.1.2 Metabolismus und Energiehomöostase in Tumoren

Die zelluläre Energiehomöostase ergibt sich aus stetiger Energieproduktion und Energieverbrauch. ATP ist dabei der wichtigste Energieträger der eukaryotischen Zelle. Die Synthese erfolgt hauptsächlich in den Mitochondrien, in welchen die OxPhos die Kopplung zwischen Sauerstoffverbrauch und Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) realisiert (Sztark et al., 1999, Alberts B, 2002). Genauer werden bei der Zellatmung Elektronen von einer organischen Verbindung auf einen Cofaktor (z. B. NAD⁺) übertragen, sowie über die Elektronentransportkette zu einem Akzeptor (O₂) weitergeleitet. Bei dieser Weiterleitung wird Energie frei, welche zur Bildung von ATP aus ADP führt (Czura, 2017). Ergänzend können Metaboliten wie Kohlenhydrate (überwiegend Glukose), oder falls nicht ausreichend, Triglyceride und später Aminosäuren zum Energiegewinn beitragen (Czura, 2017, Ye et al., 2020). Da der Ertrag aus dem Lipid- oder Aminosäuremetabolismus jedoch nicht ergiebig genug ist, verbleibt die Zelle primär bei der Verwertung von Glukose und Kohlenhydraten (Alberts B, 2002). Auch ein Recyclingprozess (Autophagie), welcher fehlgefaltete Proteine, oder defekte Zellorganellen abbaut, um neue Nährstoffe bereit zu stellen, dient der Energieerhaltung (Feng et al., 2014, Glick et al., 2010). Der Produktion entgegen steht der Energieverbrauch, welcher in Tumorzellen aufgrund der vermehrten Proliferation und Migration höher ausfällt (Kroemer and Pouyssegur, 2008, Zhang and Yang, 2013).

1.1.2.1 Glykolyse und Warburg Effekt

Die Glykolyse ist ein zytoplasmatischer Stoffwechselweg, bei der Glukose zu Pyruvat metabolisiert wird (siehe Abbildung 1.1) (Kumari, 2018, Harris, 2013). Durch verschiedene Glukosetransporter wie GLUTs (transmembranäre uniportäre Glukosetransportproteine) oder Natriumionen (Na⁺)-abhängige Glukosetransporter (*sodium/glucose co-transporter*, SGLTs), kann Glukose in die Zelle transportiert werden (Deng and Yan, 2016, Lunt and Vander Heiden, 2011). Im Anschluss phosphorylieren Hexokinase Isoformen, unter ATP-Verbrauch, die Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) (Porporato et al., 2011, Akram, 2013, Bryan Krantz: University of California, Spring 2008, Li et al., 2015, Lunt and Vander Heiden, 2011). Durch enzymatische Spaltung entstehen im Anschluss Fruktose-6-Phosphat (F-6-P), Fruktose-1,6-Bisphosphat (F-1,6-P) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G-3-P) (Porporato et al., 2011, Akram, 2013, Bryan Krantz: University of California, Spring 2008, Li et al., 2015, Lunt and Vander Heiden, 2011). Diese Prozesse verbrauchen erneut ein ATP, weswegen die ersten Stoffwechselschritte als „Energieinvestitionsphase“ (Vorbereitungsphase) betitelt werden. Die nachfolgenden Schritte werden aufgrund des Energiegewinns, als „Ertragsphase“ deklariert (Redalen, 2006, Bryan Krantz: University of California, Spring 2008). Dabei kommt es zur Übertragung der Energie auf zwei Coenzyme Nicotinamid Adenin Dinukleotid (NAD⁺), sodass zwei Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid Hydride (NADH) und Protonen (H⁺) entstehen. NADH+H⁺ dient im späteren Verlauf als Energie-Donor in der OxPhos (Bryan Krantz: University of California, Spring 2008, Lunt and Vander Heiden, 2011). In den weiteren Schritten der Ertragsphase werden letztendlich aus G-3-P über Phosphoenolpyruvat (PEP) Pyruvat, sowie 4 weitere ATP-Moleküle gebildet. Letztlich werden somit 2 zusätzliche ATP-Moleküle während der Glykolyse generiert (Porporato et al., 2011, Akram, 2013, Bryan Krantz: University of California, Spring 2008, Li et al., 2015, Lunt and Vander Heiden, 2011).

Acetyl-CoA, das nach Abspaltung von Kohlenstoffdioxid (CO₂) aus Pyruvat entsteht (Lunt and Vander Heiden, 2011), ist initiales Edukt des Citratzyklus, welcher Metaboliten für die Atmungskette liefert. So wird, zusätzlich zu dem in der Glykolyse gebildeten ATP und NADH+H⁺ für Komplex I, auch Succinate oder FADH₂ (Flavin-Adenin-Dinukleotid Dihydrid) gebildet, welche im Komplex II unter Energiegewinn oxidiert werden (Martinez-Reyes and Chandel, 2020, Osellame et al., 2012, De Meirleir et al., 2006). Damit zeigt sich die Komplexität der Energieversorgung einer eukaryotischen Zelle, um die Energieproduktion aufrecht zu erhalten und dem Energieverbrauch anzugleichen.

Bemerkenswert ist, dass in Tumorzellen die Glykolyse nicht nur im anaeroben, sondern auch im aeroben Milieu ablaufen kann, obwohl während der Glykolyse weniger ATP produziert werden kann, als durch die OxPhos (Zheng, 2012). Durch die schnellere Kinetik der Glykolyse (schnellerer Metabolismus von Glukose in ATP) wird dadurch die Aufrechterhaltung der Energieversorgung in stark proliferierenden Tumorzellen gewährleistet. Diese aerobe Glykolyse wird als „Warburg Effekt“ bezeichnet, benannt nach dem Entdecker Otto Warburg in den 1920ern (Potter et al., 2016, Warburg et al., 1927). Warburg postulierte, dass Tumorzellen auch unter O₂-reichen Bedingungen Glukose zu Pyruvat verstoffwechseln und am Ende zu Laktat reduzieren, anstelle generiertes Pyruvat in den Citratzyklus einzuleiten und dort zur mitochondriellen Energieproduktion beizutragen (Potter et al., 2016, Warburg et al., 1927). Da Laktat allerdings nicht weiter zum Energiegewinn beiträgt, kann dieses entweder zu Pyruvat rück-metabolisiert werden, oder mit Hilfe der Monocarboxylat-Transporter (MCT) aus der Zelle ausgeschleust werden (Goodwin et al., 2014, Sun et al., 2020). Warburgs Schlussfolgerung nach, mussten dadurch mitochondrielle Fehlfunktionen vorliegen, die im Detail bis *dato* noch nicht aufgeklärt sind (Potter et al., 2016, Warburg et al., 1927). Der Efflux von Laktat im Symport mit H⁺ sorgt für eine Ansäuerung des extrazellulären Kompartiments (*extracellular acidification rate*, ECAR, siehe Abbildung 1.1) (plc., 1998-2022, Mookerjee and Brand, 2015). Warburgs Theorie ist aber nicht auf alle Tumorzellen übertragbar, da verschiedene Tumorzellpopulationen einen unterschiedlichen Metabolismus und Laktatproduktion aufgezeigt haben (Potter et al., 2016). Allerdings konnte die aerobe Glykolyse in Kolorektalen-, Lungen-, und Brusttumoren nachgewiesen werden (Grover-McKay et al., 1998, Sakashita et al., 2001, Wu et al., 2007). Obwohl unter normoxischen Bedingungen die OxPhos mehr ATP produziert, kann über den Warburg Effekt dennoch eine effektive Energiegewinnung stattfinden (Liberti and Locasale, 2016, Warburg et al., 1927). So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass der Warburg Effekt in biosynthetischen- und signaltransduzierenden Wegen sowie im *Tumor-Microenvironment* (TME) eine Rolle spielt (Liberti and Locasale, 2016).

1.1.2.2 Oxidative Phosphorylierung

Der Großteil der produzierten Energie einer Zelle wird durch die Zellatmung, bzw. die OxPhos generiert. Am Ende entstehen 36 ATP-Moleküle, anders als bei der anaeroben Glykolyse, bei der Netto 2 Moleküle ATP (pro Glukose) produziert werden (Yetkin-Arik et al., 2019). Während der Atmungskette werden H⁺ über die innere Membran der Mitochondrien (IMM) in den Inter-membranraum (*inter membrane space*, IMS) transportiert. Der sich damit aufbauende H⁺-Gradient wird im letzten Schritt, der eigentlichen OxPhos (*Chemiosmosis*), benötigt um ATP zu erzeugen (OpenStax-College, 2013). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der Prozess der Atmungskette mit seinen vier Komplexen, sowie der Komplex V der *Chemiosmosis*, unter dem Begriff „OxPhos“ zusammengefasst.

Wie in Abschnitt 1.1.2.1 beschrieben, benötigt die OxPhos dafür verschiedene Metaboliten welche sie aus anderen Stoffwechselprozessen der Zelle erhält (Khan-Academy, 2022). So beispielsweise Acetyl-CoA, Succinat und Fumarat aus dem Lipidstoffwechsel, Citratzyklus oder der Glykolyse. Komplex I der Atmungskette, eine Ubichinon–Oxidoreduktase (NADH-Dehydrogenase), nutzt NADH als Cofaktor (OpenStax-College, 2013, Chaban et al., 2014, Khan-Academy, 2022, Zhao et al., 2019) und reduziert, wie der Name andeutet, Ubichinon (Abbildung 1.1, Q) aus dem Citratzyklus, zu Ubichinol (OpenStax-College, 2013, Chaban et al., 2014, Khan-Academy, 2022). Da alle fünf Komplexe (bis auf Komplex II) die IMM durchspannen (Khan-Academy, 2022), werden im ersten Schritt 4 H⁺ in den IMS transportiert (Chaban et al., 2014). Als Ausgleich dient dabei Ubichinon, welches als Überträgermolekül für die Elektronentransportkette verantwortlich ist. Komplex II wird auch als Succinat-Dehydrogenase bezeichnet und oxidiert demnach Succinat zu Fumarat. Durch die im Enzym vorliegende prosthetische Gruppe Flavin-Adenin-Dinukleotid Dihydrid (FADH₂) können weitere Elektronen auf das Ubichinon übertragen werden, ohne den H⁺-Gradienten weiter aufzubauen (OpenStax-College, 2013, Chaban et al., 2014, Khan-Academy, 2022). In Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) wird schließlich das geladene Ubichinol zum ursprünglichen Ubichinon oxidiert. Die dabei freigesetzte Energie wird zur Reduktion von einem Cytochrom-c, sowie zum Transport von zwei H⁺ aus der Matrix in den IMS genutzt (OpenStax-College, 2013, Chaban et al., 2014, Khan-Academy, 2022). Im Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) wird die gespeicherte Energie des Cytochrom-c durch eine Redox-Reaktion oxidiert, während O₂ zu Wasser (H₂O) reduziert wird. Dabei können vier Elektronen (e⁻) mit 4 H⁺ aus der mitochondrialen Matrix ein O₂-Molekül reduzieren (OpenStax-College, 2013, Chaban et al., 2014, Khan-Academy, 2022, Zhao et al., 2019). Komplex IV ist somit O₂-abhängig und zeigt, dass die Atmungskette nur unter aeroben Bedingungen ablaufen kann (siehe Abbildung 1.1) (Muller et al., 2019).

Der über die Atmungskette aufgebaute H⁺-Gradient im Intermembranraum des Mitochondriums richtet sich in die Matrix zurück und ist essentiell für die F₀F₁-ATP Synthase (Komplex V) (Chaban et al., 2014). Das aufgebaute elektrochemische Potenzial, auch mitochondrielles Membranpotenzial $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ genannt, kann nun durch die F₀-Untereinheit des Komplexes V abgeleitet werden. Dieser Rückfluss erzeugt Energie, welche durch den F₁-Teil der ATP Synthase verwendet wird, um ADP zu einem ATP-Molekül zu phosphorylieren (Chaban et al., 2014, Zhao et al., 2019). Wie viele ATP pro Konformationsänderung der F₀-, bzw. Aktivierung der F₁-Untereinheit produziert werden, hängt vom strukturellen Aufbau des Enzyms ab. Um ATP der ganzen Zelle bereit zu stellen, kommt es durch die ATP/ADP-Translokase (*adenine nucleotide translocator*, ANT) zur Distribution von ATP ins Cytosol (Chinopoulos et al., 2009, Hoshino et al., 2019, Klingenberg, 2008).

Durch diverse Blocker können Rückschlüsse auf die OxPhos gewonnen werden (siehe Abbildung 1.1). Dabei unterscheidet man Inhibitoren der Atmungskette, wie Antimycin-A, welches die Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) hemmt und somit den O₂-Verbrauch, als auch die ATP Produktion in Komplex V unterbricht (Guidarelli et al., 1996, Kim et al., 1999, Ma et al., 2011). Des Weiteren gibt es Inhibitoren der OxPhos, wie Oligomycin-A, dass direkt die F₀F₁-ATP Synthase blockiert. Hierdurch wird der Abbau des H⁺-Gradienten und die damit verbundene ATP-Produktion, sowie der O₂-Verbrauch, verlangsamt (Hayes et al., 1990, Sanchez-Gonzalez and Formentini, 2021, Symersky et al., 2012). Eine dritte Möglichkeit die OxPhos zu inhibieren, ist den elektrochemischen Gradienten aufzuheben. Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) ist eines dieser Entkoppler (Protonophore). Durch das Erzeugen einer höheren Durchlässigkeit für H⁺ in der inneren mitochondrialen Membran, geht die protonenmotorische Kraft für die ATP Synthase durch Komplex V verloren (Zander-Fox et al., 2015).

Der O₂-Verbrauch von Komplex IV steigt damit auf ein Maximum, da dieser möglichst viele H⁺ transportiert und versucht den Gradienten zu stabilisieren (Demine et al., 2019, Maro et al., 1982, Muller et al., 2019).

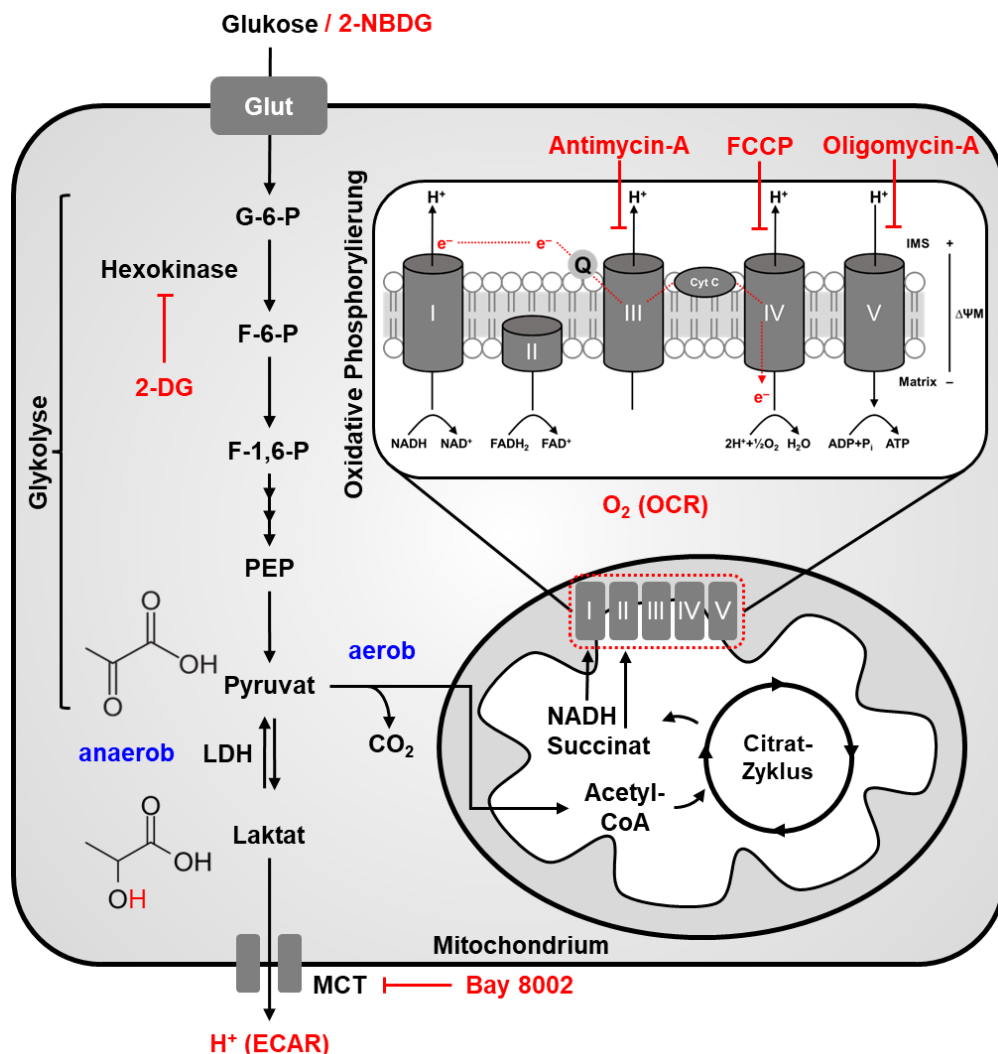


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Energiegewinnung einer eukaryotischen Zelle und Interventionsstrategien.

Eukaryotische Zellen gewinnen den Großteil ihrer Energie aus der Glykolyse und der nachgeschalteten oxidativen Phosphorylierung (OxPhos). Die Glykolyse verläuft anaerob und metabolisiert, unter ATP-Gewinn, Pyruvat aus Glukose. Pyruvat kann über die Laktatdehydrogenase (LDH) enzymatisch zu Laktat umgewandelt werden, wobei zeitgleich Protonen (H⁺) frei werden (rot markiert). Die damit verbundene Ansäuerung des Cytosols kann extrazellulär als *extracellular acidification rate* (ECAR) erfasst werden und gibt Rückschlüsse auf die glykolytische Aktivität der Zelle. Laktat wird über Monocarboxylat-Transporter (MCT) aus dem Cytosol ausgeschleust. Des Weiteren kann Pyruvat im Citratzyklus zu NADH, sowie Succinat umgewandelt werden, wichtige Substrate der Komplexe I oder II. Durch die 5 Komplexe (I-V) der Atmungskette entsteht somit ein H⁺-Gradient, welcher letztendlich zur Produktion von ATP im Mitochondrium benötigt wird. Da dieser Prozess aerob verläuft kann der O₂-Verbrauch (*oxygen consumption rate*, OCR) als Surrogat für die OxPhos gemessen werden und somit Rückschlüsse auf die Energieproduktion gezogen werden. Modulatoren der Glykolyse oder OxPhos sind in Rot markiert. (2-DG: 2-Desoxy-D-Glukose; 2-NBDG: 7-Nitrobenzofurazan-Fluorophor substituierte Glukose; Bay 8002: dualer MCT1/2 Inhibitor; ECAR: extrazelluläre Ansäuerung/ *extracellular acidification rate*; FCCCP: Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon; OCR: O₂-Verbrauch/oxygen consumption rate; NADH: Nicotinamidadenindinukleotid; Weitere Abkürzung finden sich im Fließtext.). Als Vorlage und Orientierung der Grafik dienten (Yetkin-Arik et al., 2019).

1.1.2.3 Autophagie und AMPK

Bei der Autophagie werden die drei Formen der Makro-, Mikro- und Chaperon-bedingten Autophagie unterschieden (Glick et al., 2010, Parzych and Klionsky, 2014). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird nur noch Bezug auf die Makro-Autophagie genommen. Autophagie ist ein Recycling-Prozess, welcher das Aufrechterhalten der Homöostase bei Schwankungen des Nährstoff- oder Energiehaushaltes, gewährleistet (Aman et al., 2021, Glick et al., 2010, Su et al., 2020). Im Detail werden fehlgefaltete Proteine, Nukleinsäuren, Lipide oder defekte Zellorganellen, wie Mitochondrien degradiert, um neue Nährstoffe wie Aminosäuren, Triglyceride und Mineralstoffe für die Zelle bereitzustellen zu können (Lin and Qin, 2013, Cuervo and Macian, 2012, Glick et al., 2010, Rabinowitz and White, 2010). Diese werden im weiteren Verlauf durch anabole Prozesse wie der Glykolyse, dem Citratzyklus, Fettstoffwechsel oder bei der Proteinsynthese, verstoffwechselt (Kaur and Debnath, 2015, Lahiri et al., 2019). Somit werden kurzzeitig Ressourcen gespart, um im Anschluss das Zellüberleben und den Metabolismus zu fördern (Lahiri et al., 2019).

Für die Regulation der Autophagie stehen der Zelle diverse Autophagie assoziierten Gene (*autophagy related genes*, ATGs) zur Verfügung. Diese ATGs codieren mehrere Proteine und Komplexe, welche für die Induktion und den autophagischen Flux essenziell sind (siehe Abbildung 1.2) (Wesselborg and Stork, 2015, Lahiri et al., 2019). Eines dieser ATGs beschreibt beispielsweise den ULK1/2 Komplex (*unc51 like kinase 1/2*, ATG1) (Wang et al., 2018), welcher im Zusammenspiel mit anderen Proteinen zur Rekrutierung einer Lipiddoppelmembran führt und somit die Autophagie induziert (Lahiri et al., 2019).

Unter physiologischen Bedingungen interagiert der Nährstoffsensor *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) mit dem ULK1/2-Komplex, der sich aus mehreren ATGs zusammensetzt (Jung et al., 2010, Kim et al., 2011). Dabei besitzt mTOR zwei regulatorische Komplexe, mTORC1 und mTORC2, welche mit der Proliferation, Zellstress und Tumor-Progression assoziiert sind (Jung et al., 2010, Bhaskar and Hay, 2007, Deleyto-Seldas and Efeyan, 2021). Die mTORC1-Aktivität ist abhängig vom Nährstoffangebot, der Energiehomöostase, sowie der zellulären O₂-Verfügbarkeit, welche indirekt über *Upstream*-Kinasen vermittelt werden (Jung et al., 2010, Bhaskar and Hay, 2007). Bei der Aktivierung kann mTORC1 direkt ULK1 am Serin⁷⁵⁷ phosphorylieren und so die Autophagie-Induktion inhibieren (Bhaskar and Hay, 2007, Deleyto-Seldas and Efeyan, 2021, Alers et al., 2012). Im Falle einer Hypoxie kann *vice versa* eine mTORC1-Blockade den autophagischen Flux induzieren (Jung et al., 2010).

mTORC2 hingegen scheint den AKT-Signalweg zu aktivieren (Bhaskar and Hay, 2007, Oh and Jacinto, 2011, Yung et al., 2011). AKT (Proteinkinase B) ist ein zentraler Knotenpunkt in Signalwegen des Zellwachstums, der Apoptose, der Nährstoffversorgung und in vielen patho-/physiologischen Prozessen, wie Krebs (Manning and Cantley, 2007, Hanada et al., 2004, Revathidevi and Munirajan, 2019). So können beispielsweise Wachstumsfaktoren (meist über Rezeptor Tyrosin Kinasen) mTORC2 aktivieren und diese wiederum AKT am Serin⁴⁷³ phosphorylieren (Manning and Cantley, 2007). Des Weiteren kann AKT auch durch PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) aktiviert werden, was zur Phosphorylierung der Tuberöse-Sklerose-Proteine (TSC) 1 und 2 führt (Manning and Cantley, 2007, Brunet et al., 2001). TSC1 und TSC2 blockieren, über RHEB (*ras homolog enriched in brain*), wiederum mTORC1 (Bhaskar and Hay, 2007, Huang and Manning, 2009). Die Phosphorylierung von mTORC1 durch AKT über PRAS40, zeigt nur eine weitere Möglichkeit der Intervention (Wiza et al., 2012). Da mTORC1 durch seine inhibierende Wirkung auf den ULK1-Komplex zu einer Blockade der Autophagie

führt, und mTORC1 über den PI3K/AKT-Signalweg stimuliert wird, ist auch PI3K/AKT (teilweise) ein Autophagie-Inhibitor (Yun and Lee, 2018, Manning and Cantley, 2007).

Ähnlich wie mTOR wird auch die AMPK (Adenosinmonophosphat (AMP) abhängige Kinase) durch einen gestörten Metabolismus aktiviert (Kim et al., 2011, Garcia and Shaw, 2017, Hardie et al., 2012, Hardie et al., 2016). AMPK überwacht als *energy sensing kinase* den intrazellulären Energiehaushalt, indem sie das AMP/ADP zu ATP-Verhältnis detektiert (Hardie et al., 2012, Hardie et al., 2016). Durch Nährstoffmangel oder vermindertem Metabolismus steigt die intrazelluläre AMP- oder ADP-Ratio an, was zur Aktivierung der AMPK führt und somit katabole Prozesse steigert, während anabole Stoffwechselwege unterdrückt werden (Hardie et al., 2012, Corradetti et al., 2004). Aufgrund des schnellen Wachstums der Tumoren kann, wie zuvor angedeutet, die Nährstoff- und O₂-Versorgung gestört werden. Sowohl die Hypoxie, als auch der Mangel an essenziellen Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren, kann die AMPK aktivieren (Wu et al., 2021a, Li et al., 2021, Endo et al., 2018). Eine Studie zeigte, dass SV40-Mausembryo Fibroblasten (MEFs) unter Hypoxie eine erhöhte Autophagie- und AMPK-Aktivität aufgewiesen haben, unabhängig von HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor) (Papandreou et al., 2008). Daraus zeigt sich die Komplexität der AMPK und der Autophagie, welche zwar eng miteinander verknüpft sind, aber dennoch beide multifaktoriell beeinflusst werden können. Strukturell ist die AMPK ein Heterotrimer, bestehend aus den drei Untereinheiten α , β und γ , wobei die γ -Untereinheit für die Energiesensitivität verantwortlich ist (Kim et al., 2016, Willows et al., 2017). Diese besitzt eine Bindestelle für AMP und ADP (siehe Abbildung 1.2) (Kim et al., 2016, Willows et al., 2017). Als Folge der Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung der AMPK. Hierdurch werden regulatorische Phosphorylierungsstellen, unter anderem Threonin¹⁷² (Thr¹⁷²) der α -Untereinheit, und Bindungsstellen für inhibitorische Phosphatasen zur Blockade zugänglich (Kim et al., 2016, Willows et al., 2017, Hardie et al., 2012, Hardie et al., 2016). Durch die Konformationsänderung kann Thr¹⁷² durch mehrere *Upstream*-Kinasen phosphoryliert werden. Die zwei Bekanntesten sind dabei die Ca²⁺/Calmodulin abhängige Kinase 2 (CaMKK2) und die Leberkinase B1 (LKB1) (Hardie et al., 2012, Hardie et al., 2016, Kim et al., 2016).

LKB1 ist eine Serin/Threonin Kinase und in einem Komplex mit Maus Protein 25 (Mo25) und *STE20-related kinase adaptor* (STRAD) aktiv (Zeqiraj et al., 2009). So sind sowohl STRAD, als auch Mo25 für die Stabilität und Aktivität des Komplexes verantwortlich, wobei der genaue Aktivierungsmechanismus nicht geklärt ist (Zeqiraj et al., 2009, Boudeau et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass durch RAS/RAF-Signalwege (Zheng et al., 2009) und das *S-phase kinase-associated protein 2* (Lee et al., 2015, Lee and Lin, 2018) eine Aktivierung der LKB1 induziert wurde (Lee et al., 2015, Dard et al., 2018). Des Weiteren sind beide Induktoren, LKB1 und AMPK, abhängig von der Energiehomöostase, was neben der AMP/ADP Bindestelle der AMPK γ -Untereinheit, auch LKB1 für die Aktivität der AMPK verantwortlich macht. Ebenso zeigen Mutationen des Tumorsuppressorgens LKB1 Auswirkungen auf das krebsassoziierte Peutz-Jeghers Syndrom (PJS), sowie Lungen-, oder Zervixkarzinome (Sanchez-Cespedes, 2007, Nakada et al., 2013). PJS erhöht unter anderem das Risiko für Brusttumore, wobei oft eine reduzierte LKB1-Expression beschrieben wurde (Fenton et al., 2006). Eine genetische Überexpression von LKB1 im Mausmodell konnte wiederum das Brusttumorwachstum, die Invasivität und die Anzahl an Lungenmetastasen reduzieren (Fenton et al., 2006, Zhuang et al., 2006). Vermutete wird dabei eine Involvierung der Autophagie.

Anders als bei der LKB1 ist über den Wirkmechanismus der CaMKK2 mehr bekannt. Durch steigende Ca²⁺-Konzentrationen ([Ca²⁺]) im Cytosol kommt es zur vermehrten Komplexbindung von Calmodulin (CaM), CaMKK2 und AMPK (Marcelo et al., 2016, Racioppi and Means,

2012, Dunn and Munger, 2020). Die regulatorische α - und β -Untereinheit der AMPK im Komplex induziert die CaMKK2 bedingte Phosphorylierung am Thr¹⁷² der α -Untereinheit und somit eine Aktivierung der AMPK (Fogarty et al., 2016, Lin et al., 2021a, Marcelo et al., 2016, Yi et al., 2020). Wie Pulliam et al. zeigten, hat CaMKK2 selbst einen Einfluss auf die Tumorgenese und Metastasierung in fortgeschrittenem Prostatakarzinomen. Eine eventuelle Regulation der AMPK wurde dabei postuliert (Pulliam et al., 2022). In einem murinen Brusttumormodell konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch die Blockade von CaMKK2, und folgend der AMPK, CD8+ Zellen am Wachstum gehindert werden. Die damit unterbundene Akkumulation dieser tumorassoziierten Myeloidzellen stellte sich als vorteilhaft auf das TME und die Entstehung von Brustkrebs heraus (Racioppi et al., 2019). Dies unterstreicht den Einfluss der Autophagie, ebenso wie die Ca²⁺-Abhängigkeit bei der Progression des Mammakarzinoms.

AMPK reguliert die Aktivierung von ULK1/2 durch direkte und indirekte Mechanismen. Der direkte Mechanismus ist auf die AMPK-vermittelte Phosphorylierung von ULK1 an den Serinresten 467, 555 und 638 zurückzuführen, was zu einer ULK1-Aktivierung führt (Kim et al., 2011, Nwadike et al., 2018). Die indirekte Regulierung von ULK1/2 erfolgt über die Unterdrückung der mTOR-Aktivität. In diesem Sinne reguliert AMPK mTORC1 durch Phosphorylierung des TSC2 (Corradetti et al., 2004). Da ULK1/2 ein Induktor der Autophagie ist, demonstriert der AMPK/AKT/mTOR-Signalweg das größte Potential zur Aktivierung der Autophagie.

Der autophagische Prozess (autophagischer Flux) lässt sich in 5 Phasen unterteilen: Initiation, Elongation, Reifung (Maturation) zu einem Autophagosom, Fusion zu einem Autolysosom und Lyse (Degradation) (Abbildung 1.2) (Alvarez-Meythaler et al., 2020, Yin et al., 2016). Wie bereits erwähnt, wird der autophagische Flux letztendlich über ULK1/2, sowie andere ATGs wie Beclin1 oder FIP200 induziert (Alvarez-Meythaler et al., 2020, Parzych and Klionsky, 2014). Durch Induktion weiterer Komplexe kommt es zur Abspaltung einer Lipiddoppelschicht von der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat, oder dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (Lahiri et al., 2019, Alvarez-Meythaler et al., 2020). Während der Elongation können zu phagozytierende Moleküle (Abbildung 1.2, *Beladung*) gesammelt und eingeschlossen werden (Rabinowitz and White, 2010). Maßgeblich daran beteiligt ist die ATG8-Familie, zu der auch GABARAP, oder das Mikrotubuli-assoziierte 1A/1B leichte Kette 3-Protein (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*, LC3) gehören (Lahiri et al., 2019, Tanida et al., 2004, Parzych and Klionsky, 2014). LC3 ist ein lösliches Protein welches als A, B oder C-Form vorliegt und unterschiedliche Distribution und Funktionen in verschiedenen Tumoren zeigt (Koukourakis et al., 2015, Tanida et al., 2008). Während LC3A und C eher exklusiv in Nuklei oder dem Cytoplasma detektiert werden, kann bei LC3B eine gleichmäßige Verteilung beobachtet werden (Koukourakis et al., 2015). Nachdem der C-Terminus des translatierten Pro-LC3B gespalten wird, liegt das cytosolische LC3B I vor (Kabeya et al., 2000, Tanida et al., 2004). Durch Konjugation eines Phosphatidylethanolamins (Abbildung 1.2, PE) entsteht nach Autophagie-Induktion, das membranständige LC3B II (Tanida et al., 2004, Tanida et al., 2008). Durch diese Aktivierung bindet das LC3B II Molekül an das sich gerade bildende Phagophor, um dort sowohl die Elongation als auch Reifung (Verschließen der Vakuole) zu unterstützen (Tanida et al., 2004, Tanida et al., 2008, Lahiri et al., 2019). Auch manche Proteine besitzen Bindungsdomänen für LC3B II, sodass es während der Maturation (Binden der zu verdauenden Moleküle im Autophagosom) involviert ist (Lahiri et al., 2019). Das vollständig geschlossene Phagosom wird im Anschluss an die Maturationsphase, als *Autophagosom* bezeichnet (Abbildung 1.2) (Lahiri et al., 2019). Da die Menge an LC3B II mit der Anzahl der Autophagosomen korreliert, dient LC3B als Marker für den autophagischen Flux (Kabeya et al., 2000). Durch eine Bindestelle zu LC3B II, ist auch das multifunktionale Protein p62 (Sequestosom 1) mit der

Autophagie assoziiert (Liu et al., 2016b). Es konnte gezeigt werden, dass p62 ebenfalls zwischen Nukleus und Cytosol wandern kann (Liu et al., 2016b), sowie durch Autophagie-Stimuli wie Zellstress, dem Autophagie-Agonisten Resveratrol, oder Nährstoffmangel exprimiert und synthetisiert wird (Liu et al., 2016b, Puissant et al., 2012, Thompson et al., 2003). Aufgrund seiner C-terminalen Ubiquitin-assoziierten Domäne und der LC3B Bindestelle ist p62 am Sammelprozess der zu phagozytierenden *Beladung* beteiligt (Liu et al., 2016b). Wichtig ist, dass p62, anders als LC3B II, exklusiv an der Innenseite der Autophagosomen bindet, sodass es im Verlauf des autophagischen Flux zu dessen Degradation kommt (Liu et al., 2016b). Die Eigenschaften als Autophagie-Marker sind demnach revers zu LC3B II (Mizushima and Yoshimori, 2007, Xiong et al., 2013, Zhang et al., 2018). Aufgrund der multifunktionalen Wirkung, sowie einer gewissen Ambivalenz hinsichtlich einer Akkumulation des p62, ist die alleinige Aussagekraft dieses Markers allerdings bestreitbar. Um folglich eine genaue Aussage über den autophagischen Flux einer Zelle treffen zu können, sind mehrere verschiedene Ansätze (z. B. p62 und LC3B II) notwendig (Mizushima and Yoshimori, 2007).

Im Anschluss an die Maturation des Autophagosoms folgt eine Fusion mit Lysosomen, welche die enthaltenen Hydrolasen für die eigentliche Phagozytose freisetzen (Lahiri et al., 2019). Bei der Fusion der beiden Vakuolen und der Degradation ist die V-ATPase (*vacuolar-type H⁺-ATPase*) maßgeblich beteiligt. Durch Absenken des pH-Werts führt dies zur Aktivierung der Hydrolasen (Guo et al., 2017). Diese Fusion wiederum ist Angriffspunkt des Autophagie-Inhibitors Bafilomycin A1. Als Makrolid-Antibiotikum bindet Bafilomycin A1 an den c-Ring der V-ATPase. Dies verhindert die Wechselwirkung mit der α -Untereinheit und unterbindet den H⁺-Fluss (Wang et al., 2021, Mauvezin and Neufeld, 2015). Im Drosophila Tiermodell konnte durch Bafilomycin A1 eine zusätzliche Blockade der Lysosomenfusion erreicht werden (Mauvezin and Neufeld, 2015), was dadurch die Degradation stoppte. Dies unterstreicht die Funktionalität des Blockers.

Wenn die Fusion und die Aktivierung der Hydrolasen ungehindert abläuft, bildet sich ein Autolysosom (Rabinowitz and White, 2010). In dieser Form beginnt der Verdau aller im Autolysosom enthaltenen Moleküle (*Beladung*), einschließlich der Vakuolenhülle (Lahiri et al., 2019). Im Anschluss an die Degradation kommt es zur Freisetzung der Nährstoffen, wobei das äußere LC3B II recycelt wird. ATG4 vermittelt entsteht so erneut die cytosolische LC3B I-Form (Aman et al., 2021). Alle Nährstoffe können, wie zuvor erwähnt, für weitere Syntheseschritte und die Energieproduktion genutzt werden.

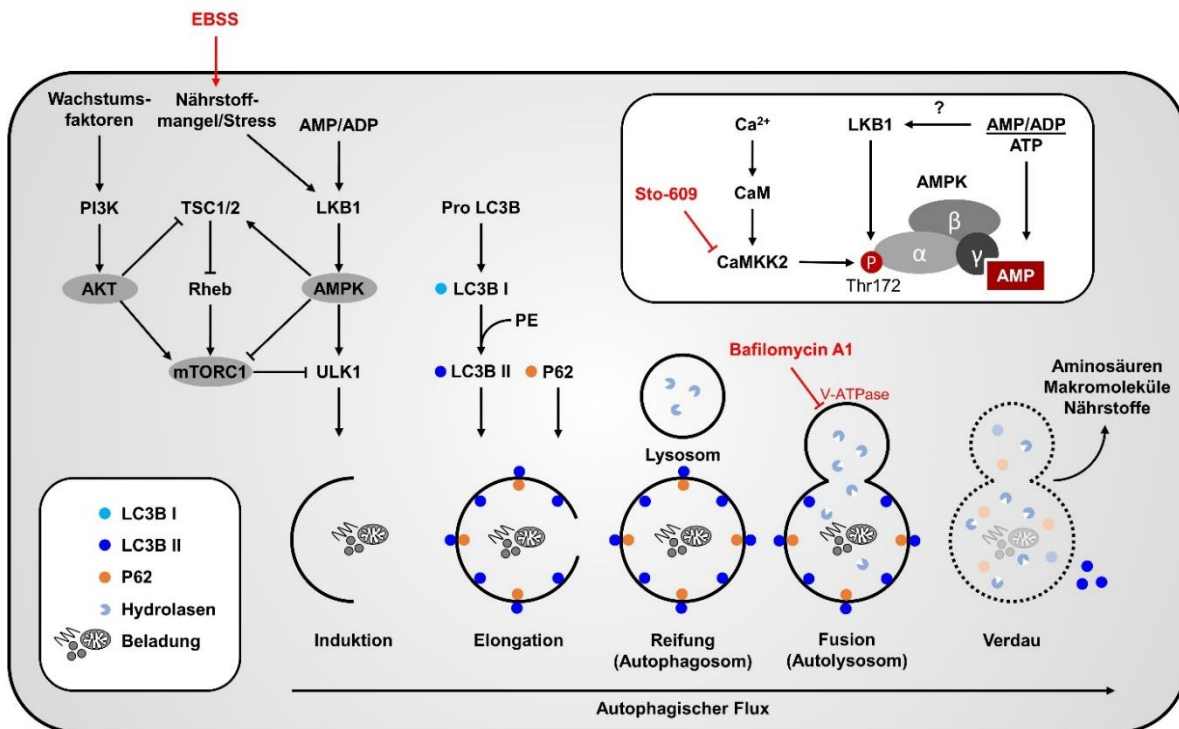


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Autophagie

Autophagie kann durch äußere Einflüsse wie Wachstumsfaktor- oder Nährstoffmangel, sowie intrazellulär durch Energieverlust (AMP/ADP) aktiviert werden. Hauptakteure sind dabei PI3K/AKT, mTORC1, oder AMPK, welche eine regulatorische Trias bilden. AMPK besteht aus 3 Untereinheiten und ist über Ca^{2+} oder erhöhte AMP/ADP Level aktivierbar. Als Folge wird über den ULK1 Komplex die Autophagie induziert. Im weiteren Verlauf (Autophagischer Flux) kommt es zur Expansion einer bimembranären Schicht (Elongation) mit anschließender Reifung zu einem Autophagosom. Dieses umschließt während der Maturation (Reifung) beschädigte Zellorganellen, falsch gefaltete Proteine oder Zellreste (*Beladung*). Durch die Fusion eines Lysosoms formt sich ein Autolysosom, welches die *Beladung* verdaut und recycelte Nährstoffe in das Cytosol entlässt. Wichtiger Bestandteile der Reifung sind p62 oder LC3B. LC3B I wird durch Konjugation mit einem Phosphatidylethanolamin zur aktiven Form (LC3B II) umgewandelt. Durch die H^+ Transportproteine wie V-ATPasen kommt es zur Ansäuerung/Aktivierung der Autolysosomen. Pharmakologische Modulatoren der Autophagie sind in Rot dargestellt. (AMPK: AMP-abhängige Kinase; AKT: Proteinkinase B; CaM: Calmodulin; CaMKK2: Ca^{2+} /Calmodulin Kinase 2; EBSS: Salzlösung/Earles Balanced Salt Solution; LC3B: Mikrotubuli-assoziiertes Protein/ Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B; LKB1: Leberkinase B1; p62: Ubiquitin-Binde Protein p62).

Aufgrund des massiven Einflusses der Autophagie auf den zellulären Metabolismus, liegt deren pathophysiologische Rolle auf die Tumorgenese nahe. Beispielsweise wurden Einflüsse der Autophagie auf Prozesse der Immunologie und Infektiologie, bei Krebs, auf die neuronale Entwicklung, in kardiovaskulären Prozessen, sowie bei Stoffwechselerkrankungen und auf die Eisenhomöostase beschrieben (Khandia et al., 2019). Die Autophagie ermöglicht es Säugtieren beispielsweise einem Nährstoffmangel zu widerstehen, was durch $\text{ATG5}^{-/-}$ oder $\text{ATG7}^{-/-}$ KO-Mäuse verifiziert werden konnte. Diese sterben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt, vermutlich aufgrund ihrer Unfähigkeit sich an den neonatalen Nährstoffmangel anzupassen (Komatsu et al., 2005, Kuma et al., 2004). Des Weiteren konnte eine erhöhte Akkumulation von Autophagosomen in neuronalen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Alzheimer identifiziert werden (Rubinsztein et al., 2007, Williams et al., 2006, Yang and Klionsky, 2020). In Morbus Alzheimer könnte ein erhöhter autophagischer Flux zum Abbau der falsch gefalteten Proteine, wie Tau, führen und somit der Progression entgegensteuern (Williams et al., 2006). Ebenfalls konnten erhöhte Autophagosom-Level in Herzbiopsien von Patienten mit koronarer

Herzkrankheit, Bluthochdruck oder Herzinsuffizienz gemessen werden (Levine and Kroemer, 2008, Terman and Brunk, 2005). Dort wurde der Autophagie eine protektive Wirkung entgegen der Hypoxie zugesprochen (Levine and Kroemer, 2008). Dem entsprechend wurde *in vitro* aufgedeckt, dass eine, unter anderem AMPK-abhängige, Autophagieinduktion protektive Effekte bei Ischämie/Reperfusion haben könnte (Hamacher-Brady et al., 2006, Matsui et al., 2007).

Im Hinblick auf Krebserkrankungen nimmt die Autophagie eine ambivalenten Rolle ein (Yang and Klionsky, 2020, Chavez-Dominguez et al., 2020). Es bleibt strittig, ob eine Induktion der Autophagie zum Selbstverdau der Zelle und somit zur Apoptose führt, oder förderlich für die Tumorprogression ist, da frische Nährstoffen bereitgestellt werden (Yang and Klionsky, 2020, White and DiPaola, 2009, Chavez-Dominguez et al., 2020, Zhang and Liu, 2021). Bekannt ist, dass diese Ambivalenz abhängig vom Stadium des Tumors, dem TME, sowie dem Therapieschema (Radiotherapie, Chemotherapeutika) ist (Apel et al., 2009, Chavez-Dominguez et al., 2020, Zhang and Liu, 2021). Zu Beginn der Tumorgenese wirkt die Induktion der Autophagie wahrscheinlich protektiv, da sie potentiell onkogene Moleküle degradiert und somit als Tumorsuppressor fungiert (Chavez-Dominguez et al., 2020). White et al. beschreiben weiterhin, dass Stress-induzierte Autophagie die Zellschäden abmildert und die Seneszenz fördert, wodurch die Tumorentstehung behindert wird (White and DiPaola, 2009).

In späteren Tumorstadien verbessern autophagische Prozesse das Überleben der Tumorzelle durch Gewährleistung der Energieversorgung. Somit wird dem Nährstoffmangel, dem Energiedefizit (z. B. durch verstärkte Glykolyse), Zellstress und dem negativen TME entgegengewirkt (Chavez-Dominguez et al., 2020, Lock et al., 2011). Die Autophagie ermöglicht es auch, metabolischen Stress zu überleben, in einen Ruhezustand überzugehen (G₀-Phase) und sich zu regenerieren, was ebenso Rezidive fördern kann. In Tumoren mit induzierten Autophagie-Defekten ist diese Schadensbegrenzung beeinträchtigt. Gleichwohl sind die überlebenden, geschädigten Tumorzellen (durch Schäden am Genom) vermehrt pro-tumorgen. Durch Induktion des chronischen Zelltods in Tumoren kann auch eine Inflammation und somit die Tumorentstehung begünstigt werden (White and DiPaola, 2009). Gleiches gilt für therapeutische Ansätze, welche den autophagischen Flux modulieren können (White and DiPaola, 2009). So wurden Studien mit Hydroxy-/Chloroquin durchgeführt, welche durch die Blockade der Lysosomenfusion zu einer Verringerung der Autophagie führten. In verschiedenen Tumorentitäten konnte so eine Verbesserung der Therapie und damit einhergehend, eine geringere Progression des Tumors festgestellt werden (Cook et al., 2014, Mao et al., 2018, Mauthe et al., 2018). Basierend darauf wurde eine Phase II-Studie in Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinomen eingeleitet (Dr. Siow Ming Lee, 2021). In MCF7 Brustkrebszellen konnte ebenso eine vermehrte Sensitivität zu Tamoxifen beschrieben werden, welche auf die genetische Blockade des ATG5 zurückzuführen war (Qadir et al., 2008). Auf der anderen Seite induzieren Zytostatika zellulären Stress und aktivieren nachfolgend die Autophagie, was zur Resistenzbildung beiträgt (Chavez-Dominguez et al., 2020). So konnte in Blasenkarzinomzellen gezeigt werden, dass die Chemoresistenz gegen Cisplatin durch eine Beclin1 (BECN1)-vermittelte Induktion der Autophagie vermittelt wird (Lin et al., 2017).

Da sowohl die Autophagie als auch die Apoptose eine wesentliche Rolle in der zellulären Homöostase spielen, ist es nicht überraschend, dass es zwischen ihnen Wechselwirkung gibt und sich einige Signalmoleküle in beiden Signalwegen wiederfinden. Aufgrund dieser Korrelation erhofft man sich mögliche Vorteile bei der Krebstherapie, durch die Adressierung eines einzigen Wirkstoffes mit dualer Wirkung (Co-Regulation) (Maiuri et al., 2007). So gibt es Überschneidungen im Beclin1-, ATG5- und p53-Signalweg (Su et al., 2013, Nikolettoulou et al.,

2013), welche als interessantes Ziel dienen könnten. Auch Induktoren der Autophagie könnten somit zum selektiven Abtöten von Krebszellen dienen, aber auch zur Resistenz gegenüber Zytostatika führen (Liu et al., 2020).

Auswirkungen auf das Zellwachstum und die Proliferation stehen auch in Verbindung mit der Autophagie. Neben der Versorgung mit Nährstoffen und Energie, konnte auch ein direkter Einfluss über PI3K/AKT/mTOR oder AMPK ermittelt werden (Wang and Levine, 2010). Diese Signalmoleküle sind mitverantwortlich für die Expression von entweder Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen, welche die Proliferation positiv oder negativ regulieren können (Yun and Lee, 2018). Sun et al. zeigten in einem Leberzellkarzinommodell in Ratten, dass eine Inhibition der Autophagie durch Chloroquin in einem frühen Tumor-Stadium zu einer Erhöhung der Proliferation führen konnte, während in einem späteren Stadium das Gegenteil erreicht wurde (Sun et al., 2013). Dies beschreibt abermals die duale Rolle der Autophagie, abhängig vom Tumorstatus (Frühe/späte Phase der Tumorentwicklung, bzw. *Staging*).

Die Autophagie zeigt auch eine ambivalente Rolle im Hinblick auf die Metastasierung. Die tumorsuppressive Wirkung wird durch die Unterdrückung des EMT demonstriert, welcher essentiell für die Metastasierung ist. Durch den Abbau von p62 und dem Frachtprotein TWIST1, welches als Transkriptionsfaktor die EMT fördert, wird die Invasion und Migration vermindert (Qiang et al., 2014, Yun et al., 2020). Auch die Infiltration von Makrophagen, welche zur Initiation der Metastasierung notwendig sind, kann durch vermehrte Autophagie verhindert werden (Yun et al., 2020, Xia et al., 2020). Auf der anderen Seite initiiert eine verstärkte Autophagie auch die Modulation von verschiedenen Signalwegen. So kann einerseits die Adhäsion der Zelle herabgesetzt werden, die Apoptose und Nekrose während der frühen Phase der Metastasierung verhindert werden, sowie die Invasion und Migration von Tumorzellen induziert werden (Mowers et al., 2018, Sharifi et al., 2016, Yun et al., 2020). Unter hypoxischen- oder nährstoffarmen Bedingungen wird wiederum das Risiko einer Abspaltung vom Primärtumor vergrößert, was ebenso die protumorösen Eigenschaften der Autophagie aufzeigt (Yun et al., 2020).

Wie in zahlreichen oben genannten Krebsentitäten ist die duale Rolle der Autophagie auch im Brustkrebsmodell bekannt. So weisen 50% aller Mammakarzinome eine Deletion des Beclin1-Gens auf, welches als Initiator der Autophagie gilt (Maycotte and Thorburn, 2014, Negri et al., 2010). Durch eine genetische Überexpression in Low-Level Beclin1-MCF7 Zellen konnte eine Induktion der Autophagie erzielt werden, welche mit einer verminderten Proliferation korrelierte und somit tumorprotektiv wirkte (Liang et al., 1999). Auch der RAS/RAF/MEK-Signalweg scheint Einfluss zu nehmen, da in MDA-MB-231- und MEF-Zellen mit einer RAS-Mutation, Autophagie abhängig, das Proliferationsverhalten verändert wurde, indem die Glykolyseaktivität erhöht wurde. Unter Autophagie Inhibition zeigte sich hier RAS-abhängig ein verminderter Glukose-Metabolismus und eine eingeschränkte Proliferation (Lock et al., 2011). Im Vergleich zu Beclin1, konnte dabei die Autophagie Inhibition einen Vorteil bringen, was die duale Rolle bekräftigt. Da Mammakarzinome oft hormonabhängig wachsen und die AMPK oder andere Vorläuferkinasen abhängig von diesen Hormonen (Wachstumsfaktoren) agieren, wurden dahingehend weitere Untersuchungen durchgeführt. Als Reaktion auf eine Anti-Östrogen-Therapie in MCF7-Zellen wurde die Autophagie induziert. Umgekehrt sensibilisierte eine Hemmung der Autophagie Tamoxifen-resistente Brustkrebs-Zelllinien (TR5) für Tamoxifen (Cook et al., 2011, Samaddar et al., 2008). Einen vermehrten Einfluss der Autophagie konnte man auch in HER2-positiven Brusttumoren feststellen, ergänzend zu einer Therapie mit Trastuzumab oder Lapatinib (Han et al., 2013, Vazquez-Martin et al., 2009). Dabei indizierte die Autophagie eine Therapieresistenz gegen die HER2-Inhibitoren. Die Autophagie-Ambivalenz konnte auch in Experimenten mit Zytostatika gezeigt werden. Durch die Blockade des autophagischen Flux

wurde die Toxizität von Epirubicin, sowie die Sensitivität in Epirubicin-resistenten MCF7 erhöht (Sun et al., 2011). Die Induktion der Autophagie durch Rapamycin wiederum, führt zu einem verlängerten Überleben unter Doxorubicin-Behandlung *in vivo* (Sishi et al., 2013).

Zusammengefasst ist der Einfluss der Autophagie bei weitem nicht vollständig aufgeklärt. Aufgrund der Komplexität der involvierten Proteine, äußerer Faktoren wie dem Energie- oder Sauerstoffhaushalt, sowie beschriebener pro- und antitumorösen Eigenschaften, ist es schwierig, der Autophagie eine klare „Richtung“ zuzuordnen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der Autophagie in Zusammenhang mit dem Metabolismus von Mammakarzinomzellen und K⁺-Kanälen genauer untersucht.

1.2 Das Mammakarzinom

Laut Internationaler statistischer Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD 10, C50) wird das Mammakarzinom als maligne Neubildung der Brustdrüse (*Mamma*) definiert und zählt zu der häufigsten Tumorerkrankung der Frau.

1.2.1 Ätiologie und Epidemiologie

Mit einer jährlichen Inzidenz von 70.000 Neuinfektionen in Deutschland (Stand 2018) (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018) und 2,3 Millionen Fällen weltweit (Stand 2020) (WHO, 2021), ist das Mammakarzinom die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau. Statistisch macht das 30% aller Krebserkrankungen pro Jahr aus und erklärt die hohe 5 Jahresprävalenz von 304.000 Patientinnen in Deutschland (7,8 Millionen weltweit). Brustkrebs kann auch Männer betreffen. Im Vergleich zu Frauen ist die Inzidenz bei Männern statistisch aber um das 100-fache niedriger (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Analog der hohen Inzidenzrate, ist auch eine gesteigerte Mortalitätsrate von ca. 18% beobachtet worden (29,7% weltweit 2020) (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018, WHO, 2021). Trotz vermehrter Forschung und besseren evidenzbasierten Therapieverfahren liegt diese, knapp gefolgt von Lungenkrebs (16%), auf Platz 1 der tumorbedingten Todesfälle. Das höhere Durchschnittsalter von 65 Jahren verbunden mit vermehrten Rezidiven, sowie das ausgeprägte Metastasierungsrisiko tragen zur Mortalität bei. Es wurde herausgefunden, dass ca. 90% aller Todesfälle auf Sekundärtumore zurückzuführen sind (Chen et al., 2018). Aufgrund der Nähe des Primärtumors zu Lymph- oder Blutbahnen gelangen Metastasen vor allem in Knochen (~35%), Leber (~8%), Lunge (~7%) und Gehirn (~1%). Der hohen Invasivität geschuldet, können auch oft zwei (~25 %), drei (~10 %) oder mehr Organe betroffen sein (Chen et al., 2018, Gote et al., 2021, Sun et al., 2022). Dies ist abhängig von der genetischen Variation und Lage des Primärtumors, sowie der Klassifikation (siehe Abschnitt 1.2.2) (Gote et al., 2021). Im letzten UICC-Stadium (*union for international cancer control*), welches durch positive Fernmetastasen definiert ist, beträgt das durchschnittliche 5-Jahresüberleben 31%, während es in den Stadien 1–3 bei 100–75% liegt (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018).

Wie sich das Mammakarzinom entwickelt, hängt meist von einer Mischung äußerer und innerer Einflüsse ab. Externe Risikofaktoren wie Ernährung, Alkoholkonsum, Gewicht, aber auch Karzinogene, Chemikalien oder erhöhte Strahlenbelastung sind Induktoren für die Entstehung von Brustkrebs (Singletary, 2003, Coronado et al., 2011, Wolff and Weston, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Körpergewicht, das Risiko und die Sterblichkeit für

Brustkrebs deutlich wächst (Blair et al., 2019, McPherson et al., 2000, Kaminska et al., 2015). Auch exogene Faktoren wie die Exposition von Giften wie Bisphenol A, DDT oder PCB, sowie eine Bestrahlung durch vorhergegangene Therapien erhöhen das Brustkrebsrisiko erheblich (White et al., 2016, Cohn et al., 2007, Ng and Travis, 2009, Wolff and Weston, 1997). Zu den internen Einflüssen zählen das Alter, der Hormonstatus, eine familiäre Prädisposition, Multimorbiditäten oder andere genetische Faktoren (McPherson et al., 2000). Es konnte beobachtet werden, dass ab Beginn des 50. Lebensjahres die Brustkrebsinzidenz deutlich zunimmt. Diese Altersspanne beschreibt auch den Beginn des Klimakteriums einer Frau, welche mit den verbundenen Hormonschwankungen einen weiteren Risikofaktor bilden (McPherson et al., 2000, Kaminska et al., 2015). Auch der Beginn der ersten Menarche mit unter 11 Jahren, oder eine späte erste Schwangerschaft (>35 Jahren) erhöht das Risiko um das Dreifache (McPherson et al., 2000, Bernstein, 2002, Sun et al., 2017). Die zuletzt genannten Faktoren unterstreichen den enormen Einfluss der Sexualhormone auf die Entwicklung eines Mammakarzinoms. So korrelieren hohe endogene Östrogenlevel mit einer höheren Inzidenz (Kaminska et al., 2015, Bernstein, 2002). Ein doppelt so großes Risiko wurde bei Gabe exogener Hormone im Zusammenhang mit einer Hormonersatztherapien postuliert. Eine Korrelation mit oralen Kontrazeptiva scheint keinen signifikanten Einfluss zu haben, ein Zusammenhang der intensiv diskutiert wird (McPherson et al., 2000, Kaminska et al., 2015). Ein erhöhtes Brustkrebsrisiko von 10% ist auf eine positive Familienanamnese zurückzuführen (McPherson et al., 2000, Sun et al., 2017), welche primär durch die Gene BRCA1 und BRCA2 auf Chromosom 13 und 17 induziert werden (McPherson et al., 2000, Kaminska et al., 2015). Eine genetische Veränderung dieser Tumorsuppressorgene geht außerdem mit anderen Tumoren wie Ovarial- oder Kolonkarzinomen einher (McPherson et al., 2000, Sopik et al., 2015, Ramus and Gayther, 2009). Falls ein direkter Verwandter einen derartigen Tumor aufgewiesen hat, ist das Risiko verdoppelt, bei benignen Neoplasien sogar verfünffacht (McPherson et al., 2000). Auch Mutationen in Genen wie p53 oder HER2 gehen mit einer verschlechterten Prognose und einem aggressiveren Wachstum des Tumors einher (Gasco et al., 2002, Swede et al., 2001). Dabei ist zu beachten, dass die Mutation eines Allels meist eine gewisse Prädisposition aufzeigen, aber erst die Veränderung des zweiten (Wildtyp-) Allels zur vollständigen Malignität führt. Der als *Knudson- oder Multiple hit*-Hypothese bezeichnete Prozess beschreibt den Verlust der Heterozygotie und zeigt, dass erst eine Kombination von mehreren Mutationen zur Ausbildung von sehr heterogenen Tumoren sorgt (Hino and Kobayashi, 2017, Knudson, 1996). Damit ist nicht jeder Tumor identisch ausgeprägt (Subtypen) und gleich zu behandeln.

Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, weisen alle Tumore dennoch mehrere spezifische Eigenschaften auf, welche sie vereint und in den *Hallmarks of cancer* zusammengefasst sind, sowie auch für das Mammakarzinom geltend sind. So zeigen Brustkrebszellen ergänzend zu Mutationen in Onko- oder Tumorsuppressorgenen auch ein vermehrtes Wachstum, welches durch eine Überexpression von Hormonrezeptoren begründet ist (Dai et al., 2016). Ähnlich wie eine vermehrte Proliferation, weist auch das Metastasierungsrisiko, die Umgehung der Apoptose und das Stoffwechsel-*Remodeling* eine Abhängigkeit von den Brustkrebssubtypen auf (Dai et al., 2016). Ein veränderter Stoffwechsel (Metabolismus) ist einer der wichtigsten Mechanismen, der einer Therapieresistenz zugrunde liegt (Gandhi and Das, 2019). Aufgrund einer Verschiebung der Energiehomöostase, durch den erhöhten Energieverbrauch von Mammakarzinomzellen, kommt es zum Umbau des Zellmetabolismus (Gandhi and Das, 2019, Wang et al., 2020). Dieser *Remodeling*-Prozess ist abhängig von den Brustkrebs-Subtypen (Gandhi and Das, 2019, Wang et al., 2020) und deren unterschiedlichen Phänotypen. So zeigen tripple negative Mammakarzinome (*triple negative breast tumors*, TNBC) eher einen Anstieg der Glykolyse, während Estrogenrezeptor positive ihre Energieproduktion zugunsten der

oxidativen Phosphorylierung verlagern (Lucantoni et al., 2018). Genaueres zu den Subtypen und deren Eigenschaften wird in Abschnitt 1.2.2 beschrieben.

1.2.2 Klassifizierung und Therapie

Ein Teil der oben genannten *Multiple hit*-Hypothese beschreibt die Heterogenität von Tumoren (Al Hajri et al., 2020, Loeb and Loeb, 2000). Abhängig von den mutierten Genen und der Anzahl an Zellen, entstehen Agglomerate mit veränderter Funktionalität (Loeb and Loeb, 2000). Dies erklärt, warum Brustkrebszellen in verschiedene Subtypen einzuteilen sind. Die Klassifizierung erfolgt abhängig von bestimmten Biomarkern und Gewebefärbungen, welche nach der Biopsie des Tumors analysiert werden. Ergänzend fließt auch der Grad des Tumors, der Menopausenstatus, der Allgemeinzustand und weitere klinische oder pathologische Parameter in die Klassifizierung mit ein. Basierend auf dem anschließenden *Staging* und der neuesten S3-Leitlinie (Stand Juni 2021, AWMF-Registernummer: 032-045OL) (DKG, 2021) wird ein Behandlungsschema entworfen, welches entweder auf eine Komplettremission abzielt (kurativ), oder palliativ die Lebenszeit der Betroffenen erhöht. Für die biomolekulare Einteilung des Mammakarzinoms werden der Östrogen- und Progesteron Rezeptorstatus erhoben, sowie humane epitheliale Wachstumsfaktoren, speziell des Humanen Epidermalen Rezeptors Typ 2 (HER2), CDK 5/6 und der Proliferationsmarker Ki-67 analysiert. Daraus werden die Subtypen Luminal A und B, Luminal + HER2, nur HER2, Basal und Trippel negativ definiert (siehe Tabelle 1). Die in dieser Studie verwendeten Tumore des murinen MMTV-PyMT Modells weisen am ehesten Übereinstimmungen mit dem Luminal B-Subtyp auf (Attalla et al., 2021, Pfefferle et al., 2013).

Tabelle 1: Charakterisierung des Mammakarzinoms

Subtyp	ER	PR	HER2	Ki-67 [≥14%]	Prävalenz [%]	Prognose
Luminal A	+	+	–	–	24	Gut
Luminal B	+	+	–	–	39	Mittel
Luminal B + HER2	+	+	+	+	14	Schlecht
HER2	–	–	+	+	11	Schlecht
Basal	–	–	–	+	12	Schlecht
Trippel negativ	–	–	–	–	8	Mittel/ Schlecht

*weitere basale Marker wie cyclinabhängige Kinasen, oder Wachstumsfaktoren wurden vermessen. Die Daten zur Prävalenz und Prognose orientieren sich an (Cheang et al., 2009, Dai et al., 2015, Xue et al., 2012).

Die Einteilung von Brustkrebs folgt dem UICC-*Grading* in vier Stadien, wobei Stadium IV direkt erreicht wird, sobald Fernmetastasen detektiert wurden. Je nach *Staging* des Patienten kann nun der Tumor operiert, bestrahlt oder pharmakologisch behandelt werden. Wenn der Tumor gut erreichbar und operabel ist, stellt die OP den vielversprechendsten Ansatz dar. Dabei unterscheidet man die Brusterhaltende Therapie und die Mastektomie (Entnahme der kompletten Brust) (DKG, 2021). Letzteres ist allerdings nur bei inkompletter Entfernung,

inflammatorischen Mammakarzinomen oder bei der Unmöglichkeit der Strahlen-/ Chemo-Nachbehandlung indiziert (DKG, 2021). Zur Verkleinerung der Tumormasse oder zur Minimierung des diffusen Randes eines Mammakarzinoms kann eine neoadjuvante (vor der OP erfolgende) Chemo- oder Radiotherapie eingesetzt werden. Auch im Anschluss an eine Operation können Radio-/ Chemotherapien zu einer vollständigen Entfernung kleinster Tumorzellen beitragen (adjuvante Behandlung) (DKG, 2021). Die Radiotherapie kann auch bei inoperablen Tumoren ergänzend zur Zytostatikatherapie eingesetzt werden. Abhängig vom Subtyp kommen verschiedene pharmakologische Therapien in Frage. Neben den klassischen Zytostatika kann bei hormonrezeptorpositiven Tumoren, abhängig vom Menopausenstatus, eine endokrine Therapie begonnen werden. Bei HER2-positiven erfolgen ergänzende Therapien mit Antikörpern oder *small molecules* (Moo et al., 2018, Sun et al., 2021).

Wie oben erläutert gibt es je nach Subtyp des Mammakarzinoms verschiedene Behandlungsmöglichkeiten. Neben der Operation und Bestrahlung, ist eine pharmakologische Behandlung oft ausschlaggebend. Allerdings kommt es dennoch zu Rezidiven, welche einer erneuten Behandlung bedürfen. Sowohl die vermehrte Behandlung als auch die Therapie in Zyklen über mehrere Wochen führen oft zu Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber den Zytostatika (Ji et al., 2019). Auf Grundlage dessen ist die Entdeckung neuer Angriffsziele sowie eine fundierte Grundlagenforschung unabdingbar für den Erhalt und die Weiterentwicklung der Krebstherapie (Cardoso et al., 2017).

1.2.3 Herausforderungen und neue Therapieansätze

Aufgrund des starken Nebenwirkungsprofils vieler chemotherapeutischer Wirkstoffe ist erstens eine Dosislimitierung, zweitens das zeitliche Intervall und drittens, die geringe Spezifität der entsprechenden Behandlungsregime ein Problem (Al-Mahayri et al., 2020). Zwar wird durch eine Zyklusgabe, sowie einer Kombinationstherapie die Toxizität dieser Stoffe abgemildert, allerdings sind die Begleiterscheinungen dennoch immens (Ji et al., 2019). Um diesem Problem zu begegnen, wurden spezifischere Therapien, meist auf Basis von Antikörpern, entwickelt, welche auf genetische Unterschiede zwischen gesunden- und Tumorzellen abzielen. Allen voran die Behandlung von HER2-positiven Brusttumoren mit Trastuzumab zeigt gute Erfolge (Moo et al., 2018). Ähnlich wie bei klassischen Zytostatika sind Krebszellen in der Lage Resistenzen gegen verschiedenste Wirkstoffgruppen auszubilden (Malik et al., 2022, Cosentino et al., 2021). Durch vermindertes Eindringen, einen erhöhten Efflux, verstärkte DNA-Reparaturmechanismen oder einen beschleunigten Abbau des Zytostatikums verhindert der Tumor die Wirksamkeit (Ji et al., 2019, Lainetti et al., 2020). Als dritter Punkt ist die Heterogenität zu nennen. Da Tumore durch Mutationen körpereigener Zellen entstehen, sowie diese keine Allgemeingültigkeit für jeden Patienten besitzen, ist eine statische Therapie sehr schwierig (Al Hajri et al., 2020). Aufgrund dieser Limitationen ist es von großem Interesse neue Zielstrukturen zu finden, um Resistenzen zu umgehen oder zu vermeiden, genetische Abwandlungen als Marker oder Modulatoren zu nutzen, sowie als additiver Wirkstoff die Toxizität vorhandener Zytostatika zu vermindern (Burstein, 2022).

Neben der Suche nach Markern zur Prävention und Früherkennung, oder direkten Angriffszielen, wurden auch bekannte zugelassene Wirkstoffe auf ein mögliches breiteres Spektrum und zur Intervention in andere Krebsentitäten untersucht (*drug repurposing*) (Malik et al., 2022). So wurde unter anderem versucht, den Einfluss des Krebsmetabolismus über PI3K/AKT, AMPK, mTOR, mit Coxiben, Antimetaboliten oder Metformin zu modulieren, um ein besseres

Ergebnis zu erzielen (Malik et al., 2022, Nagini, 2017). Auch der Einsatz von Immuntherapeutika, PARP-Inhibitoren (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitoren) oder Antikörpern bei Triple negativem Brustkrebs, welcher ein starkes Resistenzrisiko aufweist, wurde untersucht (Ahmad, 2019).

Nach neusten Forschungsansätzen könnten auch Ionenkanäle ein großes Interventionspotenzial bieten (Dowd et al., 2017, Li and Xiong, 2011, Lu et al., 2020). Da viele Ionenkanäle in der Plasmamembran verankert sind und Einfluss auf das Membranpotenzial, die Ca^{2+} -Homöostase und auf die Chemoresistenz haben, werden sie auch als *Onkokanäle* bezeichnet (Altamura et al., 2022, Capatina et al., 2022, Huber, 2013, Kischel et al., 2019). Allen voran ist die Gruppe der K^+ -Kanäle in den Fokus der Forschung gerückt, da diese aufgrund ihrer hohen Variabilität und Distribution an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie Krebs, beteiligt sind (Dworakowska and Dolowy, 2000, Shieh et al., 2000). Nachfolgend werden entsprechend K^+ -Kanäle und ihre möglichen Funktionen in Tumoren insbesondere dem Mammakarzinom näher beleuchtet.

1.3 Kaliumkanäle

Im Allgemeinen beschreiben Ionenkanäle porenbildende Proteine, welche in der Plasmamembran der Zellen oder den Membranen der Organellen verankert sind (Kamiya et al., 2018). Durch ihre Porenregion können sie einen Ionengradienten über diese Membranen aufbauen und steuern so den In- und Efflux verschiedener Anionen oder Kationen (Alexander et al., 2021, Prevarskaya et al., 2018) wie Chlorid (Cl^-), Ca^{2+} , Natrium (Na^+) und K^+ (Alexander et al., 2021). K^+ -Ionenkanäle stellen dabei die variabelste und somit größte Familie der Ionenkanäle dar. Sie sind in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und sind an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt (Miller, 2000, Kuang et al., 2015). Hierzu zählen die Regulation der K^+ -Homöostase, die zelluläre Erregbarkeit, die Hormonsekretion, sowie bedeutsame Funktionen bei der Volumenregulation, Proliferation und Apoptose (Jeevaratnam et al., 2018, Szabo et al., 2010, Comes et al., 2015, Ashcroft and Rorsman, 2013, Capera et al., 2019). Deshalb sind sie interessante Zielproteine in der Kardiologie, Epilepsie und der Diabetesforschung (Miller, 2000). Die Beeinflussung der Angiogenese und des Migrations- und Invasionsverhalten von Zellen, prädestiniert K^+ -Kanäle zugleich für die Krebsforschung (Pardo and Stuhmer, 2014). Neben der weiten Distribution von K^+ -Kanälen in sowohl erregbaren, als auch nicht-erregbaren Zellen, wurden K^+ -Kanäle auch direkt in Tumorgewebe identifiziert, was deren Bedeutung in der Forschung weiter untermauert (Kuang et al., 2015, Pardo and Stuhmer, 2014). So spielen K^+ -Kanäle eine erhebliche Rolle in der Progression und Proliferation von Tumoren (Pardo, 2004, Urrego et al., 2014), deren Migration und Invasion (Breuer et al., 2019, Payne et al., 2022), dem Metabolismus (Burgstaller et al., 2022a) und der Chemoresistenz (Kischel et al., 2019, Tang et al., 2004) (siehe Abbildung 1.3).

Die Einteilung der K^+ -Kanäle erfolgt entweder aufgrund der Transmembrandomänen (TM) oder ihrer Funktion (Kuang et al., 2015). So können K^+ -Kanäle dank ihrer Topologie in 2, 4 oder 6 TM unterteilt werden. Zu den 2-TM zählen die einwärtsgerichteten (*inward rectifier*, K_{IR}) und ATP-sensitiven K^+ -Kanäle, während zu den 4-TM die Kanäle mit 2 Poren zählen (*two-pore channels*, $\text{K}_{2\text{P}}$) (Gonzalez et al., 2012, 2009). Die größte Subfamilie mit 6-TM wird auf Basis ihrer Erregbarkeit in entweder 2 oder 3 Gruppen aufgeteilt. Dabei bilden die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle eine weit verzweigte Gruppe. Diese beinhalten neben dem im Nervensystem vorkommenden Q-Typ (KCNQ) auch vier spannungsabhängige (K_{V}) und drei *ether-a-go-go*

Kanäle (K_{EAG}), zu welchem auch der bekannte hERG-Kanal zählt (Gonzalez et al., 2012). Eine weitere 6-TM Subfamilie beschreibt Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit (*Ca²⁺-dependent K⁺-channels with small conductance*, SK), zu welcher, aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit auch der IK-Kanal zählt (*Ca²⁺-dependent K⁺-channels with intermediate conductance*, IK/SK4). Die letzte 6-TM Subfamilie weist neben der Spannungs- und Ca^{2+} -Abhängigkeit auch eine zusätzliche Transmembrandomäne auf, weswegen die Slo-Kanäle (*slowpoke*) auch oft als 7-TM betitelt werden. Ein Vertreter ist der BK-Kanal (*Ca²⁺-dependent K⁺-channels with big conductance*, BK / Slo1) (2009, Gonzalez et al., 2012).

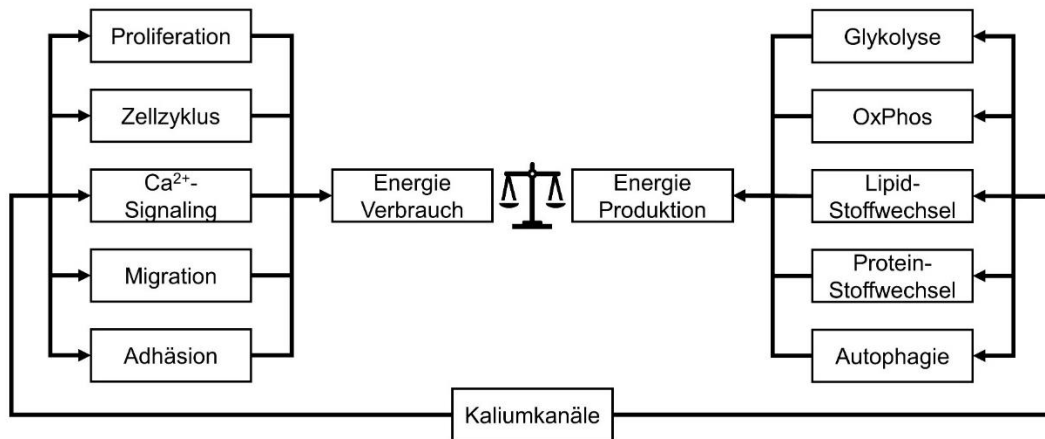


Abbildung 1.3: Potentielle Einflüsse von K^+ -Kanälen auf tumorspezifische Prozesse und die Energiehomöostase

Potenzieller Einfluss von K^+ -Kanälen auf die Tumorentstehung und daraus ableitbaren Konsequenzen für die Energiehomöostase. Pro-tumoröse Prozesse sind energieverbrauchend. Dem gegenüber stehen energieproduzierende Vorgänge, welche die Energie-Homöostase (Waage) in der Zelle aufrechterhalten. (OxPhos: Oxidative Phosphorylierung)

1.3.1 Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle

Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (K_{Ca}) gehören zu der 6-TM Subfamilie und weisen eine große Gewebedistribution in erregbaren und nicht-erregbaren Zellen auf (Kshatri et al., 2018). Ein Merkmal ist die Abhängigkeit von Ca^{2+} , welches als einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt ist. Auch eine Selbstregulation der Aktivität über K_{Ca} -Kanäle konnte gezeigt werden. So induzieren Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle eine Re- oder Hyperpolarisierung, welche spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle schließt oder deren Aktivierung verringert, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) sinkt (Gueguinou et al., 2014). In nicht-erregbaren Epithelzellen wiederum sorgt eine Aktivierung für erhöhten Ca^{2+} -Influx durch nicht spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, wie TRPCs (*transient receptor potential channels*) (Gueguinou et al., 2014, Ibrahim et al., 2021). Die normale $[Ca^{2+}]_i$ reicht von 100 nM bis 1 μ M (Bagur and Hajnoczky, 2017). Neben einer $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch Ca^{2+} Influx aus dem extrazellulären Kompartiment können auch interne Speicher wie der Golgi-Apparat, Lysosomen oder das (sarko-) endoplasmatische Retikulum (SR/ER) zu einem Ca^{2+} -Anstieg im Cytosol beitragen (Bagur and Hajnoczky, 2017, Feng and Yang, 2016, Yang et al., 2015). Unterstützt wird der direkte Zusammenhang durch mehrere Studien, welche zeigen konnten, dass gewisse K^+ -Kanäle in proximaler Nähe zu Ca^{2+} -Kanälen exprimiert werden (Marrion and Tavalin, 1998, Maylie et al., 2004, Oliver et al., 2000). Je nach Ca^{2+} Konzentration werden somit Prozesse wie der Zellzyklus, die Proliferation, Apoptose oder die Oxidative Phosphorylierung reguliert (Bong and Monteith, 2018, Gellerich et al., 2010).

Grundsätzlich bestehen die K_{Ca} -Kanäle aus 4 α -Untereinheiten, welche eine permeable Porenregion bilden. Zusätzlich zum funktionellen Heterotetramer, können regulatorische Untereinheiten die Distribution oder Funktionalität des Kanals variieren (Huang and Jan, 2014). Je nach Zusammensetzung des Proteinkomplexes verändert sich dessen Leitfähigkeit. Basierend darauf können 3 Unterfamilien definiert werden: die Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit SK (*small conductance*, SK), mittlere Leitfähigkeit (*intermediate conductance*, IK) oder großer Leitfähigkeit (*big conductance*, BK) (Huang and Jan, 2014).

SK-Kanäle besitzen eine geringen K^+ -Leitfähigkeit von 4-20 pS und sind ähnlich wie die BK-Kanäle sowohl spannungs- als auch Ca^{2+} -abhängig (Park, 1994, Castle et al., 1989). Allerdings ist die Sensitivität für Ca^{2+} höher, was unter anderem an der modulierenden Calmodulin-Untereinheit liegt, welche als direkter Ca^{2+} -Sensor fungiert. Eine $[Ca^{2+}]_i$ von 100-400 nM aktiviert den Kanal und sorgt für eine lange Hyperpolarisation, was die Distribution des SK in überwiegend nervalen und neuronalen Geweben erklärt (Sah, 1996, Kohler et al., 1996).

Der IK-Kanal besitzt eine etwas größere Leitfähigkeit von 20-80 pS und ähnelt strukturell den SK-Kanälen, weswegen er alternativ als SK4 bezeichnet wird (Castle et al., 1989, Vergara et al., 1998). Anders als diese, wird der IK-Kanal allerdings überwiegend in nicht-neuronalen Geweben exprimiert. Neben Blut- oder Epithelzellen, ist der IK-Kanal auch in vielen Drüsengeweben, wie der Mamma zu finden (Suppiramaniam et al., 2010). Durch eine Calmodulin-Bindestelle im C-Terminus, ist die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Kanals zu erklären, welcher bei einer $[Ca^{2+}]_i$ von 300 nM öffnet (Pedarzani and Stocker, 2008).

BK-Kanäle besitzen die höchste K^+ -Leitfähigkeit von 100-300 pS. Neben einer zusätzlichen Transmembrandomäne zeichnet den BK-Kanal außerdem eine hohe Spannungssensitivität aus (Castle et al., 1989, Cui et al., 2009). Außerdem ist die Ca^{2+} -Abhängigkeit nicht mehr durch eine direkte Bindung an Calmodulin, sondern durch eine *Ca²⁺-bowl* im C-Terminus gesteuert (Meera et al., 1997).

1.3.2 Der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit (IK)

In den 50er Jahren das erste Mal durch György Gárdos in Erythrozyten beschrieben (Gárdos-Kanal), hat der IK-Kanal heute viele weitere Synonyme: $IK_{Ca}1$, $K_{Ca}3.1$, oder SK4 (Gardos, 1958, Steudel et al., 2017, Yoo et al., 2008). Codiert wird der Kanal durch das Gen KCNN4, welches den Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal mittlerer Leitfähigkeit exprimiert (Begenisich et al., 2004, Li et al., 2020).

1.3.2.1 Struktureller Aufbau und Funktionen von IK

Anders als der BK-Kanal besitzt der IK-Kanal nur eine funktionale Untereinheit, wobei 4 dieser Domänen ein Homotetramer bilden können (Kshatri et al., 2018). Wie in Abbildung 1.4 beschrieben, besteht die Untereinheit aus 6 Transmembrandomänen (TM), welche in der Lipiddoppelmembran verankert sind (Kshatri et al., 2018, Sforna et al., 2018). Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen innerhalb des Cytoplasmas. Die Porenregion ist zwischen Segment S5 und S6 angesiedelt und bedingt den K^+ -Efflux durch die Membran (Sforna et al., 2018). Anders als beim BK- oder SK-Kanal fehlt eine spannungssensitive Domäne, weswegen ausschließlich die Aktivierung durch Ca^{2+} möglich ist (Kshatri et al., 2018, Nguyen et al., 2017).

Die Grundlage für die Ca^{2+} -Sensitivität des IK-Kanals wird durch ein konstitutiv gebundenes Calmodulin im C-Terminus der α -Untereinheit gebildet. Als Linker dient dabei der *C-Lobe* des CaM, welcher die CaM-Bindedomäne trägt (Morales et al., 2013, Sforna et al., 2018). Pro Homotetramer sind somit 4 CaM konstant, auch in Abwesenheit von Ca^{2+} , komplexiert (Lee and MacKinnon, 2018). Durch die Bindung an CaM induziert Ca^{2+} eine Konformationsänderung, vermutlich über den *N-Lobe* des CaM, welche die Öffnung des Kanals ermöglicht (Ibrahim et al., 2021). Genauer postulieren Lee et al., dass nach der Bindung eine Konformationsänderung in den Linkern der Segmente 4,5 (S4,5 A und B) stattfindet. Dabei kommt es zu einer zum Cytosol gerichteten Bewegung von S4,5A und einem Abwenden von S4,5B weg von der Porenregion. Aufgrund dieser Änderungen arrangieren sich auch die S6 Helices um, was das Öffnen der Pore induziert (Lee and MacKinnon, 2018). Der K_D Wert für die Ca^{2+} -Bindung von IK-Kanälen beträgt etwa 300-500 nM und ist somit identisch mit der Affinität von CaM (Lee et al., 2003, Keen et al., 1999, Ledoux et al., 2006, Cahalan et al., 2001, Xia et al., 1998, Berkefeld et al., 2010). Durch Aktivierung des Kanals kommt es zum K^+ -Efflux und damit zu einer Hyperpolarisation des Plasmamembranpotenzials (Jensen et al., 2001, Ibrahim et al., 2021, Steudel et al., 2017). Als Folge des negativeren Potenzials wird der passive Transport von Cl^- oder Na^+ begünstigt, sowie über spannungsabhängige Kanäle auch Ca^{2+} in das Cytosol transportiert (Jensen et al., 2001). Dabei kommt es neben extrazellulärem Ca^{2+} -Influx auch zum Öffnen zellinterner Ca^{2+} -Speicher (Ibrahim et al., 2021, Huang and Jan, 2014, Huber, 2013, Berridge et al., 2003). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass IK-Kanäle die Rolle eines Schrittmachers in Kardiomyozyten übernehmen und die Ca^{2+} -Regulation im SR beeinflussen (Weisbrod et al., 2013). *Vice versa* konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die Entleerung des ERs auch IK-vermittelt Einfluss auf den Ca^{2+} -Influx haben kann. In einem kolorektalen Tumormodell zeigte sich, dass der IK-Kanal über die Veränderungen des Membranpotenzials den externen Ca^{2+} -Einstrom reguliert, bedingt durch leere interne Speicher (*store operated Ca^{2+} entry*, SOCE) und dabei die Zellmigration fördert (Ibrahim et al., 2021). Weitere Beispiele der Funktionalität des IK-Kanals und dessen Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase, werden in Abschnitt 1.3.2.2 erläutert.

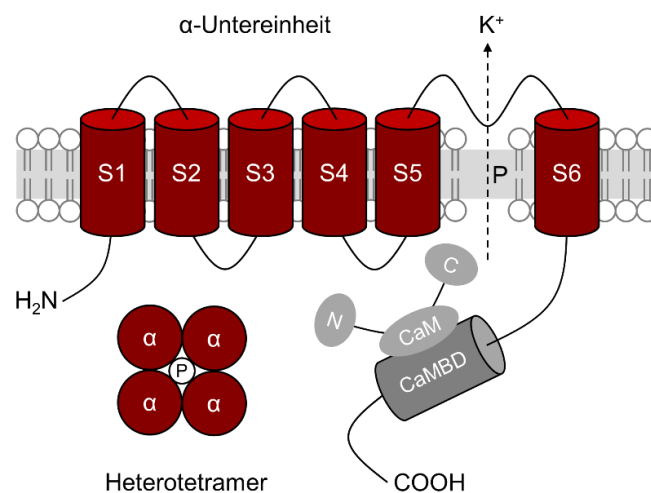


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des IK-Kanals

Funktionale IK-Kanäle sind Homotetramere, bestehend aus 4 α -Untereinheiten. Jede Untereinheit setzt sich aus sechs transmembranären Segmenten (S1–S6) zusammen. N- und C-Termini dieser Untereinheiten liegen intrazellulär. Die Porenregion (P) befindet sich zwischen Segment S5 und S6 und ermöglicht den K^+ -Efflux (schwarzer Pfeil). Calmodulin (CaM) ist im C-Terminus durch die CaM Bindedomäne (CaMBD) verankert und fungiert als Ca^{2+} -Bindestelle. Gebundenes Ca^{2+} initiiert eine Konformationsänderung über die N- und C-lobes des CaM (N/C) und sorgt somit für die Öffnung der Porenregion. (S: Transmembranäres Segment; P: Pore; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit).

1.3.2.2 Distribution und Pathophysiologie

Unter physiologischen Bedingungen werden IK-Kanäle in überwiegend nicht-erregbaren Epithel-, Endothel- und hämatopoetischen Zellen exprimiert (Jensen et al., 1998, Mohr et al., 2019b), obwohl neuere Studien auch eine Präsenz in erregbaren Zellen wie zentralen Neuronen und Kardiomyozyten postulieren (Engbers et al., 2012, Turner et al., 2015, Weisbrod et al., 2013). Neben den durch Gárdos identifizierten Erythrozyten wurden die Kanäle in B- und T-Lymphozyten, sowie im Dickdarm, Plazenta, Lunge und im Pankreas detektiert. Andere sekretorische Gewebe wie Speichel- oder Brustdrüsen weisen ebenfalls eine IK-Expressionen auf (Maher and Kuchel, 2003, Mohr et al., 2019b, Steudel et al., 2017, Begenisich et al., 2004, Feske et al., 2015, Ibrahim et al., 2021, Weisbrod et al., 2016). Durch die ubiquitäre Gewebedistribution lässt sich die immense physiologische Bedeutung des IK-Kanals abschätzen. So zeigen Veränderungen der Aktivität oder der Expressionslevel des IK-Kanals auch dessen Beteiligung in verschiedenen Pathologien.

Bekannt ist, dass der IK-Kanal in Erythrozyten für die Volumenregulation zuständig ist (Begenisich et al., 2004, Vandorpe et al., 1998). Kommt es aufgrund von einer Hypoxämie zur Polymerisation eines mutierten Hämoglobin S bei Sichelzellanämie, wird eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in Erythrozyten gemessen. Diese korreliert mit einer gesteigerten Aktivität des IK-Kanals, welcher durch den K^+ -Efflux einen exzessiven Wasserverlust erzeugt. Die somit entstandene Dehydratation der Erythrozyten induziert die typische Morphologie dieser Erkrankung (Wulff et al., 2007b, Begenisich et al., 2004, Brugnara, 2001, Brugnara, 2018). In einem *in vivo* Mausmodell für die Sichelzellanämie (SAD-Mäuse) konnte mit pharmakologischen IK-Inhibitoren eine Verbesserung der Hydratation in Erythrozyten erreicht werden (De Franceschi et al., 1994, Stocker et al., 2003). Aufgrund der vielversprechenden Datenlage wurde diese Behandlung auf den Menschen übertragen. In einer Phase III Studie mit dem selektiven IK-Inhibitor Senicapoc (1.3.2.5) wurde eine mögliche Therapie und Schmerzlinderung untersucht (Ataga et al., 2006, Ataga et al., 2008, Ataga and Stocker, 2009, Ataga et al., 2011). Zwar verbesserte Senicapoc die hämatologischen Laborparameter deutlich, allerdings konnte der primäre klinische Endpunkt nicht erreicht werden. Die IK-Inhibition sorgte leider nicht für die gewünschte Intervall-Verringerung vaso-okklusiver Schmerzkrisen, was darauf hindeutet, dass die Dehydratation der Erythrozyten nicht der einzige Faktor ist, welcher die Sichelzellanämie beeinflusst (Brown et al., 2018).

Darüber hinaus wurde der Einfluss des IK-Kanals bei bronchokonstriktorisches Erkrankungen wie Asthma bronchiale untersucht. Pathophysiologisch entsteht Asthma durch Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen wie Epithel- und Glattmuskelzellen, als auch zirkulierenden Immunzellen, sowie Umweltfaktoren wie Allergenen, Infektionen und Rauchen. Ein Schlüsselement dieses pathophysiologischen Prozesses ist die T-Helferzelle, welche eine chronische Entzündung auslöst, die Kontraktion der glatten Muskulatur begünstigt und das *Remodeling* der Atemwege steuert (Valverde et al., 2011). Der IK-Kanal wird von vielen Zellen exprimiert, die an der Entstehung von Asthma bronchiale beteiligt sind, und ist sowohl an inflammatorischen- als auch an *Remodeling*-Prozessen beteiligt (Girodet et al., 2013, Shumilina et al., 2008, Yu et al., 2017). Folglich konnte durch eine Blockade des IK-Kanals mittels TRAM-34 die Proliferation von Glattmuskelzellen und das Eindringen von Mastzellen in einem Mausmodell verhindert werden (Girodet et al., 2013). Dass diese Prozesse überwiegend auf die Intervention des IK-Kanals zurückzuführen sind, welche schließlich die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase beeinflussen, konnten Yu et al. in einem murinen *in vivo* Modell aufzeigen (Yu et al., 2017). Im weiteren Verlauf der Krankheit spielt auch die *mukoziliäre Clearance* eine Rolle, welche für den Abtransport von Schleim aus den Atemwegen verantwortlich ist. Durch

Inhibition des IK-Kanals konnte die Na⁺-Resorption vermindert werden, was zu einer geringeren Adhäsion des Mukus führte und somit das Abhusten erleichterte (Vega et al., 2020). Zusätzlich konnten in diesem *in vivo* Versuch auch Auswirkungen auf die Inflammation und Emphysembildung gezeigt werden, welche zu einer Verbesserung der Symptomatik unter IK-Blockade führten (Vega et al., 2020).

Des Weiteren konnte eine IK-Überexpression in kardialen Zellen gezeigt werden, welche zu einer myokardialen Entzündung, sowie Fibrosierung führen können (She et al., 2020). Auch auf Kardiomyozyten selbst konnte nach einem induzierten Herzinfarkt *in vivo* eine Veränderung der IK-Expression beobachtet werden (Weisbrod et al., 2013). Eine Inhibition mit TRAM-34 intervenierte in die Migration von Makrophagen und verbesserte dabei die Post-Infarkt-Symptomatik (Fei et al., 2019). In einem weiteren *in vivo* Modell konnte außerdem gezeigt werden, dass eine verstärkte Differenzierung in Kardiomyozyten, insbesondere in Richtung eines schrittmacherähnlichen Phänotyps, mit dem IK-Öffner 1-EBIO erzielt werden kann (Muller et al., 2012). Anschließend konnte durch Yang et al. der Einfluss des IK-Kanals auf Schrittmacherzellen durch (vermutlich Ca²⁺-vermittelte) Induktion des ERK1/2 Signalweges aufgezeigt werden (Yang et al., 2017).

Neben den oben erläuterten Auswirkungen des IK-Kanals auf verschiedene Immunzellen und pathophysiologischen Veränderungen, wurden weitere Erkenntnisse in autoimmunen Erkrankungen beobachtet. So konnte beispielsweise durch Clotrimazol die Ausschüttung des proinflammatorischen Interleukin-1 beta (IL-1β) vermindert werden, was sich positiv auf die Progression der rheumatoiden Arthritis auswirkte (Eugenia Schroeder et al., 2017). In einem Mausmodell für die autoimmune-Enzephalomyelitis zeigte eine Behandlung mit TRAM-34 eine protektive Wirkung, indem es zu einer Verringerung sowohl der TNF-α (Tumornekrosefaktor-α) als auch IFN-γ (Interferon-γ) Level führte und die Anzahl anderer proinflammatorischer Moleküle im Rückenmark senkte (Reich et al., 2005). Auch in einem Arteriosklerosemodell machten sich Toyama et al. den Einfluss des IK-Kanals auf Immunzellen zu Nutze (Toyama et al., 2008). Sowohl eine genetische-, als auch pharmakologische Inhibition des IK-Kanals führte dabei zu einer verminderten Proliferation der vaskulären Glattmuskelzellen, sowie Aktivierung der Makrophagen *in vivo*, welche die Entwicklung der Arteriosklerose verlangsamten (Toyama et al., 2008).

Diese Beispiele zeigen den breiten Einfluss des IK-Kanals auf verschiedene pathophysiologische Erkrankungen, welche nicht zuletzt durch die vielfältige Gewebedistribution zu erklären sind. Teilweise sind die Einflüsse direkt, über Änderungen des Membranpotenzials, oder des Ca²⁺-Haushaltes induziert, teilweise aber auch durch Veränderung des TMEs und des Immunsystems. Gerade das TME ist auch in der Tumorforschung von Interesse, da aufgezeigt werden konnte, dass beispielsweise Fibroblasten mit Tumorzellen kommunizieren und deren Wachstum fördern können (Mohr et al., 2019b). Des Weiteren wurde in vielen verschiedenen Tumorentitäten eine veränderte IK-Expression beobachtet (Mohr et al., 2019b, Steudel et al., 2017, Ibrahim et al., 2021, Pardo and Stuhmer, 2014)..

1.3.2.3 Bedeutung des IKs für die Krebsentstehung und Progression

Aufgrund der weitreichenden Distribution und veränderten Expression in verschiedenen Krebsarten, dienen IK-Kanäle als prognostischer Marker, sowie als neues Angriffsziel pharmakologischer anti-Tumortherapien (Mohr et al., 2019b, Todesca et al., 2021, Lastraioli et al., 2015). Durch eine veränderte Expression kann das Membranpotenzial, die Ca²⁺-Homöostase

und weitere Funktionen der Krebszelle verändert werden, wie in Abschnitt 1.3.2.1 erläutert wurde. Somit sind viele Funktionen des IKs (mit-) verantwortlich für das aggressive Verhalten von Krebszellen, bestehend aus der Migration, Invasion und Metastasierung, sowie Proliferation und Resistenzbildung (Todesca et al., 2021). Aufgrund dessen gilt eine therapeutische Adressierung des IK-Kanals als aussichtsreich. Ein weiterer Vorteil bietet die gute pharmakologische Erreichbarkeit von IK-Kanälen und erwiesene Verträglichkeit des *small molecule* Senicapoc im Menschen (siehe 1.3.2.5). Falls zukünftig präklinische *in vivo* Studien Erfolg versprechen sollten, wären beschleunigte Arzneimittelstudien ausgehend von Senicapoc denkbar (Todesca et al., 2021).

Um die präklinische Relevanz zu belegen, wurden in vielen Studien die Expressionslevel des IKs mit der Pathogenität des Tumors korreliert. Beispielsweise konnte in renalen Krebszellen eine doppelte so hohe IK-Expression gemessen werden, im Vergleich zu gesundem Gewebe (Todesca et al., 2021), welche mit einer schlechteren Prognose einhergingen (Rabjerg et al., 2015). Auch Brown et al. zeigten, dass der IK-Kanal in Glioblastomen überexprimiert ist (Brown et al., 2018, Stegen et al., 2015). Diese besonders aggressive Form der Hirntumore geht mit einer schlechten Prognose einher, was durch eine IK-Blockade signifikant verbessert wurde. Durch Behandlung mit TRAM-34 in einem Glioblastom-Mausmodell konnten sowohl die Tumorfiltration, als auch in Kombination mit dem Zytostatikum Temozolomid die Migration und Invasion reduziert werden (Brown et al., 2018, D'Alessandro et al., 2016, Turner et al., 2014). In der Glioblastom-Zelllinie U-87 MG wurde durch Clotrimazol ein G1-Arrest induziert, welcher mit erniedrigten CDK1 und -4, sowie p21 einherging. Der reduzierte Zellzyklus führt somit zu einer geringeren Proliferation. Des Weiteren kam es zur Translokation der mitochondrialen Hexokinase II, was eine verminderte glykolytische Aktivität mit sich brachte und eine Radiosensibilisierung, sowie eine über Cytochrom-c vermittelte Induktion der Apoptose bewirkte (Liu et al., 2010a).

Auch in Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinomen (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) wurden Expressionsunterschiede des K⁺-Kanals beobachtet (Bulk et al., 2015, Todesca et al., 2021). Diese Überexpression wurde durch eine Mutation der Promotorregion des IK-Kanals induziert (Bulk et al., 2015). So konnten auch Studien mit Lungen-Adenokarzinomen *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass die Depletion des IK-Kanals zu einer Verminderung der Proliferation, Migration, Invasion und auch Tumorgenese, sowie zur Erhöhung der Tumor-Apoptose führen kann (Xu et al., 2021). Da vor allem die Migration und Metastasierung das Mortalitätsrisiko erhöhen, könnte der IK-Kanal dahingehend ein interessantes Ziel sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der IK während der Migration vermehrt im hinteren Areal des Zellkörpers aktiv ist und über die Modulation der Ionenkonzentrationen das Volumen verändert, was letztlich zur Retraktion des sich bewegenden Zellkörpers führt (Schwab et al., 2012, Schwab et al., 2006). Die dabei entstehenden Oszillationen sind essentiell für die Fortbewegung und können durch die Blockade des IK-Kanals die gerichtete Migration verlangsamen (Schwab et al., 2012).

In pankreatischen duktalem Adenokarzinomen (PDAC) konnte eine durch AP-1 Mutation (Transkriptionsfaktor) hervorgerufene Überexpression des KCNN4-Gens detektiert werden (Mo et al., 2022, Wu et al., 2021b). Dies zeigte sich in einer schlechteren Prognose und verkürztem Überleben (Jiang et al., 2017, Mo et al., 2022). Dabei konnte der Knockdown des IK-Kanals, durch die Beeinflussung des MET/AKT-Signalweges, zu einer verminderten Proliferation und Migration führen (Mo et al., 2022). Jäger *et al.* bestätigten dies durch die Behandlung mit den IK-Inhibitoren TRAM-34 und Clotrimazol *in vitro* (Jäger et al., 2004).

Das KCNN4-Gen ist ebenso in kolorektalen Karzinomen überexprimiert, besonders wenn außerdem das K-RAS Gen (codiert ein G-Protein im RAS/MAPK-Signalweg) mutiert vorliegt (Ibrahim et al., 2021). Durch den damit verbundenen Ca^{2+} -Einstrom werden Signalwege in Gang gesetzt, welche die Migration und Invasion fördern. Beide Prozesse sind maßgeblich an der Metastasierung beteiligt und fördern somit eine erhöhte Mortalität (Ibrahim et al., 2021). Durch eine Inhibition des IK-Kanals konnten sowohl der Ca^{2+} -Strom aus internen Speichern, als auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reduziert werden (Ibrahim et al., 2021). Auch die EMT wird durch die IK-bedingte Runterregulation von E-Cadherin induziert. Dieser Übergang ist wichtig für das Migrationsverhalten von Tumorzellen und demonstrierte durch die Gabe von TRAM-34 eine direkte Inhibition (Lai et al., 2013, Zhang et al., 2016). TRAM-34 kann ebenso die Phosphorylierung cyclinabhängiger Kinasen und den G2/M Übergang des Zellzyklus inhibieren, und somit die Proliferation von Kolonkarzinomzellen mindern (Lai et al., 2011). Wie viele Krebsentitäten weisen auch Kolonkarzinome einige Resistenzen auf, so beispielsweise gegen das *First line* Medikament Cisplatin. Um diesem Resistenzmechanismus zu entgehen, konnte in Studien eine Kombinationstherapie mit IK-Aktivator (SKA-31) und hERG1-Kanalinhistor (E4031) zu ersten Erfolgen *in vivo* führen (Pillozzi et al., 2018).

Auch in hormonabhängigen Krebsarten wurden unterschiedliche Expressionslevel des IK-Kanals gefunden. So zum Beispiel in serösen Ovarialkarzinomen, bei welchem erhöhte KCNN4 Level mit einer stärkeren Rezidivrate einhergingen (Zhao et al., 2016). Geringere Rezidivraten können durch reduzierte Zellmigration begünstigt werden, da die Distribution von Zweitumoren eingeschränkt wird. Durch Blockade des IK-Kanals beispielsweise, wird die Interaktion mit dem purinergen Rezeptor P2Y2 gestört, welcher für die ATP-vermittelte Migration in ovariellen Tumorzellen verantwortlich ist und sich somit negativ auf Rezidive auswirkt (Mohr et al., 2019b, Robles-Martinez et al., 2017).

In Brusttumoren sind IK-Kanäle in der Modulation des Zellzyklus, des Proliferations- und des Migrationsverhaltens involviert. Durch die Veränderung des Membranpotenzials kann der Influx von Ca^{2+} gesteigert werden, wodurch die späte G1 Phase, sowie nachfolgend der G1/S Übergang des Zellzyklus über Ca^{2+} -Oszillationen induziert wird (Mohr et al., 2019b, Ouadid-Ahidouch et al., 2004). Dementsprechend führt der Anstieg von G1 gleichzeitig zu einer Modulation von S und G2/M. Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass durch Blockade des IK-Kanals in MCF7 Zellen alle drei Phasen unterbunden werden, und somit die Proliferation verlangsamt wird (Mohr et al., 2019b, Ouadid-Ahidouch et al., 2004). Interessanterweise stimulierte das laktationsfördernde Hormon Prolaktin, welches mit erhöhtem Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht wird, IK-abhängig die Proliferation von MCF7 Zellen (Faouzi et al., 2010). Der Einfluss auf das Membranpotenzial, die Ca^{2+} -Homöostase und das Wachstumsverhalten konnte am hiesigen Institut in einem IK-Knockoutmodell mit primären MMTV-PyMT Brustkrebszellen ebenfalls verifiziert werden (Steudel et al., 2017). Dabei wurden neben der genetischen Ablation des IK-Kanals auch pharmakologische Ansätze mittels TRAM-34 etabliert (Steudel et al., 2017, Todesca et al., 2021).

Hinsichtlich des Migrationsverhaltens zeigten *in vitro* Versuche, dass in trippel negativen MDA-MB-231 Zellen, die Inhibition des IK-Kanals zu einer Blockade von Vimentin und SNAI1, und somit der EMT führen kann (Zhang et al., 2016). Darüber hinaus verstärkt die Überexpression von KCNN4 bei Brustkrebs die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Antimetaboliten wie Gemcitabin. Dies geschieht durch die Hochregulierung des BCL2-Proteins A1 (BCL2A1), welches über RAS/MAPK- und PI3K/AKT-Signalkaskaden die Apoptose unterdrückt. BCL2A1 ist ein Mitglied der anti-apoptotischen BCL-2-Familie, die nachweislich für Resistenzen gegen

Krebsmedikamente verantwortlich ist (Lin et al., 2021b, Todesca et al., 2021). Somit können durch IK-Inhibition pro-apoptotische Prozesse in Gang gesetzt werden (Zhang et al., 2016).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Überexpression des IK-Kanals mit einer schlechteren Prognose und vermehrten energieverbrauchenden Prozessen einhergeht. Somit stellt sich die Frage, ob der IK-Kanal auch direkt metabolische Stoffwechselwege in Tumorzellen insbesondere Brustkrebszellen beeinflusst.

1.3.2.4 Auswirkungen des IK-Kanals auf den Energie-Metabolismus in Tumorzellen

Es ist allgemein bekannt, dass Krebszellen während der Transformation ihre Stoffwechselwege anpassen, um einen Überlebensvorteil zu erlangen und den gestiegenen Energieverbrauch zu kompensieren (siehe Abbildung 1.3) (Martinez-Reyes and Chandel, 2021). Zur Energiegewinnung dient in Tumorzellen überwiegend die OxPhos, wobei ebenso die weniger effiziente aerobe Glykolyse (Warburg Effekt) betrieben wird (siehe 1.1.2) (Hanahan and Weinberg, 2011, Kovalenko et al., 2016). Da die verstärkte Glykolyse vermehrt Glukose benötigt, werden Transporter wie GLUT1 in die Membran eingebaut. Dieses *Remodeling* ist ein Beispiel für die Anpassungsfähigkeit des Tumor-Metabolismus und abhängig von vielen Faktoren, unter anderem K⁺-Kanälen (Hanahan and Weinberg, 2011, Szablewski, 2013). In Dünndarmzellen wurde postuliert, dass K⁺-Kanäle durch Änderungen der Ca²⁺-Homöostase oder des Membranpotenzials die Glukoseaufnahme induzieren können (Chen et al., 2016). Auch der IK-Kanal ist in Dünndarmzellen exprimiert und könnte, wie durch andere Kanäle gezeigt, aufgrund des K⁺-Ausstroms den Na⁺-abhängigen Glukosetransport begünstigen (Chen et al., 2016, Du et al., 2019). Auch im weiteren Verlauf der Glykolyse spielt K⁺ eine große Rolle, da die Hexokinase Isoform II (HKII), ein initiales Schrittmacherenzym der Glykolyse, für ihre enzymatische Aktivität K⁺ benötigt (Bischof et al., 2021, Burgstaller et al., 2022a). Es ist also nicht auszuschließen, dass der IK-Kanal auch HKII-abhängige Effekte auf den Tumormetabolismus besitzt. Allerdings ist wenig über den Einfluss von K⁺-Kanälen auf die Glykolyse in Krebs bekannt. Lediglich korrelierende Expressionslevel von KCNN4 und GLUT1, sowie eine Hochregulation des Glukose-Metabolismus in Leberzellen konnten postuliert werden (Fan et al., 2022a, Magi et al., 2019).

Ebenso wurden einige Auswirkungen auf die mitochondrielle Funktion und die OxPhos postuliert. Kovalenko *et al.* konnten in Pankreaskarzinomzellen durch *Seahorse*- und siRNA-Analysen zeigen, dass der IK-Kanal regulatorische Eigenschaften bei der Sauerstoffaufnahme und nachfolgend auf die OxPhos hat (Kovalenko et al., 2016). Allerdings konnte die Arbeitsgruppe keinen genauen Mechanismus etablieren, wie der K⁺-Kanal die ATP-Produktion beeinflusst (Kovalenko et al., 2016). Eine mögliche Theorie betrachtet die Volumenregulation und den Einfluss des Membranpotenzials auf die Atmungskette (Kovalenko et al., 2016). Beides setzt das Vorhandensein des IK-Kanals in den Mitochondrien voraus. Obwohl viel darüber diskutiert wird, konnte in verschiedenen Krebsentitäten gezeigt werden, dass der IK-Kanal tatsächlich in der inneren mitochondrialen Membran exprimiert wird (mitoIK) (De Marchi et al., 2009, Szabo et al., 2021, Leanza et al., 2014, Sassi et al., 2010). Durch einen mitochondrialen K⁺-Zyklus, bestehend aus elektrophoretischem-, Kanal- und „leck“-vermitteltem K⁺-Einstrom und einem K⁺-Ausstrom über den K⁺/H⁺-Austauscher, kann der für die OxPhos relevante H⁺-Gradient aufrecht erhalten werden (Sassi et al., 2010). Ein direkter Einfluss des Kanals auf diese Prozesse konnte bis *dato* allerdings noch nicht verifiziert werden. Allerdings wurde durch die Behandlung mit TRAM-34 eine mitochondrielle Hyperpolarisation und ROS-Produktion gemessen. Des

Weiteren konnte eine Translokalisierung des pro-apoptotischen Proteins BAX ins Mitochondrium beobachtet werden (Leanza et al., 2014, Sassi et al., 2010, Bauer et al., 2017), was wiederum eine Beteiligung des IKs nahelegt. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass auch der mitoIK-Kanal durch Ca^{2+} aktiviert werden kann, sowie nachfolgend die $[\text{Ca}^{2+}]$ im Mitochondrium beeinflusst (Rotko et al., 2020). Da Ca^{2+} -Level direkt mit der OxPhos korrelieren, könnte dies die Beobachtungen von Kovalenko et al., dass der IK regulatorischen Einfluss auf die ATP-Produktion (via OxPhos) in Pankreaskarzinomzellen hat, untermauern (Fink et al., 2017, Kovalenko et al., 2016, Petersen and Verkhratsky, 2016). Nichtsdestotrotz ist der Einfluss des IK-Kanals auf die ATP-Produktion, die OxPhos und Glykolyse nur sehr spärlich untersucht, bzw. in Brustkrebszellen gänzlich ausstehend. Zusätzlich sind IK-Kanäle, außer in der diabetischen Nephropathie (Huang et al., 2021), nicht in Zusammenhang mit Autophagie untersucht worden. In dieser Arbeit werden deswegen gezielt Einflüsse des IK-Kanals auf Mitochondrien, die Energiehomöostase und die Autophagie analysiert.

1.3.2.5 IK Modulatoren

Aufgrund der großen Gewebedistribution und Forschungsrelevanz wurden einige Modulatoren des IK-Kanals entwickelt. Neben (agonistischen) Kanal-Aktivatoren wie 1-EBIO, SKA 31 oder NS309 sind auch einige (antagonistische) Inhibitoren bekannt. Dazu zählen neben dem ursprünglich entdeckten Charybdotoxin (CHX), auch NS6180, Senicacpoc oder Triarylmethan-34 (TRAM-34), welches ein Analogon von Clotrimazol darstellt (Benzaquen et al., 1995, Ishii et al., 1997, Coleman et al., 2014). 1-Ethyl-2-Benzimidazolinon (1-EBIO) ist ein unspezifischer Öffner von K_{Ca} - und insbesondere IK-Kanälen, welcher neben der Hyperpolarisation auch zu einer Cl^- -Sekretion führt (Coleman et al., 2014, Devor et al., 1996). Mit einem EC_{50} von ca. 30 μM ist 1-EBIO weniger potent als NS309 (EC_{50} : 20 nM) oder SKA 31 (EC_{50} : 200 nM) und wird deswegen nur zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt (Coleman et al., 2014). SKA 31 erlaubt aufgrund der verbesserten Halbwertszeit zwar eine Untersuchung *in vivo*, allerdings ist die Selektivität aller bisherigen Kanalöffner eingeschränkt, sodass neben IK auch weitere Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle, oder sogar Na^+ -Kanäle aktiviert werden (Coleman et al., 2014).

Neben den vorbenannten Aktivatoren stehen zur Untersuchung der IK-Funktionalität auch Kanalinhhibitoren zu Verfügung. Das Antimykotikum Clotrimazol (1-[(2-Chlorphenyl)diphenylmethyl]-1H-Imidazol) zeigt neben der inhibierenden Wirkung auf den IK-Kanal auch noch agonistische Effekte an CaM und moduliert somit additiv die Ca^{2+} -Homöostase (Kadavakollu et al., 2014, Wulff et al., 2001). Die durch Clotrimazol (IC_{50} : 920 nM) entstehende Entleerung der Ca^{2+} -Speicher vermindert unter anderem die Proliferation von Tumorzellen und induziert die Apoptose (Kadavakollu et al., 2014, Nilius and Wohlrab, 1992). Aufgrund seiner direkten inhibitorischen Wirkung auf das Cytochrom P3A4 werden allerdings oft Alternativen verwendet (Wulff et al., 2000). Ein nicht so toxisches Derivat des Clotrimazols stellt TRAM-34 da (Wulff et al., 2000, Wrzosek et al., 2022). Obwohl keine Zulassung für humane Behandlungen besteht, weist TRAM-34 eine gute Verträglichkeit im Tiermodell auf, was auf einem geringen IC_{50} von 20-25 nM zurückzuführen ist. Auch eine höhere Selektivität für den IK-Kanal, als für BK, SK oder K_V -Kanäle ist ein Vorteil (Wrzosek et al., 2022, Wulff et al., 2007b, Mohr et al., 2019b). Eine Behandlung mit TRAM-34 konnte auch den Ca^{2+} -Einstrom in T-Zellen verhindern, was die Effektivität des Blockers widerspiegelt (Wulff et al., 2007b). Auch in dosisabhängigen Versuchen konnte die Proliferation verschiedener Zellen fast vollständig unterbunden werden (Mohr et al., 2019b, Xie et al., 2018). Des Weiteren wurde TRAM-34 auch zur Behandlung von Restenosen nach einer Angioplastie oder bei Transplantatabstoßungen untersucht (Wulff et

al., 2007a, Wulff et al., 2007b). Durch die vier Ringsysteme stellt TRAM-34 eine stark lipophile Verbindung da, welche in die Zelle diffundiert und intrazellulär an einem Threonin (Thr²⁵⁰) aller vier Untereinheiten des Kanals angreift. Dabei positioniert sich der Pyrazol-Ring des TRAM-34 so, dass er mit dem Thr²⁵⁰ des Kanals Wasserstoffbrückenbindungen eingeht und somit den K⁺-Einstrom in die Filterregion des IK-Kanals verhindert. Der Efflux des K⁺ ist somit gestört (Brown et al., 2018).

Senicapoc (ICA-1704) besitzt eine ähnliche chemische Struktur und Wirkmechanismus wie TRAM-34, weist aber eine höhere Affinität zum IK-Kanal auf (IC₅₀ 11 nM) (Mohr et al., 2019b, Wulff et al., 2000, McNaughton-Smith et al., 2008). Ursprünglich zur Behandlung der Sichelzellanämie entwickelt, wurde Senicapoc auch in respiratorischen Erkrankungen wie ARDS (akutes Atemnotsyndrom) oder Asthma, sowie Morbus Alzheimer und verschiedenen Tumoren untersucht (Petersen et al., 2021, Petersen et al., 2022, Todesca et al., 2021, Wulff and Castle, 2010, Jin et al., 2019). Vorteil von Senicapoc ist die gute Verträglichkeit beim Menschen, welche durch verschiedene Phase I–III Studien bewiesen wurden (Ataga et al., 2006, Ataga et al., 2008, Ataga and Stocker, 2009, Jin et al., 2019), sowie seine orale Bioverfügbarkeit und längere Halbwertszeit von 12 d (2 h bei TRAM-34) (Brown et al., 2018).

Grundlage zur Übertragung von präklinischen Modellen auf therapeutische Verfahren ist die Adressierung eines Zielproteins mit pharmakologischen Substanzen. Durch die oben erwähnten Modulatoren des IK-Kanals ist somit einerseits die Aktivierung, als auch Blockade des IKs adressierbar, was ergänzend zu einem genetischen Knockout (KO)-Modell, pharmakologisch die Rolle des IK-Kanals in der Forschung validiert. Darauf aufbauend könnten im Anschluss die IK Modulatoren auch für Tier- oder Humanmodelle verifiziert werden und neue Erkenntnisse über die Rolle des Kanals *in vivo* liefern.

2 Zielsetzung

Das Mammakarzinom zählt weltweit zu der häufigsten Tumorerkrankung der Frau und geht mit der höchsten Mortalitätsrate einher. Trotz evidenzbasierter Medizin und wechselnder Regime sind die Therapieoptionen des Mammakarzinoms limitiert. Durch die hohe Mutagenität kommt es oft zu Resistenzen gegen gängige Chemotherapeutika und somit zu Rezidiven. Aufgrund dessen ist die Erforschung neuer potentieller Angriffsmechanismen unabdingbar für die Eradikation und Progressionsverlangsamung des Tumors. Die zielgerichteten Therapeutika, wie beispielsweise Trastuzumab bei HER2 positiven Brustkrebs, oder der CDK 4/6 Inhibitor Palbociclib, zeigen dabei Angriffsstrukturen, welche explizit in der Krebszelle verändert vorkommen. Da, neben Tyrosinkinase, auch Ionenkanäle oft mit einer veränderten Expression im Mammakarzinom vorliegen, wird ihnen ein großes Interventionspotenzial zugesprochen. Allen voran Kalium (K⁺)-Kanäle sind aufgrund ihrer großen Distribution und Variabilität, Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte.

Da zahlreiche Publikationen einen kausalen Zusammenhang zwischen der Tumorprogression und dem Calcium (Ca²⁺)-abhängigen K⁺-Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit (IK) postulieren, ist ein Ziel dieser Arbeit, die pathophysiologische Rolle sowie einen möglichen therapeutischen Nutzen des IK-Kanals im Mammakarzinom näher zu beleuchten. Durch ein genetisch verändertes MMTV-PyMT-Mausmodell konnte in vorangegangenen Studien bereits eine Korrelation des Tumorstadiums mit dem IK KO Status beobachtet werden. Diese Befunde sind Grundlage für die hier durchgeführten zellbasierten Experimente zur Aufklärung der relevanten biomolekularen Pro- bzw. Antitumor-Mechanismen im Kontext von IK. Dabei wird sich an den von Hanahan und Weinberg aufgestellten *Hallmarks of cancer* orientiert, welche neben zahlreichen Charakteristika der Tumorentwicklung auch die Reprogrammierung des Metabolismus aufgeführt haben. Prozesse wie die Tumorpheriferation, Migration oder Metastasierung sind dabei Energie-verbrauchend, was im Umkehrschluss eine vermehrte Energie-Produktion veranlasst und die Homöostase aufrechterhält. Daher zielt die zweite Fragestellung dieser Doktorarbeit auf die Rolle des IK-Kanals im Metabolismus und der Energie-Homöostase in Brustkrebszellen ab. Vorrangig wird dabei die, oft in Krebszellen veränderte, Glykolyse (Warburg Effekt) und die Oxidative Phosphorylierung analysiert. Unter Verwendung verschiedener biochemischer, immunhistologischer und FRET-basierter *Imaging*-Methoden soll der Zusammenhang zwischen Tumorentwicklung und Metabolismus, sowie IK-Kanalfunktion aufgeklärt werden. Zusammengefasst ergeben sich daraus folgende Ziele:

1. Charakterisierung des IK-abhängigen Wachstums- und Metastasierungsverhaltens der MMTV-PyMT Zellen (Energiekonsumierende Prozesse).
2. Einfluss des IK-Kanals auf die Calciumhomöostase in verschiedenen zellulären Organellen und dem Cytosol.
3. Charakterisierung der Bedeutung von IK für die glykolytische Aktivität und die mitochondrielle ATP-Produktion in MMTV-PyMT Zellen.
4. Rolle der AMPK als Bindeglied des metabolischen *Remodelings*.
5. Regulation der Autophagie durch IK und mögliche Folgen für den Metabolismus in MMTV-PyMT Zellen.

3 Material

In den Abschnitten 3.1 bis 3.3 sind die verwendeten Mauslinien, Geräte, die zugehörige Software und generelles Verbrauchsmaterialien aufgelistet. Ab 3.4 sind versuchsspezifische Materialien, Substanzen und Puffer aufgeführt, welche für die Methoden (Abschnitt 0) benötigt werden.

3.1 Mauslinien

Bezeichnung	Transgen	Hersteller
FVB/N	FVB/N CrI	Charles River
MMTV-PyMT ^{tg/+}	FVB/N-Tg ^{(MMTV-PyVT)634Mul/J}	The Jackson Laboratory
IK	IK KCNN4 ^{tm1.1Jele/RuLu}	Prof. P. Ruth/ Prof. R. Lukowski Universität Tübingen
BK	KCNMA1 ^{tmRuth/RuLu}	Prof. P. Ruth/ Prof. R. Lukowski Universität Tübingen

3.2 Geräte und Software

Geräte	Gerätebezeichnung, Hersteller
Absaugpumpe	KNF Laborport, Neuberger
Abzug	Verm. Vinitex
Autoklav (Sterilisation)	VX-55, Systec
Autoklav (Zellkultur)	VX-120, Systec
Brutschrank	Binder und HERA Cell
BCA-Plattenlesegerät	Sunrise Remote, F039300, Tecan
Eismaschine	AF 103, Scotsman
Gefrierschrank -20°C	Comfort NoFrost, Liebherr
Gefrierschrank -80°C	HFU 586 Basic, Kendro Laboratory Proucts
Gelelektrophorese-Kammer (Genotypisierung)	Fige Mapper Cell, Bio-Rad
Gelelektrophorese-Kammer (Western Blot)	Mini Protean Tetra Cell, Bio-Rad
Gelgieß-Apparatur	Bio-Rad
Kämme (10 und 15 Taschen)	Bio-Rad
Glasplatten 0,75 mm Spacer	Bio-Rad
Glasplatten, Deckglas	Bio-Rad
Glasfärbekammern	Carl Roth
Hamilton-Spritze	Carl Roth
Heizplatte/ Magnetrührer	50383, IKA-Combimag RCT
Heizschrank (80°C)	FD 115, Binder
Histoscanner	Pannoramic Desk, 3DHISTECH
Inkubationsschrank (Klonierung)	WTB Binder
IVC Anlage	Tecniplast
IVC Haltungskäfige T2 long	1145T, Tecniplast
IVC Haltungskäfige T3	1500U, Tecniplast
Kryokonservierungsgerät (Mr. Frosty)	Nalgene
Kryostat-Mikrotom	Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank (Labor)	Liebherr
Kühlschrank (Zellkultur)	Liebherr
Mikroskop Durchlicht (Zellkultur)	DMIL LED, Leica
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf Mikro 220R, Hettich Zentrifugen

Mikroskop I (Durchlicht)

Weißbalancefilter
 Neutralfilter N 0,50
 Neutralfilter N 0,25
 Kamera
 Software AxioVision

Axiovert 200 M (Invers), Carl Zeiss
 000000-155-789, Carl Zeiss
 467857-0000-000, Carl Zeiss
 467849-0000-000, Carl Zeiss
 AxioCa Carl Zeiss m MRc Rev.3, Carl Zeiss
 Rel. 4.8

Mikroskop II (FURA-2, TMRM)

Lampe
 Kamera
 Splitter
 Software VisiView

Axiovert, Carl Zeiss
 pE-340, CoolLED
 AxioCam MRc Rev.3, Carl Zeiss
 Optosplit II, Visitron Systems
 Visitron

Mikroskop III (FRET-Sensoren)

Lampe
 Filter
 Objektiv
 Kamera
 Splitter
 Software VisiView

Zeiss Observer Z.1, Carl Zeiss
 LED-Hub, Omicron
 AHF Analysentechnik
 Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil immersion
 pco.panda 4.2 bi sCMOS camera, pco.
 Optosplit II, Cairn Research
 Visitron

Mikroskop IV (Fluoreszenz, Histologie)

Lampe
 ApoTome
 Kamera
 Stromquelle
 Carl Zeiss Zen view blue edition

Zeiss Observer Z.1, Carl Zeiss
 HBO 100
 Apotome.2, Carl Zeiss
 AxioCam 503 mono, Carl Zeiss
 Power Supply 230
 Carl Zeiss

Mikrowelle
 PCR-Cycler
 PCR-Cycler, gradient
 Perfusionssystem
 pH-Meter 761 Calmatic
 Photometer
 Präparationsbesteck, Ohrlochstanze
 Pipette (10, 20, 200, 1000µl)
 Pipettierhilfe
 Plate Reader
 Filter: 570 nm ± 25 nm
 qPCR- Cycler
 Reinstwasseranlage
 Rotor (4°C)
 Rotor (20°C)
 Schieblehre
 Schüttelplatte
 Seahorse Analyzer
 Sterilwerkbank

MW9675, Severin
 Mastercycler, Eppendorf
 Mastercycler, Eppendorf
 NGFI GmbH
 Knick
 P330, Implen
 FST
 Discovery Comfort, HTL
 PipettBoy accujet, Brand
 Infinite F200 Pro, Tecan
 Tecan
 CFX Connect, Bio-Rad
 Purelab flex, Veolia
 GFL 3025, Hilab
 RS-TR05, Phoenix Instrument
 30087-00, Fine Science Tools
 Unimyx 1010, Heidolph Instrument
 XF24, Agilent Technologies
 Safe 2020, Thermo Fisher Scientific
 HeraSafe, Heraeus
 P25, Biometra
 Compact, Eppendorf
 BioDoc, Analyze, Biometra
 FS 3604, Severin
 Vortex Gene 2, Scientific Industries
 BP 2100 S, Sartorius
 Mettler PM 4600, DeltaRange
 SW-20C, Julabo
 Amersham Imager 600, GE Healthcare
 V20-SDB, Topac
 Multifuge X1R, Heraeus

Stromquelle
 Thermomixer
 UV-Detektor Agarosegele
 Vakuumier-Schweißgerät
 Vortexer
 Waage (Analyse)
 Waage (Fein)
 Wasserbad
 Western Blot-Imager
 Western Blot-Kammer (semi-dry)
 Zentrifuge (Zellkultur)

Zentrifuge (50er Tubes, Klonierung)
Zentrifuge (Klonierung, Ultrazentrifuge)

Megafuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific
Centrifuge 5910 R, Eppendorf

Software / Online-Tool	Hersteller	Verwendung
Acrobat Reader	Open Source, Adobe Inc.	PDF-Reader
Agilent XF24 Software	Agilent	Seahorse-Messungen
Axiovision Rel 4.8	Carl Zeiss	Mikroskopie
BioDocAnalyze	Biometra	Gel-Dokumentation
BioRender	BioRender	Illustrationen
BLAST	Online Freeware	Sequenz Überprüfung
CaseViewer	3DHISTECH Ltd.	Histologie Scanner
CellProfiler	Open Source, CellProfiler	Analyse Software, p62
CFX Manager V3.1	Bio-Rad	qPCR
Clustal Omega V.2.1	EMBL-EBI	Sequenzanalyse
Ensembl	Online Freeware	Primer-Generierung
Graphpad Prism V. 8.4.0	Graphpad Software, Inc.	Statistik und Graphen
ImageJ Version 1.53k	Open Source, NIH	Analyse Software
ImageQuant TL 9.0	GE Healthcare	Quantifizierung Western Blot
InkScape V. 1.1	Open Source, Inkscape	Graphen
Microsoft Office 365	Microsoft	Word, Excel, PowerPoint
NCBI	Online Freeware	Literaturrecherche
Perfusions-Software	NGFI perfusion	Perfusion Medien
Primer3	Online Freeware	Primer-Generierung
SnapGene	GSL Biotech	Plasmid-Generierung
TCGA	Online Freeware	mRNA Expression
VisiView V.4.5.0	Visitron	Fluoreszenz-Mikroskopie
Zen view blue edition	Carl Zeiss	Fluoreszenz-Mikroskopie

3.3 Generelles Verbrauchsmaterial

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
Becherglas	5,0 l	Carl Roth	C121.1
	2,0 l		C119.1
	600 ml		C116.1
Deckgläser	30 mm rund	VWR	ECN 631-1585
	24x60 mm	Marienfeld	0107242
DPEC H ₂ O		Carl Roth	T143
Eppendorf-Reaktionsgefäß	1,5 ml	Eppendorf	0030 12.0.086
	2,0 ml	Sarstedt	72.695.500
Erlenmeyerkolben	1 l	Thermo Fisher	15466133
	500 ml	Scientific	15429113
	250 ml		15409113
Handschuhe	L	Carl Roth	AYA8.1
Handschuhe Zytostatika	XL	Berner	4040
Multiwell Gefäße	6 Well	Corning	3506
	96 Well		3599
	96 Well, konisch		3894
Objektträger		Epredia	15438060
Petrischale	100 mm	Corning	430167
	35 mm		430165
Pipettenspitzen (gestopft)	10 µl	Greiner Bio one	765288
	20 µl		774288
	200 µl		739288
	1000 µl		740288
Pipettenspitzen	10 µl	Sarstedt	70.1116

(ungestopft)	20-200 µl		70.760.012
	1000 µl		70.762.010
Schraubdeckelgläser	2 l	Thermo Fisher	11942835
	1 l	Scientific	11982243
	500 ml		15476113
	250 ml		11738151
Skalpell		Feather	02.001.30.021
Stripetten	2 ml	Corning	4486
	5 ml		4487
	10 ml		4488
	25 ml		4489
	50 ml		4490
Tücher	Zellstoff	VWR	115-2762
	Fusselfrei	Kimtech, VWR	115-2221
Wägeschalen	41x41x8 mm	Carl Roth	1878.2
	89x89x25 mm		1884.1
Wägebapier		Macherey-Nagel	MN226
Whatman Papiere	0,35 mm	Carl Roth	CL66,1
Zellkulturflaschen	T25	Corning	430639
	T75		430641
	T175		431080
Zentrifugationsröhrchen	15 ml (klein)	Corning	430766
	50 ml (groß)		430921
Zytostatika Verbrauchsmaterial	Matte	Berner	8101
	Kittel		6901

3.4 Substanzen, Puffer, Lösungen und Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurde generell autoklaviertes, demineralisiertes Wasser (dH₂O) verwendet.

3.4.1 Genotypisierung

Im Folgenden werden alle Materialien von der DNA-Isolation bis zur Detektion aufgelistet.

3.4.1.1 DNA-Isolation und Amplifikation

Biopsie, DNA-Isolation

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D 8418
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	PeqLab	07-KK7352-02
Ohrlochstanze	IST	KN-292-2-1

DNA-Isolations Puffer (pro Probe)

KAPA Express Extract Enzyme (1 U/µl)	1 µl
KAPA Express Extract Buffer, 10x	5 µl
dH ₂ O	44 µl

Primer

Zielstruktur	Forward/Reverse	Sequenz 5' - 3'
MMTV-PyMT	F1	GGA AGC AAG TAC TTC ACA AGG G
	R1	GGA AAG TCA CTA GGA GCG GG
	F2	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	R2	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 TCA TCC TCG GG
	F2	AAG GGC CAT TTT GAA GAC GTC
	R	CCA GCC ACA GTG TTT GTT GG

3.4.1.2 Gelelektrophorese

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
2-Log-DNA-Ladder	NEB	32000-S
Agarose LE	Biozym Scientific	840004
Agarose	Genaxxon	M3044.0500
Borsäure	Carl Roth	6943.3
Bromphenolblau	Serva	15375
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth	8043.2
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	E1510
Ficoll® 400	Carl Roth	CN90.3
Tris	Carl Roth	5429.2
Xylencyanol	Sigma-Aldrich	X4126

EDTA (0,5 M) pH 8,0

EDTA	186,1 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ pH mit NaOH auf 8,0 einstellen

Bromphenolblau-Lösung

Bromphenolblau	110 mg
dH ₂ O	2 ml

10x TBE-Puffer

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M) pH 8,0	40 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

1x TBE-Puffer

10x TBE-Puffer	100 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

1,5% Agarosegel

Agarose	4,5 g
Ethidiumbromid	30 µl
1x TBE-Puffer	Ad 300 ml

2% Agarosegel

Agarose	6 g
Ethidiumbromid	30 µl
1x TBE-Puffer	Ad 300 ml

3% Agarosegel

Agarose	9 g
Ethidiumbromid	30 µl
1x TBE-Puffer	Ad 300 ml

Xylencyanol-Lösung

Xylencyanol	100 mg
dH ₂ O	2 ml

6x Ladepuffer

Ficoll® 400	9 g
EDTA (0,5 M) pH 8,0	12 ml
10x TBE-Puffer	30 ml
dH ₂ O	Ad 47 ml

→ 1h bei 60°C rühren

Bromphenolblau-Lösung 1,35 ml

Xylencyanol-Lösung 1,5 ml

→ Zugabe Farbstofflösungen

2-Log-DNA-Marker

2-Log-DNA-Ladder	20 µl
6x Ladepuffer	40 µl
dH ₂ O	180 µl

3.4.2 In vivo Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Chirurgische Schere	FST	14101-14
Ethanol 80 %	Sigma Aldrich	34963 + Verdünnt
Gewebepinzette	FST	11021-12
IMEM mit Phenolrot	Thermo Fisher	A1048901
Kryokonservierungsgefäß 1xPBS	1,8 ml Cryo Tube Nunc	363632
Pinzette	Thermo Fisher	14190094
Schieblehre	FST	11000-12
Skalpell	FST	30087-00
Wattestäbchen, steril	Feather	02.001.30.021
	CareLiv, OHG	3204

3.4.3 Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Absaugpipetten, Glas	ungestopft Carl Roth	4522.1
Collagenase D	Roche	11 088 866 001
Deckgläser	30 mm, rund VWR	ECN 631-1585
Dimethylsulfoxid Hybri-Max™	(DMSO) Sigma Aldrich	D2650
Earls Balanced Salt Solution	(EBSS) Sigma Aldrich	E3024
Fetales Kälberserum	(FCS) Thermo Fisher Sc.	10270106
Kammer-Objekträger	8-Well PCA Sarstedt	94.6140.802
Modified Improved Minimal Es- sential Medium (IMEM)	mit Phenolrot ohne Phenolrot Thermo Fisher Sc.	A1048901 A1048801
Multiwell Gefäße	6 Well 96 Well, flat 96 Well, konisch Corning	353224 3988 3894
Penicillin/Streptomycin	(Pen/Strep) Thermo Fisher Sc.	15140122
Phosphat-gepufferte Lösung	(1xPBS) Thermo Fisher Sc.	14190094
Trypanblau	0,4% in 1xPBS Sigma Aldrich	93595
Trypsin	10x Thermo Fisher Sc.	15400054
Zählkammern C-Chip	(Hämozytometer) Merck Millipore	PDHC-N01
Zellkulturgefäße	Flasche 25 cm ² Flasche 75 cm ² Flasche 175 cm ² Petrischale 55 cm ² Petrischale 35 cm ² Corning	430639 430641 431080 430167 430165
Zellsieb	40 µm Corning	352340

Chemikalien

Die aufgeführten Chemikalien, welche in der Zellkultur Verwendung finden, sind im Rahmen von S1 (Biologische Sicherheitsstufe 1) Laboren nutzbar. Für Arbeiten mit potenziell cancerogenen, mutagenen und reproduktionstoxischen Wirkstoffen (CMR) wurde nur in speziell präparierten Sterilwerkbänken hantiert. Genauer ist in Abschnitt 4.4.3 aufgeführt. Die potenziellen CMR-Stoffe sind in nachfolgender Tabelle kenntlich gemacht.

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
5-Fluorouracil	CMR	Sigma-Aldrich	F6627
Bafilomycin A1		Merck Millipore	196000
Cyclophosphamid	CMR	Sigma-Aldrich	218707
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma-Aldrich	D 8418
Docetacel	CMR	Sigma-Aldrich	01885
Doxorubicin	CMR	Sigma-Aldrich	D1515
Paxilline		Sigma-Aldrich	P2928
TRAM-34		Pharm. Chemie, Universität Tübingen	Eigenherstellung (Prof. Dr. Pierre Koch)

Zellkulturmedium

IMEM mit Phenolrot	475 ml
FCS	25 ml
Pen/Strep	5 ml

Zellkulturmedium, Serumentzug

IMEM ohne Phenolrot	500 ml
Pen/Strep	5 ml

1x Trypsin

10x Trypsin	1 ml
1xPBS	9 ml

TRAM-34 (5 mM)

TRAM-34	17,25 mg
DMSO	10 ml

→ 1 ml Aliquot, Lagerung bei -20°C

TRAM-34 (10 µM)

TRAM-34 (5 mM)	20 µl
Zellkulturmedium	Ad 10 ml

TRAM-34 (2 µM)

TRAM-34 (10 µM)	2 ml
Zellkulturmedium	8 ml

Bafilomycin A1 (100 µM)

Bafilomycin A1	10 µg
DMSO	160 µl

Bafilomycin A1 (100 nM)

Bafilomycin A1 (100 µM)	10 µl
Zellkulturmedium	Ad 10 ml

Bafilomycin A1 (100 nM) in EBSS

Bafilomycin A1 (100 µM)	10 µl
EBSS	Ad 10 ml

Paxilline (5 mM)

Paxilline	21,78 g
DMSO	10 ml

→ 1 ml Aliquot, Lagerung bei -20°C

Paxilline (5 µM)

Paxilline (5 mM)	10 µl
Zellkulturmedium	Ad 10 ml

Zytostatika

Alle Zytostatika-Lösungen wurden äquivalent mit 10 µM TRAM-34 Lösung statt Zellkulturmedium hergestellt.

Cyclophosphamid (50 mM)

Cyclophosphamid	139,55 mg
DMSO	Ad 10 ml

Cyclophosphamid (1000 µM)

Cyclophosphamid (50 mM)	200 µl
Zellkulturmedium	9,8 ml

Cyclophosphamid (100 µM)

Cyclophosphamid (1000 µM)	1 ml
Zellkulturmedium	9 ml

Cyclophosphamid (10 µM)

Cyclophosphamid (100 µM)	1 ml
Zellkulturmedium	9 ml

Docetaxel (10 mM)

Docetaxel	80,78 mg
DMSO	Ad 10 ml

Docetaxel (10 µM)

Docetaxel (10 mM)	10 µl
DMSO	Ad 10 ml

Docetaxel (100 nM)

Docetaxel (10 µM)	100 µl
Zellkulturmedium	9,9 ml

Docetaxel (10 nM)

Docetaxel (100 nM)	1 ml
Zellkulturmedium	9 ml

Docetaxel (1 nM)

Docetaxel (10 nM)	1 ml
Zellkulturmedium	9 ml

Doxorubicin (10 mM)

Doxorubicin	57,99 mg
DMSO	Ad 10 ml

Doxorubicin (10 µM)

Doxorubicin (10 mM)	10 µl
DMSO	Ad 10 ml

Doxorubicin (1000 nM)

Doxorubicin (10 µM)	1 ml
Zellkulturmedium	9 ml

Doxorubicin (100 nM)

Doxorubicin (1000 nM)	1 ml
Zellkulturmedium	9 ml

Doxorubicin (10 nM)

Doxorubicin (100 nM)	1 ml
Zellkulturmedium	9 ml

5-Fluorouracil (50 mM)

5-Fluorouracil	65,04 mg
DMSO	Ad 10 ml

5-Fluorouracil (50 µM)

5-Fluorouracil (50 mM)	10 µl
DMSO	Ad 10 ml

5-Fluorouracil (500 nM)

5-Fluorouracil (50 µM)	100 µl
Zellkulturmedium	9,9 ml

5-Fluorouracil (100 nM)

5-Fluorouracil (500 nM)	2 ml
Zellkulturmedium	8 ml

5-Fluorouracil (10 nM)

5-Fluorouracil (100 nM)	1 ml
Zellkulturmedium	9 ml

3.4.3.1 Primärzellgewinnung

Collagenase-Lösung

Collagenase D	10 mg
IMEM mit Phenolrot	Ad 10 ml

Kryomedium

DMSO Hybri-Max™	20 %
Zellkulturmedium	Ad 100 %

3.4.4 RNA-Analytik

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
Abdeck-Folie für 96 Well		Bio-Rad	MSB-1001
Chloroform		Sigma-Aldrich	372978
DEPC-behandeltes H ₂ O		Carl Roth	T143
DNase I recombinant	RNAse frei	Roche	04716728001
Ethanol, absolut p.a.		Sigma-Aldrich	34963
Fetales Kälberserum	(FCS)	Thermo Fisher Sc.	10270106
iScript cDNA Synthesekit		Bio-Rad	170-8891
Isopropanol		Carl Roth	6752.3
Multiwell Platte	96 Well	Bio-Rad	MLL-9601
PeqGOLD RNA pure		PeqLab	30-1010
Phosphat-gepufferte Lösung	(1xPBS)	Life Technologies	14190094
Tücher	fusselfrei	Kimberley Clark	AA64.1
Primer		Eurofins mwg	s.u.
SsoAdvanced™ Universal	SYBR® Green Supermix	Bio-Rad	170-8882

75% Ethanol

Ethanol, absolut p.a.	75 % (V/V)
DEPC-H ₂ O	25 % (V/V)

Primer-Verdünnung

Primer-Stock (100 pmol/μl)	2 %
DEPC-H ₂ O	98 %

qPCR-Mastermix

SsoAdvanced™ Universal	7,5 μl
SYBR® Green Supermix	
Primer F	2,25
Primer R	2,25
cDNA	3 μl

Primer

Alle Primer wurden von Eurofins mwg hergestellt und geliefert.

Zielstruktur	Forward/Reverse	Sequenz 5´ - 3´
AMPK α 1	F	GGT GTA CGG AAG GCA AAA TGG C
	R	CAG GAT TCT TCC TTC GTA CAC GC
AMPK β 2	F	GAC TTC GTT GCC ATC CTG GAT C
	R	CCA AGC TGA CTG GTA ACC ACA G
AMPK γ 1	F	TCT CCG CCT TAC CTG TAG TGG A
	R	GCA GGG CTT TTG TCA CAG ACA C
Cadherin E	F	GGT CAT CAG TGT GCT CAC CTC T
	R	GCT GTT GTG CTC AAG CCT TCA C
Cadherin N	F	CCT CCA GAG TTT ACT GCC ATG AC
	R	CCA CTG ATT CTG TAT GCC G
CaMKK2	F	CAA CGT GGT GAA GCT GGT AGA G
	R	TGG TCT TCG GAC AGT GGC TTG A
HPRT	F	CTG GTG AAA AGG ACC TCT CGA AG
	R	CCA GTT TCA CTA ATG ACA CAA ACG
Integrin β 1	F	CTC CAG AAG GTG GCT TTG ATG C
	R	GTG AAA CCC AGC ATC CGT GGA A
Integrin β 1	F	GTG AGT GCG ATG ACT TCT CCT G
	R	CAG GTG TCA GTG CGT GTA C
LC3B	F	GTC CTG GAC AAG ACC AAG TTC C
	R	CCA TTC ACC AGG AAG G
LKB1	F	GCC TGG AAT ACC TAC ACA GCC A
	R	GCA GGT GTC ATC CAC AGC GAA A
β -Actin	F	CAT TGC TGA CAG GAT GCA GAA GG
	R	TGC TGG AAG GTG GAC AGT GAG G

3.4.5 Proliferationsanalysen

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
μ -dishes grid-500	(Grid-Platten)	Ibidi	81166
Fetales Kälberserum	(FCS)	Thermo Fisher Sc.	10270106
Kammer-Objektträger	8-Well PCA	Sarstedt	94.6140.802
Modified Improved Minimal Essential Medium	(IMEM)	Thermo Fisher Sc.	
	mit Phenolrot		A1048901
	ohne Phenolrot		A1048801
Penicillin/Streptomycin	(Pen/Strep)	Thermo Fisher Sc.	15140122
Phosphat-gepufferte Lösung	(PBS)	Thermo Fisher Sc.	14190094
Trypsin	10x	Thermo Fisher Sc.	15400054

3.4.6 Migrations- und Invasionsanalysen

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
Boyden-Kammer	8 μ m Porengröße	Greiner Bio-One	657638
THINCERT Zellkultureinsätze			
Aquatex [®] aqueous mounting agent		VWR	363123S
Fetales Kälberserum	(FCS)	Thermo Fisher Sc.	10270106
Modified Improved Minimal Essential Medium	(IMEM)	Thermo Fisher Sc.	
	mit Phenolrot		A1048901
	ohne Phenolrot		A1048801
Kristallviolett-Lösung	1%	Sigma-Aldrich	V5265
MaxGel [™] ECM		Merck-Millipore	E0282

Multiplatte	6 Well	Corning	353224
Objektträger		Epredia	15438060
Paraformaldehyd	(PFA)	Carl Roth	0335.2
Penicillin/ Streptomycin	(Pen/Strep)	Thermo Fisher Sc.	15140122
Phosphat-gepufferte Lösung	(1xPBS)	Thermo Fisher Sc.	14190094
Skalpell		Feather	02.001.30.021
Trypsin	10x	Thermo Fisher Sc.	15400054
Wattestäbchen, steril		CareLiv, OHG	3204

4% PFA

Paraformaldehyd	20 g
1xPBS	500 ml

→ Unter Rühren auf 60°C erwärmen

3.4.7 Histologische Methoden

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
1,4-Dithiothreitol	(DTT)	Carl Roth	6908.4
4',6-Diamidin-2-phenylindol	(DAPI)	Thermo Fisher	62247
Aluminiumfolie		Carl Roth	2596.1
Ammoniak (NH ₃)	30-33 %	Carl Roth	P093.2
Aquatex® aqueous mounting agent		VWR	363123S
Bovines Serumalbumin	(BSA)	Carl Roth	8076.2
Deckgläser		Carl Roth	L426.1
DePeX mounting medium		VWR	3612540
DNase		Roche	04716728001
Einbettmedium Neg-50™		Thermo Fisher	6506
Eosin-G-Lösung	(0,5%)	Carl Roth	X833.1
Essigsäure	100 %	Carl Roth	3738.5
Ethanol, absolut p.a.		Sigma-Aldrich	34963
Fettstift		Vector Laboratories	H-4000
Glasobjektträger Superfrost® Plus		Thermo Scientific	J1800AMNZ
Glycin		Carl Roth	3908.3
Hämatoxylin-Lösung		Carl Roth	X903.2
MCF7-Zelllinie		AG Prof. H. Brauch, IKP Stuttgart	–
Messer Mikrotom		Thermo Scientific	MX35
Mounting Medium Vectashield		Vector Laboratories	H-1200
Nagellack		Absolute pure, Es-sence	01
Normales Donkey-Serum	(NDS)	Dianova	017-000-121
Saccharose	(D+)	Carl Roth	9097.1
Toluol		Carl Roth	7115.1
Triton	X100	Carl Roth	3051.2
Tween 20®		Carl Roth	9129.1

Gewebeschnitte

4% PFA

Paraformaldehyd	20 g
1xPBS	500 ml

→ Unter Rühren auf 60°C erwärmen

5% Saccharose

D(+)-Saccharose	0,5 g
1xPBS	10 ml

10% Saccharose

D(+)-Saccharose	1 g
1xPBS	10 ml

20% Saccharose

D(+)-Saccharose	2 g
1xPBS	10 ml

Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Artikelnummer
Anti-IK	Maus	Proteintech	60276-1-Ig
Anti-p62	Kaninchen	MBL International	PM045
Anti-Ki-67	Kaninchen	CST	9129S
Phalloidin-Alexa 647	(F-Aktin-Sonde)	Thermo Fisher Sc.	A22287
Anti-Erα (MC-20)	Maus	Santa Cruz Biotech.	sc-542

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Artikelnummer
Alexa Fluor® 555 anti-Kaninchen	Esel	Thermo Fisher Sc.	A31572
Alexa Fluor® 555 anti-Maus	Ziege	Thermo Fisher Sc.	A21127
Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen	Ziege	Thermo Fisher Sc.	A11008
Alexa Fluor® 488 anti-Maus	Ziege	Thermo Fisher Sc.	A21131

Immunfluoreszenzfärbung

0,3% Triton PBS

Triton X100	1,5 ml
1xPBS	500 ml

→ Lagerung bei 4°C

1xPBS/T

Tween 20®	0,1 %
1xPBS	500 ml

→ Lagerung bei 4°C

70% Ethanol

Ethanol, absolut p.a.	70 % (V/V)
dH ₂ O	30 % (V/V)

→ Lagerung bei 4°C

100% NDS-Lösung

NDS (lyophilisiert)	600 mg
dH ₂ O	10 ml

→ 1 ml Aliquote, Lagerung bei -20°C

10% NDS-Lösung

100% NDS-Lösung	1 ml
0,3% Triton PBS	9 ml

1,5% NDS-Lösung

10% NDS-Lösung	1,5 ml
0,3% Triton PBS	8,5 ml

DAPI Stock-Lösung (1 mg/ml)

DAPI	10 mg
dH ₂ O	10 ml

→ 1 ml Aliquote, Lagerung bei -20°C

DAPI (0,1 µg/ml)

DAPI Stock-Lösung	0,5 µl
0,3% Triton PBS	5 ml

p62 Multiplexfärbung

4% PFA

Paraformaldehyd	20 g
1xPBS	500 ml

→ Unter Rühren auf 60°C erwärmen

Block-Lösung

1xBSA	1 %
1xPBST/T	10 ml

→ Lagerung auf Eis

3.4.8 Biochemische Methoden

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
6-Amincapronsäure		Sigma-Aldrich	037K0045
Ammoniumperoxodisulfat	(APS)	Carl Roth	9592.2
Bovines Serumalbumin	(BSA)	Carl Roth	0163.2
Bromphenolblau		Serva	15375
cOmplete Mini, EDTA frei	(Protease-Inhibitoren)	Roche	11836153001
Coomassie-Brilliant-Blue G250		Carl Roth	3862.2
Dimethylsulfoxid	(DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
Ethanol, absolut p.a.		Sigma-Aldrich	34963
Glycerin		Carl Roth	3783.1
Glycin		Carl Roth	3908.3
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	(HEPES)	Carl Roth	9105.3
Isopropanol		Carl Roth	9866.2
Küvetten		Greiner Bio-One	613101
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	(MgCl ₂)	Merck	1.05833.1000
Membran Immobilon® Millipore	PVDF FL	Carl Roth	T831.1
Methanol		Carl Roth	4629.2
Milchpulver	Blotting grade	Carl Roth	T145.1
Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O		Carl Roth	8043.2
Na-Deoxycholate	10 %	Thermo Fisher Sc.	89904
Natriumazid	(NaN ₃)	Carl Roth	K305
Natriumchlorid	(NaCl)	Carl Roth	9265.3
Natriumdodecylsulfat	(SDS)	Carl Roth	5136.2
Natriumfluorid	(NaF)	Carl Roth	P756.1
Natriumpyrophosphat	(NaPP)	Carl Roth	T883.1
Natriumvanadat	(Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich	450243
Nonidet P-40		Thermo Fisher Sc.	85124
Phosphat-gepufferte Lösung	(1xPBS)	Life Technologies	14190094
Phosphorsäure	(84,5%)	Carl Roth	6366.1
Pierce™ BCA Protein Assay Kit		Thermo Fisher Sc.	23227
Proteinmarker PeqGold IV		PeqLab	27-2110
Rotilabo Filterpapiere	(0,35 mm)	Carl Roth	CL69.1
Rotiphorese® Gel 30	(37,5:1)	Carl Roth	3029.2
Saccharose	D(+)	Carl Roth	4621.2

Tetramethylethyldiamin	(TEMED)	Carl Roth	2639.3
Tricin		Carl Roth	6979.1
Tris-HCl		Carl Roth	5429.2
Triton	X-100	Carl Roth	3051.2
Tween 20®		Carl Roth	9129.1

3.4.8.1 BCA-Proteinbestimmung

RIPA-Puffer

NaCl (5 M)	30 ml
Tris-HCl (1 M)	50 ml
Nonidet P-40	10 ml
10 % SDS	10 ml
10 % Na-Deoxycholate	50 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ Lagerung bei 4°C

RIPA-Puffer (1:25)

RIPA-Puffer	1 ml
dH ₂ O	24 ml

BSA (400 µg/ml)

BSA Stock (2 mg/ml)	200 µl
RIPA-Puffer (1:25)	800 µl

BSA (200 µg/ml)

BSA (400 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

BSA (100 µg/ml)

BSA (200 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

BSA (50 µg/ml)

BSA (100 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

BSA (25 µg/ml)

BSA (50 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

BSA (12,5 µg/ml)

BSA (25 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

BSA (6,25 µg/ml)

BSA (12,5 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

BSA (3,125 µg/ml)

BSA (6,25 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

BSA (1,56 µg/ml)

BSA (3,125 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

BSA (0,78 µg/ml)

BSA (1,56 µg/ml)	500 µl
RIPA-Puffer (1:25)	500 µl

3.4.8.2 Proteingewinnung

Na₃VO₄ (0,1 M)

Na ₃ VO ₄	184 mg
dH ₂ O	Ad 10 ml

→ mit NaOH auf pH 10,0 4 einstellen

NaCl (1,5 M)

NaCl	876,6 mg
dH ₂ O	Ad 100 ml

NaPP (0,2 M)

NaPP	797,7 mg
dH ₂ O	Ad 15 ml

EDTA (1 M)

Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O	37,224 g
dH ₂ O	Ad 100 ml

Bradford-Lösung

Coomassie-Brilliant-Blue	100 mg
Phosphorsäure (84,5%)	50 µl
Ethanol, absolut p.a.	50 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

10% Triton X-100

Triton X-100	5 ml
dH ₂ O	50 ml

NaF (1 M)

NaF	629,85 mg
dH ₂ O	Ad 15 ml

HEPES (1 M)

HEPES	47,662 g
dH ₂ O	Ad 200 ml

→ mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

Lysepuffer L

NaCl (1,5 M)	1 ml
NaPP (0,2 M)	500 µl
NaF (1 M)	100 µl
10% Triton X-100	1 ml
HEPES (1 M)	500 µl
Na ₃ VO ₄ (0,1 M)	200 µl
EDTA (1 M)	10 µl
dH ₂ O	Ad 10 ml

→ Zugabe von 1 Tablette cComplete Mini, EDTA-frei vor Gebrauch

3.4.8.3 Gelelektrophorese

10x Elphor

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ mit NaOH auf pH 8,3 einstellen

Tris (1,8 M)

Tris	218,052 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ mit NaOH auf pH 8,8 einstellen, autoklavieren

1x Elphor

10 x Elphor	100 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

4x Laemmli

SDS	5 g
Tris	2,4 g
Glycerin	40 ml
Bromphenolblau	4 mg
dH ₂ O	Ad 100 ml

→ mit HCl auf pH 6,7 einstellen
1 ml Aliquote, Lagerung bei -20°C

Tris (0,6 M)

Tris	72,684 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ mit NaOH auf pH 6,8 einstellen, autoklavieren

30% APS

APS	15 g
dH ₂ O	50 ml

10% SDS

SDS	10 g
dH ₂ O	Ad 100 ml

10% APS

APS	5 g
dH ₂ O	50 ml

Zweistufige Gele

11,5% Trenngel

Rotiphorese® Gel 30	6,5 ml
Tris (1,8 M)	3,6 ml
dH ₂ O	6,5 ml
10% SDS	167 µl
TEMED	20 µl
30% APS	66,6 µl

→ pro 4 Gele

5% Sammelgel

Rotiphorese® Gel 30	830 µl
Tris (0,6 M)	500 µl
dH ₂ O	3,6 ml
10% SDS	50 µl
TEMED	10 µl
30% APS	20 µl

→ pro 4 Gele

Gradienten-Gele

Tricin-Gelpuffer

Tris	363,42 g
Tricin	537,51 g
SDS	0,3 %
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ mit NaOH auf pH 8,45 einstellen

Trenngel

Rotiphorese® Gel 30	10 ml
Tricin-Gelpuffer	5 ml
Glycerin	2 ml
TEMED	14 µl
10% APS	90 µl

→ pro 4 Gele

Spacergel

Rotiphorese® Gel 30	2 ml
Tricin-Gelpuffer	1,6 ml
dH ₂ O	1,3 ml
TEMED	6 µl
10% APS	20 µl

→ pro 4 Gele

Sammelgel

Rotiphorese® Gel 30	1 ml
Tricin-Gelpuffer	1,55 ml
dH ₂ O	3,7 ml
TEMED	12 µl
10% APS	60 µl

→ pro 4 Gele

3.4.8.4 Western Blot

Anode 1-Puffer

Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ mit HCl auf pH 10,4 einstellen

Anode 2-Puffer

Tris	3,6 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ mit HCl auf pH 10,4 einstellen

Kathodenpuffer

Tris	3 g
6-Aminocaprinsäure	5,8 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ mit HCl auf pH 7,6 einstellen

10x TBST

Tris	12,1 g
NaCl	82,3 g
Tween 20®	5 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ mit HCl auf pH 8,0 einstellen

1x TBST

10x TBST	100 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ steril filtrieren

5% Milchpuffer-Blocklösung

Milchpulver	2,5 g
1x TBST	50 ml

→ frisch herstellen

5% BSA-Blocklösung

BSA	2,5 g
1x TBST	50 ml

→ frisch herstellen

Antikörperverdünnungslösung

BSA	5%
Natriumazid	0,05%
1x TBST	10 ml

→ Lagerung bei 4°C

Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Artikelnummer
anti- α Tubulin	Maus	CST	DM1A
anti-AKT	Kaninchen	CST	9272
anti-pAKT, Ser ⁴⁷³	Kaninchen	CST	4060
anti-AMPK	Kaninchen	CST	23A3
anti-pAMPK, Thr ¹⁷²	Kaninchen	CST	40H9
anti-Calmodulin (CaM)	Kaninchen	Proteintech	10541-1-AP
anti-CaMMK2	Maus	Proteintech	11549-1-AP
anti-GAPDH	Kaninchen	CST	14C10
anti-LC3B	Kaninchen	NovusBiologicals	NB100-2220
anti-LKB1	Kaninchen	Proteintech	10746-1-AP
anti-pLKB1, Ser ⁴²⁸	Kaninchen	CST	C67A3
anti-p62	Kaninchen	MBL	PM045
anti-ULK1	Kaninchen	CST	D8H5
anti-pULK1, Ser ⁵⁵⁵	Kaninchen	Proteintech	80218-1-RR

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Artikelnummer
CY5 anti-Kaninchen	Ziege	Amersham	29038278
Cy3 anti-Maus	Ziege	Amersham	29038275

3.4.9 Plasmid-Generierung

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
5 α competent E. coli	NEB	C2987I
AgarAgar	Carl Roth	2266.1
Agarose LE	Biozym Scientific	840004
Ampicillin	Carl Roth	K029.2
Cut Smart-Puffer	NEB	B6004S

Hefextrakt		Carl Roth	2363.2
Kanamycin		Carl Roth	T832.1
Monarch® Gel Extraction	Kit	NEB	T1020
Monarch® Plasmid Miniprep	Kit	NEB	T1010
Natriumchlorid	(NaCl)	Carl Roth	9265.3
Plasmid DNA Purification, NuceloBond Xtra Maxi®	Kit	Macherey-Nagel	740414.50
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase		NEB	M0491S
Restriktionsenzym HindIII		NEB	R3104S
Restriktionsenzym NheI		NEB	R3131S
Restriktionsenzym XhoI		NEB	R0146S
T4 DNA Ligase		NEB	M0202S
Taq DNA Polymerase	+ ThermoPol Puffer	NEB	M0267S
Trypton		Carl Roth	8952.2
Zentrifugationsflaschen		Nalgene, Thermo Fisher Scientific	10028850

LB-Agar

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
AgarAgar	13,5 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren

Ampicillin-Stock (50 mg/ml)

Ampicillin	250 mg
dH ₂ O	Ad 5 ml

→ Sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

Selektiv-LB-Agarplatten Ampicillin

Ampicillin-Stock	200 µl
LB-Agar	100 ml

→ LB-Agar in Mikrowelle erwärmen, Lagerung der Platten bei 4°C

Selektiv-LB-Medium Ampicillin

Ampicillin-Stock	1 ml
LB-Medium	Ad 500 ml

→ 100 µg/ml, Lagerung bei RT

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren

Kanamycin-Stock (50 mg/ml)

Kanamycin	250 mg
dH ₂ O	Ad 5 ml

→ Sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

Selektiv-LB-Agarplatten Kanamycin

Kanamycin-Stock	100 µl
LB-Agar	100 ml

→ LB-Agar in Mikrowelle erwärmen, Lagerung der Platten bei 4°C

Selektiv-LB-Medium Kanamycin

Kanamycin-Stock	500 µl
LB-Medium	Ad 500 ml

→ 50 µg/ml, Lagerung bei RT

Primer für KCNN4-emiRFP 670-Kolonie-PCR

Zielstruktur	Forward/Reverse	Sequenz 5' - 3'
KCNN4	F	TAC GCT AGC ATG GGC GGG GAG CTG G
	R	ATG CTC GAG AGA GCC TCC ACC GCC AGA GCC
		TCC ACC GCC TGT GGC CTC CTG GCT GGG
	R Validierung	GCA TGG AAG ACC ACA ATA AG

emiRFP670

F
RAGA CTC GAG ATG GCG GAA GGC TCC GTC
CTC AAG CTT TTA GCT CTC AAG CGC GGT GAT
C**Plasmide**

Plasmid	Funktion	Hersteller	Artikelnummer
4mt D3 cpV	Mitochondrieller CFP/YFP FRET-basierter Calcium-Indikator	Addgene	58184, M. Davidson
AKTAR	Cytosolischer CFP/YFP FRET-basierter AKT Aktivitäts-Reporter	Addgene	61624, J. Zhang
AMPKAR	Cytosolischer CFP/YFP FRET-basierter AMPK Aktivitäts-Reporter	Addgene	35097, I. Cantley
Car-GECO1	Cytosolischer, single-fluoreszierender nah-infrarot Calcium-Indikator	Addgene	45493, R. Campbell
Cyto GEPII 1.0 (Ic-LysM)	Cytosolischer CFP/YFP FRET-basierter Kalium-Indikator	Eigenproduktion	H. Bischof
D1ER	CFP/YFP FRET-basierter Calcium-Indikator im endoplasmatischen Retikulum	Eigenproduktion	Von H. Bischof/ R. Malli/ R. Tsien/ A. Palmer
KCNN4 (untagged)	Nicht Fluorophorgekoppeltes KCNN4-Plasmid (für Maus)	OriGene	MC200643
Laconic	Cytosolischer YFP/CFP FRET-basierter Laktat-Indikator	Addgene	44238, L. F. Barros
Mito GEPII 1.0 (Ic-LysM)	mitochondrieller CFP/YFP FRET-basierter Kalium-Indikator	Eigenproduktion	H. Bischof
mtAT1.03	mitochondrieller CFP/YFP FRET-basierter ATP-Indikator	Eigenproduktion	Hiromi Imamura/ R. Malli/ H. Bischof
NesAT1.03	Cytosolischer CFP/YFP FRET-basierter ATP-Indikator	Eigenproduktion	Hiromi Imamura/ R. Malli/ H. Bischof
pH-Lemon LC3B	LC3B gekoppelter YFP/CFP FRET-basierter pH-Indikator	Eigenproduktion	R. Malli
Pyronic	Cytosolischer YFP/CFP FRET-basierter Pyruvat-Indikator	Addgene	51308, L. F. Barros
TORCAR	Cytosolischer CFP/YFP FRET-basierter mTORC1 Aktivitäts-Reporter	Addgene, Eigenherstellung	64927, R. Malli/ H. Bischof

3.4.10 Fluoreszenzbasiertes-Imaging

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	(HEPES)	Carl Roth	HN78.3
2,5-Di-t-butyl-1,4-benzohydroquinone	(BHQ)	Sigma Aldrich	286888
2-Desoxy-D-Glukose	(2-DG)	ChemCruz	sc-202010
(2-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-2-Desoxyglucose)	(2-NBDG)	BioGems	1860768
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide	(MTT)	ThermoFisher Scientific	M6494
Adenosintriphosphat	(ATP)	Carl Roth	K054.3
Bay-8002		Sigma Aldrich	SML2670
Calciumchlorid	(CaCl ₂)	Carl Roth	5239.3

Carbonyl Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon	(FCCP)	ChemCruz	sc-203578
Dimethylsulfoxid	(DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
Ethylenglycol-bis(aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure	(EGTA)	Carl Roth	3054.2
FURA-2		AAT Bioquest	21027
Glukose-Monohydrat		Carl Roth	6889.1
GlutaMAX™ Supplement	100X (200 mM L-Glutamin)	Thermo Fisher Scientific	35050061
Gramicidin		Sigma Aldrich	50845
Ionomycin		Fermentek	56092-82-1
Kaliumchlorid	(KCl)	Carl Roth	6781.1
Magnesiumchlorid	(MgCl ₂)	Carl Roth	A539.1
MEM Amino Acids Solution	50X (Aminosäuren)	Thermo Fisher Sc.	11130051
Natriumchlorid	(NaCl)	Carl Roth	9265.2
N-Methyl-D-glucamin	(NMDG)	Sigma Aldrich	66930
Oligomycin-A		ChemCruz	sc-202263
PolyJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent		SignaGen	SL100688
Tetramethylrhodamin-methylester	(TMRM)	Invitrogen	11550796

3.4.10.1 Analysenpuffer und Sensoren

Alle Messpuffer wurden ergänzend mit jeweils 2 µM TRAM-34 hergestellt. Dazu werden 400 µl TRAM-34 (5 mM) in 1000 ml Messpuffer verdünnt und auf einen pH von 7,42 eingestellt.

NaCl (1 M)

NaCl	58,44 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

KCl (1 M)

KCl	74,55 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

CaCl₂ (100 mM)

CaCl ₂	11,10 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

MgCl₂ (100 mM)

MgCl ₂	9,52 g
dH ₂ O	Ad 1000 ml

Messpuffer

NaCl (1000 mM)	140 ml
KCl (1000 mM)	5 ml
CaCl ₂ (100 mM)	20 ml
MgCl ₂ (100 mM)	10 ml
HEPES	2,38 g
Glukose-Monohydrat	1,99 g
GlutaMAX™	10 ml
MEM Amino Acids	20 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ auf pH 7,42 einstellen, frisch herstellen

Messpuffer, calciumfrei

NaCl (1000 mM)	140 ml
KCl (1000 mM)	5 ml
MgCl ₂ (100 mM)	10 ml
HEPES	2,38 g
Glukose-Monohydrat	1,99 g
EGTA	380,35 mg
GlutaMAX™	10 ml
MEM Amino Acids	20 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ auf pH 7,42 einstellen, frisch herstellen

Messpuffer, glukosefrei

NaCl (1000 mM)	140 ml
KCl (1000 mM)	5 ml
CaCl ₂ (100 mM)	20 ml
MgCl ₂ (100 mM)	10 ml
HEPES	2,38 g
NMDG	488,05 mg
GlutaMAX™	10 ml
MEM Amino Acids	20 ml
dH ₂ O	Ad 1000 ml

→ auf pH 7,42 einstellen, frisch herstellen

FCCP (5 mM)

FCCP	12,70 mg
DMSO	Ad 10 ml

→ 100 µl Aliquote, Lagerung auf -20°C

Oligomycin-A (3 mM)

Oligomycin-A	23,73 mg
DMSO	Ad 10 ml

→ 100 µl Aliquote, Lagerung auf -20°C

ATP (100 mM)

ATP	551 mg
DMSO	Ad 10 ml

→ 100 µl Aliquote, Lagerung auf -20°C

BHQ (30 mM)

BHQ	6,67 mg
DMSO	Ad 1 ml

→ frisch herstellen

Gramicidin (3 mM)

Gramicidin	50 µg
DMSO	8,85 ml

→ 100 µl Aliquote, Lagerung auf -20°C

Ionomycin (3 mM)

Ionomycin	21,27 mg
DMSO	Ad 10 ml

→ 100 µl Aliquote, Lagerung auf -20°C

Bay-8002 (3 mM)

Bay-8002	12,45 mg
DMSO	Ad 10 ml

→ 100 µl Aliquote, Lagerung auf -20°C

Bay-8002 (3 µM)

Bay-8002 (3 mM)	100 µl
Messpuffer (± glukosefrei)	Ad 100 ml

FCCP (500 nM)

FCCP (5 mM)	10 µl
Messpuffer	Ad 100 ml

Oligomycin-A (3 µM)

Oligomycin-A (3 mM)	100 µl
Messpuffer (± glukosefrei)	Ad 100 ml

ATP (100 µM)

ATP (100 mM)	100 µl
Messpuffer (± calciumfrei)	Ad 100 ml

BHQ (15 µM)

BHQ (30 mM)	50 µl
Messpuffer (± calciumfrei)	Ad 100 ml

Gramicidin (3 µM)

Gramicidin (3 mM)	100 µl
Messpuffer	Ad 100 ml

Ionomycin (3 µM)

Ionomycin (3 mM)	100 µl
Messpuffer (± calciumfrei)	Ad 100 ml

2-DG (3 M)	
2-DG	246,24 mg
DMSO	Ad 500 µl
→ frisch herstellen	

2-DG (3 mM)	
2-DG (3 M)	100 µl
Messpuffer	Ad 100 ml

3.4.10.2 Transfektionen

Pro Ansatz wird jeweils Lösung A in Lösung B überführt und nach 10 min Inkubation bei RT zu 1 ml Zellkulturmedium / 35 mm Well oder 6 Well zugegeben. Für kleinere Transfektionsansätze (bspw. Färbungen in 8 Wells) werden die Lösungsvolumina entsprechend extrapoliert.

Lösung A, Polyjet	
Polyjet	3 µl
IMEM (mit Phenolrot)	50 µl

Lösung B, Plasmid	
Plasmid 1/ 0,3 µg/ml	1 µl
IMEM (mit Phenolrot)	50 µl

3.4.10.3 Calcium Messungen (FURA-2)

Für Experimente mit einer pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals, wurde analog der Messpuffer mit 2 µM TRAM-34 versetzt (siehe 3.4.10.1).

FURA-2 (1 mM)	
FURA-2	1,00 mg
DMSO	Ad 1 ml
→ 20 µl Aliquote, Lagerung auf -80°C	

FURA-2 (3,3 µM)	
FURA-2 (1 mM)	3,3 µl
Messpuffer	Ad 1 ml

3.4.10.4 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials

Für Experimente mit einer pharmakologischen Inhibition des IK-Kanals oder IK *rescue*, wurde analog der Messpuffer mit 2 µM TRAM-34 versetzt (siehe 3.4.10.1), oder der IK-Kanal via transienter Transfektion des *KCNN4 (untagged)*-Plasmids (OriGene, siehe 3.4.9) in KO Zellen re-exprimiert.

TMRM (10 mM)	
TMRM	25 mg
DMSO	5 ml
→ 1 ml Aliquote, Lagerung auf -80°C	

TMRM (100 µM)	
TMRM (10 mM)	10 µl
DMSO	Ad 1 ml
→ 20 µl Aliquote, Lagerung auf -80°C	

TMRM (200 nM)	
TMRM (100 µM)	2 µl
Messpuffer	1 ml

FCCP in TMRM-Puffer (10 µM)	
FCCP (5 mM)	2 µl
TMRM (200 nM)	Ad 1 ml
→ frisch herstellen, 50 µl auf 950 µl	

3.4.10.5 Glukose Aufnahme

2-NBDG (10 mM)

2-NBDG	3,42 mg
DMSO	Ad 1 ml

→ 10 µl Aliquote, Lagerung auf -20°C

2-NBDG (100 µM)

2-NBDG (10 mM)	10 µl
Zellkulturmedium	Ad 1 ml

3.4.11 Extrazellulärer Flux Messungen (Seahorse)

Die Herstellung von Zellkulturmedium ± TRAM-34 ist in Kapitel 3.4.3 aufgeführt, sowie die Zusammensetzung von FCCP (5 mM) in Abschnitt 3.4.10.1 erläutert. Des Weiteren sind die Kalibrierlösung und XF Medium von Agilent Teil eines Kits und liegen soweit möglich gebrauchsfertig vor. Letzteres wird für ideale Bedingungen, wie nach Herstellerangaben, mit 10 mM Glukose, 1 mM Pyruvat und 2 mM L-Glutamin supplementiert (Seahorse Medium).

Bezeichnung		Hersteller	Artikelnummer
Antimycin-A		Sigma-Aldrich	A8674
Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon	(FCCP)	ChemCruz	sc-203578
Dimethylsulfoxid	(DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
Fetales Kälberserum	(FCS)	Thermo Fisher Sc.	10270106
Glukose-Monohydrat		Carl Roth	6889.1
GlutaMAX™ Supplement	100X (200 mM L-Glutamin)	Thermo Fisher Sc.	35050061
IMEM mit Phenolrot		Thermo Fisher Sc.	A1048901
Natrium-Pyruvat		Thermo Fisher Sc.	11360070
Oligomycin-A		ChemCruz	sc-202263
Penicillin/ Streptomycin	(Pen/Strep)	Thermo Fisher Sc.	15140122
Seahorse Multiplatten	24 Well	Agilent	100777-004
Seahorse Cartridge		Agilent	In 102342-100
Seahorse Mito-Stress-Kit (Seahorse FluxPaks) XF24		Agilent	102342-100
Seahorse XF Calibrant		Agilent	100840-000
TRAM-34		Pharm. Chemie, Universität Tübingen	Eigenherstellung (JProf. Dr. Pierre Koch)
XF Medium		Agilent	103575-100

Glukose (1 M)

Glukose-Monohydrat	1,80 g
dH ₂ O	Ad 10 ml

Pyruvat (100 mM)

Pyruvat	88 mg
dH ₂ O	Ad 10 ml

Seahorse Zellpuffer

Glukose (1 M)	300 µl
Pyruvat (100 mM)	300 µl
GlutaMAX (200 mM)	300 µl
XF Medium	Ad 30 ml

Seahorse Zellpuffer, TRAM-34

Glukose (1 M)	300 µl
Pyruvat (100 mM)	300 µl
GlutaMAX (200 mM)	300 µl
TRAM-34 (5 mM)	12 µl
XF Medium	Ad 30 ml

Oligomycin-A (1 mM)

Oligomycin-A	7,91 mg
DMSO	Ad 10 ml

FCCP (100 µM)

FCCP (5 mM)	200 µl
DMSO	Ad 10 ml

Antimycin-A (1 mM)

Antimycin-A	5,48 mg
DMSO	Ad 10 ml

Seahorse Oligomycin-A (2 µM)

Oligomycin-A (1 mM)	1,65 µl
Seahorse Zellpuffer (± TRAM-34)	825 µl

Seahorse FCCP (0,2 µM)

FCCP (100 µM)	1,86 µl
Seahorse Zellpuffer (± TRAM-34)	930 µl

Seahorse FCCP (0,4 µM)

FCCP (100 µM)	4,14 µl
Seahorse Zellpuffer (± TRAM-34)	1035 µl

Seahorse Antimycin-A (2,5 µM)

Antimycin-A (1 mM)	2,85 µl
Seahorse Zellpuffer (± TRAM-34)	1140 µl

4 Methoden

4.1 Mausmodelle

FVB/N

Die *Friend leukemia virus B* (FVB/N) Mauslinie wurde im *National Institute of Health* (NIH, USA) etabliert und beschreibt eine weiße Labormaus, welche kommerziell über Jackson Laboratories erhältlich ist. Die Vorteile dieser Linie entstehen durch die schnelle biologische Reproduktionsrate mit großen Wurfzahlen, sowie leicht detektierbaren Pronuklei, die in befruchteten Eiern nachweisbar sind (Mahler et al., 1996). Letztere sind wichtig für die Kryokonservierung und somit den Zuchterhalt, sowie transgenetische Veränderungen in der Forschung. Des Weiteren sind FVB/N Mäuse aggressiv und weisen einen veränderten zirkadianen Rhythmus auf, welches die erhöhte Aktivität begünstigt (Pugh et al., 2004). Ca. 60% der Tiere überleben 24 Monate ($\bar{\text{O}}$ >15 Monate), wobei wiederum ca. 60% dieser Tiere an Tumoren oder Läsionen erkranken (Mahler et al., 1996). Diese hohe Vulnerabilität prädestiniert die FVB/N Mauslinie als Modell für die onkologische Forschung.

MMTV-PyMT

Zur Untersuchung von spontanen Brusttumoren wurde das MMTV-PyMT Modell auf Hintergrund der FVB/N Maus entwickelt. Dieses etablierte Modell setzt sich dabei aus dem Promotor MMTV und dem Onkogen PyMT zusammen. Das in dieser Arbeit verwendete Modell wurde im hiesigen Arbeitskreis (von SV129) auf FVB/N Hintergrund rückgezüchtet und etabliert (Mohr, 2020, Steudel, 2016). Das Maus-Mammatumorvirus (MMTV) beschreibt dabei einen Retrovirus, welches vorrangig in das Genom der Brustdrüsen-Epithelzellen integriert (Callahan and Smith, 2000). Dabei kann eine Integration in einer *Silent-region* des Wirtsgenoms lediglich zu einer schwachen Brustdrüsen-Hyperplasie führen, erhöht jedoch nicht die Kanzerogenität der Brustdrüse. Folgt die Integration allerdings Nahe eines Onkogens (z.B. PyMT) erhöht MMTV durch eine dauerhafte Aktivierung der viralen *long terminal repeats* (LTRs) dessen Expressionseffizienz (Attalla et al., 2021). Eine gesteigerte Expression des *Polyoma Virus middle T antigen* (PyMT oder PyVmT) in den Brustdrüsen erzeugt somit schnell wachsende Mammakarzinome mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial (Attalla et al., 2021). Wenngleich der genaue molekulare Wirkmechanismus nicht vollständig geklärt ist, vermutet man eine Nachahmung einer Tyrosin-Kinase Aktivität des PyMTs (Attalla et al., 2021). Dabei formt PyMT einen Komplex mit PP2A (Protein Phosphatase 2), welches wiederum die SRC-Kinasen rekrutiert. Diese proto-onkogene Tyrosin-Kinase SRC phosphoryliert PyMT an mehreren Regionen. Je nach Phosphorylierungsstelle können somit unterschiedliche Signalwege aktiviert werden (Guy et al., 1994). Die Phosphorylierung am Tyrosin²⁵⁰ von PyMT aktiviert das Adapter-Protein SHC, welches über die Signalkaskade von RAS/RAF und MEK/ERK letztendlich die Proliferation induziert. Des Weiteren werden die Phospholipase C γ , sowie der PI3K-AKT Signalweg phosphoryliert. Letztere erhöhen die Motilität, Differenzierung, Wachstum und Metastasierungsrate (Markland and Smith, 1987, Webster et al., 1998).

Heterozygote MMTV-PyMT FVB/N-Weibchen entwickeln somit im Durchschnitt nach 53 Tagen Brusttumore und Lungenmetastasen (Inzidenz von 80-90%). Analog entwickeln Männchen erst sehr viel später Tumore, weswegen in der Zucht (siehe Abschnitt 4.1.1), nur männliche FVB/N Tiere Träger des MMTV-PyMT-Allels sind. Heterozygote MMTV-PyMT FVB/N Tiere sind vital und weisen keine körperliche Beeinträchtigungen auf. Aufgrund der geringen Heterogenität des MMTV-PyMT Modells ist der Großteil als Luminal B Adenokarzinome zu

klassifizieren (Attalla et al., 2021), was ebenfalls dem Großteil der humanen Mammakarzinoms-Inzidenzen entspricht (siehe Tabelle 1) (Xue et al., 2012). Zusammengenommen gilt das MMTV-PyMT Mausmodell auf FVB/N-Hintergrund als nützliches präklinisches Werkzeug zur Untersuchung von aggressiven Brusttumoren, sowie Lungenmetastasen.

IK

Die IK KO-Mauslinie (KCNN4^{tm1.1Jele/RuLu}) wurde durch homologe Rekombination am Pharmazeutischen Institut generiert. Durch das Cre/loxP-Verfahren konnte das Exon 2 des IK-Kanals deletiert werden, welches für die Porenregion codiert (Sausbier et al., 2006). Die ursprünglich auf SV129-Hintergrund generierten Mäuse wurden ebenfalls am Pharmazeutischen Institut auf den FVB/N-Hintergrund rückgekreuzt (N>9 Generationen) (Steudel et al., 2017).

BK

Die BK KO-Mauslinie (KCNMA1^{tm1Ruth}) wurde durch homologe Rekombination am Pharmazeutischen Institut generiert (Sausbier et al., 2004). In dieser Mauslinie wurde Exon 8 des KCNMA1-Gens deletiert, welches für die Porenregion codiert. Die ursprünglich auf C57Bl/6-Hintergrund generierten Mäuse wurden ebenfalls am Pharmazeutischen Institut auf den FVB/N-Hintergrund rückgekreuzt (N>9 Generationen) (Mohr et al., 2022).

4.1.1 Tierhaltung und Verpaarung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden im Rahmen der geltenden tierschutzrechtlichen Bestimmungen gezüchtet. Die Tiere befanden sich im Tropeninstitut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Wilhelmstraße 27, 72072 Tübingen, Raum 8 A) in speziellen SPF-Tierhaltungsräumen (spezifisch pathogenfrei). Unter kontrollierten Bedingungen von $22 \pm 1^\circ\text{C}$ Raumtemperatur und $55 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit wurden die Tiere in IVC Käfigen (*isolated ventilated cages*) des Typs Makrolon T2 long (Haltung) und Makrolon T3 (Verpaarung) gehalten. Für eine Ohrlochmarkierung, Palpation, Gewichtskontrolle, Tumorentnahme oder Verpaarung wurden die Käfige ausschließlich unter einer *laminar air flow* geöffnet. Die Mäuse unterlagen einem standardisierten Tag-Nacht-Rhythmus (12 h/12 h) und hatten Zugang zu Wasser und Fenbendazol behandelten Standardtierpellets *ad libitum*. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzbehörde (Regierungspräsidium Tübingen) unter Beachtung des geltenden deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt und durch Veterinäre des Universitätsklinikums Tübingen begleitet und kontrolliert.

Zur Generierung der MMTV-PyMT WT- und IK KO-Tiere auf FVB/N-Hintergrund wurden ca. 8 Wochen alte MMTV-PyMT^{tg/+} Männchen mit heterozygoten mindestens 6 Wochen alten IK^{L1/+} Weibchen verpaart. L1 entspricht in diesem Fall dem globalen KO (–) eines Allels. Die in der F1 Generation generierten MMTV-PyMT^{tg/+} x IK^{L1/+} Männchen (12,5%) wurden erneut mit einem heterozygoten IK^{L1/+} Weibchen verpaart. In der F2 Generation konnten jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von 6,25% Weibchen mit MMTV-PyMT^{tg/+} x IK^{+/+} (WT) oder MMTV-PyMT^{tg/+} x IK^{L1/L1} (IK KO) generiert werden. Analog zu Abbildung 4.1 wurden die globalen MMTV-PyMT BK KO-Tiere gezüchtet. Die in dieser Arbeit verwendeten WT- und KO-Tiere wurden in vorangegangenen Arbeiten analog generiert und gelten damit als etabliertes Modell (Mohr et al., 2019a, Mohr et al., 2022, Steudel et al., 2017).

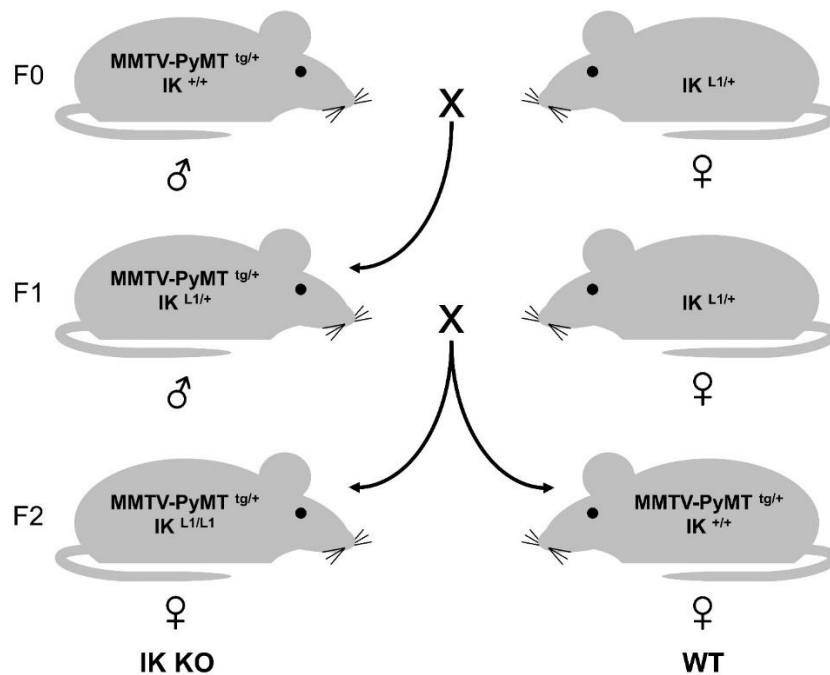


Abbildung 4.1: Verpaarungsschema zur Generierung der MMTV-PyMT WT und IK KO FVB/N Versuchstiere
 Im ersten Schritt werden heterozygote MMTV-PyMT^{tg/+} Männchen mit heterozygoten IK^{L1/+} Weibchen verpaart. Die resultierenden Männchen der F1 Generation (MMTV-PyMT^{tg/+} x IK^{L1/+}) werden erneut mit heterozygoten IK^{L1/+} Weibchen verpaart. In der F2 Generation entstehen brustumortragende globale IK KO (MMTV-PyMT^{tg/+} x IK^{L1/L1}) sowie IK WT (MMTV-PyMT^{tg/+} x IK^{+/+}) Versuchstiere. Es werden nur Weibchen als Versuchstiere verwendet. (FVB: Friend Virus B; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; MMTV: Maus-Mamma-Tumor-Virus; PyMT: polyoma virus middle T antigene; tg: transgen; L1: KO in einem Allel des IK Kanals (L1/+ entspricht -/+))

4.1.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung dient zur Identifikation der Zucht-, sowie Versuchstiere und wurde im Alter von 2-3 Wochen analog vorheriger *in vivo* Untersuchungen durchgeführt (Mohr et al., 2019a, Steudel et al., 2017). Dafür wurden Ohrlochmarkierungen mittels Stanz-Zange gesetzt, welche der Identifikation der Maus diente und zeitgleich Gewebe zur Genotypisierung lieferte. Nach DNA-Isolation, Gen-Amplifikation und Auftrennung via Gelelektrophorese konnten die Tiere im Alter von 3 Wochen entsprechend ihres Genotyps (und Geschlechts) abgesetzt werden.

4.1.2.1 DNA-Isolation aus Ohrlochstanzen

Mit Hilfe einer 2 mm Lochstanze wurden der Maus bis zu drei Keile aus der Ohrmuschel entnommen und für die direkte Lyse bei 4°C oder für längere Konservierung bei -20°C gelagert. Abbildung 4.2 zeigt das entsprechende Stanzschema.

Zur DNA-Isolation wurde das kommerziell erwerbliche KAPA-Kit verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt (Biosystems, 2017). Das Kit beinhaltet das *KAPA Express Extract Enzyme* (1 U/μl), den *KAPA Express Extract Buffer* (10 x), sowie den *KAPA2G Fast Genotyping Mix*. Letzteres ist ein Konglomerat aus DNA-Polymerase, Reaktionspuffer plus Ladepuffer, Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und Magnesiumchlorid.

Zu Beginn der Isolation wurde ein Mastermix aus 1 µl Extraktionsenzym, 5 µl Extraktionspuffer und 44 µl dH₂O (3.4.1.1), entsprechend der Probenanzahl hergestellt. Eine Inkubation bei 75°C und 500 rpm für 10 min im Thermoschüttler induzierte die Lyse der Zellen, die Degradierung der Nukleasen, sowie Proteine und sorgte somit zur Freisetzung der DNA. Eine anschließende Hitze-Inaktivierung des Extraktionsenzym erfolgte bei 95°C und 500 rpm für 5 min. Im folgenden Schritt wurden die Proben für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand extrahiert. Zur kurzfristigen Lagerung wurden die DNA-Isolate auf 4°C gekühlt oder über Nacht bei -20°C eingefroren.

4.1.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (engl. PCR) werden spezifische DNA-Abschnitte enzymatisch amplifiziert, sodass diese in ausreichender Menge detektierbar werden.

Dafür wurden Primer (Oligonukleotide) entwickelt, welche an den Flanken des gewünschten Genabschnitts binden. Der Vorwärts-Primer (*forward*, F) hybridisiert an das 3'-Ende des codierenden Strangs, während der Rückwärts-Primer (*reverse*, R) am 3'-Ende des Komplementärstrangs bindet. Des Weiteren wurden die jeweiligen Primer so *designed*, dass eine Unterscheidung der erwarteten Amplikongrößen zwischen KO und WT im Gel eindeutig möglich ist. Alle Primersequenzen sind in Abschnitt 3.4.1.1 aufgeführt.

Tabelle 2 zeigt ein vom Hersteller modifiziertes Pipettierschema des PCR-Mastermixes (Biosystems, 2017). 25 µl Mastermix und 1,3 µl Proben-DNA wurden in ein 200 µl PCR-Reaktionstube überführt und anschließend im *Mastercycler* (3.4.1.1) amplifiziert.

Während der PCR kommt es nun zu verschiedenen Temperaturphasen, welche zyklisch wiederholt werden. Da im KAPA2G Mix allerdings eine spezielle *Fast Hot Start DNA-Polymerase* verwendet wurde, musste diese vorab für 3 min bei 94°C aktiviert werden. Im Anschluss folgten 30 Zyklen beginnend mit einer Probendenaturierung für 30 sec bei 94°C. Nach Abkühlen auf ca. 57°C für 30 sec können die entstandenen DNA-Einzelstränge mit den Primern hybridisieren (*Annealing*). Die genauen *Annealing*-Temperaturen (abhängig von der Primersequenz und dem zu amplifizierenden Fragment) lagen für MMTV-PyMT bei 64°C und für IK bei 57°C. Im letzten Schritt wurden die DNA-Fragmente durch die thermostabile Polymerase für 30 sec bei 72°C amplifiziert (Elongation). Nach Beenden der 30 Zyklen wurde die Temperatur zur finalen Elongation für 5 min bei 72°C stabil gehalten bevor die Proben anschließend auf 10°C heruntergekühlt wurden.

Tabelle 2: Pipettierschema zur Genotypisierungs-PCR

Mastermix	MMTV-PyMT	IK
KAPA 2G	12,5 µl	12,5 µl
Primer F1	1 µl	0,5 µl
Primer R1	1 µl	0,5 µl
Primer F2	1 µl	0,5 µl
Primer R2	1 µl	-
DMSO	1 µl	0,25 µl
dH ₂ O	7,5 µl	10,75 µl

4.1.2.3 Gelelektrophorese und Detektion

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können die amplifizierten DNA-Fragmente nach Größe aufgetrennt werden (Addgene, 2018). Da die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen sind, können durch Anlegen einer Spannung, die DNA-Moleküle umgekehrt proportional zu ihrer Größe zum Pluspol wandern. Aufgrund des konstanten Ladung-Masse-Verhältnis hängt die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der DNA nur von der Größe der untersuchten Molekül ab.

Für die Genotypisierung wurden 2%ige Agarosegele hergestellt (3.4.1.2) und mit 0,1 µl/ml Ethidiumbromid versetzt. Das ausgehärtete Agarosegel wurde anschließend in eine horizontale Elektrophoresekammer überführt und mit 1xTBE-Puffer überschichtet.

Da der KAPA2G-Mix bereits Ladepuffer enthält, konnten die Proben direkt und vollständig in die Taschen pipettiert werden. Als Marker wurden ebenfalls 12 µl 2-Log DNA-Marker aufgetragen (3.4.1.2). Durch Anlegen einer Spannung von 80 mV bis zum Austritt der DNA aus der Tasche, sowie Steigerung auf 120 mV bis zum Ende der Lauffront am Gelrand, wurden die Amplikons nach Größe aufgetrennt. Die anschließende UV-Detektion im Geldokumentationsgerät (3.4.1.2) machte die DNA-Ethidiumbromid-Interkalate sichtbar (Banerjee et al., 2014). Mit Hilfe des 2-Log-Markers war ein Vergleich der Bandengröße und somit eine Aussage über die Fragmentlänge und den Genotyp der Probe möglich. Repräsentative Aufnahmen der MMTV-PyMT, IK und MMTV-PyMT DNA-Banden sind in Abbildung 4.2 zu sehen.

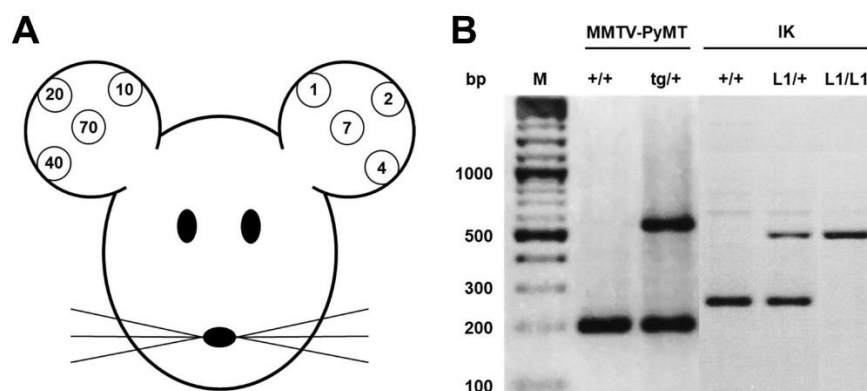


Abbildung 4.2: Schema der Ohrlochstanzung und repräsentatives Genotypisierungsergebnis

Die Ohrlochstanzung dient der Kenntlichmachung der Mäuse, sowie zeitgleicher Gewinnung von Biopsien zur Genotypisierung. (A) Je nach Stanzung können Mäuse mit den Nummern 1 bis 100 versehen werden. Aus dem Gewebe wird DNA isoliert, durch eine PCR amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. (B) Repräsentative Ergebnisse der Gelelektrophorese zeigen MMTV-PyMT Kontroll- (200 bp) sowie transgene Banden (560 bp), Amplikons der IK Kontroll- (250 bp) und KO-(500 bp) Allele (bp: Basenpaare; IK: Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; MMTV: Maus-Mamma-Tumor-Virus; PyMT: polyoma virus middle T antigene; tg: transgen; L1: KO in einem Allel des IK Kanals (L1/+ entspricht -/+); +: Wildtyp-Allel)

4.1.3 Palpation und Wachstumskontrolle der Brusttumoren *in vivo*

Zur Kontrolle des Tumorwachstums in MMTV-PyMT Weibchen wurden diese ab einem Alter von 40 Tagen wöchentlich palpiert, gewogen und optisch überprüft. Das Allgemeinwohl des Tieres wurde durch eine optische Prüfung des Fells, des Ganges, des Verhaltens und der

Atmung gewährleistet. Des Weiteren wurden die Tiere gewogen und ihr Gewicht einerseits mit den Wochen zuvor und andererseits mit nicht belasteten Tieren desselben Alters verglichen. Etwaige Gewichtsschwankungen konnten ein Indiz für einen Mangel des Allgemeinwohls des Tieres darstellen, sowie eine Umfangsvermehrung (Tumor) kenntlich machen. Zu starke Schwankungen des Gewichts, führten zum Ausschluss des Tieres aus dem Versuch. Der letzte Schritt der Wachstumskontrolle war die Palpation der Brustdrüsen. Beim Tasten eines Knoten wurde dieser zeitlich notiert, sowie mittels Schieblehre (3.4.2) in seinem Umfang bestimmt. Ab dem Zeitpunkt einer positiven Palpation wurden die Tumore engmaschiger kontrolliert und sämtliche oben genannten Untersuchungen drei Mal wöchentlich wiederholt. Nachdem der Maximaldurchmesser von 15 mm eines Tumors, oder mehrere Tumore einen addierten Gesamtdurchmesser von 30 mm erreicht haben, wurden die Tiere euthanisiert (siehe Abschnitt 4.1.4). Dasselbe Vorgehen wurde auch bei Erreichen anderer Abbruchkriterien angewandt.

Der Zeitraum zwischen Geburt und Auftreten der ersten positiven Palpation wurde als Tumorfreies Überleben (*tumor free survival*, TSF) auf die Gesamtzahl der im Versuch befindlichen Mäuse bezogen (in %). Um ein mögliches verzögertes oder verlangsamtes Tumorstadium zu eruieren, wurde das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) der Tiere analysiert. Dieses berechnete sich aus der Differenz des Geburts- und Todeszeitpunkts bzw. dem Erreichen eines Abbruchkriteriums. Alle *in vivo* Untersuchungen wurden ebenfalls in vorangegangenen Studien etabliert (Mohr et al., 2019a, Mohr et al., 2022, Steudel et al., 2017) und im Rahmen der geltenden Tierversuchsanträge von geschultem Personal durchgeführt.

4.1.4 Tumor- und Organentnahme

Alle Tiere, welche ein Abbruchkriterium erreichten wurden mit CO₂ entsprechend der gesetzlichen Vorgaben (§ 4 TschG) eingeschläfert. Durch einen zusätzlichen Genickbruch wurde der Tod der Tiere sichergestellt. Anschließend folgte eine finale Gewichtsbestimmung, sowie die Tumor- oder Organentnahme, analog vorheriger Versuche (Mohr et al., 2019a, Mohr et al., 2022, Steudel et al., 2017). Hierzu wurde die Maus auf dem Rücken mittels Präparationsnadeln über die Extremitäten auf der Sektionsfläche (Styropor) fixiert. Mit einer Präparierschere wurde ein medianer Schnitt von 20 mm Länge in der Längsachse der Maus von caudal nach cranial ausgeführt. Nach Entfernung des Fells konnten die Brustdrüsen und somit auch die Tumoren freigelegt werden. Unter Zuhilfenahme eines Skalpell (3.4.2) wurde der Tumor vom umliegenden Gewebe getrennt und entnommen. Im weiteren Verlauf wurden Fett und/oder Bindegewebe vorsichtig vom Tumor entfernt und mit 1xPBS gewaschen, sowie anschließend gewogen. Das Tumorstadium konnte rechnerisch, auf Grundlage der mittels Schieblehre gemessene Maße, mit folgender Formel ermittelt werden (Faustino-Rocha et al., 2013):

$$\frac{2 \cdot \text{Breite} + \text{Länge}}{2}$$

Zur Entnahme weiterer Organe (z.B. Leber und Lunge) wurde im Folgenden das Abdomen mit einer Präparierschere eröffnet. Zu- und abführende Blutgefäße wurden vor der Entnahme gekappt. Für die Entnahme der Lunge wurde zunächst das Diaphragma mit Hilfe eines Skalpell entlang des Rippenbogens abgelöst und letzteres vorsichtig aufgespannt. Nach Unterbrechung der Gefäßverbindungen zum Herzen, sowie der Durchtrennung der Trachea, wurden die Lungenflügel aus dem Thorax entnommen. Die Organe wurden im Anschluss in 1xPBS gewaschen und gewogen. Je nach Verwendung der Gewebe, wurden diese direkt weiterverarbeitet oder entsprechend gelagert. Zur in Kulturname wurden die Tumore in

Zellkulturmedium überführt (3.4.3), zur RNA Isolation bei -80°C eingefroren (4.3) oder für histochemische Färbungen in Tissue-Tek[®] eingebettet (0). Das weitere Vorgehen wird in den entsprechenden Kapiteln detailliert beschrieben.

4.2 Zellkultur

Insgesamt wurden pro Genotyp $n=5$ Tumore aus fünf verschiedenen MMTV-PyMT Mäusen isoliert und in Kultur gebracht. Die sich daraus ergebenden primären WT und IK KO Zelllinien wurden auf morphologische Homogenität (Abbildung 4.3 A) und ihren Tumorstatus mittels Estrogen Rezeptor α Immunfluoreszenz-Färbung ($\text{ER}\alpha$, Tumormarker) überprüft (Abbildung 4.3 B, Abschnitt 4.6.3). Analog wurde das zelluläre MMTV-PyMT Mammakarzinom Modell in mehreren Studien der hiesigen Abteilung validiert (Mohr et al., 2019a, Steudel et al., 2017).

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Experimente mit Zellen in einer sterilen *laminar air flow* (Sterilwerkbank, 3.2) durchgeführt. Lösungen und Medien wurden vor ihrer Verwendung in einem 37°C Wasserbad vorgewärmt, wenn nicht anders in den Methoden erläutert. Die Inkubation der Zellen erfolgte standardmäßig in einem Inkubator auf 37°C und 5% CO_2 .

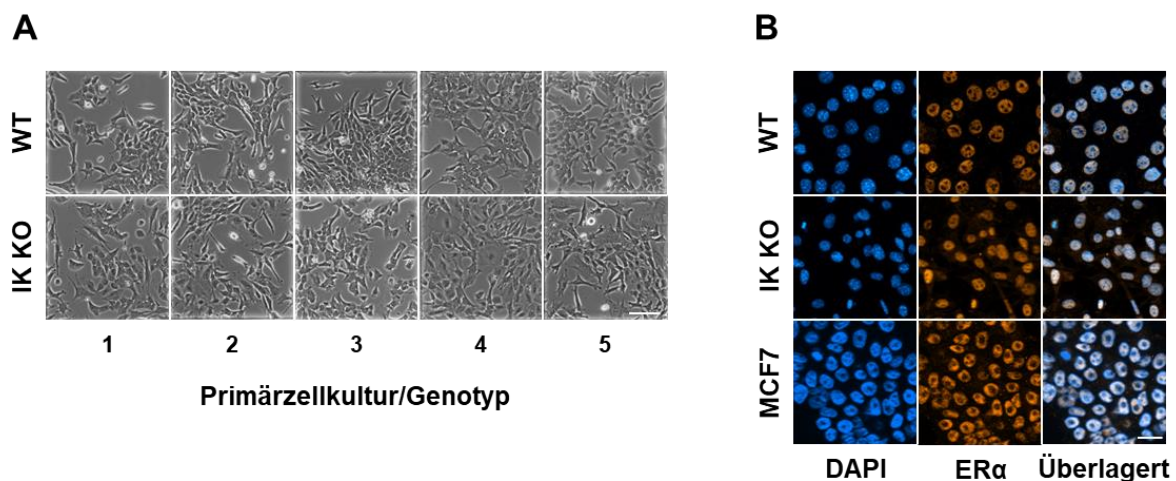


Abbildung 4.3 Validierung der Primärzellkulturen

(A) Durlichtaufnahmen von 5 verschiedenen MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und IK KO-Primärzellkulturen (untere Reihe) der gleichen Passage (Passage 11), von $n=5$ verschiedenen tumortragenden Mäusen pro Genotyp (Werte 1–5). Maßstabsbalken $40\ \mu\text{m}$. (B) Repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen (IF) des nukleären Markers DAPI (blau, links), des Östrogenrezeptors α ($\text{ER}\alpha$) als Tumormarker (orange, Mitte), sowie der überlagerten Bilder (rechts) von MMTV-PyMT WT (obere Reihe), IK KO (mittlere Reihe) und MCF7 als Positivkontrolle (untere Reihe). Die Daten zeigen repräsentative Aufnahmen von $N=3$ WT; IK KO; MCF7. Maßstabsbalken $20\ \mu\text{m}$. (MCF7: humane Brustkrebszelllinie, Michigan Cancer Foundation 7). Experiment (B) wurde in Zusammenarbeit mit Selina Maier (Experimentelle Pharmakologie, Universität Tübingen) durchgeführt. Modifizierte Grafiken A und B basierend auf (Gross et al., 2022).

4.2.1 In Kulturnahme von MMTV-PyMT Zellen

Nach der Entnahme der Tumoren (siehe Abschnitt 4.1.4) wurden diese in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen mit 20 ml sterilem Zellkulturmedium überführt (3.4.3). Das weitere Vorgehen wurde am hiesigen Institut bereits hinreichend etabliert (Steudel et al., 2017) und beschreibt ein allgemeines wenngleich modifiziertes Protokoll der Kultivierung (Liu and Chen, 2016). Zunächst wurde der Tumor in einer Petrischale mit sterilem 1xPBS gewaschen und anschließend mittels Skalpell (3.4.3.1) in ca. 5x5 mm großen Stücke zerkleinert. Diese Gewebestücke wurden in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml Collagenase D (1 mg/ml) Verdauung überführt und im Wasserbad bei 37°C für 11 Minuten inkubiert und minütlich invertiert, um ein Absetzen des Gewebes und damit eine mangelhafte Benetzung des Tumors zu vermeiden. Zur weiteren Zerkleinerung der Tumorproben wurden die Gewebereste mit einer 10 ml dann mit einer 5 ml Stripette durch auf- und ab pipettieren dispergiert. Nach Dissoziation des Gewebes wurde die gesamte Suspension durch ein 40 µm Zellsieb (3.4.3.1) in ein steriles 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die übrigen Tumorreste durchliefen einen zweiten Collagenaseverdau, Filtrations- und Dissoziationsschritt (siehe oben). Beide 50 ml Röhrchen wurden im Anschluss vereint und bei 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde mit 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in eine T25 Zellkulturflasche (3.2) überführt und in einem Gesamtvolumen von 5 ml Zellkulturmedium bei 37 °C und 5% CO im Brutschrank kultiviert.

Nach 24 h Kultivierung wurde das Medium abgenommen und durch 5 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt (siehe Abschnitt 4.2.2).

4.2.2 Mediumwechsel und Passagieren

Standardmäßig wurde 2x pro Woche das Medium gewechselt, sodass optimale Wachstumsbedingungen herrschten. Im Hinblick auf die sehr sensitiven Autophagie Versuche (Abschnitt 5.5) wurde darauf geachtet, dass Zellstress aufgrund mangelnder Nährstoffzufuhr durch den regelmäßigen Mediumwechsel vermieden wurde.

Mit Hilfe einer Absaugpumpe und einer Glaspipette das wurde dabei das verbrauchte Medium behutsam abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt (siehe Tabelle 3 für die eingesetzten Volumina pro Zellkulturgefäß).

Der Passagenwechsel der Zellen wurde bei ca. 80–90% Konfluenz analog gängiger Protokolle durchgeführt (Pijuan et al., 2019). Die dabei verwendeten 1xPBS- und 1xTrypsin- (0,25 % in 1xPBS, siehe 3.4.3) Volumina wurden an die Fläche der Zellkulturgefäße angepasst (siehe Tabelle 3). Zum Splitten der Zellen wurde das Medium abgenommen und 2x mit vorgewärmten 1xPBS gewaschen. Anschließend konnten die Zellen mit 1xTrypsin (Tabelle 3) überschichtet und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert werden. Zum Stoppen der Trypsinreaktion wurden im Anschluss mit 5 ml Zellkulturmedium verdünnt. Die Proteine des enthaltenden FCS konnten so proteolytische Zellschädigungen verhindern. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.000 rpm 5 min. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert, anschließend 10 µl der Zellsuspension mit 1:1 Trypanblau (0,4% in 1xPBS) versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer (3.3) zur Zellzahlbestimmung überführt. Nach der Zählung konnte die gewünschte Konzentration für Versuche (s. 4.2.3 – 4.11) ausgebracht werden. Die nicht in Versuchen verwendeten Zellen wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt und weiterkultiviert.

Zur Minimierung der Fibroblastenzahl in den Primärzellkulturen wurden die Zellen initial d.h. nach erfolgter Inkulturnahme mit 1xPBS gewaschen und kurz (1 min) in 1xTrypsin inkubiert. Durch behutsames Klopfen wurden anschließend selektiv Fibroblasten abgelöst, da MMTV-PyMT Brustkrebszellen stark adhärent wachsen. Nach Spülen mit 1xPBS und Absaugen des Überstandes, wurden die entsprechend bereinigten Kulturen, wie unter 4.2.2 erläutert, für insgesamt 13 Passagen genutzt.

Tabelle 3: Füllvolumen pro Zellkulturgefäß

Zellkulturgefäß	Fläche [cm ²]	Zellkulturmedium pro Well [ml]	1xTrypsin pro Well [ml]
Flasche T175	175	20-25	5
Flasche T75	75	10-15	3
Flasche T25	25	5	1
Petrischale 100 mm	55	8-10	2
Schale 35 mm	3,5	1-2	-
Grid-Platte	3,5	1-2	-
6 Well Multiplatte	6x 3,5	1-2	-
24 Well Multiplatte	24x 1,9	0,5	-
96 Well Multiplatte	96x 0.32	0,2	-
µ-Kammer 8 Well	8x 0,56	0,2	-

4.2.3 Kryokonservierung und Auftauen

Die murinen MMTV-PyMT Zellen wurden ab der ersten Passage kryokonserviert (Wu et al., 2021c) und bei Bedarf neu aufgetaut und weiterkultiviert.

Für die Konservierung wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben trypsinisiert und anschließend in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml in Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden 0,5 ml der entsprechend eingestellten Zellsuspension mit 0,5 ml des Gefrierschutzmittels DMSO (20% in Zellkulturmedium) in einem Kryoröhrchen vereint (3.4.3). Die finale Zellzahl betrug entsprechend 500.000 Zellen in Zellkulturmedium mit 10% DMSO. Das Einfrieren erfolgte kontrolliert, d.h. bei -1°C/min in einem *Mr. Frosty* Einfrierbehälter (3.4.3.1) bei -80°C für 24 h. Im Anschluss wurden die Proben in flüssigen Stickstoff (N₂) zur langfristigen Kryokonservierung überführt.

Zur Re-Kultivierung der Kryostocks wurden die Zellen aus dem flüssigen N₂ für 3 min in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in 10 ml Zellkulturmedium verdünnt. Es folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1.000 rpm. Nach Absaugen des entstandenen Überstandes wurde das zurückbleibende Pellet in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen entsprechend 4.2 kultiviert. Standardmäßig wurde nach 24 h das Medium gewechselt (siehe Abschnitt 4.2.2) um die nach dem Auftauen entstehenden Zelltrümmer zu entfernen.

4.3 RNA Analytik

Die RNA Analytik der Zellen diente der Quantifizierung von relevanten Genabschnitten zum Vergleich der Genotypen und Behandlungen. Zur Isolation sowie der Amplifikation der cDNA nach Umschreiben der RNA wurden spezielle Kits verwendet und die Protokolle entsprechend des Herstellers durchgeführt. Alle Arbeitsplätze und verwendeten Materialien wurden zuvor gründlich mit 80%igem Ethanol gereinigt um Kontaminationen der RNA-Proben zu vermeiden. Des Weiteren wurde standardmäßig DPEC-Wasser (Diethylpyrocarbonat, 3.4.4) verwendet, da dieses RNAsen inaktiviert.

4.3.1 RNA Isolation

2×10^6 Zellen wurden wie in Abschnitt 4.2.2 trypsinisiert und in eine 100 mm Kultivierungsschale ausgebracht. Nach 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte ein Mediumwechsel und nach insgesamt 72 h die Lyse der Zellen mittels PeqGold RNA pure entsprechend Herstellerangaben (Pepqlab). Hierfür wurden die Zellen 2x mit je 10 ml 1xPBS gewaschen und der Überstand abgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte in 1 ml PeqGOLD RNA pure, das direkt auf den Zellrasen pipettiert wurde. Nach dem Überführen der Suspension erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 rpm für 10 min bei 4°C. Zur Trennung der Zellreste und der RNA wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mit 200 µl Chloroform (3.4.4) versetzt, umgehend gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 12.000 rpm für 5 min auf 4°C wurde die mittlere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Dies wurde mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol (100%) gemischt und bei 4°C über Nacht zur Präzipitation inkubiert. Am Folgetag wurde die Probe erneut bei 12.000 rpm für 10 min und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde 2x mit 75%igem Ethanol (3.4.4) gewaschen und 5 min zentrifugiert (s.o.). Es folgte die Trocknung des Pellets im bei RT. Nach ca. 20 min wurde das Präzipitat in 53 µl DPEC-Wasser bei 56°C und 500 rpm resuspendiert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die RNA-Proben 3x mit einem Nanophotometer (3.2) vermessen. Es folgte ein Verdau zur Beseitigung genomischer DNA, indem 50 µl Probe mit 5 µl DNase (3.4.4) und 6 µl DPEC-Wasser bei 30 min bei 37°C im Thermoschüttler bei 500 rpm inkubiert wurden. Nach Inaktivierung der DNase bei 80°C für 5 min im Thermoschüttler bei 500 rpm wurden die Proben mit DPEC-Wasser auf 0,1 µg/µl eingestellt. Das Umschreiben in cDNA erfolgte umgehend oder nach Lagerung bei -20°C.

4.3.2 cDNA Synthese

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurden alle Schritte auf Eis und nach Herstellerangaben des iScript-Kits (BioRad, 2022a, Yang et al., 2019) durchgeführt. Für jede Probe wurde eine Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase (-RT) erzeugt, um etwaige genomische DNA-Kontaminationen sicher erkennen zu können.

Zur Generierung der cDNA wurden in einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäß 5x iScript, DPEC-Wasser, sowie die Proben entsprechend Tabelle 4 pipettiert. Essentiell war die finale Zugabe der reversen Transkriptase (RT) zu den +RT Proben. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese in einem Thermocycler entsprechend Herstellerangaben (3.2). Das *Annealing* (Oligo-

dT- sowie Random-Hexamer-Oligonukleotide waren im Mastermix des iScript vorhanden) erfolgte bei 25°C für 5 min. Die cDNA-Synthese durch die RT wurde bei 42°C für 30 min durchgeführt und mittels Hitzeinaktivierung bei 95°C für 5 min beendet. Im Anschluss wurden die + und –RT Proben mit 180 µl DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 µl verdünnt.

Tabelle 4: Pipettierschema zum Umschreiben in cDNA

cDNA Synthese-Mix	+RT	–RT
5x iScript	4 µl	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl	
DEPC-H ₂ O	10 µl	11 µl
RNA (0,1 µg/µl)	5 µl	5 µl

→ Nach dem Umschreiben wird 180 µl DEPC-H₂O zugegeben

4.3.3 qRT-PCR und Gelelektrophorese

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von cDNA/DNA-Abschnitten und erlaubt Rückschlüsse auf die Abundanz von Genabschnitten bzw. die Expressionsrate der untersuchten Gene.

In dieser Arbeit wurden alle qRT-PCR -Analysen nach dem Protokoll des SYBR[®] green Supermix durchgeführt (BioRad, 2022b, Rio et al., 2009). Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei 4°C und mit DEPC-Wasser durchgeführt. Der verwendete SYBR[®] green Supermix beinhaltet einen Fluoreszenzfarbstoff (SYBR green), die Taq-Polymerase, Desoxynukleosid-Triphosphate der vier Basen (dNTPs), sowie einen Puffer mit spezifischen Stabilisatoren. Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3 im Webbrowser generiert (Untergasser et al., 2012). Zur Untersuchung der Exons und Sequenzen wurde das Programm Ensemble verwendet (Ensemble, 2022). Nach der Generierung der *forward*- und *reverse*-Primer wurden diese nochmals mit der Software PrimerBlast überprüft (PrimerBlast, 2021). Letztere zeigte auch die optimale *Annealing*-Temperatur, sowie Interkalations- und Brückenbildungstendenzen der Primer an. Optimale Primer sollten eine Länge von 20-23 Basenpaaren (bp) besitzen, sowie eine Annealingtemperatur von 58-64°C aufweisen. Die Größe der generierten Amplikons wurde auf 70-120 bp beschränkt, um Polymerisationsfehler zu vermeiden und eine schnellere und akkuratere Quantifikation zu erzielen (Van Holm et al., 2021). Sowohl die verwendeten Primer (3.4.4) als auch die cDNA (3.4.4) wurden auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt.

Pro Versuchsansatz wurden Dupletts der +RT und –RT Proben verwendet. Durch Analyse der –RT Proben wurden mögliche Kontamination mit genomischer DNA erkennbar. Pro Versuchsansatz wurden 7,5 µl des SYBR[®] green Supermix mit jeweils 2,25 µl des *forward*- und *reverse*-Primers gemischt. 12 µl des Mastermix wurden zu bereits vorgelegten 3 µl cDNA pro Well in einer speziellen 96 Well Multiplatte vorgegeben. Je untersuchter Probe wurde neben den Zielgenen auch ein Versuchsansatz mit einem Referenz-Gen (z.B. βActin, HPRT) aufgetragen. Dieses diente als interne Kontrolle, sowie zur Normalisierung der erhaltenen Daten. Außerdem wurden das mögliche Selbst-Annealing der Primerpaare überprüft, indem die Primer ohne SYBR[®] green Supermix und cDNA aufgetragen wurden. Eine letzte Negativkontrolle aus DEPC-Wasser ohne weitere Zusätze diente zur Überprüfung von Kontaminationen während der Probenvorbereitung. Die 96 Well Multiplatte wurde mit einer Schutzfolie versiegelt, um

Volumenverluste durch Verdunstung und Kontaminationen während der Amplifikation zu vermeiden.

Anschließend wurde die 96 Well Multiplatte im qRT PCR Analysegerät (CFX Connect®) ausgelesen. Nach einer initialen Denaturierung (120 sec), wiederholte das Gerät folgende 40 Zyklen (Tabelle 5). Der im SYBR® green Supermix enthaltene Farbstoff interkalierte mit der DNA, wobei das Signal durch den Opticon-Cycler detektiert werden konnte. Während der Amplifikationszyklen kam es zur exponentiellen Vermehrung der DNA und somit auch des Fluoreszenzsignals. Durch Auftragen der Signalintensität gegen die Zyklenzahl erhält man einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Zur letztendlichen Ermittlung des gewünschten Ct-Wertes berechnet die Software, ab welcher Steigung der lineare Bereich der Kurve überschritten wurde (Bonacorsi et al., 2021). Der Schnittpunkt der entsprechenden Regression mit der X-Achse (Zyklusanzahl) beschreibt den signifikanten Unterschied zwischen Fluoreszenzsignal und Hintergrundfluoreszenz, und wird als Ct (*cycle threshold*) bezeichnet.

Tabelle 5: qPCR-Programmzyklen

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
Initiale Denaturierung	95	120
Denaturierung	95	5
Primer-Anlagerung (Annealing), Elongation	58	20
Fluoreszenzmessung		
→ 40 Zyklen		
Schmelzkurve in 0,5°C Schritten	58-95	je 5
Fluoreszenzmessung		
Kühlung	4	-

Zur eigentlichen Quantifizierung der Genexpression wurde der ΔCt verwendet. Dabei wurde der Mittelwert der Ct-Referenzwerte mit dem Mittelwert der Ct-Werte der Zielgene bestimmt und wie nachfolgend berechnet: $\Delta Ct = 2^{Ct(\text{Referenzgen}) - Ct(\text{Zielgen})}$. Umso größer der ΔCt -Wert einer Probe, desto höher das Expressionsniveau des Gens. Neben der Kontrolle der oben erwähnten Negativ- und Primerkontrollen, wurden standartmäßig 15 μl Probe in 3 μl (6x) *DNA-Loading Dye* (3.4.4) durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Unter Verwendung eines 1 kb DNA-Markers wurde somit die korrekte Amplikonlänge, sowie etwaige Verunreinigungen mit genomischer DNA überprüft.

4.4 Wachstumsversuche und Chemotherapie

Das Proliferationsverhalten der MMTV-PyMT Zellen wurde sowohl mit Grid-Platten, als auch mit Hilfe des Replikationsmarkers Ki-67 ermittelt (3.4.5). Des Weiteren wurde das Wachstum der Zellen unter Zytostatikabehandlung erfasst. Folgende Versuche wurden in vorangegangenen Arbeiten etabliert (Mohr et al., 2019a, Mohr et al., 2022, Steudel et al., 2017).

4.4.1 Untersuchung des Wachstumsverhalten mittels Grid-Platten

Das Wachstumsverhalten der MMTV-PyMT Zellen wurde mittels 500Grid-Platten quantifiziert. Wie in Abbildung 4.4 zusehen, bestehen die Platten aus einer 35 mm Zellkulturschale mit eingefrästem quadratischem Raster. Das Raster besteht dabei aus 4 Quadranten, welches wiederum in 10x10 Quadrate unterteilt ist (Abbildung 4.4). Durch die seitliche Nummerierung ist eine direkte und wiederkehrende Analyse des gleichen Areals über die Zeit möglich.

Die MMTV-PyMT Zellen wurden wie in 4.2.2 beschrieben trypsiniert und pro Grid-Platte 80.000 Zellen in 2 ml Zellkulturmedium ausgebracht. Nach Adhäsion für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ erfolgte ein Serumentzug ($\pm 10 \mu\text{M}$ TRAM-34) zur Arretierung des Zellzyklus über 3 Tage (3.4.3). Direkt vor der Restimulation wurden mit dem Mikroskop I (3.2) Aufnahmen von zwei definierten/repräsentativen Arealen im Raster angefertigt (t=0). Anschließend wurde das serumfreie Medium durch 2 ml frisches Zellkulturmedium ($\pm 10 \mu\text{M}$ TRAM-34) ersetzt. Nach 24, 48 und 72 h Inkubation wurden erneut die ausgewählten Areale analysiert (t=1-3). Mit Hilfe des *Cell-Counter*-Plugins des Programms ImageJ (3.2) konnte die Zellzahl pro mm² zu jedem der vier Zeitpunkte (t=0–4) bestimmt werden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Zellzahlen auf t=0 normiert und mit Hilfe von GraphpadPrism (3.2) statistisch analysiert. Verwendet wurde das Mikroskop I (Durchlicht) mit einem 10x Objektiv in schwarz-weiß.

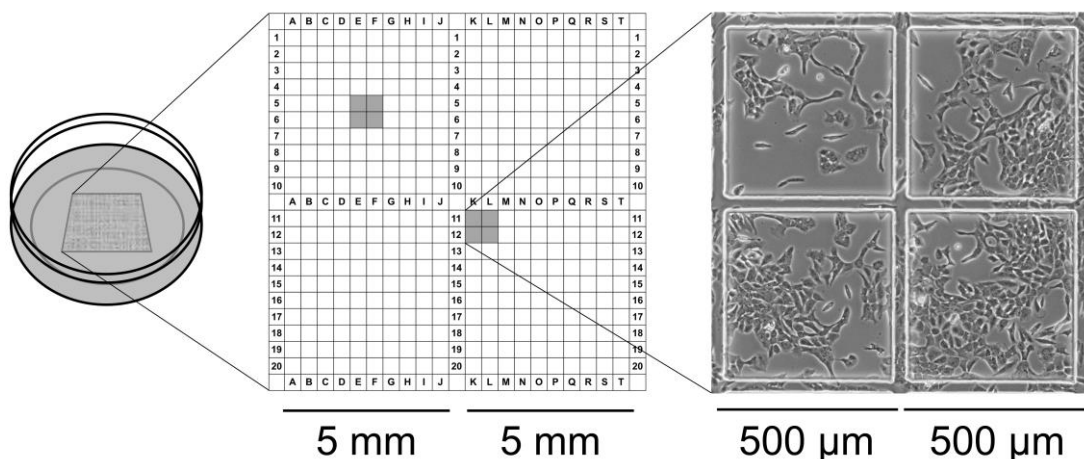


Abbildung 4.4: Koordinatensystem der Grid-Platten

Für Proliferationsversuche wurden 35 mm Grid-Platten verwendet. Das Raster besteht aus vier Feldern (je 5x5 mm) mit 10x10 Quadraten (je 500x500 µm). Weitere Angaben im Fließtext.

4.4.2 Untersuchung des Wachstumsverhaltens mittels Ki-67

Ki-67 markiert sich teilenden Zellen. Während der Interphase transloziert Ki-67 in den Zellkern und wird in der anschließenden Mitose auf den Chromosomen präsentiert. Entsprechend ist Ki-67 nur während der G1-, S- und G2-Phase mittels immunhistochemischer Färbung im Zellkern detektierbar (Sun and Kaufman, 2018). Zur Ermittlung des Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Zellen wurden 50.000 Zellen in eine 8 Well μ -Kammer (3.4.5) ausgebracht. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde für 72 h ein Serumentzug durchgeführt (3.4.3). Je nach Versuchsaufbau wurde hierfür serumfreies Medium \pm TRAM-34 (10 μ M) verwendet. Im Anschluss wurden die Zellen entweder direkt fixiert (t=0), oder mit 400 μ l Zellkulturmedium (\pm 10 μ M TRAM-34) über 72 h restimuliert (t=72 h). Für die immunhistochemische Analyse wurden die Zellen mit 400 μ l eiskaltem Ethanol (70%) über Nacht bei -20°C inkubiert. Am Folgetag wurde 2x mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 400 μ l 10% NDS-Lösung (3.4.7) blockiert. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Blockierungslösung durch die anti-Ki-67 Primärantikörper-Lösung (1:1000 mit 1,5% NDS in 1xPBS) ersetzt. Nach 2 h bei RT in Primärantikörperlösung erfolgten zwei weitere Waschschriffe mit 1xPBS. Zur Detektion der anti-Ki67 Antigenkomplexe wurden 200 μ l einer Sekundärantikörper-Lösung (Alexa Fluor® 555 (3.4.7) 1:800 mit 1,5% NDS in 1xPBS) für 1 h bei 4°C unter Lichtabschluss eingesetzt. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit 1xPBS, bevor die 8 Well Platte vom Objektträger getrennt wurde. Die Zellen wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI-versetztem *Mounting*-Medium (Vectashield, 3.4.7) und einem 24x60 mm Deckgläschen eingedeckelt. Zur Auswertung der Ki-67 Immunfluoreszenz wurde das Fluoreszenz Mikroskop IV (Histologie) verwendet (3.2). Pro Kondition wurden mehrere Bilder mit einem 40x Objektiv bei 555 nm (Ki-67) und 460 nm (DAPI) aufgenommen. Zur Quantifizierung wurde die Gesamtzahl der Kerne pro Bildausschnitt sowie die Ki-67-positiv gefärbten Zellen ausgezählt. Der relative Anteil der Ki-67 positiven Kerne wurde für alle Zeitpunkte auf den t=0 h Wert normiert und als Ki-67 Index definiert.

4.4.3 Wachstumsverhalten unter Chemotherapie

Um den Einfluss von therapierelevanten Zytostatika auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Zellen zu untersuchen, wurden zuvor beschriebene Grid-basierte Wachstumsassays als auch Ki-67 Expressions-Analysen durchgeführt (4.4.1 und 4.4.2). Die in der Therapie von Brustkrebspatientinnen indizierten Zytostatika variierten in ihrer Pharmakodynamik und Dosierungen, um eine breitgefächerte Aussage über das Zellwachstum (3.4.3) unter Behandlung treffen zu können. Eingesetzt wurden Alkylanzien (Cyclophosphamid), Taxane (Docetaxel), Anthrazykline (Doxorubicin) und (Pyrimidin-) Antimetabolite (5-Fluorouracil) als Monotherapeutika in folgenden Endkonzentrationen: Cyclophosphamid (0, 10, 100 und 1000 μ M.), Docetaxel (0, 1, 20 und 100 nM) Doxorubicin (0, 10, 100 und 1000 nM) und 5-Fluorouracil (0, 10, 100 und 500 nM). Konkret wurden die Zytostatika bei der Restimulation der Zellen (d.h. nach 72 h Serumentzug) über 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Wie in Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2 beschreiben wurden die Wachstumsversuche durchgeführt und anschließend die relativen Proliferationsraten (normiert auf t=0 h), oder der Ki-67 Index zum Zeitpunkt t=72 h berechnet. Durch eine zusätzliche Normierung auf die jeweils unbehandelte Gruppe (0 nM) war ein direkter Effekt der Zytostatika auf das Zellwachstum erkennbar.

4.5 Migrations- und Invasionsversuche

Das Migrations- und Invasionsverhalten der MMTV-PyMT Zellen wurde mit Hilfe des *Scratch*-Tests, der Boyden-Kammer, sowie qPCR Analysen (siehe Abschnitt 3.4.6) und HE Färbungen (siehe Abschnitt 3.4.7) analysiert. Zur Unterscheidung von Invasion und Migration, wurde im Boyden-Kammer Assay eine einfache Schicht Matrigel aufgetragen, welche die Intravasation durch das Gewebe simulieren sollte.

4.5.1 Untersuchung des Migrationsverhalten mittels Scratch-Assay

Vor Versuchsbeginn wurde mit einem ethanolfesten Feinliner der Boden einer 35 mm Zellkulturschale in 4 Rasterquadranten eingeteilt, welches der Identifikation der Migrationsareale diente. Im Anschluss wurden MMTV-PyMT Zellen wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben trypsinisiert und 100.000 Zellen in den entsprechend vorbereiteten 35 mm Zellkulturschale ausgebracht. Nach 24 h Kultivierung in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂, folgte ein Serumentzug über 72 h (siehe Abschnitt 3.4.3). Die G1-Arretierung wurde entweder mit oder ohne 10 µM TRAM-34 im serumfreien Zellkulturmedium durchgeführt (Grada et al., 2017). Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurde mit einer 1.000 µl Pipettenspitze der Zellrasen in den entsprechend gekennzeichneten Arealen verletzt (*Scratch*) (siehe Abbildung 4.5). Anschließend konnte von jedem der vier Areale pro Platte eine Aufnahme mit einem inversen Durchlichtmikroskop (Mikroskop I, 3.2) erstellt werden (t=0). Eine Restimulation mit 2 ml Zellkulturmedium (\pm 10 µM TRAM-34) erfolgte direkt im Anschluss an die basale Messung (t=0) über 24 h. Um das Migrationsverhalten der Zellen von der nach Restimulation wiedereinsetzenden Proliferation unterscheiden zu können wurde der Versuch nach 24 h ausgewertet (Pastar et al., 2018). Es ist davon auszugehen, dass in dieser eher kurzen Zeitspanne die freie Fläche des *Scratches* ausschließlich von migrierenden Zellen geschlossen wird. Generell wurde das Migrationsverhalten nach 8 und 24 h (t=1-2) dokumentiert und mittels ImageJ-Software analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in dieser Arbeit nur die 24 h Werte (t=2) angegeben. Anschließend wurde die relative freie Fläche berechnet, in dem jeder Zeitpunkt auf den basalen t=0 Wert normiert wurde. Verwendet wurde das inverse Durchlicht-Mikroskop I. Die Bilder wurden in schwarz-weiß mit 10x Vergrößerung aufgenommen.

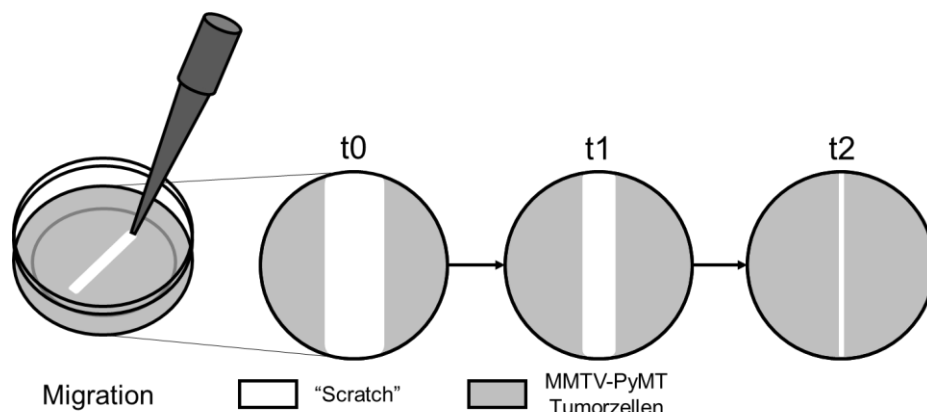


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Scratch-Tests

Für Migrationsversuche wurden 35 mm Zellkulturschalen verwendet. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurde der Tumorzellrasen (grau) durch einen *Scratch* (weiß) verletzt. Über 24 h wurde die Fläche des *Scratch* (weiß) an mehreren zuvor festgelegten Zeitpunkten bestimmt (t0–t2). Aus dem Wundverschluss lässt sich das Migrationspotenzial der MMTV-PyMT Tumorzellen unter definierten experimentellen Bedingungen ableiten.

4.5.2 Untersuchung des Migrationsverhalten mittels Boyden-Kammer Assay

Zur Validierung der in Abschnitt 4.5.1 erläuterten Migrationsversuche wurde ergänzend der Boyden-Kammer Assay verwendet. Dieser besteht aus einem Insert für 6 Well Multiplatten, welches mit einer Porenmembran (Porengröße 8 μm) überspannt ist. Die Zellen wurden dabei direkt auf die Membran ausgebracht, kultiviert und durch einen induzierten Serumgradienten zu einer gerichteten Migration gezwungen (4.5).

Zu Versuchsbeginn wurde das Insert in die Multiplatte eingesetzt und 1 ml Zellkulturmedium (10% FCS) in die untere Kammer vorgelegt, sodass Kontakt zur Membran des *Inserts* erzeugt wurde. Anschließend wurden 100.000 Zellen in 500 μl serumfreien Zellkulturmedium (0% FCS) in die obere Kammer gegeben (Abbildung 4.6 A). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne FCS in der unteren Kammer. Die Multiplatten wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die *Inserts* mit den in der oberen Kammer verbliebenen Zellen nach Entfernung des Mediums in 4% PFA Lösung für 10 min bei RT fixiert. Nach zwei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit 1xPBS wurden die Zellen im nächsten Schritt 3 min in 1% Kristallviolett Lösung angefärbt. Zur Entfernung der Färbelösung folgten 2x Waschschriffe mit 1xPBS, sowie eine Trocknung der Membran bei RT. Mit Hilfe eines Skalpell wurde die Membran vom *Insert* getrennt und mit Permafluor (3.4.6) auf einen Objektträger eingedeckelt, sowie mit Nagellack fixiert. Es wurden mehrere Aufnahmen mit einem inversen Durchlichtmikroskop (Mikroskop I, siehe 3.2) erstellt und mittels ImageJ-Software quantifiziert. Des Weiteren wurde das Medium der unteren Kammer mit Hilfe von Hämizytometern (Neubauer-Zahlkammern) auf abgelöste Zellen untersucht.

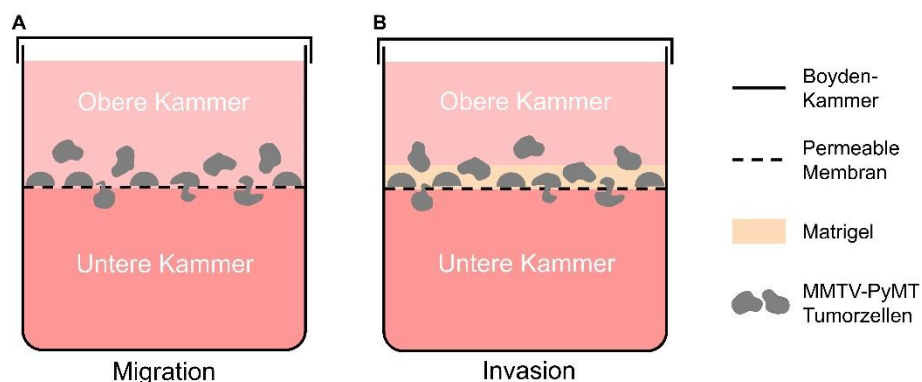


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Boyden-Migrations- und Invasionsassays

Zur Untersuchung des Migrations- und Invasionspotenzials der MMTV-PyMT Zellen wurden Boyden-Kammern verwendet. Diese bestehen aus einer unteren und oberen Kammer, sowie einer permeablen Membran. Die obere Kammer wird mit einer Zellsuspension aus serumfreiem Medium befüllt. Die untere Kammer beinhaltet serumhaltiges Medium mit 10% FCS, was einen chemotaktischen Gradienten erzeugt, welcher zur gerichteten Migration der Zellen führt (A) Die Tumorzellen wandern entlang des Gradienten durch die 8 μm Poren der Membran und können anschließend auf der Membranunterseite quantifiziert werden. (B) Beim Invasionsassay müssen die Tumorzellen ergänzend zur Membran eine dünne Schicht Matrigel durchwandern.

4.5.3 Untersuchung des Invasionsverhalten mittels Boyden-Kammer Assay

Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens von MMTV-PyMT Zellen wurden die Boyden-Kammern zusätzlich mit extrazellulärem Matrigel (MaxGel™ ECM) überschichtet (siehe Abbildung 4.6 B und 3.4.6). Die Tumorzellen mussten entsprechend die Matrigelschicht und die Membran des *Inserts* infiltrieren bzw. durchdringen. Das Matrigel wurde vor Verwendung

dauerhaft auf Eis gelagert, da eine erhöhte Temperatur zum Aushärten führen konnte. Im Verhältnis 1:7 wurde das Matrigel mit eiskaltem IMEM gemischt und pro Membran bzw. *Insert* wurden 200 µl der verdünnten Lösung vorgelegt. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ war das MaxGel™ ECM geliert. Der weitere Versuchsablauf verlief analog zu den in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Migrationsversuch.

4.6 Histologische Methoden

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Organe (z.B. Lungenflügel, Leber) von tumortragenden MMTV-PyMT Tieren entnommen, nachdem diese das Abbruchkriterium erreicht hatten (4.1.4). Die Organentnahme erfolgte analog zur Tumorentnahme (4.1.4). Teile der Leber sowie jeweils ein Lungenflügel wurden in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und zur Fixierung 3 h in 4% PFA (3.4.7) auf einem Schütteltisch inkubiert. Zwei Waschschrte mit 1xPBS beseitigten das überschüssige PFA. Nachfolgend wurde ein Saccharosegradient zur Kryoprotektion der Organe eingestellt. Die Proben wurden hierfür jeweils mit 10 ml 5% Saccharoselösung in 1xPBS für 30 min, 10% über Nacht und 20% für 24 h bei 4°C inkubiert. Anschließend konnten die Organe in Neg-50™ Einfriermedium für 24 h bei -80°C eingefroren werden (Steudel et al., 2017). Wie in Abschnitt 4.6.1 beschrieben wurden die Organe geschnitten und anschließend gefärbt.

4.6.1 Herstellung der Gewebeschnitte

Zur Herstellung von Gewebeschnitten für die Detektion von Leber-/Lungenmetastasen, wurden die Organe mit einem Kryo-Mikrotom (Microm HM 560 3.4.7) prozessiert (Zhou and Moore, 2017). Die in Abschnitt 4.1.4 eingebetteten Leber-/Lungengewebe wurden entlang der Sagittalachse in 10 µm dicke Gewebsscheiben geschnitten. Pro Objektträger konnten bis zu 4 Organschnitte von WT- oder KO-Tieren aufgenommen werden. Nach 10 Schnitten wurden 500 µm der Präparate verworfen bevor wieder 10 µm Schnitte hergestellt wurden. Durch dieses Vorgehen war es möglich, auch große Organe bzgl. eingedrungene Absiedelungen (Metastasen) sicher zu erkennen. Durch Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen (HE, siehe 4.6.2) wurden die Mikrometastasen letztlich detektiert. Nicht gefärbte Objektträger konnten bei -80°C gelagert werden. Die nicht prozessierten Geweberückstände konnten nach einer Aufreinigung für RNA- oder Proteinanalysen weiter verwendet werden. Neben Lungen- wurden auch Lebergewebe, analog geschnitten und mittels HE-Färbung untersucht. Aufgrund des MMTV-PyMT Hintergrundes werden allerdings primär Lungen infiltriert, sodass keine Metastasen im Lebergewebe detektiert wurden (Daten nicht gezeigt).

4.6.2 HE-Färbung

Die Hämatoxylin- (H) und Eosin- (E) Färbungen diente der Kenntlichmachung von Mikrometastasen des Lungen- und Lebergewebes (Steudel et al., 2017, Fischer et al., 2008), welche in Abschnitt 4.6.1 erzeugt wurden. Durch einen Ethanolgradienten (50%, 70%, 90%, 100%, 90% in dH₂O) konnten die Objektträger zunächst schonend dehydriert und mit abfallenden Ethanolkonzentrationen (100%, 90%, 70%, 50% in dH₂O) wieder rehydriert werden. Nach 3x Waschrten mit dH₂O wurden die Schnitte 5 sec in Hämatoxylin-Lösung gefärbt (3.4.7), erneut 2x gewaschen (dH₂O) und anschließend 30 sec in 0,1% Ammoniaklösung, zur Farbentwicklung,

getränkt (Renshaw, 2013). Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift (Leitungswasser) für 5 min, konnten die Objektträger 10 min in Eosin-G Lösung gefärbt werden (3.4.7). Überschüssiges Eosin-G wurde mittels 5x Waschschriften mit Leitungswasser entfernt und wurde zur Differenzierung 2 min in 80% Ethanol, 3 min in 100% Ethanol und letztendlich zur Dehydration 5 min in 100% Toluol inkubiert. Nach dem Eindeckeln in DePeX (3.4.7) wurden die Schnitte nach 24 h Trocknung im Histo-Scanner (3.2) analysiert. Die anschließende visuelle Analyse auf Mikrometastasen in Lungen- und Lebergeweben, sowie die Berechnung des Durchmessers erfolgte mit Hilfe der CaseViewer-Software (3.2).

4.6.3 Immunfluoreszenz Färbung

Die Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde bereits ausgeführt (Abschnitt 4.4.2). Der folgende Abschnitt beschreibt darüber hinaus p62 Multiplexfärbungen, sowie Darstellungen des IK-Kanals mittels geeigneter Primär-/Sekundärantikörper sowie die in 4.2 aufgeführte ERA Färbung.

p62 Multiplexfärbung

Für die Untersuchung des Autophagiemarkers p62 wurden 50.000 MMTV-PyMT Zellen in einer 8 Well μ -Kammer (3.3) ausgebracht. Nach der Kultivierung über 24 h in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ wurde ein Mediumwechsel vollzogen. Dabei wurden entweder 400 ml Zellkulturmedium, 100 nM Bafilomycin A1 in Zellkulturmedium, EBSS oder 100 nM Bafilomycin A1 in EBSS zugegeben und für 3 h bei Standardbedingungen inkubiert (Schüssele et al., 2022). Im Anschluss an eine Fixierung für 10 min in 4% PFA folgten 3x Waschschriften mit 1xPBS, sowie 1 h in einer Blockierlösung (1% BSA in 1xPBS/T) auf 4°C. Gefolgt von 2x weiteren Waschschriften in 1xPBS/T wurde die Zellen über Nacht in der Primärantikörperlösung bei 4°C inkubiert. Der anti-p62 Antikörper (Kaninchen) wurde dabei 1:100 in 1xPBS/T verdünnt. Am Folgetag wurde erneut 2x mit 1xPBS/T gewaschen und sowohl die Sekundärantikörperlösung, als auch Phalloidin-647 für 2 h bei RT im Dunklen inkubiert. Der Sekundärantikörper Alexa Fluor® 555 (anti-Kaninchen IgG) wurde dafür 1:200 und Phalloidin-647 1:1000 in 1xPBS/T verdünnt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 1xPBS/T und einmal mit 1xPBS gewaschen. Die 8 Well Platte wurde vom Objektträger getrennt und die Zellen mit DAPI-versetztem Mounting-Medium (Vectashield, 3.4.7) eingedeckelt. Nach der Trocknung über Nacht bei 4°C wurden mehrere Bilder pro Well mit einem Fluoreszenzmikroskop IV (3.2) aufgenommen. Emissionswellenlängen von 460 nm detektierten die Zellkerne (DAPI), 555 nm die p62-*puncta* und 647 nm das F-Aktin des Cytoskeletts einer Zelle (Phalloidin) (Verderame et al., 1980). Die Aufnahmen wurden im Anschluss mit dem Programm CellProfiler bearbeitet und analysiert. Aufgrund der Agglomeration von p62 in den Autophagosomen wurden nur größere *puncta* über einem zuvor definierten *threshold* (Einstellung: *RenyiEntropy*, ImageJ) als positiv bewertet. Dabei detektierte das Programm den Umriss der Zelle aufgrund der Phalloidinfärbung, den Nukleus aufgrund von DAPI, sowie die p62 *puncta* in den Autophagosomen. Automatisch wurde die *puncta*-Anzahl pro Zelle ermittelt.

IK-Kanal Färbung

Für die Funktionsüberprüfung des transienten IK-Kanals in IK KOs (IK *rescue*) wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Da eine Re-Expression des IK-Kanals beobachtet werden sollte, wurde auf die Transfektion von WT-Zellen (exprimieren IK basal) verzichtet. Zu Beginn wurden 50.000 MMTV-PyMT IK KO-Zellen wie in Abschnitt 4.2.2 trypsiniert und in einer

8 Well μ -Kammer (3.4.7) 24 h inkubiert. Es folgte eine Transfektion des *KCNN4 untagged*-Plasmids, wie in Abschnitt 4.9.1 beschrieben, was zu einer transienten Expression des IK-Kanals nach 24 h führte. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte IK KO-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit 4% PFA für 10 min fixiert, 2x mit 0,3% Triton in 1xPBS gewaschen und anschließend mit 400 μ l 10% NDS-Lösung (3.4.7) blockiert. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Blockierlösung durch die Primärantikörper-Lösung ersetzt. Dafür wurde der IK-Antikörper 1:200 mit 1,5% NDS-Lösung verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten 2x weitere Waschschritte mit 0,3% Triton in 1xPBS, sowie 200 μ l der Sekundärantikörper-Lösung, bestehend aus Alexa Fluor® 555 (3.4.7) 1:800 und Phalloidin-647 1:1000 in 1,5% NDS-Lösung. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 4°C in einer dunklen Kammer. Es folgten 2x weitere Waschschritte mit 0,3% Triton in 1xPBS. Anschließend wurde die 8 Well Platte vom Objektträger getrennt und die Zellen mit DAPI-versetztem Mounting-Medium (Vectashield, 3.4.7) eingedekelt. Zur Auswertung der IK-Immunfluoreszenz wurde das Fluoreszenzmikroskop IV (3.2) verwendet. Folgende Wellenlängen wurden mit einem 40x Objektiv aufgenommen: 555 nm (IK-Kanal), 460 nm (Nuklei, DAPI) und 647 nm (F-Aktin des Cytoskeletts, Phalloidin). Die Überlagerung der drei Wellenlängen zur Detektion des IK Kanals in der Zellmembran war durch die Software ZeissZenBlue möglich (3.2)

Analoge IF-Färbungen wurden auch in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen, als auch in der humanen MCF7 Zelllinie (3.4.7) durchgeführt. Verwendet wurde dabei der anti-ER α Primärantikörper und AlexaFluor®488 anti-Maus Sekundärantikörper, sowie DAPI (3.4.7).

4.7 Biochemische Methoden

Für die Protein-Analyse aus MMTV-PyMT Tumorzellen wurden zwei verschiedene Methoden zur Lyse und Quantifizierung verwendet. Zur Ermittlung der reinen Proteinkonzentration nach der Messung des extrazellulären Flux (*Seahorse*) wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Für Western Blot Analysen wurden die Proteine mit einem reduzierenden Lysepuffer isoliert, anschließend via Bradford quantifiziert und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

4.7.1 BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteinnachweis durch den BCA-Assay beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ und kolorimetrischen Nachweis der erhaltenen blau-violett Färbung durch Bicinchoninsäure (BCA) (Walker, 1994) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Schretter et al., 2018).

Nach der Messung des extrazellulären Flux (4.11) mussten die erhobenen Daten auf den letztendlichen Proteingehalt normiert werden. Hierfür wurden die 24 Well Multiplatten nach der Zellstoffwechsel-Messung abgesaugt und die Zellen in 20 μ l RIPA-Puffer lysiert (3.4.8.1). Der Aufschluss der Zellen wurde durch 10 min Inkubation auf in einer Rüttelplatte unterstützt. Darauf folgte eine 1:5 Verdünnung mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l, sowie eine erneute Inkubation der Proben auf der Rüttelplatte für 10 min. 20 μ l der Zellsuspension wurden in eine frische 96 Well Multiplatte überführt und mit weiteren 80 μ l dH₂O verdünnt. Zur letztendlichen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Standardkurve (von 0,78 μ g/ml bis 400 μ g/ml) entsprechend (angepasster) Herstellerangaben (ThermoFisherScientific, 2015) angefertigt. Als Negativkontrolle dienten 100 μ l dH₂O, sowie 100 μ l verdünnter RIPA-Puffer (1:25 in dH₂O) ohne Protein. Die Proben wurden 1:8 mit dem fertigen BCA-

Reagenzienmix verdünnt und für 1 h bei 37°C inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschlag nach blau-violett zu sehen war. Darauf folgte die Vermessung bei 562 nm im Tecan Sunrise Remote Plattenlesegerät (3.2). Anhand der BSA-Standardkurve konnte die Proteinkonzentration der Proben, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (1:25), bestimmt werden.

4.7.2 Zellyse und Proteinisolierung

Für die Proteinisolation wurden MMTV-PyMT Zellen in T175 Zellkulturflaschen ausgebracht, 24 h adhären lassen und weitere 48 h in Zellkulturmedium ($\pm 2 \mu\text{M}$ TRAM-34) kultiviert (3.4.8.2). Je nach Versuchsaufbau wurden letztendlich $5\text{--}20 \times 10^6$ Zellen entweder direkt zur Proteinisolation verwendet oder zuvor 3 h mit 100 nM Bafilomycin A1 in Zellkulturmedium, EBSS oder 100 nM Bafilomycin A1 in EBSS behandelt und bei 37°C inkubiert.

Zur eigentlichen Proteinisolation mussten die Zellen zunächst trypsinisiert werden, anschließend bei 1.000 rpm für 5 min bei RT herunterzentrifugiert werden und das entstandene Pellet in 200 μL Lysepuffer L (3.4.8.2) resuspendiert werden. Zur vollständigen Lyse wurde die Zellsuspension 30 min auf Eis inkubiert. Für die Trennung der isolierten Proteine von den Zelltrümmern, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 rpm auf 4°C für 15 min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford (4.7.3) durchgeführt. Falls die Proteinproben nicht direkt für Western Blot Untersuchungen verwendet wurden, konnten diese aliquotiert und bei -20°C gelagert werden.

4.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung der in Abschnitt 4.7.2 lysierten Proteine wurde die photometrische Bestimmung nach Bradford verwendet. Dabei handelt es sich um eine Triphenylmethanfarbstoff-Lösung, welche Coomassie-Brillant-Blau G-250 enthält und somit photometrisch zur Quantifizierung von Proteinen in Lösung entlang einer Kalibriergeraden mit definierter Standardproteinmengen genutzt werden kann (Bradford, 1976).

Für die Bestimmung nach Bradford wurden 95 μL demineralisiertes Wasser (3.4.8.2) mit 5 μL Probe in einer Küvette verdünnt. Für die Negativkontrolle (Blank) wurden 5 μL des Lysepuffers L (3.4.8.2) statt Probe verwendet. Es folgte eine direkte Zugabe von 1 ml Bradford-Lösung (3.4.8.2), sowie eine Inkubation für 5 min bei RT im Dunkeln. Die photometrische Messung (3.2) erfolgte bei 595 nm. Im letzten Schritt konnten alle vermessenen Proben auf die niedrigste Konzentration eingestellt werden, sodass gleiche Bandenintensitäten der *Housekeeper*-Proben generiert werden konnten. Zum Verdünnen der Proben wurde Lysepuffer L verwendet.

4.7.4 Western Blot

4.7.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (Svasti and Panijpan, 1977). Je größer das zu detektierende Protein, desto niedriger die Konzentration an Polyacrylamid. Aufgrund der Variation an zu detektierenden Proteinen wurden zwei verschiedene Gele (Zweistufiges- und Gradientengel) verwendet. Die Proben LC3B und CaM, sowie $\alpha\text{Tubulin}$ wurden aufgrund der

geringen Proteingröße (kDa) im Gradientengel aufgetrennt, während alle weiteren Proteine ein zweistufiges Gel zur Auftrennung durchwanderten.

Zum Gießen der Polyacrylamidgele wurde zunächst die Gießapparatur mit einer Spaltbreite von 0,75 mm korrekt zusammengesetzt. Allen Gelen gemein war, dass zunächst das Trenngel gegossen wurde, sowie im weiteren Verlauf *Spacer*- (nur für Gradientengele) und Sammelgele folgten (3.4.8.3). APS und TEMED wurden immer zuletzt in die Gelier-Lösungen zugegeben, dann in die Gießapparatur befüllt und mit 100%igem Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren folgte die nächste Gelschicht, sowie im Anschluss an das Befüllen des Sammelgels, das Aufsetzen des Kamms. Folgende Konzentrationen an Acrylamid wurden verwendet: Zweistufiges Gel mit 12,5% Trenn-, und 5% Sammelgel. Gradientengel mit 19,5% Trenn-, 13,5% *Spacer*- und 5% Sammelgel.

Die in Abschnitt 4.7.3 vorbereiteten Proteinproben wurden mit 4x Laemmli (3.4.8.3) versehen und für 10 min in einem Thermoschüttler bei 95°C denaturiert. Innere-, als auch äußere Gellektrophoresekammern wurden mit 1xElphor (3.4.8.4) überschichtet. Pro Tasche wurden 25 µl Probe mit einer Hamilton Spritze befüllt, sowie leere Wells zum Ausgleich mit 5 µl 4xLaemmli beladen, und mindestens eine Tasche mit 3 µl Proteinmarker IV (3.4.8.4) versehen. Bei 80 mV konnten die Proteine bis aus dem Sammelgel diffundieren und nachfolgend bei 120 mV komplett aufgetrennt werden. Es folgte der Transfer auf eine PVDF-Membran (4.7.4.2).

4.7.4.2 Transfer via „semi dry“ Western Blot

Zum Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen (Dusseldorf, 2019) wurde eine speziell für Fluoreszenz-Detektion generierte Polyvinylidendifluorid-(PVDF) Membran verwendet (3.4.8.4). Zu Beginn wurden sowohl die vorgeschchnittene Membran, als auch Whatman-Papiere wie folgt in den Transferpuffern für 5 min equilibriert: 5 x Whatman-Papiere in Anode 1 Puffer, 3 x in Anode 2 Puffer und weitere 5 x Papiere im Kathodenpuffer. Die PVDF-Membran wurde zunächst in 100% Methanol aktiviert und anschließend 5 min im Anode 2 Puffer equilibriert. Im Anschluss wurden die Papiere, Membran und Gel in folgender Reihenfolge auf die Anode der *semi dry* Blotting Apparatur gestapelt: Anode 1, Anode 2, Membran, Gel, Kathode. Nach Aufsetzen des Kathoden-Deckels der Apparatur konnten die Proteine für 1 h bei 80 mA und anschließend 15 min bei 150 mA transferiert werden.

Die Membran wurde schließlich in 5% Milchpulver in 1xTBST (3.4.8.4) für 1 h blockiert. Alle Blockier- oder Waschschrte wurden bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte mit 60 U/min durchgeführt. Es folgte die Inkubation der Membran im Primärantikörper (in 5 ml Antikörperverdünnungslösung, siehe 3.4.8.4) über Nacht bei 4°C. Die Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt. Am Folgetag wurden die Membranen 3 x für 10 min in 1xTBST gewaschen und anschließend in der sekundären Antikörperlösungen (siehe Tabelle 6) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren 10 min Waschschrte in 1xTBST wurden die Membranen getrocknet und standen zur Detektion (4.7.4.3) bereit.

Tabelle 6: Antikörperliste für Western Blot Analysen

Primärantikörper (in Antikörperverdünnungslösung)			
Antikörper	Spezies	Masse (kDa)	Verdünnung
anti-AKT	Kaninchen	60	1:1000
anti-Phospho-AKT	Kaninchen	60	1:1000
anti-AMPK	Kaninchen	62	1:1000
anti-Phospho-AMPK	Kaninchen	62	1:1000
anti-CaM	Kaninchen	17	1:1000
anti-CaMKK2	Maus	68	1:1000
anti-GAPDH	Kaninchen	38	1:1000
anti-LC3B	Kaninchen	14, 17	1:1000
anti-LKB1	Kaninchen	54	1:1000
anti-Phospho-LKB1	Kaninchen	54	1:1000
anti-P62	Kaninchen	62	1:1000
anti-ULK1	Kaninchen	140	1:1000
anti-Phospho-ULK1	Kaninchen	140	1:1000
anti- α -Tubulin	Maus	52	1:1000

Sekundärantikörper (in 1xTBST)			
Antikörper	Spezies	Excitations-Maximum (nm)	Verdünnung
CY5 anti-Kaninchen	Ziege	649	1:2500
CY3 anti-Maus	Ziege	555	1:2500

4.7.4.3 Detektion und Analyse

Zur Detektion der Proteinbanden wurden die getrockneten Membranen im GSK-Imager (3.2) vermessen. Die Belichtungszeit der Proben variierte je nach Antikörper, wurde aber beim direkten Gegenüberstellen der Genotypen nicht verändert. Zur Quantifizierung der Banden, wurde die Software ImageQuant TL 9.0 (3.2) verwendet. Neben der Subtraktion des Hintergrunds, wurden die Proben ebenfalls auf den jeweiligen *Housekeeper* (GAPDH, α Tubulin) normalisiert. Eine weitere Normalisierung auf die WT- oder Kontrollgenotypen zeigte des Weiteren den direkten Einfluss des Genotyps oder einer Behandlung. Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism (siehe Abschnitt 4.12).

4.8 Klonierung

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden entweder kommerziell erworben (OriGene; Addgene), oder durch die Kooperation mit Prof. Roland Malli (MedUni Graz, Österreich), bzw. Dr. Helmut Bischof (Experimentelle Pharmakologie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden kurz vor Verbrauch mittels Transformation in *E. coli* und anschließender Mini-/Maxi-Präparation erneuert und im Anschluss sequenziert. Im Folgenden sind diese Arbeitsschritte aufgeführt.

Die Klonierung eines emiRFP gekoppelten KCNN4-Plasmids erfolgte mittels Amplifikation, Restriktion und Ligation aus einem *emiRFP670*- und dem kommerziellen *untagged KCNN4*-Plasmid (Origene), siehe Abbildung 9.7. Trotz der positiven Klonierung und der Detektion des *emiRFP-KCNN4* in transfizierten IK KO-Zellen, konnte eine Funktionalität des Kanals nicht bestätigt werden. Aufgrund dessen wurden weitere Experimente des IK *rescue* nur mit dem nicht Fluorophor-gekoppelten KCNN4-Plasmid (*KCNN4 untagged*, Origene) durchgeführt.

4.8.1 Transformation und Kolonie-PCR

Für die Transformation der Plasmide wurden NEB 5-alpha E. coli (3.4.9) verwendet. Hierfür wurden 25 µl der kompetenten NEB 5-alpha E. coli für 10 min auf Eis aufgetaut und mit 1 µl DNA des zu reproduzierenden Plasmids, versetzt. Durch vorsichtiges Invertieren wurde eine optimale Durchmischung erreicht. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42°C für 30 sec. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden 475 µl SOC Medium (3.4.9) zugegeben und für 1 h bei 37°C und 250 rpm auf einem Thermo-Schüttler inkubiert. Nachfolgend wurden 500 µl der SOC-Kultur auf vorgewärmte (37°C) Selektivagarplatten mit entsprechendem Resistenzantibiotikum (Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (100 µg/ml) (3.4.9)) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am Folgetag wurden einzelne Klone der gewachsenen Kolonien expandiert und die Plasmid DNA wurde mittels Mini- oder Maxi-Präparation für nachfolgende Untersuchungen isoliert. Hierfür wurden je 10 ml Selektiv-LB-Medium in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen mit einer 200 µl Pipettenspitze angeimpft, mit der zuvor ein Klon der Selektivagarplatte gepickt wurde. Das Wachstum der Klone in dem Selektiv-LB-Medium (3.4.9) erfolgte für 8 h bei 37°C und 250 rpm.

Zur Vorselektion welcher der gepickten Klone für eine Mini-/Maxipräparation in Frage kommt, wurde eine Kolonie-PCR mit 10 Klonen durchgeführt. Mit einer 200 µl Pipettenspitze wurde vorsichtig ein Klon der Platte gepickt und durch auf- und abwärts pipettieren in 10 µl DEPC-H₂O in einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäßes verdünnt. Dieselbe Spitze wurde anschließend in 500 µl Selektiv-LB-Medium in einem 2 ml Reaktionsgefäßes über Nacht bei 37°C inkubiert. Unter Verwendung der Insert-Primer und Taq DNA-Polymerase (3.4.9) wurde die Plasmid-DNA des jeweiligen Klons durch eine PCR amplifiziert. Tabelle 7 beschreibt das Pipettierschema. In einem Thermocycler wurden die Proben initial für 30 sec auf 95°C erhitzt und die DNA anschließend 30 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus durchlief 30 sec auf 95°C (Denaturierung), 60 sec auf 45-68°C (*Annealing*) und 60 sec 68°C (Elongation). Im Anschluss wurden die Proben 2 min auf 68°C inkubiert und final auf 4°C heruntergekühlt. Die amplifizierte DNA wurde anschließend auf ein 1,5% Agarosegel (3.4.1.2) aufgetragen. Derjenige Klon mit der stärksten Bandenintensität auf richtiger Höhe wurde zur weiteren Klonierung verwendet. Das zugehörige 2 ml Reaktionsgefäß wurde vollständig in 10 ml Selektiv-LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tabelle 7: Pipettierschema zur Kolonie-PCR

Komponente	Volumen [μl]	Konzentration
ThermoPol Reaktions-Puffer 10X	2,5	1X
10 mM dNTPs	0,5	200 μ M
10 μ M Primer forward	0,5	0,2 μ M
10 μ M Primer reverse	0,5	0,2 μ M
DNA	Variabel	<1000 ng
Taq DNA-Polymerase	0,125	0,025 U/ μ l
DEPC-H ₂ O	Ad 25	-

4.8.2 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation dient der Isolation von Plasmiden aus geringen Volumina (i.d.R. 1–10 ml). Verwendet wurde dabei das Monarch Plasmid Miniprep Kit (3.4.9) (Burgstaller et al., 2022b). Alle aufgeführten Puffer sind in diesem Kit inkludiert. Das Protokoll entspricht den Herstellerangaben. 5 ml der in Abschnitt 4.8.1 transformierten Plasmide in Selektiv-LB-Medium wurden bei 16.000 x g für 30 sec zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 200 μ l Plasmid Resuspensionspuffer gevortext. Weitere 200 μ l Lyse-Puffer wurden zugegeben und 1 min bei RT inkubiert. 400 μ l Neutralisations-Puffer stoppten die Lyse. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT wurden die Lysate 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand in eine Elutionssäule (Anionenaustauscher) samt Auffangbehälter überführt. Nach 1 min bei 16.000 x g wurde die DNA an die Säule gebunden und 200 μ l Waschpuffer 1 wurden zugegeben, sowie erneut 1 min zentrifugiert. Ein zweiter Waschschritt mit 400 μ l Waschpuffer 2 folgte analog. Nach Zugabe von 25 μ l Elutionspuffer und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 16 000 x g wurde die Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert. Eine Konzentration von 1 μ g/ml wurde nach Messung im NanoDrop (3.2) mittels DEPC-H₂O eingestellt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA konnte nun transfiziert, oder zur Sequenzierung vorbereitet werden (4.8.4).

4.8.3 Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparation dient der Generierung von Plasmiden mit großer Ausbeute d.h. aus 100–500 ml. Verwendet wurde dabei das NukleoBond® Xtra Maxi Plus (3.4.9) (Yang et al., 2021). Alle aufgeführten Puffer sind in diesem Kit inkludiert. Das Protokoll entspricht den Herstellerangaben. Für die Maxi-Präparation wurde der gesamte Inhalt der 10 ml Vorkultur aus Abschnitt 4.8.1 in 500 ml Selektiv-LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Das Selektiv-LB-Medium wurde nach der Inkubation für 15 min bei 6.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 12 ml Resuspensionspuffer (+ RNase A) aufgenommen. Im Anschluss wurden weitere 12 ml Lyse-Puffer zugesetzt und 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Equilibrierung des Aufreinigungsfilters mit 25 ml Equilibrierungspuffer. Im Anschluss an die Zelllyse wurde die Reaktion mit 12 ml Neutralisierungspuffer beendet und die gesamte Suspension in den Aufreinigungsfiler überführt. Durch Zugabe von 15 ml Equilibrierungspuffer wurden die im Filter enthaltende DNA in eine am Filterboden befindliche Säule (Anionenaustauscher) gebunden. Es folgte ein Waschschritt mit 25 ml Waschpuffer, das Entfernen des Aufreinigungsfilters und die Elution in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 15 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Zur Aufkonzentrierung der DNA folgte eine Prezipitation mit Isopropanol. Dabei

wurden die 15 ml Plasmid-Lösung mit 10,5 ml Isopropanol versetzt, gevortext und bei 6.000 x g, auf 4°C, für 30 min zentrifugiert (3.2). Der Überstand wurde abgenommen, die gefällte DNA vorsichtig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 4 ml 70%igen Ethanol gewaschen, erneut für 5 min, auf RT, bei 6.000 x g zentrifugiert und im Anschluss getrocknet. Im letzten Schritt wurde die DNA in 15 µl DEPC-H₂O rekonstituiert, sowie mittels NanoDrop (siehe Abschnitt 3.2) die Konzentration bestimmt und anschließend auf 1 µg/ml eingestellt.

4.8.4 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse der Plasmide erfolgte durch die Firma Microsynth (Microsynth AG, Balgach, Schweiz). Zur Sequenzanalyse wurden je 1 µl Plasmid-DNA (40–100 ng/µl) mit entweder 3 µl *forward*- oder *reverse*-Primer (je nach Plasmid andere Primersequenz, Verweis an Hersteller) in 11 µl DEPC-H₂O verdünnt. Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung konnten mit der bekannten Plasmid Sequenz (generiert in SnapGene, siehe 3.2) durch das Web-Programm Clustal Omega auf Abweichungen untersucht werden (3.2). Erst nach positiver Sequenzanalyse (Übereinstimmung der Sequenzen) wurde das reproduzierte Plasmid für weitere Versuche freigegeben.

4.9 Fluoreszenzbasiertes Imaging

Unter dem fluoreszenzbasierten Imaging wurden alle Versuche mit beladenen Fluoreszenzfarbstoffen, sowie transfizierten FRET- und einfach-Fluorophor-gekoppelten Plasmiden zusammengefasst.

4.9.1 Transfektion

Die Lipotransfektion der MMTV-PyMT Zellen erfolgte nach Herstellerangaben wie folgt (SignaGenLaboratories, 2009). Zu Beginn wurden 6 Well Multiplatten mit 30 mm Glasplättchen bestückt (3.4.3) und 80.000 MMTV-PyMT Zellen in Zellkulturmedium ($\pm 2 \mu\text{M}$ TRAM-34) ausgebracht. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, wurde eine Konfluenz von ca. 80% für optimale Transfektionsbedingungen erreicht. 1 Stunde vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt ($\pm 2 \mu\text{M}$ TRAM-34, oder $\pm 3 \mu\text{M}$ Oligomycin-A). Neben Vollmedium für die Inkubation, wurde Serum- und Pen/Strep-freies IMEM für die Transfektion verwendet, da FCS die Mizellenbildung behinderte. Für die Transfektion wurden pro Versuchsansatz (Well) zwei Reaktionsgefäße (A, B) mit je 50 µl kaltem IMEM versehen. In Reaktionsgefäß A wurden 1 µl Plasmid-DNA (1 µg/ml oder 0,3 µg/ml bei mitochondrialen Plasmiden) zugegeben und vorsichtig gemischt. In Reaktionsgefäß B wurden 3 µl Polyjet zugegeben, anschließend der gesamte Ansatz in Reaktionsgefäß A überführt und vorsichtig gemischt. Für größere Versuchsansätze wurden die Volumina (3.4.10.2) für die Lösungen A und B entsprechend extrapoliert. Nach 10 min Inkubation bei RT bildeten sich lipophile Mizellen. 100 µl der Mizellen-Lösung wurden tröpfchenweise pro Well transferiert und für 16 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Ein erneuter Mediumwechsel stoppte die Transfektion und die MMTV-PyMT Tumorzellen konnten die Sensoren weiterhin transient exprimieren. Evidenzbasiert zeigte sich die höchste Transfektionseffizienz nach 24 h, weswegen zu diesem Zeitpunkt die Sensoren vermessen wurden.

4.9.2 FRET-basierte Fluoreszenz-Messungen

Zum Messen der FRET-basierten Sensoren wurden wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, MMTV-PyMT Zellen ausgebracht und mit Plasmiden transient transfiziert (4.9.1). Der Förster (oder auch Fluoreszenz)-Resonanzenergietransfer (FRET) beschreibt dabei die Übertragung von Energie eines angeregten Donor-Farbstoffes auf einen Akzeptor (Förster, 1948). Dabei wird die Energie strahlungsfrei durch räumliche Annäherung übertragen (siehe Abbildung 4.7). Durch Nutzung von FRET-basierten Biosensoren ist es möglich, Zelldynamiken von Ionen, Proteinen oder bioenergetischen Molekülen in Echtzeit zu überwachen (Zadran et al., 2012). Zur Detektion der in den Zellen transient exprimierten FRET-Sensoren wurde folgendes Setup verwendet: Zeiss Mikroskop (Zeiss Observer Z.1) verbunden mit einer externen Lichtquelle. Verwendet wurde für alle Aufnahmen ein Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil Immersions-Objektiv, ein Splitter (Optosplit II, Cairn Research, Faversham, UK) und eine LED-Hub (Omicron, Rodgau-Dudendorf) ausgestattet mit 340 nm, 380 nm, 455 nm, 470 nm und 505-600 nm LEDs, sowie 340x, 380x, 427/10, 473/10 und 575/15 *Bandpass* Filtern (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland). Emissionswellenlängen wurden durch 409/493/573/652 dichroische Filter und 514/605/730 Emissionsfilter, sowie einen 459/526/596 dichroischen mit 475/543/702 Emissionsfilter bestimmt (AHF Analysentechnik, Tübingen). Zur Aufnahme diente die pco.panda 4.2 bi sCMOS Kamera (pco., Kelheim, Deutschland), sowie zur Akquisition die Software VisiView (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland).

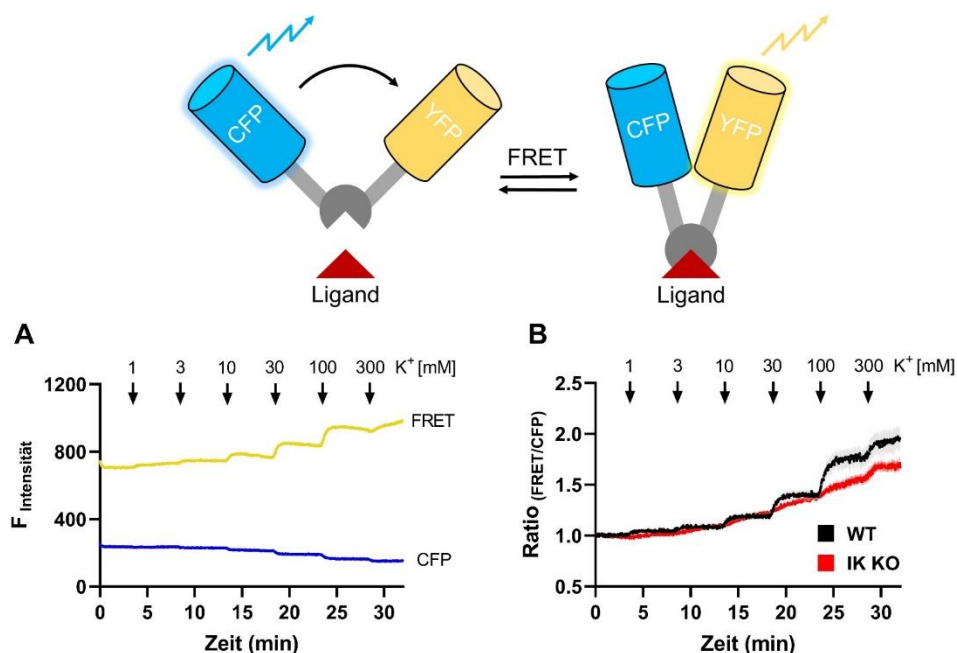


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung eines FRET-basierten Biosensors und repräsentative Messergebnisse

Der hier repräsentativ dargestellte Biosensor ist ein vereinfachtes Modell des cytosolischen Kaliumsenors *cyto GEPII 1.0 (Ic-LysM)* (Bischof et al., 2017). FRET-basierte Biosensoren bestehen aus einem fluoreszenzgekoppelten Donor (CFP) und einem Akzeptor (YFP). Die Bindestelle für den jeweiligen Liganden (Kaliumionen) ist mit Linkern an den Donor und Akzeptor gekoppelt. Im ungebundenen Zustand wird CFP mit einer Wellenlänge von 425 nm angeregt und emittiert in der Folge Licht der Wellenlänge 475 nm. Kommt es zum Binden des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung die Annäherung von Donor zu Akzeptor (FRET). Es resultiert ein Energietransfer von CFP auf YFP und die Emissionswellenlänge des YFP ist detektierbar (525 nm). YFP wird anschließend korrekter als FRET bezeichnet. **(A)** Repräsentative Fluoreszenzintensitäten des *cyto GEPII 1.0 (Ic-LysM)* unter Zugabe von zunehmenden Kaliumkonzentrationen (0–300 mM). Die retrograden Intensitäten von CFP und FRET sind sichtbar. **(B)** Beschreibt die Ratio aus FRET zu CFP und repräsentiert damit die cytosolischen Kaliumkonzentrationen in MMTV-PyMT WT (schwarz) und IK KO (rot) über die Zeit. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=3 WT; N=3 IK KO dar. Grafik A ist auf Grundlage von (Bischof et al., 2017) modifiziert worden.

Für die Messung wurden die in Abschnitt 4.9.1 ausgebrachten 30 mm Glasplatten in die Messkammer eingesetzt und mit Hilfe von Immersionsöl (3.4.10.2) über dem 40x Objektiv platziert. An die Messkammer wurde sowohl der Absaugschlauch, als auch das Perfusionssystem angeschlossen. Durch gleichzeitiges Absaugen und Perfundieren von Messpuffern wurden die Zellen stets mit frischem Nährstoffen versorgt. Beim Perfusionssystem handelte es sich um eine Schwerkraft-basierte und automatisierte Apparatur der NGFI GmbH. Die zu perfundierenden Messpuffer (3.4.10) wurden in die jeweiligen Silos der Apparatur vorgelegt und wurden mit Hilfe der Software (NGFI) durch Entriegeln von Quetschventilen geöffnet. Die Schlauchverbindungen aller Silos mündeten in einem zentralen Katheterschlauch, welcher an der Messkammer angeschlossen wurde. Die Geschwindigkeit wurde in jedem Versuch auf 1 Tropfen/sec eingestellt.

Tabelle 8: Mikroskopie-Einstellungen pro transfiziertem Plasmid

Plasmid	Emission	Extinktion nm: [%]	Belichtungszeit [ms]	Binning	ND	Splitter
AMPKAR	FRET	455: 4	200	4	4	Ja
	CFP	505-600: 4				
AKTAR	FRET	455: 10	200	4	4	Ja
	CFP	505-600: 10				
mTORC1AR	FRET	455: 10	200	4	4	Ja
	CFP	505-600: 10				
NesAT1.03	FRET	455: 10	200	4	2	Ja
	CFP	505-600: 10				
mitoAT1.03	FRET	455: 10	200	2	2	Ja
	CFP	505-600: 10				
D1ER	FRET	455: 10	200	2	2	Ja
	CFP	505-600: 10				
Cyto GEPII 1.0 (Ic-LysM)	FRET	455: 10	200	4	2	Ja
	CFP	505-600: 10				
Mito GEPII 1.0 (Ic-LysM)	FRET	455: 10	200	2	2	Ja
	CFP	505-600: 10				
Laconic	FRET	455: 10	200	4	2	Ja
	CFP	505-600: 10				
Pyronic	FRET	455: 10	200	4	2	Ja
	CFP	505-600: 10				
4mt D3 cpv	FRET	455: 10	200	2	2	Ja
	CFP	505-600: 10				
Car-GECO1	RFP	470: 10	200	4	2	Nein
FURA-2	510	340: 85	200	4	1	Nein
	510	380 2				
TMRM	575	505-600: 10	200	4	1	Nein
2-NBDG	520 Durchlicht	470: 5 DL: 20	50	4	1	Nein

Die restlichen Einstellungen zur Messung erfolgten über die VisiView-Software (3.2). Im Folgenden sind in Tabelle 8 alle Parameter aufgeführt, welche für die entsprechenden Sensoren eingestellt wurden: Belichtungszeit (50–200 ms), Extinktionszeit pro Wellenlänge (2–15%), *neutral density* Filter (ND) zur Dezimierung des einfallenden Lichts auf den Kamera-Sensor (Filter 2: 70% oder Filter 4: 40% Durchlicht). *Binning* 2–4. *Binning* beschreibt eine Technik, um die Bildrate und den Dynamikbereich der Kamera zu erhöhen und gleichzeitig das Rauschen zu reduzieren, indem die Auflösung verschlechtert wird. Umso kleiner der *Binning*-Wert, desto mehr Pixel pro Bildausschnitt werden detektiert. Pro Aufnahme wurde außerdem festgelegt, welche Anregungswellenlängen parallel gemessen werden, bzw. welche Wellenlängen mit dem Splitter (Optosplit II) getrennt werden mussten und über welche Filter entsprechend die Detektion stattfand (Tabelle 8). Allen Messungen gemein war eine Bildrate von 1 Aufnahme / 3 sec.

Die Messungen der FRET-Biosensoren, inklusive verwendeter Messpuffer erfolgte analog etablierter Protokolle (Bischof et al., 2017).

4.9.3 Calcium-Imaging mittels FURA-2

Für Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration wurde der Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 verwendet. Dieser bildet mit freien Ca^{2+} Chelatkomplexe, welche zu einer Modulation der Extinktionswellenlängen des Moleküls führen. In ungebundener Form wird FURA-2 im Cytosol mit einer Wellenlänge von 380 nm (F380) angeregt. Sobald FURA-2 in komplexierter Form vorliegt, verändert sich die Extinktionswellenlänge zu 340 nm (F340). Dabei bleibt die Emissionswellenlänge von 510 nm unverändert. Durch UV-Anregung beider Extinktionen kann der genaue Anteil an gebundenen zu freiem Ca^{2+} , und somit die relative Konzentration, ermittelt werden (Ratio F340/F380) (Tanaka and Matsui, 2021).

MMTV-PyMT Zellen wurden wie in Abschnitt 4.2.2 auf 3,5 mm Zellkulturschalen mit 30 mm Glasplättchen ausgebracht und 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Vor Messbeginn wurde das Medium durch 1 ml frische 3,3 μM FURA-2 Lösung ersetzt und für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde der Puffer abgenommen und zwei Mal mit Messpuffer gespült, das Glasplättchen in die Messkammer eingespannt (siehe 4.9.2) und am Absaug-, sowie Perfusionssystem angeschlossen. Die Software des Perfusionssystems (NGFI perfusion) und des Mikroskops (VisiView) wurden analog der FRET-basierten Experimente gesteuert (4.9.2). Alle Messparameter sind in Tabelle 8 aufgeführt. Während der FURA-2 Messungen wurden alle unter 3.4.10.1 angegebenen Puffer perfundiert und die Konzentration an Ca^{2+} analysiert. Verwendet wurden für FURA-2 Messungen das Mikroskop II (3.2).

4.9.4 Mitochondrielle Membranpotenzial-Messungen mittels TMRM

Für Messungen des mitochondrialen Membranpotenzials wurde Tetramethylrhodamin-Methyl-ester (TMRM) verwendet. Dabei handelt es sich um einen lipophilen Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff, welcher sowohl in die Zellen, als auch Organellen perfundieren kann. Aufgrund seiner positiven Partialladung akkumuliert dieser in den negativ geladenen Mitochondrien. Das negative Potenzial der Mitochondrien korreliert umgekehrt proportional mit dem Membranpotenzial (Creed and McKenzie, 2019). Bei einer Extinktion von 515/555 nm und einer Emissionswellenlänge von 575 nm geben die Intensitäten in den Mitochondrien Rückschluss auf das Membranpotenzial. Durch die Verwendung einer geringen Konzentration von 200 nM, wird ein

Quenching-Effekt (Abbau der Fluoreszenz) verhindert. Durch die Zugabe von Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP, 0,5 μ M), einem H⁺-Gradienten-Entkoppler der OxPhos, wird das Membranpotenzial der Mitochondrien zerstört. Im Basalzustand akkumuliert wenig TMRM in den Zellkern, was sich allerdings durch die FCCP induzierte Entkopplung ändert. Es kommt zu einer Akkumulation von TMRM, vor Allem in den Nukleus. Aufgrund dessen dienen die Intensitäts-Ratios von Mitochondrium zu entsprechenden Nukleus einer Zelle als Maß für das mitochondrielle Membranpotenzial (Vasilev et al., 2021, Leonard et al., 2015).

Zur Messung wurden MMTV-PyMT Zellen wie in Abschnitt 4.2.2 in 6 Well Multiplatten mit 30 mm Glasplättchen ausgebracht und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Messbeginn wurde das Medium durch 950 μ l frischen 200 nM TMRM-Puffer ersetzt (3.4.10.4) und für 30 min inkubiert. Der Messaufbau war analog zu Abschnitt 4.9.2 aufgebaut und die Einstellungen in der VisiView-Software erfolgten wie in Tabelle 8 beschrieben. Nach 5 Min Messung wurden 50 μ l einer 10 μ M FCCP-Lösung (3.4.10.4) in TMRM-Puffer zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 0,5 μ M entstand. Verwendet wurden für TMRM-Messungen das Mikroskop II (3.2).

4.9.5 Glukose-Aufnahme mittels 2-NBDG

Zur Bestimmung der Glukose-Aufnahme in die MMTV-PyMT Tumorzellen wurde das fluoreszenzgekoppelte Glukoseanalogon 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglukose) verwendet (O'Neil et al., 2005). Dabei handelt es sich um ein Glukosamin, welches durch das fusionierte grün fluoreszierende Protein (GFP) bei 467 nm angeregt (Extinktion) und 538 nm (Emission) detektiert werden kann. Über Glukosetransporter kann 2-NBDG in die Zelle aufgenommen werden und konkurriert dabei direkt mit der D-Glukose. Die Emissionsintensität gibt somit Rückschluss auf die Glukose-Aufnahme über die Zeit.

Zur Messung wurden MMTV-PyMT Zellen wie in Abschnitt 4.2.2 in 6 Well Multiplatten auf 30 mm Glasplättchen ausgebracht und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach erfolgter Adhärenz, wurden die Zellen mit 100 μ M 2-NBDG-Lösung über Nacht inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen 3x mit je 1 ml glukosefreien Puffer (3.4.10.5) gespült. Im Anschluss wurden von jeder Probe 3–5 Aufnahmen bei einer Wellenlänge von 520 nm (Extinktion bei 470 nm), sowie im Durchlicht erzeugt. Alle weiteren Einstellungen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Eine Aufnahme bildete dabei die Intensität zu diesem basalen Zeitpunkt ab. Die Intensitäten des GFP wurden mit Hilfe von GraphPad Prism (3.2) statistisch analysiert. Verwendet wurden für die Glukose Aufnahme das Mikroskop III (3.2).

4.10 MTT

Der Nachweis der Zellvitalität gegenüber TRAM-34 und des IK *rescues* wurde mittels MTT-Test überprüft. Der Assay beruht auf der Reduktion des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazol Bromids (MTT) zu Formazan (Stockert et al., 2012). Mögliche cytotoxische Wirkungen der Behandlungen könnten eine vermehrte Reduktion zu Formazan fördern und somit die Farbreaktion intensivieren. Da Formazan wasserunlöslich ist, müssen durch Extraktion mit DMSO die Kristalle vor der Detektion in Lösung gebracht werden. Durch photometrische Bestimmung der Intensität bei 570 nm kann die Viabilität innerhalb eines Genotyps verglichen werden.

80.000 Zellen wurden in eine 96 Well Multiplatte ausgebracht und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es folgte eine Behandlung mit 0, 1, 2 oder 5 µM TRAM-34 (3.4.3) in 100 µl Zellkulturmedium für weitere 48 h. Des Weiteren wurden unbehandelte IK KOs 24 h vor der Messung mit dem *KCNN4-untagged* Plasmid transfiziert (siehe Abschnitt 4.9.1), sodass sie den IK Kanal im Anschluss transient exprimierten. Ein zellfreies Well diente als Negativkontrolle. Im Anschluss wurden 10 µl einer 12 mM MTT-Lösung pro Well zugegeben und die Multiplatte erneut für 4 h bei Standardbedingungen inkubiert. Dabei kam es zur Reduktion des MTT zu Formazan. 85 µl jedes Wells wurden abgenommen und mit 50 µl 100%igem DMSO verdünnt. 100 µl der DMSO-Suspension wurden auf eine neue 96 Well Multiplatte transferiert und mit Hilfe des F200 Pro Plattenlesers (3.2) bei einer Absorption von 570 nm ausgelesen. Für die Quantifizierung wurde der Mittelwert der vermessenen Triplett-Intensitäten gebildet und auf den unbehandelten Wert (0 µM) normiert. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (3.2).

4.11 Extrazelluläre Flux-Messungen (Seahorse)

Durch die *Seahorse*-Methode (1.1.2) können je nach Versuchsaufbau verschiedene Parameter in der Extrazellulärflüssigkeit über die Zeit vermessen werden. Verwendet wurde der so genannte mitochondrielle Stress-Test, welcher Rückschlüsse über den Metabolismus von MMTV-PyMT Zellen liefern sollte. Dabei wurden verschiedene Modulatoren der Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung eingesetzt, um etwaige Änderungen der mitochondriellen Funktion der Zellen zu provozieren. Diese Änderungen konnten sowohl im Sauerstoffverbrauch (OCR) oder in extrazellulären pH-Schwankungen (ECAR) detektiert werden (siehe Abbildung 1.1). OCR und ECAR sind Schlüsselindikatoren der mitochondriellen Atmung und Glykolyse (Burgstaller et al., 2021). Verwendet wurde der XFe24 Analyzer von Agilent (AgilentTechnologies, 2017). Die im Kit enthaltenen Behältnisse bestanden aus einer 24 Well Multiplatte, einer *Cartridge* (Deckel mit 4 Durchfluss-Kammern), sowie einem Kalibrieraufsatz. Zur Analyse wurden 50.000 MMTV-PyMT Zellen pro 24 Well Multiplatte in 1 ml Zellkulturmedium (± 2 µM TRAM-34) ausgebracht. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Kalibriereinsatz wurde mit 1 ml Equilibrierungslösung gefüllt und die *Cartridge* aufgesetzt. Die in der *Cartridge* verbauten Sensoren konnten so in die Lösung tauchen und wurden ebenfalls für 24 h bei 37°C und 0% CO₂ inkubiert. Am Folgetag konnte die Kalibrierlösung verworfen werden und die vier Durchfluss-Kammern mit den jeweiligen Inhibitor-Lösungen befüllt werden. Der Reihenfolge nach wurden jeweils folgende Volumina in die Kammern 1–4 pipettiert: 55 µl der 2 µM Oligomycin-A Lösung (3.4.11), 62 µl der 0,2 µM FCCP-Lösung, 69 µl der 0,4 µM FCCP-Lösung und 76 µl der 2,5 µM Antimycin-A Lösung. Die sich ändernden Füllstände der Durchfluss-Kammern kamen durch die insgesamt Volumenänderungen der vorherigen Kammern zustande. Je nach Versuchsaufbau wurden dem *Seahorse*-Zellpuffer 2 µM TRAM-34 zugesetzt, um eine Änderung der Inhibitor-Konzentration zu verhindern (siehe 3.4.11). Des Weiteren wurde, durch mehrere Waschschrte, das Zellkulturmedium nach 24 h durch *Seahorse*-Messpuffer (± 2 µM TRAM-34) in der 24 Well Multiplatte ersetzt. Mit dem letzten Waschschrte wurde ein Restvolumen von 500 µl über den MMTV-PyMT Zellen zurückgelassen und diese für weitere 30 min bei 37°C und 0% CO₂ inkubiert. Im letzten Schrrte wurde die *Cartridge* auf die 24 Well Multiplatte gesetzt, sodass die Sensoren in die *Seahorse*-Messflüssigkeit eintauchen konnten. Der *XFe24 Analyzer* konnte mit Hilfe einer Luftdruckdüse die Durchfluss-Kammern zu gezielten Zeitpunkten in die Messflüssigkeit entleeren und somit Veränderungen der OCR und ECAR in Echtzeit detektieren. Zur eindeutigen Quantifizierung

der Daten, wurden die Zellen nach der Messung lysiert und mittels BCA-Assay auf ihren Proteingehalt bestimmt (siehe Abschnitt 4.7.1). Im Anschluss an die Normierung auf den Proteingehalt jedes Wells, konnten die Daten durch die Software GraphPad Prism statistisch analysiert werden.

4.12 Statistik

Im Verlauf dieser Arbeit wurden insgesamt 5 Primärzelllinien aus 5 verschiedenen Tumoren (Mäusen) pro Genotyp verwendet. Jede n-Zahl beschreibt dabei ein biologisches Replikat. Werden n-Zahlen > 5 (Anzahl an verwendeten Tumorzelllinien) angegeben, wurden Zelllinien erneut vermessen. Jedes Experiment wurde dabei an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichen Zellen durchgeführt. Die erhobenen Ergebnisse werden in den Diagrammen als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Ausnahmen sind aufgrund einer besseren Übersicht nur in Abbildung 5.16 D und Abbildung 9.11 F aufgeführt. Ein positiver Test auf Normalverteilung wurde initial erhoben. Ein negativer Test auf Varianz-Homogenität fiel (aufgrund von Ausreißern) in 3 Fällen positiv aus (Abbildung 5.11 C und I, Abbildung 5.12 E, Abbildung 5.18 B). Bei positiver Varianz wurde der ungepaarte t-Test oder One-way ANOVA mit Welch's Korrektur für ungleiche Standardabweichungen verwendet.

Für die statistische Auswertung zweier Wertegruppen wurde ein Student-t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt (direkter Vergleich WT versus IK KO). Wurden mehr als zwei Wertegruppen untereinander verglichen, wurde zusätzliche eine einfaktorische Varianzanalyse (One-Way ANOVA) mit nachfolgendem Tukey-Test angewendet (direkter Vergleich der vier Gruppen WT \pm TRAM-34 und IK KO \pm TRAM-34). Für den Vergleich von mehr als zwei Wertegruppen untereinander erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (Two-Way ANOVA). *In vivo* Analysen des Überlebens (Tumorfrees Überleben, Gesamtüberleben) wurden in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und über Log-rank (Mantel-Cox) Test ergänzend zu einem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test berechnet (direkter Vergleich des TFS/OS von WT und IK KO).

Zur Darstellung der Signifikanzen wurden für alle Ergebnisse die p-Werte als * oder # ausgegeben. Die statistischen Tests wurden in den jeweiligen Abbildungslegenden erläutert. p-Werte von $\leq 0,05$ wurden mit *, $p \leq 0,01$ mit ** und $p \leq 0,001$ mit *** gekennzeichnet, was den Vergleich zur Kontrollgruppe, meist dem WT (direkter Vergleich WT versus IK KO) widerspiegelt. # zeigt dabei den signifikanten Unterschied einer Behandlung zur unbehandelten Kontrolle innerhalb eines Genotyps (IK KO + TRAM-34 versus IK KO). Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) sind nicht gekennzeichnet oder als Zahlenwert eingefügt. Alle verwendeten statistischen Auswertungen und dazugehörigen Signifikanzen sind in den Abbildungs-Legenden und in der Abbildung selbst aufgeführt.

5 Ergebnisse

Zur Überprüfung der Hypothese, inwieweit der IK die Tumorgenese und den Metabolismus von Krebszellen beeinflusst, wurden *in vivo* Mausmodelle und isolierte Tumorzellen mit und ohne IK-Kanal Depletion untersucht. Hierbei sollten die brustkrebs-assoziierten Mausmodelle Hinweise auf das Überleben und die Tumorprogression liefern, während *in vitro* Experimente mit primären murinen Zellen molekularbiologische Einblicke in Signalwege und den Energiehaushalt der Zellen ermöglichten.

5.1 Einfluss des IK-Kanals auf die Brustkrebsentwicklung und das Überleben

Um die Funktion des IK-Kanals während der Entwicklung des Mammakarzinoms näher beleuchten zu können, wurden genetisch veränderte Mauslinien generiert (siehe 3.1). FVB/N Mäuse entwickelten durch die Expression des PyMT-Onkogens unter dem MMTV-Promotor, spontan Tumore der Brustdrüse(n). Durch die mehrstufige Verpaarung (siehe 4.1.1) wurden so IK-progrediente, brusttumortragende Wildtyp- (WT) und homozygote IK-defiziente Knock-out- (KO) Mäuse generiert. Durch dieses Mausmodell, sowie anschließender Isolation primärer muriner Tumorzellen, konnten weitere *in vitro* Daten erhoben werden. Zunächst sollte der Einfluss des IK-Kanals auf die Tumorprogression untersucht werden, um bestehende Erkenntnisse aus vorangegangenen Arbeiten zu verifizieren. Untersucht wurden dementsprechend das tumorfreie- und Gesamtüberleben der Mäuse, sowie die Tumorgenese *in vivo*. Als weitere Parameter wurde das Proliferationsverhalten und Metastasierungspotenzial der Tumorzellen nach Depletion des IK-Kanals betrachtet.

5.1.1 Auswirkungen des IK-Status auf das Überleben und die Metastasierung *in vivo*

Der Einsatz von MMTV-PyMT-transgenen Mäusen stellte ein verbreitetes und bereits etabliertes Modell zur Untersuchung des IKs im Mammakarzinom dar (Mohr et al., 2019a, Steudel et al., 2017). Vorteil des FVB/N Hintergrundes ist ein schnelleres Tumorstadium im Vergleich zu anderen Mausmodellen (53 d statt 92 d in C57BL/6) (Davie et al., 2007). Der Zeitraum zwischen Geburt und Auftreten der ersten positiven Palpation wurde als tumorfreies Überleben (*tumor free survival*, TFS) definiert und auf die Gesamtzahl der im Versuch befindlichen Mäuse bezogen. Abbildung 5.1 A zeigt entsprechend, dass das TFS der MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und IK KO-Tiere (rote Linie) keinen Unterschied aufweisen (Gehan-Breslow-Wilcoxon Test WT vs. IK KO: $p = 0,4621$). Das durchschnittliche Alter bei der ersten Palpation, betrug für den WT 82 ± 4 Tage und im IK KO 87 ± 8 Tage (Abbildung 5.1 A).

Um ein mögliches verzögertes Tumorstadium zu studieren, wurde ergänzend auch das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) der Tiere bestimmt. Nach Erreichen eines Tumordurchmessers von 15 mm (Abbruchkriterium) wurde das Tier getötet und der zeitliche Abstand zur Geburt ermittelt (Abbildung 5.1 B). Analog des TFS zeigte auch das OS keine signifikanten Unterschiede (Gehan-Breslow-Wilcoxon Test WT vs. IK KO: $p = 0,4798$). Die durchschnittliche Überlebensdauer der WT-Mäuse betrug 94 ± 3 Tage und die der IK KOs 97 ± 7 Tage. Diese Ergebnisse bestätigten vorangegangene *in vivo* Versuche im FVB/N-Mausmodell (Steudel, 2016, Mohr, 2020). Dass die IK-Depletion dennoch zu einem Überlebensvorteil und einer

Verlangsamung des Tumorwachstums führt, konnte in einem orthotropen Transplantationsmodell nachgewiesen werden. Hier führte die Inokulation von weiblichen FVB/N WT Mäusen mit MMTV-PyMT WT- oder IK KO-Zellen zu einem IK-abhängigen Wachstum und folglich zu einer genotypspezifischen Reduktion des TFS und OS unter IK-Depletion (Mohr et al., 2019a). Aufgrund der Diskrepanz zum spontanen Modell, wurden der Einfluss des TME und der genetische Hintergrund der Mäuse als maßgebliche Ursachen für die erhaltenen Unterschiede identifiziert (Mohr et al., 2019b).

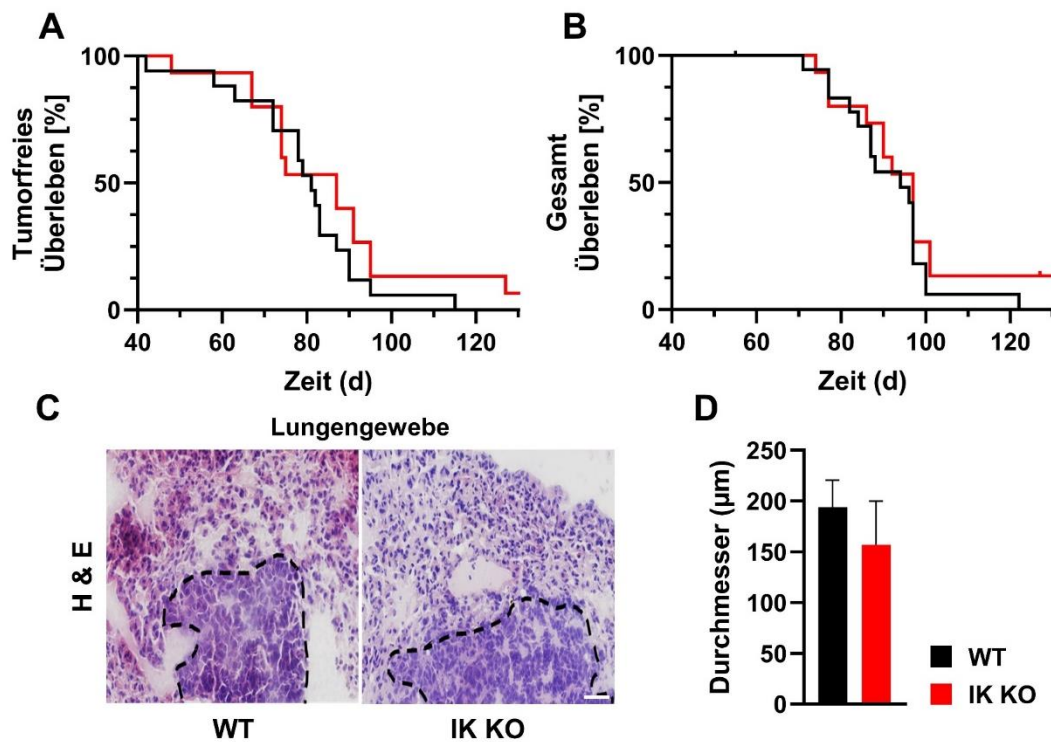


Abbildung 5.1: In vivo Charakterisierung des Brustkrebsmodells in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Mäusen
 Alle FVB/N Tiere wurden wie in Abschnitt 4.1.1 gezüchtet und genotypisiert. Anschließend wurde das Tumorstadium über die Zeit kontrolliert. Die Zeitspanne zwischen Geburt des Tieres und dem ersten positiven Tastbefund eines Brusttumors gilt als tumorfreies Überleben, die Zeitspanne bis zum Tod oder Erreichen des Abbruchkriteriums als Gesamtüberlebenszeit. **(A)** Zeigt die Kaplan-Meier Kurve des tumorfreien Überlebens von MMTV-PyMT WT (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Tieren (rote Linie) über die Zeit. MMTV-PyMT WT Tiere entwickeln im Mittel nach 81 ± 4 Tagen den ersten Tumor, MMTV-PyMT IK KO-Tiere nach 87 ± 8 Tagen. $N=17$ für WT; $N=15$ für IK KO. **(B)** Zeigt die Kaplan-Meier Kurve des Gesamt-Überlebens von MMTV-PyMT WT (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Tieren (rote Linie). MMTV-PyMT WT Tiere sterben im Mittel nach 94 ± 3 Tagen, MMTV-PyMT IK KO-Tiere nach 97 ± 7 Tagen. $N=17$ WT; $N=15$ IK KO. **(A)** und **(B)** zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen, nach Log-rank (Mantel-Cox) Test. **(C)** Repräsentative Hämatoxylin- und Eosin (HE) Färbungen von 10-µm Lungenschnitten aus MMTV-PyMT WT- (links) und MMTV-PyMT IK KO-Mäusen (rechts). Schwarz gestrichelte Linien markieren die Sekundärtumoren. Maßstabsbalken 100 µm. **(D)** Quantifizierung des Tumordurchmessers von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Lungenschnitten (roter Balken). Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von $N=3$ WT; $N=3$ IK KO dar. Statistische Analyse mittels (ungepaartem) t-Test für unabhängige Stichproben.

Die MMTV-PyMT-spezifische Veränderung des Genoms äußerte sich neben der Initiation von soliden Brusttumoren auch in einem verstärkten Risiko für Lungenmetastasen. In FVB/N sind 80–90% häufiger Lungenmetastasen als in C57BL/6 Mäusen zu finden (Guy et al., 1992). Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die hohe Mortalitätsrate des Mammakarzinoms auf das starke Metastasierungsrisiko zurückzuführen ist (Dillekas et al., 2019). Aufgrund dessen wurde

der mögliche Einfluss des IK-Kanals auf die Entstehung von Lungenmetastasen untersucht. Abbildung 5.1 C zeigt repräsentative HE Färbungen von MMTV-PyMT WT- und IK KO-Lungenflügeln. Die Anzahl der Lungenmetastasen pro Maus war im Vergleich der beiden Genotypen unverändert (Daten nicht gezeigt), allerdings zeigten sich Tendenzen im Durchmesser der Lungenmetastasen (Abbildung 5.1 D). Die Größe der Sekundärtumoren im IK KO fiel tendenziell kleiner aus (Durchmesser in μm : WT 193 ± 26 ; IK KO 144 ± 38). Um den Einfluss des TME, insbesondere die Rolle von IK auf das Immunsystem und Stroma auszuschließen (Chen et al., 2022, Chen et al., 2021), fokussierte sich die vorliegende Arbeit im Folgenden auf die Analyse von murinen Tumorzellen *in vitro* (siehe Abschnitt 4.2.1).

5.1.2 IK-Kanäle modulieren das Wachstum von isolierten MMTV-PyMT Tumorzellen

Da globale IK KO-Tiere gegenüber ihren WT-Wurfgeschwistern zunächst keinen auffälligen Phänotyp oder Veränderungen in der Tumorentstehung zeigten, sollte ein *in vitro* Modell aus isolierten primären Tumorzellen detailliertere Einblicke in die Energiehomöostase ermöglichen. Zunächst wurde daher das Wachstumsverhalten der MMTV-PyMT Tumorzellen *in vitro* auf sogenannten Grid-Rasterplatten überprüft (siehe 4.4.1). Über 72 Stunden wurden täglich dieselben Areale auf die Zellproliferation analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde des Weiteren eine Normalisierung auf den Anfangswert von 0 Stunden ($t=0$) durchgeführt (Abbildung 5.2 B). Repräsentative Areale des Grid-Rasters, sowie eine progrediente Vermehrung der Tumorzellen in beiden Genotypen über 72 h sind in Abbildung 5.2 A zu sehen. Das relative Zellwachstum war im IK KO nach 24 h tendenziell und dann nach 48 h (Zellzahl/ mm^2 : WT $2,35 \pm 0,09$; IK KO $1,92 \pm 0,07$) und 72 h (Zellzahl/ mm^2 : WT $3,49 \pm 0,24$; IK KO $2,46 \pm 0,10$; Abbildung 5.2 B) signifikant reduziert. Diese Befunde decken sich mit früheren Beobachtungen (Steudel et al., 2017), sollten aber durch eine weitere Methode verifiziert werden. Immunfluoreszenz (IF)-Färbungen des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigen eine Anreicherung (Intensitätssteigerung) während der G1-, S-, G2- und Mitose-Phase des Zellzyklus sich teilender Zellen (Scholzen and Gerdes, 2000). Abbildung 5.2 C zeigt repräsentative Fluoreszenzbilder der Ki-67 Färbung (gelb) nach Überlagerung mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau). Die Quantifizierung bestätigte die in Abbildung 5.2 B gezeigte verminderte Proliferation bei IK-Depletion (Abbildung 5.2 D). Die Ki-67 positiven Tumorzellen waren im IK KO im Vergleich zum WT signifikant reduziert (Relativer Ki-67 Index: WT $1,72 \pm 0,07$; IK KO $1,50 \pm 0,06$; Abbildung 5.2 D).

Alle vorangegangenen Versuche wurden mit dem pharmakologischen IK-Kanal Inhibitor TRAM-34 verifiziert. Um auszuschließen, dass die Behandlung mit TRAM-34 die Viabilität und somit letztlich das Proliferationsverhalten der MMTV-PyMT Tumorzellen beeinflusst, wurde zunächst ein MTT-Assay durchgeführt (siehe 4.10, Abbildung 9.1 A). TRAM-34 (1, 2, oder 5 μM) hatte, unabhängig vom IK-Status der Zellen, keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität (Abbildung 9.1 A). Dementsprechend konnte die Behandlung der MMTV-PyMT WT Zellen mit TRAM-34 über 48 h in Grid-basierten Experimenten analog 4.4 durchgeführt werden. In Übereinstimmung mit den unter Abbildung 5.2 A, B beschriebenen Ergebnissen resultierte die TRAM-34 Behandlung in einer signifikant verlangsamte Wachstumsrate der Zellen über die Zeit (Abbildung 5.2 E, F). Anders als beim IK KO war bereits nach 24 h eine deutliche Reduktion der TRAM-34 exponierten Zellen erkennbar (Zellzahl/ mm^2 : WT $1,67 \pm 0,05$; WT + TRAM-34 $0,82 \pm 0,10$; Abbildung 5.2 F). Die über den gesamten Beobachtungszeitraum stagnierende Proliferation war offensichtlich TRAM-34- und folglich IK-abhängig. Die Proliferation unter TRAM-34 Behandlung wurde ebenfalls mittels Ki-67 IF-Färbungen analysiert (Abb. 5.2 G, H). Repräsentative Bilder nach 72 h sind in Abbildung 5.2 G aufgeführt. Der Ki-67 Index

bestätigte das signifikant langsamere Wachstum der TRAM-34-behandelten WT Zellen (Relativer Ki-67 Index: WT $1,72 \pm 0,07$; WT + TRAM-34 $1,15 \pm 0,07$; Abbildung 5.2 H).

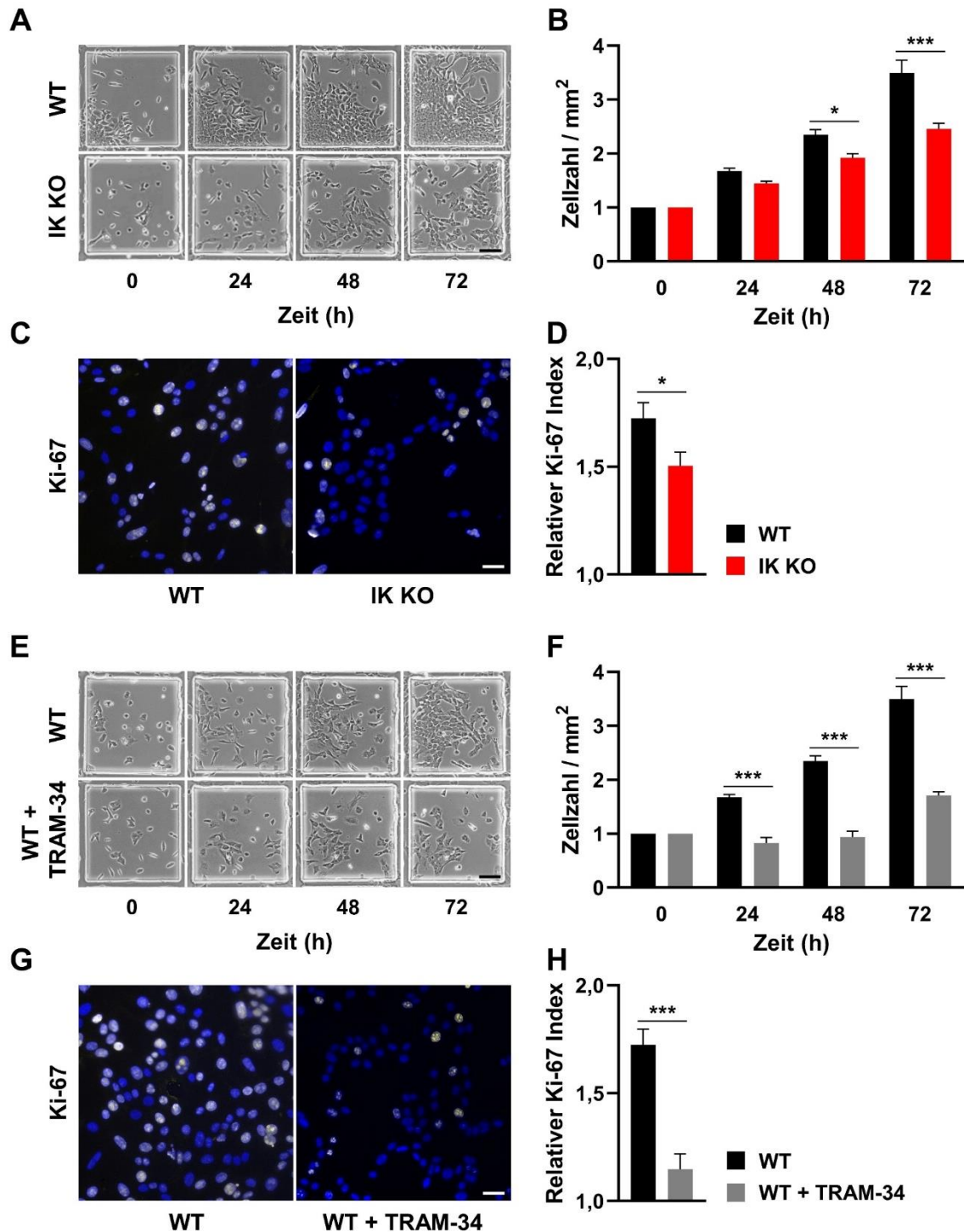


Abbildung 5.2: Einfluss des IK-Kanals auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Tumorzellen

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 4.4 in Grid-Rasterplatten ausgebracht und das Wachstum über 72 h kontrolliert, oder die Ki-67 Expression nach 0 und 72 h detektiert. Die relative Ki-67 Expression nach 72 h ist auf 0 h normiert. (A) Repräsentative Ausschnitte eines Quadranten von MMTV-PyMT WT-Zellen (obere Reihe) und IK KO-Zellen (untere Reihe) über vier Zeitpunkte (0–72 h). Maßstabsbalken 100 μ m. (B) Quantifizierung des Wachstums pro Quadratmillimeter von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO (rote Balken), normiert auf den Ausgangswert t=0 h. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=21 WT; N=18 IK KO dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$. (C) Repräsentative Ki-67

Immunfluoreszenzfärbungen von MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT IK KO (rechts). Gezeigt sind überlagerte Fluoreszenzaufnahmen der Zellkerne (DAPI, blau) und Ki-67 (gelb), nach 72 h. Maßstabsbalken 30 μm . (D) Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO (rote Balken). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=10 WT; N=9 IK KO dar. Statistische Analyse mittels (ungepaartem) t-Test für unabhängige Stichproben, * $p \leq 0,05$. (E) Repräsentative Ausschnitte eines Quadranten von MMTV-PyMT WT Zellen (obere Reihe) und WT-Zellen behandelt mit 10 μM TRAM-34 (untere Reihe) über vier Zeitpunkte (0–72 h). Maßstabsbalken 100 μm . (F) Quantifizierung des Wachstums pro Quadratmillimeter von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT behandelt mit 10 μM TRAM-34 (graue Balken), normiert auf den basalen Stundenwert ($t=0$ h). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=21 WT; N=9 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse mittels einfaktorieller Varianzanalyse ANOVA, *** $p \leq 0,001$. (G) Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen von MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT WT behandelt mit 10 μM TRAM-34 (rechts). Gezeigt sind überlagerte Aufnahmen der Zellkerne (DAPI, blau) und anti-Ki-67 (gelb) nach 72 h. Maßstabsbalken 30 μm . (H) Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT behandelt mit 10 μM TRAM-34 (graue Balken). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=10 WT; N=6 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (mm^2 : Quadratmillimeter; SEM: Mittelwert der Standardabweichung/ Standard error of mean). Modifizierte Grafiken C, D, G und H basierend auf (Gross et al., 2022).

Zusammengefasst resultierte die genetische Depletion des IK-Kanals oder dessen pharmakologische Inhibition in einer reproduzierbaren Wachstumshemmung der MMTV-PyMT Brusttumorzellen. Anders als die primären *in vivo* Daten vermuten ließen, zeigten die isolierten MMTV-PyMT IK KO-Zellen das zuvor etablierte (Stedel et al., 2017) verlangsamte Wachstums *in vitro* und konnten somit für weitere Untersuchungen der Energiehomöostase verwendet werden.

5.1.3 Rolle des IKs für die Migration und Invasion von MMTV-PyMT Tumorzellen *in vitro*

Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit der MMTV-PyMT Zellen wurde initial der *Scratch*-Test durchgeführt. Wie in 4.5.1 beschrieben wurden hierfür die Tumorzellen ausgebracht, und nach definierter Läsion (*Scratch*) des Zellrasens über 24 h die Migration der Zellen in das so eröffnete Areal beobachtet (Abbildung 5.3 A; Abbildung 4.5). Repräsentative Bilder des *Scratch*-Assays direkt nach Beginn ($t=0$ h) und am Ende des Versuches ($t=24$ h) zeigten Unterschiede im Verschluss der Wunde (Abbildung 5.3 A). Die Quantifizierung zum Zeitpunkt $t=24$ h zeigte eine Verringerung der freien Fläche um $38,45 \pm 1,66\%$ in den WT im Vergleich zu den IK KO Zellen ($30,75 \pm 2,53\%$; Abbildung 5.3 B). Analog wurde das Migrationspotenzial der MMTV-PyMT WT-Zellen in der Anwesenheit von TRAM-34 untersucht (Abbildung 5.3 C). Übereinstimmend mit dem genetisch KO des IKs, resultierte die pharmakologische Hemmung des Kanals durch TRAM-34 in einem geringeren Migrationspotential der MMTV-PyMT WT Zellen (Fläche %: WT $38,45 \pm 1,66$; WT + TRAM-34 $14,35 \pm 1,35$; Abbildung 5.3 C-D).

Die Validierung der Migration im 2D Modell erfolgte durch den Boyden-Kammer Assay. Dabei sollte das Migrationsverhalten durch eine porenhaltige Membran beobachtet werden (Abbildung 4.6 A). Migrierte Zellen wurden nach 24 h auf der Unterseite der Membran mittels Kristallviolett gefärbt und quantifiziert (4.5.2). Repräsentative Aufnahmen demonstrieren klar die höhere MMTV-PyMT Zelldichte auf der Membranunterseite (Abbildung 5.3 E). Analysen des Puffers der unteren Kammer bestätigten (mittels Neubauer-Zählkammer), dass sich keine Zellen von der Membranunterseite gelöst hatten (Daten nicht gezeigt). Die Quantifizierung der Kristallviolett-Färbung ergab ebenfalls eine signifikant erniedrigte Migrationsrate unter IK-Depletion, im Vergleich zum WT (Relative Migration %: WT $1,00 \pm 0,15$; IK KO $0,48 \pm 0,12$; Abbildung 5.3 F).

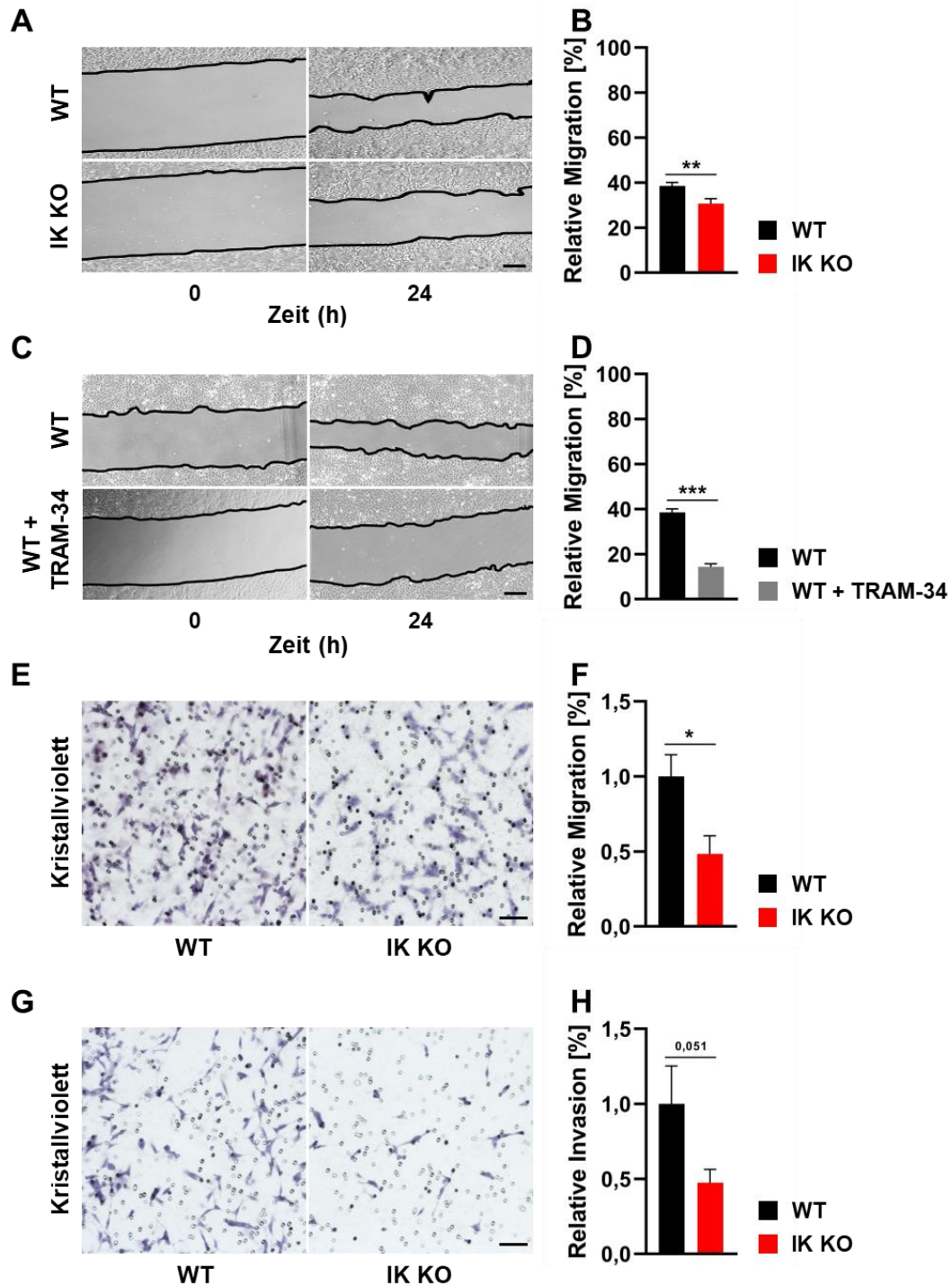


Abbildung 5.3: Einfluss des IK-Kanals auf das Migrationsverhalten von MMTV-PyMT Tumorzellen

Das Migrations- sowie Invasionsverhalten von MMTV-PyMT Zellen wurde mittels *Scratch*-Test oder mit Hilfe einer Boyden-Kammer ± Matrigel untersucht. (A) Repräsentative Aufnahmen von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe) zum Zeitpunkt 0 und 24 h. Die Läsionsfläche („Scratch“) ist durch schwarze Linien hervorgehoben. Maßstabsbalken 100 µm. (B) Relative migrierte Fläche nach 24 h von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken). Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=9 WT; N=14 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** p<0,01. (C) Repräsentative Aufnahmen eines *Scratch*-Tests von MMTV-PyMT WT (obere Reihe) und MMTV-PyMT WT behandelt mit 10 µM TRAM-34 (untere Reihe) zum Zeitpunkt 0 und 24 h. Die *Scratch*fläche wurde durch schwarze Linien zu den angezeigten Zeitpunkten hervorgehoben. Maßstabsbalken 100 µm. (D) Relative migrierte Fläche nach 24 h von MMTV-PyMT WT Zellen (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT-Zellen + TRAM-34 (graue Balken). Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=9 WT; N=4 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch

(ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (E) Repräsentative Kristallviolett-Färbungen der Membranunterseite einer Boyden-Kammer von MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT IK KO (rechts). Die schwarzen Punkte repräsentieren die Poren der Membran. Maßstabsbalken 20 μm . (F) Relative Migration von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken) nach 24 h. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=4 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, * $p \leq 0,05$. (G) Repräsentative Kristallviolett-Färbungen der Membranunterseite einer Boyden-Kammer von MMTV-PyMT WT- (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts). Die schwarzen Punkte repräsentieren die Poren der Membran. Maßstabsbalken 20 μm . (H) Relative Invasion von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken) nach 24 h. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse mittels (ungepaartem) t-Test für unabhängige Stichproben.

Anschließend wurde untersucht, ob der IK-Kanal Einfluss auf die invasive Motilität der Brusttumorzellen hat. Die Modulation des Boyden-Kammer Assays durch eine zusätzliche Schicht aus Matrigel auf der Oberfläche der Membran wurde zur Analyse der Invasion verwendet (siehe Abbildung 4.6 B, 4.5.3). Durch das enthaltende Laminin und Kollagen simulierte das Matrigel die extrazelluläre Matrix. Repräsentative Aufnahmen zeigen eine verminderte Kristallviolett-Färbung im Vergleich zur Migration (Abbildung 5.3 E) ohne Matrigel (Abbildung 5.3 G). Es konnte gezeigt werden, dass IK KO-Zellen tendenziell schlechter durch das Matrigel migrierten (Relative Invasion %: WT $1,00 \pm 0,25$; IK KO $0,53 \pm 0,15$; Abbildung 5.3 G,H). Die eindeutige Tendenz zu einer verringerten Invasion untermauerte das zuvor beobachtete Migratiospotential der IK KO-Zellen.

Durch mRNA Analysen mittels qPCR wurden zentrale Marker der Migration und Adhäsion untersucht. Sowohl Cadherin E und N, als auch die Integrine $\beta 1$ und $\beta 3$ zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen, welche die verminderte, IK-abhängige Migration erklären könnten (Abbildung 9.2 A). Lediglich eine schwache Tendenz zu einer verminderten Integrin $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Expression war im MMTV-PyMT IK KO zu beobachten (Abbildung 9.2 A). Eine Aufklärung der molekularen Ursachen bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

5.2 IK-abhängige Beeinflussung des Brustkrebs-Metabolismus

Die Hypothese, dass die genetische oder pharmakologische Inhibition des IK-Kanals den Energieverbrauch von MMTV-PyMT Tumorzellen beeinflusst basiert auf den von Hanahan und Weinberg betitelten *Hallmarks of cancer*, die postulieren, dass die Tumorgenese eine Reprogrammierung des Energie-Metabolismus beinhaltet (Hanahan and Weinberg, 2011). Auf dessen Grundlage wurde untersucht, ob die Energiebereitstellung bzw. der Energiehaushalt der MMTV-PyMT IK KO-Zellen reduziert ist. Entsprechend wurden initial Analysen des extrazellulären Flux (*Seahorse*) durchgeführt. Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, konnten damit Erkenntnisse über die Oxidative Phosphorylierung und die glykolytische Aktivität der Tumorzellen gewonnen werden.

5.2.1 Modulation der glykolytischen Aktivität durch den IK-Kanal

Bei der Umwandlung von Glukose zu Pyruvat, sowie der späteren Verstoffwechslung von Pyruvat zu Laktat, welches aus der Zelle geschleust wird, werden zusätzlich Protonen sekretiert. Dadurch sinkt der pH im extrazellulären Milieu. Eine vermehrte Glykolyse stimuliert diesen Prozess. Die Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate korreliert folglich mit der

glykolytischen Aktivität der Zellen. Um die ECAR zu analysieren wurden MMTV-PyMT WT- und IK KO-Brustkrebszellen ($\pm 2 \mu\text{M}$ TRAM-34) nach dem Protokoll des Herstellers vermessen (siehe Abschnitt 4.11, Abbildung 5.4 A). Zunächst wurden die basalen, physiologischen ECAR-Level (Minute 0–5 in Abbildung 5.4 A) quantifiziert (Abbildung 5.4 B). Diese zeigten eine deutlich erniedrigte ECAR in IK KO- im Vergleich zu WT-Zellen ($\text{ECAR}_{(\text{mpH}/\text{min}/\mu\text{g Protein})}$: WT $1,17 \pm 0,22$; IK KO $0,35 \pm 0,06$; Abb. 5.4 B). Analog konnte die Behandlung mit TRAM-34 in WT-Zellen einen deutlichen, wenngleich nicht signifikanten, Abfall der basalen ECAR erzielen ($\text{ECAR}_{(\text{mpH}/\text{min}/\mu\text{g Protein})}$: WT + TRAM-34 $0,85 \pm 0,17$), während eine stärkere Reduktion durch TRAM-34 in IK KO-Zellen, im Vergleich zu unbehandelten IK KO-Zellen nicht beobachtet wurde ($\text{ECAR}_{(\text{mpH}/\text{min}/\mu\text{g Protein})}$: IK KO + TRAM-34 $0,36 \pm 0,05$; Abbildung 5.4 B).

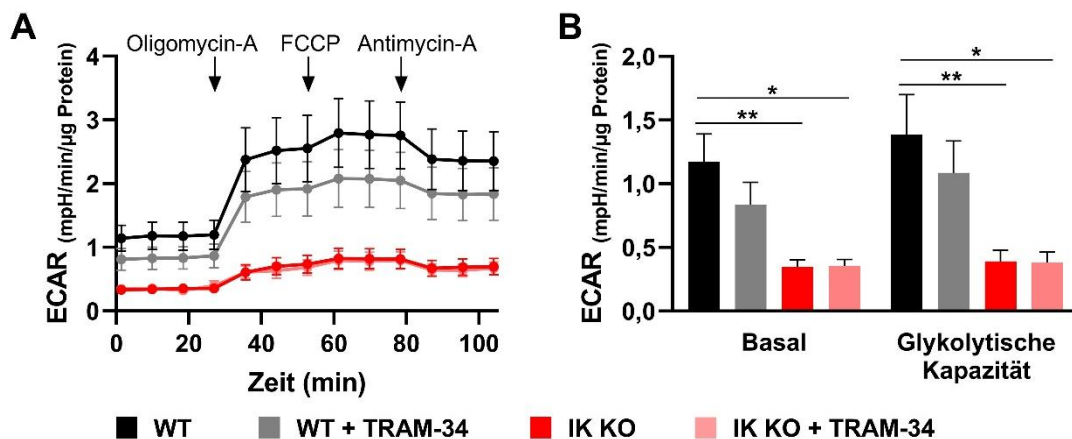


Abbildung 5.4: Einfluss des IK-Kanals auf die extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR)

Während der Messung des extrazellulären Flux (*Seahorse*, 4.11) kann die Ansäuerungsrate des extrazellulären Mediums (ECAR) bestimmt werden und somit Rückschlüsse auf die glykolytische Aktivität gewonnen werden. (A) ECAR von MMTV-PyMT WT- (schwarze und graue Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote und lachsarbene Linie) über die Zeit, welche entweder mit DMSO (schwarz und rot) oder mit $2 \mu\text{M}$ TRAM-34 (grau und lachsarbene) behandelt wurden. ECAR-Änderungen durch Verabreichung von Oligomycin-A, FCCP oder Antimycin-A sind im Panel angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von $N=3$ WT \pm TRAM-34; IK KO \pm TRAM-34 dar. (B) Basale ECAR (Zeitpunkte 0–30 min (A), links) und glykolytische Kapazität (rechts) von MMTV-PyMT WT (schwarze und graue Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote und lachsarbene Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot) oder $2 \mu\text{M}$ TRAM-34 (grau und lachsarbene) behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von $N=3$ WT \pm TRAM-34; IK KO \pm TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle Varianzanalyse mittels ANOVA, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. (ECAR: extracellular acidification rate; FCCP: Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone;). Modifizierte Grafiken A und B basierend auf Gross et al., 2022 (Gross et al., 2022).

Durch die Zugabe des F_0F_1 -ATP Synthase-Inhibitors Oligomycin-A und des mitochondrialen Entkopplers FCCP wurde anschließend die primäre ATP-Produktion durch die OxPhos unterbunden (siehe Abschnitt 4.11). Ein Kompensationsmechanismus zwang die Zelle damit vermehrt Glykolyse zu betreiben, was sich in einem Anstieg der ECAR bemerkbar machte (Abb. 5.4 A). Antimycin-A, ein Komplex III-Inhibitor, induzierte währenddessen einen nicht ganz so starken ECAR-Anstieg (Abbildung 5.4 A). Um der Frage nachzugehen, inwiefern die glykolytische Aktivität gesteigert ist und der Energieverlust unter blockierter OxPhos kompensiert werden kann, wurde die glykolytische Kapazität berechnet. Der Basalwert wurde dabei vom maximalen Anstieg unter FCCP-Inhibition subtrahiert (Abbildung 5.4 B). Unter OxPhos-Blockade kam es in IK KO-Zellen zu einem signifikant flacheren Ansprechen der ECAR-Level über die Zeit (Abbildung 5.4 A). IK KO-Zellen wiesen entsprechend eine signifikant niedrigere glykolytische Kapazität im Vergleich zum WT auf ($\text{ECAR}_{(\text{mpH}/\text{min}/\mu\text{g Protein})}$: WT $1,39 \pm 0,32$; IK KO $0,39 \pm$

0,09; Abbildung 5.4 B). Die Behandlung mit TRAM-34 resultierte in einer tendenziellen Erniedrigung der ECAR, erreichte allerdings nicht das Ausmaß des IK KOs \pm TRAM-34 ($ECAR_{(mpH/min/\mu g \text{ Protein})}$: WT + TRAM 1,09 \pm 0,25; IK KO + TRAM-34 0,38 \pm 0,08; Abbildung 5.4 B). Diese Befunde implizieren, dass IK für die Glykolyse der MMTV-PyMT Zellen von Bedeutung ist und eine Ausschaltung des Kanals die glykolytische Energiegewinnung nachteilig beeinflusst.

5.2.2 Funktionelle Expression des IK-Kanals erhöht intrazelluläre Laktat- und Pyruvat-Level

Um die Rolle des IK-Kanals während der Glykolyse weiter zu untersuchen, wurde einerseits Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse, als auch das über die LDH verstoffwechselte Laktat analysiert. Wie von Otto Warburg postuliert, zeigen Zellen mit gesteigerter (aerober) Glykolyse auch eine vermehrte Laktatproduktion (Warburg et al., 1927). Durch die Transfektion eines FRET-basierten Laktatsensor (*Laconic*) in MMTV-PyMT Tumorzellen wurde die intrazelluläre Laktatkonzentration ([Laktat]) über die Zeit bestimmt (Abbildung 5.5). Repräsentative Aufnahmen der Einzelintensitäten des cyan fluoreszierenden Proteins (CFP), des FRET-Kanals (FRET), als auch das CFP/FRET-Verhältnis (Ratio) der Brustkrebszellen sind in Abbildung 5.5 A dargestellt. Durch die Berechnung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von CFP/FRET über die Zeit konnten Änderungen der [Laktat] bestimmt werden (Abbildung 5.5 B). Da eine veränderte Glukoseaufnahme durch die IK-Ablation nicht auszuschließen war, wurde zunächst die Laktatkonzentration unter Glukosedepriuation vermessen. Eine signifikante, basale Reduktion im IK KO bestätigte den Befund einer geringeren glykolytischen Aktivität aus vorangegangenen *Seahorse* Experimenten (Abbildung 5.4) ($Ratio_{(CFP/FRET)}$: WT 0,27 \pm 0,01; IK KO 0,26 \pm 0,01; Abbildung 5.5 B, C). Durch die Blockade des Monocarboxylat-Transporters (MCT) via Bay 8002, war eine Akkumulation des Laktats und einer Steigerung der Ratio von *Laconic* zu beobachten (Abbildung 5.5 B). Die Differenz des Maximums der Glukosedepriuation unter Bay 8002 Behandlung (Minute 15 in Abbildung 5.5 B), zum Basalwert in MMTV-PyMT Tumorzellen impliziert einen schwächeren Anstieg in IK KO-Zellen ($Ratio_{(CFP/FRET)}$: WT 0,07 \pm 0,01; IK KO 0,04 \pm 0,01; Abbildung 5.5 D). Ergänzend wurden basale [Laktat] Messungen mit dem pharmakologischen IK-Inhibitor TRAM-34 durchgeführt (Abbildung 5.5 E). Die Blockade des Kanals im WT resultierte in einer signifikanten Reduktion der basalen Laktatkonzentrationen im Vergleich zu unbehandelten WT-Zellen ($Ratio_{(CFP/FRET)}$: WT 0,27 \pm 0,01; WT + TRAM-34 0,24 \pm 0,01; Abbildung 5.5 B, C), während der IK KO TRAM-34-insensitiv war. Die bereits zuvor gezeigte Reduktion der basalen Laktatkonzentration im IK KO konnte somit bestätigt werden ($Ratio_{(CFP/FRET)}$: IK KO 0,25 \pm 0,01; IK KO + TRAM-34 0,25 \pm 0,01; Abbildung 5.5 B, C ; Abbildung 5.5 E).

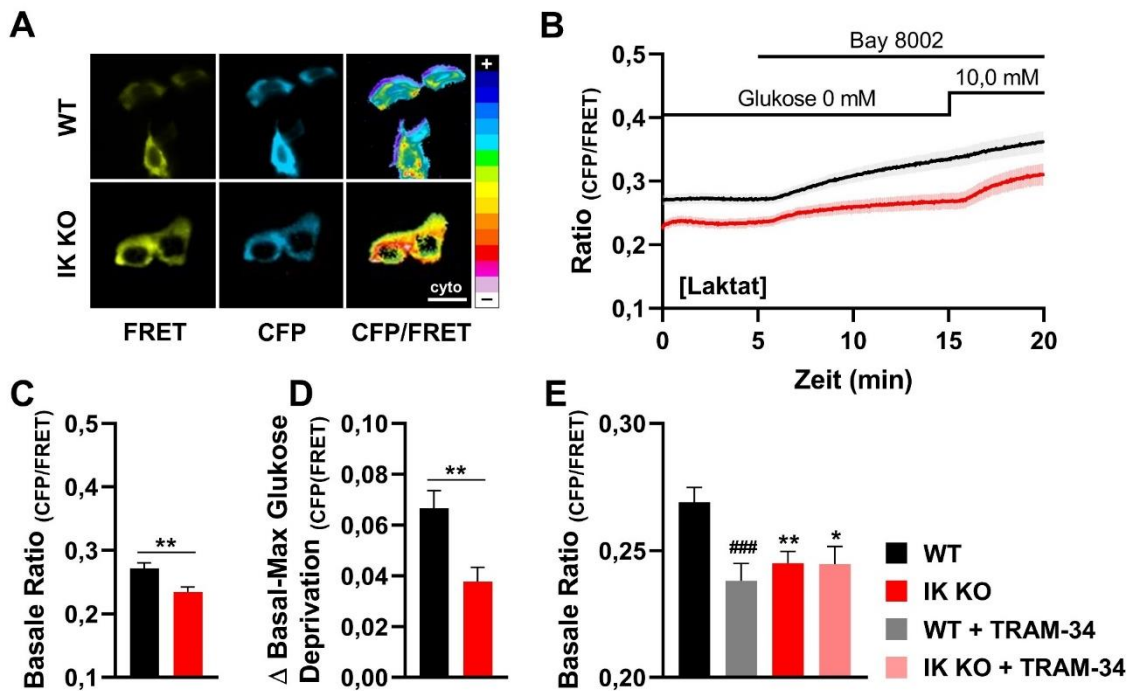


Abbildung 5.5: Einfluss der IK-Ablation auf die Laktatakkumulation in MMTV-PyMT Brusttumorzellen

(A) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und korrespondierende Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten Laktat-Indikator *Laconic* exprimieren. Maßstabsbalken: 20 µm. (B) Zugehörige FRET-Ratio über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurde den Zellen entweder Bay 8002, einem Monocarboxylat Transporter (MCT)-Inhibitor, oder 10,0 mM Glukose verabreicht. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. (C) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (B)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *Laconic* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse mittels (ungepaartem) t-Test für unabhängige Stichproben, ** p≤0,01. (D) Differenz der basalen FRET-Ratio zum Maximum der Glukose-Zugabe (Zeitpunkt 15 min (B)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *Laconic* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** p≤0,01. (E) Basale FRET-Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter und lachsfarbener Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot) oder 2 µM TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden, sowie *Laconic* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT ± TRAM-34; IK KO ± TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielles ANOVA, * p≤0,05; ** p≤0,01 zwischen Genotypen; ### p≤0,001 zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe. (*Laconic*: FRET-basierter Laktat-Indikator; MCT: Monocarboxylat-Transporter). Modifizierte Grafiken A–E basierend auf (Gross et al., 2022).

Da Laktat aus Pyruvat umgesetzt wird, sowie eine ebenso wichtige Rolle für die OxPhos spielt (metabolisiert zu Acetyl-CoA, 1.1.2.1), wurde die Pyruvatkonzentration ([Pyruvat]) untersucht. Analog zu *Laconic*, wurde ein FRET-basierter Pyruvat Sensor (*Pyronic*) transient transfiziert und vermessen. Repräsentative Fluoreszenz- und Ratio-Abbildungen sind in Abbildung 5.6 A aufgeführt. In MMTV-PyMT IK KO Zellen konnte eine verminderte [Pyruvat] quantifiziert werden (Ratio_(CFP/FRET): WT 0,26 ± 0,004; WT + TRAM-34 0,24 ± 0,004; Abbildung 5.6 B), was die geringere [Laktat] erklären könnte und mit einer Reduktion der glykolytischen Aktivität im IK KO einhergehen würde.

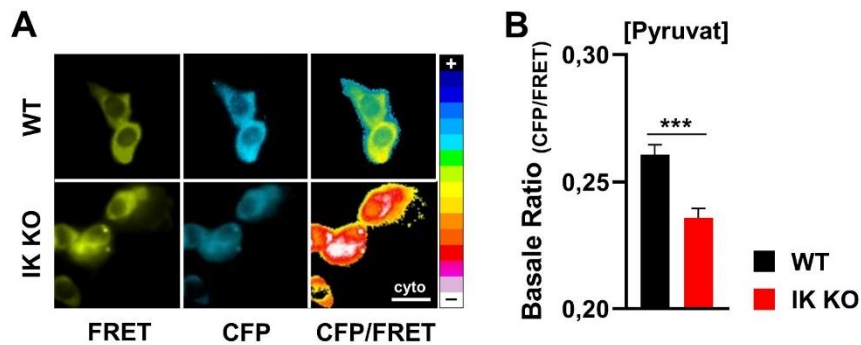


Abbildung 5.6: Einfluss der IK-Ablation auf die Pyruvatkonzentration in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten Pyruvat-Indikator *Pyronic* exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μm . (B) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0–5 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *Pyronic* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (*Pyronic*: FRET-basierter Pyruvat-Indikator). Modifizierte Grafiken A und B basierend auf (Gross et al., 2022).

5.2.3 Genetische Ablation des IKs verringert die zelluläre Glukoseaufnahme *in vitro*

Wie in Abschnitt 1.1.2.1 beschrieben wird Glukose über Transporter (GLUTs, SGLTs) in die Zelle gebracht und dient nachfolgend als Edukt der Glykolyse. Eine mögliche Erklärung für die verminderte glykolytische Aktivität der IK KO-Zellen könnte die veränderte Aufnahme von Glukose sein. Mittels Fluorophor-substituierter D-Glukose (2-NBDG) im extrazellulären Medium wurde ein veränderter Glukose-Transport in die Zelle sichtbar (Abbildung 5.7 A). Repräsentative Aufnahmen zeigen die Zellen (Durchlicht, DL), sowie die Intensität des 2-NBDG intrazellulär (F520, grün) (Abbildung 5.7 A). Die Messung der Intensität korreliert, durch die Kopplung des Fluorophores an die Glukose, mit der Glukoseaufnahme. Interessanterweise zeigte sich eine Reduktion der Intensität bei 520 nm und somit eine um ca. 50% abgeschwächte Glukoseaufnahme im KO ($F_{\text{Intensität/Unit}} \times 10^7$): WT $2,66 \pm 0,40$; IK KO $1,33 \pm 0,24$; Abbildung 5.7 B).

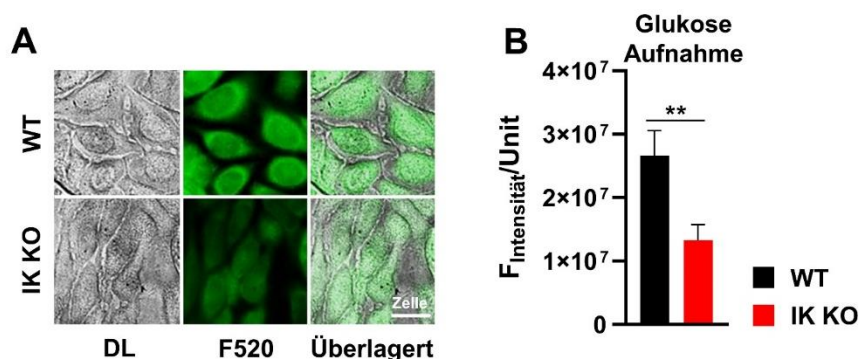


Abbildung 5.7: Glukose Aufnahme in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen

(A) Repräsentative Durchlicht- (grau, links), GFP- (grün, Mitte) und überlagerte Bilder (rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche das fluoreszierende Glukose-Analogon 2-NBDG aufgenommen haben. Maßstabsbalken: 20 μm . (B) Quantifizierung der Intensität (F520) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** $p \leq 0,01$. (2-NBDG: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglukose; GFP: grün fluoreszierendes Protein). Modifizierte Grafiken A und B basierend auf (Gross et al., 2022).

5.2.4 IK-Depletion moduliert multiple Parameter der mitochondrialen Bioenergetik

Neben seiner Plasmamembranlokalisation implizieren Studien aus dem Labor von Szabo und anderen, dass der IK auch in Mitochondrien von Kolon-, Pankreas-, NSCLC-, Melanom- und Brustkrebszellen exprimiert wird (Bachmann et al., 2022). Inwieweit der IK-Kanal die oxidative Phosphorylierung (OxPhos) und/oder die mitochondrielle ATP-Produktion beeinflusst, wurde durch die Messung des Sauerstoffverbrauchs (OCR) von IK-profizienten und -defizienten MMTV-PyMT Zellen untersucht. Diese Untersuchungen wurden unter „physiologischen“ Bedingungen und nach Blockade verschiedener Komplexe der Atmungskette und der F_0F_1 -ATP Synthase (analog Abbildung 5.4) durchgeführt (Abbildung 5.8 A). Zur besseren Übersicht wurden die folgenden Quantifizierungen schematisch dargestellt (Abbildung 5.8 B, I–V). Zunächst wurde die basalen OCR als Hinweis für die physiologische OxPhos Aktivität bestimmt (Abbildung 5.8 C, I). Unter IK-Depletion konnte ein deutlicher Abfall der basalen OCR im Vergleich zum WT gezeigt werden ($OCR_{(pmol/min/\mu g \text{ Protein})}$: WT $15,78 \pm 2,99$; IK KO $4,99 \pm 1,09$; Abbildung 5.8 C, I). Die pharmakologische Inhibition des IKs mittels TRAM-34 resultierte tendenziell in einer Reduktion der OCR ($OCR_{(pmol/min/\mu g \text{ Protein})}$: WT + TRAM-34 $11,91 \pm 1,29$; Abbildung 5.8 C, I). Unspezifische Wirkungen des Inhibitors wurden aufgrund von Nichtansprechen von TRAM-34 im IK KO ausgeschlossen ($OCR_{(pmol/min/\mu g \text{ Protein})}$: IK KO + TRAM-34 $5,06 \pm 1,05$; Abbildung 5.8 C, I).

Eine Inhibition der F_0F_1 -ATP Synthase (Komplex V) mittels Oligomycin-A sorgte für eine verminderte ATP-Produktion in den Mitochondrien. Durch den Vergleich der basalen OCR-Level zum erzeugten Minimum unter Oligomycin-A konnte die jeweilige *ATP-Produktion* der Mitochondrien bestimmt werden (Abbildung 5.8 C, II). Durch die Blockade von Komplex V der Atmungskette zeigte sich erwartungsgemäß auch der O_2 -Verbrauch reduziert. MMTV-PyMT IK KO-Zellen wiesen eine deutlich geringere ATP-Produktion im Vergleich zum WT auf ($OCR_{(pmol/min/\mu g \text{ Protein})}$: WT $9,91 \pm 1,95$; IK KO $3,02 \pm 0,57$; Abbildung 5.8 C, II). Analog führte TRAM-34 zu einer tendenziellen Herunterregulation in WT-Zellen ($OCR_{(pmol/min/\mu g \text{ Protein})}$: WT + TRAM-34 $7,51 \pm 0,79$), wohingegen IK KO-Zellen von TRAM-34 unbeeinflusst blieben (IK KO + TRAM-34 $2,99 \pm 0,62$; Abbildung 5.8 C, II). Unter Oligomycin-A verbleiben mehr H^+ im Intermembranraum der Mitochondrien, was den weiteren H^+ -Fluss der Atmungskette über die IMM stört. Komplex IV, der eigentlich O_2 -verbrauchende Komplex des Mitochondriums, wird somit ebenfalls in seiner Aktivität gehemmt, was das Absinken der OCR erklärt.

Zur Differenzierung einer temporär erniedrigten OCR oder einer generellen Herunterregulation des Zell-Metabolismus, wurde der mitochondrielle Entkoppler FCCP eingesetzt. FCCP löst den H^+ -Gradienten des Mitochondriums über die IMM auf. Um dies zu kompensieren, reagieren die Zellen mit einer maximal gesteigerten Zellatmung/ O_2 -Verbrauch (Abbildung 5.8 C, III). Diese *maximale Respiration* stellte sich in den IK KO-Zellen deutlich reduziert dar ($OCR_{(pmol/min/\mu g \text{ Protein})}$: WT $22,03 \pm 3,84$; IK KO $7,08 \pm 1,69$; Abbildung 5.8 C, III). Auch die pharmakologische IK-Hemmung durch TRAM-34 zeigte im WT einen tendenziellen Abfall, welcher im KO wiederum nicht detektiert wurde ($OCR_{(pmol/min/\mu g \text{ Protein})}$: WT + TRAM-34 $15,28 \pm 2,14$; IK KO + TRAM-34 $9,09 \pm 1,99$; Abbildung 5.8 C, III). Auch die *Reservekapazität*, welche die Möglichkeit der Zelle aufzeigt, zusätzlich Energie durch die OxPhos zu produzieren (Abbildung 5.8 C, IV), war in WT-Zellen deutlich erhöht, verglichen mit dem IK KO ($OCR_{(pmol/min/\mu g \text{ Protein})}$: WT $9,16 \pm 1,49$; IK KO $3,19 \pm 1,06$; Abbildung 5.8 C, IV).

Schließlich wurde durch den Komplex III-Inhibitor Antimycin-A der oxidative Schritt der Atmungskette adressiert. Damit war die durch Komplex IV katalysierte Reaktion aus $\frac{1}{2} O_2$ und $2 H^+$ Wasser (H_2O) oxidativ herzustellen, nicht möglich. Die Zelle verbrauchte entsprechend

kein O₂ mehr und die OCR sank auf ihr Minimum. Im Vergleich der MMTV-PyMT WT- mit IK KO-Zellen zeigte sich ein starker Abfall auf ein ähnliches Niveau (Abbildung 5.8 A). Die direkte Differenz zwischen dem physiologischen Basalwert und dem Minimum unter Antimycin-A beschreibt den Verlust der H⁺ (H⁺-Verlust) aus dem IMS in die Matrix des Mitochondriums (Abbildung 5.8 C, V) und erlaubt Rückschlüsse auf eine mögliche Beschädigung der Mitochondrien (-Membranen). Die Ablation des IK-Kanals (KO) induzierte einen signifikant verringerten H⁺-Verlust, verglichen zum WT (OCR_(pmol/min/μg Protein): WT 2,96 ± 0,55; IK KO 0,88 ± 0,16; Abbildung 5.8 C, V). Der Unterschied des durch TRAM-34 induzierten H⁺-Verlusts im WT war indes marginal, während im KO (+ TRAM-34) ein zum unbehandelten IK KO vergleichbarer Wert erreicht wurde (OCR_(pmol/min/μg Protein): WT + TRAM-34 2,75 ± 0,47; IK KO + TRAM-34 0,95 ± 0,17; Abbildung 5.8 C, V). Zusammengefasst zeigte sich unter Deletion des IK-Kanals in MMTV-PyMT Tumorzellen ein deutliches Defizit der mitochondrialen Bioenergetik und damit ihrer metabolischen Leistungsfähigkeit.

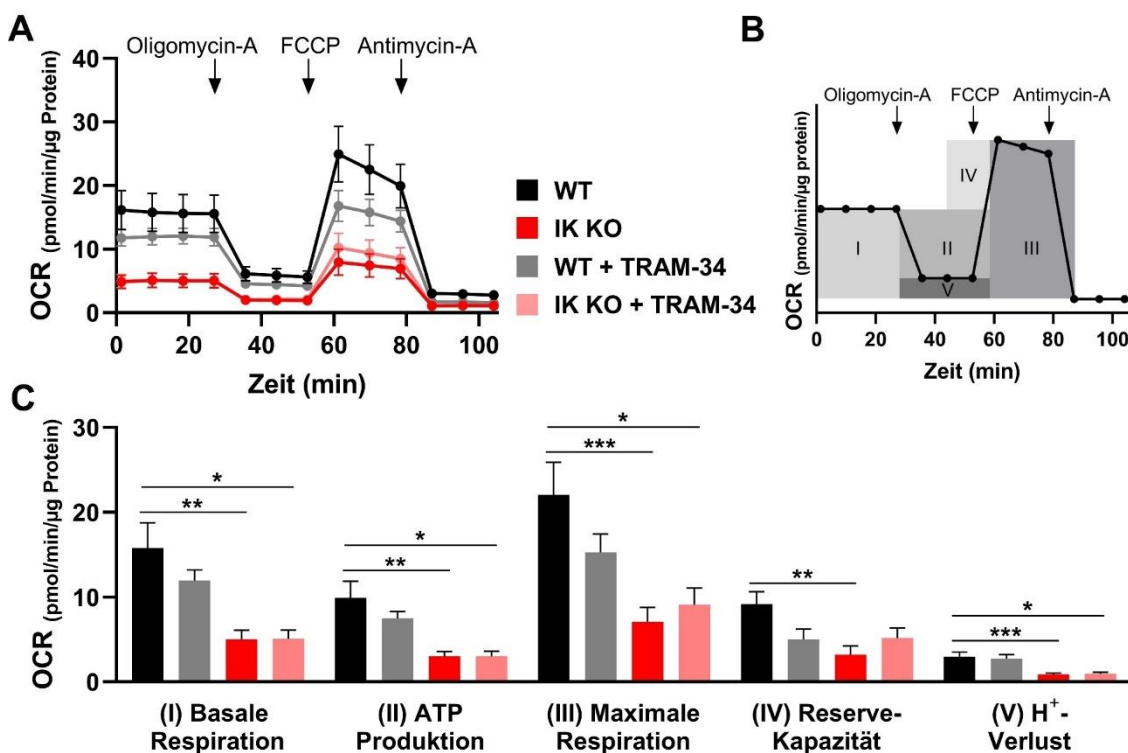


Abbildung 5.8: Einfluss des IK-Kanals auf den oxidativen Sauerstoffverbrauch (OCR) von MMTV-PyMT Tumorzellen

Während der Messung des extrazellulären Flux (*Seahorse*, 4.11) kann der Sauerstoffverbrauch (OCR) bestimmt werden, was Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Mitochondrien und der OxPhos gibt. (A) OCR von MMTV-PyMT WT- (schwarze und graue Linie) oder MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote und lachsfarbene Linie) über die Zeit, welche entweder mit DMSO (schwarz und rot) oder mit 2 μM TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden. Zeitpunkte zu denen OCR-Änderungen durch Verabreichung von Oligomycin-A, FCCP oder Antimycin-A induziert wurden, sind angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM mit N=3 pro Genotyp dar. (B) Graue Balken und römische Ziffern identifizieren die quantitative Darstellung der Messzeiträume in (C). Hierfür wurde in (B) eine fiktive und idealisierte OCR Messung über die Zeit verwendet. (C) Basale OCR (Zeitpunkte 0–30 min (A), (I) Basal), Differenz der durch Oligomycin-A induzierten OCR zum Basalniveau ((II) ATP-Produktion), durch FCCP induzierte maximale Atmung, durch Entkopplung von OxPhos ((III) Maximale Respiration), Differenz der maximalen OCR zum Basalniveau ((IV) Reserve-Kapazität) und das Verhältnis des durch Antimycin-A induzierten Minimums zum Basalniveau ((V) H⁺-Verlust), von MMTV-PyMT WT- (schwarze und graue Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote und lachsfarbene Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot) oder 2 μM TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM mit N=3 WT ± TRAM-34; IK KO ± TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielles Varianzanalyse mittels ANOVA, * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001. (OCR: oxygen consumption rate). Modifizierte Grafiken A–C basierend auf (Gross et al., 2022).

5.2.5 Abwesenheit des IK-Kanals reduziert das mitochondrielle Membranpotenzial

Aufgrund der K^+ - und Ca^{2+} -modulierenden Wirkung des IK-Kanals, sowie den extrazellulären Flussanalysen nach Entkopplung durch FCCP (Abbildung 5.4 und Abbildung 5.8), sollte die Rolle von IK auf das mitochondrielle Membranpotenzial ($\Delta\Psi_{\text{mito}}$) genauer untersucht werden. Hierfür wurde der Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff TMRM (Tetramethylrhodamin-Methylester) eingesetzt. TMRM akkumuliert als kationischer Farbstoff in negativ geladenen Organellen wie dem Mitochondrium (Vasilev et al., 2021). Durch den Entkoppler FCCP wird das Membranpotenzial zerstört und die freigewordene negative Ladung (Anionen) aus dem Mitochondrium reichert sich im Nukleus an (4.9.4). Dies bewirkt unter FCCP eine Abschwächung der TMRM Intensität im Mitochondrium und eine Erhöhung im Nukleus (Abbildung 5.9 A). Aus der Ratio der Fluoreszenzintensität von Mitochondrien zu Nukleus können also Rückschlüsse auf das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ gezogen werden. Unter IK-Depletion wurde eine signifikant verminderte (positivere) basale TMRM-Ratio gemessen, was folglich für ein vermindertes $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ spricht (Ratio_(Mito/Nukleus): WT $3,16 \pm 0,08$; IK KO $2,46 \pm 0,07$; Abbildung 5.9 C). In Übereinstimmung zeigte die pharmakologische Inhibition von IK in MMTV-PyMT WT-Zellen ebenfalls einen signifikanten Abfall des Potenzials unter physiologischen Bedingungen (basal), sowie keine unspezifischen Wirkungen des TRAM-34 auf IK KO-Zellen (Ratio_(Mito/Nukleus): WT + TRAM-34 $2,43 \pm 0,05$; IK KO + TRAM-34 $2,35 \pm 0,06$; Abbildung 5.9 D).

Zusätzlich sollte die Re-Expression des IK-Kanals in IK KO-Zellen (*IK rescue*) den Effekt des Kanals auf das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ bestätigen. Die zuvor generierte genetische Ablation wurde durch Re-Expression des IK Kanals mittels Plasmid-Transfektion in MMTV PyMT IK KO-Zellen realisiert. Um ergänzend die Auswirkungen der Transfektion auf die Viabilität der MMTV-PyMT Tumorzellen zu testen, wurden IK-transfizierte KOs mittels MTT-Assay untersucht. Diese Vitalitätsmessungen ergaben keine Viabilitäts-Unterschiede zwischen MMTV PyMT *IK rescue* und IK KO (ohne Transfektion) (Abbildung 9.1 A). Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten ebenfalls eine primär membranständige Lokalisation des IK-Kanalproteins im MMTV PyMT *IK rescue* (Abbildung 9.1 B). Den funktionellen Nachweis des *IK rescue* erbrachten letztlich Messungen des mitochondrialen Membranpotenzials mittels TMRM. Im Vergleich zu den MMTV PyMT KO-Zellen lag die TMRM-Ratio signifikant höher und erreichte das entsprechende Niveau der MMTV PyMT WT-Zellen (Ratio_(Mito/Nukleus): *IK rescue* $3,11 \pm 0,12$; Abbildung 5.9 D). Folglich führte die Re-Expression des Kanals im IK KO zu einer signifikanten Erhöhung im Vergleich zum nicht transfizierten IK KO, sowie einer ähnlichen basalen Ratios wie im WT, was dementsprechend die Funktionalität des *IK rescue* validiert.

Die TMRM-Messungen untermauern, dass die IK-Ablation in MMTV-PyMT Zellen in einem positiveren mitochondrialen Membranpotenzial ($\Delta\Psi_{\text{mito}}$) resultiert. Dieser Befund ist kongruent mit den zuvor detektierten IK-abhängigen Effekten eines reduzierten (mitochondriellen) Metabolismus (Abbildung 5.8).

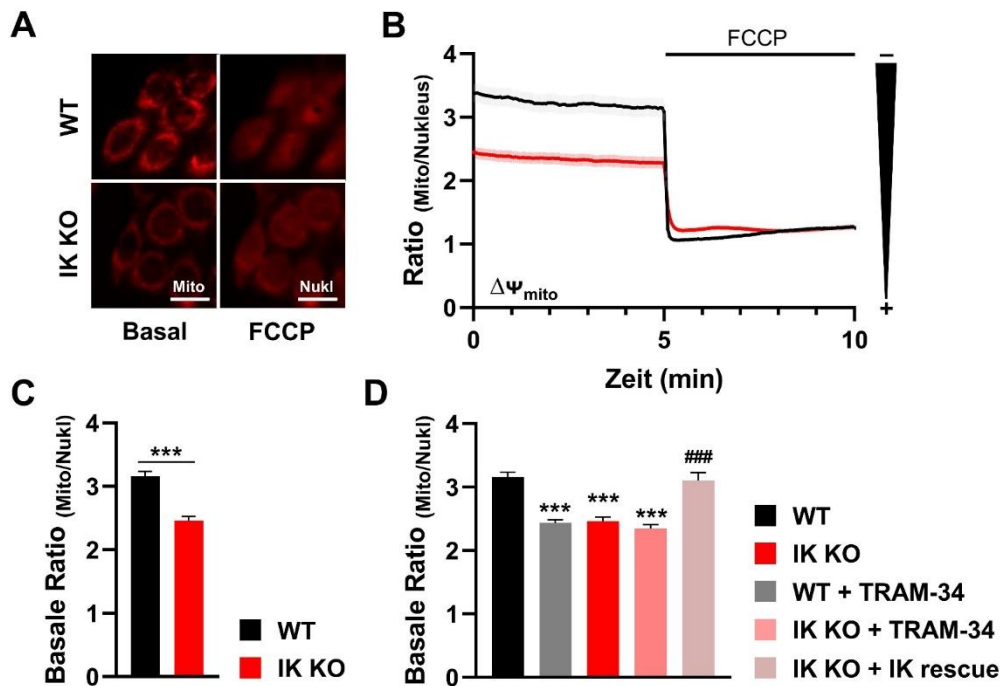


Abbildung 5.9: Einfluss der IK-Depletion auf das mitochondrielle Membranpotenzial in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Repräsentative Aufnahmen von TMRM-beladenen MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche entweder unbehandelt (Basal, links) oder zusätzlich mit FCCP behandelt (FCCP, rechts) wurden. Maßstabsbalken: 20 μm . (B) Zugehörige Ratio ($\Delta\Psi_{\text{mito}}$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurde den Zellen FCCP, ein mitochondrieller Entkoppler, verabreicht. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N=9 IK KO dar. (C) Basale Ratio (Zeitpunkte 0–5 min (B)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N=9 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (D) Basale Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter, lachsarbener und hellroter Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot) oder 2 μM TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden, oder nach Re-Expression des IK-Kanals im IK KO Hintergrund (hellrot). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle ANOVA, *** $p \leq 0,001$ zwischen Genotypen; ### $p \leq 0,001$ zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe. (Mito: Mitochondrium; Nukl.: Nukleus; TMRM: Tetramethylrhodamin-methylester). Modifizierte Grafiken A–D basierend auf (Gross et al., 2022).

5.2.6 Untersuchung der mitochondrialen und cytosolischen ATP-Level in IK-profizienten und -defizienten MMTV-PyMT Tumorzellen

In Übereinstimmung mit der verminderten OCR, als auch des reduzierten mitochondrialen Membranpotenzials in IK KO-Zellen, wurden im Folgenden die intrazellulären ATP-Level in unterschiedlichen Zellkompartimenten im Detail untersucht. Hierfür wurde zunächst der FRET-basierte Sensor *mtAT1.03* eingesetzt, mit dem sich die mitochondrielle ATP-Dynamik in Echtzeit ermitteln lässt (siehe 4.9) (Imamura et al., 2009). Repräsentative Aufnahmen zeigen die Expression und Lokalisation des Sensors exklusiv in der mitochondrialen Matrix (Abbildung 5.10 A). Die Berechnung der FRET/CFP Fluoreszenzsignal-Ratio unter physiologischen Bedingungen liefert Informationen zur basalen Konzentration von ATP in der mitochondrialen Matrix ($[\text{ATP}]_{\text{mito}}$) (Abb. 5.10 B). Die Deletion des IK-Kanals resultierte in einer geringeren $[\text{ATP}]_{\text{mito}}$ im Vergleich zum WT (Ratio_(FRET/CFP): WT $2,74 \pm 0,06$; IK KO $2,45 \pm 0,08$; Abbildung 5.10 C), was eine geringere metabolische Aktivität der IK KO-Zellen widerspiegelt und mit

vorangegangenen Experimenten (Abbildung 5.8–Abbildung 5.9) übereinstimmt (siehe Abschnitt 5.2.4). Durch eine Glukose-Deprivation wird die Glykolyse unterbunden. Dies führt wiederum zu einer Verknappung der cytosolischen Pyruvatkonzentration ($[Pyruvat]$) und damit einhergehend zu einem Mangel an Edukten für die OxPhos. Infolgedessen zeigte der WT eine initiale kompensatorische (mitochondrielle) Erhöhung der $Ratio_{(FRET/CFP)}$ gefolgt von einer starken Reduktion. Währenddessen wurde im IK KO ein direkter Abfall der $Ratio_{(FRET/CFP)}$ detektiert (Abbildung 5.10 B). Zusätzlich wurde nach 10 min die mitochondrielle ATP-Produktion der F_0F_1 -ATP Synthase nach Hemmung durch Oligomycin-A inhibiert (Abbildung 5.10 B). Die gleichzeitige Blockade der zwei primären energieproduzierenden Prozesse resultierte in einem gemeinsamen Minimum ($[ATP]_{mito}$) beider Genotypen ($Ratio_{(FRET/CFP)}$: WT $2,13 \pm 0,10$; IK KO $2,09 \pm 0,08$; Abbildung 5.10 D). Ergänzend wurde die basale ATP-Konzentration im Mitochondrium in TRAM-34 behandelten MMTV-PyMT Zellen bestimmt (Abbildung 5.10 E). Erneut zeigte sich eine klare Tendenz zur $[ATP]_{mito}$ -Reduktion unter TRAM-34 im WT. Eine signifikante Reduktion im IK KO \pm TRAM-34 zeigte indes keine *off-target* Effekte des Inhibitors ($Ratio_{(FRET/CFP)}$: WT $2,49 \pm 0,07$; IK KO $2,17 \pm 0,13$; WT +TRAM-34 $2,23 \pm 0,17$; IK KO + TRAM-34 $2,14 \pm 0,12$; Abbildung 5.10 E).

Aufgrund des eindeutigen metabolischen Phänotyps der IK KO-Zellen wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch die cytosolische ATP-Konzentration $[ATP]_{cyto}$ vermindert sein musste. Mittels des im FRET-basierten ATP Sensoren *NesAT1.03* wurde die cytosolische ATP-Konzentration $[ATP]_{cyto}$ ermittelt (Imamura et al., 2009). Repräsentative Aufnahmen zeigen die Einzelintensitäten, sowie die Ratio aus FRET/CFP im Cytosol der MMTV-PyMT Zellen (Abbildung 5.10 F). Um den Effekt des mitochondrialen ATPs direkt mit dem Cytosol korrelieren zu können, wurde ein identischer Versuchsaufbau wie in Abbildung 5.10 B gewählt (Abbildung 5.10 G). Überraschenderweise implizierte die basale $Ratio_{(FRET/CFP)}$ unter IK-Ablation eine signifikante Erhöhung der $[ATP]_{cyto}$ ($Ratio_{(FRET/CFP)}$: WT $2,43 \pm 0,4$; IK KO $2,68 \pm 0,07$; Abbildung 5.10 H). Die Blockade der Glykolyse durch Glukose-Deprivation, oder die Inhibition der ATP-Produktion via Oligomycin-A zeigten wiederum ähnliche Effekte wie die mittels *mtAT1.03* bestimmte $[ATP]_{mito}$ (Abbildung 5.10 B). Nach 20 min wurde letztendlich ein gemeinsames $Ratio$ -Minimum in beiden Genotypen erreicht ($Ratio_{(FRET/CFP)}$: WT $2,07 \pm 0,04$; IK KO $2,04 \pm 0,08$; Abbildung 5.10 I). Jedoch konnte durch den frühzeitigen Abbruch des Experiments nicht differenziert werden, ob eine weitere Reduktion der Ratios nach 20 min stattfinden konnte (Abbildung 5.10 G). Infolgedessen wurde ein Langzeitexperiment mit einer Oligomycin-A Behandlung über 24 h durchgeführt (Abbildung 5.10 J). Analog Abbildung 5.10 H, zeigte eine Behandlung mit Oligomycin-A über 24 h in beiden Genotypen eine signifikante Reduktion der basalen $[ATP]_{cyto}$ im Vergleich zum jeweils unbehandelten Genotyp ($Ratio_{(FRET/CFP)}$: WT $3,35 \pm 0,03$; WT + Oligomycin-A $2,94 \pm 0,03$; IK KO $3,58 \pm 0,04$; IK KO + Oligomycin-A $3,23 \pm 0,05$; Abbildung 5.10 J). Ebenso wurde im Langzeitexperiment erneut die signifikant erhöhte $[ATP]_{cyto}$ des IK KOs (im Vergleich zum WT) verifiziert (Abbildung 5.10 J).

Zusammengenommen implizieren die FRET-basierten ATP-Messungen, dass die Ablation des IK-Kanals zu einer Verminderung von $[ATP]_{mito}$ führt, aber dennoch die $[ATP]_{cyto}$ trotz verminderter OxPhos (Abbildung 5.8) erhöht war. Diese zunächst diskrepant erscheinenden Effekte sollten im Folgenden aufgeklärt werden.

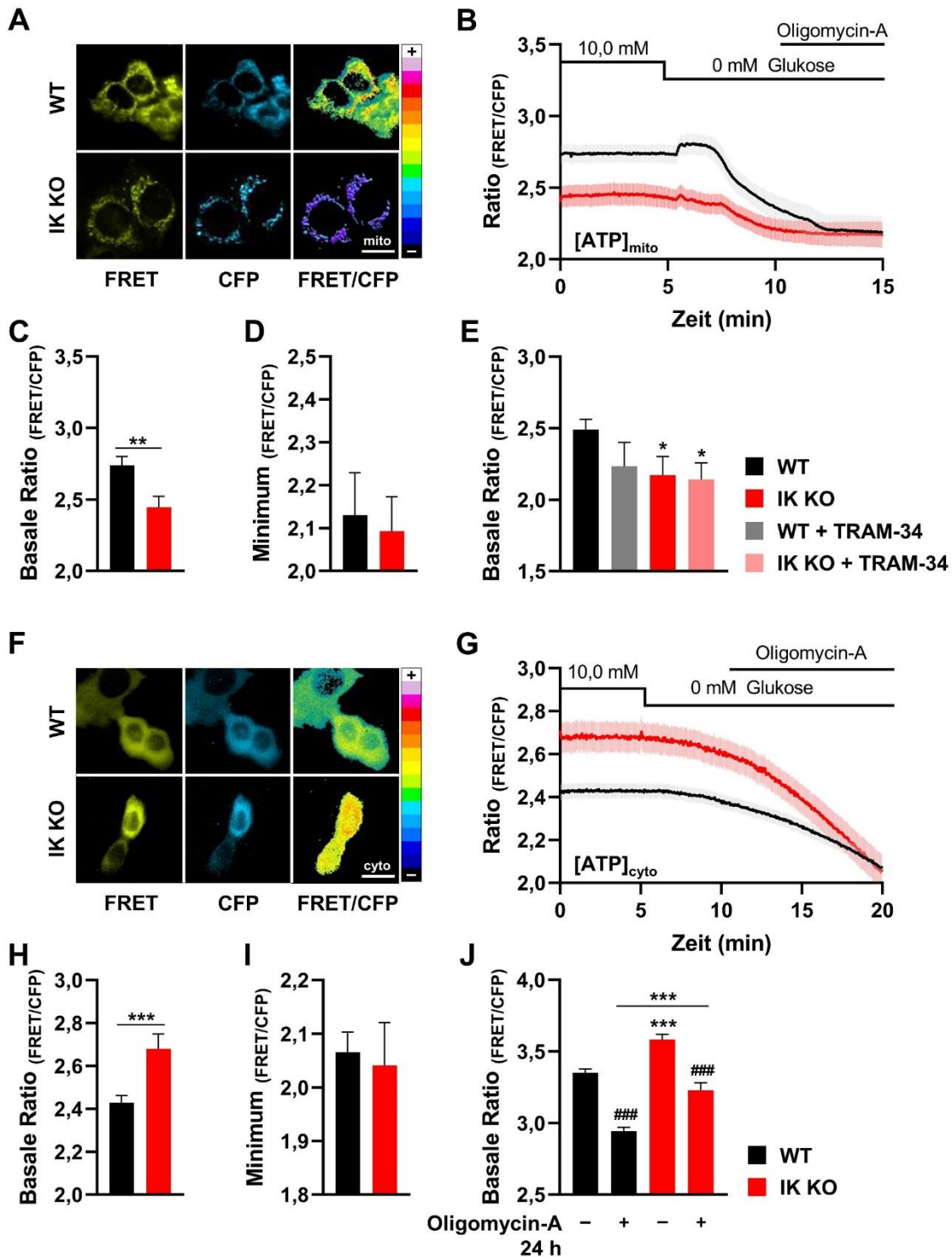


Abbildung 5.10: Einfluss des IK-Kanals auf die mitochondrielle- und cytosolische ATP-Produktion in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und FRET-Ratio Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den mitochondrial lokalisierten, FRET-basierten ATP-Indikator *mtAT1.03* exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μm . (B) Zugehörige Ratio ($[\text{ATP}]_{\text{mito}}$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu denen im Panel angegebenen Zeitpunkten wurde den Zellen Glukose entzogen (0 mM), oder der F_0F_1 -ATP Synthese Inhibitor Oligomycin-A verabreicht. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=7 WT; N=8 IK KO dar. (C) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (B)) und (D) die minimale Ratio (Zeitpunkte 15 min (B)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *mtAT1.03* exprimieren. Die Daten

stellen den Mittelwert \pm SEM von N=7 WT; N=8 IK KO dar. Statistische Analyse mittels (ungepaartem) t-Test für unabhängige Stichproben, ** $p \leq 0,01$. (E) Basale Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter und lachsfarbener Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot), oder 2 μ M TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT \pm TRAM-34; IK KO \pm TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle ANOVA, * $p \leq 0,05$. (F) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und FRET-Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET- basierten, cytosolischen ATP-Indikator *NesAT1.03* exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μ m. (G) Zugehörige Ratio ($[ATP]_{cyto}$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu denen im Panel angegebenen Zeitpunkten wurde den Zellen Glukose entzogen (0 mM), oder der F_0F_1 -ATP Synthase Inhibitor Oligomycin-A verabreicht. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. (H) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (G)) und (I) die minimale Ratio (Zeitpunkte 20 min (G)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *NesAT1.03* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (J) Basale Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche über 24 h entweder mit DMSO (-) oder mit Oligomycin-A (+) behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT \pm Oligomycin-A; IK KO \pm Oligomycin-A dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle ANOVA, *** $p \leq 0,001$ zwischen Genotypen; ### $p \leq 0,001$ zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe. (mtAT1.03: FRET-basierter mitochondrialer ATP-Indikator; NesAT1.03: FRET-basierter cytosolischer ATP-Indikator). Modifizierte Grafiken A–I basierend auf (Gross et al., 2022).

5.3 Einfluss des IK-Kanals auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase in MMTV-PyMT Tumorzellen

Aufgrund der Tatsache, dass mitochondrielles Ca^{2+} die ATP-Produktion, sowie das Membranpotenzial beeinflussen kann (McKenzie et al., 2017), wurden subzelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]$) in MMTV-PyMT untersucht. Durch die „Ambivalenz“ des IKs, als Ca^{2+} abhängiger Ionenkanal, als auch Modulator der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, ist ein Einfluss auf die Energiehomöostase zu vermuten (Ibrahim et al., 2021, Jensen et al., 2001). Des Weiteren wird postuliert, dass K^+ -Kanäle, wie der IK, in der IMM an der Regulation des Membranpotentials, oder der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind (De Marchi et al., 2009, Wrzosek et al., 2022).

5.3.1 IK-abhängige Modulation der cytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase

Zunächst wurde die mitochondrielle $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{mito}$) ermittelt (siehe Abschnitt 4.9.2). Dazu wurde ein genetisch codierter, mitochondrial lokalisiert und FRET-basierter Ca^{2+} -Sensor (*4mtD3cp*) in den MMTV-PyMT Zellen exprimiert (Palmer et al., 2006). Repräsentative Aufnahmen von *4mtD3cpV* bestätigen die Lokalisation des Sensors in den Mitochondrien (Abbildung 5.11 A). Die basale FRET-Ratio in den MMTV-PyMT Zellen (Abbildung 5.11 B) zeigte dabei keine signifikanten Genotyp-spezifischen Unterschiede (Ratio_(FRET/CFP): WT $2,69 \pm 0,08$; IK KO $2,51 \pm 0,06$; Abbildung 5.11 C). Um einen Ca^{2+} -Influx in das Mitochondrium auszulösen, wurde extrazellulär ATP verabreicht, was über purinerge P2-Rezeptoren einen Ca^{2+} -Einstrom vermittelte (Seiler et al., 1999, Yamada et al., 1996). Dieser Influx war unmittelbar im Mitochondrium detektierbar (Abbildung 5.11 B). Durch die anschließende Blockade der mitochondrialen F_0F_1 -ATP Synthase via Oligomycin-A, sowie nachfolgender ATP-Deprivation, wurde ein weiterer Abfall der FRET-Ratio in beiden Genotypen beobachtet (Abbildung 5.11 B).

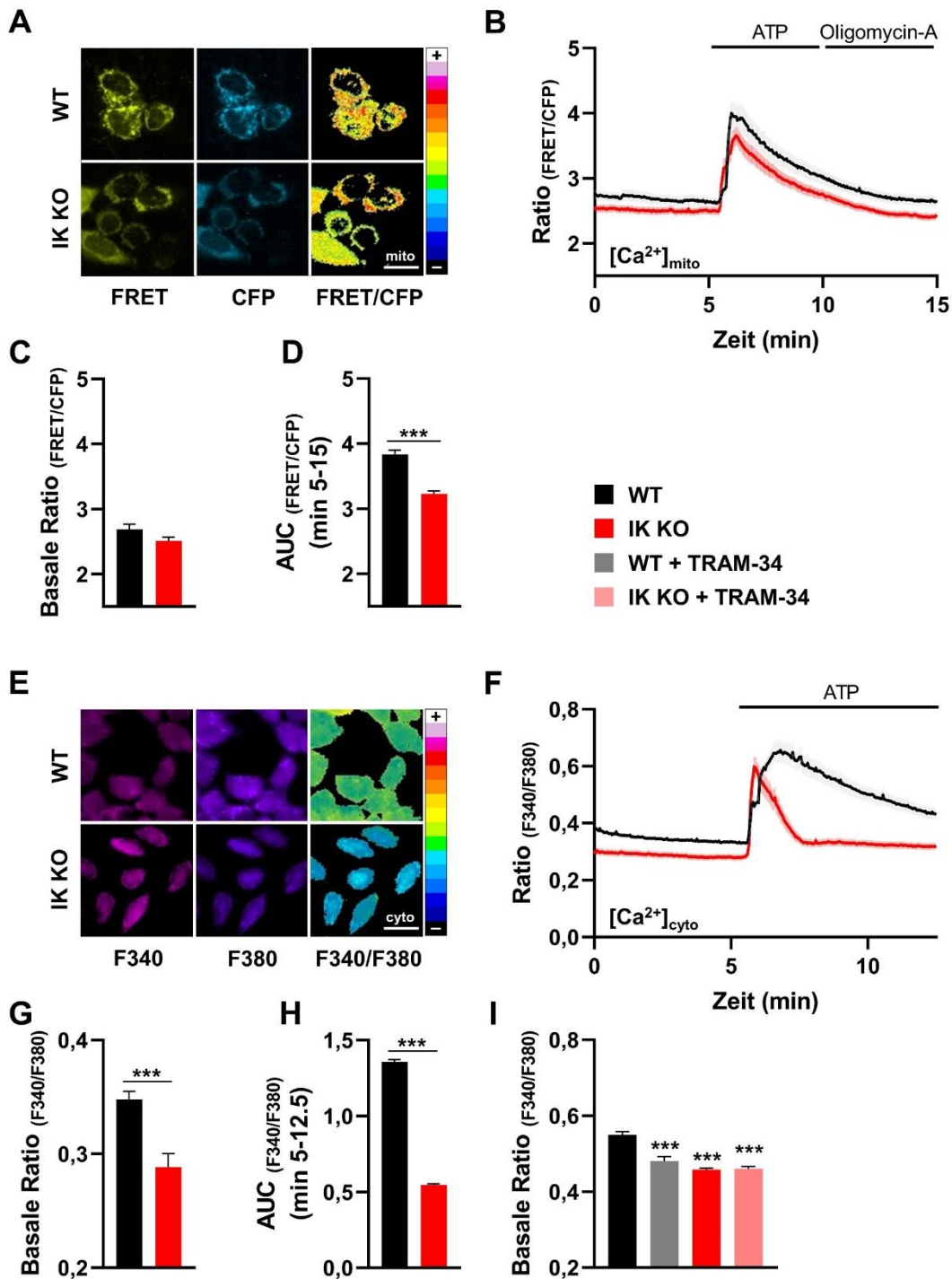


Abbildung 5.11: Auswirkungen des IK-Kanals auf mitochondrielle- und cytosolische Ca^{2+} Signale in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten mitochondrialen Ca^{2+} -Indikator *4mtD3cpV* ($[Ca^{2+}]_{mito}$) exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μ m. (B) Zugehörige Ratio ($[Ca^{2+}]_{mito}$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zudem sind die Zeitpunkte der extrazellulären ATP, sowie der Oligomycin-A Zugabe angegeben. Extrazelluläres ATP triggert die Erhöhung der intrazellulären $[Ca^{2+}]$. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. (C) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0–5 min (B)) und (D) die Fläche unter der Kurve (AUC, Zeitpunkte 5–15 min (B)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *4mtD3cpV* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (E) Repräsentative Bilder von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe)

und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), beladen mit FURA-2 und angeregt mit 340 nm (rosa, links), oder 380 nm (violett, Mitte). Das rechte Bild zeigt die Ratio von 340/380 (pseudo-koloriert, rechts). (F) Zugehörige Ratio ($[Ca^{2+}]_{cyto}$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen mit extrazellulärem ATP stimuliert, welches den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran erhöht. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. (G) Basale FURA-2-Ratio (Zeitpunkte 0–5 min (F)) und (H) die Fläche unter der Kurve (AUC, Zeitpunkte 5–12,5 min (F)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche mit FURA-2 beladen wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (I) Basale FURA-2-Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter und lachsfarbener Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot), oder 2 μ M TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT \pm TRAM-34; IK KO \pm TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle ANOVA, *** $p \leq 0,001$. (ATP: Adenosintriphosphat; AUC: Fläche unter der Kurve/ area under the curve; 4mt D3 cpv: FRET-basierter mitochondrieller Calcium-Indikator). Modifizierte Grafiken A–I basierend auf (Gross et al., 2022).

Die Berechnung der *Area under the curve* (AUC) zeigte, anders als die basalen $[Ca^{2+}]_{mito}$, einen im IK KO signifikant verminderten Ca^{2+} -Influx in das Mitochondrium ($AUC_{(FRET/CFP)}$: WT $3,83 \pm 0,42$; IK KO $3,23 \pm 0,25$; Abbildung 5.11 D).

Der verminderte Ca^{2+} -Einstrom in das Mitochondrium resultierte wahrscheinlich aus dem reduzierten cytosolischen $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{cyto}$) Influx unter extrazellulärer ATP-Stimulation. Analog der Messung des $[Ca^{2+}]_{mito}$ mittels *4mtD3cpV* (Abb. 5.11 B) wurde extrazelluläres ATP zur Stimulation der Zellen verwendet und mittels FURA-2 Ratio (F340/380 nm, Abbildung 5.11 E) in beiden Genotypen eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{cyto}$ über die Zeit beobachtet (Abbildung 5.11 F). Die AUC in den IK KO-Zellen war um ca. das dreifache erniedrigt $[Ca^{2+}]_{cyto}$ ($AUC_{(F340/F380)}$: WT $1,36 \pm 0,12$; IK KO $0,54 \pm 0,06$; Abbildung 5.11 H) im Vergleich zum WT. Die Ablation des IKs resultierte darüber hinaus auch in einer signifikanten Verminderung der basalen Ratio ($Ratio_{(F340/F380)}$: WT $0,35 \pm 0,01$; IK KO $0,28 \pm 0,01$; Abbildung 5.11 G). Daraus ergaben sich drastische Unterschiede der zellulären Ca^{2+} -Homöostase in MMTV-PyMT IK KO-Zellen, welche auch pharmakologisch durch TRAM-34 im WT bestätigt wurden ($Ratio_{(F340/F380)}$: WT $0,55 \pm 0,01$; IK KO $0,46 \pm 0,00$; WT + TRAM-34 $0,48 \pm 0,01$; IK KO + TRAM-34 $0,46 \pm 0,01$; Abbildung 5.11 I). Mögliche *off-target* Effekte des TRAM-34 wurden durch eine Insensitivität auf ATP-vermittelten $[Ca^{2+}]_{cyto}$ Signale im IK KO ausgeschlossen.

5.3.2 IK moduliert die zelluläre Ca^{2+} -Speicherkapazität in MMTV-PyMT Zellen

Zur Differenzierung, ob der in 5.3.1 induzierte Ca^{2+} Einstrom (mittels ATP) durch extrazelluläre- oder intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher ausgelöst wurde, wurden ergänzende FURA-2 Messungen durchgeführt. Analog Abbildung 5.11 G, bestätigte sich zunächst eine reduzierte basale Ratio im IK KO ($Ratio_{(F340/F380)}$: WT $0,55 \pm 0,01$; IK KO $0,46 \pm 0,00$; Abbildung 5.12 A, B). Unter anschließender Ca^{2+} -Deprivation, sowie EGTA vermittelter Ca^{2+} -Chelation, wurde eine Reduktion der $[Ca^{2+}]_{cyto}$ unter den Basalwert in beiden Genotypen beobachtet. Die Differenz (Δ) zwischen Minima und Basalwerten in MMTV-PyMT WT-Zellen zeigten ebenfalls eine signifikante Steigerung im Vergleich zum IK KO (Δ Basal-Min $_{(F340/F380)}$: WT $0,067 \pm 0,00$; IK KO $0,039 \pm 0,00$; Abbildung 5.12 C).

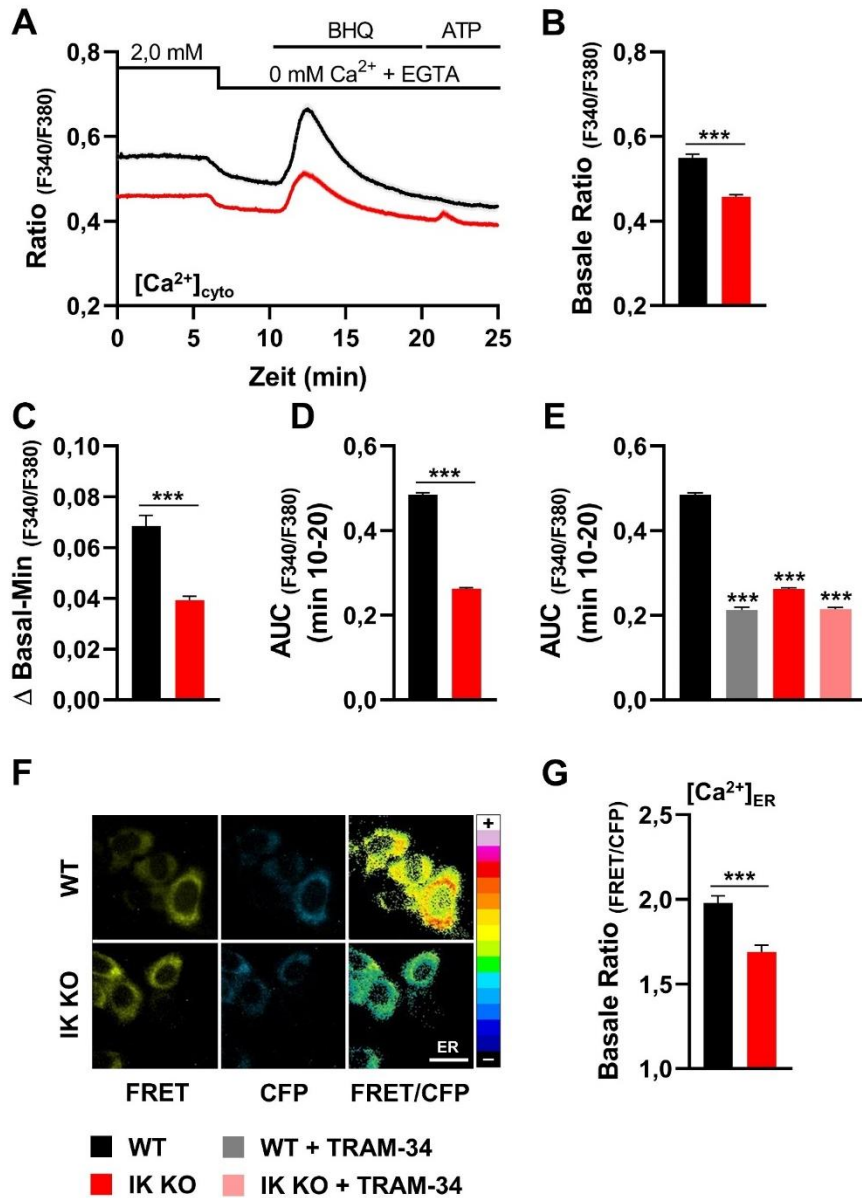


Abbildung 5.12: Einfluss des IK-Kanals auf die cytosolische Ca²⁺-Homöostase und Ca²⁺-Speicherung in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) FURA-2-Ratio ([Ca²⁺]_{cyto}) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu denen im Panel angegebenen Zeitpunkten wurde den Zellen extrazelluläres Ca²⁺ entzogen (0 mM Ca²⁺ + EGTA), der SERCA-Inhibitor BHQ, oder extrazelluläres ATP verabreicht, welches eine intrazelluläre Ca²⁺ Freisetzung stimuliert. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT; N=5 IK KO dar. (B) Basale FURA-2-Ratio (Zeitpunkte 0–5 min (A)) und (C) die Differenz zwischen basaler- und minimaler Ratio nach der Ca²⁺-Deprivation (Zeitpunkte 5–10 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche mit FURA-2 beladen wurden. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** p≤0,001. (D) Die Fläche unter der Kurve (AUC, Zeitpunkte 10–20 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche mit FURA-2 beladen wurden. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** p≤0,001. (E) Die Fläche unter der Kurve (AUC, Zeitpunkte 10–20 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter und lachsfarbener Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot), oder 2 μM TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT ± TRAM-34; IK KO ± TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle ANOVA, *** p≤0,001. (F) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und Ratio-Bilder (pseudo koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten Ca²⁺-Indikator *D1ER*

exklusiv im endoplasmatischen Retikulum (ER) exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μm . (G) Basale FRET-Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *D1ER* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=3 WT; N=3 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (BHQ: 2,5-Di-*t*-butyl-1,4-benzohydroquinone; EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure; SERCA: Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen- und endoplasmatischen Retikulums/ Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase). Modifizierte Grafiken A–G basierend auf (Gross et al., 2022).

Anschließend wurde durch 1,4-Dihydroxy-2,5-di-*tert*-butylbenzen (BHQ) die Sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) blockiert. Als Resultat wurde der Rücktransport von Ca^{2+} in den Haupt- Ca^{2+} -Speicher der Zelle, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) verhindert (Ashby and Tepikin, 2001). Aufgrund des fehlenden extrazellulären Ca^{2+} konnten in der Folge ausgelöste Ca^{2+} -Signale nur aus den intrazellulären Speichern der Zelle stammen. Die AUC bestätigte dabei eine deutliche Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} Speicherkapazität in IK-depletierten Zellen ($\text{AUC}_{(\text{F}_{340}/\text{F}_{380})}$: WT $0,48 \pm 0,07$; IK KO $0,26 \pm 0,03$; Abbildung 5.12 D). Die pharmakologische Inhibition des Kanals mittels TRAM-34 zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion der AUC im Vergleich zum unbehandelten WT (Abbildung 5.12 E). Ergänzend zeigte TRAM-34 keinen stärkeren Effekt auf die AUC in MMTV-PyMT KO-Zellen, als auf die unbehandelte IK KO Kontrolle ($\text{AUC}_{(\text{F}_{340}/\text{F}_{380})}$: WT + TRAM $0,21 \pm 0,04$; IK KO + TRAM-34 $0,21 \pm 0,04$; Abbildung 5.12 E). Da aufgrund von BHQ und Ca^{2+} Deprivation von einem Ca^{2+} Austritt aus dem ER ins Cytosol ausgegangen werden kann, wurde mit Hilfe des FRET-basierten Ca^{2+} -Sensor *D1ER* die Ca^{2+} Konzentration direkt im ER ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) untersucht (Palmer et al., 2004). Repräsentative Bilder des Sensors zeigen die Lokalisation des Sensors im ER (Abbildung 5.12 F), sowie eine veränderte Ratio zwischen den Genotypen (Abbildung 5.12 G). Die Ablation des IKs führte zu einer reduzierten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ($\text{Ratio}_{(\text{FRET}/\text{CFP})}$: WT $1,98 \pm 0,04$; IK KO $1,69 \pm 0,04$; Abb. 5.12 G). Eine anschließende ATP-Applikation (unter Ca^{2+} Deprivation) induzierte keine signifikanten Unterschiede der FURA-2 Ratios (Abbildung 5.12 A) und diente als Kontrolle der BHQ-Behandlung und kompletten Entleerung der (ER-) Speicher.

5.3.3 IK beeinflusst die subzelluläre K^+ -Homöostase

Aufgrund der veränderten $[\text{Ca}^{2+}]$ in IK KO-Zellen (Abschnitt 5.3.1 und 5.3.2) wurde eine Einflussnahme des IK-Kanals vermutet. Da eine direkte Differenzierung des plasmaständigen- und mitochondriellen Kanals (bis *dato*) nicht möglich war, wurden intrazellulären K^+ -Konzentrationen ($[\text{K}^+]$) als Maß für die Einflussnahme des IKs verwendet. Das FRET-Ratio Signal des mitochondriellen, FRET-basierten K^+ -Sensors *mito GEPII 1.0 (Ic-LysM)* (Bischof et al., 2017) korreliert dabei mit der mitochondriellen $[\text{K}^+]$ ($[\text{K}^+]_{\text{mito}}$). Neben der mitochondriellen Lokalisation des Sensors in MMTV PyMT Zellen (Abbildung 5.13 A), wurde zunächst die physiologischen $[\text{K}^+]$ bestimmt (Abbildung 5.13 B, C). Basal verursachte die genetische Ablation des IKs eine deutliche Erhöhung der $[\text{K}^+]_{\text{mito}}$, im Vergleich zum WT ($\text{Ratio}_{(\text{FRET}/\text{CFP})}$: WT $2,26 \pm 0,03$; IK KO $2,55 \pm 0,05$; Abbildung 5.13 C). Entsprechend Abbildung 5.11, zeigte die Applikation von ATP im extrazellulären Messpuffer einen mitochondriellen Ca^{2+} -Influx, was potentiell zur Aktivierung des IKs und nachfolgend zum Einstrom von K^+ in die mitochondrielle Matrix führen kann (Bachmann et al., 2022). Interessanterweise konnte allerdings keine genotypabhängige Veränderung der $[\text{K}^+]_{\text{mito}}$ unter ATP-Stimulation gezeigt werden (Abbildung 5.13 D).

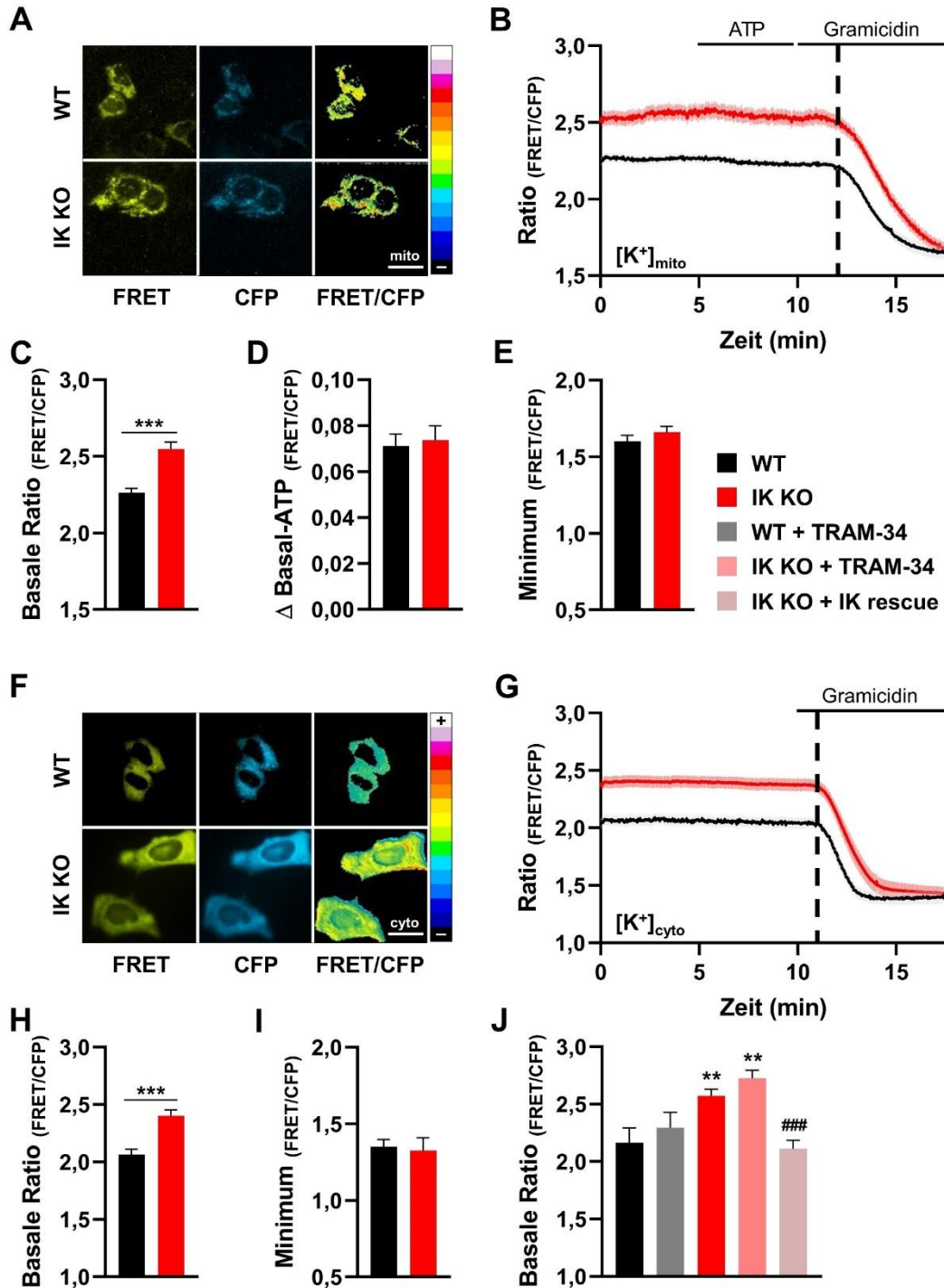


Abbildung 5.13: Einfluss des IK-Kanals auf die mitochondrielle- und cytosolische K^+ -Konzentration in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten K^+ -Indikator *mito GEPII 1.0 (Ic-LysM)* ($[K^+]_{mito}$), exklusiv im Mitochondrium exprimieren. Maßstabsbalken: 20 µm. (B) Zugehörige Ratio ($[K^+]_{mito}$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu denen im Panel angegebenen Zeitpunkten wurde den Zellen extrazellulär ATP, oder das ionophorische Peptid Gramicidin verabreicht. Die schwarz gestrichelte Linie (Zeitpunkt: 12,22 min) indiziert den beginnenden Abfall der Ratio unter Gramicidin. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N=9 IK KO dar. (C) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (B)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *mito GEPII 1.0 (Ic-LysM)* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N=9

IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (D) Differenz der basalen FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (B)) und dem Mittelwert der FRET-Ratio nach Applikation von ATP (Zeitpunkte 5-10 min (B)) in MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *mito GEPII 1.0 (Ic-LysM)* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N=9 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (E) Minimum der FRET-Ratio aus (B) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *mito GEPII 1.0 (Ic-LysM)* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N=9 IK KO dar. (F) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten cytosolischen K^+ -Indikator *cyto GEPII 1.0 (Ic-LysM)* ($[K^+]_{cyto}$), exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μm . (G) Zugehörige Ratio ($[K^+]_{cyto}$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu denen im Panel angegebenen Zeitpunkten wurde den Zellen extrazellulär Gramicidin verabreicht. Die schwarz gestrichelte Linie (Zeitpunkt: 11,13 min) indiziert den beginnenden Abfall der Ratio unter Gramicidin. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. (H) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0–5 min (E)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *cyto GEPII 1.0 (Ic-LysM)* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (I) Minimum der FRET-Ratio aus (G) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *cyto GEPII 1.0 (Ic-LysM)* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (J) Basale FRET-Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter, lachsfarbener und hellroter Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot), 2 μM TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden, oder der IK-Kanal transfiziert wurde (hellrot). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; IK KO; IK KO + IK rescue; N=3 WT + TRAM-34, IK KO + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle ANOVA, ** $p \leq 0,01$ zwischen Genotypen; ### $p \leq 0,001$ zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe. Modifizierte Grafiken A–J basierend auf (Gross et al., 2022).

Die anschließende Behandlung mit dem ionophorischen Antibiotikum Gramicidin konnte einen Efflux von K^+ aus dem Mitochondrium bewirken, was durch einen Abfall der FRET-Ratio ersichtlich wurde. Das letztendliche Minimum nach Gramicidin-Behandlung war in beiden Genotypen unverändert (Abbildung 5.13 E). Diese Versuchsreihe impliziert, dass die basalen Unterschiede der $[K^+]_{mito}$ IK-abhängig sind.

Da der IK-Kanal nicht nur mitochondriell, sondern primär in der Plasmamembran lokalisiert ist, sollte im Folgenden auch die cytosolischen $[K^+]$ sowie deren Wirkung auf die veränderte mitochondrielle K^+ -Homöostase untersucht werden. Durch die Transfektion des cytosolisch lokalisierten K^+ Sensors *cyto GEPII 1.0 (Ic-LysM)* (Bischof et al., 2017) (siehe 4.9.1) konnten Rückschlüsse auf die cytosolische $[K^+]$ ($[K^+]_{cyto}$) gewonnen werden (Abbildung 5.13 F). Analog zur $[K^+]_{mito}$ (Abbildung 5.13 C) waren auch die basalen $[K^+]_{cyto}$ im IK KO erhöht (Ratio_(FRET/CFP): WT $2,07 \pm 0,05$; IK KO $2,40 \pm 0,05$; Abbildung 5.13 G, H). Obwohl die Zellstimulation mit ATP die $[K^+]_{cyto}$ leicht reduzierte (Daten nicht gezeigt), konnten auch hier keine signifikanten, genotyp-abhängigen $[K^+]$ Modulationen detektiert werden. Allerdings induzierte die Behandlung mit Gramicidin einen Abfall der Ratio auf ein gemeinsames Plateau in beiden Genotypen (Abbildung 5.13 E) (Ratio_(FRET/CFP): WT $1,35 \pm 0,05$; IK KO $1,33 \pm 0,08$; Abbildung 5.13 I). Auffällig war ebenso, dass der Beginn des Gramicidin-induzierten $[K^+]$ -Abfalls zuerst im Cytosol (gestrichelte Linie, Abbildung 5.13 G) und nachfolgend im Mitochondrium (gestrichelte Linie, Abbildung 5.13 B) begann.

Durch TRAM-34 wurden tendenziell höhere $[K^+]_{cyto}$ erreicht, wenngleich diese nicht an die des genetischen KOs heranreichten (Ratio_(FRET/CFP): WT + TRAM-34 $2,30 \pm 0,13$; IK KO + TRAM-34 $2,72 \pm 0,07$; Abbildung 5.13 J). *Vice versa* führte die Re-Expression des IK-Kanalproteins in MMTV-PyMT IK KO-Zellen (IK *rescue*) zu einer deutlichen Reduktion der $[K^+]_{cyto}$ (Ratio_(FRET/CFP): IK rescue $2,11 \pm 0,07$; Abbildung 5.13 J).

Zusammengenommen scheint die Ablation des IK-Kanals in einer (erwarteten) Erhöhung der intrazellulären $[K^+]$ zu münden. Der Anstieg von $[K^+]_{mito/cyto}$ wiederum kann, neben anderen hier

nicht untersuchten Faktoren, die veränderte Ca^{2+} -Homöostase im Cytosol und Mitochondrium (Abbildung 5.11) erklären.

5.4 Effekt der IK-Kanalaktivität auf die AMPK

Um die erhöhte $[\text{ATP}]_{\text{cyto}}$ bei reduzierter Ca^{2+} -Homöostase und metabolischen Aktivität in IK KO-Zellen zu erklären, wurde die Adenosinmonophosphat-abhängige-Kinase analysiert. Diese dient in eukaryotischen Zellen als Energiesensor, welcher bei Zellstress, unter Mangel von Wachstumsfaktoren, oder vermindertem Nährstoff- oder Energieangebot aktiviert wird (Hardie et al., 2012). Die AMPK war auch deshalb ein interessanter Biomarker für die Energiehomöostase der Zellen, weil sie neben AMP und ADP, auch eine funktionale Abhängigkeit von Ca^{2+} zeigt. (siehe Abschnitt 1.1.2.3 und Abbildung 1.2 sowie (Hardie et al., 2012)). Aufgrund dessen wurde im Folgenden die Ca^{2+} - und metabolische-Abhängigkeit der Kinase hinsichtlich des IK-Status überprüft.

5.4.1 IK-Depletion steigert die AMPK-Aktivität

Zunächst wurde die Expression und Aktivität der AMPK mittels Western Blot analysiert (Abbildung 5.14 A). Die Quantifizierung der normalisierten Bandenintensitäten zeigte zwischen den Genotypen keine signifikante Erhöhung der gesamten AMPK-Proteinmenge. Das Ausmaß der Phosphorylierung an Thr¹⁷², einer mit der AMPK-Aktivierung korrelierenden Phosphorylierungsstelle, war unter IK-Depletion im Vergleich zu den WT Proteinlysaten gesteigert (Protein/GAPDH: WT $1,00 \pm 0,28$; IK KO $3,36 \pm 0,46$; Abbildung 5.14 B). Das Verhältnis zwischen gesamt- zu phosphoryliertem AMPK-Protein machte das Ausmaß der Phosphorylierung und damit der Aktivitätssteigerung nochmals deutlicher ($\text{Ratio}_{(\text{Protein}/\text{GAPDH})}$: WT $1,04 \pm 0,14$; IK KO $2,19 \pm 0,16$; Abbildung 5.14 C). Des Weiteren konnten die pAMPK/AMPK Ergebnisse durch Behandlung der MMTV PyMT Zellen mit TRAM-34 verifiziert werden (Abbildung 5.14 D). Erneut bestätigte die Quantifizierung eine stabile AMPK-Proteinmenge unter TRAM-34 (Protein/GAPDH: WT $1,00 \pm 0,76$; WT + TRAM-34 $1,07 \pm 0,28$; IK KO $1,43 \pm 0,16$; IK KO + TRAM-34 $1,42 \pm 0,14$; Abbildung 5.14 E), sowie einen signifikanten Anstieg von pAMPK im WT auf das Niveau des genetischen IK KOs (Protein/GAPDH: WT $1,00 \pm 0,04$; WT + TRAM-34 $1,40 \pm 0,07$; IK KO $1,65 \pm 0,21$; IK KO + TRAM-34 $1,43 \pm 0,16$; Abbildung 5.14 E).

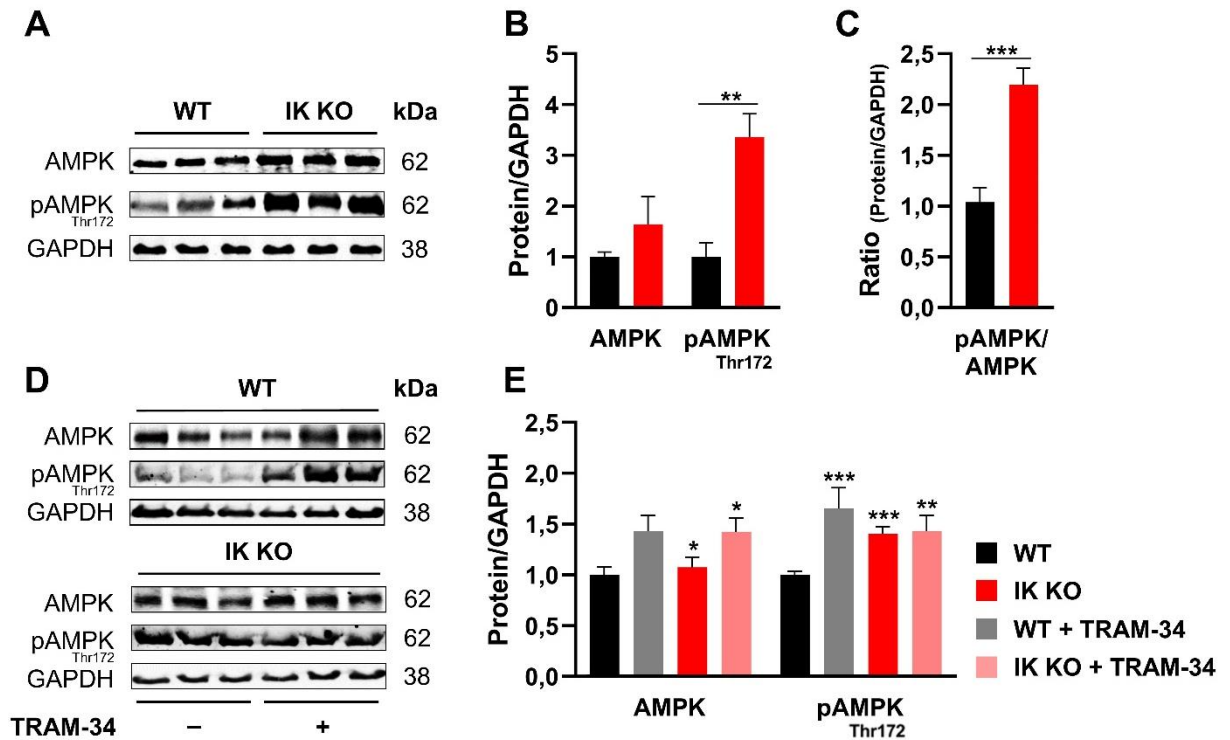


Abbildung 5.14: AMPK-Aktivität unter pharmakologischer-, sowie genetischer Inhibition des IK-Kanals in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Western Blot-Analysen von GAPDH, AMPK und phosphorylierter AMPK (pAMPK) an Thr¹⁷² von Protein-Lysaten aus MMTV-PyMT WT- (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. (B) Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (A) und Normalisierung auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** $p \leq 0,01$. (C) Verhältnis der phosphorylierten AMPK zu den gesamten AMPK-Intensitäten, normalisiert auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (D) Western Blot-Analyse von GAPDH, AMPK und phosphorylierter AMPK an Thr¹⁷² von Protein-Lysaten aus MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts), welche entweder mit DMSO (-), oder 2 μ M TRAM-34 (+) behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. (E) Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (D) und Normalisierung auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter und lachs-farbener Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot), oder 2 μ M TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden. Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT \pm TRAM-34; IK KO \pm TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle ANOVA, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. (AMPK: Adenosinmonophosphat abhängige Kinase; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Modifizierte Grafiken A–E basierend auf (Gross et al., 2022).

5.4.2 Ca²⁺-abhängige Aktivierung der AMPK in MMTV-PyMT Tumorzellen

Die Analyse der Ca²⁺-Abhängigkeit der AMPK, wurde durch einen FRET-basierten, transient transfizierten AMPK-Sensor, *AMPKAR*, adressiert (Tsou et al., 2011). Dieser FRET-basierte Sensor verfügt über eine Bindedomäne (FHA1) und eine Phosphorylierungsstelle (Substrat Peptid) in der Linker-Region der Fluorophore CFP und YFP. Wird AMPK aktiviert, kann diese das Substratpeptid phosphorylieren, was in einer Konformationsänderung und später FRET resultiert (Tsou et al., 2011). Das FRET-Signal des Sensors korreliert entsprechend mit der Phosphorylierungsaktivität der AMPK, was im Folgenden als Aktivitäts-Antwort (AMPK_A)

bezeichnet wird. Repräsentative Aufnahmen der CFP- und FRET-Einzelfluoreszenzintensitäten, sowie der Ratio aus FRET/CFP Fluoreszenz sind in Abbildung 5.15 A aufgeführt. Die Ratio der AMPK_A über die Zeit zeigte Unterschiede in MMTV-PyMT IK KO-Zellen (Abbildung 5.15 B). Die Quantifizierung der basalen AMPK_A-Ratio ergab eine signifikante Steigerung für AMPK_A unter IK-Depletion (Ratio_(FRET/CFP): WT 1,87 ± 0,09; IK KO 2,25 ± 0,11; Abbildung 5.15 C), was die Western Blot Analysen bestätigte (Abbildung 5.14). Analog vorangegangener Versuche (Abbildung 5.11), wurde erneut extrazelluläres ATP appliziert, um über den Ca²⁺-Einstrom die AMPK zu aktivieren. Dabei zeigte weder das Maximum der ATP-induzierten AMPK_A Erhöhung (Abbildung 5.15 B), noch die Aktivität über die Zeit (Abbildung 5.15 D) einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Zwar zeigte sich eine tendenziell schnellere Inaktivierung der AMPK_A FRET-Signale in IK KO-Zellen (Ratio_(FRET/CFP): WT 0,05 ± 0,03; IK KO 0,12 ± 0,05; Abbildung 5.15 D), was allerdings mit der zuvor beobachteten, transient erniedrigten [Ca²⁺], einhergeht (Abbildung 5.11 F). Generell ist allerdings die geringere basale [Ca²⁺] im IK KO nicht mit der hier beobachteten gesteigerten AMPK_A-Level vereinbar. Aufgrund dessen wurden neben der genetischen Ablation des IK-Kanals auch die pharmakologische Blockade und der IK *rescue* untersucht (Abbildung 5.15 E). Im Vergleich zum WT, zeigte die Behandlung mit TRAM-34 eine deutliche Erhöhung der AMPK_A, welche auf das gleiche Niveau wie der IK KO (± TRAM-34) stieg (Ratio_(FRET/CFP): WT 1,75 ± 0,03; WT + TRAM-34 1,97 ± 0,06; IK KO 2,05 ± 0,05; IK KO + TRAM-34 2,07 ± 0,08; Abbildung 5.15 E). Erneut zeigte der *rescue* des IK-Kanals in MMTV-PyMT IK KO-Zellen eine deutliche Reduktion der zuvor erhöhten AMPK_A FRET-Signale (Ratio_(FRET/CFP): IK *rescue* 1,82 ± 0,08; Abbildung 5.15 E). Durch die Re-Expression des IK-Kanals wurde die AMPK Aktivität auf das Level des WTs reduziert (Abbildung 5.15 E), was den Einfluss des IKs auf die AMPK-Aktivität bestätigt.

Weiter konnte die Ca²⁺-Abhängigkeit der AMPK und damit verbunden die Funktionalität des Sensors verifiziert werden. Widersprüchlich schien dabei allerdings, dass niedrigere [Ca²⁺] im IK KO eine erhöhte AMPK_A induzierten. Durch Co-Transfektion mit dem rot fluoreszierenden Ca²⁺-Sensor *Car-GECO1* (Wu et al., 2013), sowie dem *AMPKAR*-Plasmid (AMPK_A) sollte dieser Aspekt durch direkte Korrelation der Ca²⁺-Level mit dem AMPK-Status derselben Zelle untersucht werden (Abbildung 5.16). Zunächst wurden die MMTV-PyMT Zellen unter physiologischen Bedingungen (2,0 mM Ca²⁺) analysiert (Abbildung 5.16 A, D). Dabei zeigte sich erneut eine gesteigerte aber nicht signifikante, basale AMPK_A in IK-depletierten Zellen (Ratio_(FRET/CFP): WT 1,46 ± 0,10; IK KO 1,66 ± 0,10; Abbildung 5.16 B). Zeitgleich konnte durch den Ca²⁺-Sensor erneut eine stark erniedrigte basale [Ca²⁺] im IK KO detektiert werden ([Ca²⁺]_{cyto} in %: WT 12,39 ± 3,54; IK KO 4,66 ± 0,84; Abbildung 5.16 E). Die [Ca²⁺] wurde zur besseren Darstellung in Prozent ([Ca²⁺]_{cyto} in %) angegeben. Die Berechnung erfolgte aus der Differenz der intensimetrischen *Car-GECO1* Ratio-Minima und Maxima (weitere Details siehe Abbildung 5.16).

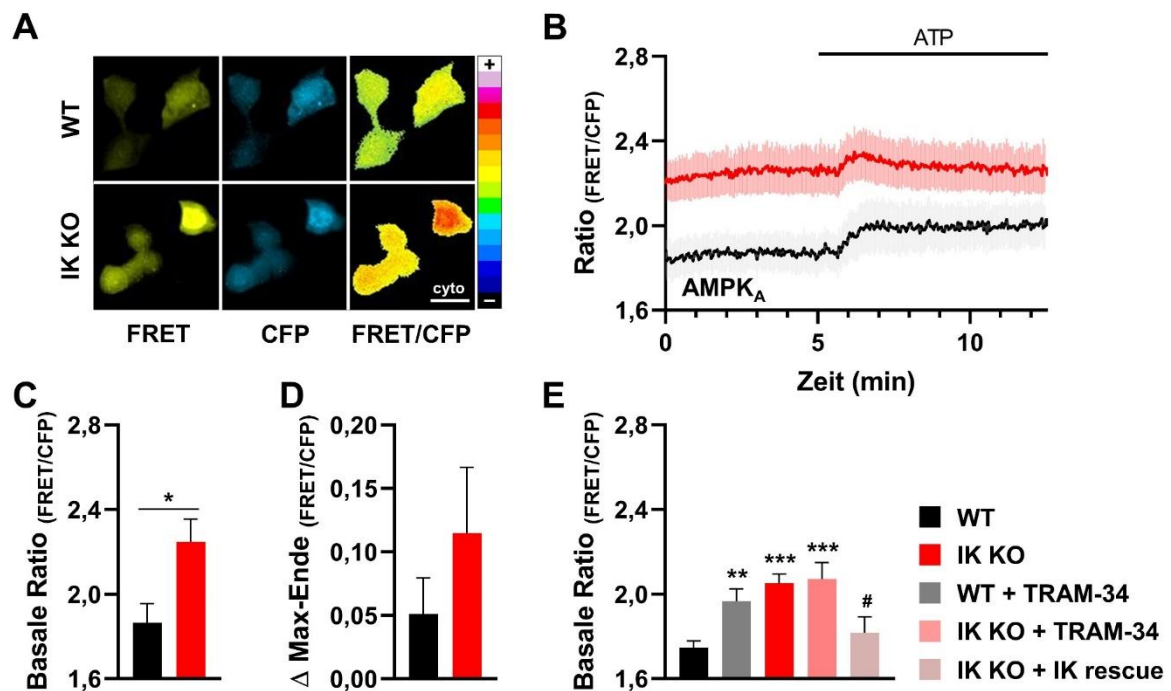


Abbildung 5.15: Einfluss des IK-Kanals auf die Ca^{2+} -abhängige AMPK Aktivität

(A) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten AMPK Aktivitäts-Indikator *AMPKAR* (AMPK Aktivitäts-Antwort: AMPK_A) exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μm . (B) Zugehörige Ratio (AMPK_A) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurde den Zellen extrazellulär ATP verabreicht, welches den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle erhöht. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von $N=5$ WT; $N=5$ IK KO dar. (C) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (B)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *AMPKAR* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von $N=5$ WT; $N=5$ IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, * $p \leq 0,05$. (D) Differenz aus der Ratio des Maximums (Maximum der Zeitpunkte 5-10 min (B)) versus Endpunkt der Messung (Zeitpunkt 12,5 min (B)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *AMPKAR* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von $N=5$ WT; $N=5$ IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (E) Basale FRET-Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter, lachsarbener und hellroter Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot), 2 μM TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden, oder in welche der IK-Kanal transfiziert wurde (hellrot), sowie *AMPKAR* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von $N=5$ WT \pm TRAM-34; IK KO \pm TRAM-34; IK KO + IK rescue dar. Statistische Analyse durch einfaktorielles ANOVA, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ zwischen Genotypen; # $p \leq 0,05$ zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe. (*AMPKAR*: Adenosinmonophosphat-Kinase Aktivitäts-Indikator/ adenosinmonophosphate-kinase activity reporter). Modifizierte Grafiken A–E basierend auf (Gross et al., 2022).

Die anschließende Ca^{2+} -Deprivation führte erneut zu einer starken Reduktion der Ca^{2+} -Level (Vergleich Abbildung 5.12 A), was direkte Auswirkungen auf die AMPK Aktivität haben könnte (Abbildung 5.16 A, D). Während die $[\text{Ca}^{2+}]$ in beiden Genotypen auf das gleiche Plateau sank (Abbildung 5.16 D), zeigten sich dennoch keine Änderungen der AMPK_A FRET-Signale (Abbildung 5.16 A). Im Anschluss sollte durch das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin ein Efflux des Ca^{2+} aus den internen Speichern der MMTV-PyMT Zellen induziert werden. Ionomycin zeigte eine deutliche Ca^{2+} -Spitze in den WT-Zellen, während die Amplitude im IK KOs deutlich geringer ausfiel ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ in %: WT $36,55 \pm 5,50$; IK KO $11,68 \pm 2,04$; Abbildung 5.16 F). Aufgrund der extrazellulären Ca^{2+} Depletion, sowie der EGTA bedingten Komplexbildung von freier Ca^{2+} , war die Amplitude (Minute 10–12; Abbildung 5.16 D) sehr schnell abgefallen. Die zu diesem Zeitpunkt analogen AMPK_A FRET-Signale, zeigten keinen direkten Anstieg in den

MMTV-PyMT Tumorzellen ($\text{Ratio}_{(\text{FRET}/\text{CFP})}$: WT $1,49 \pm 0,11$; IK KO $1,75 \pm 0,11$; Abbildung 5.16 C). Die schnelle Kinetik der Ca^{2+} Komplexierung durch EGTA (Abbildung 5.16 D) könnte die (Ca^{2+} bedingte) Aktivierung der AMPK verhindern und so den fehlenden AMPK_A Anstieg unter Ionomycin erklären. Durch die perforierende Eigenschaft des Ionomycins wurde nach Re-Stimulation mit extrazellulärem Ca^{2+} ein maximaler Ca^{2+} -Influx in die Zellen beobachtet (Abbildung 5.16 D). Zeitgleich resultierte die AMPK-Aktivität in einem gemeinsamen Maximum bei der Genotypen (Abbildung 5.16 A). Durch die Co-Transfektionen konnte die Deletion des IK-Kanals erneut mit einer verstärkten AMPK-Aktivierung korreliert werden ($\text{Ratio}_{(\text{FRET}/\text{CFP})}$: WT $0,49 \pm 0,06$; IK KO $0,34 \pm 0,05$; Abbildung 5.16 C), obwohl parallel intensimetrisch gemessene Ca^{2+} Signale eine Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration implizierten ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ in %: WT $87,61 \pm 3,54$; IK KO $95,35 \pm 0,84$; Abbildung 5.16 F).

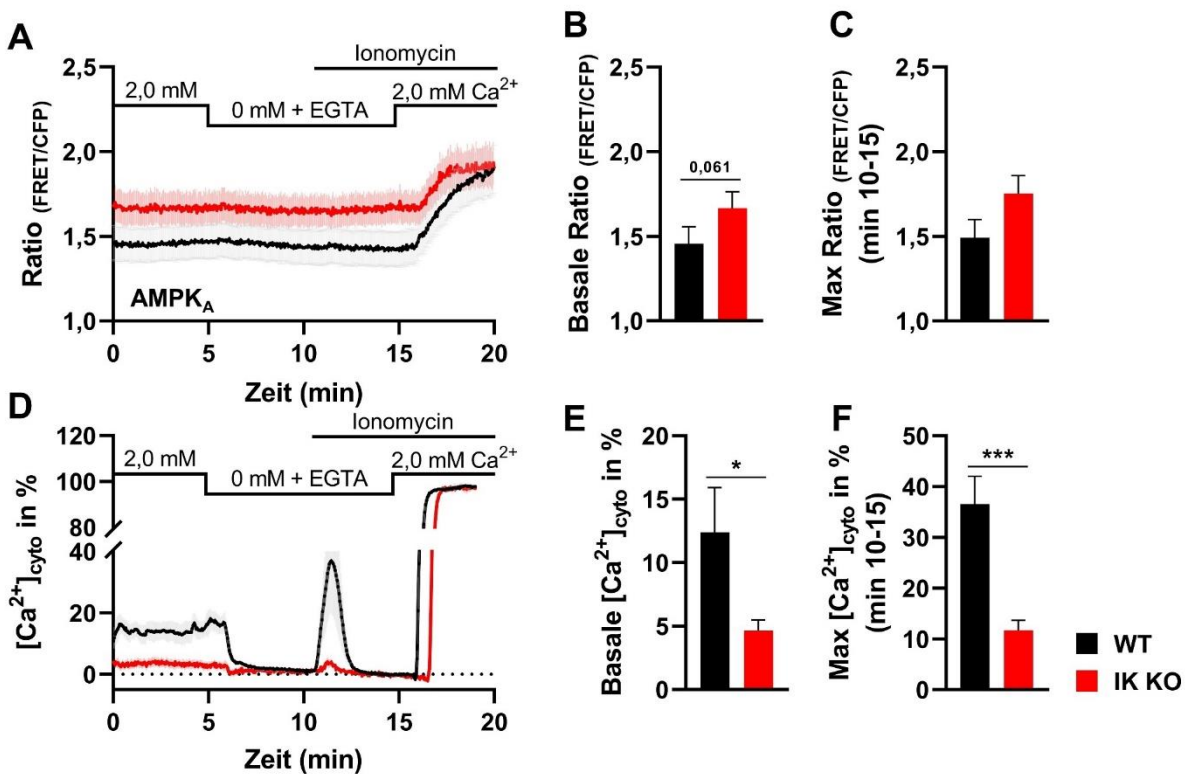


Abbildung 5.16: Simultane Untersuchung des Einflusses von IK auf die Ca^{2+} -Homöostase und AMPK Aktivität

(A) FRET-Ratio (AMPK_A) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie), welche AMPKAR exprimieren. Zu denen im Panel angegebenen Zeitpunkten wurde den Zellen extrazelluläres Ca^{2+} entzogen (0 mM + EGTA), das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin verabreicht, sowie extrazellulär die $[\text{Ca}^{2+}]$ erneut erhöht (2,0 mM). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. (B) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0–5 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche AMPKAR exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (C) Maximale FRET-Ratio unter EGTA + Ionomycin (Maximum der Zeitpunkte 15–20 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche AMPKAR exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (D) Normalisierte Fluoreszenzsignale über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie), welche Car-GECO1 exprimieren, einen rot fluoreszierenden cytosolischen Ca^{2+} -Indikator. Zu denen im Panel angegebenen Zeitpunkten wurde den Zellen extrazelluläres Ca^{2+} entzogen (0 mM + EGTA), das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin verabreicht, sowie extrazellulär die $[\text{Ca}^{2+}]$ erneut erhöht (2,0 mM). Die Daten stellen den Mittelwert von je 5 repräsentativen Aufnahmen \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. (E) Basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ (Zeitpunkte

0–5 min (D)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *Car-GECO1* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, * $p \leq 0,05$. (F) Maximale $[Ca^{2+}]$ in % unter EGTA + Ionomycin (Maximum der Zeitpunkte 15–20 min (D)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *Car-GECO1* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (*Car-GECO1*: Fluoreszenzbasierter cytosolischer Ca^{2+} Indikator; Ionomycin: Ca^{2+} spezifischer Ionophor). Modifizierte Grafiken A, B, D und E basierend auf (Gross et al., 2022).

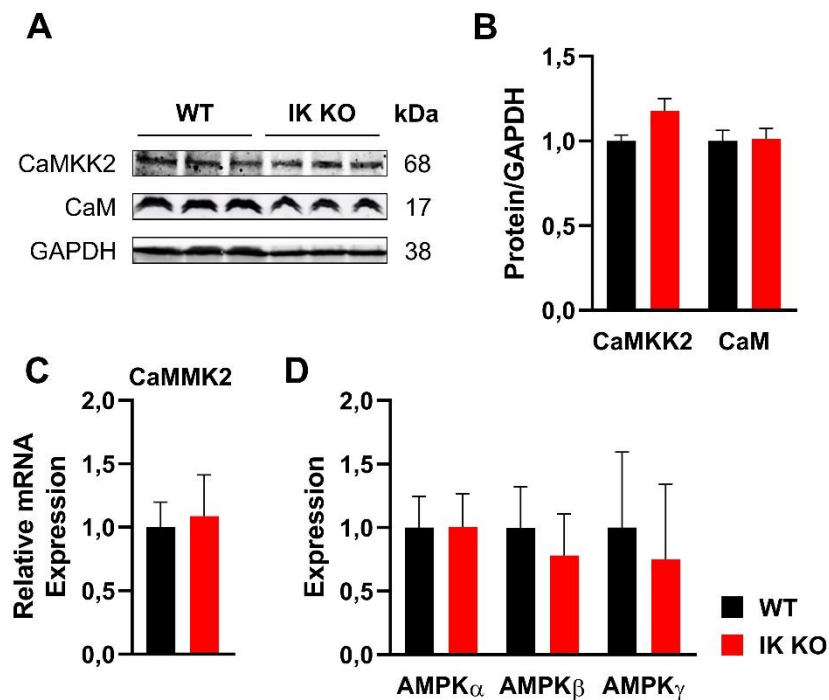


Abbildung 5.17: Expressionsanalyse Ca^{2+} -abhängiger AMPK Upstream-Kinasen in MMTV-PyMT WT und IK KO-Zellen

(A) Western Blot-Analyse von GAPDH, Calmodulin (CaM) und Calmodulin Kinase 2 (CaMKK2) von Protein Lysaten aus MMTV-PyMT WT- (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. (B) Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (A) und Normalisierung auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (C) qPCR-Analyse von CaMKK2 aus cDNA von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=8 WT; N= 9 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (D) qPCR-Analyse von AMPK Untereinheiten α , β und γ aus cDNA von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=7 WT; N= 6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (CaM: Calmodulin; CaMKK2: Calmodulin Kinase 2). Modifizierte Grafiken A–D basierend auf (Gross et al., 2022).

Wie in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt, ist die Phosphorylierung von Thr¹⁷² in der α -Untereinheit der AMPK von CaM und der CaMKK2 (abhängig (siehe 1.1.2.3)). Western Blot Analysen dieser Proteine in MMTV-PyMT Zelllysaten zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und IK KO-Zellen (CaM: Protein/GAPDH: WT $1,00 \pm 0,06$; IK KO $1,01 \pm 0,06$; CaMKK2: Protein/GAPDH: WT $1,00 \pm 0,04$; IK KO $1,18 \pm 0,07$; Abbildung 5.17 B). Auch auf mRNA-Ebene konnten keine Unterschiede der Expressionslevel detektiert werden (Relative mRNA Expression: WT $1,00 \pm 0,19$; IK KO $1,09 \pm 0,32$; Abbildung 5.17 C). Schlussendlich wurden mögliche Expressionsunterschiede der AMPK Untereinheiten

vermutet, welche etwaige Veränderungen der Ca²⁺ Bindedomänen aufzeigen könnten. Dabei zeigten qPCR-Analysen die Expressionslevel der α -, β - und γ -Untereinheiten, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 5.17 D).

Zusammengenommen zeigt sich keine klare Korrelation zwischen verminderten [Ca²⁺] und gesteigerter AMPK-Aktivität im IK KO.

5.4.3 Einfluss der AMPK Aktivität auf den Metabolismus IK-profizienter und -defizienter MMTV PyMT Brusttumorzellen

Neben der Ca²⁺ Abhängigkeit wurden im weiteren Verlauf auch die Auswirkungen eines Energiedefizits (AMP/ADP) auf die AMPK-Aktivität analysiert. Mittels Transfektion des *AMPKAR*-Plasmids wurde zunächst die AMPK_A-Aktivitätsänderung unter 2-Desoxyglukose (2-DG) untersucht. 2-DG wird durch die Hexokinase Isoformen zu 2-DG-6-Phosphat phosphoryliert und verhindert anschließend die Verstoffwechslung durch glykolytische Enzyme (Hellemann et al., 2022). Dieses Glykolyse-Inhibition induzierte ein Energiedefizit, was in einem Anstieg der AMPK-Aktivität in WT und IK KO-Zellen resultierte (Abbildung 5.18 A). Beide Genotypen zeigten dabei ein identisches Maximum (Maximum_(FRET/CFP): WT 2,51 ± 0,04; IK KO 2,57 ± 0,04; Abbildung 5.18 C). Da durch die Behandlung mit 2-DG eine deutliche Abhängigkeit der AMPK von der glykolytischen Aktivität erkennbar war, wurde im Folgenden die mitochondrielle Energieproduktion (OxPhos) untersucht. Durch die Zugabe des F₀F₁-ATP Synthase Inhibitors Oligomycin-A war ebenfalls ein Anstieg der AMPK_A zu beobachten (Abbildung 5.18 D). Das Maximum der AMPK_A FRET-Signale war in beiden Genotypen wieder identisch (Maximum_(FRET/CFP): WT 2,41 ± 0,05; IK KO 2,50 ± 0,06; Abbildung 5.18 F). Die erhöhten basalen AMPK_A Signale (nur IK KO) und identischen Maxima (beider Genotypen) unter Inhibition der metabolischen Aktivität, zeigten somit (I) eine Abhängigkeit der AMPK-Aktivität von der Energiehomöostase, als auch (II) eine erhöhte AMPK_A im IK KO, als Resultat der eingeschränkten Glykolyse und OxPhos (Abbildung 5.4 – Abbildung 5.9).

Neben CaMKK2 ist die Leberkinase 1 (LKB1) primär für die Aktivierung der AMPK verantwortlich. Der Tumorsuppressor LKB1 beschreibt eine Serin/Threonin-Kinase, welche die AMPK bei Zellstress oder unter zellulärem Energiedefizit an Thr¹⁷² phosphoryliert (Boudeau et al., 2004, Lee and Lin, 2018, Willows et al., 2017, Bourouh and Marignani, 2022). Um einem möglichen Einfluss auf die AMPK-Aktivität nachzugehen, wurden die Proteinlevel des gesamten LKB1 Proteins, sowie der phosphorylierten LKB1 (pLKB1) am Serin 428 (Ser⁴²⁸) untersucht (Abbildung 5.19 A). Diese Phosphorylierungsstelle (Ser⁴²⁸) ist essentiell für den nukleären Export der LKB1, die Komplexbildung mit STRAD und Mo25, als auch die Aktivierung der AMPK (Xie et al., 2008). Die Quantifizierung ergab keine Unterschiede im LKB1 Gesamtprotein (LKB1/GAPDH: WT 0,98 ± 0,04; IK KO 1,07 ± 0,04; Abbildung 5.19 B), wohingegen das regulatorische LKB1 Phosphorylierungslevel an Ser⁴²⁸ im IK KO signifikant erhöht wurde (pLKB1/GAPDH: WT 1,00 ± 0,08; IK KO 1,65 ± 0,14; Abbildung 5.19 B). Entsprechend fiel auch das pLKB1 zu LKB1 Proteinintensitätsverhältnis in den IK-defizienten Zelllysaten höher aus als im WT (Ratio_(Protein/GAPDH): WT 1,02 ± 0,07; IK KO 1,54 ± 0,11; Abbildung 5.19 C).

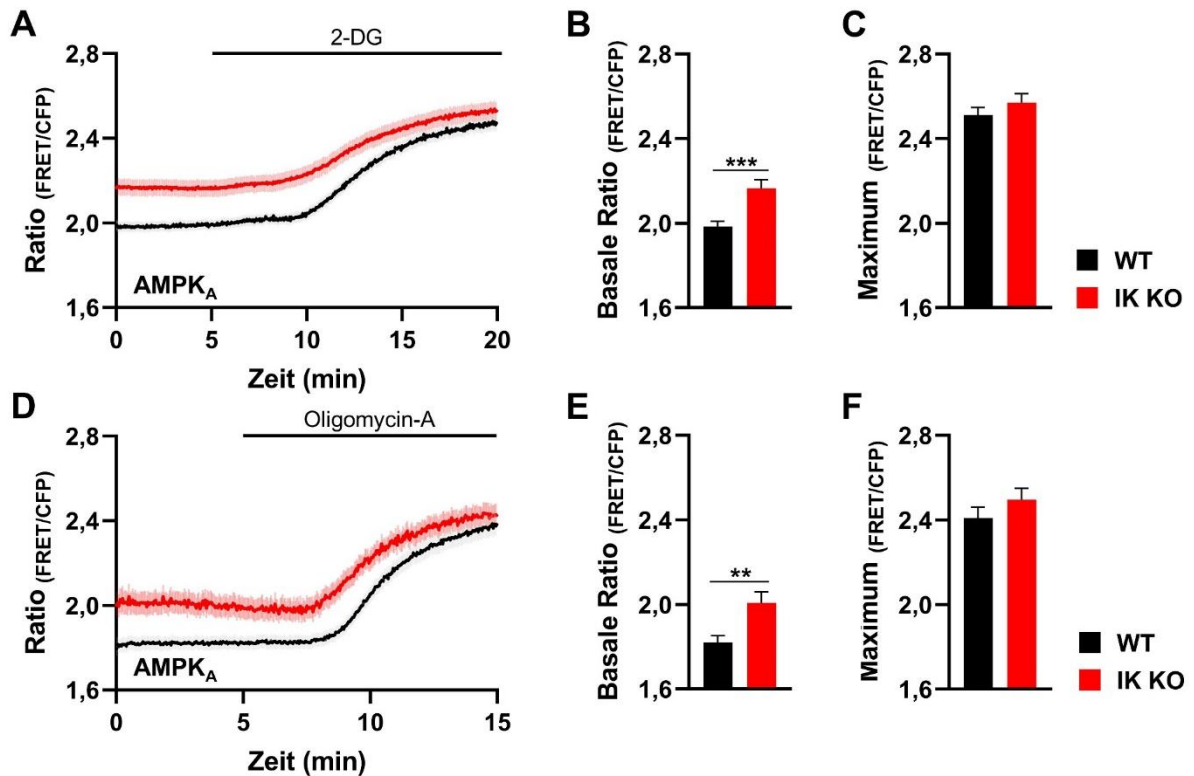


Abbildung 5.18: Metabolischer Einfluss auf die AMPK-Aktivität von MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) FRET-Ratio ($AMPK_A$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie). Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurde den Zellen der Glykolyse-Inhibitor 2-Desoxyglukose (2-DG) verabreicht. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. (B) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche $AMPKAR$ exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** $p \leq 0,001$. (C) Maximale FRET-Ratio (Zeitpunkt 20 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche $AMPKAR$ exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (D) FRET-Ratio ($AMPK_A$) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Linie), welche $AMPKAR$ exprimieren. Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurde den Zellen der F_0F_1 -ATP Synthase Inhibitor Oligomycin-A verabreicht. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. (E) Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche $AMPKAR$ exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** $p \leq 0,01$. (F) Maximale FRET-Ratio (Zeitpunkt 15 min (D)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche $AMPKAR$ exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (2-DG: 2-Desoxyglukose). Modifizierte Grafiken A–F basierend auf (Gross et al., 2022).

Zusammengenommen zeigen diese Versuche, dass die AMPK Aktivität, unabhängig vom IK-Status der MMTV PyMT Zellen, sensitiv auf Störungen der Stoffwechselaktivität reagieren, was letztlich in identischen Maximalaktivitäten der AMPK in IK KO und WT unter 2-DG, sowie Oligomycin-A Bedingungen führt (Abbildung 5.18). Des Weiteren resultierte der IK KO in einer unter basalen Bedingungen höheren $AMPK_A$ Aktivität, deren Ursache mit den höheren regulatorischen LKB1 Phosphorylierungslevel an Serin⁴²⁸ im IK KO in Zusammenhang stehen (Abbildung 5.18).

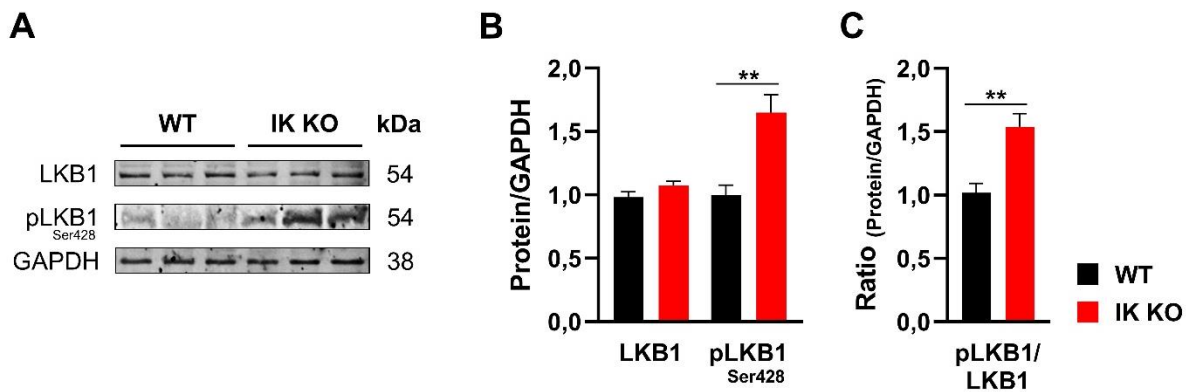


Abbildung 5.19: Aktivitäts-Analyse der AMPK Upstream-Kinase LKB1 in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen

(A) Western Blot-Analyse von GAPDH, LKB1 und Ser⁴²⁸ phosphoryliertem LKB1 (pLKB1) in Protein-Lysaten aus MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts). Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=8 WT; N= 8 IK KO dar. (B) Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (A) und Normalisierung auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** p<0,01. (C) Verhältnis der phosphorylierten LKB1 zu den gesamten LKB1-Intensitäten, normalisiert auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert ± SEM von N=8 WT; N= 8 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** p<0,01. (LKB1: Leberkinase B1). Modifizierte Grafiken A–C basierend auf (Gross et al., 2022).

5.5 Zusammenhang zwischen IK und Autophagie Signalwegen in MMTV-PyMT Brusttumorzellen

Im Folgenden wurde die Rolle des IK-Kanals auf die AMPK abhängige Steigerung von katabolen (energiesparenden) Prozessen, wie der Autophagie untersucht, welche die gesteigerten [ATP]_{cyto} im IK KO erklären kann (Abbildung 5.10).

5.5.1 Gesteigerte Autophagiemarker-Aktivität in IK-depletierten Brustkrebszellen

Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, ist eine direkte Signaltransduktion von der AMPK, über den ULK1-Komplex bis zur Autophagie Induktion möglich. Mechanistisch phosphoryliert die AMPK ULK1 am Serin⁵⁵⁵. Als Folge wird die Bildung und Reifung des Autophagosoms initiiert, an dem maßgeblich die Proteine LC3B und p62 involviert sind (1.1.2.3). Das Phosphatidylethanolamin-konjugierte LC3B II dient dabei als Marker des autophagischen Flux (Initiation, Elongation, Fusion und Degradation). Analog ist p62 essenziell an der Maturation der Autophagosomen beteiligt und wird im Verlauf der Autophagie abgebaut. Durch Western Blot Analysen wurden die Phosphorylierungslevel, bzw. Proteinexpressionen der drei Autophagiemarkerproteine pULK1/ULK1, LC3B und p62 bestimmt.

5.5.1.1 IK beeinflusst pULK1/ULK1-, LC3B- und p62-Status in MMTV-PyMT Brusttumorzellen

Die Gesamtproteinmenge an ULK1 (ULK1/Ladekontrolle: WT $1,00 \pm 0,04$; IK KO $1,13 \pm 0,05$; Abbildung 5.20 B) und an phospho-Serin⁵⁵⁵ ULK1 (pULK1) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den IK-profizienten und -defizienten Proteinlysaten (pULK1/Ladekontrolle: WT $1,00 \pm 0,05$; IK KO $1,76 \pm 0,12$; Abbildung 5.20 B). Insgesamt lag das pULK1/ULK1 Verhältnis im IK KO um ca. 30% höher, als im WT (Ratio_(pULK1/ULK1/Ladekontrolle): WT $0,99 \pm 0,19$; IK KO $1,55 \pm 0,44$; Abbildung 5.20 C).

Der gesteigerten ULK1-Aktivität folgend, zeigten auch die LC3B II-Level im Western Blot eine signifikante Steigerung im IK KO (LC3B II/Ladekontrolle: WT $1,00 \pm 0,11$; IK KO $2,02 \pm 0,16$; Abbildung 5.20 B). Die cytosolische Form LC3B I wies hingegen keine signifikante Erhöhung auf (LC3B I/Ladekontrolle: WT $1,00 \pm 0,18$; IK KO $1,62 \pm 0,42$; Abbildung 5.20 B). Um zu überprüfen inwiefern die LC3B I/II-Level sensitiv auf eine akute IK-Inhibition reagieren, wurden MMTV-PyMT Zellen mit TRAM-34 behandelt (Abbildung 5.20 D). Unter IK-Inhibition (des WT) zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten MMTV PyMT WT-Kontrolle eine signifikante Akkumulation der LC3B II-Level (LC3B II/ α Tubulin: WT $1,00 \pm 0,03$; WT + TRAM-34 $1,66 \pm 0,13$; Abbildung 5.20 E), wohingegen TRAM-34 keine weitere Steigerung des LC3B II im IK KO bewirkte (LC3B II/ α -Tubulin: IK KO $2,08 \pm 0,14$; IK KO + TRAM-34 $1,77 \pm 0,21$; Abbildung 5.20 E).

Ergänzend wurde das Autophagiemarkerprotein p62 analysiert (Puissant et al., 2012). Durch die Degradation von p62 in Autolysosomen sinkt im Verlauf des autophagischen Flux die Proteinkonzentration an p62. Das auch extra-vakulär gebundene LC3B II wird hingegen akkumuliert, weswegen p62 invers zu LC3B II in Western Blot Analysen detektiert wird (siehe Abschnitt 1.1.2.3). In der Tat war ein signifikanter Rückgang der p62 Abundanz in den IK KO versus WT Proteinlysaten erkennbar (p62/Ladekontrolle: WT $1,00 \pm 0,06$; IK KO $0,60 \pm 0,03$; Abbildung 5.20 B). TRAM-34 behandelte MMTV-PyMT WT zeigten, wie der unbehandelte IK KO eine Depletion von p62, wohingegen p62 im IK KO + TRAM-34 nicht beeinflusst wurde (p62/Ladekontrolle: WT $1,00 \pm 0,21$; WT + TRAM-34 $0,40 \pm 0,01$; IK KO $0,43 \pm 0,01$; IK KO + TRAM-34 $0,33 \pm 0,04$; Abbildung 5.20 E). Die Western Blot Analysen von ULK1, LC3B und p62 bestätigten einen klaren Anstieg der Autophagie in IK-depletierten MMTV-PyMT Zellen.

Die Fusion von Lysosomen mit Autophagosomen während des autophagischen Flux, sowie die Ansäuerung der Hydrolasen (über die V-ATPase) sind essentiell für die nachfolgende Degradation. Als Folge der Ansäuerung wird in Autolysosomen ein niedrigerer pH-Wert gemessen, welcher mit einer gesteigerten Autophagie korreliert (Burgstaller et al., 2019). Um die Ansäuerung der Kompartimente vor dem Hintergrund des IK-Status der MMTV-PyMT Zellen zu überprüfen, wurde ein an LC3B gekoppelter FRET-basierter pH-Sensor (*pH lemon-LC3B*, pH_{LC3B}) eingesetzt (Abbildung 5.21 A) (Burgstaller et al., 2019). Repräsentative Aufnahmen bestätigten die entsprechende Distribution und Expression des Sensors, der durch Zunahme der CFP-Intensität (weniger FRET) saurere pH-Werte anzeigt (Abbildung 5.21 A). In Übereinstimmung mit der LC3B II Anreicherung (Abbildung 5.20) war der pH in den auto-/lysosomalen Kompartimenten der IK KO-Zellen signifikant niedriger (Ratio_(CFP/FRET): WT $0,49 \pm 0,01$; IK KO $0,59 \pm 0,03$; Abbildung 5.21 B) als im WT.

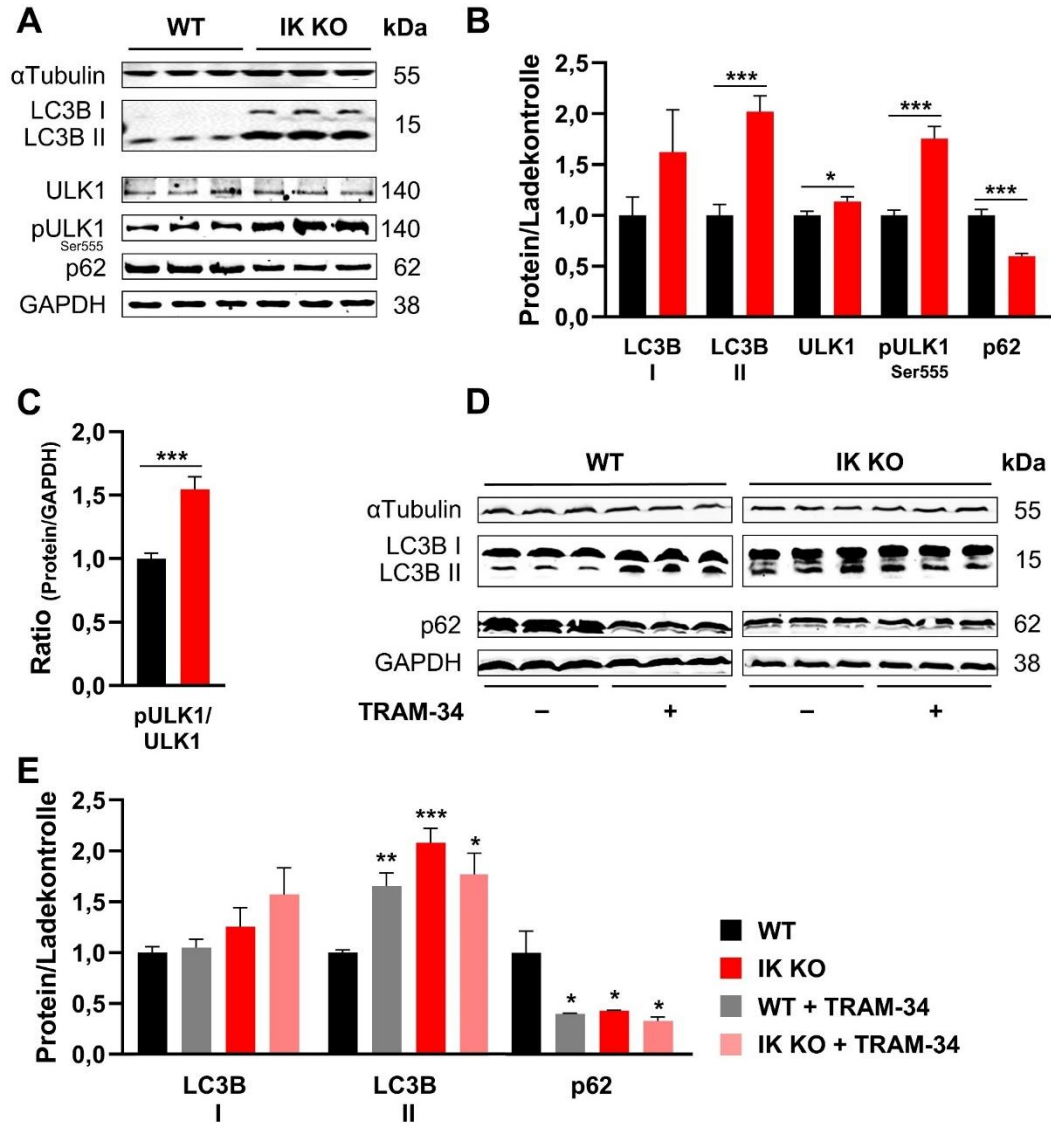


Abbildung 5.20: Auswirkungen der IK-Inhibition auf die Autophagie Induktion in MMTV-PyMT Tumorzellen
(A) Western Blot-Analyse von αTubulin, LC3B (I und II), ULK1, phosphoryliertem ULK1 (pULK1) am Ser⁵⁵⁵, P62 und GAPDH von Protein-Lysaten aus MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts). Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. **(B)** Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (A) und Normalisierung von ULK1, pULK1 und P62 auf GAPDH, sowie LC3B (I und II) auf αTubulin, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, * p<0,05; *** p<0,001. **(C)** Zeigt das Verhältnis von pULK1 zur gesamten ULK1-Intensität, normalisiert auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** p<0,001. **(D)** Western Blot-Analyse von αTubulin, LC3B (I und II), P62 und GAPDH von Protein Lysaten aus MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts), welche entweder mit DMSO (-), oder 2 μM TRAM-34 (+) behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 für WT ± TRAM-34; IK KO ± TRAM-34 (Ausnahme P62/GAPDH: N=4 für WT ± TRAM-34; IK KO ± TRAM-34) dar. **(E)** Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (D) und Normalisierung von P62 auf GAPDH, sowie LC3B (I und II) auf αTubulin, von MMTV-PyMT WT- (schwarzer und grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter und lachsarbener Balken), welche entweder mit DMSO (schwarz und rot), oder 2 μM TRAM-34 (grau und lachsfarben) behandelt wurden. Die Balken stellen den Mittelwert ± SEM von N=6 WT ± TRAM-34; IK KO ± TRAM-34 (Ausnahme p62/GAPDH: N=4 WT ± TRAM-34; IK KO ± TRAM-34) dar. Statistische Analyse durch einfaktorielle ANOVA, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. (LC3B: Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1A/1B leichte Kette 3B; P62: Ubiquitin-bindendes Protein P62; ULK1: Unc-51-like Kinase 1). Modifizierte Grafiken A–E basierend auf (Gross et al., 2022).

Im weiteren Verlauf sollte nun der direkte Einfluss eines Nährstoff- (und Wachstumsfaktor-) Mangels, sowie der Einfluss des IK-Kanals auf den autophagischen Flux überprüft werden. Ziel des Experiments war einerseits (I) eine Korrelation des eingeschränkten Metabolismus (im IK KO) und der Autophagie aufzuzeigen, als auch (II) zwischen hochreguliertem autophagischen Flux oder Inhibition der lysosomalen Fusion (im IK KO) zu differenzieren. Mittels Western Blot Analysen wurden die LC3B I/II-Level unter Nährstoffmangel (EBSS, I) oder Inhibition der Fusion (Bafilomycin A1, II) untersucht (Abbildung 9.3 A). (I) EBSS (*Earles Balanced Salt Solution*) induzierte im extrazellulären Milieu einen Mangel an essentiellen Mineralstoffen und Wachstumsfaktoren (Serum). Wie in Abbildung 1.2 gezeigt resultiert ein Nährstoff-/Serummangel in der Aktivierung der AMPK und folglich der Autophagie. Die Quantifizierung der normalisierten Bandenintensitäten resultierte unter EBSS in signifikant erhöhten LC3B II-Leveln des IK KO im Vergleich zum WT, sowie im Vergleich zur Kontrollgruppe (IK KO in Zellkulturmedium + Serum) (LC3B II/ α Tubulin: WT $1,13 \pm 0,02$; IK KO $2,10 \pm 0,05$; Abbildung 9.3 B, +EBSS). Die LC3B I-Level blieben in beiden Genotypen unverändert (Abbildung 9.3 B). Diese Ergebnisse offenbarten einen direkten Einfluss des Metabolismus (Nährstoff-/Serummangel) auf die Autophagie (Zhu et al., 2017).

(II) Bafilomycin A1 ist ein Inhibitor der V-ATPase, welcher im späteren Verlauf des autophagischen Flux die Fusion und die Ansäuerung der Lysosomen verhindert, was zu einer Akkumulation des LC3B II führt. Durch die Behandlung mit Bafilomycin A1 konnte der IK-spezifische Anstieg des LC3B II (Abbildung 9.3 B, Kontrolle) zusätzlich signifikant erhöht werden (LC3B II/ α Tubulin: WT $0,90 \pm 0,13$; IK KO $1,66 \pm 0,08$; Abbildung 9.3 B, +Bafilomycin A1). Diese gesteigerte Akkumulation des LC3 II implizierte eine Erhöhung der Autophagie und keine Blockade der Degradation, als Folge der IK Ablation. Eine Kombination aus EBSS und Bafilomycin A1 zeigte dagegen keinen synergistischen Effekt auf die LC3B II Akkumulation im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen (LC3B II/ α Tubulin: WT $1,23 \pm 0,08$; IK KO $1,99 \pm 0,12$; Abbildung 9.3 B). Auffällig und momentan unverstanden ist hingegen die ausbleibende Wirkung von Bafilomycin A1 (und EBSS) bzgl. LC3B II in MMTV PyMT WT Zellen (Abbildung 9.3 B).

Analog des vorangegangenen Behandlungsschemas wurden auch p62 Immunfluoreszenzfärbungen (p62 Multiplex, Abbildung 5.22) durchgeführt. Die Anzahl an p62-*Puncta* pro Zelle wurde mittels der CellProfiler Software quantifiziert. Repräsentative Bilder der IF-Färbungen, sowie CellProfiler Analyse sind in Abbildung 5.22 A und C aufgeführt. Die Quantifizierung des Kontroll-Panels zeigte, analog der Western Blot Analysen (Abbildung 5.20), eine deutliche Reduktion der *Puncta* in den MMTV-PyMT IK KO-Zellen (p62 *Puncta*/Zelle: WT $5,09 \pm 0,50$; IK KO $3,58 \pm 0,27$; Abbildung 5.22 B). (I) Die Nährstoff-/Serum-Deprivation mittels EBSS sorgte für eine signifikante Reduktion der p62 *Puncta* im Vergleich zur Kontrolle in beiden Genotypen (p62 *Puncta*/Zelle: WT $3,03 \pm 0,24$; IK KO $2,71 \pm 0,17$; Abbildung 5.22 D). (II) Unter Bafilomycin A1 wurde hingegen nur eine signifikante Reduktion der *Puncta* im IK KO detektiert (p62 *Puncta*/Zelle: WT $4,64 \pm 0,42$; IK KO $2,17 \pm 0,19$; Abbildung 5.22 D). Die Kombination aus EBSS und Bafilomycin A1 sorgte lediglich tendenziell für eine Reduktion der p62 *Puncta*/Zelle (Abbildung 5.22 D). Die IF-Färbungen des Autophagiemarkerproteins p62 korrelieren mit den LC3B II Western Blot Analysen (Abbildung 9.3) unter EBSS oder Bafilomycin A1 Behandlung und bestätigen folglich dessen Ergebnis einer metabolischen Abhängigkeit der Autophagie.

Zusammengenommen konnte durch Western Blot Analysen, IF-Färbungen, sowie dem Einsatz FRET-basierter Sensoren (Abbildung 5.20–Abbildung 5.22 und Abbildung 9.3) ein klarer Einfluss der MMTV-PyMT IK KO-Zellen auf die Autophagie gezeigt werden.

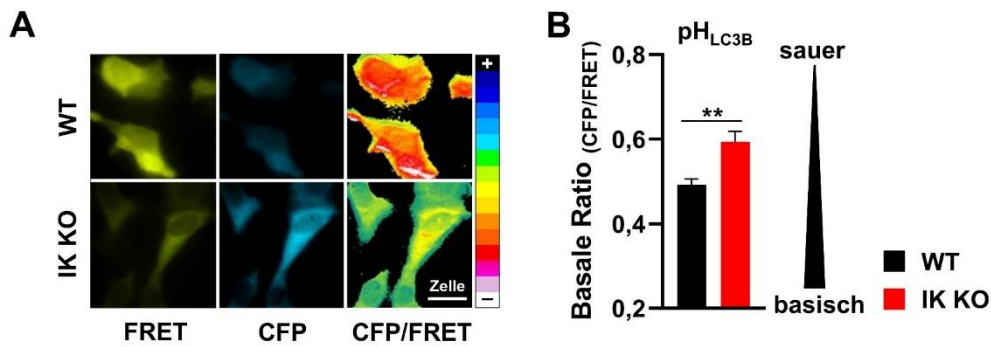


Abbildung 5.21: LC3B-gekoppelte pH Änderungen in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen

(A) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und FRET-Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten LC3B-gekoppelten pH-Indikator *pH lemon-LC3B* (pH_{LC3B}) exprimieren. Maßstabsbalken: 20 µm. (B) Basale FRET-Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *pH lemon-LC3B* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=3 WT; N=3 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** p≤0,01. (CFP: cyan fluoreszierendes Protein; FRET: Förster Resonanz Energie Transfer; pH-Lemon LC3B: LC3B-gekoppelter FRET-basierter pH-Indikator; SEM: Mittelwert der Standardabweichung/ Standard error of mean). Modifizierte Grafiken A und B basierend auf (Gross et al., 2022).

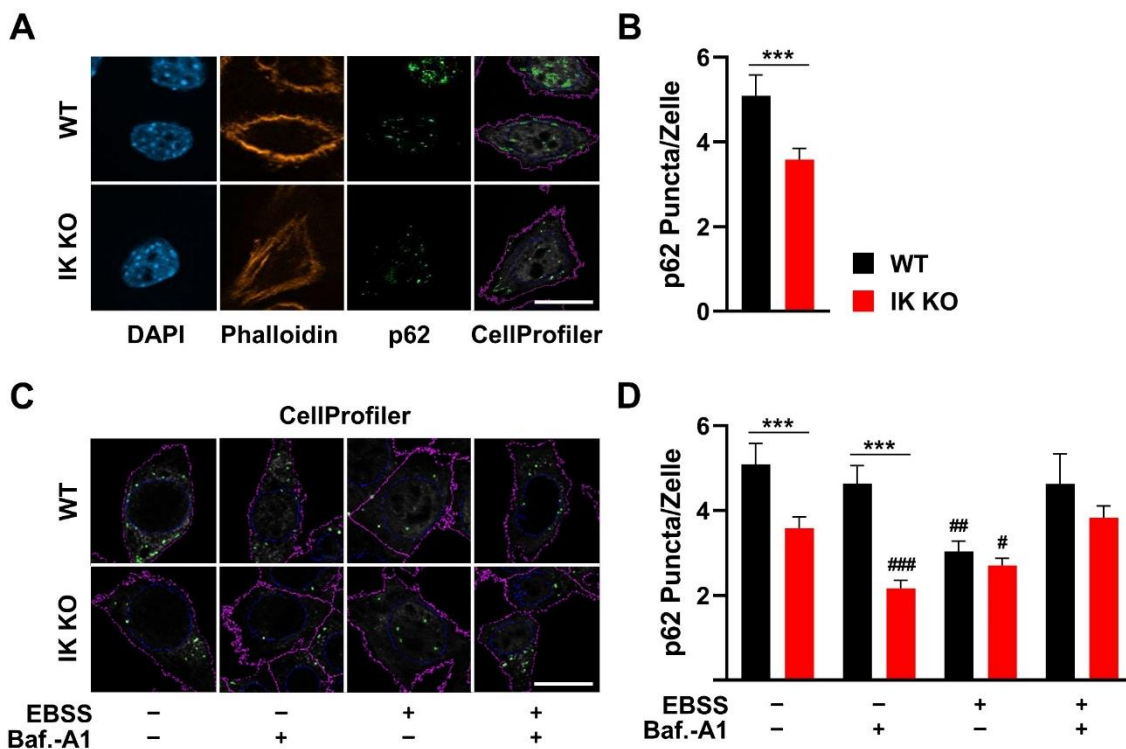


Abbildung 5.22: Expressionsanalyse von p62 in MMTV-PyMT WT und IK KO-Zellen

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung (IF) von DAPI (blau, links), Phalloidin (orange, Mitte links), p62 (grün, Mitte rechts) und (pseudo-) überlagerte *CellProfiler*-Aufnahmen (pseudo-koloriert durch *CellProfiler* Software, rechts) von MMTV-PyMT WT (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO (untere Reihe). Maßstabsbalken: 10 µm. (B) Quantifizierung der p62-Puncta pro Zelle von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=4 WT; N=4 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** p≤0,001. (C) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung (IF) von (pseudo-) überlagerten *CellProfiler*-Aufnahmen von MMTV-PyMT WT (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO (untere Reihe), welche entweder nicht behandelt wurden, oder mit EBSS, Bafilomycin A1 oder einer Kombination aus EBSS und Bafilomycin A1 behandelt wurden. Maßstabsbalken: 10 µm. (D) Quantifizierung der p62-Puncta pro Zelle von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken), analog zu in Panel (C) gezeigten

Behandlungen. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 für WT \pm Behandlung; IK KO \pm Behandlung (Ausnahmen N=3 für EBSS + Bafilomycin A1) dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA, *** $p \leq 0,001$ zwischen Genotypen; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ zwischen Kontrolle und jeweiliger Behandlung. Modifizierte Grafiken A–D basierend auf (Gross et al., 2022).

5.5.2 Einfluss des IK-Kanals auf den AKT- und mTORC1-Signalweg

Neben der AMPK gilt auch mTORC1 als Energie-Sensor der Zelle. Darüber hinaus fungiert mTORC1 als Schlüsselprotein bei der Proliferation, Autophagie sowie der Tumorentstehung. Bislang ist ein Bezug zwischen dem mTORC1 Signalweg und IK-abhängigen Mechanismen für die Initiation der Autophagie jedoch unklar (Inoki et al., 2012). Neben mTORC1, das den ULK1-Komplex über Phosphorylierung an Serin⁷⁵⁷ inhibiert (Kim et al., 2011) und somit die Autophagie-Induktion behindert, spielt auch der PI3K/AKT-Signalweg eine bedeutsame Rolle bei Zellstress. Unter diesen Bedingungen stimuliert entweder PI3K oder ein Mangel an Wachstumsfaktoren, die AKT-Aktivität (siehe Abbildung 1.2). AKT kann nun entweder über Hamartin (TSC1)/Tuberin (TSC2) oder direkt mTORC1 signalisieren und folglich die Autophagie-Induktion inhibieren (1.1.2.3). Die Aktivität von mTORC1 und AKT wurde deswegen mittels FRET-Aktivitäts-Indikatoren in MMTV-PyMT Zellen überprüft. Repräsentative Aufnahmen zeigen die Einzelintensitäten von CFP und FRET, sowie die Ratio aus FRET/CFP bzw. CFP/FRET des exprimierten *AKTAR*-Plasmids (AKT_A) (Gao and Zhang, 2008) und des *mTORC1AR*-Plasmids ($mTORC1_A$) (Zhou et al., 2015) (Abbildung 5.23 A, C). Interessanterweise ergab die Quantifizierung der basalen AKT_A -Level keine Unterschiede zwischen den Genotypen ($Ratio_{(FRET/CFP)}$: WT $1,21 \pm 0,06$; IK KO $1,34 \pm 0,11$; Abbildung 5.23 B). Ergänzend zeigten auch Western Blot Analysen der Gesamtproteinmenge (AKT/GAPDH: WT $1,00 \pm 0,03$; IK KO $1,27 \pm 0,14$) und der an Serin⁴⁷³ phosphorylierten AKT (pAKT) keine Unterschiede (pAKT/GAPDH: WT $1,00 \pm 0,03$; IK KO $1,36 \pm 0,15$; Abb. 9.4 B), was auch durch die Ratio von pAKT/AKT bestätigt wurde ($Ratio_{(pAKT/AKT/GAPDH)}$: WT $0,96 \pm 0,04$; IK KO $0,98 \pm 0,04$; Abbildung 9.4 C). Auch die Analyse des mTORC1-Indikators zeigte keine Unterschiede in der FRET-Ratio zwischen IK KO und WT ($Ratio_{(CFP/FRET)}$: WT $0,43 \pm 0,02$; IK KO $0,49 \pm 0,06$; Abbildung 5.23 D). Zusammenfassend konnte der Einfluss von (PI3K)/AKT und mTORC1 auf die IK-abhängige Aktivierung der Autophagie ausgeschlossen werden.

5.5.3 Einfluss von Zytostatika auf die Autophagie und das Proliferationsverhalten von MMTV-PyMT WT und IK KO-Zellen

Ob und inwiefern die IK-induzierte Autophagiesteigerung einen therapeutischen Nutzen hat, wurde durch die Applikation verschiedener Zytostatika untersucht. Aufgrund der ambivalenten Rolle der Autophagie in Tumoren (Abschnitt 1.1.2.3) (Apel et al., 2009, Chavez-Dominguez et al., 2020), ist dessen Rolle in der Chemotherapie allerdings umstritten. Da einige Zytostatika (z.B. Doxorubicin) ebenfalls Induktoren der Autophagie sind (Liu et al., 2016a), kann eine Behandlung zu Zellstress führen, was autophagievermittelt zu einer Verminderung der cytotoxischen Wirkung der Chemotherapeutika führt und dadurch zur Therapieresistenz beiträgt. Auf der anderen Seite kann die Zytostatika-vermittelte Induktion der Autophagie zur Apoptose und damit zu einer stärkeren anti-tumoralen Wirksteigerung führen (Liu et al., 2016a). Als Marker der IK- oder Autophagie-abhängigen Chemotherapie, dienten erneut Proliferations-Assays (Grid; Ki-67, analog 5.1.2). Behandelt wurden MMTV-PyMT Tumorzellen mit den etablierten Brustkrebs-Zytostatika Cyclophosphamid, Docetaxel, Doxorubicin und 5-Fluorouracil (5-FU) (Abbildung 9.5 – Abbildung 9.6).

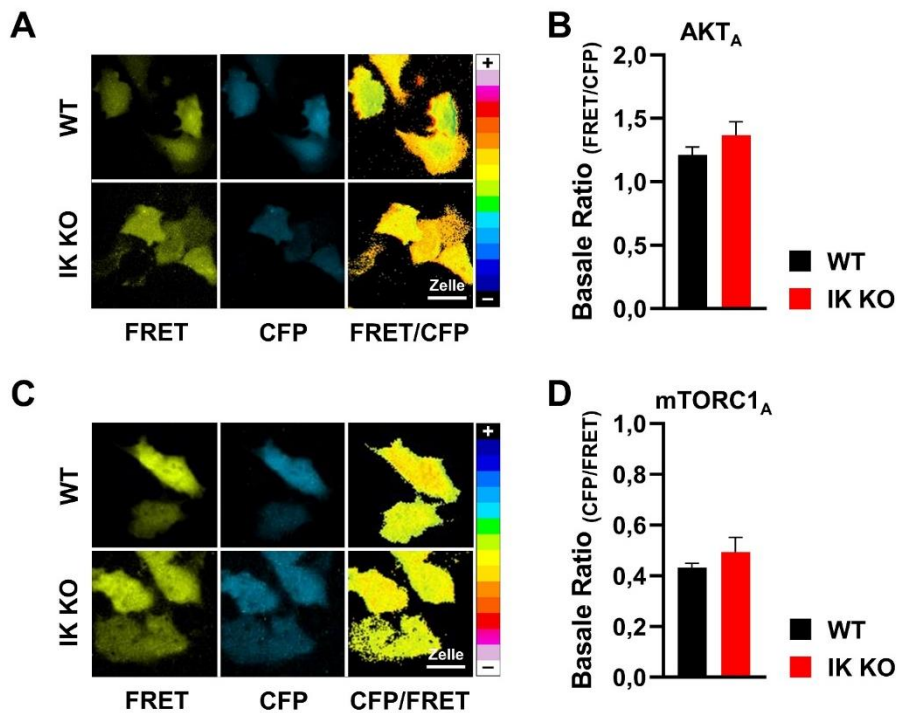


Abbildung 5.23: Einfluss des IK-Kanals auf den AKT- oder mTORC1-Signalweg in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten AKT Aktivitäts-Antwort Indikator *AKTAR* (AKT_A) exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μ m. (B) Basale FRET-Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *AKTAR* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (C) Repräsentative FRET- (gelb, links), CFP- (cyan, Mitte) und Ratio-Bilder (pseudo-koloriert, rechts) von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (untere Reihe), welche den FRET-basierten mTORC1 Aktivitäts-Antwort Indikator *mTORC1AR* ($mTORC1_A$) exprimieren. Maßstabsbalken: 20 μ m. (D) Basale FRET-Ratio von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (roter Balken), welche *mTORC1AR* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (AKTAR: FRET-basierter AKT (Proteinkinase B) Aktivitäts-Indikator/ AKT activity reporter; mTORC1AR: FRET-basierter mTORC1 (mechanistisches Ziel von Rapamycin-Komplex 1/ mechanistic target of rapamycin complex 1) Aktivitäts-Indikator/ mTORC1 activity reporter). Modifizierte Grafiken A–D basierend auf (Gross et al., 2022).

Die Behandlung mit Cyclophosphamid zeigte eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation im Grid-basierten Assay (Abbildung 9.5 A) und des Ki-67 Index (Abbildung 9.5 B), jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Die pharmakologische Co-Applikation von TRAM-34 führte in MMTV PyMT WT-Zellen zu einer verminderten Wirksamkeit des Zytostatikums auf die Proliferation im Vergleich zum unbehandelten WT (Abbildung 9.6 A). Dieser TRAM-34-Effekt wurden in den Ki-67 Färbungen allerdings nicht verifiziert (Abbildung 9.6 B).

Unter Docetaxel wurden in beiden Genotypen stärkere dosisabhängige Effekte auf das Zellwachstum und den Ki-67 Index beobachtet, als unter Cyclophosphamid (Abbildung 9.5 C). Interessanterweise zeigten sich WT-Zellen hierbei sensitiver, was sich für einige Wirkstoffkonzentrationen in einer teilweise signifikanten Reduktion der Proliferation im Grid-Assay äußerte. Diese dosisabhängige Verminderung des Wachstums konnte durch den Ki-67 Index bestätigt werden, wenngleich Docetaxel keine signifikante Änderungen zwischen den Genotypen zeigte

(Abbildung 9.5 D). Analoge Versuche in MMTV-PyMT WT-Zellen mit TRAM-34 führten zu fast identischen Resultaten (Abbildung 9.6 C, D).

Unter Doxorubicin-Behandlung konnte sowohl im genetischen IK KO (Abbildung 9.5 E, F), als auch unter pharmakologischer Inhibition (Abbildung 9.6 E, F) ein konzentrationsabhängiger, aber kein mit dem Genotyp korrelierender, Effekt auf das Zellwachstums nachgewiesen werden.

Ähnliche Effekte wurden auch bei Behandlung der Zellen mit 5-FU beobachtet. Sowohl die relative Proliferation im Grid-Assay (Abbildung 9.5 G, Abbildung 9.6 G) als auch der Ki-67 Index (Abbildung 9.5 H, Abbildung 9.6 H) der MMTV PyMT Zellen zeigte sich klar sensitiv gegenüber 5-FU. Im Vergleich der Genotypen ergaben sich jedoch für keine der untersuchten 5-FU Konzentrationen signifikanten Effekte.

Zusammengefasst zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählten Zytostatika dosisabhängige Effekte auf die Proliferation bzw. das Zellüberleben. Inwiefern der IK-Status der Zellen oder IK-abhängige Effekte auf den autophagischen Flux die Chemosensitivität der MMTV PyMT Zellen beeinflussen, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Insbesondere die Ergebnisse zu Docetaxel und Doxorubicin (Abbildung 9.5 und Abbildung 9.6) sind aber vielversprechend und rechtfertigen zukünftig eine Erweiterung der hier durchgeführten Chemosensitivitätstests.

6 Diskussion

Laut statistischem Bundesamt zählen maligne Neubildungen zu den zweit häufigsten Todesursachen in Deutschland (Stand 2022). Platz eins der Tumorentitäten belegt bei den Frauen das Mammakarzinom. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei 70.000/Jahr mit einer sehr hohen Mortalitätsrate von 18.400/Jahr (Stand 2018) (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Trotz unterschiedlichster Therapieansätze kommt es immer wieder zur Resistenz- und Rezidivbildung (Nagini, 2017). Aufgrund dessen ist es von größter Bedeutung, neue Zielproteine zu finden, welche die Chemoresistenz umgehen, die Wirkung anderer Therapeutika verstärken, oder selbst die Tumorentwicklung stoppen können. Grundlage der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist die Erforschung der patho-/physiologischen Mechanismen einer Krebszelle. Dabei werden etwaige Unterschiede zwischen Tumor- und gesunden Zellen aufgedeckt, um diese als Angriffsziel (*Target*) nutzen zu können. Einige *Targets*, wie zum Beispiel HER2, VEGF oder Estrogenrezeptoren werden bereits klinisch genutzt und sind in Leitlinientherapien verankert (Cancer-Research-UK, 2020). Ein weiteres Zielprotein ist mTORC1. Dieses zeigte neben einer anti-proliferativen Wirkung über die *Downstream*-Proteine 4EBP1 und S6K1, auch Einfluss auf den Energiemetabolismus, welcher in Tumorzellen durch spezifische *Remodeling*-Prozesse erhöht ist (Masoud and Pages, 2017, Bhaskar and Hay, 2007, Deleyto-Seldas and Efeyan, 2021, Harris, 2013, Warburg et al., 1927, Zhang and Yang, 2013). Auch Ionen-Kanäle nehmen Einfluss auf die Tumorgenese. Durch ihre ubiquitäre Distribution und vielseitigen (patho-)physiologischen Eigenschaften können pro-proliferative und -tumoröse Prozesse gefördert werden (Kunzelmann, 2005). Besonderer Bedeutung kommt hierbei der Expression von K⁺-Kanälen zu. Diese ist in vielen Tumorentitäten verändert, weshalb ihnen eine Rolle hinsichtlich Malignität, Progression und Metabolismus eines Tumors zugeschrieben wird (Ganser et al., 2021, Lastraioli et al., 2015, Nilius and Wohlrab, 1992). Da sowohl K⁺ als auch Ca²⁺ eine wichtige Bedeutung in der Tumorgenese haben, sind IK-Kanäle in den Fokus des Interesses gerückt. Entsprechend zeigen vorangegangene Studien, dass die Expression der Kanäle im Mammakarzinom verändert ist, woraus sich eine Pro-Tumor-Aktivität ergibt, die insbesondere auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der Krebszellen Einfluss zu nehmen scheint (Ibrahim et al., 2021, Steudel et al., 2017, Todesca et al., 2021, Bloch et al., 2007). Inwiefern die potentielle onkogene Wirkung von IK auch Einfluss auf den Energiemetabolismus der Brustkrebszellen hat, wurde bislang noch nicht analysiert. Ziel dieser Arbeit war dementsprechend die Aufklärung von IK-spezifischen Einflüssen auf die Tumorgenese, den Metabolismus und die zugrundeliegenden Signalwege.

6.1 Einfluss des IK-Kanals auf den Metabolismus von Brusttumoren im MMTV-PyMT Modell

Die bisherigen Untersuchungen des IKs im Mammakarzinom, basierend auf globalen IK KO- und WT-Mäusen, zeigten einen starken Einfluss auf die Tumorgenese (Mohr et al., 2019a, Steudel et al., 2017). Eine Veränderung des Energiemetabolismus (Hanahan, 2022) konnte bisher nicht nachgewiesen werden, und diente deshalb als Ziel dieser Dissertation. Um letztendlich diese pathophysiologische Rolle des IK-Kanals im Mammakarzinom zu untersuchen, wurden die bereits etablierten genetisch veränderten (KO-) Mausmodelle und zugehörige Primärzellkulturen verwendet.

In Pankreaskarzinomzellen lieferten *Seahorse*-Untersuchungen, mittels KCNN4-siRNA oder pharmakologischer Kanal-Inhibition durch Rac-16, erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss des IKs auf den Metabolismus (Kovalenko et al., 2016). Initiale Befunde, dass der IK auch im Mammakarzinom Einfluss auf die Energie-Homöostase hat, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit durch reduzierte ECAR- und OCR-Level in MMTV-PyMT KO-Zellen erbracht werden

(Abbildung 5.4 und Abbildung 5.8). Da die ECAR primär die glykolytische Aktivität und die OCR die ATP-Produktion über die OxPhos beschreiben, wurde zunächst deren Abhängigkeit vom IK-Kanal näher untersucht.

6.1.1 Relevanz des IK-Kanals für die Glykolyse

Wie Otto Warburg postulierte, haben Tumorzellen oft erhöhte Laktatkonzentrationen, welche auf eine vermehrte Glykolyse-Aktivität zurückzuführen sind. Selbst unter aeroben Bedingungen versuchen die Zellen den steigenden Energiebedarf durch Glykolyse auszugleichen, wenngleich diese weniger ATP produziert als die Steigerung der OxPhos (Liberti and Locasale, 2016, Warburg et al., 1927). Da die Tumorzelle mehr Pyruvat verstoffwechselt, als sie für weitere Prozesse benötigt bzw. verwerten kann, wird dieses zu Laktat metabolisiert und über MCT aus der Zelle geschleust (Sun et al., 2020, Goodwin et al., 2014, Harris, 2013). Die Laktatsekretion sorgt dabei für eine extrazelluläre Ansäuerung, welche durch Sensoren der *Seahorse*-Messeinheit als ECAR registriert wird. Wie bereits beschrieben, zeigte der genetische KO des IKs eine signifikant verminderte basale glykolytische Aktivität (ECAR), im Vergleich zum MMTV-PyMT WT (Abbildung 5.4). Die Inhibition des Kanals mittels TRAM-34 bestätigte tendenziell die IK-abhängige Erniedrigung der Glykolyse. Da im IK KO + TRAM-34 keine additive Reduktion der ECAR-Level detektiert werden konnten, sind *off-target* Effekte des Inhibitors auszuschließen.

Neben der Laktat-bedingten extrazellulären Ansäuerung (siehe ECAR) sollte auch die intrazelluläre Laktatkonzentration analysiert werden. Mittels FRET-basiertem Biosensor zeigte sich auch diesbezüglich eine intrazellulär geringere basale [Laktat] in MMTV-PyMT KO-Zellen (Abbildung 5.5). Durch die parallele Messung der intra- und extrazellulären Parameter ([Laktat], ECAR) konnte im IK KO (I) ein verstärkter Laktat-Efflux über den MCT ausgeschlossen werden und (II) eine IK-abhängige Reduktion der glykolytischen Aktivität gezeigt werden. Verifiziert wurde dies durch die Inhibition der MCT (via Bay 8002), was in einem schwächeren Anstieg der [Laktat]-FRET-Ratio im IK KO resultierte, als im WT. Der direkte Einfluss des IK-Kanals auf die Glykolyse konnte ebenfalls in Leberkarzinom (Stamm-)Zellen bestätigt werden. Die Überexpression des IK-Kanals sorgte dabei für einen deutlichen Anstieg der ECAR- (und OCR-) Level, was als klares Indiz für einen gesteigerten Metabolismus gewertet werden kann (Fan et al., 2022b).

Während einige glykolytische Enzyme abhängig von monovalenten Kationen (wie K^+) sind (Gohara and Di Cera, 2016), ist nur wenig über den initialen Schritt der Glukose-Aufnahme und des IK-Kanals bekannt. Dabei zählt der Glukose-Transport über die Familie der GLUTs und der SGLTs zu den meist beschriebenen (Scheepers et al., 2004). Klumpp et al. postulieren, dass in genotoxisch gestressten Adenokarzinomzellen der Lunge die Aktivierung des IK-Kanals parallel zum Anstieg der Glukoseaufnahme verläuft, evtl. bedingt durch einen Na^+ -gekoppelten Co-Transport (Klumpp et al., 2018). Auch in Leberkarzinom-Stammzellen konnte via qPCR und *Seahorse* Analysen der IK-Kanal mit einem erhöhten Glukose Metabolismus und einer IK-abhängigen Steigerung des GLUT1 in Verbindung gebracht werden (Fan et al., 2022a). Eine gleichzeitige Überexpression des KCNN4-Gens mit GLUT1 konnte ebenfalls in Lymphomen verifiziert werden (Magi et al., 2019). Auch weitere K^+ -Kanäle, wie zum Beispiel K_{ATP} -Kanäle, zeigten über die Regulation der $[K^+]_{cyto}$ Effekte auf die GLUT1-Transporter (McTaggart et al., 2010). Auch die Na^+ -Homöostase der Zelle, welche essentiell für den Glukose-Symport via SGLT ist, scheint von K^+ abhängig zu sein (Liu et al., 2021). Dies deutet auf eine Korrelation zwischen dem IK-Kanal und der Glukoseaufnahme hin und beschreibt dadurch eine direkte Auswirkung auf die glykolytische Aktivität. Passend zu diesen Befunden zeigten Untersuchungen der MMTV-PyMT IK KO-Tumorzellen mit einem 7-

Nitrobenzofurazan-Fluorophore-substituierten Glukoseanalogon eine reduzierte Glukoseaufnahme (um ca. 50%) im Vergleich zum WT (Abbildung 5.7).

Zusammenfassend kann durch *Seahorse*- und FRET-Analysen, sowie Detektion der Glukoseaufnahme eine signifikante Verringerung der glykolytischen Aktivität unter IK-Depletion nachgewiesen werden. Um eine genaue Aussage treffen zu können, wie der IK-Kanal die Glykolyse beeinflusst, müssen zukünftig weitere Experimente durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang dürften mRNA-Expressionsanalysen der Glukosetransporter, Messungen der K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen unter 2-DG, sowie die Analyse der Glykolyse-Metaboliten mittels LC/MS vielversprechende Ansätze sein (Burgstaller et al., 2022a, Gohara and Di Cera, 2016, Walvekar et al., 2018).

6.1.2 IK-abhängige Regulation der oxidativen Phosphorylierung

Die Glykolyse und die OxPhos sind zwei eng miteinander verbundene Prozesse der ATP-Produktion. So kann das in der Glykolyse produzierte Pyruvat aerob in Acetyl-CoA umgewandelt werden. Über die darauf anschließende Verstoffwechslung im Citrat-Zyklus werden NADH und Succinat für die Atmungskette gewonnen (siehe Abschnitt 1.1.2.1).

In dieser Arbeit wurden *Seahorse*-Experimente durchgeführt, um genau diesen Zusammenhang in Abhängigkeit des IK-Kanals zu untersuchen (Abbildung 5.8). Eine Inhibition der Atmungskette/OxPhos via Oligomycin-A, FCCP und Antimycin-A induziert einen Anstieg der ECAR (Abbildung 5.4). Darüber hinaus scheint, die Atmungskette durch niedrigere [Pyruvat] beeinträchtigt zu werden, wie im IK KO detektiert wurde (Abbildung 5.6). Gleichzeitig bekräftigen reduzierte OCR-Level in IK-depletierten Brusttumorzellen einen Kanal-abhängigen Effekt auf die mitochondriale ATP-Produktion (Abbildung 5.10).

Um diese Wechselwirkungen zwischen dem IK KO und der OxPhos genauer zu untersuchen, wurden zusätzliche Experimente mit den oben genannten Blockern durchgeführt. Oligomycin-A inhibiert die F_0F_1 -ATP Synthase, was wiederum den H^+ -Transport über die IMM und damit verbunden den O_2 -Verbrauch vermindert. Die Differenz zwischen basalen OCR-Levels und dem nach Inhibition gemessenen OCR-Minimum spiegelt die tatsächliche ATP-Produktion im Mitochondrium wider. Diese zeigte sich ebenfalls im KO signifikant reduziert (Abbildung 5.8 C, II). Daraus ergaben sich erste Hinweise, dass der IK-Kanal einen gravierenden Einfluss auf den mitochondriellen Energie-Metabolismus nimmt. Ähnliche Ergebnisse erzielten Kovalenko et al. in Pankreaskarzinomzellen. Mittels KCNN4-siRNA oder pharmakologischer IK-Inhibition konnte eine Abnahme der OCR induziert werden (Kovalenko et al., 2016).

Darüber hinaus zeigte auch die Behandlung mit dem H^+ -Entkoppler FCCP, dass unter IK-Depletion nicht nur basal weniger ATP in den Mitochondrien produziert wurde, sondern auch die Möglichkeit mehr zu produzieren, eingeschränkt war (Abbildung 5.8 C, III). Dem Auflösen des H^+ -Gradienten (unter FCCP) versuchte die Zelle durch vermehrten Sauerstoffverbrauch entgegenzuwirken (siehe 4.11), was sich in einem Maximum der OCR-Level widerspiegelte (Abbildung 5.8 C, III). Die daraus resultierende maximale Leistungsfähigkeit der OxPhos war im IK KO deutlich eingeschränkt und untermauert somit vorangegangene Daten (Abbildung 5.8 A). Folglich konnte ein deutlicher Effekt des IKs auf die Komplexe III und V, sowie den Aufbau des H^+ -Gradienten aufgezeigt werden.

Letzteres ist essentiell für die ATP-Produktion und dient als Energiequelle für die finale Phosphorylierung des ADPs in Komplex V. Zusammen mit weiteren Ionen wie K^+ , oder Ca^{2+} ist dieser Gradient maßgeblich am Aufbau des mitochondriellen Membranpotentials beteiligt (Haumann et al., 2018, Szabo et al., 2021) und dient als Parameter des oxidativen Energiestoffwechsels (Gerencser et al., 2012). Bemerkenswert ist, dass Krebszellen ein abnorm

hohes $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ aufweisen, das mit verstärkten invasiven Eigenschaften in Verbindung gebracht wird (Zhang et al., 2015, Begum and Shen, 2023). Interessanterweise wird der IK-Kanal neben der Plasmamembran, auch in der IMM exprimiert (Bachmann et al., 2022, Bulk et al., 2022). Zusammen mit dem Einfluss des (auch mitochondriellen) Kanals auf die K^+ - und Ca^{2+} -Homöostase, ist eine Korrelation mit dem $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in MMTV-PyMT Tumorzellen zu vermuten.

TMRM-basierte Messungen zeigten ein positiveres mitochondrielles Membranpotential in IK KO- und TRAM-34 inhibierten WT-Zellen (Abbildung 5.9). Ein positiveres Membranpotential setzt einen geringeren H^+ -Gradienten voraus, was sich mit einer geringeren OxPhos-Aktivität deckt. Ein möglicher Verlust von H^+ (durch Übertragung in die mitochondrielle Matrix) konnte via Antimycin-A Behandlung durch *Seahorse*-Analysen ausgeschlossen werden (Abbildung 5.8 C, V). Somit zeigte das verringerte $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ eine direkte Abhängigkeit vom IK-Status der Tumorzelle. Wie der IK-Kanal das Membranpotential genau beeinflusst, ist allerdings nicht bekannt. Lediglich in NSCLC Zelllinien konnte unter Senicapoc-Gabe eine Hyperpolarisation mittels TMRM-Fluoreszenz detektiert werden (Bulk et al., 2022). Ob dabei der mitochondrielle IK-Kanal eine direkte Rolle spielt oder nachfolgend die Modulation der K^+ -Homöostase das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ verändert, bleibt, nicht zuletzt durch Fehlen direkter mitochondriell adressierter IK-Modulatoren, unklar (Laskowski et al., 2016). Weiter postulieren Laskowski et al., dass mitochondrielle K^+ -Kanäle für einen K^+ -Einstrom in die Matrix sorgen und dabei Einfluss auf die ROS-Produktion, das mitochondriale Volumen, die OxPhos und das Membranpotential nehmen (Laskowski et al., 2016). Anders als erwartet, zeigte der IK KO durch FRET-basierte Messungen eine erhöhte $[K^+]$ in der Matrix der Mitochondrien (Abbildung 5.13, B). Dies könnte allerdings auf das *mitoGEPII 1.0* Plasmid zurückzuführen sein, welches lediglich in der Matrix, nicht jedoch im Intermembranraum exprimiert wird. Somit ist nicht auszuschließen, dass auch gesteigerte $[K^+]$ im IMS detektiert werden. Eine etwaige Hochregulation/-Expression (Kompensation) anderer K^+ -Kanäle nach globalem IK-Knockout könnte ebenfalls die gestiegenen $[K^+]_{\text{mito}}$ in der Matrix erklären (El-Brolosy and Stainier, 2017).

Betrachtet man die $[K^+]$ des Cytosols, so ist die Konzentration ähnlich derer in der mitochondriellen Matrix (Laskowski et al., 2016), was einen direkten Einfluss des Cytosols auf das Mitochondrium vermuten lässt. In dieser Arbeit zeigten FRET-basierte Biosensoren (I) im KO eine deutliche Erhöhung der $[K^+]_{\text{cyto}}$, als auch (II) eine Korrelation der K^+ -Kinetik unter dem Ionophor Gramicidin (Abbildung 5.13, G und I). Es zeigte sich, dass die Gramicidin-induzierte Verringerung der $[K^+]_{\text{cyto}}$ der $[K^+]_{\text{mito}}$ um ca. 1 min vorausging (Abbildung 5.13, G). Die zeitliche Korrelation der beiden K^+ -Level könnte folglich auch die erhöhte basale $[K^+]_{\text{mito}}$ in der Matrix erklären. Kongruent zu Kovalenkos Vermutung, könnte so die Ablation des IK-Kanals die K^+ -Homöostase modulieren und nachfolgend das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ verändern, sowie die OxPhos-Aktivität vermindern (Kovalenko et al., 2016). Da neben K^+ auch Ca^{2+} als ubiquitärer sekundärer Botenstoff die OxPhos beeinflussen kann (Wulff and Castle, 2010, Gellerich et al., 2010), sowie der IK-Kanal die $[Ca^{2+}]$ verändern kann (Wolfe et al., 2009, Wulff and Castle, 2010), wurde dahingehend die Ca^{2+} -Homöostase als Modulator der ATP-Produktion überprüft.

6.1.3 IK als Effektor der Ca^{2+} -Homöostase

Bisherige Untersuchungen zeigten einen direkten Ca^{2+} -Einstrom in das Cytosol nach Öffnen des IK-Kanals (Ibrahim et al., 2021, Kshatri et al., 2018, Mohr et al., 2019b, Todesca et al., 2021). Eine IK-bedingte Hyperpolarisation des Membranpotentials in nicht-erregbaren Zellen öffnet dabei nach innen gerichtete Kanäle wie CRAC oder TRP. Diese induzieren nachfolgend einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (Wulff and Castle, 2010). Interessanterweise handelt es sich dabei um einen direkten Feedback-Mechanismus, da auch der Kanal selbst von der cytosolischen $[Ca^{2+}]$ abhängig ist (Mohr et al., 2019b). Des Weiteren ist Ca^{2+} , neben pro-proliferativen und -migrativen Prozessen in der Tumorgenese (Bettaieb et al., 2021, Bong and Monteith,

2018), auch direkt am Energie-Metabolismus beteiligt (Bustos et al., 2017, Gellerich et al., 2010). Dabei kann sowohl cytosolisches, als auch mitochondrielles Ca^{2+} das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$, den „Pyruvatstoffwechsel“ und die OxPhos beeinflussen (McKenzie et al., 2017).

Kongruent mit vorangegangenen FURA-2 Messungen (Stedel et al., 2017), zeigten IK-depletierte MMTV-PyMT Zellen eine signifikante Reduktion der basalen Ca^{2+} -Homöostase im Cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$) (Abbildung 5.12). TRAM-34 inhibierte WT-Zellen bestätigten eine IK-abhängige Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$. Entsprechende Effekte des TRAM-34 oder KCNN4-siRNA wurden in Prostatakarzinomzellen ebenfalls beschrieben (Lallet-Daher et al., 2009). Die geringeren $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ könnten die Folge der erhöhten $[\text{K}^{+}]_{\text{cyto}}$ im IK KO sein (Abbildung 5.13). Durch einen induzierten Einstrom von Ca^{2+} in das Cytosol mittels extrazellulärem ATP (Seiler et al., 1999, Yamada et al., 1996) bestätigte sich ebenfalls eine verminderte Ca^{2+} -Aufnahme im IK KO (Abb. 5.11 E–H). Der IK-Kanal hat somit direkte Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Homöostase in MMTV-PyMT Brustkrebszellen.

Um einen möglichen Einfluss des IKs auf intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher und folglich auf die Ca^{2+} -Aufnahme in das Mitochondrium zu analysieren (Ashby and Tepikin, 2001, Bernardi, 1999, Bustos et al., 2017), wurden durch eine Ca^{2+} -Depletion (+ EGTA) der Einfluss des extrazellulären Ca^{2+} exkludiert und anschließend die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ erneut bestimmt. Mittels des SERCA-Inhibitors BHQ wurde der Ca^{2+} -Efflux aus dem ER in das Cytosol induziert. Es konnte eine eingeschränkte Ca^{2+} -Speicherkapazität (bzw. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) im IK KO und im TRAM-34 behandelten WT gezeigt werden (Abbildung 5.12). Durch den ER-spezifischen FRET-Sensor *D1ER* wurden diese Ergebnisse zusätzlich validiert (Abbildung 5.12, G). Ebenfalls bestätigen Lallet-Daher et al. reduzierte Ca^{2+} -Ströme (Patch-Clamp) unter IK-Inhibition und Thapsigargin (TP)-Behandlung (Lallet-Daher et al., 2009). Clotrimazol und TRAM-34 induzierten in Prostata-Adenokarzinom-Zellen (LNCaP) einen geringeren Ca^{2+} -Strom unter Behandlung mit dem SERCA-Inhibitor TP, als unbehandelte Kontrollzellen. Ursache der verringerten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ könnte der Einfluss des IKs auf den SOCE sein. SOCE bewirkt nach Entleeren der Ca^{2+} -Speicher des ERs einen Ca^{2+} -Einstrom durch die Plasmamembran (Hogan and Rao, 2015). Eine IK-abhängige Modulation der SOCE ist aus anderen Zelltypen bekannt (Yu et al., 2018, Gao et al., 2010, Ferreira and Schlichter, 2013), und könnte folglich die Ca^{2+} -Depletion im ER des MMTV-PyMT IK KOs erklären. Die niedrigeren $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ und $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ induzieren des Weiteren einen verringerten Ca^{2+} -Einstrom in die mitochondrielle Matrix (Abbildung 5.11 A–D). Soweit bekannt, wird der Ca^{2+} -Transfer durch VDAC (*voltage dependent anion channel*) oder mitochondrielle Ca^{2+} -selektive Uniporter (MCU) mit hoher Kapazität und niedriger Affinität vermittelt. Diese sind in unmittelbarer Nähe der Ryanodin-Rezeptoren, oder spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen des ERs (Ashby and Tepikin, 2001, Lee et al., 2018, Bustos et al., 2017). Induziert wird der Ca^{2+} -Transport ins Mitochondrium durch ein hohes mitochondrielles Membranpotential oder die Aufkonzentrierung des Ca^{2+} in der sogenannten *mitochondria-associated membrane*. Mitochondrielles Ca^{2+} dient dabei der Generierung von Stoffwechselprodukten für die Atmungskette, der Aufrechterhaltung des Pyruvat-Stoffwechsels und schlussendlich der OxPhos (Ashby and Tepikin, 2001, Lee et al., 2018, Bustos et al., 2017). Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse kann durch die Pyruvat Dehydrogenase aerob zu Acetyl-CoA metabolisiert werden und im weiteren Verlauf über den Citratzyklus der OxPhos bereitgestellt werden. Publikationen zeigten dabei, dass Ca^{2+} -Oszillationen im Mitochondrium Einfluss auf die PDH haben (Rutter et al., 1996) und die PDH-Aktivität durch eine mitochondriale Ca^{2+} -sensitive Phosphatase herunterreguliert wird (Denton et al., 1972, Lander et al., 2018). Auch weitere Dehydrogenasen des Citratzyklus wie die Isozitat Dehydrogenase, sind direkt abhängig von der mitochondriellen Ca^{2+} -Konzentration (Bustos et al., 2017). Für eine signifikante Steigerung der NADH-Level und nachfolgend der OxPhos, sind schon geringe Erhöhungen von 0,1–10 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ ausreichend (Bustos et al., 2017). Inwieweit die mitochondriellen Ca^{2+} -Konzentrationen in MMTV-PyMT Tumorzellen verändert sind, wurde durch den Mitochondrien-spezifischen Ca^{2+} -

Indikator (*4mtD3cpV*) untersucht. Hierdurch konnte eine zumindest tendenziell geringere $[Ca^{2+}]_{mito}$, sowie ein signifikant reduzierter Ca^{2+} -Influx (AUC) im IK KO beobachtet werden (Abbildung 5.11 A–D).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte folglich aufgezeigt werden, dass der IK-Kanal für eine Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol und dem ER mit verantwortlich ist und nachfolgend die Ca^{2+} -Homöostase des Mitochondriums beeinflusst.

6.1.4 Einfluss des IKs auf die ATP-Konzentration

Die bereits in den vorherigen Abschnitten diskutierte Hypothese einer IK-abhängigen Runterregulation des Energiestoffwechsels durch eine mögliche Modulation der Ca^{2+} -Homöostase, bestätigte sich auch bei der Betrachtung der mitochondriellen ATP-Konzentration (Abbildung 5.10, B). Mittels eines FRET-Biosensors wurde eine signifikant erniedrigte $[ATP]_{mito}$ in IK-depletierten Brusttumorzellen festgestellt (Abbildung 5.10, B). Kongruent zu vorangegangenen Analysen der OxPhos, $\Delta\Psi_{mito}$ und des $mitoCa^{2+}$ (Abbildung 5.8–Abbildung 5.12), konnte anhand der relativen ATP-Konzentration eine IK-bedingte Reduktion der mitochondriellen ATP-Produktion aufgezeigt werden. Eine Inhibition der Glykolyse (via Glukose Deprivation), sowie der OxPhos (via Oligomycin-A) resultierte in einem identischen Minimum der $[ATP]_{mito}$ FRET-Ratio in beiden Genotypen (Abbildung 5.10 A–E). Dies zeigte einerseits die Sensitivität des ATP-abhängigen FRET-Biosensors auf intrazelluläre Energieschwankungen und andererseits eine kurzzeitige Kompensation der mitochondriellen ATP-Produktion nach Glykolyse-Inhibition (temporärer Anstieg der FRET-Ratio unter Glukose-Deprivation, Abbildung 5.10 B, ca. Minute 6). Erklärbar durch den Warburg-Effekt, induziert die Glukose-Deprivation ein zu starkes Energiedefizit, was längerfristig nicht durch die OxPhos ausgeglichen werden kann und in einem nachfolgenden Abfall der FRET-Ratio in beiden Genotypen zu erkennen ist. Diese temporäre Erhöhung der $[ATP]_{mito}$ (Minute 6 auf Minute 7, Abbildung 5.10 B) wurde auch von Depaoli et al. ebenfalls in HeLa Zellen beobachtet (Depaoli et al., 2018). Depaoli postuliert, dass nach Glukose-Deprivation zunächst der mitochondrielle ATP-Pool betroffen ist, was über die Aktivierung von Import-Mechanismen z.B. über die ANT oder anderen ATP-Transportern zu einem Anstieg der $[ATP]_{mito}$ führt. Da dieser vermutlich zugrundeliegende Kompensationsmechanismus lediglich im WT induziert wurde, bestätigte dies erneut die eingeschränkte „Leistungsfähigkeit“ der OxPhos im IK KO. Auch wenn die mechanistischen Details aktuell noch unklar sind, scheint der IK-Kanal dennoch die Aktivität verschiedener Komponenten des $Ca^{2+}/\Delta\Psi_{mito}/F_0F_1$ -ATP Synthase-Signalwegs zu beeinflussen.

Generell korreliert die glykolytische- und mitochondrielle Aktivität mit der Energie-Homöostase (Voronina et al., 2010, Imamura et al., 2009). Konträr zur vorangegangenen Rolle des IKs auf den Metabolismus und den Energiehaushalt in Brustkrebszellen, zeigten die Untersuchungen der cytosolischen ATP-Konzentration allerdings reverse Ergebnisse. In dieser Arbeit induzierte der IK KO eine signifikante Erhöhung der FRET-basierten $[ATP]_{cyto}$, trotz abgeschwächter Energieproduktion (Abbildung 5.4–Abbildung 5.9). Durch die Verwendung einer Glykolyse- und OxPhos-Inhibition konnten falsch positive Ergebnisse des Plasmids, ausgeschlossen werden. Sowohl die Glukose-Deprivation, als auch Oligomycin-A Behandlung reduzierten die FRET-Ratio wie erwartet. Da der Versuch nach 20 Minuten abgebrochen wurde, aber noch keine Plateauphase der FRET-Ratio (wie in Abbildung 5.10, $[ATP]_{mito}$) unter Oligomycin-A erkennbar war, wurden zusätzlich Langzeitbehandlungen über 24 h durchgeführt. Auch diese Langzeit-Messungen zeigten eine klare IK-abhängige Reduktion der $[ATP]_{cyto}$ in beiden Genotypen unter Oligomycin-A, sowie eine signifikante $[ATP]_{cyto}$ -Steigerung des KOs in der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 5.10, J). Da die erreichten $[ATP]_{cyto}$ -FRET-Minima unter Oligomycin-A (und basal) im IK KO dennoch signifikant höher waren als im WT, wird von einer

Kompensation der $[ATP]_{cyto}$ durch weitere energiesparende/-produzierende Prozesse im KO ausgegangen.

Um diese Hypothese zu untermauern, wurde zunächst der Warburg Effekt näher beleuchtet. Anders als in nicht malignen eukaryotischen Zellen (90% des cytosolischen ATPs wird durch die OxPhos bereitgestellt) (White, 2023), dient in Tumorzellen die Glykolyse als primärer Energielieferant. Wie bereits beschrieben geht die Malignität einer Krebszelle mit einer erhöhten Proliferation, Zellstress und weiterführend mit einem O_2 -Mangel einher (White, 2023). Die Hypoxie erklärt folglich (I) die beschränkte (aerobe) OxPhos und gesteigerte (anaerobe) Glykolyse zum Erhalt der Homöostase und (II) veranlasst gleichzeitig die Zelle zur Hydrolyse (Konsum) von ATP im Mitochondrium, um das $\Delta\Psi_{mito}$ aufrecht zu erhalten (White, 2023, Sgarbi et al., 2018, Maldonado et al., 2016). (I) Die Reduktion der Glykolyse und OxPhos (Abbildung 5.4–Abbildung 5.8) in IK-depletierten MMTV-PyMT Brustkrebszellen stellt somit eine geringere Energieversorgung der Zelle da, welche in einer abgeschwächten Proliferation resultiert (Abbildung 5.2 und (Steudel et al., 2017, Israelsen and Vander Heiden, 2010)). Anders verhält sich der WT, welcher das gewonnene ATP durch gesteigerte Proliferation o. ä. „verbraucht“ und dadurch dessen $[ATP]_{cyto}$ Level sinken (Abbildung 5.10). Ob die $[ATP]_{cyto}$ Ratio-Level des WTs allerdings unter die des IK KOs fallen, oder der KO eine kompensatorische Energieerhöhungen durch weitere Prozesse erfährt, bleibt zu untersuchen.

(II) Des Weiteren ist im IK KO aufgrund des eingeschränkten Metabolismus und der Tumorgenese nicht mit hypoxischen Bedingungen zu rechnen. Anders als im WT, welcher durch die erhöhte Proliferationsrate (Abbildung 5.2) und OCR-Level (Abbildung 5.8) mehr O_2 verbraucht und somit das Risiko einer Hypoxie der Krebszellen verstärkt (Muz et al., 2015). Die Hypoxie führt, neben der Förderung des Warburg Effekts, zur reversen Aktivierung der F_0F_1 -ATP Synthase, welche somit ATP verbraucht (hydrolysiert), statt produziert, und folglich den Protonengradienten des Mitochondriums aufrecht erhält. Der Abfall des $\Delta\Psi_{mito}$ würde andernfalls die ROS-vermittelte Apoptose der Krebszelle induzieren (Nguyen and Pandey, 2019). Interessanterweise ist die Induktion der Apoptose durch Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_{mito}$ ebenfalls abhängig von K^+ -Kanälen, wie durch die Inhibition des mitochondriellen Kv1.3-Kanal in Lymphozyten gezeigt wurde (Bortner and Cidlowski, 2014). Da auch der IK-Kanal in der IMM exprimiert wird, ist eine Wirkung des mitoIKs ebenfalls nicht auszuschließen. Wie Chinopoulos des Weiteren aufzeigt, kann neben der F_0F_1 -ATP Synthase auch die ANT revers wirken (Chinopoulos, 2011). Durch die verstärkte Proliferation des MMTV-PyMT WTs könnte es zur Hypoxie der Tumorzelle und somit zur Reduktion der aeroben OxPhos und folglich des $\Delta\Psi_{mito}$ kommen. Laut Hypothese transportiert die revers „laufende“ ANT daraufhin ATP aus dem Cytosol in die Matrix, welches von der revers-wirkenden F_0F_1 -ATP Synthase zur Aufrechterhaltung des $\Delta\Psi_{mito}$ hydrolysiert wird. Folglich sind erhöhte $[ATP]_{mito}$ und reduzierte $[ATP]_{cyto}$ im MMTV-PyMT WT detektierbar (Abbildung 5.10). Erste Versuche mit dem ANT-Inhibitor Carboxyatractylosid (ATR) zeigten in WT-Zellen eine Erniedrigung der $[ATP]_{mito}$ und $[ATP]_{cyto}$, im Vergleich zur unbehandelten WT-Kontrolle. Im IK KO wiederum steigerte ATR die $[ATP]_{mito}$ und reduzierte $[ATP]_{cyto}$ (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte $[ATP]_{mito}$ im KO ist durch den inhibierten Export des ATPs aus dem Mitochondrium zu begründen. Folglich zeigen diese präliminären Daten, dass im IK KO sowohl die F_0F_1 -ATP Synthase als auch die ANT vorwärts (*forward*) wirken (im WT beide revers) und letztendlich die gesteigerte $[ATP]_{cyto}$ im KO nur durch weitere energiesparende/-produzierende Prozesse erklärt werden können.

Da eukaryotische Zellen immer nach einem Gleichgewicht zwischen Energie-Verbrauch und Produktion streben (Hardie, 2018, Hardie et al., 2012), ergibt sich die Frage nach möglichen Mechanismen zur Kompensation des Energie-Defizits im KO. Insbesondere dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell eingehend adressiert. Als intrazellulärer Detektor der Energie-Homöostase wurde dabei die AMPK eingesetzt (Hardie, 2018, Hardie et al., 2012, Garcia and Shaw, 2017, Inoki et al., 2012).

6.2 IK-abhängige Regulation der AMPK-Aktivität

Erste Hinweise der Kompensation in Tumorzellen lieferten Bustos et al., welche eine direkte Abhängigkeit von Ca^{2+} , dem Metabolismus und der AMPK postulierten. Viele Zellen transportieren Ca^{2+} über die IP₃-Rezeptoren des ERs direkt in das Mitochondrium (über den MCU), um dort Schlüsselenzyme insb. -Dehydrogenasen des Citratzyklus zu aktivieren. Diese sind essenziell für die ATP-Produktion und gewährleisten zusätzlich die Bildung von Fettsäuren, Aminosäuren und Nukleotiden, welche unerlässlich für den Zellzyklus und die Proliferation sind (Bustos et al., 2017). Bei einem eingeschränkten Ca^{2+} -Influx ins Mitochondrium, schlussfolgern die Autoren, dass diese Prozesse verlangsamt ablaufen und der Zellzyklus heruntergefahren wird. Die AMPK und nachfolgend autophagische Prozesse der Zelle werden aktiviert, um das Energiedefizit zu kompensieren (Bustos et al., 2017). Da sowohl der Ca^{2+} -Einstrom, als auch die Proliferation der MMTV-PyMT IK KO-Zellen abgeschwächt bzw. verlangsamt sind (Abbildung 5.2/Abbildung 5.12), wurde im weiteren Verlauf die AMPK als Energie-Sensor untersucht (Abschnitt 1.1.2.3). Die Aktivierung der AMPK (bspw. durch Phosphorylierung des Thr¹⁷²) würde über die Aktivierung verschiedener *Downstream*-Signalwege (u. A. Autophagie) anabole Prozesse drosseln und katabole, energieerzeugende Wege, verstärken (Yadav et al., 2017), was in einer Steigerung der $[\text{ATP}]_{\text{cyto}}$ resultiert.

Western Blot Analysen bestätigten eine verstärkte Phosphorylierung der α -Untereinheit der AMPK an Thr¹⁷² im MMTV-PyMT KO und nach pharmakologischer Inhibition des IKs durch TRAM-34 im WT. Diese Befunde wurden durch Versuche mit einem FRET-basierten Indikator der AMPK-Aktivität (AMPK_A) bestätigt (Abbildung 5.14–Abbildung 5.15). Auch die Re-Expression des Kanals im IK KO (IK *rescue*) zeigte ähnlich reduzierte FRET-Ratios wie der WT und bekräftigte den direkten Einfluss des IKs auf die AMPK (Abbildung 5.15, E). Darüber hinaus konnten Klein et al. durch Co-Immunopräzipitation einen weiteren Einfluss des IKs auf die AMPK durch direkte Interaktion des C-Terminus des IK-Kanals mit der γ 1-Untereinheit der AMPK, in welcher die Bindestelle für AMP und ADP verankert sind (Energie-sensitive Zone) zeigen (Klein et al., 2009, Willows et al., 2017, Garcia and Shaw, 2017). Die Aktivierung der AMPK in NuLi-Zellen (Epithelzellen der humanen Atemwege) regulierte dabei die IK-Funktionalität herunter (Klein et al., 2009). Wenngleich die Wechselwirkung des Kanals mit der AMPK mechanistisch nicht vollständig aufgeklärt sind, ist durchaus eine Abhängigkeit des IK-Kanals auf den Energiestoffwechsel (vor allem via AMPK) zu erkennen. Wechselwirkungen zwischen weiteren Ionenkanälen und der AMPK sind ebenfalls bekannt (Lang and Foller, 2014, Yadav et al., 2017). Um zu überprüfen inwiefern mit IK verwandte K⁺-Kanäle (bzw. deren Funktion) mit der AMPK Aktivität korrelieren, wurden MMTV-PyMT BK KO-Zellen via Western Blot und AMPK_A-Sensor untersucht. Analog zum IK KO zeigte auch der BK KO eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung am Thr¹⁷², sowie signifikant erhöhte AMPK_A-FRET-Ratios im Vergleich zum WT (Abbildung 9.11 und Abbildung 9.12).

6.2.1 Bedeutung der Ca^{2+} -Homöostase für die AMPK-Aktivität

Zur Aufklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem IK und der AMPK wurde zunächst die Ca^{2+} -Abhängigkeit der AMPK analysiert (Garcia and Shaw, 2017, Hardie et al., 2012, Marcelo et al., 2016). Vermittelt wird diese über den CaMKK2-Signalweg, welcher letztendlich die AMPK an der α -Untereinheit (Thr¹⁷²) zur Phosphorylierung freigibt (Lin et al., 2021a, Marcelo et al., 2016, Nguyen et al., 2016). Der genaue Phosphorylierungs-Mechanismus ist indes noch nicht bekannt. Analog vorangegangener Versuche (Abbildung 5.11) wurde zunächst mittels extrazellulärem ATP purinerg ein Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle induziert, was in einer gesteigerten AMPK-Ratio in beiden Genotypen resultierte (Abbildung 5.15). Es wurde somit eine direkte Abhängigkeit der AMPK von Ca^{2+} bestätigt, allerdings genotypunabhängig.

Auch die nachfolgende Co-Transfektion des AMPK_A- mit einem intensimetrischen Ca²⁺-Sensors (Abbildung 5.16) zeigte lediglich bei höheren Ca²⁺-Leveln und längerer Exposition (nicht bei Ionomycin Behandlung unter Ca²⁺-Depletion, Abbildung 5.16) eine Steigerung der AMPK FRET-Ratio. Allerdings wurden erneut keine Unterschiede zwischen IK KO und WT festgestellt. Dass die schnelle Ca²⁺-Komplexbildung des Chelators EGTA eventuelle Auswirkungen des Ca²⁺ auf die AMPK maskiert, konnte durch MEFs, HeLa oder MDA-MB-231 Zellen gezeigt werden. Erst der Ca²⁺-Entzug ± BAPTA-AM (Ca²⁺-Chelator) über einen längeren Zeitpunkt sorgte für eine Reduktion der pAMPK-Level im Western Blot (Ghislat et al., 2012, Sundararaman et al., 2016). Letztlich besteht die Möglichkeit, dass Auswirkungen der Ca²⁺-Homöostase auf die AMPK_A mittels *Live Imaging* ohne Langzeit-Deprivation übersehen wurden. Weitere Versuche zur Aufklärung, ob der IK-Kanal über die Modulation der Ca²⁺-Homöostase die AMPK aktiviert, blieben ohne Erkenntnis. Expressionsanalysen der vorgeschalteten Signalproteine CaM und CaMKK2 zeigten weder auf Protein- noch mRNA-Ebene signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Die pharmakologische Blockade der CaMKK2 mittels Sto-609 resultierte zwar in einer Abnahme der AMPK_A FRET-Ratio in MMTV-PyMT Brustkrebszellen, konnte aber aufgrund starker Autofluoreszenz des Inhibitors nicht verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Untersuchungen mit dem AMPK-Inhibitor Compound C wurden ebenfalls aus technischen Gründen (Autofluoreszenz) ausgesetzt (Daten nicht gezeigt). Letztlich konnte der zugrundeliegende Mechanismus einer Korrelation von erniedrigter [Ca²⁺]_{cyto} und erhöhter AMPK-Aktivität nicht final aufgeklärt werden.

6.2.2 Einfluss des Metabolismus auf die IK-abhängige AMPK-Aktivität

Neben den bereits benannten [Ca²⁺]_{cyto}-Abhängigkeit gilt die Phosphorylierung der AMPK durch die Leberkinase 1 (im Komplex mit Mo25 und STRAD) an Thr¹⁷² als bedeutsamer Stimulus der AMPK-Aktivität (Boudeau et al., 2004, Lee and Lin, 2018, Mans et al., 2017, Shackelford and Shaw, 2009). Der genaue Wirkmechanismus der LKB1, sowie deren *Upstream*-Signalwege sind weitestgehend unbekannt (Kullmann and Krahn, 2018). Neben AKT, ERK, der PKA und PKCζ wurde interessanterweise auch eine direkte AMPK-Aktivierung durch LKB1 bei intrazellulärem Energie-Defizit postuliert (Shaw et al., 2004, Parker et al., 2017, Xie et al., 2009). Western Blot Analysen von MMTV-PyMT Zelllysaten bestätigten erhöhte Level an phosphorylierten LKB1 (am Ser⁴²⁸) im IK KO, welche mit einem eingeschränkten Metabolismus assoziiert sind (Abbildung 5.19). Die LKB1 könnte somit als Ca²⁺-unabhängiges Linkerprotein zwischen der eingeschränkten Glykolyse/OxPhos und der AMPK-Aktivierung am Thr¹⁷² dienen, wenngleich die *Upstream*-Mechanismen noch aufgeklärt werden müssen. Diskutiert wird hier eine indirekte Wirkung der Glykolyse auf die LKB1, wobei eine reduzierte glykolytische Aktivität die Bildung von Fruktose-1,6-Bisphosphat über die Phosphofruktokinase vermindert. Durch dieses Defizit bindet weniger F-1,6-P an Aldolasen und es kommt zur Bildung übergeordneter Komplexe, bestehend aus V-ATPasen, Axin, LKB1 und AMPK selbst, wodurch letztlich (über LKB1) die AMPK-Aktivität verstärkt wird (Zhang et al., 2017). Diese Erkenntnis wäre kongruent mit der Annahme, dass die im KO herunterregulierte Glykolyse die F-1,6-P Konzentration vermindert und über die Aktivierung der LKB1 letztendlich die AMPK stimuliert.

Eine Blockade der Glykolyse mittels 2-DG führt zu einer Steigerung der AMPK_A FRET-Ratios in MMTV-PyMT Brustkrebszellen (Abbildung 5.18, A–C). Dies bestätigt ebenfalls den Einfluss der Glykolyse auf die AMPK-Aktivität. Die 2-DG Behandlung resultierte in einem gemeinsamen Maximum der AMPK_A FRET-Ratio in beiden Genotypen. Eine durch den IK KO induzierte verstärkte Sensitivität der AMPK gegenüber metabolischen Schwankungen konnte somit ausgeschlossen werden. Im Folgenden wurden analoge Ergebnisse mit dem F₀F₁-ATP Synthase Inhibitor Oligomycin-A erzielt (Abbildung 5.18, D–F). Auch hier konnte eine direkte Korrelation der mitochondrialen ATP-Produktion und AMPK-Aktivität aufgezeigt werden. Bestätigt wurde

dies ebenfalls in Pankreaskarzinomzellen (Ishino et al., 2018), Hepatozyten (Guigas et al., 2006) und MEFs (Xie et al., 2006), welche unter Blockade der Glykolyse oder OxPhos eine Steigerung der pAMPK im Western Blot demonstrierten. Kosaisawe et al. zeigten des Weiteren in mehreren humanen Krebszelllinien via *Live Imaging* eine Oligomycin-A induzierte erhöhte AMPK_A FRET-Ratio (Sensor: *AMPKAR*) in Abhängigkeit von verschiedenen Glukosekonzentrationen. Parallel wurde in den gleichen Zellen eine Erhöhung der ADP/ATP-Ratio (Sensor: *Perceval*), als auch (teilweise) eine Erhöhung der cytosolischen ATP-Level (Sensor: *AT1.03*) gezeigt (Kosaisawe et al., 2019). Übertragen auf das IK KO-Modell lässt sich somit postulieren, dass eine durch IK induzierte Runterregulation des Energiemetabolismus eine cytosolische ADP/ATP-Erhöhung bewirkt. Dies wiederum führt (evtl. LKB1-abhängig) zur Aktivierung der AMPK_A und induziert dadurch energiesparende/ -produzierende Prozesse, welche die ATP-Level cytosolisch erhöhen.

6.3 IK-vermittelte kompensatorische Aktivierung der Autophagie via AMPK

Die AMPK reguliert zur Aufrechterhaltung der ATP-Homöostase verschiedene energiesparende/ -produzierende Prozesse, zu denen auch die Autophagie gehört (Alers et al., 2012). Die Autophagie beschreibt den Verdau defekter oder nicht benötigter Proteine, Organellen oder Moleküle zur Generierung neuer Nährstoffe (Alvarez-Meythaler et al., 2020, Cuervo and Macian, 2012, Deleyto-Seldas and Efeyan, 2021, Glick et al., 2010). Folglich ist die Rolle des IK-Kanals auf die Autophagie und damit verbunden die [ATP]_{cyto} in (Tumor-) Zellen von großem Interesse. Hierbei ist, wie bereits erwähnt, vor allem die Induktion der Autophagie durch die AMPK interessant, welche durch die direkte Phosphorylierung des ULK1-Komplexes am Serin⁵⁵⁵ die Bildung eines initialen Phagosoms initiiert (Alers et al., 2012). ULK1 wirkt neben Beclin1 als direkter Induktor der Autophagie (Ni et al., 2013). Western Blot Analysen von MMTV-PyMT IK KO-Zelllysaten zeigten dabei erhöhte Phosphorylierungs-Level an Serin⁵⁵⁵ des ULK1 und bestätigen somit die AMPK-Abhängigkeit (Abbildung 5.20). In Bezug auf die Autophagie von MMTV-PyMT Brustkrebszellen, ließen sich nach Ablation des IKs hoch- (LC3B II) bzw. runter-regulierte (p62) Markerproteine finden, die an der Organisation des autophagischen Flux beteiligt sind. Erhöhte LC3B II und erniedrigte p62 Western Blot Banden implizierten eine verstärkte Autophagie in MMTV-PyMT KO-Zelllysaten (Abbildung 5.20). Dieser IK-spezifische Effekt wurde ebenfalls durch pharmakologische Blockade mittels TRAM-34 für beide Autophagiemarker (LC3B II und p62) via Western Blot bestätigt (Abbildung 5.20). Validiert wurden diese Ergebnisse durch pH Messungen im Autolysosom mittels LC3B-gekoppeltem pH Sensor (*pH Lemon LC3B*). Der saurere pH im IK KO korrelierte dabei mit einem verstärkten autophagischen Flux und der verstärkten Degradation mittels Hydrolasen (Abbildung 5.21) (Burgstaller et al., 2019, Maulucci et al., 2015). Ergänzende Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine Reduktion der p62 *Puncta* in IK-depletierten MMTV-PyMT Brusttumorzellen (Abbildung 5.20 und Abbildung 5.22) und somit eine verstärkte Autophagie. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde somit erstmals ein direkter Einfluss des IK-Kanals über AMPK und ULK1 auf zentrale autophagische Prozesse im Mammakarzinom aufgezeigt. Da weitere K⁺-Kanäle den autophagischen Flux beeinflussen können (Kondratskyi et al., 2018), wurden die bisherigen Ergebnisse in einem weiteren KO-Modell analysiert. In BK KO-Zelllysaten zeigten sich ebenfalls signifikant erhöhte LC3B II-Level im Vergleich zum WT. Bestätigt wurde der verstärkte autophagische Flux durch Behandlung der MMTV-PyMT Brustkrebszellen mit EBSS und/oder Bafilomycin A1 (Abbildung 9.13). Die Steigerung der LC3B II-Level unter EBSS, Bafilomycin A1 oder deren Co-Administration, bestätigte eine Blockade des autophagischen Flux, nicht aber dessen Degradations-Potentials in IK- (Abbildung 9.3) und BK-depletierten Zellen (Abbildung 9.13). Weitere Details siehe Abschnitt 1.1.2.3). Eine falsch positive Interpretation der zugrundeliegenden

Autophagie-Befunde (via LC3B) wurde somit ausgeschlossen und eine klare IK-Abhängigkeit bestätigt.

Neben der AMPK sind primär die Signalproteine mTORC1 und PI3K/AKT für die Autophagie-Induktion verantwortlich (Huang and Manning, 2009, Xu et al., 2020, Alers et al., 2012, Deleyto-Seldas and Efeyan, 2021). FRET-basierte Aktivitäts-Messungen dieser Proteine (mTORC1_A und AKT_A) zeigten dabei keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 5.23). Ähnliches konnte in einem Morbus Alzheimer Modell in Astroglia detektiert werden. Basal schienen keine Veränderungen der phosphorylierten AKT, mTORC1, PS6K, oder eIF4E zwischen WT und IK KO nachweisbar zu sein (Yu et al., 2018). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die AMPK vermittelte Aktivierung der Autophagie über ULK1 durch den IK-Kanal beeinflusst werden kann. Weitere Induktoren der Autophagie, wie PI3K/AKT oder mTORC1 blieben indes unverändert, sollten allerdings aufgrund ihrer pro-tumorösen und pro-metabolischen Wirkung in weiteren Versuchen validiert werden. Besonderer Beachtung sollte dabei auf die Signalkaskaden des cAMP- und PI3K-Weges, agonistische Wirkungen des mTORC1 (Ser⁷⁹²), sowie inhibitorische Phosphorylierungsstellen des ULK1 (Ser⁷⁵⁷) geschenkt werden (Kim et al., 2011, Agarwal et al., 2015).

6.4 Einfluss des IK-Kanals auf die Proliferation und Migration von Brustkrebszellen

Einige der initialen sechs *Hallmarks of cancer* beschreiben die Fähigkeit einer Krebszelle ungehindert zu wachsen, zu proliferieren und Metastasen auszubilden (Hanahan and Weinberg, 2011). Diese pro-tumorösen Prozesse sind dabei, unter anderem, abhängig vom Energie-Angebot der Zelle. Bekannt ist, dass das *Remodeling* des Metabolismus mit der Steigerung der Proliferation und Migration korreliert (Hanahan, 2022). Kongruent mit dem reduzierten Metabolismus (Abbildung 5.4–Abbildung 5.9) des IK KOs wird auch das Wachstum in MMTV-PyMT Brustkrebszellen herunterreguliert. Grid-basierte Proliferationsanalysen, sowie Färbungen des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigten eine langsamere Wachstumsrate der Brustkrebszellen in IK-depletierten KO-Zellen oder TRAM-34 behandelten WT-Zellen (Abbildung 5.2). Überraschend war die stärkere Wachstumshemmung der mit TRAM-34 behandelten WT-Zellen im Vergleich zum genetischen KO. Etwaige cytotoxische (*off-target*-) Effekte von TRAM-34 konnten durch Viabilitäts-Analysen mittels MTT ausgeschlossen werden (Abbildung 9.1).

Weitere Studien bestätigten die anti-proliferative Rolle des IKs in anderen Tumorentitäten (Zhang et al., 2016, Jager et al., 2004, Steudel et al., 2017). Neben IK wurde in dieser Arbeit auch der BK-Kanal hinsichtlich seines Wachstumsverhaltens untersucht, da bekannt ist, dass auch weitere K⁺-Kanäle Pro-Tumor-Aktivität im Mammakarzinom zeigen (Breuer et al., 2019, Dowd et al., 2017, Lastraioli et al., 2015, Mohr, 2020). In einem MMTV-PyMT-Mausmodell mit profizienten- und defizienten BK-Status wurde das Wachstum der Brustkrebszellen evaluiert (Mohr et al., 2022). In Übereinstimmung mit den IK KO Brustkrebszellen, resultierte die BK-Ablation in einem signifikant langsameren Wachstumsverhalten (*in vitro*) im Vergleich zum WT (Abbildung 9.8).

Als ursächlich für die verminderte Proliferation wurde die Modulation der Ca²⁺-Oszillationen durch den IK-Kanal beschrieben. Diese sind essentiell für den Übergang der G1 in die S-Phase, sowie folglich für die Proliferation von Tumorzellen (Ouadid-Ahidouch and Ahidouch, 2013, Steudel et al., 2017). Neben der indirekten Modulation der (sub)zellulären Ca²⁺-Homöostase durch den IK-Kanal, liefert diese Arbeit des Weiteren neue Erkenntnisse über den möglichen Einfluss des Metabolismus auf das Wachstumsverhalten im Mammakarzinom. Eine duale inhibitorische Rolle der IK-Depletion (Ca²⁺-abhängig/metabolisch) auf die Proliferation ist somit nicht auszuschließen. Erste funktionelle Überprüfungen, ob die Autophagie als

energiesparender Prozess im KO eine direkte Auswirkung auf die Proliferation hat, wurde durch die Behandlung mit verschiedenen Zytostatika überprüft. Zytostatika dienen dabei als Autophagie-Induktoren und könnten die Wirkung des IKs auf die Tumorpheriferation potenzieren und einen therapeutischen Nutzen aufzeigen. Zwar wurde dosisabhängig die Tumorpheriferation in MMTV-PyMT Zellen vermindert, jedoch konnte kein additiver Effekt durch eine IK-Depletion beobachtet werden (Abbildung 9.5, Abbildung 9.6 und Abbildung 9.14). Zu erklären sind diese Effekte evtl. durch die stark ambivalente Rolle der Autophagie (Xu et al., 2022, Liu et al., 2020) in der Tumorthherapie (siehe 1.1.2.3). Zukünftige Untersuchungen der LC3B II- und p62-Level (via Western Blot) unter Zytostatikatherapie, oder die Behandlung mit metabolischen Inhibitoren (bspw. 2-DG, Oligomycin-A) könnten eine direkte Korrelation zwischen dem Metabolismus/Autophagie und dem Wachstumsverhalten in Brustkrebszellen aufklären.

Allen *in vitro* Proliferationsuntersuchungen zugrunde lag dabei die Erzeugung IK-profizienter und -defizienter Mäuse. Leider konnten im Zuge dieser Doktorarbeit keine genotypspezifischen Unterschiede im TFS und OS der MMTV-PyMT FVB/N-Mäusen detektiert werden (Abbildung 5.1). Des Weiteren konnte keine Aussage hinsichtlich eines veränderten Energiestoffwechsels oder eines auffälligen „metabolischen“ Phänotyps in IK-defizienten Mäusen getroffen werden. Weiter bestätigten die Kaplan-Maier Kurven die Ergebnisse aus vorangegangenen FVB/N-Zuchten des hiesigen Arbeitskreises (Mohr, 2020, Steudel, 2016). Interessanterweise zeigte die genetische Ablation des IK-Kanals sowohl mit einem anderen Onkogen (MMTV-cNeu^{tg/+}) (Steudel et al., 2017), als auch nach orthotroper Transplantation im Vergleich zu WT-Brusttumorzellen im FVB/N-WT Mausmodell einen Überlebensvorteil (Mohr et al., 2019a). Das signifikant verlängerte TFS und OS im IK KO war somit nicht unmittelbar vom murinen Hintergrund (FVB/N), aber durchaus vom IK-Status der Brusttumorzellen selbst abhängig. Darüber hinaus könnte der IK-Kanal Einfluss auf das TME nehmen (Mohr et al., 2019b). Involviert sind dabei Immunzellen wie B- oder T-Zellen (Ghanshani et al., 2000, Wulff et al., 2004), welche ebenfalls IK-Kanäle exprimieren und über den TCR-Komplex aktiviert werden. Ein weiterer Bestandteil des TMEs ist VEGF. VEGF reguliert die IK-Expression in anderen Zellen, bspw. Fibroblasten (*cancer associated fibroblasts*, CAF), welche wiederum die Angiogenese, das Wachstum und das Metastasierungspotential von Tumorzellen direkt beeinflussen können (Mohr et al., 2019b, Qiao et al., 2016). Da es sich im MMTV-PyMT Mausmodell um einen globalen KO handelte, war dementsprechend auch der Kanalstatus in den Zellen des TMEs verändert (z.B. CAF). Eine Pro-Tumor-Aktivität des IKs im TME könnte etwaigen antiproliferativen Effekt des IK KOs in Brusttumorzellen entgegenwirken und diese sogar *in vivo* maskieren. Entsprechend resultierte die orthotrope Transplantation von IK KO-Zellen in FVB/N WT-Mäusen, welche den IK entsprechend im TME exprimierten, in einem deutlich reduzierten Brusttumorwachstum im Vergleich zu applizierten WT-Zellen (Mohr et al., 2019a). Weitere *in vivo* Studien sind notwendig, um einerseits den IK-abhängigen Energiemetabolismus und andererseits die *in vitro* beobachtete Wachstumseinschränkung im KO miteinander zu verbinden.

6.4.1 Anti-migrative Effekte der IK-Depletion in MMTV-PyMT Brustkrebszellen

Die Rolle des Stoffwechsels für das Fortschreiten und die Metastasierung von Brustkrebs gewinnt seit einigen Jahren an Bedeutung (Wang et al., 2020). Nicht zuletzt aufgrund der hohen Mortalitätsrate des Mammakarzinoms, welche mit dem Auftreten von Fernmetastasen korreliert (Dillekas et al., 2019). Die Regulationsmechanismen, die zur Metastasierung durch metabolische Umprogrammierung bei Brustkrebs führen, sind jedoch weitestgehend unbekannt. Allerdings weisen Brustkrebszellen je nach molekularem Subtyp und Metastasierungsareal unterschiedliche metabolische Charakteristika auf. Intrinsische Faktoren wie eine MYC-Amplifikation, die EMT, PIK3CA- und P53-Mutationen, oder extrinsische Faktoren wie Hypoxie, oxidativer Stress und Azidose tragen zur metabolischen Reprogrammierung bei

metastasierendem Brustkrebs bei (Wang et al., 2020, Hanahan and Weinberg, 2011). Um folglich den Einfluss des IK-abhängigen Metabolismus auf das Migrationspotential von MMTV-PyMT Brustkrebszellen zu untersuchen, wurden Wundheilungs- (*Scratch*)- und Boydenkammer-Assays durchgeführt (Abbildung 5.3). Sowohl die genetische Depletion des IKs als auch die pharmakologische Inhibition des Kanals (mittels TRAM-34 im WT) verlangsamte die Zellmigration und Invasion nach 24 h. Die ebenfalls in Wachstumsversuchen (Abbildung 5.2, E–H) detektierte stärkere Wirkung der TRAM-34 Behandlung (in diesem Fall die Verlangsamung der Migration), im Vergleich zum genetischen KO (Abbildung 5.3) spiegelte dabei ähnliche inhibitorische Eigenschaften wider, wie durch eine IK-Kanal-Blockade in TNBC oder Kolonkarzinomzellen (Ibrahim et al., 2021, Zhang et al., 2016). Auch andere K⁺-Kanäle, wie der BK, zeigten reduzierte migrative und invasive Eigenschaften, unter (BK-) Kanal Depletion (Abbildung 9.9 und Abbildung 9.10) oder pharmakologischer Inhibition (He et al., 2021, Rosa et al., 2018, Rosa et al., 2017).

HE Färbungen muriner Lungenflügel (MMTV-PyMT) zeigten indes keine Veränderung der Größe und Anzahl der Lungenmetastasen (Abbildung 9.2), welche ein vermindertes Metastasierungspotential *in vitro* bestätigen könnte. Kongruent mit den Wachstumsanalysen der Tumoren *in vivo* (Abbildung 5.1) könnte auch die Ausbildung von Fernmetastasen durch das TME behindert werden (Werbeck et al., 2014). Für die EMT ursächliche Proteine wie Catherine oder Integrine zeigten keine Expressions-Unterschiede zwischen WT und IK KO (Abbildung 9.2), welche den Einfluss des IKs auf die Migration erklären könnten. Die Analyse von weiteren Migrations-Parametern wie Snail1/2, Twist1, WNT oder verschiedene miRNAs (Luu, 2021) ist zur weiteren Aufklärung notwendig. Um eine direkte Korrelation des Metabolismus und des Metastasierungspotentials in Brustkrebszellen erklären zu können, sollten die oben beschriebenen Versuche (siehe 6.4) unter 2-DG und Oligomycin-A wiederholt werden.

Zusammengenommen zeigen MMTV-PyMT IK KO-Zellen eine erhebliche Reduktion des Wachstums und der Migration (*in vitro*). Als zugrundeliegender Mechanismus wird die verminderte Glykolyse und OxPhos des KOs vermutet (Pavlova et al., 2022, Zanotelli et al., 2019). Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um diese Korrelation zukünftig zu bestätigen.

6.5 Limitation der Arbeit und Ausblick

Die Interpretation der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten unterliegt trotz der interessanten Befunde noch einigen Limitationen. Dabei ist primär die Verwendung eines globalen murinen KO-Modells aufzuführen. Vorteil eines konventionellen KOs ist die bessere Vorhersehbarkeit im Vergleich zu einem überexprimierten Mausmodell, die schnelle Reproduzierbarkeit, Verlust oder Gewinn eines spezifischen Phänotyps und die ubiquitäre Ablation des Gens in allen Geweben. Da allerdings die IK-Expression bereits während der embryonalen Entwicklung unterdrückt wird, können weitere und unerwartete genetische Veränderungen auftreten (Davey and MacLean, 2006). Des Weiteren sind neben den Tumorzellen (unterliegen meist einer Überexpression der Kanäle) auch anderer Organe oder Systeme wie das TME vom KO betroffen. Die Verwendung konditionaler KO-Mäuse wäre eine Alternative, um die Rolle des IK KO auf das Brustkrebsmodell zu begrenzen und spezifischere pathophysiologische Eigenschaften des IKs zu erkennen. Bedauerlicherweise sind konditionale Mutanten (Brustdrüsen-spezifischer IK KO) aufgrund fehlender prä-mutanter IK^{flox/flox} Tiere nicht mittels Cre/loxP generierbar. Neben des KCNN4-Gens sollten des Weiteren die auf Grundlage des PyMT-Onkogens verifizierten Daten im Kontext weiterer Onkogene (bspw. cNEU+/HER2 oder Estrogen Rezeptor positive) *in vivo* / *in vitro* oder in humanen Brustkrebszelllinien bestätigt werden. Das ist bedeutsam, da ca. 25-30% aller Mammakarzinom-Patientinnen HER2 (Latta et al., 2002, Cooke et al., 2001) und sogar 75% (Hua et al., 2018) den Estrogen Rezeptor überexprimieren. Diese Expressionen korrelieren meist mit einer schlechteren Prognose für den Patienten.

Welche Rolle der IK-Kanal im HER2- oder Estrogen Rezeptor positiven-Modell auf den Metabolismus und die Tumorprogression zeigt, bleibt allerdings abzuwarten. Ein weiterer Erkenntnisgewinn wäre durch die zahlreichen humanen Zelllinien wie bspw. MCF7 und MDA-MB-453 zu erwarten, welche eine Varianz in ihrem HER2- oder Estrogen Rezeptor-Status zeigen (Mohr et al., 2022) und mittels KCNN4-siRNA oder IK-Inhibitoren zur Aufklärung beitragen würden. Letztendlich kann die Relevanz der in dieser Arbeit gezeigten Daten nur im humanen Patientenmaterial überprüft werden.

Ein weiterer Aspekt ist die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bisher wenig beleuchtete Rolle der mitochondrialen IK-Kanäle (Huang et al., 2021, Mohr et al., 2019b, Todesca et al., 2021, De Marchi et al., 2009). Der IK-medierte K^+ -Influx in die mitochondriale Matrix verändert nachfolgend das Membranpotential und die Ca^{2+} -Homöostase (De Marchi et al., 2009), sowie indirekt auch die OxPhos, wie in Pankreaskarzinomzellen beobachtet wurde (Kovalenko et al., 2016, Rotko et al., 2020). Diese klar differenzierten Auswirkungen des mitolKs auf den mitochondrialen Metabolismus, sind aufgrund der fehlenden Adressierbarkeit von pharmakologischen Inhibitoren oder siRNAs in dieser Arbeit limitierend. Weder der globale KO noch die pharmakologische Inhibition des Kanals mittels TRAM-34 ließen eine Differenzierung zum plasmamembranständigen IK zu. TRAM-34 bewies aufgrund seiner geringen molekularen Größe (Wulff et al., 2001) eine gute Zellpermeabilität und somit ebenfalls potentielle Wirksamkeit auf den mitolK. Der Vergleich eines Membran-impermeablen IK-Inhibitors Charybdotoxin (50 nM für 24 h) (Yu et al., 2005) sollte eine Differenzierung zwischen plasmamembranständigen- und mitolK aufklären. *Seahorse*-Analysen von MMTV-PyMT Brustkrebszellen mit CHX (analog Abbildung 5.4 und Abbildung 5.8), zeigten ähnliche ECAR- und OCR-Level wie die zuvor durchgeführte TRAM-34 Behandlung (Daten nicht gezeigt). WT + CHX reduzierte tendenziell die ECAR- und OCR-Level, im Vergleich zum unbehandelten WT (IK KO ± CHX blieb unverändert). Wenngleich durch diese Analyse von einer plasmamembranären IK-Wirkung und nicht einer mitochondrialen ausgegangen werden konnte, ist zu beachten, dass CHX neben dem IK, auch den BK und spannungsabhängige K_v -Kanäle inhibiert (Hinton and Langton, 2003). Somit bleibt die Limitation einer direkten Adressierbarkeit des mitolK dennoch bestehen. Ein kürzlich veröffentlichtes TRAM-34 Derivat zur zielgerichteten Inhibition des mitochondrialen IKs (Bachmann et al., 2022) könnte zukünftig diese Lücke schließen und zur Aufklärung der metabolischen Funktion des Kanals beitragen. Die Funktionalität des mitolK spezifischen TRAM-34 Derivats konnte in Melanoma-, Pankreas- und Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Dort zeigte die Inhibition des mitolK eine reduzierte Migration und verstärkten Zelltod (Bachmann et al., 2022). Zukünftige Untersuchungen der MMTV-PyMT Brusttumorzellen mit diesem TRAM-34 Derivat, könnten Aufschluss über das Membranpotential, die Ca^{2+} -Homöostase und die OxPhos geben und die Rolle des mitolKs auf den Metabolismus untermauern.

Im Rahmen der Experimente zur Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase auf den Metabolismus in IK-depletierten MMTV-PyMT Brustkrebszellen, wurden direkte anti-proliferative und -migrative Effekte des Ca^{2+} nicht näher beleuchtet (Berridge et al., 2003, Bong and Monteith, 2018, Fink et al., 2017). Die IK-(KO)-reduzierte $[Ca^{2+}]$ verhindert die für den Zellzyklus benötigten Ca^{2+} -Oszillationen, was in einem Arrest des G0/G1- und G1/S-Übergangs resultiert (Ouadid-Ahidouch et al., 2004, Sundelacruz et al., 2009). Daraus ergeben sich neben (indirekten) metabolisch-induzierten, auch direkte Ca^{2+} -abhängige Einflüsse auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT KO-Zellen. Grid- und Ki-67-Analysen unter Ca^{2+} -Deprivation können zukünftig den Einfluss der Ca^{2+} -Homöostase auf die Proliferation besser aufklären. Weiterhin sollten Ca^{2+} -abhängige Zellzyklusanalysen, oder Bromodeoxyuridin (BrdU)-Färbungen auf einen IK-induzierten G0-Arrest (schlafend, *dormant/quiescent*) aufmerksam machen. Die G0-Phase geht mit einem geringeren ATP-Verbrauch, reduzierter Proliferation und Migration, sowie autophagischer Aktivität, als auch einer Chemoresistenz einher (Vera-Ramirez et al., 2018,

Akkoc et al., 2021, Rossari et al., 2020), was im Rahmen dieser Arbeit für den IK KO gezeigt wurde. Auch der Einfluss von Ca^{2+} , als Modulator des Zellvolumens und damit verbunden der zellulären Fortbewegung (Bettaieb et al., 2021), sind von Interesse. Vor Allem das Zusammenspiel des IKs und der Ca^{2+} -Homöostase auf die zelluläre Migration könnte einen dualen Effekt des IKs, zusätzlich zum runterregulierten Metabolismus, beschreiben. Bettaieb et al. zeigten in Pankreaskarzinomzellen, dass durch das TME TRP-Kanäle, ASIC (*acid-sensitive ion channels*), IP3-Rezeptoren und ORA11 für einen Ca^{2+} -Einstrom am Ende der Zelle sorgen (Bettaieb et al., 2021). Dabei kommt es zur Bildung von Ca^{2+} -Mikrodomänen an der Migrationsfront, welche die Zellmotilität erhöhen, zur Induktion der EMT und zur Aktivierung von Cl^- - und K^+ -Kanälen, wie dem IK, führen. Ca^{2+} aktiviert den IK-Kanal, welcher durch den resultierenden K^+ -Ausstrom osmotisch Wasser nach sich zieht und das Volumen am *Rear-End* der Zelle verändert. Dieses polare „Anschwellen“ induziert die Motilität der Zelle und fördert so die Invasion und Migration (Bettaieb et al., 2021, Bonito et al., 2016). Übertragen auf die durchgeführten MMTV-PyMT Analysen könnte der IK KO durch den verminderten K^+ -Ausstrom (Abbildung 5.13) und verminderte Ca^{2+} -Homöostase (Abbildung 5.12) die verlangsamte Migration erklären. Durch die Wiederholung der Scratch- und Boydenkammer-Assays in MMTV-PyMT Brustkrebszellen unter Ca^{2+} -Depletion \pm 2-DG/Oligomycin-A könnte eine direkte Korrelation zwischen Ca^{2+} , dem Metabolismus und der Rolle des IKs aufgeklärt werden.

Ein weiterer Aspekt, der zukünftig noch einige Aufmerksamkeit benötigt, sind Untersuchungen zur genauen Rolle des IKs im ATP-AMPK-Signalweg. Ob eine IK KO-vermittelte Runterregulation der Glykolyse und OxPhos die AMPK durch verminderte AMP/ATP- bzw. ADP/ATP-Ratios aktiviert, ist ferner zu untersuchen. Hardie et al. demonstrieren in verschiedenen Studien, dass ATP mit AMP und ADP um die Bindungsstelle der AMPK konkurrieren, und auch kleine Fluktuationen von AMP zu einer Aktivierung führen (Hardie, 2018). Interessanterweise konnten auch kleine AMP-Schwankungen in Anwesenheit höherer ATP-Konzentrationen (wie im IK KO cytosolisch nachgewiesen) die AMPK-Aktivität erhöhen (Gowans and Hardie, 2014). Als Erklärung wurde von Hardie ein evolutionärer Prozess postuliert, der auf der von Hans Krebs postulierten Entdeckung beruht, dass AMP unter physiologischen Bedingungen größeren Schwankungen unterliegt als ADP oder ATP. Dies ist möglicherweise der Grund für die physiologisch stärkere Empfindlichkeit von AMPK gegenüber AMP (Hardie, 2018) und erklärt eine stärkere AMPK_A im IK KO trotz einer erhöhten (vermutlich Autophagie bedingten) $[\text{ATP}]_{\text{cyto}}$. Ob durch IK KO vermittelte Inhibition der Energieproduktion auch die AMP/ATP- und ADP/ATP-Ratios sinken, sollte zukünftig durch massenspektrometrische Analysen von AMP, ADP und ATP in IK-profizienten und defizienten MMTV-PyMT Brustkrebszellen analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde primär die AMPK vermittelte Induktion der Autophagie untersucht, welche nachfolgend die Diskrepanz zwischen erhöhtem $[\text{ATP}]_{\text{cyto}}$ und vermindertem Metabolismus im IK KO erklären konnte. Ein weiterer Erkenntnisgewinn wäre zudem durch die Analyse weiterer AMPK stimulierter und inhibierter Prozesse zu erwarten. Einmal aktiviert, reguliert die AMPK die ATP-Level, indem sie biosynthetische Signalwege der Protein-, Fettsäure- und Cholesterinproduktion unterdrückt und katabole Prozesse wie die β -Oxidation von Fettsäuren über die ACC2 (Acetyl-CoA Acetylase 2), oder die Gluconeogenese über SIRT1 (Sirtuin-1, NAD^+ -abhängige Typ III Deacetylase) aktiviert (Yadav et al., 2017, Jose et al., 2013, Hardie and Pan, 2002). Auch regulatorische Wirkungen der AMPK auf CRAC- und Na^+ -Kanäle, sowie Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (u.a. IK), können die Energie-Homöostase nachweislich verändern (Lang and Foller, 2014, Andersen and Rasmussen, 2012). Zukünftige Untersuchungen oben benannter energiesparender/ -produzierender Prozesse (neben der Autophagie) klären folglich die Rolle des IKs auf den Tumor-Metabolismus weiter auf.

7 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit war die Aufklärung der onkogenen und metabolischen Rolle des Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanals mit mittlerer Leitfähigkeit (IK) im Mammakarzinom. Dieser Zusammenhang wurde sowohl in einer *in vivo* Mausstudie, als auch *in vitro* durch primärzellbasierte Experimente untersucht. Verglichen wurden globale IK-profiziente mit defizienten Mäusen und die zugehörigen Primärzellkulturen, welche in vorangegangenen Studien bereits etabliert wurden (Mohr et al., 2019a, Mohr et al., 2019b, Steudel et al., 2017). Eine Übersicht der erarbeiteten Ergebnisse ist in Abbildung 7.1 zusammengefasst.

Die genetische Depletion und/oder pharmakologische Inhibition des IK-Kanals verhindert den Efflux von K^+ aus dem Cytosol der MMTV-PyMT Brusttumorzellen ($[\text{K}^+]_{\text{cyto}}$ sinkt nicht). Daraus resultiert keine Hyperpolarisation des Membranpotentials und ein verminderter Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (über bspw. TRPs) (Ibrahim et al., 2021, Mohr et al., 2019b, Steudel et al., 2017). Neben einer reduzierten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ unter IK-Depletion, zeigt der Kanal auch einen Einfluss auf den SOCE (Ibrahim et al., 2021, Yu et al., 2018), was ebenfalls auf eine veränderte $[\text{Ca}^{2+}]$ im Endoplasmatischen Retikulum ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) hindeutet. Erste Befunde dieser Arbeit untermauerten die Vermutung einer reduzierten Ca^{2+} -Homöostase im IK KO. Mit Hilfe von FURA-2- und FRET-basierten Echtzeitmessungen konnte entsprechend eine Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ und der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ in IK-depletierten Zellen bestätigt werden. Folglich ist auch der Transport von Ca^{2+} aus dem Cytosol oder ER in die Matrix der Mitochondrien verringert ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$) (Ashby and Tepikin, 2001, Lee et al., 2018). Wenngleich noch nicht mechanistisch aufgeklärt, zeigte sich in dieser Arbeit eine direkte Korrelation des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ und des mitochondrialen Membranpotentials, sowie der OxPhos (Bernardi, 1999, Fink et al., 2017, Gellerich et al., 2010, Leanza et al., 2014, Petersen and Verkhatsky, 2016). Darauf Bezug nehmend blieb die Rolle des mitolK auf das Membranpotential offen. Da während der Datenerhebung keine mitolK-adressierbaren Inhibitoren zur Verfügung standen, war eine Differenzierung zum plasmamembranständigen IK und dessen Rolle nicht möglich. Vorangegangene Studien zeigen allerdings einen klaren Effekt des mitolKs auf die mitochondrielle K^+ -, Ca^{2+} -Homöostase und den Energiestoffwechsel in Tumoren (Bernardi, 1999, Klein et al., 2011, Kovalenko et al., 2016, Laskowski et al., 2016, Leanza et al., 2014, Bachmann et al., 2022). Das positivere Mito-Membranpotentials und die geringere OxPhos-Aktivität im KO resultieren in einer reduzierten ATP-Produktion des Mitochondriums ($[\text{ATP}]_{\text{mito}}$).

Parallel zur OxPhos reduzierte der IK KO die Energie-Homöostase der MMTV-PyMT Zellen auch durch eine verminderte glykolytische Aktivität. Ursache der eingeschränkten Glykolyse war die stark reduzierte Glukose-Aufnahme in IK-depletierten Zellen. Als Folge des somit verminderten Warburg Effekts, der die aerobe Glykolyse in stark proliferierenden Tumoren beschreibt, sowie der Wechselwirkungen von Glykolyse mit der OxPhos durch die Verstoffwechslung von Pyruvat, würde dies die geringere $[\text{ATP}]_{\text{mito}}$ erklären (Zheng, 2012). Interessanterweise resultierte der eingeschränkte Metabolismus im IK KO nicht in einer verminderten, sondern im Gegenteil, erhöhten $[\text{ATP}]_{\text{cyto}}$.

Als Folge dieser energetischen Imbalance im IK KO wurde eine erhöhte (AMP+ADP)/ATP-Ratio vermutet, welche über die AMPK die Energiehomöostase aufrecht erhält. Die AMPK zählt als cytosolischer Energiesensor der (Tumor-)Zellen. Dessen Aktivität war, wie vermutet, in IK-depletierten MMTV-PyMT Brustkrebszellen signifikant erhöht. Die Befunde einer modulierten AMPK-Aktivität im MMTV-PyMT Modell durch die Inhibition der Glykolyse und F_0F_1 -ATP Synthase passen gut zu den Erkenntnissen, dass die AMPK direkt abhängig von der Energie-Homöostase ist (Barialai et al., 2020, Pamerter, 2014). Als Folge der inhibierten Energieproduktion (via Glykolyse und OxPhos) im IK KO, reguliert die AMPK energiesparende Prozesse, wie die Autophagie hoch (Garcia and Shaw, 2017), um die energetische Imbalance auszugleichen. Die Quantifizierung der gängigen Marker LC3B II, p62 und ULK1 belegt eine

beschleunigte Autophagie, wenn der IK-Kanal genetisch oder pharmakologisch durch TRAM-34 inhibiert wird. Diese kompensatorische Gegenregulation des KO's erklärt wiederum die zunächst erwartete hohe $[ATP]_{cyto}$. Das in MMTV-PyMT IK KO-Zellen reduzierte und energieverbrauchende Proliferations- und Migrationspotential resultiert mutmaßlich aus dieser Energieimbalance. Es ist anzunehmen, dass den autophagischen Prozess und das hierüber erhöhte $[ATP]_{cyto}$, die zuvor benannten energieverbrauchenden Zelleigenschaften noch stärker eingeschränkt werden.

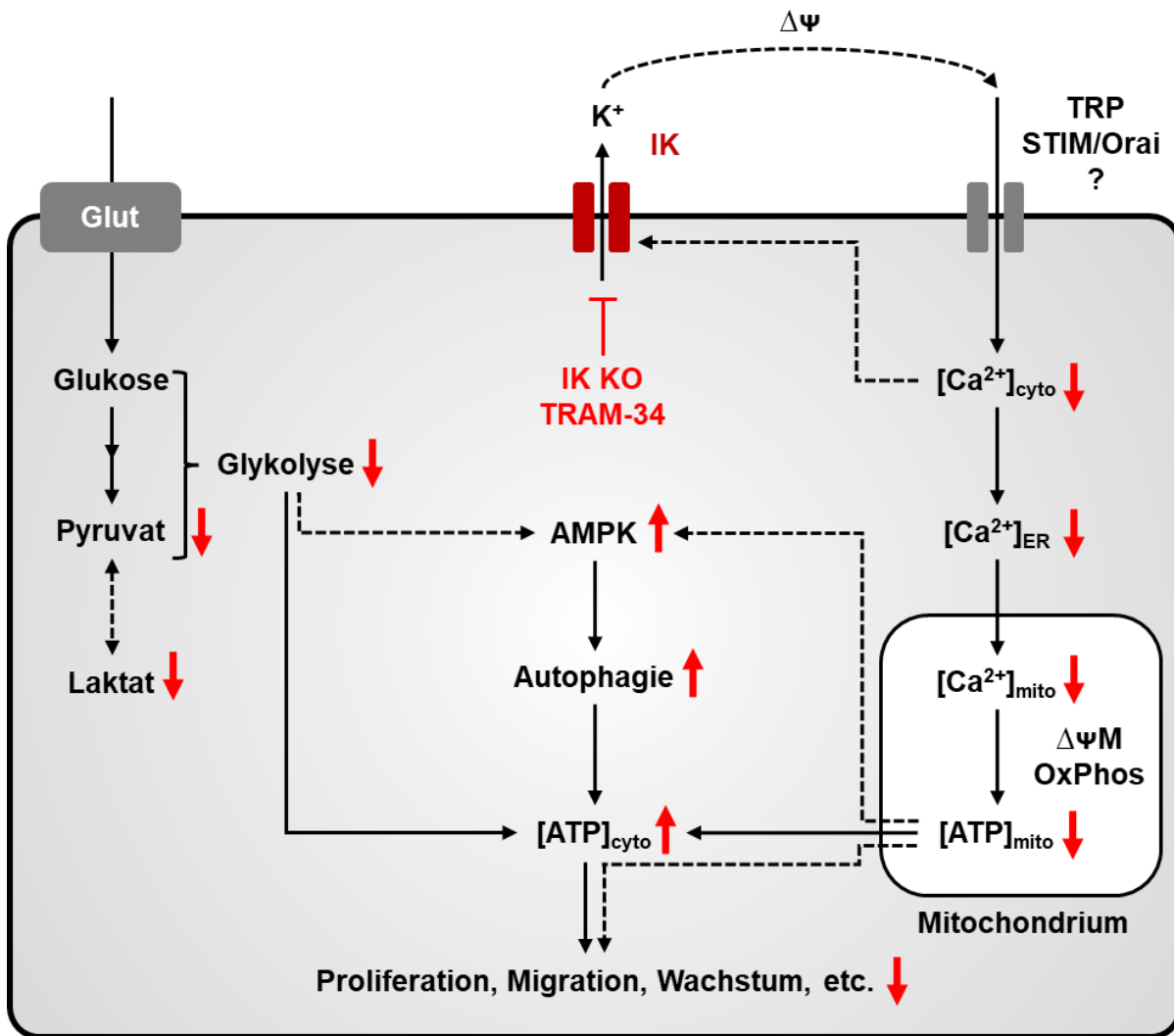


Abbildung 7.1 Übersicht: Konsequenzen der pharmakologischen oder genetischen Inhibition des IK-Kanals auf die Energie-Homöostase von MMTV-PyMT Tumorzellen.

Zusammenfassende Übersicht über die Auswirkungen der IK Kanal-Depletion oder der pharmakologischen Inhibition durch TRAM-34 auf MMTV-PyMT Tumorzellen (schematische graue Box). Rote Pfeile indizieren eine höhere (↑) oder niedrigere (↓) Aktivität, oder Konzentration von verschiedenen Signalmolekülen oder metabolischen Vorgängen. (AMPK: Adenosinmonophosphat-Kinase; ATP: Adenosintri-phosphat; cyto: cytosolisch; ER: Endoplasmatisches Retikulum; Glut: Glukosetransporter; IK: Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit; mito: mitochondriell; OxPhos: oxydative Phosphorylierung; $\Delta\Psi$ / $\Delta\Psi_M$: Membranpotential/ mitochondrielles Membranpotential; STIM/Orai: Stromal interaction molecule (STIM) und Calciumkanal Orai; TRP: Calciumkanal/ Transient receptor potential)

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Doktorarbeit, dass der IK-Kanal eine essenzielle Rolle im Mammakarzinom und dessen Metabolismus spielt. Die Depletion des Kanals resultiert dabei in einer Energieimbalance, welche maßgeblich über die veränderte Ca^{2+} -Homöostase, die Glykolyse und die OxPhos induziert wurde. Die AMPK versucht die KO-bedingte energetische Imbalance durch die Induktion der Autophagie zwar teilweise zu kompensieren, kann eine Beeinträchtigung der Proliferation, Migration und des Überlebens allerdings nicht verhindern.

Bezogen auf die *Hallmarks of cancer* (siehe Zielsetzung: Kapitel 2), zeigte der IK-Kanal somit Einfluss auf das *Remodeling* der Energiehomöostase und damit verbunden ein eingeschränktes Tumorstromwachstum und Metastasierungspotential.

Im Hinblick auf die klinische Relevanz der vorliegenden Studie lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt feststellen, dass eine gezielte Blockade des IK-Kanals zur einer verstärkten Vulnerabilität des Tumorzellmetabolismus führen könnte und so das Wachstums- und Metastasierungsrisiko senkt. Aufgrund seiner ubiquitären Distribution in Tumorzellen, Tumorstromazellen und tumorassoziierten Immunzellen zeigen sich zahlreiche Angriffsmöglichkeiten einer IK-adressierten Therapie des Mammakarzinoms und möglicherweise auch die Behandlung weiterer IK positiver Tumorentitäten (Todesca et al., 2021). Unter Berücksichtigung, dass es sich in dieser Studie um eine globale Inhibition des IKs handelt und der genaue Einfluss des Kanals noch nicht vollständig aufgeklärt ist, präsentiert sich der IK-Kanal trotzdem als neues interessantes Zielprotein in der Therapie des Mammakarzinoms. Perspektivisch könnte eine Inhibition des Kanals als *Add-On* Wirkstoff bei bestehenden Chemotherapie-Regimen oder als neo-/adjuvantes Therapeutikum zur Behandlung von Brusttumoren eingesetzt werden.

8 Literaturverzeichnis

2009. Potassium. *British Journal of Pharmacology*, 158, S141-S143.
- ADDGENE. 2018. *Agarose Gel Electrophoresis* [Online]. addgene.org: Addgene. Available: <https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/> [Accessed 29.11.2022].
- AGARWAL, S., BELL, C. M., ROTHBART, S. B. & MORAN, R. G. 2015. AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Control of mTORC1 Is p53- and TSC2-independent in Pemetrexed-treated Carcinoma Cells. *J Biol Chem*, 290, 27473-86.
- AGILENTTECHNOLOGIES. 2017. *Agilent Seahorse XFe96 and XFe24 Analyzers* [Online]. Available: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/S7894-10000_Rev_B_Wave_2_4_User_Guide.pdf [Accessed 14.12.2022].
- AHMAD, A. 2019. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance*, Springer Cham, Springer Nature Switzerland AG 2019.
- AKKOC, Y., PEKER, N., AKCAY, A. & GOZUACIK, D. 2021. Autophagy and Cancer Dormancy. *Front Oncol*, 11, 627023.
- AKRAM, M. 2013. Mini-review on glycolysis and cancer. *J Cancer Educ*, 28, 454-7.
- AL-MAHAYRI, Z. N., PATRINOS, G. P. & ALI, B. R. 2020. Toxicity and Pharmacogenomic Biomarkers in Breast Cancer Chemotherapy. *Front Pharmacol*, 11, 445.
- AL HAJRI, Q., DASH, S., FENG, W.-C., GARNER, H. R. & ANANDAKRISHNAN, R. 2020. Identifying multi-hit carcinogenic gene combinations: Scaling up a weighted set cover algorithm using compressed binary matrix representation on a GPU. *Scientific Reports*, 10, 2022.
- ALBERTS B, J. A., LEWIS J, ET AL. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, New York: Garland Science 2002, New York: Garland Science.
- ALERS, S., LOFFLER, A. S., WESSELBORG, S. & STORK, B. 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 32, 2-11.
- ALEXANDER, S. P., MATHIE, A., PETERS, J. A., VEALE, E. L., STRIESSNIG, J., KELLY, E., ARMSTRONG, J. F., FACCENDA, E., HARDING, S. D., PAWSON, A. J., SOUTHAN, C., DAVIES, J. A., ALDRICH, R. W., ATTALI, B., BAGGETTA, A. M., BECIROVIC, E., BIEL, M., BILL, R. M., CATTERALL, W. A., CONNER, A. C., DAVIES, P., DELLING, M., VIRGILIO, F. D., FALZONI, S., FENSKE, S., GEORGE, C., GOLDSTEIN, S. A. N., GRISSMER, S., HA, K., HAMMELMANN, V., HANUKOGLU, I., JARVIS, M., JENSEN, A. A., KACZMAREK, L. K., KELLENBERGER, S., KENNEDY, C., KING, B., KITCHEN, P., LYNCH, J. W., PEREZ-REYES, E., PLANT, L. D., RASH, L., REN, D., SALMAN, M. M., SIVILOTTI, L. G., SMART, T. G., SNUTCH, T. P., TIAN, J., TRIMMER, J. S., VAN DEN EYNDE, C., VRIENS, J., WEI, A. D., WINN, B. T., WULFF, H., XU, H., YUE, L., ZHANG, X. & ZHU, M. 2021. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: Ion channels. *Br J Pharmacol*, 178 Suppl 1, S157-S245.
- ALLRED, D. C., CLARK, G. M., ELLEDGE, R., FUQUA, S. A., BROWN, R. W., CHAMNESS, G. C., OSBORNE, C. K. & MCGUIRE, W. L. 1993. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 85, 200-6.
- ALTAMURA, C., GAVAZZO, P., PUSCH, M. & DESAPHY, J. F. 2022. Ion Channel Involvement in Tumor Drug Resistance. *J Pers Med*, 12.
- ALVAREZ-MEYTHALER, J. G., GARCIA-MAYEA, Y., MIR, C., KONDOH, H. & ME, L. L. 2020. Autophagy Takes Center Stage as a Possible Cancer Hallmark. *Front Oncol*, 10, 586069.
- AMAN, Y., SCHMAUCK-MEDINA, T., HANSEN, M., MORIMOTO, R. I., SIMON, A. K., BJEDOV, I., PALIKARAS, K., SIMONSEN, A., JOHANSEN, T., TAVERNARAKIS, N., RUBINSZTEIN, D. C., PARTRIDGE, L., KROEMER, G., LABBADIA, J. & FANG, E. F. 2021. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging*, 1, 634-650.
- ANDERSEN, M. N. & RASMUSSEN, H. B. 2012. AMPK: A regulator of ion channels. *Commun Integr Biol*, 5, 480-4.
- APEL, A., ZENTGRAF, H., BUCHLER, M. W. & HERR, I. 2009. Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int J Cancer*, 125, 991-5.
- ASHBY, M. C. & TEPIKIN, A. V. 2001. ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Semin Cell Dev Biol*, 12, 11-7.
- ASHCROFT, F. M. & RORSMAN, P. 2013. K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol*, 9, 660-9.
- ATAGA, K. I., ORRINGER, E. P., STYLES, L., VICHINSKY, E. P., SWERDLOW, P., DAVIS, G. A., DESIMONE, P. A. & STOCKER, J. W. 2006. Dose-escalation study of ICA-17043 in patients with sickle cell disease. *Pharmacotherapy*, 26, 1557-64.
- ATAGA, K. I., REID, M., BALLAS, S. K., YASIN, Z., BIGELOW, C., JAMES, L. S., SMITH, W. R., GALACTEROS, F., KUTLAR, A., HULL, J. H., STOCKER, J. W. & INVESTIGATORS, I. C. A. S. 2011. 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). *Br J Haematol*, 153, 92-104.
- ATAGA, K. I., SMITH, W. R., DE CASTRO, L. M., SWERDLOW, P., SAUNTHARARAJAH, Y., CASTRO, O., VICHINSKY, E., KUTLAR, A., ORRINGER, E. P., RIGDON, G. C., STOCKER, J. W. & INVESTIGATORS, I. C. A. 2008. Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood*, 111, 3991-7.

- ATAGA, K. I. & STOCKER, J. 2009. Senicapoc (ICA-17043): a potential therapy for the prevention and treatment of hemolysis-associated complications in sickle cell anemia. *Expert Opin Investig Drugs*, 18, 231-9.
- ATTALLA, S., TAIFOUR, T., BUI, T. & MULLER, W. 2021. Insights from transgenic mouse models of PyMT-induced breast cancer: recapitulating human breast cancer progression in vivo. *Oncogene*, 40, 475-491.
- BACHMANN, M., ROSSA, A., VARANITA, T., FIORETTI, B., BIASUTTO, L., MILENKOVIC, S., CHECCHETTO, V., PERUZZO, R., AHMAD, S. A., PATEL, S. H., LUKOWSKI, R., EDWARDS, M. J., CECCARELLI, M., GULBINS, E., ZORATTI, M., MATTAREI, A. & SZABO, I. 2022. Pharmacological targeting of the mitochondrial calcium-dependent potassium channel KCa3.1 triggers cell death and reduces tumor growth and metastasis in vivo. *Cell Death Dis*, 13, 1055.
- BAGUR, R. & HAJNOCZKY, G. 2017. Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell*, 66, 780-788.
- BAKIR, B., CHIARELLA, A. M., PITARRESI, J. R. & RUSTGI, A. K. 2020. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends Cell Biol*, 30, 764-776.
- BANERJEE, A., MAJUMDER, P., SANYAL, S., SINGH, J., JANA, K., DAS, C. & DASGUPTA, D. 2014. The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. *FEBS Open Bio*, 4, 251-9.
- BANYARD, J. & BIELENBERG, D. R. 2015. The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res*, 56, 403-13.
- BARIALAI, L., STRECKER, M. I., LUGER, A. L., JAGER, M., BRUNS, I., SITTIG, A. C. M., MILDENBERGER, I. C., HELLER, S. M., DELAIDELLI, A., LORENZ, N. I., VOSS, M., RONELLENFITSCH, M. W., STEINBACH, J. P. & BURGER, M. C. 2020. AMPK activation protects astrocytes from hypoxia-induced cell death. *Int J Mol Med*, 45, 1385-1396.
- BARNEY, L. E., HALL, C. L., SCHWARTZ, A. D., PARKS, A. N., SPARAGES, C., GALARZA, S., PLATT, M. O., MERCURIO, A. M. & PEYTON, S. R. 2020. Tumor cell-organized fibronectin maintenance of a dormant breast cancer population. *Sci Adv*, 6, eaaz4157.
- BAUER, D., WERTH, F., NGUYEN, H. A., KIECKER, F. & EBERLE, J. 2017. Critical role of reactive oxygen species (ROS) for synergistic enhancement of apoptosis by vemurafenib and the potassium channel inhibitor TRAM-34 in melanoma cells. *Cell Death Dis*, 8, e2594.
- BEGENISICH, T., NAKAMOTO, T., OVITT, C. E., NEHRKE, K., BRUGNARA, C., ALPER, S. L. & MELVIN, J. E. 2004. Physiological roles of the intermediate conductance, Ca2+-activated potassium channel Kcnn4. *J Biol Chem*, 279, 47681-7.
- BEGUM, H. M. & SHEN, K. 2023. Intracellular and microenvironmental regulation of mitochondrial membrane potential in cancer cells. *WIREs Mech Dis*, e1595.
- BENZAQUEN, L. R., BRUGNARA, C., BYERS, H. R., GATTON-CELLI, S. & HALPERIN, J. A. 1995. Clotrimazole inhibits cell proliferation in vitro and in vivo. *Nat Med*, 1, 534-40.
- BERKEFELD, H., FAKLER, B. & SCHULTE, U. 2010. Ca2+-activated K+ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev*, 90, 1437-59.
- BERNARDI, P. 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79, 1127-55.
- BERNSTEIN, L. 2002. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7, 3-15.
- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-29.
- BETTAIEB, L., BRULE, M., CHOMY, A., DIEDRO, M., FRUIT, M., HAPPERNEGG, E., HENI, L., HOROCHOWSKA, A., HOUSSEINI, M., KLOUYOVO, K., LARATTE, A., LEROY, A., LEWANDOWSKI, P., LOUVIEAUX, J., MOITIE, A., TELLIER, R., TITAH, S., VANAUBERG, D., WOESTELAND, F., PREVARSKAYA, N. & LEHEN'KYI, V. 2021. Ca(2+) Signaling and Its Potential Targeting in Pancreatic Ductal Carcinoma. *Cancers (Basel)*, 13.
- BHASKAR, P. T. & HAY, N. 2007. The two TORCs and Akt. *Dev Cell*, 12, 487-502.
- BIORAD. 2022a. *iScript™ cDNA Synthesis Kit* [Online]. bio-rad.com: BioRad. Available: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106228.pdf> [Accessed 05.10.2022].
- BIORAD. 2022b. *SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix* [Online]. bio-rad.com: BioRad. Available: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10031339.pdf> [Accessed 05.10.2022].
- BIOSYSTEMS, K. 2017. *KAPA Mouse Genotyping Kit* [Online]. sigmaaldrich.com: sigmaaldrich. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/158/529/kk5121dat.pdf> [Accessed 29.11.2022].
- BISCHOF, H., BURGSTALLER, S., SPRINGER, A., MATT, L., RAUTER, T., BACHKONIG, O. A., SCHMIDT, T., GROSCHNER, K., SCHINDL, R., MADL, T., PLESNILA, N., LUKOWSKI, R., GRAIER, W. F. & MALLI, R. 2021. Potassium ions promote hexokinase-II dependent glycolysis. *iScience*, 24, 102346.
- BISCHOF, H., REHBERG, M., STRYECK, S., ARTINGER, K., EROGLU, E., WALDECK-WEIERMAIR, M., GOTTSCHALK, B., ROST, R., DEAK, A. T., NIEDRIST, T., VUJIC, N., LINDERMUTH, H., PRASSL, R., PELZMANN, B., GROSCHNER, K., KRATKY, D., ELLER, K., ROSENKRANZ, A. R., MADL, T., PLESNILA, N., GRAIER, W. F. & MALLI, R. 2017. Novel genetically encoded fluorescent probes enable real-time detection of potassium in vitro and in vivo. *Nat Commun*, 8, 1422.
- BLAIR, C. K., WIGGINS, C. L., NIBBE, A. M., STORLIE, C. B., PROSSNITZ, E. R., ROYCE, M., LOMO, L. C. & HILL, D. A. 2019. Obesity and survival among a cohort of breast cancer patients is partially mediated by tumor characteristics. *NPJ Breast Cancer*, 5, 33.

- BLOCH, M., OUSINGSAWAT, J., SIMON, R., SCHRAML, P., GASSER, T. C., MIHATSCH, M. J., KUNZELMANN, K. & BUBENDORF, L. 2007. KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene*, 26, 2525-34.
- BONACORSI, S., VISSEAU, B., BOUZID, D., PAREJA, J., RAO, S. N., MANISSERO, D., HANSEN, G. & VILA, J. 2021. Systematic Review on the Correlation of Quantitative PCR Cycle Threshold Values of Gastrointestinal Pathogens With Patient Clinical Presentation and Outcomes. *Front Med (Lausanne)*, 8, 711809.
- BONG, A. H. L. & MONTEITH, G. R. 2018. Calcium signaling and the therapeutic targeting of cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865, 1786-1794.
- BONITO, B., SAUTER, D. R., SCHWAB, A., DJAMGOZ, M. B. & NOVAK, I. 2016. KCa3.1 (IK) modulates pancreatic cancer cell migration, invasion and proliferation: anomalous effects on TRAM-34. *Pflugers Arch*, 468, 1865-1875.
- BORTNER, C. D. & CIDLOWSKI, J. A. 2014. Ion channels and apoptosis in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369, 20130104.
- BOUDEAU, J., SCOTT, J. W., RESTA, N., DEAK, M., KIELOCH, A., KOMANDER, D., HARDIE, D. G., PRESCOTT, A. R., VAN AALTEN, D. M. & ALESSI, D. R. 2004. Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *J Cell Sci*, 117, 6365-75.
- BOUROUH, M. & MARIGNANI, P. A. 2022. The Tumor Suppressor Kinase LKB1: Metabolic Nexus. *Front Cell Dev Biol*, 10, 881297.
- BRADFORD, M. M. 1976. 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.
- BREUER, E. K., FUKUSHIRO-LOPES, D., DALHEIM, A., BURNETTE, M., ZARTMAN, J., KAJA, S., WELLS, C., CAMPO, L., CURTIS, K. J., ROMERO-MORENO, R., LITTLEPAGE, L. E., NIEBUR, G. L., HOSKINS, K., NISHIMURA, M. I. & GENTILE, S. 2019. Potassium channel activity controls breast cancer metastasis by affecting beta-catenin signaling. *Cell Death Dis*, 10, 180.
- BROWN, B. M., PRESSLEY, B. & WULFF, H. 2018. KCa3.1 Channel Modulators as Potential Therapeutic Compounds for Glioblastoma. *Curr Neuropharmacol*, 16, 618-626.
- BRUGNARA, C. 2001. Therapeutic strategies for prevention of sickle cell dehydration. *Blood Cells Mol Dis*, 27, 71-80.
- BRUGNARA, C. 2018. Sickle cell dehydration: Pathophysiology and therapeutic applications. *Clin Hemorheol Microcirc*, 68, 187-204.
- BRUNET, A., DATTA, S. R. & GREENBERG, M. E. 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 297-305.
- BRYAN KRANTZ: UNIVERSITY OF CALIFORNIA, B. Spring 2008. *GLYCOLYSIS FEEDER PATHWAYS & GLUCONEOGENESIS* [Online]. berkeley.edu. Available: http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/mcb102/lect_S2008/MCB102-SPRING2008-LECTURE4-FEEDER_GLUONEOGENESIS.pdf [Accessed].
- BULK, E., AY, A. S., HAMMADI, M., OUADID-AHIDOUCH, H., SCHELHAAS, S., HASCHER, A., ROHDE, C., THOENNISSEN, N. H., WIEWRODT, R., SCHMIDT, E., MARRA, A., HILLEJAN, L., JACOBS, A. H., KLEIN, H. U., DUGAS, M., BERDEL, W. E., MULLER-TIDOW, C. & SCHWAB, A. 2015. Epigenetic dysregulation of KCa 3.1 channels induces poor prognosis in lung cancer. *Int J Cancer*, 137, 1306-17.
- BULK, E., TODESCA, L. M., BACHMANN, M., SZABO, I., RIEKE, M. & SCHWAB, A. 2022. Functional expression of mitochondrial KCa3.1 channels in non-small cell lung cancer cells. *Pflugers Arch*.
- BURGSTALLER, S., BISCHOF, H., GENSCH, T., STRYECK, S., GOTTSCHALK, B., RAMADANI-MUJA, J., EROGLU, E., ROST, R., BALFANZ, S., BAUMANN, A., WALDECK-WEIERMAIR, M., HAY, J. C., MADL, T., GRAIER, W. F. & MALLI, R. 2019. pH-Lemon, a Fluorescent Protein-Based pH Reporter for Acidic Compartments. *ACS Sensors*, 4, 883-891.
- BURGSTALLER, S., BISCHOF, H., LUKOWSKI, R., GRAIER, W. F. & MALLI, R. 2021. Investigating the K(+) sensitivity of cellular metabolism by extracellular flux analysis. *STAR Protoc*, 2, 100876.
- BURGSTALLER, S., BISCHOF, H., MATT, L. & LUKOWSKI, R. 2022a. Assessing K(+) ions and K(+) channel functions in cancer cell metabolism using fluorescent biosensors. *Free Radic Biol Med*, 181, 43-51.
- BURGSTALLER, S., WAGNER, T. R., BISCHOF, H., BUECKLE, S., PADAMSEY, A., FRECOT, D., KAISER, P. D., SKRABAK, D., MALLI, R., LUKOWSKI, R. & ROTHBAUER, U. 2022b. Monitoring extracellular ion and metabolite dynamics with recombinant nanobody-fused biosensors. *iScience*, 25, 104907.
- BURSTEIN, H. J. 2022. Unmet challenges in systemic therapy for early stage breast cancer. *Breast*, 62 Suppl 1, S67-S69.
- BUSTOS, G., CRUZ, P., LOVY, A. & CARDENAS, C. 2017. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Calcium Communication and the Regulation of Mitochondrial Metabolism in Cancer: A Novel Potential Target. *Front Oncol*, 7, 199.
- BUTTURINI, E., CARCERERI DE PRATI, A., BORIERO, D. & MARIOTTO, S. 2019. Tumor Dormancy and Interplay with Hypoxic Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 20.
- CAHALAN, M. D., WULFF, H. & CHANDY, K. G. 2001. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol*, 21, 235-52.
- CALLAHAN, R. & SMITH, G. H. 2000. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. *Oncogene*, 19, 992-1001.
- CANCER-RESEARCH-UK. 2020. *Tests on your breast cancer cells* [Online]. cancerresearchuk.org. Available: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/getting-diagnosed/tests-diagnose/hormone-receptor-testing-breast-cancer> [Accessed 14.07.2022 14.07.2022].

- CAPATINA, A. L., LAGOS, D. & BRACKENBURY, W. J. 2022. Targeting Ion Channels for Cancer Treatment: Current Progress and Future Challenges. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 183, 1-43.
- CAPERA, J., SERRANO-NOVILLO, C., NAVARRO-PEREZ, M., CASSINELLI, S. & FELIPE, A. 2019. The Potassium Channel Odyssey: Mechanisms of Traffic and Membrane Arrangement. *Int J Mol Sci*, 20.
- CARDOSO, F., HARBECK, N., BARRIOS, C. H., BERGH, J., CORTES, J., EL SAGHIR, N., FRANCIS, P. A., HUDIS, C. A., OHNO, S., PARTRIDGE, A. H., SLEDGE, G. W., SMITH, I. E. & GELMON, K. A. 2017. Research needs in breast cancer. *Ann Oncol*, 28, 208-217.
- CASTLE, N. A., HAYLETT, D. G. & JENKINSON, D. H. 1989. Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci*, 12, 59-65.
- CHABAN, Y., BOEKEMA, E. J. & DUDKINA, N. V. 2014. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 418-26.
- CHANG, F., STEELMAN, L. S., SHELTON, J. G., LEE, J. T., NAVOLANIC, P. M., BLALOCK, W. L., FRANKLIN, R. & MCCUBREY, J. A. 2003. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol*, 22, 469-80.
- CHANG, L., FANG, S. & GU, W. 2020. The Molecular Mechanism of Metabolic Remodeling in Lung Cancer. *J Cancer*, 11, 1403-1411.
- CHAVEZ-DOMINGUEZ, R., PEREZ-MEDINA, M., LOPEZ-GONZALEZ, J. S., GALICIA-VELASCO, M. & AGUILAR-CAZARES, D. 2020. The Double-Edge Sword of Autophagy in Cancer: From Tumor Suppression to Pro-tumor Activity. *Front Oncol*, 10, 578418.
- CHEANG, M. C., CHIA, S. K., VODUC, D., GAO, D., LEUNG, S., SNIDER, J., WATSON, M., DAVIES, S., BERNARD, P. S., PARKER, J. S., PEROU, C. M., ELLIS, M. J. & NIELSEN, T. O. 2009. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101, 736-50.
- CHEJFEC, G., COSNOW, I., GOULD, N. S., HUSAIN, A. N. & GOULD, V. E. 1990. Pulmonary blastoma with neuroendocrine differentiation in cell morules resembling neuroepithelial bodies. *Histopathology*, 17, 353-8.
- CHEN, L., TUO, B. & DONG, H. 2016. Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters. *Nutrients*, 8.
- CHEN, S., SU, X. & MO, Z. 2022. KCNN4 is a Potential Biomarker for Predicting Cancer Prognosis and an Essential Molecule that Remodels Various Components in the Tumor Microenvironment: A Pan-Cancer Study. *Front Mol Biosci*, 9, 812815.
- CHEN, S., WANG, C., SU, X., DAI, X., LI, S. & MO, Z. 2021. KCNN4 is a potential prognostic marker and critical factor affecting the immune status of the tumor microenvironment in kidney renal clear cell carcinoma. *Transl Androl Urol*, 10, 2454-2470.
- CHEN, W., HOFFMANN, A. D., LIU, H. & LIU, X. 2018. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precis Oncol*, 2, 4.
- CHINOPOULOS, C. 2011. Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. *FEBS Lett*, 585, 1255-9.
- CHINOPOULOS, C., VAJDA, S., CSANADY, L., MANDI, M., MATHE, K. & ADAM-VIZI, V. 2009. A novel kinetic assay of mitochondrial ATP-ADP exchange rate mediated by the ANT. *Biophys J*, 96, 2490-504.
- CHUANG, S. C., CHEN, C. H., CHOU, Y. S., HO, M. L. & CHANG, J. K. 2020. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Mediates Cell Proliferation through the cAMP/PKA/CREB Pathway in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*, 21.
- COHEN, M., EMMS, M. & KASCHULA, R. O. 1991. Childhood pulmonary blastoma: a pleuropulmonary variant of the adult-type pulmonary blastoma. *Pediatr Pathol*, 11, 737-49.
- COHN, B. A., WOLFF, M. S., CIRILLO, P. M. & SHOLTZ, R. I. 2007. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environ Health Perspect*, 115, 1406-14.
- COLEMAN, N., BROWN, B. M., OLIVAN-VIGUERA, A., SINGH, V., OLMSTEAD, M. M., VALERO, M. S., KOHLER, R. & WULFF, H. 2014. New positive Ca²⁺-activated K⁺ channel gating modulators with selectivity for KCa3.1. *Mol Pharmacol*, 86, 342-57.
- COMES, N., SERRANO-ALBARRAS, A., CAPERA, J., SERRANO-NOVILLO, C., CONDOM, E., RAMON, Y. C. S., FERRERES, J. C. & FELIPE, A. 2015. Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype. *Biochim Biophys Acta*, 1848, 2477-92.
- COOK, K. L., SHAJAHAN, A. N. & CLARKE, R. 2011. Autophagy and endocrine resistance in breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 11, 1283-94.
- COOK, K. L., WARRI, A., SOTO-PANTOJA, D. R., CLARKE, P. A., CRUZ, M. I., ZWART, A. & CLARKE, R. 2014. Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer. *Clin Cancer Res*, 20, 3222-32.
- COOKE, T., REEVES, J., LANIGAN, A. & STANTON, P. 2001. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol*, 12 Suppl 1, S23-8.
- CORONADO, G. D., BEASLEY, J. & LIVAUDAIS, J. 2011. Alcohol consumption and the risk of breast cancer. *Salud Publica Mex*, 53, 440-7.
- CORRADETTI, M. N., INOKI, K., BARDEESY, N., DEPINHO, R. A. & GUAN, K. L. 2004. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev*, 18, 1533-8.
- COSENTINO, G., PLANTAMURA, I., TAGLIABUE, E., IORIO, M. V. & CATALDO, A. 2021. Breast Cancer Drug Resistance: Overcoming the Challenge by Capitalizing on MicroRNA and Tumor Microenvironment Interplay. *Cancers (Basel)*, 13.

- CREED, S. & MCKENZIE, M. 2019. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential with the Fluorescent Dye Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM). In: HAZNADAR, M. (ed.) *Cancer Metabolism: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- CUERVO, A. M. & MACIAN, F. 2012. Autophagy, nutrition and immunology. *Mol Aspects Med*, 33, 2-13.
- CUI, J., YANG, H. & LEE, U. S. 2009. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci*, 66, 852-75.
- CZURA, A. W. 2017. *Energy Production In A Cell* [Online]. SCCC BIO130 Chapter 25 Cellular Respiration Handout: http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/BIO130Chapter25Handout.pdf. Available: http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/BIO130Chapter25Handout.pdf [Accessed].
- D'ALESSANDRO, G., GRIMALDI, A., CHECE, G., PORZIA, A., ESPOSITO, V., SANTORO, A., SALVATI, M., MAINIERO, F., RAGOZZINO, D., DI ANGELANTONIO, S., WULFF, H., CATALANO, M. & LIMATOLA, C. 2016. KCa3.1 channel inhibition sensitizes malignant gliomas to temozolomide treatment. *Oncotarget*, 7, 30781-96.
- DAI, X., LI, T., BAI, Z., YANG, Y., LIU, X., ZHAN, J. & SHI, B. 2015. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*, 5, 2929-43.
- DAI, X., XIANG, L., LI, T. & BAI, Z. 2016. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*, 7, 1281-94.
- DARD, L., BELLANCE, N., LACOMBE, D. & ROSSIGNOL, R. 2018. RAS signalling in energy metabolism and rare human diseases. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859, 845-867.
- DAVEY, R. A. & MACLEAN, H. E. 2006. Current and future approaches using genetically modified mice in endocrine research. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E429-38.
- DAVIE, S. A., MAGLIONE, J. E., MANNER, C. K., YOUNG, D., CARDIFF, R. D., MACLEOD, C. L. & ELLIES, L. G. 2007. 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.
- DE FRANCESCHI, L., SAADANE, N., TRUDEL, M., ALPER, S. L., BRUGNARA, C. & BEUZARD, Y. 1994. Treatment with oral clotrimazole blocks Ca(2+)-activated K+ transport and reverses erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice. A model for therapy of sickle cell disease. *J Clin Invest*, 93, 1670-6.
- DE MARCHI, U., SASSI, N., FIORETTI, B., CATACUZZENO, L., CEREGHETTI, G. M., SZABO, I. & ZORATTI, M. 2009. Intermediate conductance Ca2+-activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium*, 45, 509-16.
- DE MEIRLEIR, L. J., VAN COSTER, R. & LISSENS, W. 2006. Disorders of Pyruvate Metabolism and the Tricarboxylic Acid Cycle. In: FERNANDES, J., SAUDUBRAY, J.-M., VAN DEN BERGHE, G. & WALTER, J. H. (eds.) *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- DELEYTO-SELDA, N. & EFEYAN, A. 2021. The mTOR-Autophagy Axis and the Control of Metabolism. *Front Cell Dev Biol*, 9, 655731.
- DEMINE, S., RENARD, P. & ARNOULD, T. 2019. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells*, 8.
- DENG, D. & YAN, N. 2016. GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. *Protein Sci*, 25, 546-58.
- DENTON, R. M., RANDLE, P. J. & MARTIN, B. R. 1972. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J*, 128, 161-3.
- DEPAOLI, M. R., KARSTEN, F., MADREITER-SOKOLOWSKI, C. T., KLEC, C., GOTTSCHALK, B., BISCHOF, H., EROGLU, E., WALDECK-WEIERMAIR, M., SIMMEN, T., GRAIER, W. F. & MALLI, R. 2018. Real-Time Imaging of Mitochondrial ATP Dynamics Reveals the Metabolic Setting of Single Cells. *Cell Rep*, 25, 501-512 e3.
- DEVOR, D. C., SINGH, A. K., FRIZZELL, R. A. & BRIDGES, R. J. 1996. Modulation of Cl- secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K+ channel. *Am J Physiol*, 271, L775-84.
- DILLEKAS, H., ROGERS, M. S. & STRAUME, O. 2019. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med*, 8, 5574-5576.
- DKG, D. K., AWMF 2021. Leitlinienprogramm Onkologie. . *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. www.awmf.org.
- DOWD, J., HENDIN, J., FUKUSHIRO-LOPES, D., LACZYNSKI, D. & GENTILE, S. 2017. Ion Channels in Breast Cancer: From Signaling to Therapy.
- DR. SIOW MING LEE, U. C., LONDON 2021. STUDY 15 - Comparing Gemcitabine/Carboplatin and Hydroxychloroquine Versus Carboplatin/Etoposide Therapy Alone in Small Cell Lung Cancer (SCLC). In: UNIVERSITY COLLEGE, L. (ed.). <http://www.ctc.ucl.ac.uk/TrialDetails.aspx?Trial=111>: London Lung Cancer Group.
- DU, C., CHEN, S., WAN, H., CHEN, L., LI, L., GUO, H., TUO, B. & DONG, H. 2019. Different functional roles for K(+) channel subtypes in regulating small intestinal glucose and ion transport. *Biol Open*, 8.
- DUNN, D. M. & MUNGER, J. 2020. Interplay Between Calcium and AMPK Signaling in Human Cytomegalovirus Infection. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 384.
- DURONIO, R. J. & XIONG, Y. 2013. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a008904.
- DUSSELDORF, I. 2019. *Western Blot (semi-dry)* [Online]. protocols.io: protocols.io. Available: https://www.protocols.io/view/western-blot-semi-dry-764hrqw.pdf?only_materials=1 [Accessed 13.12.2022].
- DWORAKOWSKA, B. & DOLOWY, K. 2000. Ion channels-related diseases. *Acta Biochim Pol*, 47, 685-703.

- EALLES, K. L., HOLLINSHEAD, K. E. & TENNANT, D. A. 2016. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*, 5, e190.
- EDLICH, R. F., WINTERS, K. L. & LIN, K. Y. 2005. Breast cancer and ovarian cancer genetics. *J Long Term Eff Med Implants*, 15, 533-45.
- EL-BROLOS, M. A. & STAINIER, D. Y. R. 2017. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*, 13, e1006780.
- ENDO, H., OWADA, S., INAGAKI, Y., SHIDA, Y. & TATEMACHI, M. 2018. Glucose starvation induces LKB1-AMPK-mediated MMP-9 expression in cancer cells. *Sci Rep*, 8, 10122.
- ENGBERS, J. D., ANDERSON, D., ASMARA, H., REHAK, R., MEHAFFEY, W. H., HAMEED, S., MCKAY, B. E., KRUSKIC, M., ZAMPONI, G. W. & TURNER, R. W. 2012. Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2601-6.
- ENSEMBLE, E. S. E. B. I.-. 2022. Ensembl. ensembl.org.
- EUGENIA SCHROEDER, M., RUSSO, S., COSTA, C., HORI, J., TISCORNIA, I., BOLLATI-FOGOLIN, M., ZAMBONI, D. S., FERREIRA, G., CAIROLI, E. & HILL, M. 2017. Pro-inflammatory Ca(++)-activated K(+) channels are inhibited by hydroxychloroquine. *Sci Rep*, 7, 1892.
- FAN, J., TIAN, R., YANG, X., WANG, H., SHI, Y., FAN, X., ZHANG, J., CHEN, Y., ZHANG, K., CHEN, Z. & LI, L. 2022a. KCNN4 Promotes the Stemness Potentials of Liver Cancer Stem Cells by Enhancing Glucose Metabolism. *Int J Mol Sci*, 23.
- FAN, J., TIAN, R., YANG, X., WANG, H., SHI, Y., FAN, X., ZHANG, J., CHEN, Y., ZHANG, K., CHEN, Z. & LI, L. 2022b. KCNN4 Promotes the Stemness Potentials of Liver Cancer Stem Cells by Enhancing Glucose Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 6958.
- FAOUZI, M., CHOPIN, V., AHIDOUCH, A. & OUADID-AHIDOUCH, H. 2010. Intermediate Ca²⁺-sensitive K⁺ channels are necessary for prolactin-induced proliferation in breast cancer cells. *J Membr Biol*, 234, 47-56.
- FAUSTINO-ROCHA, A., OLIVEIRA, P. A., PINHO-OLIVEIRA, J., TEIXEIRA-GUEDES, C., SOARES-MAIA, R., DA COSTA, R. G., COLACO, B., PIRES, M. J., COLACO, J., FERREIRA, R. & GINJA, M. 2013. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim (NY)*, 42, 217-24.
- FEI, Y. D., WANG, Q., HOU, J. W., LI, W., CAI, X. X., YANG, Y. L., ZHANG, L. H., WEI, Z. X., CHEN, T. Z., WANG, Y. P. & LI, Y. G. 2019. Macrophages facilitate post myocardial infarction arrhythmias: roles of gap junction and KCa3.1. *Theranostics*, 9, 6396-6411.
- FEITELSON, M. A., ARZUMANYAN, A., KULATHINAL, R. J., BLAIN, S. W., HOLCOMBE, R. F., MAHAJNA, J., MARINO, M., MARTINEZ-CHANTAR, M. L., NAWROTH, R., SANCHEZ-GARCIA, I., SHARMA, D., SAXENA, N. K., SINGH, N., VLACHOSTERGIOS, P. J., GUO, S., HONOKI, K., FUJII, H., GEORGAKILAS, A. G., BILSLAND, A., AMEDEI, A., NICCOLAI, E., AMIN, A., ASHRAF, S. S., BOOSANI, C. S., GUHA, G., CIRIOLO, M. R., AQUILANO, K., CHEN, S., MOHAMMED, S. I., AZMI, A. S., BHAKTA, D., HALICKA, D., KEITH, W. N. & NOWSHEEN, S. 2015. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*, 35 Suppl, S25-S54.
- FENG, X. & YANG, J. 2016. Lysosomal Calcium in Neurodegeneration. *Messenger (Los Angel)*, 5, 56-66.
- FENG, Y., HE, D., YAO, Z. & KLIONSKY, D. J. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24, 24-41.
- FENTON, H., CARLILE, B., MONTGOMERY, E. A., CARRAWAY, H., HERMAN, J., SAHIN, F., SU, G. H. & ARGANI, P. 2006. LKB1 protein expression in human breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 14, 146-53.
- FERREIRA, R. & SCHLICHTER, L. C. 2013. Selective Activation of KCa3.1 and CRAC Channels by P2Y2 Receptors Promotes Ca²⁺ Signaling, Store Refilling and Migration of Rat Microglial Cells. *PLOS ONE*, 8, e62345.
- FESKE, S., WULFF, H. & SKOLNIK, E. Y. 2015. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 33, 291-353.
- FINK, B. D., BAI, F., YU, L. & SIVITZ, W. I. 2017. Regulation of ATP production: dependence on calcium concentration and respiratory state. *Am J Physiol Cell Physiol*, 313, C146-C153.
- FISCHER, A. H., JACOBSON, K. A., ROSE, J. & ZELLER, R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*, 2008, pdb prot4986.
- FOGARTY, S., ROSS, F. A., VARA CIRUELOS, D., GRAY, A., GOWANS, G. J. & HARDIE, D. G. 2016. AMPK Causes Cell Cycle Arrest in LKB1-Deficient Cells via Activation of CAMKK2. *Mol Cancer Res*, 14, 683-95.
- FÖRSTER, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437, 55-75.
- FRESNO VARA, J. A., CASADO, E., DE CASTRO, J., CEJAS, P., BELDA-INIESTA, C. & GONZALEZ-BARON, M. 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 30, 193-204.
- GANDHI, N. & DAS, G. M. 2019. Metabolic Reprogramming in Breast Cancer and Its Therapeutic Implications. *Cells*, 8.
- GANSER, K., KLUMPP, L., BISCHOF, H., LUKOWSKI, R., ECKERT, F. & HUBER, S. M. 2021. Potassium Channels in Cancer. *Handb Exp Pharmacol*, 267, 253-275.
- GAO, X. & ZHANG, J. 2008. Spatiotemporal analysis of differential Akt regulation in plasma membrane microdomains. *Mol Biol Cell*, 19, 4366-73.
- GAO, Y. D., HANLEY, P. J., RINNE, S., ZUZARTE, M. & DAUT, J. 2010. 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.

- GARCÍA-JIMÉNEZ, C. & GODING, C. R. 2019. Starvation and Pseudo-Starvation as Drivers of Cancer Metastasis through Translation Reprogramming. *Cell Metabolism*, 29, 254-267.
- GARCIA, D. & SHAW, R. J. 2017. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell*, 66, 789-800.
- GARDOS, G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 30, 653-4.
- GASCO, M., SHAMI, S. & CROOK, T. 2002. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 4, 70-6.
- GELLERICH, F. N., GIZATULLINA, Z., TRUMBECKAITE, S., NGUYEN, H. P., PALLAS, T., ARANDARCIKAITE, O., VIELHABER, S., SEPPET, E. & STRIGGOW, F. 2010. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 1018-27.
- GERASIMAVICIUS, L., LIVESEY, B. J. & MARSH, J. A. 2021. Loss-of-function, gain-of-function and dominant-negative mutations have profoundly different effects on protein structure: implications for variant effect prediction. *bioRxiv*, 2021.10.23.465554.
- GERENCSE, A. A., CHINOPOULOS, C., BIRKET, M. J., JASTROCH, M., VITELLI, C., NICHOLLS, D. G. & BRAND, M. D. 2012. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J Physiol*, 590, 2845-71.
- GHANSHANI, S., WULFF, H., MILLER, M. J., ROHM, H., NEBEN, A., GUTMAN, G. A., CAHALAN, M. D. & CHANDY, K. G. 2000. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem*, 275, 37137-49.
- GHISLAT, G., PATRON, M., RIZZUTO, R. & KNECHT, E. 2012. Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase-beta (CaMKK-beta). *J Biol Chem*, 287, 38625-36.
- GIRODET, P. O., OZIER, A., CARVALHO, G., ILINA, O., OUSOVA, O., GADEAU, A. P., BEGUERET, H., WULFF, H., MARTHAN, R., BRADDING, P. & BERGER, P. 2013. Ca(2+)-activated K(+) channel-3.1 blocker TRAM-34 attenuates airway remodeling and eosinophilia in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 48, 212-9.
- GLICK, D., BARTH, S. & MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221, 3-12.
- GM, C. 2000a. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>, Sinauer Associates.
- GM, C. 2000b. *The Development and Causes of Cancer* [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/> [Accessed 24.05.22 2022].
- GOHARA, D. W. & DI CERA, E. 2016. Molecular Mechanisms of Enzyme Activation by Monovalent Cations. *J Biol Chem*, 291, 20840-20848.
- GONZALEZ, C., BAEZ-NIETO, D., VALENCIA, I., OYARZUN, I., ROJAS, P., NARANJO, D. & LATORRE, R. 2012. K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol*, 2, 2087-149.
- GOODWIN, M. L., GLADDEN, L. B., NIJSTEN, M. W. & JONES, K. B. 2014. Lactate and cancer: revisiting the warburg effect in an era of lactate shuttling. *Front Nutr*, 1, 27.
- GOTE, V., NOOKALA, A. R., BOLLA, P. K. & PAL, D. 2021. Drug Resistance in Metastatic Breast Cancer: Tumor Targeted Nanomedicine to the Rescue. *Int J Mol Sci*, 22.
- GRADA, A., OTERO-VINAS, M., PRIETO-CASTRILLO, F., OBAGI, Z. & FALANGA, V. 2017. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137, e11-e16.
- GROSS, D., BISCHOF, H., MAIER, S., SPORBECK, K., BIRKENFELD, A. L., MALLI, R., RUTH, P., PROIKAS-CEZANNE, T. & LUKOWSKI, R. 2022. IK(Ca) channels control breast cancer metabolism including AMPK-driven autophagy. *Cell Death Dis*, 13, 902.
- GROVER-MCKAY, M., WALSH, S. A., SEFTOR, E. A., THOMAS, P. A. & HENDRIX, M. J. 1998. Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer. *Pathol Oncol Res*, 4, 115-20.
- GUEGUINO, M., CHANTOME, A., FROMONT, G., BOUGNOUX, P., VANDIER, C. & POTIER-CARTEREAU, M. 2014. KCa and Ca(2+) channels: the complex thought. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2322-33.
- GUIDARELLI, A., BRAMBILLA, L., ROTA, C., TOMASI, A., CATTABENI, F. & CANTONI, O. 1996. The respiratory-chain poison antimycin A promotes the formation of DNA single-strand breaks and reduces toxicity in U937 cells exposed to t-butylhydroperoxide. *Biochem J*, 317 (Pt 2), 371-5.
- GUIGAS, B., BERTRAND, L., TALEUX, N., FORETZ, M., WIERNSPERGER, N., VERTOMMEN, D., ANDREELLI, F., VIOLLET, B. & HUE, L. 2006. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes*, 55, 865-74.
- GUO, H., CHITIPROLU, M., RONCEVIC, L., JAVALET, C., HEMMING, F. J., TRUNG, M. T., MENG, L., LATREILLE, E., TANESE DE SOUZA, C., MCCULLOCH, D., BALDWIN, R. M., AUER, R., COTE, J., RUSSELL, R. C., SADOUL, R. & GIBBINGS, D. 2017. Atg5 Disassociates the V1V0-ATPase to Promote Exosome Production and Tumor Metastasis Independent of Canonical Macroautophagy. *Dev Cell*, 43, 716-730 e7.
- GUY, C. T., CARDIFF, R. D. & MULLER, W. J. 1992. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol*, 12, 954-61.
- GUY, C. T., MUTHUSWAMY, S. K., CARDIFF, R. D., SORIANO, P. & MULLER, W. J. 1994. Activation of the c-Src tyrosine kinase is required for the induction of mammary tumors in transgenic mice. *Genes Dev*, 8, 23-32.

- HAMACHER-BRADY, A., BRADY, N. R. & GOTTLIEB, R. A. 2006. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 281, 29776-87.
- HAN, J., HOU, W., LU, C., GOLDSTEIN, L. A., STOLZ, D. B., WATKINS, S. C. & RABINOWICH, H. 2013. Interaction between Her2 and Beclin-1 proteins underlies a new mechanism of reciprocal regulation. *J Biol Chem*, 288, 20315-25.
- HANADA, M., FENG, J. & HEMMING, B. A. 2004. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, 1697, 3-16.
- HANAHAN, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12, 31-46.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARBECK, N., PENAULT-LLORCA, F., CORTES, J., GNANT, M., HOUSSAMI, N., POORTMANS, P., RUDDY, K., TSANG, J. & CARDOSO, F. 2019. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 5, 66.
- HARDIE, D. G. 2018. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *J R Soc Interface*, 15.
- HARDIE, D. G. & PAN, D. A. 2002. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans*, 30, 1064-70.
- HARDIE, D. G., ROSS, F. A. & HAWLEY, S. A. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 251-62.
- HARDIE, D. G., SCHAFFER, B. E. & BRUNET, A. 2016. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol*, 26, 190-201.
- HARRIS, R. A. 2013. Glycolysis Overview. In: LENNARZ, W. J. & LANE, M. D. (eds.) *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Waltham: Academic Press.
- HAUMANN, J., CAMARA, A. K. S., GADICHERLA, A. K., NAVARRO, C. D., BOELEN, A. D., BLOMEYER, C. A., DASH, R. K., BOSWELL, M. R., KWOK, W. M. & STOWE, D. F. 2018. Slow Ca(2+) Efflux by Ca(2+)/H(+) Exchange in Cardiac Mitochondria Is Modulated by Ca(2+) Re-uptake via MCU, Extra-Mitochondrial pH, and H(+) Pumping by FOF1-ATPase. *Front Physiol*, 9, 1914.
- HAYES, D. J., O'DOWD, A. B., SELWOOD, D. L., STABLES, J. N., COMLEY, J. C. & REES, M. J. 1990. The effect of two novel analogues of antimycin A on oxygen consumption and survival of filarial nematodes in vitro. *Mol Biochem Parasitol*, 38, 159-68.
- HE, Y., LIN, Y., HE, F., SHAO, L., MA, W. & HE, F. 2021. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in migration control of human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Mol Med*, 25, 9685-9696.
- HELLEMANN, E., WALKER, J. L., LESKO, M. A., CHANDRASHEKARAPPA, D. G., SCHMIDT, M. C., O'DONNELL, A. F. & DURRANT, J. D. 2022. Novel mutation in hexokinase 2 confers resistance to 2-deoxyglucose by altering protein dynamics. *PLoS Comput Biol*, 18, e1009929.
- HINO, O. & KOBAYASHI, T. 2017. Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci*, 108, 5-11.
- HINTON, J. M. & LANGTON, P. D. 2003. Inhibition of EDHF by two new combinations of K+-channel inhibitors in rat isolated mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*, 138, 1031-5.
- HOGAN, P. G. & RAO, A. 2015. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 460, 40-9.
- HOSHINO, A., WANG, W. J., WADA, S., MCDERMOTT-ROE, C., EVANS, C. S., GOSIS, B., MORLEY, M. P., RATHI, K. S., LI, J., LI, K., YANG, S., MCMANUS, M. J., BOWMAN, C., POTLURI, P., LEVIN, M., DAMRAUER, S., WALLACE, D. C., HOLZBAUR, E. L. F. & ARANY, Z. 2019. The ADP/ATP translocase drives mitophagy independent of nucleotide exchange. *Nature*, 575, 375-379.
- HUA, H., ZHANG, H., KONG, Q. & JIANG, Y. 2018. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Exp Hematol Oncol*, 7, 24.
- HUANG, C., YI, H., SHI, Y., CAO, Q., SHI, Y., CHENG, D., BRAET, F., CHEN, X. M. & POLLOCK, C. A. 2021. KCa3.1 Mediates Dysregulation of Mitochondrial Quality Control in Diabetic Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol*, 9, 573814.
- HUANG, J. & MANNING, B. D. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans*, 37, 217-22.
- HUANG, X. & JAN, L. Y. 2014. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol*, 206, 151-62.
- HUBER, S. M. 2013. Oncochannels. *Cell Calcium*, 53, 241-55.
- IBRAHIM, S., CHAIGNE, J., DAKIK, H., FOURBON, Y., CORSET, L., LECOMTE, T., RAOUL, W. & GUEGUINO, M. 2021. SK4 oncochannels regulate calcium entry and promote cell migration in KRAS-mutated colorectal cancer. *Cell Calcium*, 96, 102384.
- IMAMURA, H., NHAT, K. P., TOGAWA, H., SAITO, K., IINO, R., KATO-YAMADA, Y., NAGAI, T. & NOJI, H. 2009. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 15651-6.
- INFANTINO, V., SANTARSIERO, A., CONVERTINI, P., TODISCO, S. & IACOBAZZI, V. 2021. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int J Mol Sci*, 22.
- INOKI, K., KIM, J. & GUAN, K. L. 2012. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 381-400.
- ISHII, T. M., SILVIA, C., HIRSCHBERG, B., BOND, C. T., ADELMAN, J. P. & MAYLIE, J. 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11651-6.
- ISHINO, K., KUDO, M., PENG, W. X., KURE, S., KAWAHARA, K., TEDUKA, K., KAWAMOTO, Y., KITAMURA, T., FUJII, T., YAMAMOTO, T., WADA, R. & NAITO, Z. 2018. 2-Deoxy-d-glucose increases GFAT1 phosphorylation resulting in endoplasmic reticulum-related apoptosis via disruption of protein N-glycosylation in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 501, 668-673.

- ISRAELSEN, W. J. & VANDER HEIDEN, M. G. 2010. ATP consumption promotes cancer metabolism. *Cell*, 143, 669-71.
- JAGER, H., DREKER, T., BUCK, A., GIEHL, K., GRESS, T. & GRISSMER, S. 2004. Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol Pharmacol*, 65, 630-8.
- JEEVARATNAM, K., CHADDA, K. R., HUANG, C. L. & CAMM, A. J. 2018. Cardiac Potassium Channels: Physiological Insights for Targeted Therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 23, 119-129.
- JENSEN, B. S., STROBAEK, D., CHRISTOPHERSEN, P., JORGENSEN, T. D., HANSEN, C., SILAHTAROGLU, A., OLESEN, S. P. & AHRING, P. K. 1998. Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am J Physiol*, 275, C848-56.
- JENSEN, B. S., STROBAEK, D., OLESEN, S. P. & CHRISTOPHERSEN, P. 2001. The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets*, 2, 401-22.
- JI, X., LU, Y., TIAN, H., MENG, X., WEI, M. & CHO, W. C. 2019. Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomed Pharmacother*, 114, 108800.
- JIANG, S., ZHU, L., YANG, J., HU, L., GU, J., XING, X., SUN, Y. & ZHANG, Z. 2017. Integrated expression profiling of potassium channels identifies KCNN4 as a prognostic biomarker of pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 494, 113-119.
- JIN, L. W., LUCENTE, J. D., NGUYEN, H. M., SINGH, V., SINGH, L., CHAVEZ, M., BUSHONG, T., WULFF, H. & MAEZAWA, I. 2019. Repurposing the KCa_{3.1} inhibitor senicapoc for Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol*, 6, 723-738.
- JOLLY, M. K., WARE, K. E., GILJA, S., SOMARELLI, J. A. & LEVINE, H. 2017. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Mol Oncol*, 11, 755-769.
- JOSE, C., MELSER, S., BENARD, G. & ROSSIGNOL, R. 2013. Mitoplasticity: adaptation biology of the mitochondrion to the cellular redox state in physiology and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*, 18, 808-49.
- JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M. & KIM, D. H. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584, 1287-95.
- JUNG, S., LEE, S., KIM, S. & NAM, H. 2015. Identification of genomic features in the classification of loss- and gain-of-function mutation. *BMC Med Inform Decis Mak*, 15 Suppl 1, S6.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., UENO, T., YAMAMOTO, A., KIRISAKO, T., NODA, T., KOMINAMI, E., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*, 19, 5720-8.
- KADAVAKOLLU, S., STAILEY, C., KUNAPAREDDY, C. S. & WHITE, S. 2014. Clotrimazole as a Cancer Drug: A Short Review. *Med Chem (Los Angeles)*, 4, 722-724.
- KALLURI, R. & WEINBERG, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119, 1420-8.
- KAMINSKA, M., CISZEWSKI, T., LOPACKA-SZATAN, K., MIOTLA, P. & STAROSLAWSKA, E. 2015. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*, 14, 196-202.
- KAMIYA, K., OSAKI, T., NAKAO, K., KAWANO, R., FUJII, S., MISAWA, N., HAYAKAWA, M. & TAKEUCHI, S. 2018. Electrophysiological measurement of ion channels on plasma/organelle membranes using an on-chip lipid bilayer system. *Scientific Reports*, 8, 17498.
- KAUR, J. & DEBNATH, J. 2015. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 461-72.
- KEEN, J. E., KHAWALED, R., FARRENS, D. L., NEELANDS, T., RIVARD, A., BOND, C. T., JANOWSKY, A., FAKLER, B., ADELMAN, J. P. & MAYLIE, J. 1999. Domains responsible for constitutive and Ca(2+)-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *J Neurosci*, 19, 8830-8.
- KHAN-ACADEMY. 2022. *Oxidative Phosphorylierung* [Online]. khanacademy.org: Khan Academy. Available: <https://de.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/oxidative-phosphorylation/a/oxidative-phosphorylation-etc> [Accessed].
- KHANDIA, R., DADAR, M., MUNJAL, A., DHAMA, K., KARTHIK, K., TIWARI, R., YATOO, M. I., IQBAL, H. M. N., SINGH, K. P., JOSHI, S. K. & CHAICUMPA, W. 2019. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *Cells*, 8.
- KIM, H., ESSER, L., HOSSAIN, M. B., XIA, D., YU, C.-A., RIZO, J., VAN DER HELM, D. & DEISENHOFER, J. 1999. Structure of Antimycin A1, a Specific Electron Transfer Inhibitor of Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 4902-4903.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KIM, J., YANG, G., KIM, Y., KIM, J. & HA, J. 2016. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med*, 48, e224.
- KISCHEL, P., GIRAULT, A., RODAT-DESPOIX, L., CHAMLALI, M., RADOSLAVOVA, S., ABOU DAYA, H., LEFEBVRE, T., FOULON, A., RYBARCZYK, P., HAGUE, F., DHENNIN-DUTHILLE, I., GAUTIER, M. & OUADID-AHIDOUCH, H. 2019. Ion Channels: New Actors Playing in Chemotherapeutic Resistance. *Cancers (Basel)*, 11.

- KLEIN, B., WORNDL, K., LUTZ-MEINDL, U. & KERSCHBAUM, H. H. 2011. Perturbation of intracellular K(+) homeostasis with valinomycin promotes cell death by mitochondrial swelling and autophagic processes. *Apoptosis*, 16, 1101-17.
- KLEIN, H., GARNEAU, L., TRINH, N. T., PRIVE, A., DIONNE, F., GOUPIL, E., THURINGER, D., PARENT, L., BROCHIERO, E. & SAUVE, R. 2009. Inhibition of the KCa3.1 channels by AMP-activated protein kinase in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296, C285-95.
- KLINGENBERG, M. 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1978-2021.
- KLUMPP, L., SEZGIN, E. C., SKARDELLY, M., ECKERT, F. & HUBER, S. M. 2018. KCa3.1 Channels and Glioblastoma: In Vitro Studies. *Curr Neuropharmacol*, 16, 627-635.
- KNUDSON, A. G. 1996. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol*, 122, 135-40.
- KOHLER, M., HIRSCHBERG, B., BOND, C. T., KINZIE, J. M., MARRION, N. V., MAYLIE, J. & ADELMAN, J. P. 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, 273, 1709-14.
- KOMATSU, M., WAGURI, S., UENO, T., IWATA, J., MURATA, S., TANIDA, I., EZAKI, J., MIZUSHIMA, N., OHSUMI, Y., UCHIYAMA, Y., KOMINAMI, E., TANAKA, K. & CHIBA, T. 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*, 169, 425-34.
- KONDRATSKYI, A., KONDRATSKA, K., SKRYMA, R., KLIONSKY, D. J. & PREVARSKAYA, N. 2018. Ion channels in the regulation of autophagy. *Autophagy*, 14, 3-21.
- KOSAISAWA, N., SPARTA, B., PARGETT, M., TERAGAWA, C. & ALBECK, J. G. 2019. Cell-to-cell variability in AMPK activation reveals autonomous cycles in cellular energy balance. *bioRxiv*, 780023.
- KOUKOURAKIS, M. I., KALAMIDA, D., GIATROMANOLAKI, A., ZOIS, C. E., SIVRIDIS, E., POULILIOU, S., MITRAKAS, A., GATTER, K. C. & HARRIS, A. L. 2015. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS One*, 10, e0137675.
- KOVALENKO, I., GLASAUER, A., SCHOCKEL, L., SAUTER, D. R., EHRMANN, A., SOHLER, F., HAGEBARTH, A., NOVAK, I. & CHRISTIAN, S. 2016. Identification of KCa3.1 Channel as a Novel Regulator of Oxidative Phosphorylation in a Subset of Pancreatic Carcinoma Cell Lines. *PLoS One*, 11, e0160658.
- KROCK, B. L., SKULI, N. & SIMON, M. C. 2011. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer*, 2, 1117-33.
- KROEMER, G. & POUYSSEGUR, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13, 472-82.
- KSHATRI, A. S., GONZALEZ-HERNANDEZ, A. & GIRALDEZ, T. 2018. Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca(2+) Activated Potassium Channels in the Nervous System. *Front Mol Neurosci*, 11, 258.
- KUANG, Q., PURHONEN, P. & HEBERT, H. 2015. Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci*, 72, 3677-93.
- KULLMANN, L. & KRAHN, M. P. 2018. Controlling the master-upstream regulation of the tumor suppressor LKB1. *Oncogene*, 37, 3045-3057.
- KUMA, A., HATANO, M., MATSUI, M., YAMAMOTO, A., NAKAYA, H., YOSHIMORI, T., OHSUMI, Y., TOKUHISA, T. & MIZUSHIMA, N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432, 1032-6.
- KUMARI, A. 2018. Chapter 1 - Glycolysis. In: KUMARI, A. (ed.) *Sweet Biochemistry*. Academic Press.
- KUNZELMANN, K. 2005. Ion channels and cancer. *J Membr Biol*, 205, 159-73.
- LAHIRI, V., HAWKINS, W. D. & KLIONSKY, D. J. 2019. Watch What You (Self-) Eat: Autophagic Mechanisms that Modulate Metabolism. *Cell Metab*, 29, 803-826.
- LAI, W., CHEN, S., WU, H., GUAN, Y., LIU, L., ZENG, Y., ZHAO, H., JIANG, J. & CHU, Z. 2011. PRL-3 promotes the proliferation of LoVo cells via the upregulation of KCNN4 channels. *Oncol Rep*, 26, 909-17.
- LAI, W., LIU, L., ZENG, Y., WU, H., XU, H., CHEN, S. & CHU, Z. 2013. KCNN4 channels participate in the EMT induced by PRL-3 in colorectal cancer. *Med Oncol*, 30, 566.
- LAI, X., LI, Q., WU, F., LIN, J., CHEN, J., ZHENG, H. & GUO, L. 2020. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metabolic Switching in Cancer: Lessons From Somatic Cell Reprogramming. *Front Cell Dev Biol*, 8, 760.
- LAINETTI, P. F., LEIS-FILHO, A. F., LAUFER-AMORIM, R., BATAZZA, A. & FONSECA-ALVES, C. E. 2020. Mechanisms of Resistance to Chemotherapy in Breast Cancer and Possible Targets in Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 12.
- LALLET-DAHER, H., ROUDBARAKI, M., BAVENCOFFE, A., MARIOT, P., GACKIERE, F., BIDAUX, G., URBAIN, R., GOSSET, P., DELCOURT, P., FLEURISSE, L., SLOMIANNY, C., DEWAILLY, E., MAUROY, B., BONNAL, J. L., SKRYMA, R. & PREVARSKAYA, N. 2009. Intermediate-conductance Ca2+-activated K+ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene*, 28, 1792-806.
- LANDER, N., CHIURILLO, M. A., BERTOLINI, M. S., STOREY, M., VERCESI, A. E. & DOCAMPO, R. 2018. Calcium-sensitive pyruvate dehydrogenase phosphatase is required for energy metabolism, growth, differentiation, and infectivity of Trypanosoma cruzi. *J Biol Chem*, 293, 17402-17417.
- LANG, F. & FOLLER, M. 2014. Regulation of ion channels and transporters by AMP-activated kinase (AMPK). *Channels (Austin)*, 8, 20-8.
- LASKOWSKI, M., AUGUSTYNEK, B., KULAWIAK, B., KOPROWSKI, P., BEDNARCZYK, P., JARMUSZKIEWICZ, W. & SZEWCZYK, A. 2016. What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim Biophys Acta*, 1857, 1247-1257.

- LASTRAIOLI, E., IORIO, J. & ARCANGELI, A. 2015. Ion channel expression as promising cancer biomarker. *Biochim Biophys Acta*, 1848, 2685-702.
- LATTA, E. K., TJAN, S., PARKES, R. K. & O'MALLEY, F. P. 2002. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol*, 15, 1318-25.
- LEANZA, L., ZORATTI, M., GULBINS, E. & SZABO, I. 2014. Mitochondrial ion channels as oncological targets. *Oncogene*, 33, 5569-81.
- LEDOUX, J., WERNER, M. E., BRAYDEN, J. E. & NELSON, M. T. 2006. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*, 21, 69-78.
- LEE, C. H. & MACKINNON, R. 2018. Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures. *Science*, 360, 508-513.
- LEE, K. S., HUH, S., LEE, S., WU, Z., KIM, A. K., KANG, H. Y. & LU, B. 2018. Altered ER-mitochondria contact impacts mitochondria calcium homeostasis and contributes to neurodegeneration in vivo in disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E8844-E8853.
- LEE, S. W., LI, C. F., JIN, G., CAI, Z., HAN, F., CHAN, C. H., YANG, W. L., LI, B. K., REZAEIAN, A. H., LI, H. Y., HUANG, H. Y. & LIN, H. K. 2015. Skp2-dependent ubiquitination and activation of LKB1 is essential for cancer cell survival under energy stress. *Mol Cell*, 57, 1022-1033.
- LEE, S. W. & LIN, H. K. 2018. A new mechanism for LKB1 activation. *Mol Cell Oncol*, 5, e1035691.
- LEE, W. S., NGO-ANH, T. J., BRUENING-WRIGHT, A., MAYLIE, J. & ADELMAN, J. P. 2003. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin: cell surface expression and gating. *J Biol Chem*, 278, 25940-6.
- LEONARD, A. P., CAMERON, R. B., SPEISER, J. L., WOLF, B. J., PETERSON, Y. K., SCHNELLMANN, R. G., BEESON, C. C. & ROHRER, B. 2015. Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning. *Biochim Biophys Acta*, 1853, 348-60.
- LEVINE, B. & KROEMER, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- LI, M. & XIONG, Z.-G. 2011. Ion channels as targets for cancer therapy. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 3, 156-166.
- LI, Q. T., FENG, Y. M., KE, Z. H., QIU, M. J., HE, X. X., WANG, M. M., LI, Y. N., XU, J., SHI, L. L. & XIONG, Z. F. 2020. KCNN4 promotes invasion and metastasis through the MAPK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *J Invest Med*, 68, 68-74.
- LI, T., TONG, H., YIN, H., LUO, Y., ZHU, J., QIN, Z., YIN, S. & HE, W. 2021. Starvation induced autophagy promotes the progression of bladder cancer by LDHA mediated metabolic reprogramming. *Cancer Cell Int*, 21, 597.
- LI, X. B., GU, J. D. & ZHOU, Q. H. 2015. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thorac Cancer*, 6, 17-24.
- LIANG, J. & SLINGERLAND, J. M. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, 2, 339-45.
- LIANG, X. H., JACKSON, S., SEAMAN, M., BROWN, K., KEMPKES, B., HIBSHOOSH, H. & LEVINE, B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402, 672-6.
- LIAO, D. & JOHNSON, R. S. 2007. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 26, 281-90.
- LIBERTI, M. V. & LOCASALE, J. W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41, 211-218.
- LIM, S. M., MOHAMAD HANIF, E. A. & CHIN, S. F. 2021. Is targeting autophagy mechanism in cancer a good approach? The possible double-edge sword effect. *Cell Biosci*, 11, 56.
- LIN, C., BLESSING, A. M., PULLIAM, T. L., SHI, Y., WILKENFELD, S. R., HAN, J. J., MURRAY, M. M., PHAM, A. H., DUONG, K., BRUN, S. N., SHAW, R. J., ITTMANN, M. M. & FRIGO, D. E. 2021a. Inhibition of CAMKK2 impairs autophagy and castration-resistant prostate cancer via suppression of AMPK-ULK1 signaling. *Oncogene*, 40, 1690-1705.
- LIN, F. & QIN, Z. H. 2013. Degradation of misfolded proteins by autophagy: is it a strategy for Huntington's disease treatment? *J Huntingtons Dis*, 2, 149-57.
- LIN, J. F., LIN, Y. C., TSAI, T. F., CHEN, H. E., CHOU, K. Y. & HWANG, T. I. 2017. Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther*, 11, 1517-1533.
- LIN, P., LI, J., YE, F., FU, W., HU, X., SHAO, Z. & SONG, C. 2021b. Erratum: KCNN4 induces multiple chemoresistance in breast cancer by regulating BCL2A1. *Am J Cancer Res*, 11, 621-622.
- LIU, H., HE, Z. & SIMON, H.-U. 2016a. Chapter 14 - The Role of Autophagy in Cancer and Chemotherapy. In: HAYAT, M. A. (ed.) *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. San Diego: Academic Press.
- LIU, H., LI, Y. & RAISCH, K. P. 2010a. Clotrimazole induces a late G1 cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to radiation in vitro. *Anticancer Drugs*, 21, 841-9.
- LIU, J., TIAN, J., SODHI, K. & SHAPIRO, J. I. 2021. The Na/K-ATPase Signaling and SGLT2 Inhibitor-Mediated Cardiorenal Protection: A Crossed Road? *J Membr Biol*, 254, 513-529.
- LIU, S. & CHEN, H. 2016. Isolation of Primary Breast Cancer Cells from HER2 Transgenic Mice. *Bio-protocol*, 6, e1956.
- LIU, T., ZHANG, J., LI, K., DENG, L. & WANG, H. 2020. Combination of an Autophagy Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy. *Front Pharmacol*, 11, 408.

- LIU, W. J., YE, L., HUANG, W. F., GUO, L. J., XU, Z. G., WU, H. L., YANG, C. & LIU, H. F. 2016b. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*, 21, 29.
- LIU, Y., LASZLO, C., LIU, Y., LIU, W., CHEN, X., EVANS, S. C. & WU, S. 2010b. Regulation of G(1) arrest and apoptosis in hypoxia by PERK and GCN2-mediated eIF2alpha phosphorylation. *Neoplasia*, 12, 61-8.
- LOCK, R., ROY, S., KENIFIC, C. M., SU, J. S., SALAS, E., RONEN, S. M. & DEBNATH, J. 2011. Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol Biol Cell*, 22, 165-78.
- LOEB, K. R. & LOEB, L. A. 2000. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21, 379-85.
- LOH, C. Y., CHAI, J. Y., TANG, T. F., WONG, W. F., SETHI, G., SHANMUGAM, M. K., CHONG, P. P. & LOOI, C. Y. 2019. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8.
- LÓPEZ-SÁEZ, J. F., DE LA TORRE, C., PINCHEIRA, J. & MARTÍN, G. G. 1998. Cell proliferation and cancer. *Histology and histopathology*, 13, 1197-1214.
- LOU, Y., JIANG, Y., LIANG, Z., LIU, B., LI, T. & ZHANG, D. 2021. Role of RhoC in cancer cell migration. *Cancer Cell Int*, 21, 527.
- LU, C., MA, Z., CHENG, X., WU, H., TUO, B., LIU, X. & LI, T. 2020. Pathological role of ion channels and transporters in the development and progression of triple-negative breast cancer. *Cancer Cell Int*, 20, 377.
- LUCANTONI, F., DUSSMANN, H. & PREHN, J. H. M. 2018. Metabolic Targeting of Breast Cancer Cells With the 2-Deoxy-D-Glucose and the Mitochondrial Bioenergetics Inhibitor MDIVI-1. *Front Cell Dev Biol*, 6, 113.
- LUNT, S. Y. & VANDER HEIDEN, M. G. 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 441-64.
- LUU, T. 2021. Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Regulation Mechanisms in Pancreatic Cancer. *Front Oncol*, 11, 646399.
- MA, X., JIN, M., CAI, Y., XIA, H., LONG, K., LIU, J., YU, Q. & YUAN, J. 2011. Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit autophagy. *Chem Biol*, 18, 1474-81.
- MAGI, A., MASSELLI, M., SALA, C., GUERRIERO, A., LAISE, P., PUCCINI, B., RIGACCI, L., BRESCHI, C., CROCIANI, O., PILLOZZI, S. & ARCANGELI, A. 2019. The ion channels and transporters gene expression profile indicates a shift in excitability and metabolisms during malignant progression of Follicular Lymphoma. *Sci Rep*, 9, 8586.
- MAHER, A. D. & KUCHEL, P. W. 2003. The Gardos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 1182-97.
- MAHLER, J. F., STOKES, W., MANN, P. C., TAKAOKA, M. & MARONPOT, R. R. 1996. Spontaneous lesions in aging FVB/N mice. *Toxicol Pathol*, 24, 710-6.
- MAIURI, M. C., ZALCKVAR, E., KIMCHI, A. & KROEMER, G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 741-52.
- MALDONADO, E. N., DEHART, D. N., PATNAIK, J., KLATT, S. C., GOOZ, M. B. & LEMASTERS, J. J. 2016. ATP/ADP Turnover and Import of Glycolytic ATP into Mitochondria in Cancer Cells Is Independent of the Adenine Nucleotide Translocator. *J Biol Chem*, 291, 19642-50.
- MALIK, J. A., AHMED, S., JAN, B., BENDER, O., AL HAGBANI, T., ALQARNI, A. & ANWAR, S. 2022. Drugs repurposed: An advanced step towards the treatment of breast cancer and associated challenges. *Biomed Pharmacother*, 145, 112375.
- MANNING, B. D. & CANTLEY, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-74.
- MANS, L. A., QUEROL CANO, L., VAN PELT, J., GIARDOGLOU, P., KEUNE, W. J. & HARAMIS, A. G. 2017. The tumor suppressor LKB1 regulates starvation-induced autophagy under systemic metabolic stress. *Sci Rep*, 7, 7327.
- MAO, I. C., LIN, C. Y., WU, C. L., KOR, C. T. & CHANG, C. C. 2018. Hydroxychloroquine and risk of development of cancers: a nationwide population-based cohort study. *Ther Clin Risk Manag*, 14, 1435-1443.
- MARCELO, K. L., MEANS, A. R. & YORK, B. 2016. The Ca(2+)/Calmodulin/CaMKK2 Axis: Nature's Metabolic CaMshaft. *Trends Endocrinol Metab*, 27, 706-718.
- MAREI, H. E., ALTHANI, A., AFIFI, N., HASAN, A., CACECI, T., POZZOLI, G., MORRIONE, A., GIORDANO, A. & CENCIARELLI, C. 2021. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int*, 21, 703.
- MARKLAND, W. & SMITH, A. E. 1987. Mutants of polyomavirus middle-T antigen. *Biochim Biophys Acta*, 907, 299-321.
- MARO, B., MARTY, M. C. & BORNENS, M. 1982. In vivo and in vitro effects of the mitochondrial uncoupler FCCP on microtubules. *EMBO J*, 1, 1347-52.
- MARRION, N. V. & TAVALIN, S. J. 1998. Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature*, 395, 900-5.
- MARTINEZ-REYES, I. & CHANDEL, N. S. 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*, 11, 102.
- MARTINEZ-REYES, I. & CHANDEL, N. S. 2021. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*, 21, 669-680.
- MASOUD, V. & PAGES, G. 2017. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J Clin Oncol*, 8, 120-134.
- MATSUI, Y., TAKAGI, H., QU, X., ABDELLATIF, M., SAKODA, H., ASANO, T., LEVINE, B. & SADOSHIMA, J. 2007. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*, 100, 914-22.

- MAULUCCI, G., CHIARPOTTO, M., PAPI, M., SAMENGO, D., PANI, G. & DE SPIRITO, M. 2015. Quantitative analysis of autophagic flux by confocal pH-imaging of autophagic intermediates. *Autophagy*, 11, 1905-16.
- MAUTHE, M., ORHON, I., ROCCHI, C., ZHOU, X., LUHR, M., HIJLKEMA, K. J., COPPES, R. P., ENGEDAL, N., MARI, M. & REGGIORI, F. 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14, 1435-1455.
- MAUVEZIN, C. & NEUFELD, T. P. 2015. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11, 1437-8.
- MAYCOTTE, P. & THORBURN, A. 2014. Targeting autophagy in breast cancer. *World J Clin Oncol*, 5, 224-40.
- MAYLIE, J., BOND, C. T., HERSON, P. S., LEE, W. S. & ADELMAN, J. P. 2004. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J Physiol*, 554, 255-61.
- MCCUBREY, J. A., STEELMAN, L. S., CHAPPELL, W. H., ABRAMS, S. L., WONG, E. W., CHANG, F., LEHMANN, B., TERRIAN, D. M., MILELLA, M., TAFURI, A., STIVALA, F., LIBRA, M., BASECKE, J., EVANGELISTI, C., MARTELLI, A. M. & FRANKLIN, R. A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1263-84.
- MCKENZIE, M., LIM, S. C. & DUCHEN, M. R. 2017. Simultaneous Measurement of Mitochondrial Calcium and Mitochondrial Membrane Potential in Live Cells by Fluorescent Microscopy. *J Vis Exp*.
- MCNAUGHTON-SMITH, G. A., BURNS, J. F., STOCKER, J. W., RIGDON, G. C., CREECH, C., ARRINGTON, S., SHELTON, T. & DE FRANCESCHI, L. 2008. Novel inhibitors of the Gardos channel for the treatment of sickle cell disease. *J Med Chem*, 51, 976-82.
- MCPHERSON, K., STEEL, C. M. & DIXON, J. M. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, 321, 624-8.
- MCTAGGART, J. S., CLARK, R. H. & ASHCROFT, F. M. 2010. The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *J Physiol*, 588, 3201-9.
- MEERA, P., WALLNER, M., SONG, M. & TORO, L. 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 14066-71.
- MILLER, C. 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*, 1, REVIEWS0004.
- MIZUSHIMA, N. & YOSHIMORI, T. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3, 542-5.
- MO, X., ZHANG, C. F., XU, P., DING, M., MA, Z. J., SUN, Q., LIU, Y., BI, H. K., GUO, X., ABDELATY, A., HU, C., XU, H. J., ZHOU, G. R., JIA, Y. L. & XIA, H. P. 2022. KCNN4-mediated Ca(2+)/MET/AKT axis is promising for targeted therapy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Acta Pharmacol Sin*, 43, 735-746.
- MOHR, C. J. 2020. *KCa channels in breast cancer development, progression and response to endocrine and radiation therapy*. Dr. rer. nat., Universität Tübingen.
- MOHR, C. J., GROSS, D., SEZGIN, E. C., STEUDEL, F. A., RUTH, P., HUBER, S. M. & LUKOWSKI, R. 2019a. KCa3.1 Channels Confer Radioresistance to Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 11.
- MOHR, C. J., SCHROTH, W., MURDTER, T. E., GROSS, D., MAIER, S., STEGEN, B., DRAGOI, A., STEUDEL, F. A., STEHLING, S., HOPPE, R., MADDEN, S., RUTH, P., HUBER, S. M., BRAUCH, H. & LUKOWSKI, R. 2022. Subunits of BK channels promote breast cancer development and modulate responses to endocrine treatment in preclinical models. *Br J Pharmacol*, 179, 2906-2924.
- MOHR, C. J., STEUDEL, F. A., GROSS, D., RUTH, P., LO, W. Y., HOPPE, R., SCHROTH, W., BRAUCH, H., HUBER, S. M. & LUKOWSKI, R. 2019b. Cancer-Associated Intermediate Conductance Ca(2+)-Activated K(+) Channel KCa3.1. *Cancers (Basel)*, 11.
- MOO, T. A., SANFORD, R., DANG, C. & MORROW, M. 2018. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin*, 13, 339-354.
- MOOKERJEE, S. A. & BRAND, M. D. 2015. Measurement and Analysis of Extracellular Acid Production to Determine Glycolytic Rate. *J Vis Exp*, e53464.
- MORALES, P., GARNEAU, L., KLEIN, H., LAVOIE, M. F., PARENT, L. & SAUVE, R. 2013. Contribution of the KCa3.1 channel-calmodulin interactions to the regulation of the KCa3.1 gating process. *J Gen Physiol*, 142, 37-60.
- MOWERS, E. E., SHARIFI, M. N. & MACLEOD, K. F. 2018. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. *FEBS J*, 285, 1751-1766.
- MULLER, B., LEWIS, N., ADENIYI, T., LEESE, H. J., BRISON, D. R. & STURMEY, R. G. 2019. Application of extracellular flux analysis for determining mitochondrial function in mammalian oocytes and early embryos. *Sci Rep*, 9, 16778.
- MULLER, M., STOCKMANN, M., MALAN, D., WOLHEIM, A., TISCHENDORF, M., LINTA, L., KATZ, S. F., LIN, Q., LATZ, S., BRUNNER, C., WOBUS, A. M., ZENKE, M., WARTENBERG, M., BOECKERS, T. M., VON WICHERT, G., FLEISCHMANN, B. K., LIEBAU, S. & KLEGER, A. 2012. Ca²⁺ activated K channels-new tools to induce cardiac commitment from pluripotent stem cells in mice and men. *Stem Cell Rev Rep*, 8, 720-40.
- MUZ, B., DE LA PUENTE, P., AZAB, F. & AZAB, A. K. 2015. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*, 3, 83-92.
- NAGINI, S. 2017. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem*, 17, 152-163.

- NAKADA, Y., STEWART, T. G., PENA, C. G., ZHANG, S., ZHAO, N., BARDEESY, N., SHARPLESS, N. E., WONG, K. K., HAYES, D. N. & CASTRILLON, D. H. 2013. The LKB1 tumor suppressor as a biomarker in mouse and human tissues. *PLoS One*, 8, e73449.
- NAMBIAR, M., KARI, V. & RAGHAVAN, S. C. 2008. Chromosomal translocations in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1786, 139-52.
- NATHANSON, K. L., WOOSTER, R. & WEBER, B. L. 2001. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med*, 7, 552-6.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, N. I. O. H. *Cancer Classification* [Online]. <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>. Available: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html> [Accessed 24.05.22 2022].
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, N. I. O. H. *Tumor* [Online]. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor>: cancer.gov. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor> [Accessed 2022].
- NEGRI, T., TARANTINO, E., ORSENIGO, M., REID, J. F., GARIBOLDI, M., ZAMBETTI, M., PIEROTTI, M. A. & PILOTTI, S. 2010. Chromosome band 17q21 in breast cancer: significant association between beclin 1 loss and HER2/NEU amplification. *Genes Chromosomes Cancer*, 49, 901-9.
- NG, A. K. & TRAVIS, L. B. 2009. Radiation therapy and breast cancer risk. *J Natl Compr Canc Netw*, 7, 1121-8.
- NGUYEN, C. & PANDEY, S. 2019. Exploiting Mitochondrial Vulnerabilities to Trigger Apoptosis Selectively in Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 11.
- NGUYEN, H. M., SINGH, V., PRESSLY, B., JENKINS, D. P., WULFF, H. & YAROV-YAROVYOY, V. 2017. Structural Insights into the Atomistic Mechanisms of Action of Small Molecule Inhibitors Targeting the KCa3.1 Channel Pore. *Mol Pharmacol*, 91, 392-402.
- NGUYEN, T. M., COMBARNOUS, Y., PRAUD, C., DUITTOZ, A. & BLESBOIS, E. 2016. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinases (CaMKKs) Effects on AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Regulation of Chicken Sperm Functions. *PLoS One*, 11, e0147559.
- NI, H. M., WILLIAMS, J. A., JAESCHKE, H. & DING, W. X. 2013. Zonated induction of autophagy and mitochondrial spheroids limits acetaminophen-induced necrosis in the liver. *Redox Biol*, 1, 427-32.
- NIKOLETOPOULOU, V., MARKAKI, M., PALIKARAS, K. & TAVERNARAKIS, N. 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3448-3459.
- NILIUS, B. & WOHLRAB, W. 1992. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol*, 445, 537-48.
- NWADIKE, C., WILLIAMSON, L. E., GALLAGHER, L. E., GUAN, J. L. & CHAN, E. Y. W. 2018. AMPK Inhibits ULK1-Dependent Autophagosome Formation and Lysosomal Acidification via Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol*, 38.
- O'NEIL, R. G., WU, L. & MULLANI, N. 2005. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Mol Imaging Biol*, 7, 388-92.
- OH, W. J. & JACINTO, E. 2011. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle*, 10, 2305-16.
- OLIVER, D., KLOCKER, N., SCHUCK, J., BAUKROWITZ, T., RUPPERSBERG, J. P. & FAKLER, B. 2000. Gating of Ca²⁺-activated K⁺ channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron*, 26, 595-601.
- OPENSTAX-COLLEGE 2013. *Biology*, OpenStax College, © 2013 by Rice University.
- OSELLAME, L. D., BLACKER, T. S. & DUCHEN, M. R. 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 26, 711-23.
- OUADID-AHIDOUCH, H. & AHIDOUCH, A. 2013. K(+) channels and cell cycle progression in tumor cells. *Front Physiol*, 4, 220.
- OUADID-AHIDOUCH, H., ROUDBARAKI, M., DELCOURT, P., AHIDOUCH, A., JOURY, N. & PREVARSKAYA, N. 2004. Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C125-34.
- PALM, W. 2021. Metabolic plasticity allows cancer cells to thrive under nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- PALMER, A. E., GIACOMELLO, M., KORTEMME, T., HIRES, S. A., LEV-RAM, V., BAKER, D. & TSIEN, R. Y. 2006. Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol*, 13, 521-30.
- PALMER, A. E., JIN, C., REED, J. C. & TSIEN, R. Y. 2004. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17404-9.
- PAMENTER, M. E. 2014. Mitochondria: a multimodal hub of hypoxia tolerance. *Canadian Journal of Zoology*, 92, 569-589.
- PAN, B., GUO, J., LIAO, Q. & ZHAO, Y. 2018. beta1 and beta3 integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication. *Oncol Lett*, 15, 5412-5416.
- PAPANDREOU, I., LIM, A. L., LADEROUTE, K. & DENKO, N. C. 2008. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ*, 15, 1572-81.
- PARDO, L. A. 2004. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)*, 19, 285-92.
- PARDO, L. A. & STUHMER, W. 2014. The roles of K(+) channels in cancer. *Nat Rev Cancer*, 14, 39-48.
- PARK, Y. B. 1994. Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, 481 (Pt 3), 555-70.

- PARKER, S. J., SVENSSON, R. U., DIVAKARUNI, A. S., LEFEBVRE, A. E., MURPHY, A. N., SHAW, R. J. & METALLO, C. M. 2017. LKB1 promotes metabolic flexibility in response to energy stress. *Metab Eng*, 43, 208-217.
- PARZYCH, K. R. & KLIONSKY, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- PASTAR, I., LIANG, L., SAWAYA, A. P., WIKRAMANAYAKE, T. C., GLINOS, G. D., DRAKULICH, S., CHEN, V., STOJADINOVIC, O., DAVIS, S. C. & TOMIC-CANIC, M. 2018. 10 - Preclinical models for wound-healing studies. In: MARQUES, A. P., PIRRACO, R. P., CERQUEIRA, M. T. & REIS, R. L. (eds.) *Skin Tissue Models*. Boston: Academic Press.
- PAVLOVA, N. N., ZHU, J. & THOMPSON, C. B. 2022. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metab*, 34, 355-377.
- PAYNE, S. L., RAM, P., SRINIVASAN, D. H., LE, T. T., LEVIN, M. & OUDIN, M. J. 2022. Potassium channel-driven bioelectric signalling regulates metastasis in triple-negative breast cancer. *EBioMedicine*, 75, 103767.
- PEDARZANI, P. & STOCKER, M. 2008. Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3196-217.
- PEQLAB. 2022. *peqGOLD RNAPure System* [Online]. VWR: Peqlab. Available: https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/17035112/contents [Accessed 05.10.2022 2022].
- PETERSEN, A. G., LIND, P. C., JENSEN, A. B., EGGERTSEN, M. A., GRANFELDT, A. & SIMONSEN, U. 2021. Treatment with senicapoc in a porcine model of acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med Exp*, 9, 20.
- PETERSEN, A. G., LIND, P. C., MOGENSEN, S., JENSEN, A. B., GRANFELDT, A. & SIMONSEN, U. 2022. Treatment with senicapoc, a KCa 3.1 channel blocker, alleviates hypoxaemia in a mouse model of acute respiratory distress syndrome. *Br J Pharmacol*, 179, 2175-2192.
- PETERSEN, O. H. & VERKHRATSKY, A. 2016. Calcium and ATP control multiple vital functions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371.
- PFEFFERLE, A. D., HERSCHKOWITZ, J. I., USARY, J., HARRELL, J. C., SPIKE, B. T., ADAMS, J. R., TORRES-ARZAYUS, M. I., BROWN, M., EGAN, S. E., WAHL, G. M., ROSEN, J. M. & PEROU, C. M. 2013. Transcriptomic classification of genetically engineered mouse models of breast cancer identifies human subtype counterparts. *Genome Biol*, 14, R125.
- PIJUAN, J., BARCELO, C., MORENO, D. F., MAIQUES, O., SISO, P., MARTI, R. M., MACIA, A. & PANOSA, A. 2019. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front Cell Dev Biol*, 7, 107.
- PILLOZZI, S., D'AMICO, M., BARTOLI, G., GASPAROLI, L., PETRONI, G., CROCIANI, O., MARZO, T., GUERRIERO, A., MESSORI, L., SEVERI, M., UDISTI, R., WULFF, H., CHANDY, K. G., BECCHETTI, A. & ARCANGELI, A. 2018. The combined activation of KCa3.1 and inhibition of Kv11.1/hERG1 currents contribute to overcome Cisplatin resistance in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*, 118, 200-212.
- PLC., A. 1998-2022. *Glycolysis Assay [Extracellular acidification] (ab197244)* [Online]. abcam.com: Abcam plc. Available: <https://www.abcam.com/glycolysis-assay-extracellular-acidification-ab197244.html> [Accessed].
- POLYAK, K. & KALLURI, R. 2010. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003244.
- PORPORATO, P. E., DHUP, S., DADHICH, R. K., COPETTI, T. & SONVEAUX, P. 2011. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol*, 2, 49.
- POTTER, M., NEWPORT, E. & MORTEN, K. J. 2016. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*, 44, 1499-1505.
- PREVARSKAYA, N., SKRYMA, R. & SHUBA, Y. 2018. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol Rev*, 98, 559-621.
- PRIMERBLAST, N.-. 2021. PrimerBlast. ncbi.nlm.nih.gov: NCBI.
- PUGH, P. L., AHMED, S. F., SMITH, M. I., UPTON, N. & HUNTER, A. J. 2004. A behavioural characterisation of the FVB/N mouse strain. *Behavioural Brain Research*, 155, 283-289.
- PUISSANT, A., FENOUILLE, N. & AUBERGER, P. 2012. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res*, 2, 397-413.
- PULLIAM, T. L., GOLI, P., AWAD, D., LIN, C., WILKENFELD, S. R. & FRIGO, D. E. 2022. Regulation and role of CAMKK2 in prostate cancer. *Nat Rev Urol*.
- QADIR, M. A., KWOK, B., DRAGOWSKA, W. H., TO, K. H., LE, D., BALLY, M. B. & GORSKI, S. M. 2008. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat*, 112, 389-403.
- QIANG, L., ZHAO, B., MING, M., WANG, N., HE, T. C., HWANG, S., THORBURN, A. & HE, Y. Y. 2014. Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 9241-6.
- QIAO, A., GU, F., GUO, X., ZHANG, X. & FU, L. 2016. Breast cancer-associated fibroblasts: their roles in tumor initiation, progression and clinical applications. *Front Med*, 10, 33-40.
- QIAO, M., SHENG, S. & PARDEE, A. B. 2008. Metastasis and AKT activation. *Cell Cycle*, 7, 2991-6.
- RABINOWITZ, J. D. & WHITE, E. 2010. Autophagy and metabolism. *Science*, 330, 1344-8.
- RABJERG, M., OLIVAN-VIGUERA, A., HANSEN, L. K., JENSEN, L., SEVELSTED-MOLLER, L., WALTER, S., JENSEN, B. L., MARCUSSEN, N. & KOHLER, R. 2015. High expression of KCa3.1 in patients with clear cell renal carcinoma predicts high metastatic risk and poor survival. *PLoS One*, 10, e0122992.

- RACIOPPI, L. & MEANS, A. R. 2012. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem*, 287, 31658-65.
- RACIOPPI, L., NELSON, E. R., HUANG, W., MUKHERJEE, D., LAWRENCE, S. A., LENTO, W., MASCI, A. M., JIAO, Y., PARK, S., YORK, B., LIU, Y., BAEK, A. E., DREWRY, D. H., ZUERCHER, W. J., BERTANI, F. R., BUSINARO, L., GERADTS, J., HALL, A., MEANS, A. R., CHAO, N., CHANG, C. Y. & MCDONNELL, D. P. 2019. CaMKK2 in myeloid cells is a key regulator of the immune-suppressive microenvironment in breast cancer. *Nat Commun*, 10, 2450.
- RAMUS, S. J. & GAYTHER, S. A. 2009. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol Oncol*, 3, 138-50.
- RANKIN, E. B. & GIACCIA, A. J. 2016. Hypoxic control of metastasis. *Science*, 352, 175-80.
- REDALEN, K. R. 2006. *In vivo Magnetic Resonance Spectroscopy and Diffusion Weighted Magnetic Resonance Imaging for Non-Invasive Monitoring of Treatment Response of Subcutaneous HT29 Xenografts in Mice* [Online]. ps://www.researchgate.net/publication/27800093: researchgate. Available: https://www.researchgate.net/profile/Kathrine-Redalen/publication/278000934_In_vivo_Magnetic_Resonance_Spectroscopy_and_Diffusion_Weighted_Magnetic_Resonance_Imaging_for_Non-Invasive_Monitoring_of_Treatment_Response_of_Subcutaneous_HT29_Xenografts_in_Mice/links/558c19c708ae591c19d9eb23/In-vivo-Magnetic-Resonance-Spectroscopy-and-Diffusion-Weighted-Magnetic-Resonance-Imaging-for-Non-Invasive-Monitoring-of-Treatment-Response-of-Subcutaneous-HT29-Xenografts-in-Mice.pdf?origin=publication_detail [Accessed].
- REICH, E. P., CUI, L., YANG, L., PUGLIESE-SIVO, C., GOLOVKO, A., PETRO, M., VASSILEVA, G., CHU, I., NOMEIR, A. A., ZHANG, L. K., LIANG, X., KOZLOWSKI, J. A., NARULA, S. K., ZAVODNY, P. J. & CHOU, C. C. 2005. Blocking ion channel KCNN4 alleviates the symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur J Immunol*, 35, 1027-36.
- RENSHAW, S. 2013. Chapter 4.2 - Immunohistochemistry and Immunocytochemistry. In: WILD, D. (ed.) *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*. Oxford: Elsevier.
- REVATHIDEVI, S. & MUNIRAJAN, A. K. 2019. Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol*, 59, 80-91.
- RIO, R. V., MALTZ, M., MCCORMICK, B., REISS, A. & GRAF, J. 2009. Symbiont succession during embryonic development of the European medicinal leech, *Hirudo verbana*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 6890-5.
- ROBEY, I. F., LIEN, A. D., WELSH, S. J., BAGGETT, B. K. & GILLIES, R. J. 2005. Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia*, 7, 324-30.
- ROBLES-MARTINEZ, L., GARAY, E., MARTEL-GALLEGOS, M. G., CISNEROS-MEJORADO, A., PEREZ-MONTIEL, D., LARA, A. & ARELLANO, R. O. 2017. Kca3.1 Activation Via P2y2 Purinergic Receptors Promotes Human Ovarian Cancer Cell (Skov-3) Migration. *Sci Rep*, 7, 4340.
- ROSA, P., CATACUZZENO, L., SFORNA, L., MANGINO, G., CARLOMAGNO, S., MINCIONE, G., PETROZZA, V., RAGONA, G., FRANCIOLINI, F. & CALOGERO, A. 2018. BK channels blockage inhibits hypoxia-induced migration and chemoresistance to cisplatin in human glioblastoma cells. *J Cell Physiol*, 233, 6866-6877.
- ROSA, P., SFORNA, L., CARLOMAGNO, S., MANGINO, G., MISCUSI, M., PESSIA, M., FRANCIOLINI, F., CALOGERO, A. & CATACUZZENO, L. 2017. Overexpression of Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Human Glioblastoma Stem-Like Cells and Their Role in Cell Migration. *J Cell Physiol*, 232, 2478-2488.
- ROSSARI, F., ZUCCHINETTI, C., BUDA, G. & ORCIUOLO, E. 2020. Tumor dormancy as an alternative step in the development of chemoresistance and metastasis - clinical implications. *Cell Oncol (Dordr)*, 43, 155-176.
- ROTKO, D., KUNZ, W. S., SZEWCZYK, A. & KULAWIAK, B. 2020. Signaling pathways targeting mitochondrial potassium channels. *Int J Biochem Cell Biol*, 125, 105792.
- ROY, S. K., SRIVASTAVA, R. K. & SHANKAR, S. 2010. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J Mol Signal*, 5, 10.
- RUBINSZTEIN, D. C., GESTWICKI, J. E., MURPHY, L. O. & KLIONSKY, D. J. 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 304-12.
- RUTTER, G. A., BURNETT, P., RIZZUTO, R., BRINI, M., MURGIA, M., POZZAN, T., TAVARE, J. M. & DENTON, R. M. 1996. Subcellular imaging of intramitochondrial Ca²⁺ with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5489-94.
- SAH, P. 1996. Ca(2+)-activated K+ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci*, 19, 150-4.
- SAKASHITA, M., AOYAMA, N., MINAMI, R., MAEKAWA, S., KURODA, K., SHIRASAKA, D., ICHIHARA, T., KURODA, Y., MAEDA, S. & KASUGA, M. 2001. Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features. *Eur J Cancer*, 37, 204-9.
- SAMADDAR, J. S., GADDY, V. T., DUPLANTIER, J., THANDAVAN, S. P., SHAH, M., SMITH, M. J., BROWNING, D., RAWSON, J., SMITH, S. B., BARRETT, J. T. & SCHOENLEIN, P. V. 2008. A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance. *Mol Cancer Ther*, 7, 2977-87.
- SANCHEZ-CESPEDES, M. 2007. A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene*, 26, 7825-32.

- SANCHEZ-GONZALEZ, C. & FORMENTINI, L. 2021. An optimized protocol for coupling oxygen consumption rates with beta-oxidation in isolated mitochondria from mouse soleus. *STAR Protoc*, 2, 100735.
- SARKAR, S., HORN, G., MOULTON, K., OZA, A., BYLER, S., KOKOLUS, S. & LONGACRE, M. 2013. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *Int J Mol Sci*, 14, 21087-113.
- SASSI, N., DE MARCHI, U., FIORETTI, B., BIASUTTO, L., GULBINS, E., FRANCIOLINI, F., SZABO, I. & ZORATTI, M. 2010. An investigation of the occurrence and properties of the mitochondrial intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel mtKCa3.1. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 1260-7.
- SAUSBIER, M., HU, H., ARNTZ, C., FEIL, S., KAMM, S., ADELSBERGER, H., SAUSBIER, U., SAILER, C. A., FEIL, R., HOFMANN, F., KORTH, M., SHIPSTON, M. J., KNAUS, H. G., WOLFER, D. P., PEDROARENA, C. M., STORM, J. F. & RUTH, P. 2004. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9474-8.
- SAUSBIER, M., MATOS, J. E., SAUSBIER, U., BERANEK, G., ARNTZ, C., NEUHUBER, W., RUTH, P. & LEIPZIGER, J. 2006. Distal colonic K(+) secretion occurs via BK channels. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1275-82.
- SCHEEPERS, A., JOOST, H. G. & SCHURMANN, A. 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 28, 364-71.
- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182, 311-322.
- SCHRETTER, C. E., VIELMETTER, J., BARTOS, I., MARKA, Z., MARKA, S., ARGADE, S. & MAZMANIAN, S. K. 2018. A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nature*, 563, 402-406.
- SCHÜSSELE, D. S., HALLER, P. K., HAAS, M. L., HUNTER, C., SPORBECK, K. & PROIKAS-CEZANNE, T. 2022. Autophagy profiling in single cells with open source CellProfiler-based image analysis. *Autophagy*, 1-14.
- SCHWAB, A., FABIAN, A., HANLEY, P. J. & STOCK, C. 2012. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev*, 92, 1865-913.
- SCHWAB, A., WULF, A., SCHULZ, C., KESSLER, W., NECHYPORUK-ZLOY, V., ROMER, M., REINHARDT, J., WEINHOLD, D., DIETERICH, P., STOCK, C. & HEBERT, S. C. 2006. Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *J Cell Physiol*, 206, 86-94.
- SEILER, L., MATYAS, S. & FLECKENSTEIN-GRUN, G. 1999. Extracellular ATP increases [Ca²⁺]_i in primarily cultured pig coronary smooth muscle cells via a P2Y purinoceptor subtype. *J Cardiovasc Pharmacol*, 33, 807-13.
- SEMENZA, G. L. 2016. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863, 382-391.
- SFORNA, L., MEGARO, A., PESSIA, M., FRANCIOLINI, F. & CATACUZZENO, L. 2018. Structure, Gating and Basic Functions of the Ca²⁺-activated K Channel of Intermediate Conductance. *Curr Neuropharmacol*, 16, 608-617.
- SGARBI, G., BARBATO, S., COSTANZINI, A., SOLAINI, G. & BARACCA, A. 2018. The role of the ATPase inhibitor factor 1 (IF1) in cancer cells adaptation to hypoxia and anoxia. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859, 99-109.
- SHACKELFORD, D. B. & SHAW, R. J. 2009. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 9, 563-75.
- SHARIFI, M. N., MOWERS, E. E., DRAKE, L. E., COLLIER, C., CHEN, H., ZAMORA, M., MUI, S. & MACLEOD, K. F. 2016. Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Rep*, 15, 1660-72.
- SHAW, R. J., KOSMATKA, M., BARDEESY, N., HURLEY, R. L., WITTERS, L. A., DEPINHO, R. A. & CANTLEY, L. C. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3329-35.
- SHE, G., HOU, M. C., ZHANG, Y., ZHANG, Y., WANG, Y., WANG, H. F., LAI, B. C., ZHAO, W. B., DU, X. J. & DENG, X. L. 2020. Gal-3 (Galectin-3) and KCa3.1 Mediate Heterogeneous Cell Coupling and Myocardial Fibrogenesis Driven by betaAR (beta-Adrenoceptor) Activation. *Hypertension*, 75, 393-404.
- SHIEH, C. C., COGHLAN, M., SULLIVAN, J. P. & GOPALAKRISHNAN, M. 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*, 52, 557-94.
- SHIN, J. S., HONG, S. W., LEE, S. L., KIM, T. H., PARK, I. C., AN, S. K., LEE, W. K., LIM, J. S., KIM, K. I., YANG, Y., LEE, S. S., JIN, D. H. & LEE, M. S. 2008. Serum starvation induces G1 arrest through suppression of Skp2-CDK2 and CDK4 in SK-OV-3 cells. *Int J Oncol*, 32, 435-9.
- SHUMILINA, E., LAM, R. S., WOLBING, F., MATZNER, N., ZEMTSOVA, I. M., SOBIESIAK, M., MAHMUD, H., SAUSBIER, U., BIEDERMANN, T., RUTH, P., SAUSBIER, M. & LANG, F. 2008. Blunted IgE-mediated activation of mast cells in mice lacking the Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa3.1. *J Immunol*, 180, 8040-7.
- SIGNAGENLABORATORIES. 2009. *PolyJet In Vitro DNA Transfection Reagent* [Online]. signagen.com: Signagen. Available: <https://signagen.com/DataSheet/SL100688.pdf> [Accessed 13.12.2022].
- SINGLETERY, S. E. 2003. Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg*, 237, 474-82.
- SISHI, B. J., LOOS, B., VAN ROOYEN, J. & ENGELBRECHT, A. M. 2013. Autophagy upregulation promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Pharmacol*, 85, 124-34.
- SOPIK, V., PHELAN, C., CYBULSKI, C. & NAROD, S. A. 2015. BRCA1 and BRCA2 mutations and the risk for colorectal cancer. *Clin Genet*, 87, 411-8.
- STEGEN, B., BUTZ, L., KLUMPP, L., ZIPS, D., DITTMANN, K., RUTH, P. & HUBER, S. M. 2015. Ca²⁺-Activated IK K⁺ Channel Blockade Radiosensitizes Glioblastoma Cells. *Mol Cancer Res*, 13, 1283-95.

- STEUDEL, F. A. 2016. *Die Bedeutung der Ca²⁺-aktivierten Kaliumkanäle vom IK- und BK-Typ für die Entstehung und Therapie von Brustkrebs*. Dr. rer. nat., Universität Tübingen.
- STEUDEL, F. A., MOHR, C. J., STEGEN, B., NGUYEN, H. Y., BARNERT, A., STEINLE, M., BEER-HAMMER, S., KOCH, P., LO, W. Y., SCHROTH, W., HOPPE, R., BRAUCH, H., RUTH, P., HUBER, S. M. & LUKOWSKI, R. 2017. SK4 channels modulate Ca(2+) signalling and cell cycle progression in murine breast cancer. *Mol Oncol*, 11, 1172-1188.
- STOCKER, J. W., DE FRANCESCHI, L., MCNAUGHTON-SMITH, G. A., CORROCHER, R., BEUZARD, Y. & BRUGNARA, C. 2003. ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice. *Blood*, 101, 2412-8.
- STOCKERT, J. C., BLÁZQUEZ-CASTRO, A., CAÑETE, M., HOROBIN, R. W. & VILLANUEVA, Á. 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114, 785-796.
- SU, M., MEI, Y. & SINHA, S. 2013. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. *J Oncol*, 2013, 102735.
- SU, T., LI, X., YANG, M., SHAO, Q., ZHAO, Y., MA, C. & WANG, P. 2020. Autophagy: An Intracellular Degradation Pathway Regulating Plant Survival and Stress Response. *Front Plant Sci*, 11, 164.
- SUN, G., RONG, D., LI, Z., SUN, G., WU, F., LI, X., CAO, H., CHENG, Y., TANG, W. & SUN, Y. 2021. Role of Small Molecule Targeted Compounds in Cancer: Progress, Opportunities, and Challenges. *Front Cell Dev Biol*, 9, 694363.
- SUN, H., HUANG, W., JI, F., PAN, Y. & YANG, L. 2022. Comparisons of Metastatic Patterns, Survival Outcomes and Tumor Immune Microenvironment Between Young and Non-Young Breast Cancer Patients. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10.
- SUN, K., GUO, X. L., ZHAO, Q. D., JING, Y. Y., KOU, X. R., XIE, X. Q., ZHOU, Y., CAI, N., GAO, L., ZHAO, X., ZHANG, S. S., SONG, J. R., LI, D., DENG, W. J., LI, R., WU, M. C. & WEI, L. X. 2013. Paradoxical role of autophagy in the dysplastic and tumor-forming stages of hepatocarcinoma development in rats. *Cell Death Dis*, 4, e501.
- SUN, W. L., CHEN, J., WANG, Y. P. & ZHENG, H. 2011. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy*, 7, 1035-44.
- SUN, X. & KAUFMAN, P. D. 2018. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127, 175-186.
- SUN, X., WANG, M., WANG, M., YAO, L., LI, X., DONG, H., LI, M., SUN, T., LIU, X., LIU, Y. & XU, Y. 2020. Role of Proton-Coupled Monocarboxylate Transporters in Cancer: From Metabolic Crosstalk to Therapeutic Potential. *Front Cell Dev Biol*, 8, 651.
- SUN, Y. S., ZHAO, Z., YANG, Z. N., XU, F., LU, H. J., ZHU, Z. Y., SHI, W., JIANG, J., YAO, P. P. & ZHU, H. P. 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, 13, 1387-1397.
- SUNDARARAMAN, A., AMIRTHAM, U. & RANGARAJAN, A. 2016. Calcium-Oxidant Signaling Network Regulates AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Activation upon Matrix Deprivation. *J Biol Chem*, 291, 14410-29.
- SUNDELACRUZ, S., LEVIN, M. & KAPLAN, D. L. 2009. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev Rep*, 5, 231-46.
- SUPPIRAMANIAM, V., ABDEL-RAHMAN, E. A., BUABEID, M. A. & PARAMESHWARAN, K. 2010. 13.09 - Ion Channels*. In: MCQUEEN, C. A. (ed.) *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier.
- SUZANNE CLANCY, N. E. 2008. *DNA Damage & Repair: Mechanisms for Maintaining DNA Integrity*, *Nature Education* 1(1):103 [Online]. Nature Education 1(1):103: © 2008 Nature Education. Available: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-damage-repair-mechanisms-for-maintaining-dna-344/> [Accessed].
- SVASTI, J. & PANIJAN, B. 1977. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A simple explanation of why it works. *Journal of Chemical Education*, 54, 560.
- SWEDE, H., MOYSICH, K. B., FREUDENHEIM, J. L., QUIRK, J. T., MUTI, P. C., HURD, T. C., EDGE, S. B., WINSTON, J. S. & MICHALEK, A. M. 2001. Breast cancer risk factors and HER2 over-expression in tumors. *Cancer Detect Prev*, 25, 511-9.
- SYMERSKY, J., OSOWSKI, D., WALTERS, D. E. & MUELLER, D. M. 2012. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13961-5.
- SZABLEWSKI, L. 2013. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1835, 164-9.
- SZABO, I., ZORATTI, M. & BIASUTTO, L. 2021. Targeting mitochondrial ion channels for cancer therapy. *Redox Biol*, 42, 101846.
- SZABO, I., ZORATTI, M. & GULBINS, E. 2010. Contribution of voltage-gated potassium channels to the regulation of apoptosis. *FEBS Lett*, 584, 2049-56.
- SZTARK, F., PAYEN, J. F., PIRIOU, V., RIGOLET, M., VENTURA-CLAPIER, R., MAZAT, J. P., LEVERVE, X. & JANVIER, G. 1999. [Cellular energy metabolism: physiologic and pathologic aspects]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 18, 261-9.
- TAKEICHI, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*, 59, 237-52.
- TANAKA, M. & MATSUI, T. 2021. Chapter 11 - Methodologies for investigating the vasorelaxation action of peptides. In: TOLDRÁ, F. & WU, J. (eds.) *Biologically Active Peptides*. Academic Press.
- TANG, X. D., SANTARELLI, L. C., HEINEMANN, S. H. & HOSHI, T. 2004. Metabolic regulation of potassium channels. *Annu Rev Physiol*, 66, 131-59.
- TANIDA, I., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2503-18.

- TANIDA, I., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88.
- TERMAN, A. & BRUNK, U. T. 2005. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. *Cardiovasc Res*, 68, 355-65.
- THERMOFISHERSCIENTIFIC. 2015. *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* [Online]. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225> [Accessed 01.07.2022].
- THOMPSON, H. G., HARRIS, J. W., WOLD, B. J., LIN, F. & BRODY, J. P. 2003. p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene*, 22, 2322-33.
- TODESCA, L. M., MASKRI, S., BROMMEL, K., THALE, I., WUNSCH, B., KOCH, O. & SCHWAB, A. 2021. Targeting Kca3.1 Channels in Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 55, 131-144.
- TOYAMA, K., WULFF, H., CHANDY, K. G., AZAM, P., RAMAN, G., SAITO, T., FUJIWARA, Y., MATTSON, D. L., DAS, S., MELVIN, J. E., PRATT, P. F., HATOUM, O. A., GUTTERMAN, D. D., HARDER, D. R. & MIURA, H. 2008. The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans. *J Clin Invest*, 118, 3025-37.
- TSOU, P., ZHENG, B., HSU, C. H., SASAKI, A. T. & CANTLEY, L. C. 2011. A fluorescent reporter of AMPK activity and cellular energy stress. *Cell Metab*, 13, 476-486.
- TURNER, K. L., HONASOGE, A., ROBERT, S. M., MCFERRIN, M. M. & SONTHEIMER, H. 2014. A proinvasive role for the Ca(2+) -activated K(+) channel KCa3.1 in malignant glioma. *Glia*, 62, 971-81.
- TURNER, R. W., KRUSKIC, M., TEVES, M., SCHEIDL-YEE, T., HAMEED, S. & ZAMPONI, G. W. 2015. Neuronal expression of the intermediate conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 in the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch*, 467, 311-28.
- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M. & ROZEN, S. G. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40, e115.
- URREGO, D., TOMCZAK, A. P., ZAHED, F., STUHMER, W. & PARDO, L. A. 2014. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369, 20130094.
- VALVERDE, M. A., CANTERO-RECASENS, G., GARCIA-ELIAS, A., JUNG, C., CARRERAS-SUREDA, A. & VICENTE, R. 2011. Ion channels in asthma. *J Biol Chem*, 286, 32877-82.
- VAN HOLM, W., GHESQUIERE, J., BOON, N., VERSPECHT, T., BERNAERTS, K., ZAYED, N., CHATZIGIANNIDOU, I. & TEUGHEL, W. 2021. A Viability Quantitative PCR Dilemma: Are Longer Amplicons Better? *Appl Environ Microbiol*, 87, e0265320.
- VANDORPE, D. H., SHMUKLER, B. E., JIANG, L., LIM, B., MAYLIE, J., ADELMAN, J. P., DE FRANCESCHI, L., CAPPELLINI, M. D., BRUGNARA, C. & ALPER, S. L. 1998. cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca2+-gated K+ channel, mIK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation. *J Biol Chem*, 273, 21542-53.
- VASILEV, A., SOFI, R., SMITH, S. J., RAHMAN, R., TESCHEMACHER, A. G. & KASPAROV, S. 2021. Feasibility of Photodynamic Therapy for Glioblastoma with the Mitochondria-Targeted Photosensitizer Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM). *Biomedicines*, 9.
- VAZQUEZ-MARTIN, A., OLIVERAS-FERRAROS, C. & MENENDEZ, J. A. 2009. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One*, 4, e6251.
- VEGA, G., GUEQUEN, A., PHILP, A. R., GIANOTTI, A., ARZOLA, L., VILLALON, M., ZEGARRA-MORAN, O., GALIETTA, L. J., MALL, M. A. & FLORES, C. A. 2020. Lack of Kcnn4 improves mucociliary clearance in muco-obstructive lung disease. *JCI Insight*, 5.
- VERA-RAMIREZ, L., VODNALA, S. K., NINI, R., HUNTER, K. W. & GREEN, J. E. 2018. Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nat Commun*, 9, 1944.
- VERDERAME, M., ALCORTA, D., EGNOR, M., SMITH, K. & POLLACK, R. 1980. Cytoskeletal F-actin patterns quantitated with fluorescein isothiocyanate-phalloidin in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 6624-8.
- VERGARA, C., LATORRE, R., MARRION, N. V. & ADELMAN, J. P. 1998. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*, 8, 321-9.
- VORONINA, S. G., BARROW, S. L., SIMPSON, A. W., GERASIMENKO, O. V., DA SILVA XAVIER, G., RUTTER, G. A., PETERSEN, O. H. & TEPIKIN, A. V. 2010. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*, 138, 1976-87.
- WALKER, J. M. 1994. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. In: WALKER, J. M. (ed.) *Basic Protein and Peptide Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- WALVEKAR, A., RASHIDA, Z., MADDALI, H. & LAXMAN, S. 2018. A versatile LC-MS/MS approach for comprehensive, quantitative analysis of central metabolic pathways. *Wellcome Open Res*, 3, 122.
- WANG, C., WANG, H., ZHANG, D., LUO, W., LIU, R., XU, D., DIAO, L., LIAO, L. & LIU, Z. 2018. Phosphorylation of ULK1 affects autophagosome fusion and links chaperone-mediated autophagy to macroautophagy. *Nat Commun*, 9, 3492.
- WANG, L., ZHANG, S. & WANG, X. 2020. The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. *Front Oncol*, 10, 602416.
- WANG, R., WANG, J., HASSAN, A., LEE, C. H., XIE, X. S. & LI, X. 2021. Molecular basis of V-ATPase inhibition by bafilomycin A1. *Nat Commun*, 12, 1782.
- WANG, R. C. & LEVINE, B. 2010. Autophagy in cellular growth control. *FEBS Lett*, 584, 1417-26.
- WARBURG, O., WIND, F. & NEGELEIN, E. 1927. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*, 8, 519-30.

- WEBSTER, M. A., HUTCHINSON, J. N., RAUH, M. J., MUTHUSWAMY, S. K., ANTON, M., TORTORICE, C. G., CARDIFF, R. D., GRAHAM, F. L., HASSELL, J. A. & MULLER, W. J. 1998. Requirement for both Shc and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways in polyomavirus middle T-mediated mammary tumorigenesis. *Mol Cell Biol*, 18, 2344-59.
- WEINBERG, R. A. 1996. How cancer arises. *Sci Am*, 275, 62-70.
- WEISBROD, D., KHUN, S. H., BUENO, H., PERETZ, A. & ATTALI, B. 2016. Mechanisms underlying the cardiac pacemaker: the role of SK4 calcium-activated potassium channels. *Acta Pharmacol Sin*, 37, 82-97.
- WEISBROD, D., PERETZ, A., ZISKIND, A., MENAKER, N., OZ, S., BARAD, L., ELIYAHU, S., ITSKOVITZ-ELDOR, J., DASCAL, N., KHANANSHVILI, D., BINAH, O. & ATTALI, B. 2013. SK4 Ca²⁺ activated K⁺ channel is a critical player in cardiac pacemaker derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E1685-94.
- WERBECK, J. L., THUDI, N. K., MARTIN, C. K., PREMANANDAN, C., YU, L., OSTROWKSI, M. C. & ROSOL, T. J. 2014. Tumor microenvironment regulates metastasis and metastasis genes of mouse MMTV-PyMT mammary cancer cells in vivo. *Vet Pathol*, 51, 868-81.
- WESSELBORG, S. & STORK, B. 2015. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci*, 72, 4721-57.
- WHITE, A. J., BRADSHAW, P. T., HERRING, A. H., TEITELBAUM, S. L., BEYEA, J., STELLMAN, S. D., STECK, S. E., MORDUKHOVICH, I., ENG, S. M., ENGEL, L. S., CONWAY, K., HATCH, M., NEUGUT, A. I., SANTELLA, R. M. & GAMMON, M. D. 2016. Exposure to multiple sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer incidence. *Environ Int*, 89-90, 185-92.
- WHITE, D., III, LOTHAR LAUTERBOECK, PARNIA MOBASHERAN, TETSUYA KITAGUCHI, ANTOINE H. CHAANINE, AND QINGLIN YANG. 2023. Real-Time Visualization of Cytosolic and Mitochondrial ATP Dynamics in Response to Metabolic Stress in Cultured Cells. *Cells*.
- WHITE, E. & DIPOLA, R. S. 2009. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*, 15, 5308-16.
- WHO. 2021. *Breast cancer* [Online]. who.int: WHO. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> [Accessed 26.07.2022 2022].
- WILLIAMS, A., JAHREISS, L., SARKAR, S., SAIKI, S., MENZIES, F. M., RAVIKUMAR, B. & RUBINSZTEIN, D. C. 2006. Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr Top Dev Biol*, 76, 89-101.
- WILLOWS, R., NAVARATNAM, N., LIMA, A., READ, J. & CARLING, D. 2017. Effect of different gamma-subunit isoforms on the regulation of AMPK. *Biochem J*, 474, 1741-1754.
- WIZA, C., NASCIMENTO, E. B. & OUWENS, D. M. 2012. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302, E1453-60.
- WOLFF, M. S. & WESTON, A. 1997. Breast cancer risk and environmental exposures. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 4, 891-6.
- WOLFLE, S. E., SCHMIDT, V. J., HOYER, J., KOHLER, R. & DE WIT, C. 2009. Prominent role of KCa_{3.1} in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo. *Cardiovasc Res*, 82, 476-83.
- WRZOSEK, A., GALECKA, S., ZOCHOWSKA, M., OLSZEWSKA, A. & KULAWIAK, B. 2022. Alternative Targets for Modulators of Mitochondrial Potassium Channels. *Molecules*, 27.
- WU, F., LIU, Y., CHENG, H., MENG, Y., SHI, J., CHEN, Y. & WU, Y. 2021a. Enhanced Cancer Starvation Therapy Based on Glucose Oxidase/3-Methyladenine-Loaded Dendritic Mesoporous OrganoSilicon Nanoparticles. *Biomolecules*, 11.
- WU, H., TIAN, W., TAI, X., LI, X., LI, Z., SHUI, J., YU, J., WANG, Z. & ZHU, X. 2021b. Identification and functional analysis of novel oncogene DDX60L in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Genomics*, 22, 833.
- WU, J., LIU, L., MATSUDA, T., ZHAO, Y., REBANE, A., DROBIZHEV, M., CHANG, Y. F., ARAKI, S., ARAI, Y., MARCH, K., HUGHES, T. E., SAGOU, K., MIYATA, T., NAGAI, T., LI, W. H. & CAMPBELL, R. E. 2013. Improved orange and red Ca²⁺/I⁻ indicators and photophysical considerations for optogenetic applications. *ACS Chem Neurosci*, 4, 963-72.
- WU, M., NEILSON, A., SWIFT, A. L., MORAN, R., TAMAGNINE, J., PARSLLOW, D., ARMISTEAD, S., LEMIRE, K., ORRELL, J., TEICH, J., CHOMICZ, S. & FERRICK, D. A. 2007. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C125-36.
- WU, S. Z., RODEN, D. L., AL-ERYANI, G., BARTONICEK, N., HARVEY, K., CAZET, A. S., CHAN, C. L., JUNANKAR, S., HUI, M. N., MILLAR, E. A., BERETOV, J., HORVATH, L., JOSHUA, A. M., STRICKER, P., WILMOTT, J. S., QUEK, C., LONG, G. V., SCOLYER, R. A., YEUNG, B. Z., SEGARA, D., MAK, C., WARRIER, S., POWELL, J. E., O'TOOLE, S., LIM, E. & SWARBRICK, A. 2021c. Cryopreservation of human cancers conserves tumour heterogeneity for single-cell multi-omics analysis. *Genome Med*, 13, 81.
- WULFF, H. & CASTLE, N. A. 2010. Therapeutic potential of KCa_{3.1} blockers: recent advances and promising trends. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 3, 385-96.
- WULFF, H., CHEN, Y.-J., RAMAN, G. & GREGORY, C. 2007a. TRAM-34, a Blocker of the Calcium-activated Potassium Channel KCa_{3.1}, Prevents Acute Transplant Rejection. *Clinical Immunology*, 123, S173.
- WULFF, H., GUTMAN, G. A., CAHALAN, M. D. & CHANDY, K. G. 2001. Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa₁. *J Biol Chem*, 276, 32040-5.

- WULFF, H., KNAUS, H. G., PENNINGTON, M. & CHANDY, K. G. 2004. K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol*, 173, 776-86.
- WULFF, H., KOLSKI-ANDREACO, A., SANKARANARAYANAN, A., SABATIER, J. M. & SHAKKOTTAI, V. 2007b. Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Curr Med Chem*, 14, 1437-57.
- WULFF, H., MILLER, M. J., HANSEL, W., GRISSMER, S., CAHALAN, M. D. & CHANDY, K. G. 2000. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8151-6.
- XIA, H., LI, S., LI, X., WANG, W., BIAN, Y., WEI, S., GROVE, S., WANG, W., VATAN, L., LIU, J. R., MCLEAN, K., RATTAN, R., MUNKARAH, A., GUAN, J. L., KRYCZEK, I. & ZOU, W. 2020. Autophagic adaptation to oxidative stress alters peritoneal residential macrophage survival and ovarian cancer metastasis. *JCI Insight*, 5.
- XIA, X. M., FAKLER, B., RIVARD, A., WAYMAN, G., JOHNSON-PAIS, T., KEEN, J. E., ISHII, T., HIRSCHBERG, B., BOND, C. T., LUTSENKO, S., MAYLIE, J. & ADELMAN, J. P. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395, 503-7.
- XIE, H., LU, J., ZHU, Y., MENG, X. & WANG, R. 2018. The KCa3.1 blocker TRAM-34 inhibits proliferation of fibroblasts in paraquat-induced pulmonary fibrosis. *Toxicol Lett*, 295, 408-415.
- XIE, M., ZHANG, D., DYCK, J. R., LI, Y., ZHANG, H., MORISHIMA, M., MANN, D. L., TAFFET, G. E., BALDINI, A., KHOURY, D. S. & SCHNEIDER, M. D. 2006. A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17378-83.
- XIE, Z., DONG, Y., SCHOLZ, R., NEUMANN, D. & ZOU, M. H. 2008. Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation*, 117, 952-62.
- XIE, Z., DONG, Y., ZHANG, J., SCHOLZ, R., NEUMANN, D. & ZOU, M. H. 2009. Identification of the serine 307 of LKB1 as a novel phosphorylation site essential for its nucleocytoplasmic transport and endothelial cell angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 29, 3582-96.
- XIONG, N., XIONG, J., JIA, M., LIU, L., ZHANG, X., CHEN, Z., HUANG, J., ZHANG, Z., HOU, L., LUO, Z., GHOORAH, D., LIN, Z. & WANG, T. 2013. The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. *Behav Brain Funct*, 9, 13.
- XU, J., ELSHAZLY, A. M. & GEWIRTZ, D. A. 2022. The Cytoprotective, Cytotoxic and Nonprotective Functional Forms of Autophagy Induced by Microtubule Poisons in Tumor Cells-Implications for Autophagy Modulation as a Therapeutic Strategy. *Biomedicines*, 10.
- XU, P., MO, X., XIA, R., JIANG, L., ZHANG, C., XU, H., SUN, Q., ZHOU, G., ZHANG, Y., WANG, Y. & XIA, H. 2021. KCNN4 promotes the progression of lung adenocarcinoma by activating the AKT and ERK signaling pathways. *Cancer Biomark*, 31, 187-201.
- XU, Z., HAN, X., OU, D., LIU, T., LI, Z., JIANG, G., LIU, J. & ZHANG, J. 2020. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104, 575-587.
- XUE, C., WANG, X., PENG, R., SHI, Y., QIN, T., LIU, D., TENG, X., WANG, S., ZHANG, L. & YUAN, Z. 2012. Distribution, clinicopathologic features and survival of breast cancer subtypes in Southern China. *Cancer Sci*, 103, 1679-87.
- YADAV, D., TRIPATHI, Y. B., SINGH, P., KESHARWANI, R. K. & KESERVANI, R. K. 2017. 2 - Roles of AMP, ADP, ATP, and AMPK in Healthy Energy Boosting and Prolonged Life Span. In: BAGCHI, D. (ed.) *Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity*. Academic Press.
- YAMADA, H., SEKI, G., TANIGUCHI, S., UWATOKO, S., SUZUKI, K. & KUROKAWA, K. 1996. Mechanism of [Ca²⁺]_i increase by extracellular ATP in isolated rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol*, 270, C1096-104.
- YANG, M., CAMARA, A. K. S., ALDAKKAK, M., KWOK, W. M. & STOWE, D. F. 2017. Identity and function of a cardiac mitochondrial small conductance Ca(2+)-activated K(+) channel splice variant. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1858, 442-458.
- YANG, X., KIM, M. Y., HA, J. & LEE, S. H. 2019. Overexpression of the Soybean NAC Gene GmNAC109 Increases Lateral Root Formation and Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis Plants. *Front Plant Sci*, 10, 1036.
- YANG, Y., CHAI, X., XIN, W., WANG, D., DAI, C., QIAN, F. & YANG, T. 2021. Generation and characterization of a high-affinity chimeric anti-OX40 antibody with potent antitumor activity. *FEBS Lett*, 595, 1587-1603.
- YANG, Y. & KLIONSKY, D. J. 2020. Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death Differ*, 27, 858-871.
- YANG, Z., KIRTON, H. M., MACDOUGALL, D. A., BOYLE, J. P., DEUCHARS, J., FRATER, B., PONNAMBALAM, S., HARDY, M. E., WHITE, E., CALAGHAN, S. C., PEERS, C. & STEELE, D. S. 2015. The Golgi apparatus is a functionally distinct Ca²⁺ store regulated by the PKA and Epac branches of the beta1-adrenergic signaling pathway. *Sci Signal*, 8, ra101.
- YE, B., JIANG, L. L., XU, H. T., ZHOU, D. W. & LI, Z. S. 2012. Expression of PI3K/AKT pathway in gastric cancer and its blockade suppresses tumor growth and metastasis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 25, 627-36.
- YE, Z., WANG, S., ZHANG, C. & ZHAO, Y. 2020. Coordinated Modulation of Energy Metabolism and Inflammation by Branched-Chain Amino Acids and Fatty Acids. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 617.
- YETKIN-ARIK, B., VOGELS, I. M. C., NOWAK-SLIWINSKA, P., WEISS, A., HOUTKOOPER, R. H., VAN NOORDEN, C. J. F., KLAASSEN, I. & SCHLINGEMANN, R. O. 2019. The role of glycolysis and

- mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Sci Rep*, 9, 12608.
- YI, Y., CHEN, D., AO, J., ZHANG, W., YI, J., REN, X., FEI, J., LI, F., NIU, M., CHEN, H., LUO, Y., LUO, Z. & XIAO, Z. J. 2020. Transcriptional suppression of AMPK α 1 promotes breast cancer metastasis upon oncogene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 8013-8021.
- YIN, Z., PASCUAL, C. & KLIONSKY, D. J. 2016. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*, 3, 588-596.
- YOO, H. Y., ZHENG, H., NAM, J. H., NGUYEN, Y. H., KANG, T. M., EARM, Y. E. & KIM, S. J. 2008. Facilitation of Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) by mibefradil in B lymphocytes. *Pflugers Arch*, 456, 549-60.
- YU, L., SUN, C., SONG, D., SHEN, J., XU, N., GUNASEKERA, A., HAJDUK, P. J. & OLEJNICZAK, E. T. 2005. Nuclear magnetic resonance structural studies of a potassium channel-charybdotoxin complex. *Biochemistry*, 44, 15834-41.
- YU, Z., DOU, F., WANG, Y., HOU, L. & CHEN, H. 2018. Ca(2+)-dependent endoplasmic reticulum stress correlation with astrogliosis involves upregulation of KCa3.1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. *J Neuroinflammation*, 15, 316.
- YU, Z., WANG, Y., QIN, L. & CHEN, H. 2017. Functional Cooperation between KCa3.1 and TRPV4 Channels in Bronchial Smooth Muscle Cell Proliferation Associated with Chronic Asthma. *Front Pharmacol*, 8, 559.
- YUN, C. W., JEON, J., GO, G., LEE, J. H. & LEE, S. H. 2020. The Dual Role of Autophagy in Cancer Development and a Therapeutic Strategy for Cancer by Targeting Autophagy. *Int J Mol Sci*, 22.
- YUN, C. W. & LEE, S. H. 2018. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci*, 19.
- YUNG, H. W., CHARNOCK-JONES, D. S. & BURTON, G. J. 2011. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. *PLoS One*, 6, e17894.
- ZADRAN, S., STANDLEY, S., WONG, K., OTINIANO, E., AMIGHI, A. & BAUDRY, M. 2012. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96, 895-902.
- ZANDER-FOX, D. L., FULLSTON, T., MCPHERSON, N. O., SANDEMAN, L., KANG, W. X., GOOD, S. B., SPILLANE, M. & LANE, M. 2015. Reduction of Mitochondrial Function by FCCP During Mouse Cleavage Stage Embryo Culture Reduces Birth Weight and Impairs the Metabolic Health of Offspring. *Biol Reprod*, 92, 124.
- ZANOTELLI, M. R., RAHMAN-ZAMAN, A., VANDERBURGH, J. A., TAUFALLELE, P. V., JAIN, A., ERICKSON, D., BORDELEAU, F. & REINHART-KING, C. A. 2019. Energetic costs regulated by cell mechanics and confinement are predictive of migration path during decision-making. *Nat Commun*, 10, 4185.
- ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN, G. D. E. K. I. D. 2018. Krebs in Deutschland für 2017/2018. In: ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN, G. D. E. K. I. D. (ed.) 13 ed. Robert Koch-Institut: Robert Koch-Institut, Berlin 2021.
- ZEQIRAJ, E., FILIPPI, B. M., DEAK, M., ALESSI, D. R. & VAN AALTEN, D. M. 2009. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science*, 326, 1707-11.
- ZHANG, B., HOU, R., ZOU, Z., LUO, T., ZHANG, Y., WANG, L. & WANG, B. 2018. Mechanically induced autophagy is associated with ATP metabolism and cellular viability in osteocytes in vitro. *Redox Biol*, 14, 492-498.
- ZHANG, B. & LIU, L. 2021. Autophagy is a double-edged sword in the therapy of colorectal cancer. *Oncol Lett*, 21, 378.
- ZHANG, B. B., WANG, D. G., GUO, F. F. & XUAN, C. 2015. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in cancer stem cells. *Fam Cancer*, 14, 19-23.
- ZHANG, C. S., HAWLEY, S. A., ZONG, Y., LI, M., WANG, Z., GRAY, A., MA, T., CUI, J., FENG, J. W., ZHU, M., WU, Y. Q., LI, T. Y., YE, Z., LIN, S. Y., YIN, H., PIAO, H. L., HARDIE, D. G. & LIN, S. C. 2017. Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature*, 548, 112-116.
- ZHANG, H., KONG, Q., WANG, J., JIANG, Y. & HUA, H. 2020. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol*, 9, 32.
- ZHANG, P., YANG, X., YIN, Q., YI, J., SHEN, W., ZHAO, L., ZHU, Z. & LIU, J. 2016. Inhibition of SK4 Potassium Channels Suppresses Cell Proliferation, Migration and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One*, 11, e0154471.
- ZHANG, Y. & YANG, J. M. 2013. Altered energy metabolism in cancer: a unique opportunity for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther*, 14, 81-9.
- ZHAO, H., GUO, E., HU, T., SUN, Q., WU, J., LIN, X., LUO, D., SUN, C., WANG, C., ZHOU, B., LI, N., XIA, M., LU, H., MENG, L., XU, X., HU, J., MA, D., CHEN, G. & ZHU, T. 2016. KCNN4 and S100A14 act as predictors of recurrence in optimally debulked patients with serous ovarian cancer. *Oncotarget*, 7, 43924-43938.
- ZHAO, R. Z., JIANG, S., ZHANG, L. & YU, Z. B. 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*, 44, 3-15.
- ZHENG, B., JEONG, J. H., ASARA, J. M., YUAN, Y. Y., GRANTER, S. R., CHIN, L. & CANTLEY, L. C. 2009. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol Cell*, 33, 237-47.
- ZHENG, J. 2012. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett*, 4, 1151-1157.
- ZHOU, X., CLISTER, T. L., LOWRY, P. R., SELDIN, M. M., WONG, G. W. & ZHANG, J. 2015. Dynamic Visualization of mTORC1 Activity in Living Cells. *Cell Rep*, 10, 1767-1777.
- ZHOU, X. & MOORE, B. B. 2017. Lung Section Staining and Microscopy. *Bio Protoc*, 7.

- ZHU, W., QU, H., XU, K., JIA, B., LI, H., DU, Y., LIU, G., WEI, H. J. & ZHAO, H. Y. 2017. Differences in the starvation-induced autophagy response in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Anim Cells Syst (Seoul)*, 21, 190-198.
- ZHUANG, Z. G., DI, G. H., SHEN, Z. Z., DING, J. & SHAO, Z. M. 2006. Enhanced expression of LKB1 in breast cancer cells attenuates angiogenesis, invasion, and metastatic potential. *Mol Cancer Res*, 4, 843-9.

9 Anhang

9.1 Ergänzende Experimente in MMTV-PyMT WT- und IK KO-Zellen

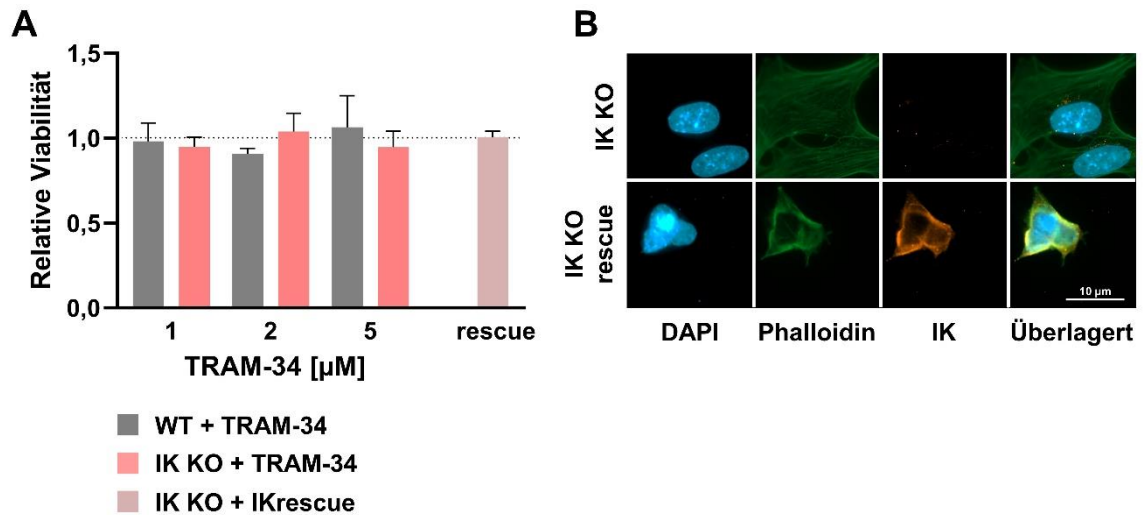


Abbildung 9.1: Einfluss der IK-Kanal-Modulatoren auf die MMTV-PyMT Zell-Viabilität, sowie die transiente IK Kanal Expression

(A) MTT-Analysen von MMTV-PyMT WT- (grauer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (lachsarbener Balken), welche 48 h mit 0 bis 5 μ M TRAM-34 behandelt wurden, oder IK KO-Zellen, welche mit dem IK-Kanal transfiziert wurden (IK rescue, hellrote Balken). Die Daten sind auf die mit DMSO behandelte Kontrolle normalisiert und stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT \pm TRAM-34; IK KO \pm TRAM-34/ IK rescue-Plasmid dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (B) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder (IF) von DAPI (blau, links), Phalloidin (grün, Mitte links), IK (orange, Mitte rechts), und überlagerten Aufnahmen (Überlagert, rechts) von MMTV-PyMT IK KO (obere Reihe) und MMTV-PyMT IK KO, transfiziert mit dem IK-Kanal (untere Reihe). N= 5 IK KO; N=5 IK rescue. Maßstabsbalken: 10 μ m. (DAPI: Nukleus-Marker/ 4',6-Diamidin-2-phenylindol) Modifizierte Grafiken A und B basierend auf (Gross et al., 2022).

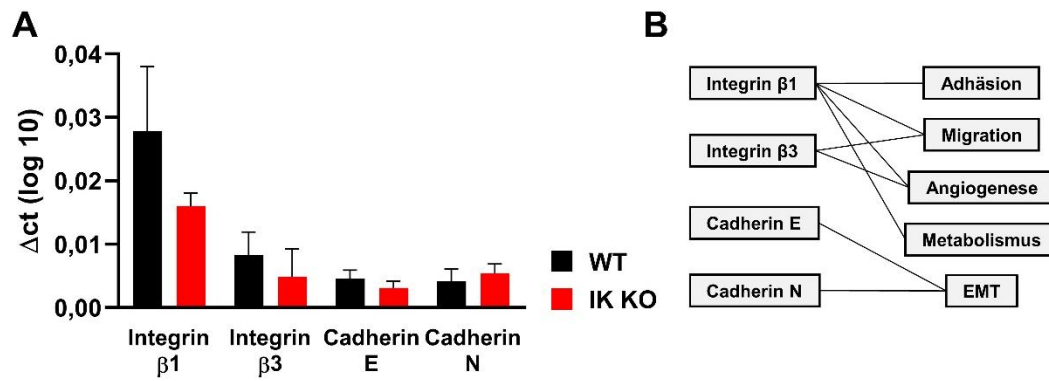


Abbildung 9.2: Einfluss des IK-Kanals auf das Metastasierungsverhalten in MMTV-PyMT Tumorzellen und Geweben

(A) qPCR-Analyse von Integrin β1, Integrin β3, Cadherin E und Cadherin N aus cDNA von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (B) Übersichts-schemata der in (C) genannten Gene und deren Interaktion (schwarze Verbindungsstriche) mit gängigen Migrations- und Metastasierungsprozessen. (EMT: Epithelial-mesenchymale Transition)

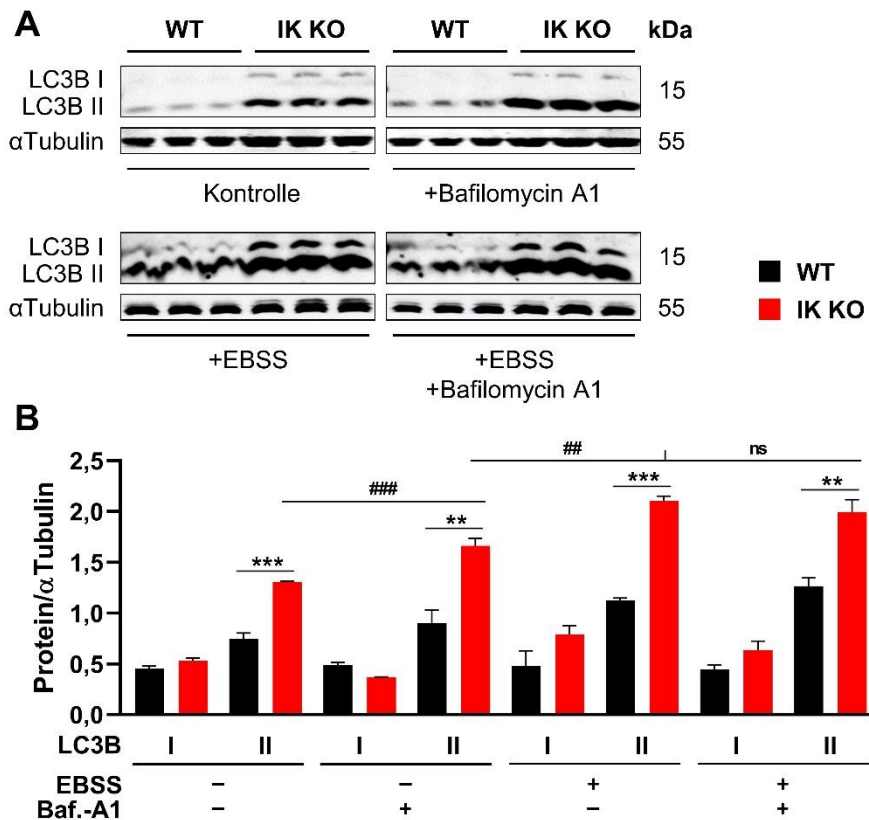


Abbildung 9.3: Auswirkungen des IK-Kanals auf den autophagischen Flux in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Western Blot-Analyse von α Tubulin und LC3B (I und II) von Protein Lysaten aus MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts), welche entweder nicht, mit EBSS, Bafilomycin A1 oder einer Kombination aus EBSS und Bafilomycin A1 behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. (B) Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (A) und Normalisierung von LC3B (I und II) auf α Tubulin, von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO (rote Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA und Multiplen t-Test, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ zwischen Genotypen; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe. (EBSS: Salzlösung/ Earles Balanced Salts Solution). Die Graphen wurden in Zusammenarbeit mit K. Sporbeck (Interfakultäres Institut für Zell Biologie, Universität Tübingen) erstellt. Modifizierte Grafiken A und B basierend auf (Gross et al., 2022).

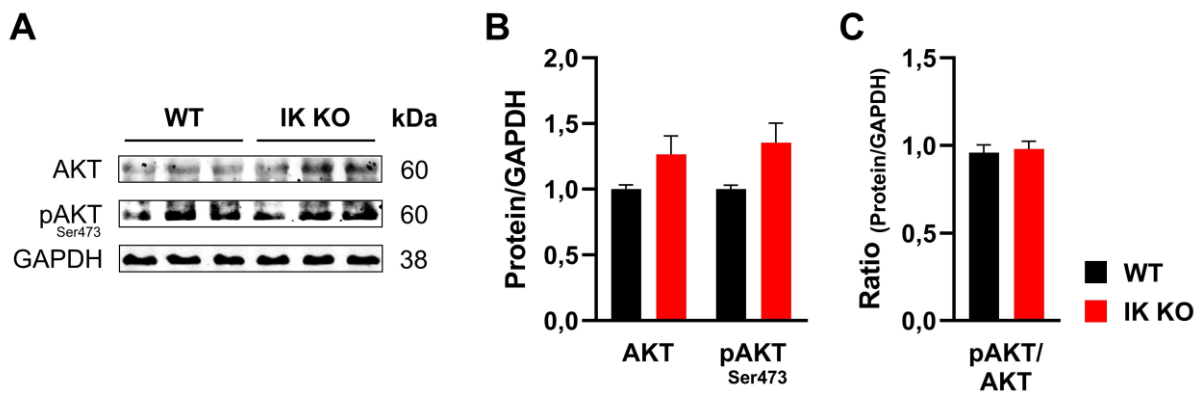


Abbildung 9.4: Effekte der IK-Ablation auf die Proteinkinase B (AKT) in MMTV-PyMT Tumorzellen
(A) Western Blot-Analyse von AKT, phosphoryliertem AKT an Ser473 und GAPDH von Protein Lysaten aus MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rechts). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N= 9 IK KO dar. **(B)** Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (A) und Normalisierung von AKT und phosphorylierten AKT auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT IK KO (roter Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N= 9 IK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (AKT: Proteinkinase B; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Modifizierte Grafiken A–C basierend auf (Gross et al., 2022).

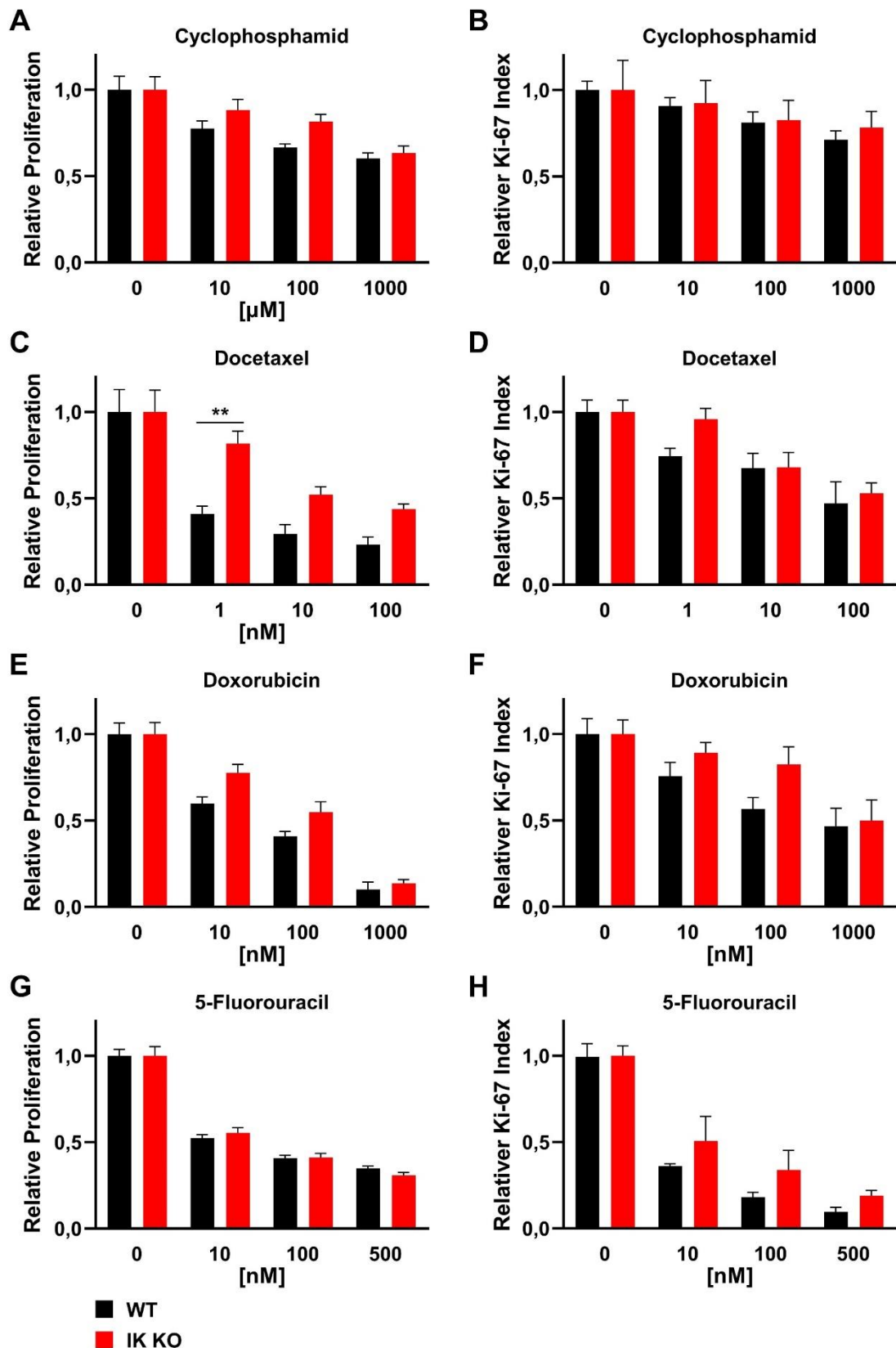


Abbildung 9.5: Auswirkungen der Zytostatika-Therapie auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT WT und IK KO-Zellen

Das Zellwachstum wurde quantitativ über Grid-Platten, oder die Ki-67 Expression über 3 Tage bestimmt (4.4). In den Panelen (A) bis (H) ist die relative Proliferation, sowie die relative Ki-67 Expression nach 72 h aufgetragen. Normalisiert wurde auf die unbehandelte Gruppe. (A) Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 μM Cyclophosphamid

über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=4 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(B)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 μ M Cyclophosphamid über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=3 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(C)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken), behandelt mit 0, 1, 10 oder 100 nM Docetaxel über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=4 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(D)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken), behandelt mit 0, 1, 10 oder 100 nM Docetaxel über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(E)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 nM Doxorubicin über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=5 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(F)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 nM Doxorubicin über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=4 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(G)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 500 nM 5-Fluorouracil über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=4 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(H)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT IK KO-Zellen (rote Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 500 nM 5-Fluorouracil über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=4 IK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. Modifizierte Grafiken A–H basierend auf (Mohr et al., 2019a).

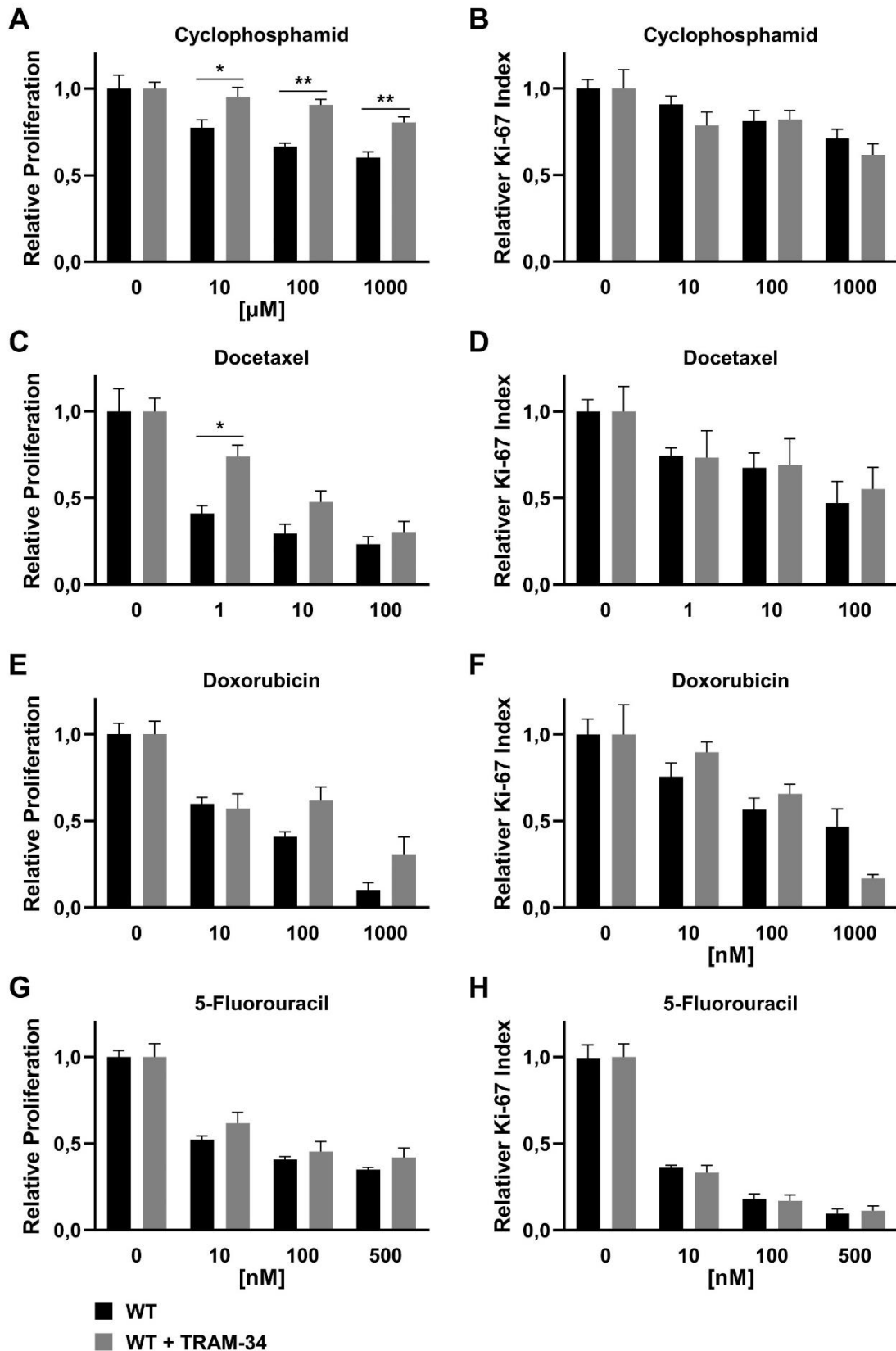
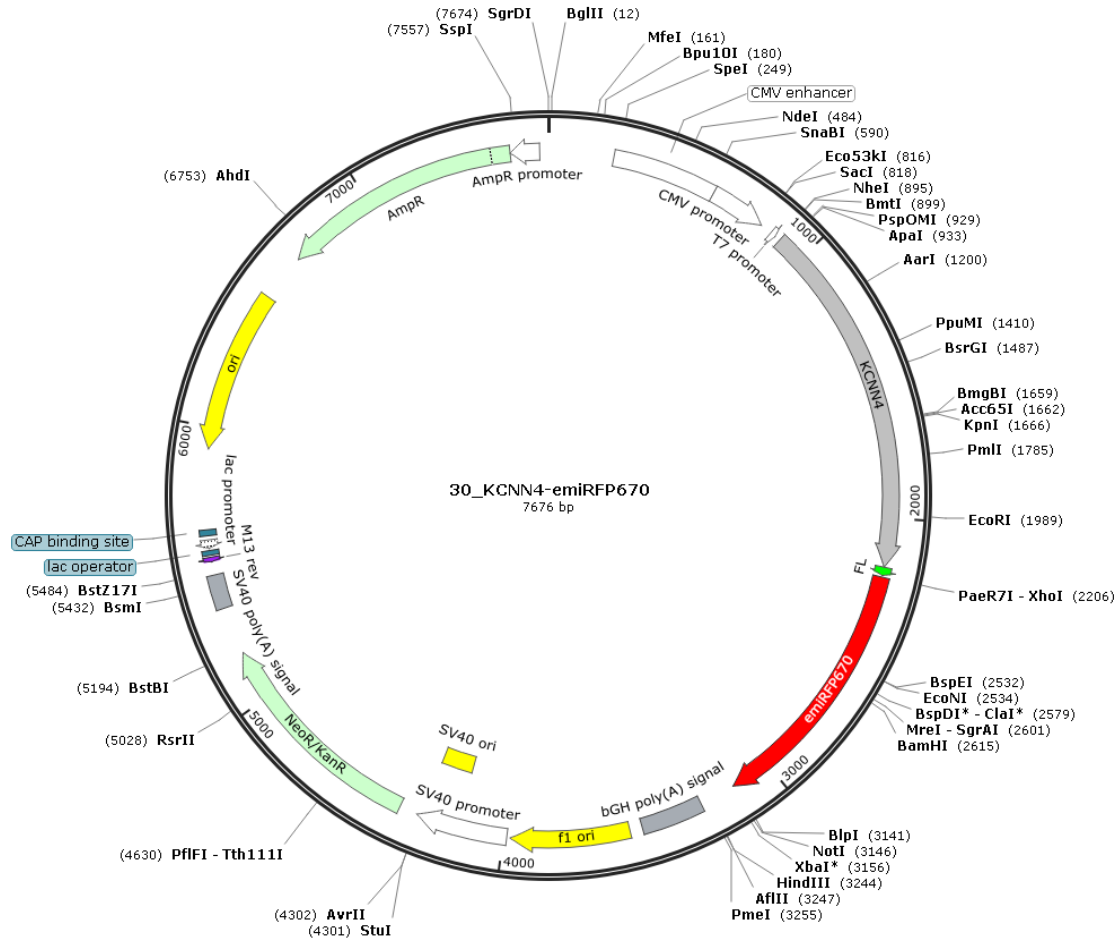


Abbildung 9.6: Auswirkungen der Zytostatika-Therapie auf das Wachstumsverhalten von TRAM-34 behandelten MMTV-PyMT WT-Zellen

Das Zellwachstum wurde quantitativ über Grid-Platten, oder die Ki-67 Expression über 3 Tage bestimmt (4.4). In den Panels (A) bis (H) ist die relative Proliferation, sowie die relative Ki-67 Expression nach 72 h aufgetragen. Normalisiert wurde auf die unbehandelte Gruppe. (A) Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT- Zellen + 10 μ M TRAM-34 (graue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 μ M

Cyclophosphamid über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=4 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. **(B)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT-Zellen + 10 μ M TRAM-34 (graue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 μ M Cyclophosphamid über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=6 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(C)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT-Zellen + 10 μ M TRAM-34 (graue Balken), behandelt mit 0, 1, 10 oder 100 nM Docetaxel über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=3 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA, * $p \leq 0,05$. **(D)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT-Zellen + 10 μ M TRAM-34 (graue Balken), behandelt mit 0, 1, 10 oder 100 nM Docetaxel über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=3 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(E)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT-Zellen + 10 μ M TRAM-34 (graue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 nM Doxorubicin über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=3 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(F)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT-Zellen + 10 μ M TRAM-34 (graue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 nM Doxorubicin über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=3 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(G)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT-Zellen + 10 μ M TRAM-34 (graue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 500 nM 5-Fluorouracil über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=3 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(H)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT-Zellen + 10 μ M TRAM-34 (graue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 500 nM 5-Fluorouracil über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=4 WT + TRAM-34 dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. Modifizierte Grafiken A–H basierend auf (Mohr et al., 2019a).



Name des Plasmids: *KCNN4 emiRFP670*

Backbone: pcDNA3.1(-)

Ursprungsplasmid:

- Name: *KCNN4 untagged* (MC200643, OriGene)
- Vektor: PCMV6-Kan/Neo
- Größe: 6197 bp, davon Insert: 1278 bp

DNA-Insert:

- Name: *emiRFP 670* (Bereitgestellt von R.Malli/ H. Bischof)
- Größe: 933 bp

Klonierungsstellen: XhoI / HindIII / NheI

Verwendete Materialien: (siehe 3.4.9)

- Q5 DNA-Polymerase
- Restriktionsenzym XhoI, HindIII, NheI
- Monarch DNA-Gel Extraktions Kit
- T4 DNA Ligase
- Taq DNA Polymerase

Klonierung nach Herstellerangaben

Sequenzierung: positiv evaluiert durch MycroSynth

>FOR

NATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCATGGGCGGG-
GAGCTGGTACTGGCCTGGGGGCCCTGAGACGGAGAAAGCGCCTGCTGGAGCAGGAGAAGAGGGTGGCC
GGCTGGGCGTTGGTGCTGGCGGGAAGTGGCATCGGACTCATGGTTCTGCACGCTGAGATGTT-
GTGGTTCCTGGGCTGCAAGTGGGTGCTGTACCTGCTCCTGGTTAAGTGTGTTGATCACCCCTGTCCACTGCCTT
CCTCCTTTGTCTTATTGGTCTTCCATGCCAAGGAGGTCCAGCTGTTTCATGACTGACAAC-
GGGCTCCGGGACTGGCGCTGGCGCTGACCCGGCGGCAGGTGGCGCAGATCCTGCTGGAGCTGTTGGTG
TGGGGGTGCACCCGGTGGCCCTACGGAGCCCGCACTGCGCCCTGGCGGGGAGGCCAC-
CGACGCGCAGCCCTGGCCGGGTTTCTGGGCGAAGGCGAGGCGTTGCTGTCCCTGGCCATGCTCCTGCGT
CTCTACCTGGTGCCTCCGCGGGTCTGCTGCTGCGCAGCGGGTCTCTGCTCAACGCGTCTACCG-
CAGCATCGGGGCGCTCAACCAAGTCCGCTTCCGCCACTGGTTCGTGGCCAAGCTGTACATGAACACGCACC
CGGGTGCCTGCTGCTGGGCTCACGCTGGGTCTCTGGCTCACCACAGCTT-
GGGTGCTGTCTGTGGCTGAGAGGCAGGCTGTCAATGCCACGGGGCACCTCACAGACACACTGTGGCTGATT
CCGATCACATTCCTGACCATTGGCTATGGGGACGTGGTACCTGGCACCATGTGGGGCAA-
GATTGTCTGCCTGTGCACCGGAGTCATGGGGTCTGCTGCACAGCTCTCCTGGTGGCTGTGGTGGCTCGGA
AGCTGGAGTTCAACAAGGCGGAGAAACACGTG-
CACAACCTCATGATGCACATCCATTATGCCAAAAGAGATGAAGGAGTCAGCGGCGCGGCTGCTGCAGGAAGC
CTGGATGTACTACAAGCACACTCGAAGGAAGGACTCCCGGGCTGCCCGCAGACATCAGCG-
CAAGATGCTGGCCGCCATCCACMCGTTCGCCAGGTACGGCTGAAACMCCGGAAGCTCCGG

>REV

TAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGGTTTAACTTAAGCTTTTAGCTCTCAA-
GCGCGGTGATCCGCGTGCAGATCCTTTTCGGCGAGCCGTTTGCAGATCGCCCGCAGCTCGAAACGGATGAA
GCGCGGCAGATAATGGTGACAGACAACCAGGCCCCACAGCTTGGCCCGGACCAC-
CAGCGACACCGCCAGGGTGGCGCGCACGCCATGTCTTCAGGAAGTGCAGATGGCACGGCGACATCGAG
CGCAGGAAGCAGCCCCGACATGTCTGA-
GATCGCGCCCCGTGAGCGGCGACAGCCGCGGCTCCAGCGGCACCGGCTGATAGGTGACGTCGACCAGCA
CGCGGACGCGCTGCCGCACGTACAGCTGCCGCGCCATCTGCGGGACAGTCGACGACGGA-
TAGCGGTTGCCGAAATAGGATTCGAGCCCAGGCACATGGCACTCGGAGAATACCAGGCCGTGGCCTTGCTC
ATCGAAACGATACACCATCACCCGGTCTGAGCCGGTGCCTGCTGAAACAGCAGCAC-
GGTGTCTATCGCACAGCGCGCGCAGTGAACCCGCCGTGCGGATCCGCTCCAGCGCCGGCGCCAGCGTGCCT
GACAGATCGATCGACGGGCCGCGCACGTTTCGAGTTCGATGATCAGCCCGCCTTCCG-
GAGGCCGATGCATCAGACCGCAGTACTCCGTAGAGGGATTGCCGATCCGGCAGCGCACCCGCGACCGGCAT
GCCTTCGGCGGTGGGATCGAGATGCGGCAGGATCTT-
GATCAACAGATCGCCGTCGATCTCGGCGAGCGGAACGCCGAGTACGCTTCCGAGATTCAGAAATTCCGCGG
CGTTGGCGCTGGCCTGGATGACGCGATGATCATGTTTCGCTGACGACCAGAA-
GCGCGCCATGCGGCTGGATCGAGCCGGCGAGGTGGATCTCTTTCATGTTTCGAGGTCAAGAGGTCAGGCTG
CCTGGCGACGGAGCCTTCCGCCATCTCGAGAGAGCCTCCACCGCCAGAGCCTCCAC-
CGCCTGTGGCCTCCTGGCTGGGTTCTGGTAGCTGCTGTTGCTGCAGGGCAGTGCCGAGCAGCTCTGTGAG
GGCATCCAGCTTTCTGCCAGACCGTGCATTCTCTTNCNCCAGGGCACGGTGCGAGGANCTGAAA

Abbildung 9.7 KCNN4 emiRFP 670 Plasmidkarte

Plasmidkarte, Herstellungsprotokoll und Sequenzier-Ergebnisse des eigens klonierten emiRFP-gekoppelten KCNN4-Plasmids. Dieses Plasmid exprimiert einen nicht funktionalen IK-Kanal in MMTV-PyMT Zellen, welcher Licht mit einer Wellenlänge von 670 nm emittiert. Hergestellt wurde dieses Plasmid in Zusammenarbeit mit H. Bischof (Experimentelle Pharmakologie, Universität Tübingen).

9.2 Ergänzende Experimente in MMTV-PyMT WT- und BK KO-Zellen

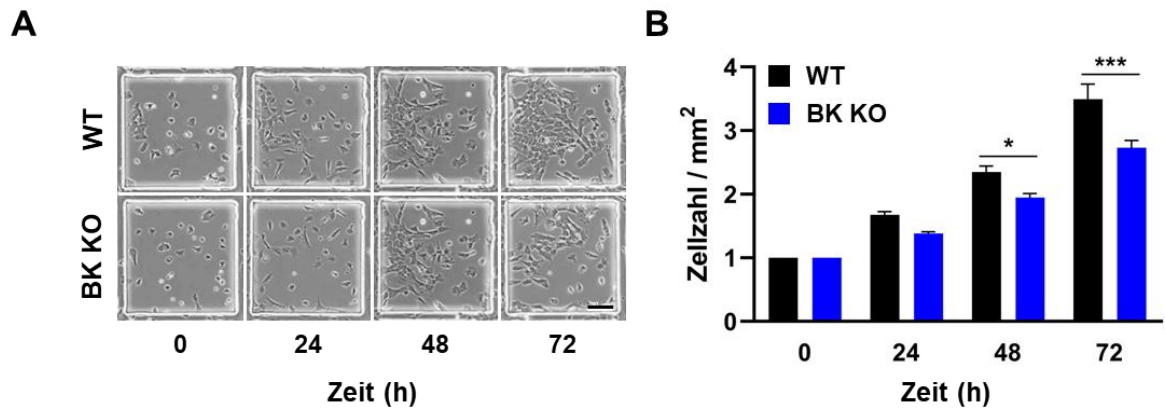


Abbildung 9.8: Auswirkungen des BK-Kanals auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT Tumorzellen
Die Zellen wurden wie in Abschnitt 4.4.1 in 500er-Grid-Platten ausgebracht und das Wachstum über 3 Tage kontrolliert. Maßstabsbalken 100 μm . **(A)** Repräsentative Abschnitte eines Raster-Quadranten von MMTV-PyMT WT- (obere Reihe) und BK KO-Zellen (untere Reihe) über vier Zeitpunkte (0–72 h). **(B)** Quantifizierung des Wachstums pro Quadratmillimeter von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO (blaue Balken), normiert auf den basalen 0 Stundenwert. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=21 WT; N=19 BK KO dar. Statistische Analyse durch One-Way ANOVA, * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

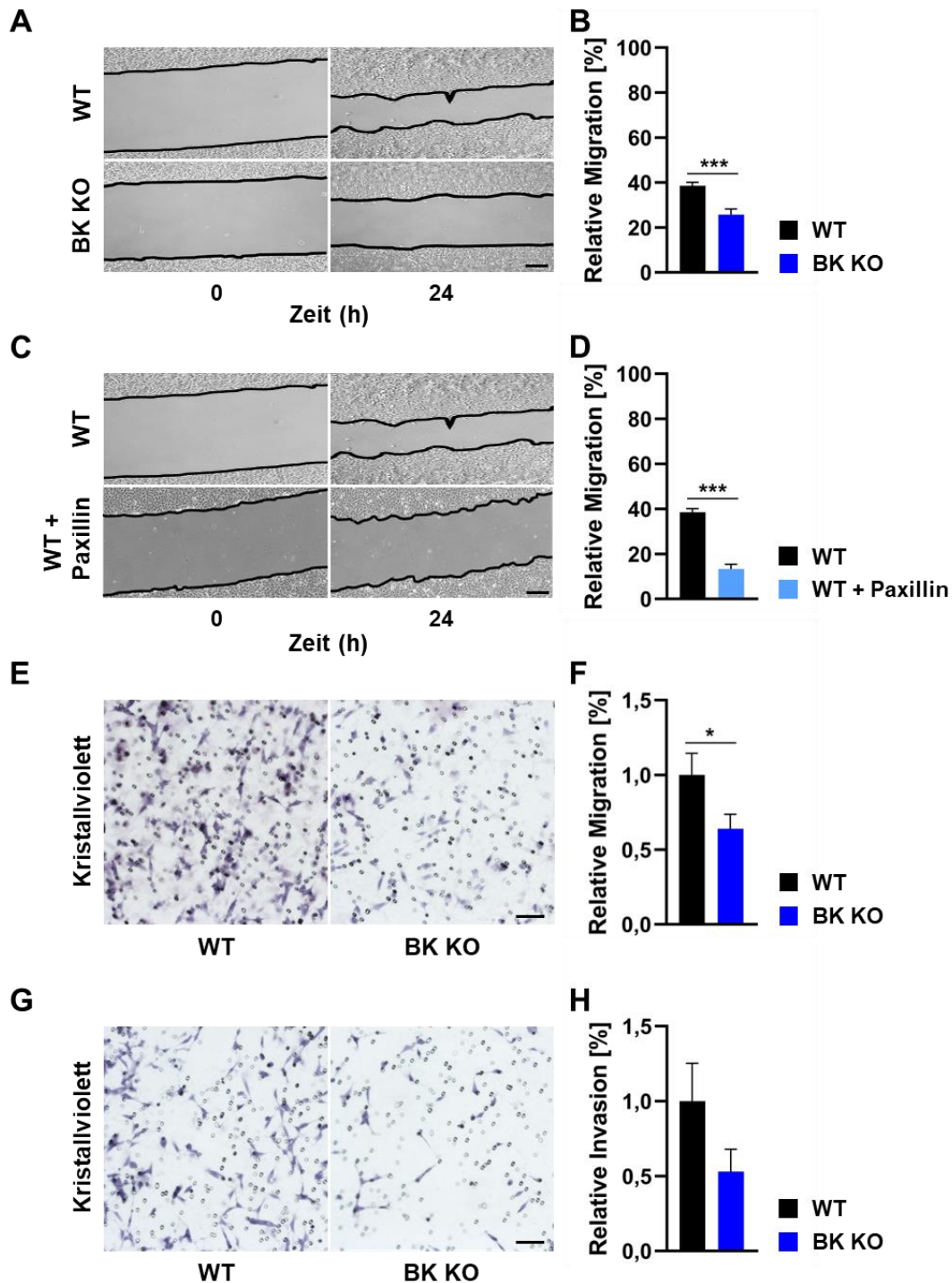


Abbildung 9.9: Pharmakologische und genetische BK-Inhibition und dessen Auswirkungen auf das Migrations- und Invasionsverhalten von MMTV-PyMT Tumorzellen

Das Migrationsverhalten von MMTV-PyMT Zellen wurde mittels „Scratch“-Test untersucht. (A) Repräsentative Aufnahmen eines „Scratch“-Tests von MMTV-PyMT WT (obere Reihe) und MMTV-PyMT BK KO (untere Reihe) zum Zeitpunkt 0 und 24 h. Eingezeichnet ist die Fläche des „Scratch“ (schwarze Linien) zu den indizierten Zeitpunkten. Maßstabsbalken 100 µm. (B) Relative Fläche des „Scratch“ nach 24 h von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO (blaue Balken). Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=9 WT; N=8 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** p<0,001. (C) Repräsentative Aufnahmen eines „Scratch“-Tests von TV-PyMT WT (obere Reihe) und MMTV-PyMT WT behandelt mit 5 µM Paxilline (untere Reihe) zum Zeitpunkt 0 und 24 h. Eingezeichnet ist die Fläche des „Scratch“ (schwarze Linien) zu den indizierten Zeitpunkten. Maßstabsbalken 100 µm. (D) Relative Fläche des „Scratch“ nach 24 h von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT WT + Paxilline (hellblaue Balken). Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=12 WT; N=4 WT + Paxilline dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige

Stichproben, *** $p \leq 0,001$. Das Migrations- sowie Invasionsverhalten von MMTV-PyMT Zellen wurde mit Hilfe einer Boyden-Kammer \pm Matrigel, untersucht. **(E)** Repräsentative Kristallviolett-Färbungen der Membranunterseite einer Boyden-Kammer von MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT BK KO (rechts). Die schwarzen Punkte repräsentieren die Poren der Membran. Maßstabsbalken 20 μm . **(F)** Relative Migration von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO (blaue Balken) nach 24 h. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, * $p \leq 0,05$. **(G)** Repräsentative Kristallviolett-Färbungen der Membranunterseite einer Boyden-Kammer von MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT BK KO (rechts). Die schwarzen Punkte repräsentieren die Poren der Membran. Maßstabsbalken 20 μm . **(H)** Relative Invasion von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO (blaue Balken) nach 24 h. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (Paxilline: BK-Inhibitor)

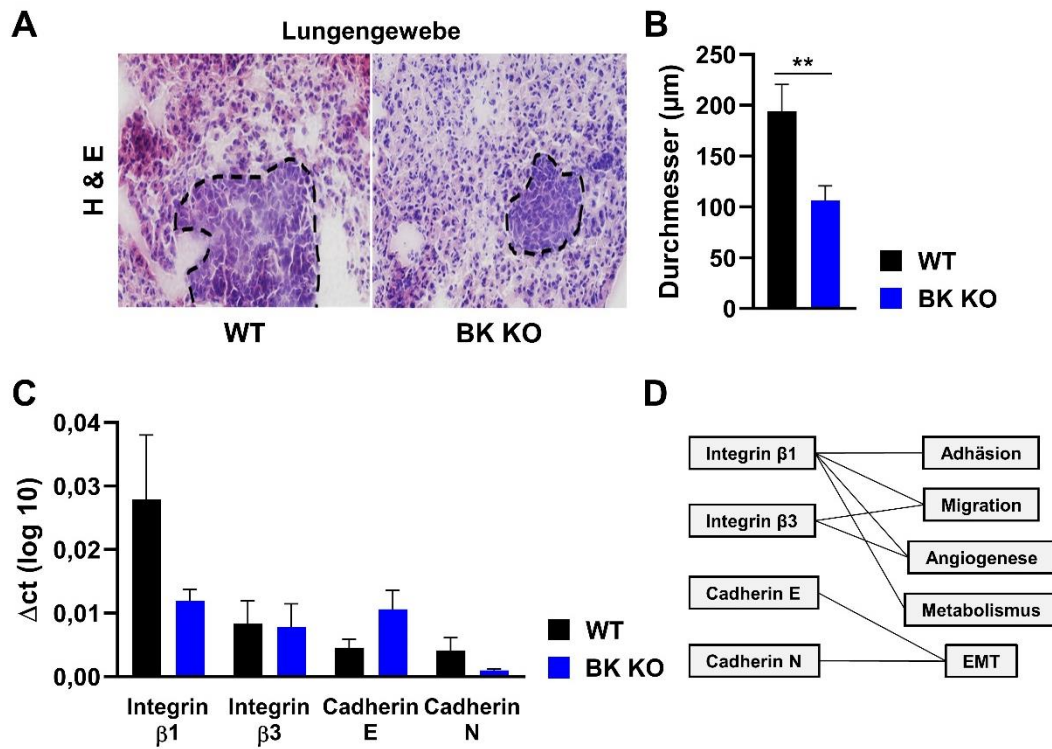


Abbildung 9.10: Einfluss des BK-Kanals auf das Metastasierungsverhalten in MMTV-PyMT Tumorzellen und Geweben

(A) Repräsentative Hämatoxylin- und Eosin Färbungen (HE) von Lungenschnitten aus MMTV-PyMT WT- (links) und MMTV-PyMT BK KO-Mäusen (rechts). Schwarz gestrichelte Linien umranden den tumorösen Bereich. (B) Quantifizierung des Tumor-Durchmessers von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Lungenschnitten (blauer Balken). Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=3 WT; N=3 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** $p \leq 0,01$. (C) qPCR-Analyse von Integrin $\beta 1$, Integrin $\beta 3$, Cadherin E und Cadherin N aus cDNA von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO (blauer Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=5 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (D) Übersichtsschema der in (C) genannten Gene und deren Interaktion (schwarze Verbindungsstriche) mit gängigen Migrations- und Metastasierungsprozessen.

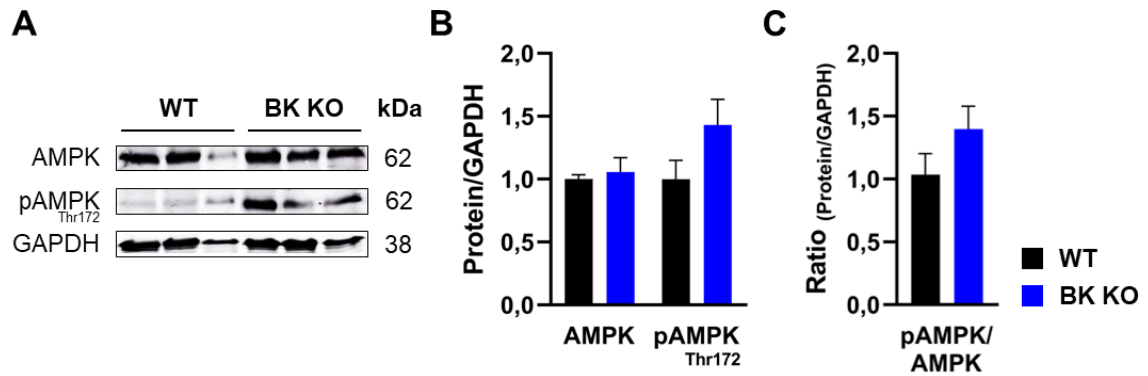


Abbildung 9.11: Effekte der BK-Depletion auf die AMPK Aktivität in MMTV-PyMT Tumorzellen

(A) Western Blot-Analyse von GAPDH, AMPK und phosphorylierter AMPK an Thr 172 von Protein Lysaten aus MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (rechts). Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N= 6 BK KO dar. (B) Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (A) und Normalisierung auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO (blauer Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N= 9 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. (C) Verhältnis der phosphorylierten AMPK zu den gesamten AMPK-Intensitäten, normalisiert auf GAPDH, von MMTV-PyMT WT (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO (blauer Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N= 9 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben.

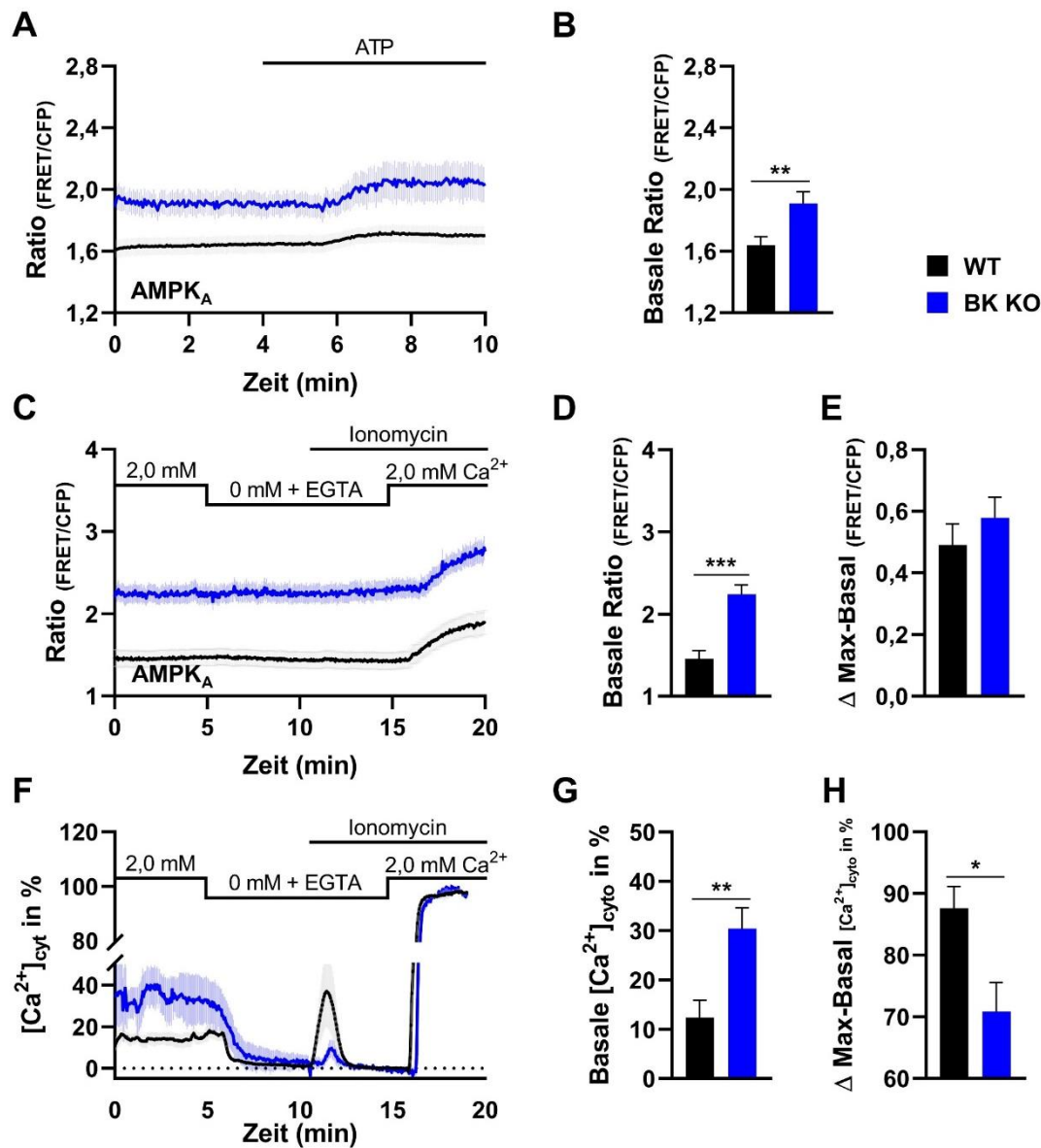


Abbildung 9.12: Gleichzeitiger Einfluss des BK-Kanals auf die Calcium-Homöostase und AMPK Aktivität
(A) FRET-Ratio (AMPK_A) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Linie), welche AMPKAR exprimieren. Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurde den Zellen extrazellulär ATP verabreicht, welches den Calciumeinstrom in die Zelle erhöht. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=3 BK KO dar. **(B)** Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (A)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blauer Balken), welche AMPKAR exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=3 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** p<0,01. **(C)** FRET-Ratio (AMPK_A) über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Linie), welche AMPKAR exprimieren. Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurde den Zellen extrazelluläres Calcium entzogen (0 mM + EGTA), das Calcium-Ionophor Ionomycin verabreicht, sowie extrazellulär die Calcium-Konzentration erneut erhöht (2.0 mM). Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=4 BK KO dar. **(D)** Basale FRET-Ratio (Zeitpunkte 0-5 min (C)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blauer Balken), welche AMPKAR exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=4 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, *** p<0,001. **(E)** Differenz aus basaler FRET-Ratio (D) und Maximum der Ratio (Maximum der Zeitpunkte 15-20 min (C)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blauer Balken), welche AMPKAR exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM von N=5 WT; N=4 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben. **(F)** Normalisierte Fluoreszenzsignale über die Zeit von MMTV-PyMT WT- (schwarze Linie) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Linie), welche Car-GECO1 exprimieren, einen rot fluoreszierenden cytosolischen Ca²⁺-Indikator. Zu dem im Panel angegebenen Zeitpunkt wurde den Zellen

extrazelluläres Calcium entzogen (0 mM + EGTA), das Calcium-Ionophor Ionomycin verabreicht, sowie extrazellulär die Calcium-Konzentration erneut erhöht (2.0 mM). Die Daten stellen den Mittelwert von je 3 repräsentativen Messungen \pm SEM von N=5 WT; N=4 BK KO dar. (G) Basale $[Ca^{2+}]$ (Zeitpunkte 0-5 min (F)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blauer Balken), welche *Car-GECO1* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=4 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, ** $p \leq 0,01$. (H) Differenz aus basaler $[Ca^{2+}]$ und Maximum der $[Ca^{2+}]$ (Maximum der Zeitpunkte 15-20 min (F)) von MMTV-PyMT WT- (schwarzer Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blauer Balken), welche *Car-GECO1* exprimieren. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=4 BK KO dar. Statistische Analyse durch (ungepaarten) t-Test für unabhängige Stichproben, * $p \leq 0,05$.

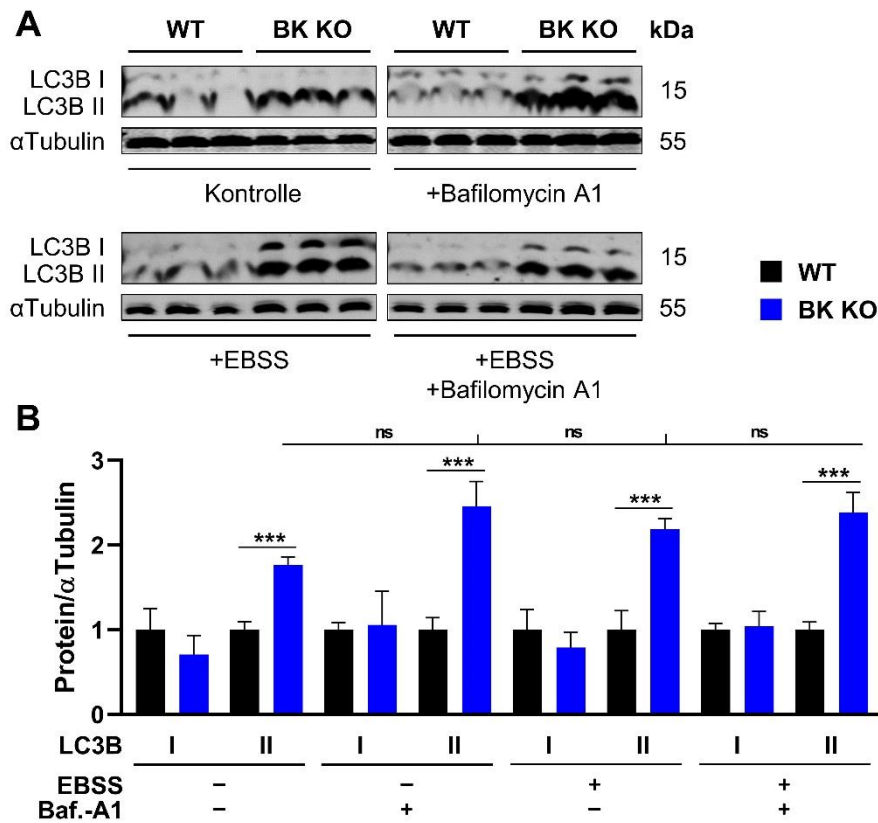


Abbildung 9.13: Auswirkungen des BK-Kanals auf den autophagischen Flux in MMTV-PyMT Tumorzellen
(A) Western Blot-Analyse von α Tubulin und LC3B (I und II) von Protein Lysaten aus MMTV-PyMT WT (links) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (rechts), welche entweder nicht, mit EBSS, Bafilomycin A1 oder einer Kombination aus EBSS und Bafilomycin A1 behandelt wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N=8 BK KO dar. **(B)** Quantifizierung der Western Blot-Bandenintensitäten aus (A) und Normalisierung von LC3B (I und II) auf α Tubulin, von MMTV-PyMT WT (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO (blaue Balken). Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM von N=9 WT; N=8 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA und Multiplen t-Test, *** $p \leq 0,001$. Die Graphen wurden in Zusammenarbeit mit K. Sporbeck (Interfakultäres Institut für Zell Biologie, Universität Tübingen) erstellt.

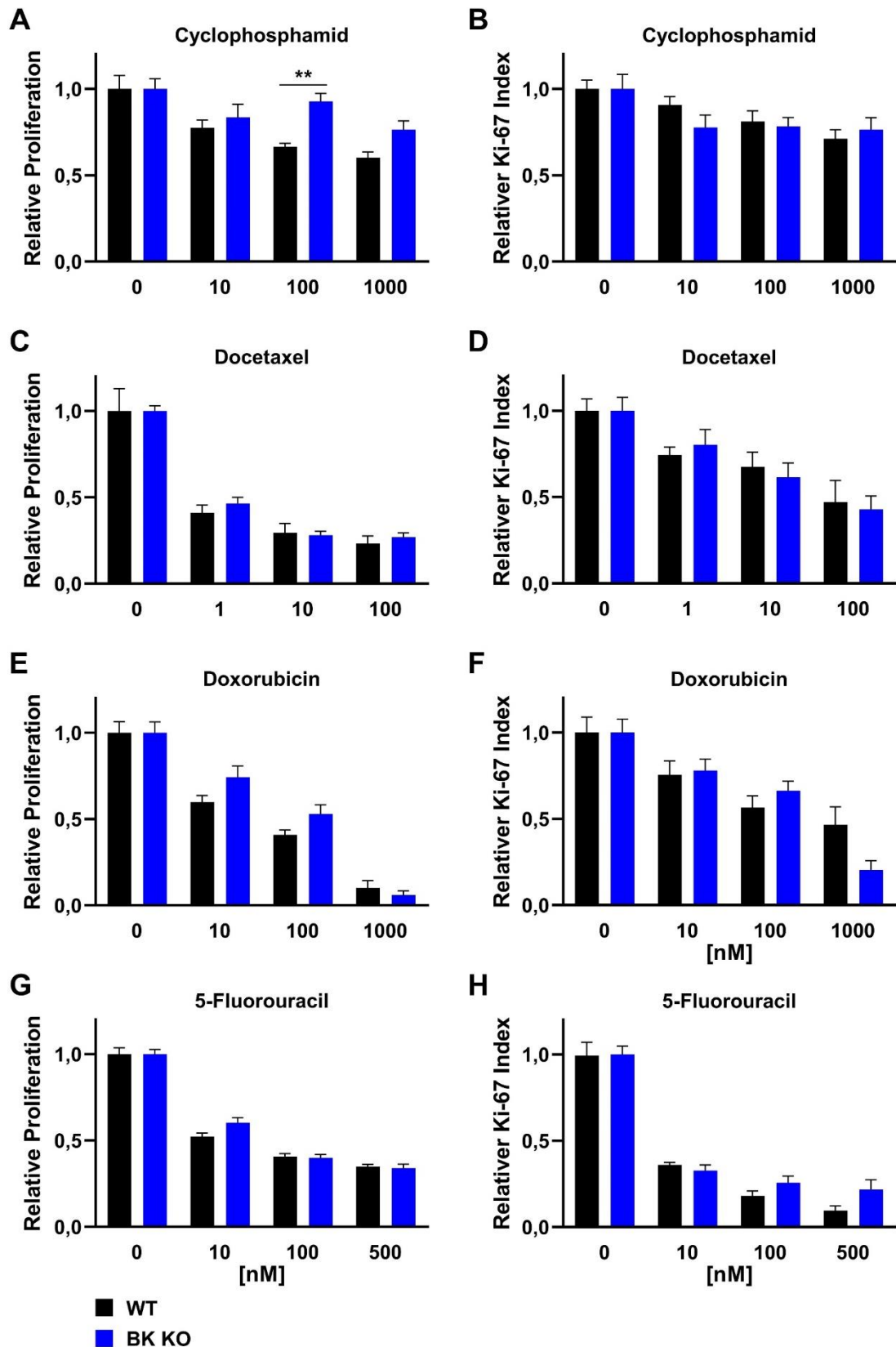


Abbildung 9.14: Auswirkungen der Zytostatika-Therapie auf das Wachstumsverhalten von MMTV-PyMT WT- und BK KO-Zellen

Das Zellwachstum wurde quantitativ über Grid-Platten, oder die Ki-67 Expression über 3 Tage bestimmt (4.4). In den Panelen (A) bis (H) ist die relative Proliferation, sowie die relative Ki-67 Expression nach 72 h aufgetragen. Normalisiert wurde auf die unbehandelte Gruppe. (A) Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze

Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 μ M Cyclophosphamid über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=5 WT; N=4 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA, ** $p \leq 0,01$. **(B)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 μ M Cyclophosphamid über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=6 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(C)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Balken), behandelt mit 0, 1, 10 oder 100 nM Docetaxel über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=6 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(D)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Balken), behandelt mit 0, 1, 10 oder 100 nM Docetaxel über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=6 WT; N=4 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(E)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 nM Doxorubicin über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=5 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(F)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 1000 nM Doxorubicin über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=4 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(G)** Relative Grid-Proliferation von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 500 nM 5-Fluorouracil über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=4 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA. **(H)** Relative Ki-67 Expression von MMTV-PyMT WT- (schwarze Balken) und MMTV-PyMT BK KO-Zellen (blaue Balken), behandelt mit 0, 10, 100 oder 500 nM 5-Fluorouracil über 72 h. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von N=4 WT; N=3 BK KO dar. Statistische Analyse durch Two-Way ANOVA.

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Dominic Gross, Helmut Bischof, Selina Maier, Katharina Sporbeck, Andreas L. Birkenfeld, Roland Malli, Peter Ruth, Tassula Proikas-Cezanne, Robert Lukowski (2022). „IK(Ca) channels control breast cancer metabolism including AMPK-driven autophagy”. *Cell Death & Disease*, 13, 902.

Richard Schäfer, Matthias Schwab, Georg Siegel, Andreas von Ameln-Mayerhofer, Marine Buadze, Ali Lourhmati, Hans-Peter Wendel, Torsten Kluba, Marcel A Krueger, Carsten Calaminus, Eva Scheer, Massimo Dominic, Giulia Grisendi, Thorsten R Doeppner, Jana Schlechter, Anne Kathrin Finzel, **Dominic Gross**, Roland Klaffschenkel, Frank K Gehring, Gabriele Spohn, Anja Kretschmer, Karen Bieback, Eva-Maria Krämer-Albers, Kerstin Barth, Anne Eckert, Stefanie Elser, Joerg Schmehl, Claus D Claussen, Erhard Seifried, Dirk M Hermann, Hinnak Northoff, Lusine Danielyan (2020). „Modulating endothelial adhesion and migration impacts stem cell therapies efficacy”. *EBioMedicine*, 60, 102987.

Corinna J Mohr, Werner Schroth, Thomas E Mürdter, **Dominic Gross**, Selina Maier, Benjamin Stegen, Alice Dragoi, Friederike A Steudel, Severine Stehling, Reiner Hoppe, Stephen Madden, Peter Ruth, Stephan M Huber, Hiltrud Brauch, Robert Lukowski (2022). „Subunits of BK channels promote breast cancer development and modulate responses to endocrine treatment in preclinical models”. *British Journal of Pharmacology*, 179, 2906-2924.

Corinna J. Mohr, Friederike A. Steudel, **Dominic Gross**, Peter Ruth, Wing-Yee Lo, Reiner Hoppe, Werner Schroth, Hiltrud Brauch, Stephan M. Huber, Robert Lukowski (2019). „Cancer-Associated Intermediate Conductance Ca(2+)-Activated K(+) Channel KCa3.1”. *Cancers (Basel)*, 11.

Corinna J. Mohr, **Dominic Gross**, Efe C. Sezgin, Friederike A. Steudel, Peter Ruth, Stephan M. Huber, Robert Lukowski (2019). „KCa3.1 Channels Confer Radioresistance to Breast Cancer Cells”. *Cancers (Basel)*, 11.

Kongressbeiträge

Dominic Groß, Helmut Bischof, Peter Ruth, Tassula Proikas-Cezanne, Robert Lukowski. „The Ca²⁺ activated K⁺ channel of intermediate conductance KCa3.1 plays a role in breast cancer metabolism and autophagy”. Annual PhD Student & Postdoc Meeting 2022 of the DPhG. 23.–25. Februar 2022. Short Talk.

Dominic Groß, Helmut Bischof, Peter Ruth, Tassula Proikas-Cezanne, Robert Lukowski. „The role of Ca²⁺ activated potassium channels of intermediate conductance in breast cancer autophagy and metabolism“. 7th German Pharm Tox Summit 2022 (DGPT). 07.–10. März 2022. ePoster. **Preis** für bestes Poster in der Rubrik: Ion Channels and Membrane Transporters.

GBM/DGZ Fall Conference Age-Related Human Diseases. Special Focus: Autophagy, Tübingen. 25.–27. September 2019. Gast-Partizipation.

Corinna J. Mohr, **Dominic Groß**, Friederike A. Steudel, Peter Ruth, Werner Schroth, Hiltrud Brauch, Stephan M. Huber, Robert Lukowski. „The role of the intermediate conductance calcium-activated potassium channel IK in breast cancer development and therapy“. 17th International Summer School Inflammation, Immunomodulation, Inspiration, Bern/Bönigen, 29.–31. Juli 2018. Poster.

Corinna J. Mohr, **Dominic Groß**, Friederike A. Steudel, Peter Ruth, Werner Schroth, Hiltrud Brauch, Stephan M. Huber, Robert Lukowski. „The intermediate conductance calcium-activated potassium channel IK in breast cancer development and therapy“. Ion Channel Symposium, Kopenhagen, 24.–25. Mai 2018. Poster.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2017 bis Dezember 2022 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Robert Lukowski und Prof. Dr. Peter Ruth im Lehrstuhl für Experimentelle Pharmakologie/Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie des Pharmazeutischen Instituts der Universität Tübingen angefertigt.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Robert Lukowski für die hervorragende Betreuung während meiner Promotion, für die entgegengebrachte Unterstützung und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen, sowie für den Freiraum die wissenschaftlichen Fragestellungen mit eigenen Ideen und Lösungsvorschlägen anzugehen. Außerdem bedanke ich mich bei ihm dafür, dass er es mir ermöglicht hat eine Vielzahl an Methoden und Techniken zu erlernen, meine Fähigkeiten zu verbessern und interessante Kongresse zu besuchen.

Prof. Dr. Peter Ruth danke ich sehr für die Bereitstellung des spannenden Themas, sowie für die guten wissenschaftlichen Ideen, das entgegengebrachte Vertrauen und die zahlreichen interessanten Gespräche und witzigen Anekdoten, sowie spannende Fahrten zu den Kongressen.

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer möchte ich herzlich für die Begutachtung meiner Dissertation und die nachfolgende Disputation danken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei den Professoren Dr. Tassula Proikas-Cezanne, Dr. Stephan Huber, Dr. Roland Malli und Dr. Birkenfeld für die Unterstützung meines Projektes bedanken. Das Bereitstellen von Gerätschaften, Räumlichkeiten, Material und Ihre Expertise hat diese Arbeit positiv beeinflusst. Im speziellen danke ich Prof. Dr. Huber ebenfalls für seine Partizipation als Prüfer meiner Disputation.

Ein großer Dank geht an Dr. Helmut Bischof für die großartige Unterstützung, das Einbringen neuer Ideen, die Einarbeitung in neue Techniken und die generelle Hilfsbereitschaft.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Clement und Michael für die technische Hilfe, sowie für viele witzige, sowie teils sehr philosophische Gespräche und Neckereien.

Ein besonderer Dank geht natürlich an Anna, Helmut, Sandra, Michael, David Skr., David Sp., Thomas, Selina, Melanie, Tamara, Lena, Janina, Natalie, Bekki, Jiaqi, Ying, Lucas, Loni, Corinna und den gesamten Arbeitskreis. Danke für eure Unterstützung, die super Atmosphäre, die sehr witzigen Mittagspausen und Bierrunden und all den Spaß in- und außerhalb der Arbeit. Ihr habt diese Zeit zu etwas ganz besonderen gemacht.

Danke auch an meine Freunde außerhalb des Instituts, allen voran Marius und Lisa, welche immer ein offenes Ohr haben und gute Ratschläge geben, sowie mit sehr viel Spaß und Verständnis meinen Alltag bereichern.

Abschließend möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich in meinem Vorhaben immer unterstützt hat, die immer ein offenes Ohr für mich hat und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite steht.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine wundervolle Frau, die mich in all den Jahren meiner Promotion immer unterstützt hat, nie an mir gezweifelt hat und mir auch an stressigen Tagen sämtliche Last von den Schultern zaubert. Durch dich verliere ich nie mein Lächeln.