

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie II
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Linke -

Die Rolle mitochondrialer $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in Lungenkrebszellen

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät (Fachbereich 05)
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:
Rieke, Marius Andreas
geboren in Würzburg, Deutschland

2020

gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Albrecht Schwab
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christoph Schliemann
Tag der mündlichen Prüfung:	18.08.2020

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie II

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Linke-

Referent: Prof. Dr. med. Albrecht Schwab

Koreferent: Prof. Dr. med. Christoph Schliemann

ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle mitochondrialer $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in Lungenkrebszellen

Rieke, Marius Andreas

Krebs stellt in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar. Das Lungenkarzinom weist die höchste Mortalität auf. Der wesentliche Faktor für die Letalität ist dabei die Metastasierung. Es konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass die Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals im Tumorgewebe die Prognose beeinflusst. Ferner wurde die Extravasation von Lungenkrebszellen durch Kanalblockade reduziert.

Der stimulierende Effekt von *Reactive Oxygen Species* (ROS) auf die *Intercellular Adhesion Molecule-1*-Präsentation (ICAM-1) und die Abhängigkeit der endogenen ROS-Genese vom mitochondrialen Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) sind eingehend untersucht. Für diese Arbeit wurde die Ausgangshypothese aufgestellt, dass $K_{Ca}3.1$ -Kanäle auch in der inneren Mitochondrienmembran von Lungenkarzinom- und Endothelzellen exprimiert werden. Durch Kanalinhhibition wird demnach $\Delta\Psi_m$ hyperpolarisiert, die ROS-Produktion gesteigert, und somit vermehrt ICAM-1 an den Zelloberflächen präsentiert.

Mittels Western Blot konnte in dieser Studie die Expression von $K_{Ca}3.1$ -Kanälen in Mitochondrien der Lungenkrebszelllinien A549-3R und H1975 nachgewiesen werden. In der Immunfluoreszenz zeigte sich in Superposition mit dem Mitochondriensignal eine um bis zu 50 % gesteigerte Kanaldichte im Vergleich zum Hintergrund, in A549-3R- und H1975-Zellen ebenso wie in HMEC-1-Endothelzellen. Durch Blockade des $K_{Ca}3.1$ -Kanals mit dem Inhibitor TRAM-34 wurde in A549-3R-Zellen eine signifikante Hyperpolarisation von $\Delta\Psi_m$ hervorgerufen.

Diese Ergebnisse legen das Vorkommen funktionaler $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in Mitochondrien von Lungenkrebszellen nahe. Dies steht im Einklang mit der Annahme einer gesteigerten ROS-Produktion und ICAM-1-Präsentation durch Kanal-Inhibition oder -Knock-down. Zu Senicapoc, einem weiteren $K_{Ca}3.1$ -Blocker, gibt es bereits Studien über die Verträglichkeit und Sicherheit für Patient*innen. Der Kanal könnte zukünftig also pharmakologisch anvisiert werden, um die Extravasation bereits zirkulierender Lungenkrebszellen zu verhindern. Doch auch hinsichtlich Proliferation, Migration und Invasion von Lungen- und weiteren Karzinomen zeigen Studien reduzierende Effekte durch $K_{Ca}3.1$ -Inhibition.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.08.2020

Erklärung zur Arbeit gemäß §4 Abs. 1 Nr. 3 der Promotionsordnung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Die Rolle mitochondrialer $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in Lungenkrebszellen“ im Institut für Physiologie II der Westfälischen Wilhelms-Universität unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. A. Schwab:

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

(Ort, Datum)

(Name, Unterschrift)

INHALTSVERZEICHNIS

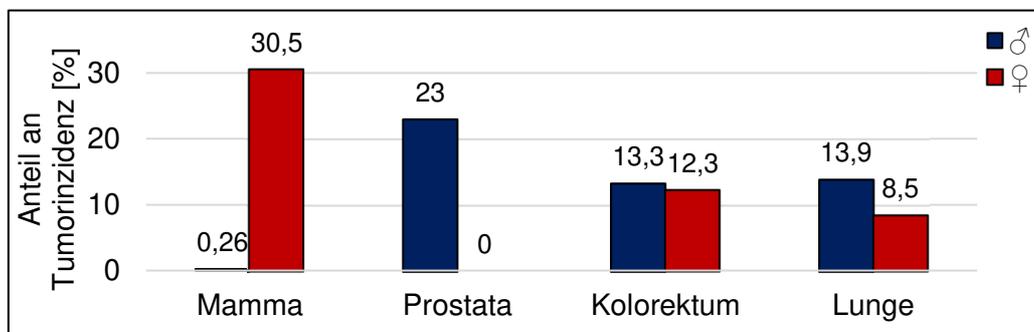
	Seite
1) Einleitung	07
1. i) Lungenkrebs	08
1. ii) Der Kaliumkanal $K_{Ca3.1}$	13
1. iii) Die Bedeutung des $K_{Ca3.1}$ -Kanals für den Lungenkrebs	15
1. iv) Reaktive Sauerstoffspezies und Mitochondrien	17
2) Fragestellung	19
3) Methoden und Materialien	20
3. i) Zellkultur	20
3. ii) Isolation von Mitochondrien	22
3. iii) Western Blot	23
3. iv) Immunfluoreszenz	28
3. v) Messung des mitochondrialen Membranpotenzials	32
a) Ganze Zellen	32
b) Isolierte Mitochondrien	35
3. vi) Messung der Lipophilie	36
3. vii) Statistische Analyse	37
3. viii) Auflistung der Materialien und ihrer Hersteller	38

4)	Ergebnisse	41
4. i)	Western Blot	41
4. ii)	Immunfluoreszenz	43
4. iii)	Messung des mitochondrialen Membranpotenzials	48
	a) Ganze Zellen	48
	b) Isolierte Mitochondrien	56
4. iv)	Messung der Lipophilie	58
5)	Diskussion	59
5. i)	Western Blot	59
5. ii)	Immunfluoreszenz	62
5. iii)	Messungen des mitochondrialen Membranpotenzials	65
5. iv)	Ausblick	70
6)	Abkürzungsverzeichnis	76
7)	Dankeswort	78
8)	Lebenslauf	79
9)	Literaturverzeichnis	80

1) Einleitung

Krebs stellt in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar. Für 2017 verzeichnete das statistische Bundesamt 235.681 an Neubildungen Verstorbene, übertroffen nur von kardiovaskulären Erkrankungen (344.524).¹ Damit war auf ca. jeder vierten Totenbescheinigung eine Krebsentität unter der Todesursache aufgeführt.

Das häufigste Malignom betrifft in der Bundesrepublik geschlechtsspezifisch Brust- und Vorsteherdrüse (s. Graphik 1). An zweiter und dritter Stelle folgen mit vergleichbarer Inzidenz das kolorektale und das Lungenkarzinom, auf dem der Fokus dieser Arbeit liegt.



Graphik 1: Anteil der häufigsten Karzinomlokalisationen an der Gesamttumorinzidenz
Die Daten beziehen sich auf Deutschland und das Jahr 2014. Die Zahlen geben die Prozentwerte der jeweiligen Geschlechter wieder. Blau repräsentiert die Männer und Rot die Frauen. Zu beachten ist, dass sich die Neuerkrankungen nicht 50:50 auf die Geschlechter verteilen, sondern Männer generell häufiger von Malignomen betroffen sind. Quelle: Zentrum für Krebsregisterdaten²

Doch während es im Rahmen der gesetzlichen Krebsvorsorge für die drei erstgenannten Tumorentitäten etablierte Untersuchungen gibt, fehlt bisher Ähnliches für Malignome der Lunge. Dieser Umstand trägt neben anderen dazu bei, dass der Lungenkrebs in der Mortalitätsstatistik auf Platz 1 rangiert.

1. i) Lungenkrebs

Das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts prognostizierte für 2018 für Männer 33.700 und für Frauen 22.000 Neuerkrankungen.³ Diese Zahl bezieht sich auf „C33 und C34ⁱ - Maligne Neoplasien der Trachea, des Bronchus und der Lunge“. 2014 bezifferte sich die Mortalität auf 45.084 Menschen in Deutschland, entsprechend einem Anteil von 20,2 % der Gesamtkrebstoten. Global betrachtet ist das **epidemiologische** Ausmaß von Lungenkrebs noch gravierender. Die Internationale Agentur für Krebsforschung der Weltgesundheitsorganisation ging für 2018 weltweit von 2.093.876 Neuerkrankungen (11,6 % der Malignome) und von 1.761.007 Todesopfern (18,4 % der Krebstoten) aus.⁴ Für keine andere Krebsart sind diese Zahlen größer.

Der relevanteste **Risikofaktor** ist die Inhalation von Tabakrauch, aktiv oder passiv. Die Emanzipation der Frau hinsichtlich des Zigarettenkonsums ging in den letzten Dekaden daher auch mit einer Annäherung an die männliche Inzidenz und Mortalität einher.⁵ Sir Richard Peto, Epidemiologe an der University of Oxford, formulierte plakativ:

„If women smoke like men, they die like men.“⁶

Auch Luftverschmutzung und Feinstaubbelastung aus Industrie und Verkehr haben einen negativen Einfluss. In den Fokus der aktuellen politischen Diskussion ist die Rolle der Dieselmotorenemissionen gerückt. Tiermodelle und epidemiologische Studien rechtfertigen das Attribut „kanzerogen“, was sich insbesondere bei arbeitsmedizinischen Untersuchungen unter Tage zeigte.⁷ Die Abgase sind allerdings ein heterogenes Stoffgemisch von Ruß, Stickoxiden und vielen weiteren Bestandteilen. Eine exakte Aufschlüsselung der Erkrankungsgefahr auf einzelne Bestandteile und die daraus resultierende Bemessung von Grenzwerten in Innenstädten oder Verwendung als Surrogatmarker ist diffizil. Ferner ist der Unterschied zu Arbeitsplatzgrenzwerten zu betonen. Diese setzen in der Regel eine gesunde Arbeitskraft und Exposition über 40 Stunden in der Woche während der durchschnittlichen Lebensarbeitszeit voraus. Im urbanen Raum sind allerdings auch Kinder, Hochbetagte und chronisch Kranke anzutreffen, für die von einer tagtäglichen, 24-stündigen Exposition ausgegangen werden muss. Ionisierende Strahlung kosmischer, terrestrischer und nosokomialer

ⁱ Die Kodierung stammt aus der 10. Ausgabe der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10). Die neue, 11. Version vergibt das Kürzel 2C24 und 2C25, ist im deutschen Gesundheitswesen aber noch nicht implementiert.

Herkunft kann ebenfalls Lungenkrebs auslösen. Die Wahrscheinlichkeit dafür wird durch das Flugverhalten, die geologische Beschaffenheit des Wohnorts und die radiologische Anamnese beeinflusst. Neben dem natürlich in der Erde vorkommenden Radon lassen sich viele weitere Elemente, Stoffe und Chemikalien auflisten. Am bekanntesten ist das Mineral Asbest, das vor den Erkenntnissen über seine Kanzerogenität großflächig zum Brandschutz verwendet wurde. Es ist gleichzeitig Hauptursache des hochmalignen Pleuramesothelioms. Das Rauchverhalten und die Exposition am Arbeitsplatz sind zudem wichtige Mediatoren für den Zusammenhang zwischen sozioökonomischem Status und Lungenkrebsrisiko. Diese beiden Faktoren stehen weitestgehend in negativer Korrelation zueinander.⁸

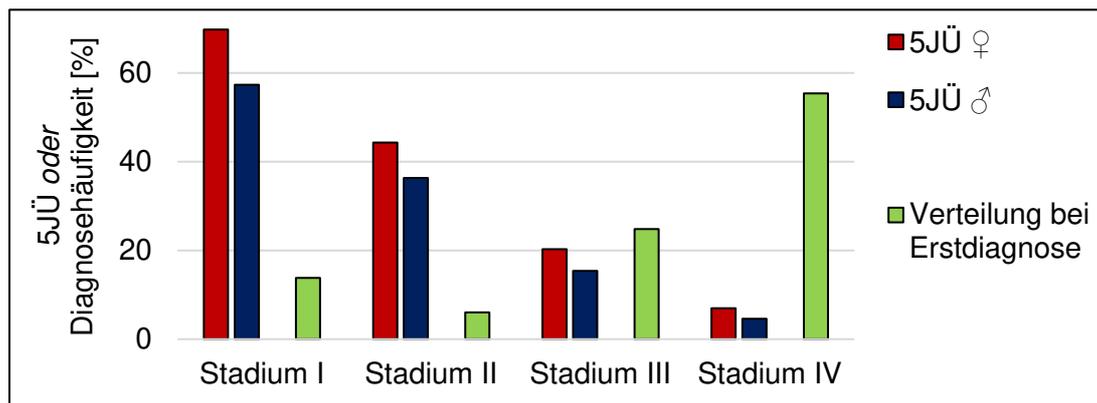
Klassischerweise wird bei der **Tumorentstehung** zwischen zwei Wegen unterschieden. Einerseits kann ein Tumorsuppressorgen mutieren, sodass es seine Kontrollfunktion über den Zellzyklus verliert. Das Protein p53, der sogenannte „Wächter des Genoms“, ist ein wichtiges Beispiel, da es bei DNA-Schäden den Zellzyklus anhalten und Apoptose, den „programmierten Zelltod,“ induzieren kann. Andersherum kann ein Protoonkogen eine Mutation erfahren, die seine Aktivität oder Expression steigert. Meist sind diese Proteine in die Signalkaskade von Wachstumsfaktoren und in das Antreiben der Mitose involviert. Dabei wirkt besonders schwer, dass bereits ein mutiertes Allel karzinogen wirken kann, während bei den Tumorsuppressorgen in der Regel (zunächst) noch ein Wildtypallel der zellphysiologischen Funktion nachkommen kann. Ein solches Protoonkogen ist *KRAS*. Das *KRAS*-Gen kodiert für das Rezeptortyrosinkinase-assoziierte Protein K-ras, das in vielen Zellen ein proliferatives Programm vermittelt. Für *KRAS*-mutierte Patient*innen kommt erschwerend hinzu, dass Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren therapeutisch schlechter ansprechen, da das überaktive K-ras-Protein in der Signaltransduktion nachgeschaltet ist.⁹ Beide Gene sind in bronchialen Adenokarzinomen am häufigsten von Alterationen (Mutation, Deletion und Amplifikation) betroffen (*KRAS* 38 %, *TP53* 36 %).¹⁰ Für beide Gene besteht eine Korrelation zu inhalativem Tabakkonsum.^{9, 11}

Im lokalen Stadium kann das Lungenkarzinom bereits **symptomatisch** werden. Zu den häufigsten Beschwerden zählen Husten (8 – 75 %), Dyspnoe (3 – 60 %) und thorakaler Schmerz (20 – 49 %).¹² Dies ist wie die vorkommende B-Symptomatik nicht spezifisch und gerade auch bei chronisch Rauchenden ohne Karzinom vorzufinden. Paraneoplastische Symptome lassen sich eher beim kleinzelligen Lungenkrebs beobachten. Und natürlich können Metastasen unabhängig vom Primärtumor lokalisationsabhängig auffällig werden, beispielsweise durch

neurologische Symptome bei zerebraler Streuung oder durch pathologische Frakturen bei skelettaler Metastasierung. Unterm Strich steht häufig eine (zu) späte Diagnose.

Histologisch lassen sich der nicht-kleinzellige (*Non Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) und der kleinzellige Lungenkrebs (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC) unterscheiden. Diese Differenzierung ist wichtig, weil die beiden Krebsarten unterschiedliche Symptomatik und biologisches Verhalten aufweisen. Dies geht auch mit verschiedenen Überlebenskurven und Behandlungsoptionen einher. Der NSCLC ist ca. fünfmal so häufig wie der SCLC (84 % zu 16 %).¹³ Daher wurde sich in dieser Arbeit auf ersteren konzentriert, welcher seinerseits in Subgruppen differenzierbar ist: Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, großzelliges Karzinom und weitere.

Die **Prognose** hängt von vielen patient*innen- und erkrankungsbedingten Faktoren ab. Essentiell ist das Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bzw. des Behandlungsstarts, wie Eberle et al. 2015 an deutschen Fällen zeigen konnten.¹⁴ Die *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) schlägt ein alphanumerisches Klassifikationssystem von Stadium I bis IV vor, das international weite Verbreitung gefunden hat. Im Stadium Ia überlebten 75,2 % der Frauen und 62,9 % der Männer mindestens 5 Jahre nach Befundung. Im schwersten Stadium lokaler Begrenzung, UICC IIIb, betragen diese Anteile nur noch 15,7 % bzw. 12,5 %, und im metastasierten Stadium IV minimale 7,0 % bzw. 4,6 %. Auch die absoluten Zahlen sind aufschlussreich. 41.112 Patient*innen (55,4 %) wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits das am weitesten fortgeschrittene Stadium IV auf. Dem standen für Stadium I 10.277 (13,8 %), für Stadium II 4.455 (6,0 %) und für Stadium III 18.407 (24,8 %) Erstdiagnosen gegenüber (s. Graphik 2).



Graphik 2: Überleben und Diagnosehäufigkeit von Lungenkrebs

In Abhängigkeit vom UICC-Stadium werden die 5-Jahres-Überlebensraten (5JÜ) beider Geschlechter dargestellt (♀ rot, ♂ blau). Die Letalität korreliert positiv mit dem Stadium. Die relative Häufigkeit der Stadien zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ist in Grün aufgetragen. Die Patient*innendaten stammen aus Deutschland im Zeitraum von 2002 bis 2010.¹⁴

Riihimäki et al. untersuchten 2014 schwedische Daten über die häufigsten Metastasierungslokalisationen.¹³ In absteigender Reihenfolge listeten sie zentrales Nervensystem (39 % der 9.830 M1-Patient*innenⁱⁱ), Knochen (34 %), Leber (20 %), Lungeⁱⁱⁱ (18 %) und Nebenniere (8 %) auf. Dabei wiesen besonders Fälle mit ossären und/oder hepatischen Filiae eine schlechte Prognose auf.

Auch die **Therapie** ist stadienabhängig. Stadium IV mit Feststellen einer bereits stattgefundenen Streuung^{iv} des NSCLC bedeutet nach Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Medizinische Onkologie die Abkehr von einem kurativen Ansatz.¹⁶ Doch auch mit einem palliativen Konzept inklusive invasiver Interventionen, Schmerzmedizin, psychoonkologischer oder spiritueller Betreuung kann noch Einiges für Patient*innenwohl und Lebensqualität erreicht werden.

ⁱⁱ Die TNM-Klassifikation schlüsselt das *Staging* nach tumorspezifischen Kriterien auf, fester Bestandteil ist die Beurteilung von u.a. Primarius, Lymphknoten und Fernmetastasen. Für letztere werden qualitativ M0 und M1 vergeben, ohne und mit Metastasen.

ⁱⁱⁱ Nach der aktuell gültigen Klassifikation der UICC zählen manche intrathorakale Tumorausbreitungen bereits zum Stadium M1a, beispielsweise ein nichtkontinuierlicher Befall des kontralateralen Lungenflügels.¹⁵

^{iv} Auf den unscharfen Sonderfall des potenziell kurablen oligometastasierten Karzinoms wird hier nicht weiter eingegangen.

Nichtsdestoweniger unterstreicht dies den Wunsch, einer Metastasierung zuvorzukommen. Auf der Suche nach einer geeigneten **Früherkennungsuntersuchung** wurden in den letzten Jahren weltweit diverse Studien durchgeführt, die zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich des Nutzens kommen. Der *National Lung Screening Trial* verglich in den USA Computertomographie (CT, effektive Dosis im Schnitt ca. 1,5 mSv) mit 2D-Röntgenaufnahmen mit dem primären Endpunkt Lungenkrebsmortalität.¹⁷ 2011 konnte eine lungenkrebspezifische Mortalitätsreduktion von 20,0 % präsentiert werden, ebenso wie eine Reduktion der Gesamtmortalität um 6,7 %.¹⁸ Die notwendigen Screeningvorgänge zur Verhinderung eines Lungenkrebs-Todesopfers wurden auf 320 berechnet. Die CT lieferte Diagnosen in früheren Stadien, hatte gleichzeitig aber auch einen niedrigeren positiven prädiktiven Wert.¹⁹

Der *Randomized Danish Lung Cancer Screening Trial* konnte 2016 keine signifikante Reduktion der Mortalität durch niedrigdosierte Thorax-CT gegenüber gar keinem Screening aufzeigen.²⁰ Gleichwohl wiesen die Autor*innen selbstkritisch auf zu geringe statistische *Power* und ungünstige Randomisierung hin.

2017 konnte in China, wie beim *National Lung Screening Trial*, über eine Kohorte von mehreren Zehntausend Teilnehmenden berichtet werden.²¹ Nach fünf Jahren zeigte sich für die niedrigdosierte CT eine Reduktion der dem Lungenkarzinom zuzuschreibenden Mortalität von 24,2 % (*best case*-Szenario 40,2 %; *worst case*-Szenario 5,4 %) gegenüber keiner Sekundärprävention.

Ein retrospektiver Ansatz wurde 2019 in Japan gewählt.²² Es wurden Fälle ausgewertet, bei denen es zu mindestens einer CT *oder* mindestens einer Röntgenaufnahme gekommen war. Es war eine Abnahme der Lungenkrebsmortalität in der CT-Kohorte um 51 % und der Gesamtmortalität um 43 % zu verzeichnen, gleichzeitig aber auch eine Zunahme der Inzidenz um 23 % gegenüber den Geröntgten.

Aktuell laufen viele weitere (radiologische) Studien über Effektivität und Effizienz von Lungenkrebs-Vorsorgeuntersuchungen. Hier in Münster ist beispielsweise das Clemenshospital daran beteiligt. Die bisher größte europäische Studie (NELSON) wählte dabei einen volumetrischen Ansatz für eine schärfere Definition eines positiven Befunds und mit dem Ziel einer Reduktion der Falsch-Positiv-Rate.²³ Dies konnte unter Berücksichtigung von Volumen, Volumengrenzwert und Volumenverdopplungszeit erreicht werden.²⁴ Die finale Evaluation dieses Screeningansatzes sowie ein Konsens in der Fachwelt und eine etwaige gesundheitspolitische Reaktion darauf bleiben abzuwarten.

1. ii) Der Kaliumkanal $K_{Ca3.1}$

Ionenkanäle bilden eine heterogene Gruppe von Membranproteinen mit ubiquitärer Verbreitung. Klassifikationen differenzieren u. a. anhand von Transportmolekül und Aktivierungsart. Dabei weist nicht jedes Kanalprotein die gleiche Spezifität gegenüber bestimmten Ionen auf, viele sind auch nicht-selektiv permeabel. Die Steuerung der Kanalöffnung wird durch verschiedene Stimuli bewirkt, z. B. durch Protonen (H^+), weitere Ionen wie Ca^{2+} , elektrische Spannung oder mechanische Signale. In der Familie der durch Kalziumionen modulierten Kaliumkanäle hat sich ferner die Unterteilung nach ihrer elektrischen Leitfähigkeit etabliert: “*big*”, “*intermediate*” und “*small conductance*”.

Der kalziumaktivierte Kaliumkanal $K_{Ca3.1}$ wurde 1958 in Erythrozyten erstbeschrieben.²⁵ Inzwischen wurde er in vielen physiologischen wie pathologischen Zellen nachgewiesen. Dazu zählen verschiedene Zellarten der hämatopoetischen Reihe wie Makrophagen, Granulo-, T-Lympho-, Megakaryo- und Thrombozyten.^{26, 27, 28, 29, 30} Weiterhin sind die Kanäle physiologisch exprimiert in Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelien, Trachea, Prostata, Plazenta, Speichel- und anderen exkretorischen Drüsen, darüber hinaus in Tonsillen, fetaler Leber, Gastrointestinaltrakt, Brustdrüse, Milz, Thymus, Harnblase, Haut, Myo-, Endometrium, Omentum, Uterus, Lunge, Fettgewebe und Testes.^{31, 32, 33, 34} Zudem ist der Kanal auch für das zentrale und das enterische Nervensystem sowie Glia beschrieben.^{35, 36, 37} Neben seiner Expression in der Plasmamembran ist der $K_{Ca3.1}$ -Kanal auch bei verschiedenen Zellarten intrazellulär funktional vorhanden (s. 1.iii).

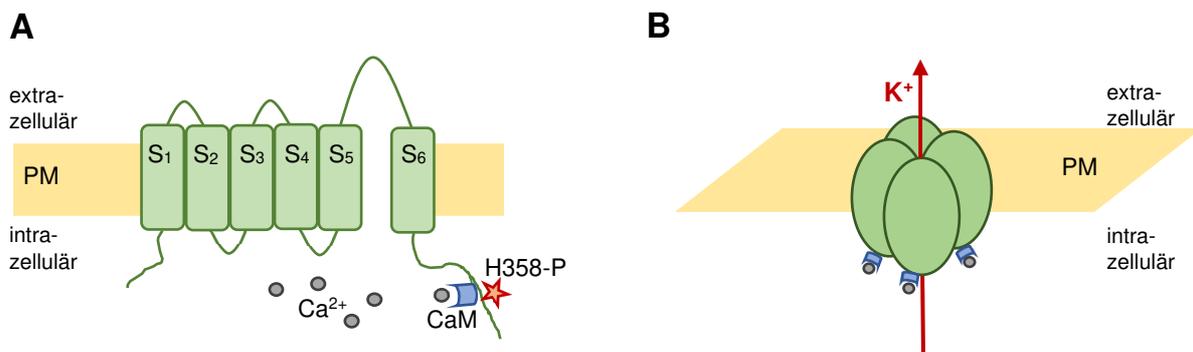
Synonym finden sich in der Fachliteratur Bezeichnungen wie IKCA1, hIKCa1, SK4, das den Entdecker ehrende Eponym “*Gárdos channel*” und diverse weitere. Die wiederkehrenden Bestandteile “K” und “Ca” ergeben sich aus den permeierenden bzw. aktivierenden Kationen, das Präfix “h” bezieht sich auf den humanen Ursprung, und das Attribut “I” auf die biophysikalischen Eigenschaften: “*intermediate conductance*”^v.

Das für diesen Kanal kodierende Gen *KCNN4* ist auf Chromosom 19 lokalisiert.⁴¹ Das entsprechende Protein enthält 427 Aminosäuren, sechs helikale Transmembrandomänen (S1 - S6) und lagert sich als Homotetramer zu einer Membranpore^{vi} schaffenden

^v Es wurden elektrische Leitfähigkeiten im zweistelligen pS-Bereich kalkuliert.^{38, 39, 40}

^{vi} In der geöffneten Konformation beträgt der Porendurchmesser 12 Ångström.⁴²

Quartärstruktur zusammen (s. Graphik 3). N- wie C-Terminus ragen ins Zytosol, letzterer beinhaltet die Zielstruktur für Calmodulin. Calmodulin ist auch bei niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentrationen schon lose mit dem Kanal assoziiert. Ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ bewirkt eine Bindung an die S4-S5-Verbindungsregion, woraufhin es zur Konformationsänderung im Sinne eines Öffnens des Kanals kommt.⁴³ Die halbmaximale Aktivität erreicht der Kanal bei Kalziumkonzentrationen von 154 mM.⁴⁴ Weiterhin kann die Aminosäure Histidin an Stelle 358 kanalaktivierend phosphoryliert werden, zellabhängig wird diese Aktivierung durch die Nucleosiddiphosphatkinase B (NDPK-B), die Ras/MEK/ERK-Kaskade (*Rat Sarcoma / Mitogen-activated protein kinase kinase / Extracellular signal regulated kinase*) und die Proteinkinase C (PKC) mediiert.^{45, 46, 44} Durch den dem elektrochemischen Konzentrationsgradienten folgenden Kaliumausstrom kommt es zu einer Hyperpolarisation des Plasmamembranpotenzials, was den Kalziumeinstrom verstärkt, der seinerseits im Rahmen einer positiven Rückkopplung den $K_{Ca3.1}$ -Kanal weiter aktiviert. Zu den generellen Funktionen der Kanalaktivität gehören Kalziumhomöostase, Regulation von Membranpotenzial und Zellvolumen, Sekretion, Migration und Proliferation. Gewebespezifisch spielt der $K_{Ca3.1}$ -Kanal eine Rolle bei der epithelialen Salz- und Wassersekretion, bei der Vasodilatation oder dem oxidativen *Burst* von Makrophagen.



Graphik 3: Mono- und tetramerer Aufbau des $K_{Ca3.1}$ -Proteins

(A) zeigt vereinfacht die Tertiärstruktur des $K_{Ca3.1}$ -Proteins in der Plasmamembran (PM). Es weist sechs Transmembrandomänen (S_{1-6}) auf, zwischen S_5 und S_6 wird die Kanalpore gebildet. Die Phosphorylierung von Histidin (H358-P) und die Ca^{2+} -Bindung des assoziierten Calmodulins (CaM) wirken aktivierend. In (B) ist das Kanal-Tetramer in seiner geöffneten Konstitution schematisch dargestellt. Kalziumionen-abhängig kommt es zum K^+ -Efflux und zur PM-Hyperpolarisation.

Die Liste der hemmenden und aktivierenden Substanzen ist umfassend.⁴⁷ Tabelle 1 führt nur diejenigen auf, von denen im Rahmen der Experimente Gebrauch gemacht wurde:

Substanz	Wirkprinzip	Pharmakodynamik
TRAM-34	Inhibitor	IC ₅₀ von 49 nM ^a bzw. K _d von 20 ± 3 nM ^b
Senicapoc (ICA-17043)	Inhibitor	IC ₅₀ von 11 ± 2 nM ^c
1-EBIO	unspezifischer Aktivator	EC ₅₀ von 74 ± 11 µM ^d bis 320 µM ^e

Tabelle 1: Verwendete Kanalmodulatoren und ihre pharmakologischen Charakteristika
 IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration. K_d: Dissoziationskonstante. EC₅₀: mittlere effektive Konzentration. (a) bestimmt an Kolonkarzinomzellen und deren isolierten Mitochondrien.⁴⁸ (b) bestimmt an mit K_{Ca}3.1 transfizierten COS 7-Zellen.⁴⁹ (c) bestimmt anhand des ⁸⁶Rb⁺-Efflux humaner Erythrozyten.⁵⁰ (d) bestimmt an HEK-293-Zellen.⁵¹ (e) bestimmt an Kolonkarzinom-Zellen.⁵² TRAM-34: 1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol. 1-EBIO: 1-Ethyl-2-benzimidazolinon.

TRAM-34 und Senicapoc besetzen kompetitiv die Stelle der Kanalpore, an der Kaliumionen sonst in den Selektivitätsfilter vordringen würden.⁵³ 1-EBIO erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit u. a. der K_{Ca}3.1-Kanäle insofern, als dass es an der Calmodulin-Bindungsdomäne wirkt und somit die Sensitivität für [Ca²⁺]_i potenziert.⁵⁴

1. iii) Die Bedeutung des K_{Ca}3.1-Kanals für den Lungenkrebs

Zu den Malignomen, in denen K_{Ca}3.1-Kanäle bereits nachgewiesen wurde, zählen Pankreas-, Prostata-, klarzelliges Nierenzell-, hepatozelluläres, Endometrium-, Mamma-, pankreatisches duktales Adeno-, Ovarial- und kolorektales Karzinom sowie Melanom, Glioblastom und Angiosarkom (s. Tabelle 14). Nicht nur in physiologischen, sondern auch in entarteten Zellen wirkt der Kaliumkanal K_{Ca}3.1 – über die Hyperpolarisierung der Plasmamembran und den damit einhergehenden Einstrom des Signalmoleküls Ca²⁺ – stimulierend auf die Proliferation. Ebenfalls beschrieben ist der K_{Ca}3.1-Kanal für das Lungenkarzinom, hier war sogar eine gesteigerte K_{Ca}3.1-Expression zu verzeichnen.⁵⁵

Die klinische Relevanz dieser Überexpression beschrieben Bulk et al. 2015.⁵⁶ Sowohl in Tumorbiopsien als auch in einer hochaggressiven NSCLC-Zelllinie (A549-3R) konnten eine Hypomethylierung des *KCNN4*-Promotors, und konsekutiv eine gesteigerte Transkription der

mRNA und Translation des Proteins nachgewiesen werden. Diese epigenetische Disinhibition war auch mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben sowie Gesamtüberleben korreliert. Patient*innen wurden nach dem anhand von Gewebeproben bestimmten Methylierungsgrad dichotomisiert, mit dem Median als Grenzwert. Die 50 % der Studienpopulation mit höherer Promotormethylierung waren nach 60 Monaten zu 66 % progressionsfrei, 28 % waren verstorben. Bei der Hälfte mit geringerer Transkriptionshemmung des Kanal-Gens betragen diese Werte hingegen 37 % für die Progressionsfreiheit und 63 % für die Letalität. Diese Assoziation bestätigte sich auch bei Untersuchung des mRNA-Synthese. *In vitro* reduzierte die Kanalblockade Proliferation und Migration von Tumorzellen, im Mausmodell war der antiproliferative Effekt konsistent.

In ihrer Publikation von 2017 untersuchten Bulk et al. weitergehend die Interaktion von Lungenkarzinom- und Endothelzellen.⁵⁷ Die mittels *Single Cell Force Spectroscopy* gemessene Adhäsion zwischen diesen beiden Zelltypen steigerte sich durch pharmakologische Kanal inhibition und durch Gen-Knock-down. In Anwesenheit eines spezifischen Antikörpers gegen das *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) war keine Differenz zwischen Kanalblockade und Kontrolle mehr zu messen. Es wurde daher angenommen, dass dieses Glykoprotein die gesteigerten Zellanheftung vermittelt. Tatsächlich konnten in Western Blot und Immunfärbung eine gesteigerte ICAM-1-Expression durch K_{Ca}3.1-Knock-down in Lungenkrebs- und Endothelzellen bestätigt werden. In einem weiteren Experiment wurde eine Kapillarwand mit konfluentem Endothelrasen, Kollagen IV- und Kollagen I-Matrizen simuliert und die Transmigration von Adenokarzinomzellen untersucht. Deren "Extravasation" wurde durch die Anwesenheit eines Kanalblockers halbiert.

Diese Ergebnisse können auf den ersten Blick kontraintuitiv wirken. Wenn durch Kanalblockade mehr Adhäsionsmoleküle an den Zelloberflächen exprimiert werden, wäre eine erhöhte Transmigrationsrate nicht überraschend – das Gegenteil ist jedoch der Fall. Aufgelöst wird dieser scheinbare Widerspruch, wenn der Prozess der Extravasation in die Teilschritte "Adhäsion" und "Diapedese" aufgeteilt wird: ersterer wird natürlich durch eine hohe Anzahl von ICAM-1-Molekülen begünstigt, zweiterer jedoch nicht. Wenn die Adhäsionskraft zwischen Tumorzellen und Endothel zu groß ist, verbleiben die Krebszellen lumenseitig adhärirt und können das Gefäß nicht durch das Endothel hindurch verlassen. Der Zusammenhang zwischen ICAM-1-Expression und Transmigrationsrate ist also offenbar kein linearer, sondern stellt sich – graphisch ausgedrückt – eher als Gauß-Kurve dar.

Welche Mechanismen intrazellulär zwischen dem kalziumaktivierten Kaliumkanal auf der einen Seite und ICAM-1-Präsentation auf der anderen exakt ablaufen, bleibt zu erforschen. Dabei ist der stimulierende Einfluss von oxidativem Stress bzw. *Reactive Oxygen Species* (ROS) auf die ICAM-1-Expression ausführlich untersucht.^{58, 59}

1. iv) Reaktive Sauerstoffspezies und Mitochondrien

Zu diesen Sauerstoffspezies gehören freie Radikale wie Superoxid (O_2^-), aber auch nicht-radikale Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Sie sind ein physiologisches Nebenprodukt der Zellatmung, hoch reaktiv und kurzlebig. Die Produktion ist unter normalen Bedingungen eng durch antioxidative Enzyme und Stoffe reguliert, da eine Überproduktion zu oxidativem Stress und Schädigung von verschiedenen Makromolekülen führen kann. Für die Vitalität der Zelle ist somit die richtige Balance der Sauerstoffspezies unabdingbar: zu niedrige Spiegel gehen mit einer Unterstimulation einher, zu hohe Spiegel können den programmierten Zelltod induzieren. In Krebszellen ist dieses Gleichgewicht in Richtung einer gesteigerten mitochondrialen ROS-Synthese verschoben, die die Proliferation stimuliert.⁶⁰ Erhöhte ROS-Spiegel sind mit karzinogenen DNA-Schäden und Metastasierung assoziiert.⁶¹ Nichtsdestotrotz wird an anti-oxidativen und an pro-oxidativen Ansätzen zur Krebstherapie geforscht, weil eine exzessive ROS-Produktion selbst für adaptierte (Lungen)Krebszellen Apoptose induzierend wirkt.^{62, 63} In der Entstehung und Progression des Bronchialkarzinoms ist die Rolle der ROS insofern besonders interessant, als dass der Hauptrisikofaktor Zigarettenrauch einerseits selbst ROS enthält und andererseits auch die ROS-Produktion im Lungenepithel steigert.^{64, 65}

Für die meisten Zellen stellt die endogene ROS-Produktion die Hauptquelle dieser Signalmoleküle dar. Im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran werden nicht ganz 100 % des Elektronenflusses der Produktion von H_2O zugeführt, der fehlende Bruchteil generiert ROS; die zytosolische Quelle stellt insbesondere Komplex III der Atmungskette dar.⁶⁶ Die ROS-Produktion ist unter anderem abhängig vom Potenzial der inneren Mitochondrienmembran, $\Delta\Psi_m$. $\Delta\Psi_m$ ist stark negativ^{vii}

^{vii} In kortikalen Neuronen der Ratte wurde das Ruhepotenzial beispielsweise fluorometrisch auf -139 ± 5 mV kalkuliert.⁶⁷

zur Mitochondrienmatrix hin und bildet somit den elektrochemischen Gradienten für den Rückfluss der von der Atmungskette in den Intermembranraum transportierten Protonen (H^+) über die ATP-Synthase.⁶⁸ Bei einer Hyperpolarisierung dieses Potentials steigt die ROS-Produktion überlinear an.^{69, 70}

Vom Ende der Kausalkette startend sind ROS also Auslöser einer gesteigerten ICAM-1-Expression. Endogene ROS stammen von der Atmungskette der inneren Mitochondrienmembran. Deren Beitrag zum oxidativen Stress steigt mit ihrer Hyperpolarisierung. Die Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in der Mitochondrienmembran und sein modulierender Einfluss auf $\Delta\Psi_m$ kann daher das fehlende Bindeglied zwischen *KCNN4*-Methylierung und Metastasierungsverhalten bilden. Eine hypothetisch geöffnete $K_{Ca}3.1$ -Pore würde dem elektrochemischen Gradienten entsprechend zu einem Kationeneinstrom und zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran führen. Andersherum würde eine Inhibierung oder ein Knock-down des mitochondrialen $K_{Ca}3.1$ -Kanals (mito $K_{Ca}3.1$) $\Delta\Psi_m$ hyperpolarisieren, die ROS-Genese würden in pathophysiologische Bereiche ansteigen, ICAM-1-Moleküle würden vermehrt exprimiert werden und somit die Transmigration der Krebszellen durch die Gefäßwand reduzieren. Die Hypothese eines mitochondrialen $K_{Ca}3.1$ -Kanals kann daher eine Erklärung für die von Bulk et al. 2015 und 2017 veröffentlichten Ergebnisse liefern.

Die mitochondriale Lokalisation des $K_{Ca}3.1$ -Kanals ist für kolorektale, zervikale und pankreatische Karzinome bereits auf immunologischer und/oder elektrophysiologischer Basis beschrieben, zudem für murine, embryonale Fibroblasten und Melanomzellen.^{48, 71, 72, 73} Die dabei an Mitoplasten, also aus der Außenmembran gelösten Mitochondrien, untersuchten Charakteristika des $K_{Ca}3.1$ -Kanals zeigen hinsichtlich der Kaliumselektivität, der Kalziumabhängigkeit, der weitgehenden Spannungsindpendenz, der elektrischen Leitfähigkeit und der Pharmakodynamik^{viii} keine Differenzen zu dem in der Plasmamembran.^{48, 71} Das Vorkommen in den Mitochondrien ergibt in der inneren Membran insofern Sinn, als dass die äußere Membran generell permeabler ist als die innere Membran, gerade für (geladene) Einzelatome.

^{viii} Es wurden TRAM-34 und Clotrimazol überprüft.

2) Fragestellung

Die beschriebenen Erkenntnisse zeigen also einerseits eine klinische Korrelation zwischen *KCNN4*-Genmethylierung und Prognose, andererseits einen Effekt von Kanalmanipulation auf die Interaktion von NSCLC- und Endothelzellen. Bei dem noch unbekanntem intrazellulären Mediator zwischen $K_{Ca3.1}$ -Kanälen und ICAM-1-Präsentation auf der Plasmamembran handelt es sich möglicherweise um reaktive Sauerstoffspezies. Da die Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran die wichtigste Quelle endogener ROS darstellt, stellen sich hinsichtlich des Kaliumkanals drei Hauptfragen^{ix}.

Qualitativ: Werden $K_{Ca3.1}$ -Kanäle in den Mitochondrien von NSCLC- und Endothelzellen exprimiert?

Quantitativ: Lässt sich die Dichte der mitochondrialen $K_{Ca3.1}$ -Kanäle bestimmen?

Funktional: Hat die Inhibition der mitochondrialen $K_{Ca3.1}$ -Kanäle einen messbaren Effekt auf das mitochondriale Membranpotenzial und die ROS-Genese?

Für die lungenkarzinomatösen A549-3R- und die endothelialen HMEC-1-Zellen ist von einem mitochondrialen Vorkommen der $K_{Ca3.1}$ -Kanäle auszugehen, da an diesen Zellen unter Kanalinhhibition der beschriebene ICAM-1-Anstieg beobachtet werden konnte (s. 1.iii). Daher kann auch deren Funktionalität angenommen werden, eine mito $K_{Ca3.1}$ -Blockade sollte also mit einer $\Delta\Psi_m$ -Hyperpolarisation einhergehen. Inwiefern diese Hypothesen auch auf andere Lungenkrebszelllinien übertragbar sind, ist vorab nicht genauer abzuschätzen, da mit ihnen die Vorversuche nicht durchgeführt wurden. Zusammenfassend verspricht die Beantwortung dieser Hauptfragen ein besseres Verständnis des komplexen Zusammenspiels von Kaliumkanälen, Mitochondrien und reaktiven Sauerstoffspezies in der Entstehung, Entwicklung und vor allem Streuung von Lungenkrebs. Einen Schritt weiter gedacht könnte sich mit dem (mitochondrialen) $K_{Ca3.1}$ -Kanal nicht nur ein neuer Prognoseparameter, sondern auch ein Ziel für eine pharmakologische Krebstherapie bieten.

^{ix} Die genauen Nullhypothesen finden sich nach Ausführung der Methodik, um ein besseres Verständnis zu gewährleisten.

3) Methoden und Materialien

Alle Experimente waren entweder rein (bio)chemisch oder wurden an etablierten Zelllinien humanen Ursprungs (Risikogruppe 1 nach § 3 Biostoffverordnung) durchgeführt. Jede Räumlichkeit und die Qualifikation und Schutzausstattung aller Mitarbeitenden entsprachen den Vorschriften zur Schutzstufe 1. Tierversuche wurden nicht durchgeführt, ebenso wenig wurde mit isoliertem Patient*innenmaterial gearbeitet.

3. i) Zellkultur

Bei der **A549**-Zelllinie handelt es sich um hypotriploide Epithelzellen aus einem pulmonalen Adenokarzinom, welche 1972 einem 58-jährigen Kaukasier entnommen wurden.⁷⁴ Sie wurde als *in vitro*-Modell nicht nur für entsprechende Malignome genutzt, sondern auch zur Forschung über die Physiologie gesunder Alveolen.⁷⁵ Der Zusatz „3R“ bezieht sich auf den dreifach wiederholten Vorgang der intravenösen Applikation von Parentalzellen (also anfangs „0R“) in radiologisch immunkompromittierte Mäuse, Gewinnung von Lungenfiliae, *in vitro*-Kultur und Reinjektion, um somit Tumorzellen hohen metastatischen Potenzials zu selektionieren.⁷⁶ Diese weisen homozygot Wildtyp-Allele für den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) auf.⁷⁷

Auch die **H1975**-Linie ist lungenkarzinomatösen Ursprungs, isoliert aus einer Nichtraucherin und etabliert 1988. **H1299** sind ebenfalls NSCLC-Zellen, entnommen aus einer Lymphknotenmetastase eines 43-jährigen Patienten.

HMEC-1 (*Human dermal Microvascular Endothelial Cells*) ist eine von einem männlichen Patienten gewonnene endotheliale Zelllinie. Die Kultivierung direkt entnommener Endothelien birgt bisweilen gewisse Herausforderungen.⁷⁸ U. a. werden spezielle Nährmedien (beispielsweise eine Supplementation mit 30 % menschlichem Serum) benötigt, und trotzdem zeigt sich nur geringes Wachstum. Um sie genügsamer und widerstandsfähiger werden zu lassen, wurde diese Zelllinie mit einem Plasmid transfiziert, das für das potenziell immortalisierende *Large T* Antigen des Simian-40 Virus kodiert.^{79, 80}

Die Zelllinien wurden in den in Tabelle 2 aufgeführten Nährmedien bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) kultiviert, die karzinomatösen in Zellkulturschalen (∅ 10 cm) und die endotheliale in mit 0,5 % Gelatine vorbehandelten Zellkulturflaschen (25 oder 75 cm²).

Zelllinie	Nährmedium	Glukose [g/l]	Zusätze
A549-3R	DMEM	4,5	+ 10 % FCS Superior
H1975	RPMI 1640	2,0	+ 10 % FCS Superior
H1299	RPMI 1640	2,0	+ 10 % FCS Superior
HMEC-1	MCDB 131	1,0	10 % FCS Gold 1 % Glutamax TM 1 % Streptomycin/Penicillin 1 µg/ml Hydrocortison 10 ng/ml EGF

Tabelle 2: Zellkulturmedien der verwendeten Zelllinien

Um für den Vorgang des Passagierens die gebildeten Adhäsionen zwischen den Zellen untereinander sowie zur Oberfläche aufzulösen, wurde enzymatisch mit 0,25 % Trypsin-EDTA gearbeitet.⁸¹ Die Ethylendiamintetraessigsäure wirkte als Chelator für Mg²⁺ und insbesondere Ca²⁺ antiadhäsiv. Die für die Waschschriffe benötigte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurde in der Anfertigung ohne diese Ionen (minus/minus) verwendet. Das Trypsinieren erfolgte nahe der physiologischen Temperatur bei 37 °C. Die Dauer betrug je nach Zellart 10 bis 15 min, um die extrazellulären Adhäsionsmoleküle effektiv zu denaturieren, gleichzeitig aber noch nicht die Zellen selbst zu schädigen. Im Anschluss wurde direkt sowohl Ca²⁺ als auch *Fetal Calf Serum* (FCS) enthaltendes Medium hinzugefügt. Dessen Proteaseinhibitoren wie α -1-Antitrypsin antagonisierten die Wirkung des Verdauungsenzyms und beendeten somit den Prozess des Ablösens. Für eine genaue Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension 5 min unter 360-facher Erdbeschleunigung \vec{g} zentrifugiert (Heraeus MultifugeTM 1 S-R von Thermo Scientific), der Überstand abgesaugt, das Pellet in Medium resuspendiert und 10 µl in eine Zählkammer (Neubauer Improved ASSISTENT der Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG) pipettiert.

Mit steigender Passagezahl änderten sich auch die Eigenschaften der Zelllinien. Deshalb wurden frisch aufgetaute Zellen in FCS, mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als

Kryoprotektivum, suspendiert und für eine mittelfristige Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, für die langfristige Lagerung in Stickstofftanks bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert.⁸² Regelmäßig wurden Zellen neu der Tiefkühlung entnommen, um den Modellcharakter zu gewährleisten.

3. ii) Isolation von Mitochondrien

Da die Fragestellung auf das Vorkommen der Kanalproteine in der Mitochondrienmembran zielte, mussten diese Organellen für den Western Blot und bestimmte $\Delta\Psi\text{m}$ -Messungen zuerst isoliert werden. Dafür wurde unter Zuhilfenahme des kommerziell erhältlichen *Qproteome*TM *Mitochondria Isolation Kit* (QIAGEN N.V.) ein in diesem Labor neues Verfahren etabliert.^{83,84}

Alle Schritte der Mitochondrienisolation wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. 5 bis 10 Millionen Zellen wurden in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen bei $500 \times g$ für 10 min zentrifugiert (Heraeus MultifugeTM 1 S-R). Nach Verwerfen des Überstands und Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml 0,9 % Natriumchloridlösung (NaCl) wurde diese Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml *Lysis Buffer* (QIAGEN N.V.) mit $10\text{ }\mu\text{l}$ *Protease Inhibitor Solution* (QIAGEN N.V.) resuspendiert und für 10 min auf einer Schüttelmaschine bei 120 Rotationen pro Minute (rpm) platziert, um einerseits im Rahmen des Zellaufschlusses die intakte Plasmamembran zu zerstören, andererseits aber auch eine Solubilisation zu verhindern. Nach erneutem Zentrifugieren ($1.000 \times g$ für 10 min) und Absaugen des zytosolischen Überstands wurde der die Zellorganellen enthaltende Bodensatz mit 1,5 ml *Disruption Buffer* (QIAGEN N.V.) und $15\text{ }\mu\text{l}$ *Protease Inhibitor Solution* (QIAGEN N.V.) durchmischt. Zusätzlich wurde der Röhrcheninhalt zehnfach in eine 5 ml-Spritze aufgesogen und kräftig ausgestoßen. Nach Zentrifugation ($1.000 \times g$ für 10 min) wurde der Überstand in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und wieder zentrifugiert ($6.000 \times g$ für 10 min in einer Heraeus FrescoTM 21 Centrifuge der Thermo Electron LED GmbH). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Mitochondrienpellet in 1 ml *Mitochondria Storage Buffer* (QIAGEN N.V.) resuspendiert und zum vorletzten Mal zentrifugiert ($6.000 \times g$ für 20 min). Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Zentrifugations sediment mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Lagerungspuffer aufgenommen. Letzterer setzte sich aus $1.000\text{ }\mu\text{l}$ Radioimmunoprecipitationsassaypuffer (RIPA-Puffer: 10 % Natriumdeoxycholat, 5 % 1 M

Trometamol mit Salzsäure auf pH 7,6 eingestellt, 3 % 5 M NaCl, 1 % Tergitol NP-40, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)) und 167 µl einer Proteasen inhibierenden Complete MiniTM-Lösung zusammen. Nach halbstündiger Lagerung auf Eis erfolgte die finale Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min. Bis zur Anwendung wurden die Mitochondrien bei -80 °C aufbewahrt.

3. iii) Western Blot

Die 1979 erstbeschriebene Methode des *Western Blotting*, damals noch nicht unter diesem auf das Eponym "Southern Blot" anspielenden Namen, ist ein Verfahren zum Proteinnachweis, bei dem sich spezifischer Immunreaktion und Chemilumineszenz zur Detektion bedient wird.⁸⁵ Konkret beruht diese Detektion auf der hohen Spezifität der Antikörperbindung an ihre Antigene, womit letztere in und an lebendigen, fixierten oder – wie hier – aufgeschlossenen Zellen nachgewiesen werden können. Die Lysate können aufgrund der unterschiedlichen Größen der in ihnen enthaltenen Polypeptide gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend zur Dokumentation auf eine Membran übertragen werden. Dieser Schritt stellt das namensgebende „*Blotting*“ dar.

Diese Methode lässt sich in die Unterschritte Probengewinnung, Proteinbestimmung, Gelherstellung, Elektrophorese, Transfer, Proteinfärbung und Immundetektion aufgliedern.

Probengewinnung:

Die mitochondrialen Proteinfraktionen von A549-3R, H1975, H1299 und HMEC-1 wurden wie in 3.ii) beschrieben isoliert. Als Kontrolle wurden Ganzzelllysate verwendet. Dafür wurde das Medium aus den konfluent mit Zellen bewachsenen 78,5 cm²-Schalen bzw. 75 cm²-Flaschen abgesaugt. Die Zellen wurden mit 3 × 6 ml 4 °C kalter PBS -/- gewaschen. Anschließend wurden 583 µl des oben beschriebenen Lyse-/Lagerungspuffers (RIPA + Complete MiniTM) hinzu pipettiert. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 min auf Eis unter wiederholtem Schwenken. Mit einem Zellschaber und einer 1.000 µl-Pipette wurde das Lysat daraufhin in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. In Analogie zur Mitochondrienisolation wurde nach halbstündiger Lagerung auf Eis 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Heraeus FrescoTM 21

Centrifuge). Der das zelluläre Proteom enthaltende Überstand wurde in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt und nach Bedarf bei -80 °C gelagert.

Proteinbestimmung:

Der Proteingehalt der Ganzzelllysate wurde mit dem *Pierce*TM *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Dazu wurden für neun Standardkonzentrationen^x bovinen Serumalbumins je 2 × 10 µl und von den Proben je 2 × 5 µl in eine transparente 96-well-Platte pipettiert. Aufgrund der geringeren Probenvolumina wurden die Mitochondrienisolationen nicht standardmäßig mitbestimmt. Stattdessen wurde nach erfolgreicher Durchführung der Experimente für jede der vier verschiedenen Zelllinien die Mitochondrienprobe gemessen, die auf der Membran die kräftigste Bak-Bande aufgewiesen hatte. Das Protein Bak spielt eine Rolle in der Apoptoseregulation und wurde hier als spezifischer Mitochondrienmarker verwendet.⁸⁶

In jede der 18 Standard- und der Proben-Vertiefungen der Pipettierplatte wurden 200 µl einer 50:1-Mixtur von Reagent A und B des Kits hinzugegeben und 30 min unter Abschirmung von Licht bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die kolorimetrische Auswertung bei 562 nm mittels des ThermoMax Microplate Reader und SoftMax Pro 3.1.2 (beides von Molecular Devices LLC). Der Durchschnitt der beiden resultierenden Proteinkonzentrationen pro Probe musste noch verdoppelt werden, da deren verwendetes Volumen nur 50 % der Standards entsprach.

Die Grundlage der Messung stellt die Bindung von Kupferkationen (Cu²⁺) an die Peptidbindungen und die im basischen Milieu stattfindende Reduktion zu einwertigem Cu⁺ dar. Dieses wiederum komplexiert mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure (BCA) zu einem Farbstoff, der im langwelligen Spektralbereich absorbiert.⁸⁷

^x Diese verteilten sich zwischen 2.000 µg/ml und 25 µg/ml in RIPA + Proteaseinhibitoren inklusive einer Negativkontrolle (0 µg/ml).

Gelherstellung:

Die Polyacrylamidgele wurden eigens unter Berücksichtigung der Molekülmassen^{xi} angefertigt. Für den K_{Ca}3.1-Kanal sind dies 50 kDa und für Bak 29 kDa. Die Wahl fiel also auf ein Trenngel mit 10 % Polyacrylamidanteil und einer Dicke von 1,5 mm.

Nach Einspannen einer Glasform in Gießrahmen und -stand wurde das Trenngel (s. Tabelle 3) eingefüllt und mit drei Tropfen Propan-2-ol gegen Luftkontakt beschichtet. Nachdem das Gel mindestens 20 min auspolymerisiert hatte, wurde der Propan-2-ol mit einem Papiertuch abgesaugt und das Sammelgel (5 %, s. Tabelle 3) hinzugefügt. Vor der mindestens 60-minütigen Polymerisation wurde noch ein Zehntaschen-Gelkamm eingesetzt.

Inhaltsstoffe	Trenngel, 10% [µl]	Sammelgel, 5 % [µl]
Wasser, destilliert	2500	2600
Rotiphoresegel TM A	3240	750
Rotiphoresegel TM B	1340	300
Tris/Natriumdodecylsulfat, 1,5 M	2600	1000
Ammoniumpersulfat, 10 %	50	50
Tetramethylethyldiamin	7,5	5

Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Elektrophorese:

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) trennt die Proteine nach ihrer Masse auf. Dabei dient das Sammelgel der Probenkonzentrierung, bevor es dann im Trenngel zur Aufbänderung kommt. Nach Denaturierung durch Hitze und β -Mercaptoethanol (gegen Disulfidbrücken) lagert sich das anionische Detergenz Dodecylsulfat an die Polypeptide an und sorgt für eine negative Gesamtladung, die nicht mehr von der Polarität der einzelnen Aminosäuren abhängt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Proteine in

^{xi} Wenngleich sich die Einheit Dalton auf die Masse eines Moleküls bezieht, wird üblicherweise auch von „Molekülgrößen“ gesprochen. In diesem Rahmen ist es aufgrund der vergleichbaren Aminosäuredichten und der somit engen Korrelation zwischen Volumen und Masse des denaturierten Polypeptids vertretbar.

Richtung Anode, wobei kleinere Proteine das Polyacrylamidnetz besser durchdringen und daher eine höhere Geschwindigkeit aufweisen.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen vorbereitet. In die Proben der Ganzzelllysate wurde bei ausreichender Proteinkonzentration ein 25 µg Polypeptid enthaltendes Volumen pipettiert und mit RIPA auf 20 µl aufgefüllt. Von den Mitochondrienisolationen sowie von unzureichend konzentrierten Ganzzelllysaten (Proteingehalt < 1,25 µg/µl) wurden 30 µl genommen, anschließend zu jedem Mikroreaktionsgefäß noch ein Viertel des Probenvolumens an Ladepuffer addiert (5 µl oder 7,5 µl). Danach wurde 5 min bei 95 °C denaturiert und wenige Sekunden zentrifugiert, um das entstandene Kondenswasser den Proben rückzuführen. Nun wurde das Gel im Fixierahmen in den Puffertank gestellt (Mini PROTEAN™ 3 von Bio-Rad Laboratories, Inc.) und der Laufpuffer (14,4 g/l Glycin, 3 g/l Tris, 1 g/l SDS) eingefüllt. Nach Entfernen des Gelkamms wurden die Probenaschen im und mit Laufpuffer ausgespült, und mit den Proben sowie mit 5 µl eines Größenmarkers (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*) beladen. Die Elektrophorese erfolgte für mindestens 90 min bei einer Spannung von 80 V. Danach wurde optisch kontrolliert, ob der Marker sich schon über die gesamte Gelhöhe erstreckte, und gegebenenfalls die Elektrophorese verlängert.

Transfer:

Für die immunologischen Schritte wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran^{xii} (PVDF) übertragen. Dazu wurden Gel und Membran aufeinandergepresst in einer mit Transferpuffer (7,51 g/l Glycin, 1,211 g/l Tris, 10 % Methanol) gefüllte Transferkammer platziert. Über Nacht wurde bei 4 °C eine Stromstärke von 20 mA eingestellt, wodurch die Proteine bei einer Spannung von < 20 V erneut Richtung Anode und damit PVDF-Membran wanderten.

Proteinfärbung:

Der Erfolg des Transfers auf die PVDF-Membran konnte anhand einer Inkubation des Gels mit Coomassie-Brillant-Blau R-250 überprüft werden. Nach 30 min auf dem Schütteltisch (80 rpm) wurde das Elektrophoresegel vierfach mit *Aqua destillata* gewaschen, und im ChemiDoc™

^{xii} Diese wurde in Methanol aktiviert, um ihre Hydrophobie zu reduzieren.

Imaging System und mit der Image LabTM Touch Software (Version 2.2.0.08, beides von Bio-Rad Laboratories, Inc.) kolorimetrisch ausgewertet. Je gründlicher der Transfer gelungen war, desto geringer waren Anzahl und Intensität der Proteinbanden.

Immundetektion:

Im letzten Teil des Experiments konnte die Membran der immunochemischen Dokumentation zugeführt werden. Dafür wurde die PVDF-Membran über der 35 kDa-Markerbande durchtrennt und 60 min auf dem Schütteltisch (80 rpm) in 5 % Magermilchpulver und 0,05 % Polysorbat (als Emulgator) in PBS geblockt. Dies diente der Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen und der Vermeidung falsch positiver Signale. Danach wurden die spezifischen Kaninchen-Immunglobuline eingesetzt: gegen das Antigen K_{Ca}3.1 für die Membranhälfte oberhalb der 35 kDa, und gegen Bak für die Membranhälfte unterhalb davon. Es wurde eine 1:500-Verdünnung eingesetzt, also 6 µl der 0,5 µg/µl-Antikörperaliquots auf 3 ml Milch. Die Inkubation erfolgte in Plastik eingeschweißt über Nacht bei 4 °C auf dem Schütteltisch (30 rpm). Am nächsten Tag wurden die ungebundenen primären Antikörper durch dreimaliges Waschen (je 5 min, 80 rpm) in PBS-T (für 0,05 % TWEENTM 20) entfernt und der sekundäre Antikörper 60 min bei 80 rpm hinzugegeben. Dieses peroxidasekonjugierte Ziegenanti-Kaninchen IgG (1:10.000 in Milch) konnte somit an die Erstantikörper binden, sein Überschuss wurde durch einen erneuten Waschschrift (dreifach, zehnminütig, 80 rpm) entfernt. Damit das gekoppelte Enzym seiner Reporterfunktion nachkommen konnte, inkubierten die Membranen zuletzt 5 min dunkel in einer Mixtur von je 400 µl Peroxidpuffer und Luminol (beides aus dem Kit SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate von Thermo Fisher Scientific), bevor das Signal mit dem ChemiDocTM Imaging System festgehalten wurde.

Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Reaktion von Sauerstoff und Wasser zu Wasserstoffperoxid. Der Luminophor wiederum wird durch H₂O₂ oxidiert und emittiert Photonen im blauen Spektralbereich. Die Chemilumineszenz zeigt also die Produktakkumulation des an den Zweitantikörper gebundenen Enzyms, und damit auch den Erstantikörper und das Zielprotein an.

Alternativ erfolgte die Doppelinkubation gegen K_{Ca}3.1-Känale und Bak nicht synchron nach Zerschneiden der Membran, sondern sequenziell an der ganzen Membran. Dies diente zur Überprüfung, ob es durch den oberhalb der 35 kDa-Markerbande angesetzten Schnitt zur Nicht-

Detektion von Banden in diesem Bereich kam. Dafür wurden die beiden Immundetektionen durch $3 \times 7,5$ min Waschen in PBS-T getrennt. Auf ein sogenanntes „*Stripping*“ zum Loslösen der Antikörper (z.B. mit NaOH) wurde zur Schonung der Proteine verzichtet. Dies wurde durch die an sich gute Differenzierbarkeit der Banden gerechtfertigt. Nach Bestimmung der Kanal-Bande und dem dreimaligen Waschen setzte die Immundetektion der Bak-Bande im beschriebenen Protokoll wieder beim Blocken (in Milch, 60 min, 80 rpm) ein. Die weiteren Schritte erfolgten wie angeführt. Da sich die Ergebnisse von synchroner Inkubation an der zerschnittenen Membran und von sequenzieller Inkubation an der ganzen Membran allerdings nicht unterschieden, wurde diese alternative Vorgehensweise nicht weiterverfolgt.

3. iv) Immunfluoreszenz

Auch mit diesem Verfahren lassen sich Antigene nachweisen. Im Gegensatz zum oben ausgeführten Western Blotting stellen hierbei jedoch nicht Lysate sondern (fixierte) Zellen *in toto* das Ausgangsmaterial dar. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet der primäre Antikörper an die Zielstruktur, danach wird ein sekundärer Antikörper zur Detektion hinzugegeben. Durch die Konjugation des zweiten Antikörpers mit einem Fluorochrom anstelle eines Enzyms kann an einem entsprechenden Mikroskop durch Anregung mittels Lichts einer definierten Wellenlänge (λ) die Fluoreszenz direkt ausgewertet werden.⁸⁸

Vorbereitend wurden die Deckgläschen (\varnothing 15 mm) mit 0,1 % Poly-L-Lysin für 30 min, bzw. für die HMEC-1-Endothelien mit 0,5 % Gelatine für 60 min beschichtet, anschließend 100.000 bzw. 200.000 Zellen ausgesät. Die Karzinomzellen wuchsen nur über eine Nacht an; die HMEC-1-Zellen über deren drei, danach wurde das Medium gewechselt und 10 ng proinflammatorischer Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) für weitere 24 Stunden hinzugegeben, um den (lungen)karzinomtypischen Effekt von Entzündungsmediatoren auf das Endothel zu simulieren.^{89, 90}

Für eine gleichzeitige Mitochondrienfärbung wurde Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM, von Sigma Aldrich, s. Tabelle 4) angewandt.⁹¹ Seine Lipophilie lässt ihn Zell- wie Mitochondrienmembran permeieren, seine Kationizität bewirkt eine Akkumulation in der anionischen Mitochondrienmatrix. Die noch vitalen Zellen wurden bei 37 °C für 45 min mit

einer 200 nM-Verdünnung in HEPES-gepufferter Ringerlösung^{xiii} inkubiert. Daraufhin wurde die Zellkultur 60 min in 1 ml 3,5 % Paraformaldehyd fixiert, dieser Schritt durch 1 ml 100 mM Glycin in PBS zehnminütig gestoppt. Die Permeabilisation der Zellmembran wurde erforderlich durch den erwünschten Nachweis von intrazellulären Strukturen, benutzt wurde 1 ml des Detergentiums TritonTM X-100 (0,25 % Octoxinol 9 in 1 % SDS/PBS) für 10 min.^{92, 93} Zwischen den beschriebenen Schritten wurde je dreifach mit 1 ml PBS gewaschen.

Es folgte das Blockieren: mittels halbstündiger Inkubation in 30 µl 10 % Ziegennormalserum^{xiv} (10 % ZNS, 10 % Na₂HPO₄ (0,1 M) und 5 % NaCl (3 M) in AmpuwaTM) bei Raumtemperatur wurden Fehler durch Andocken der Antikörper an unspezifische Strukturen des untersuchten Biomaterials vermieden.⁹⁴ 30 µl des Kaninchen-anti-K_{Ca}3.1-Immunglobulins (1:300 in ZNS, nicht angewandt bei den Negativkontrollen) inkubierten ebenfalls in einer dunklen Feuchtkammer, jedoch zwei Stunden lang. Danach wurden unter Abschirmung direkten Lichts 30 µl des sekundären, mit Fluoreszinisothiocyanat (FITC, von Thermo Fisher Scientific, s. Tabelle 4) konjugierten Antikörpers (1:600 in ZNS) hinzugefügt, diesmal auch bei den Negativkontrollen, um die Spezifität des Sekundärantikörpers zu testen.

Nach dieser 45-minütigen Inkubation erfolgte eine erneute, 10 min andauernde Fixation in 1 ml 3,5 % Paraformaldehyd. Zuletzt konnten die Deckgläschen in einem speziellen Präparatmedium auf Objektträger übertragen werden. Diese wurden kühl und dunkel gelagert und standen fortan verschiedenen, nach Bedarf auch wiederholten, Auswertungen zur Verfügung. Bei unmittelbarer Dokumentation konnte auf diesen letzten Konservierungsschritt verzichtet werden, da die Deckgläschen anschließend verworfen wurden.

Mitunter wurden als Fluorochrome zusätzlich Indocarbocyanin (Cy3, von Thermo Fisher Scientific) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, von Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Ersteres, an den Zweitantikörper gekoppelt (Verdünnung 1:500 in ZNS), wies bei *per se* guter Detektion der Kanäle jedoch optische Ähnlichkeiten zum TMRM auf. Zweiteres färbte

^{xiii} 2,38 g/l 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, 1,09 g/l Glukose, 4,08 % NaCl (3 M), 1,20 % CaCl₂ (0,1 M), 0,80 % MgCl₂ (0,1 M), 0,54 % KCl (1 M); bei 25 °C mit Natronlauge (3 M NaOH) auf pH 7,57 titriert

^{xiv} ZNS wurde verwendet, weil es das Serum der Spezies war, aus der auch die Zweitantikörper stammten.

Doppelstrang-DNA^{xv} und somit den Zellkern an. Dies verschaffte eine gewisse Orientierungshilfe in den Aufnahmen, war für die Analyse jedoch nicht essenziell.

Fluorophor	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Diamidinphenylindol (DAPI)	358	461
Fluoreszinoisothiocyanat (FITC)	495	519
Indocarbocyanin (Cy3)	553	566
Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM)	554	576

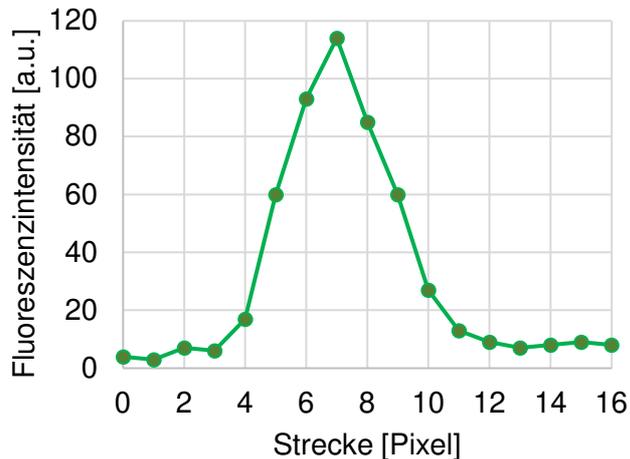
Tabelle 4: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und ihre optischen Charakteristika

Es wurde ein inverses Axiovert 200-Mikroskop (Carl Zeiss AG) mit einem $\times 100$ Ölimmersionsobjektiv verwendet. Mittels eines Anregungsfilters wurden die verschiedenen Fluorophore mit Licht entsprechend ihres Absorptionsmaximums bestrahlt. Das daraufhin emittierte Licht verlief wiederum durch einen Sperrfilter, damit dann im Okular bzw. auf der Kamera (SPOT RT SE von Diagnostic Instruments Inc.) nur noch die Wellenlänge der erwünschten Fluoreszenz vorlag.⁹⁶ Das Bild wurde auf einen Computer übertragen. Als verrechnende und steuernde Software wurde MetaVue (Version 6.3r6 von Molecular Devices LLC) genutzt.

Für die Auswertung von mitochondrialen Lokalisationen des $K_{Ca}3.1$ -Kanals wurden im mit dem Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-Filter (Carl Zeiss Filter Set 15, Bandpass-Exzitationsfilter 546/12, Farbteiler 580, Emissionsfilter Long Pass 590) aufgenommenen Bild zufällig drei Quadrate mit einer Seitenlänge von 100 Pixeln eingezeichnet, bei einer Pixelgröße von ca. $60 \text{ nm} \times 60 \text{ nm}$ entsprechend einer Fläche von je $36 \mu\text{m}^2$.⁹⁷ Mittels einer Dichotomisierung der Pixel anhand eines individuell für jedes TRITC-Bild gewählten Intensitätsschwellenwertes konnte mit MetaVue die Fläche der Mitochondrien errechnet werden. Anschließend wurde das FITC-Bild (Carl Zeiss Filter Set 10, Bandbreiten-

^{xv} Das Emissionsmaximum von an RNA bindendem DAPI unterscheidet sich mit $\lambda = 500 \text{ nm}$ genügend, um *de facto* eine dsDNA-Spezifität zu erreichen.⁹⁵

Anregungsfilter 450-490, Farbteiler 510, Bandpass-Emissionsfilter 515-565) addiert. Zur eindeutigen Unterscheidung der Bilder wurde das Mitochondrienbild rot, die Aufnahme der Kanäle grün koloriert. Anhand von Linien-Intensitätsprofilen (s. Graphik 4) wurden in den davor schon ausgewählten Regionen die abgebildeten Kanäle identifiziert.



Graphik 4: Beispielhaftes Intensitätsprofil und Bestimmung der Halbwertsbreite

Es wird eine über einen potenziellen Kanal gelegte Messlinie als Intensitätsprofil dargestellt. Dieses trägt die Fluoreszenzintensität in arbiträrer Einheit gegen die Strecke in Pixeln auf. Die maximale Intensität beträgt 114 a.u., die minimale 6 a.u. Die halbmaximale Intensität ist also 60 a.u. $[0,5(y_{\max} + y_{\min})]$. Den y-Wert von 60 nimmt der Graph für $x = 5$ und für $x = 9$ an, aus der Differenz berechnet sich daher eine Halbwertsbreite von 4 Pixeln.

Über jeden grünen Punkt wurde also eine durch das Maximum verlaufende Linie gelegt und anhand deren Intensitätsprofil zwei Fragen beantwortet:

1. Liegt ein $K_{Ca3.1}$ -Kanal vor?

Ausschlusskriterium war eine Halbwertsbreite (*Full Width at Half Maximum*) > 5 Pixel, also etwa 300 nm. Dabei wurden unter Inkaufnahme einer geringeren Sensitivität und zugunsten einer höheren Spezifität Intensitätswerte stets abgerundet, wenn $0,5(y_{\max} + y_{\min})$ bei der Berechnung der FITC-FWHM keine ganze Zahl ergab.

Bejahung von 1. führte zu

2. Liegt eine Kollokalisierung vor?

Als solche angesehen wurden Intensitätsanstiege in beiden Fluoreszenz-Kanälen, bei denen die x-Koordinaten des FITC-Maximums und der TRITC-FWHM um nicht mehr als einen Pixel differierten. Dabei wurden Intensitätswerte unter Inkaufnahme einer geringeren Sensitivität und zugunsten einer höheren Spezifität stets aufgerundet, wenn $0,5(y_{\max} + y_{\min})$ bei der Berechnung der TRITC-FWHM keine ganze Zahl ergab.

Pro Immunfärbung wurden mindestens zehn Zellen von mindestens zwei verschiedenen Deckgläschen ausgewertet. Da es bei Überlagerung von Mitochondriensignal (rot koloriert) und Kanalsignal (grün koloriert) nach additiver Farbsynthese zu einer gelben Darstellung kommt, werden im Folgenden kolokalisierte $K_{Ca3.1}$ -Kanäle auch mit „gelb“ beschrieben, nicht-kolokalisierte dementsprechend mit „grün“.

Es sollte überprüft werden, ob sich sowohl die kolokalen als auch die nicht-kolokalen $K_{Ca3.1}$ -Kanaldichten zwischen den drei verschiedenen Zelllinien unterscheiden. Weiter war von Interesse, ob die Dichte der Kanäle in jeder einzelnen Zelllinie in Superposition mit den Mitochondrien höher ist. Und zuletzt stellte sich die Frage, ob das Verhältnis von mitochondrialen zu plasmamembranösen Kanälen in den malignen und physiologischen Zellen vergleichbar ist. Dementsprechend ließen sich folgende Nullhypothesen aufstellen:

- H_{0a}: Die kolokalen $K_{Ca3.1}$ -Kanaldichten der Zelllinien A549-3R, H1975 und HMEC-1 unterscheiden sich nicht.
- H_{0b}: A549-3R-, H1975- und HMEC-1-Zellen differieren in ihren nicht-kolokalen $K_{Ca3.1}$ -Kanaldichten nicht.
- H_{0c}: In den Zelllinien A549-3R, H1975 und HMEC-1 gibt es keinen Unterschied zwischen den jeweiligen $K_{Ca3.1}$ -Kanaldichten mit mitochondrialer Kolokalisation und ohne sie.
- H_{0d}: Das Verhältnis von mitochondrialer zu nichtmitochondrialer Kanaldichte ist für die Zelllinien A549-3R, H1975 und HMEC-1 identisch.

3. v) Messung des mitochondrialen Membranpotenzials

a) Ganze Zellen

Der aromatische, kationische Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (in PBS Absorptionsmaximum von $\lambda = 488$ nm, Emissionsmaximum von $\lambda = 515 - 575$ nm laut Hersteller Sigma Aldrich) reichert sich in Abhängigkeit vom inneren Membranpotenzial in der

Mitochondrienmatrix an.⁹⁸ Dabei kommt es aufgrund der hohen Polarität konzentrationsbedingt zum „*Quenching*“, also zur Intensitätsabnahme. Insofern kann durch Aufzeichnen des Fluoreszenzsignals und seiner Änderung direkt auf $\Delta\Psi_m$ rückgeschlossen werden.⁹¹

Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm mit \varnothing 18 mm Glasboden) wurden mit 0,1 % Poly-L-Lysin vorbeschichtet. Nach 30 min wurden je 100.000 A549-3R-Zellen ausgesiedelt und in DMEM über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die HMEC-1-Zellen wurden zu 200.000 in über 60 min mit 0,5 % Gelatine behandelte Schälchen (\varnothing 35 mm mit \varnothing 18 mm Glasboden) gegeben, über zwei Nächte anwachsen gelassen, und nach Mediumwechsel für eine weitere Nacht mit TNF α versetzt. Dies diente in Analogie zur Immunfluoreszenz (s. 3.iv) dem Modell des systemischen Vorkommens (lungen)karzinomatöser Entzündungsmediatoren. Am nächsten Tag wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen dreifach mit 1 ml HEPES-gepufferter Ringerlösung gewaschen und anschließend 60 min in 1 ml Lösung bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Bei dieser Inkubationslösung handelte es sich um HEPES-gepufferte Ringerlösung (als Kontrolle). Bedarfsweise wurden zugesetzt:

- 100 ng/ml EGF
- 14 mM^{xvi} DMSO ohne Kanalmodulator (als Kontrolle)
- 10 μ M TRAM-34
- 200 μ M 1-EBIO
- 10 μ M Paxillin

Dabei diente TRAM-34 als Blocker des K_{Ca}3.1-Kanals, 1-EBIO als dessen Aktivator (s. Tabelle 1) und Paxillin als Hemmer des K_{Ca}1.1-Kanals. Für diesen K_{Ca}1.1-Kanal ist eine weite Verbreitung beschrieben, auch in den Mitochondrien vieler Zellarten. Aufgrund dieser stärkeren Evidenzlage als für einen mitoK_{Ca}3.1 sollte der Einsatz von Paxillin als potenzielle Positivkontrolle einer Hyperpolarisierung fungieren.⁹⁹

Alle Kanalmodulatoren wurden hochkonzentriert in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für die Experimente wurden die Lösungen frisch entsprechend der aufgeführten Konzentration angesetzt.

^{xvi} Dies entsprach einer 1:1.000-Verdünnung, um somit die gleiche DMSO-Konzentration in den Kanalmodulatorproben wie in der Solvens-Kontrolle zu erzielen.

Nach der Stunde im Wärmeschrank wurde 1 μl Rhodamin 123 (26 mM in DMSO, Endkonzentration vom Rhodamin 123 in den Glasbodenschalen also 26 μM) hinzupipettiert und erneut 15 min bei 37 °C in Raumluft inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung abgesaugt und die Schale mit der jeweiligen Inkubationslösung gewaschen.

Unter Durchfluss dieser Inkubationslösung wurden die Zellen bei 37 °C am inversen Axiovert 200-Mikroskop (Carl Zeiss AG) unter Nutzung eines $\times 40$ Ölimmersionsobjektivs und eines FITC480-Anregungsfilters (Farbteiler DCXR 515 (dichroic longpass, extended reflection), Emissionsfilter D535/25m) fluoreszenzmikroskopisch eingestellt. Es folgte eine Bildersequenz mit einer Aufnahme durch eine *scientific complementary metal-oxide-semiconductor* pco.edge-Kamera (PCO AG) alle 10 s (50 ms Belichtungszeit), nach 4 min Inkubationslösung (25 Bilder) wurde auf Durchfluss mit 10 mM Natriumazid (NaN_3) in HEPES-Ringer umgestellt, die Aufnahme nach weiteren 5 bis 9 min (also nach Bild 55 bis 85) beendet. Aufnahmesoftware war VisiView (Version 2.1.4 von Visitron Systems GmbH), die Auswertung erfolgte mittels ImageJ/FIJI (*public domain* der NIH).

Dafür wurden als zu analysierende Region (ROI) perinukleär die Mitochondrien eingezeichnet und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität dieser Fläche über alle 55 bis 85 Bilder ermittelt. Gleichzeitig wurde für jedes Bild in einem fixen, zellfreien Bereich die jeweilige Hintergrundfluoreszenzintensität gemessen und von den mitochondrialen Werten subtrahiert. Da das Azidanion (N_3^-) als Atmungskettengift Komplex IV inhibiert und so zu einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran führt, erfolgte nach dessen Applikation ein Anstieg der Signalstärke (s. Graphik 8).¹⁰⁰ Zeigte sich dieser Anstieg erst verzögert, wurde die Aufnahmedauer um einige Bilder erweitert. Die maximale Intensität unter NaN_3 wurde als 100 % definiert und die durchschnittliche Intensität der ROI der letzten sechs Aufnahmen (Bilder 21 bis 25) in der jeweiligen Inkubationslösung dazu in Relation gesetzt. Somit konnte jeder Zelle ein Prozentwert zugeordnet werden. Ferner wurden zwei Ausschlusskriterien definiert:

- a) Werte $> 100 \%$ für Karzinomzellen, bzw. aufgrund insgesamt geringerer Bildqualität $> 90 \%$ für Endothelzellen, da hier nicht von vitalen Zellen ausgegangen werden konnte.
- b) eine Steigung > 0 *arbitrary units/s* in den letzten drei Bildern der Sequenz, da hier nicht von einem Erreichen des Maximums mit typischer konsekutiver Signalabnahme ausgegangen werden konnte.

Sowohl in Krebs- als auch in Endothelzellen sollte überprüft werden, ob sich durch Kanalaktivierung oder -inhibition das Membranpotenzial ändern lässt. Dies wäre ein starkes Indiz für das Vorkommen funktionaler $K_{Ca3.1}$ - bzw. $K_{Ca1.1}$ -Kanäle in den Mitochondrienmembranen der entsprechenden Zelllinien.

H_{0e}: Die relative Änderung des mitochondrialen Membranpotenzials durch die Hinzugabe von Natriumazid unterscheidet sich für mit HEPES-Ringer, EGF, DMSO, 1-EBIO, TRAM-34 oder Paxillin vorinkubierte A549-3R-Zellen nicht.

H_{0f}: Es gibt keinen Unterschied in der relativen Änderung des mitochondrialen Membranpotenzials nach Natriumazidgabe zwischen mit HEPES-Ringer, EGF, DMSO, 1-EBIO, TRAM-34 oder Paxillin vorbehandelten HMEC-1-Zellen.

b) Isolierte Mitochondrien

Zunächst erfolgte die Mitochondrienisolation von A549-3R-Zellen wie beschrieben (s. 3.ii), jedoch das Resuspendieren nicht in Lagerungspuffer. Stattdessen wurde 1 ml eines am Zytoplasma orientierten Mitochondrienpuffers^{xvii} verwendet. Für die Proben war er mit 30 μ M TRAM-34, für die Negativkontrolle mit 0,3 % DMSO versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C im Wärmeschrank und weitere 5 min nach Zugabe von 1 μ l Rhodamin 123 (26 mM). Nach Zentrifugation (6.000 \times g, 10 min, 37 °C, Heraeus FrescoTM 21 Centrifuge) wurde der Überstand verworfen und das Pellet wieder in 900 μ l TRAM- bzw. DMSO-Mitochondrienpuffer aufgenommen. Pro 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß wurden 3 \times 300 μ l in eine schwarze 96-well-Platte pipettiert und mit dem Fluoroskan II Fluorescent Microplate Reader (Version 4.0 von Thermo LabSystems Inc.) und der Software Genesis Lite (Version 3.04 von Life Sciences Ltd.) die Fluoreszenzintensität gemessen. Daraufhin wurden pro Vertiefung 3 μ l NaN_3 (1 M) hinzugefügt. Zweimal hintereinander wurde darauffolgend 7,5 min bei 37 °C inkubiert und erneut gemessen.

^{xvii} 125 mM KCl, 20 mM HEPES, 5 mM Pyruvat, 2,5 mM KH_2PO_4 , 2 mM $MgCl_2$, 0,1 % bovines Serumalbumin; bei 37 °C mit Kalilauge (1 M KOH) auf pH 7,2 titriert.¹⁰¹

Wie auch bei den $\Delta\Psi_m$ -Messungen an ganzen Zellen wurde der durch das Atmungskettengift provozierte Wert als 100 % bestimmt und der Ausgangswert in Relation gesetzt. Die Fragestellung war hier grundlegend dieselbe wie bei den Messungen an den ganzen Zellen, beschränkte sich aufgrund des geringeren Ausgangsmaterials auf die A549-Krebszellen und den $K_{Ca}3.1$ -Aktivator TRAM-34: Kann durch eine potenzielle, TRAM-34-induzierte Hyperpolarisation von $\Delta\Psi_m$ auf die Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in der Mitochondrienmembran rückgeschlossen werden?

H₀g: Die relative Änderung von $\Delta\Psi_m$ durch die Depolarisation mit Natriumazid unterscheidet sich für mit DMSO oder mit TRAM-34 vorinkubierte A549-3R-Mitochondrien nicht.

3. vi) Messung der Lipophilie, durchgeführt von Kathrin Brömmel (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, WWU)

Um die Ergebnisse der Messungen unter Kanalmanipulation besser einschätzen zu können, führte Kathrin Brömmel eine Bestimmung des Distributionskoeffizienten D für die verschiedenen Stoffe durch. Grundlage ist die Verteilung in hydrophiler und lipophiler Phase, hier wässrigem Puffer und n-Octanol.

Verwendung fanden Schüttelkolben und Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung sowie folgende Materialien: 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS, Fisher BioReagents), MOPS-Natriumsalz (Sigma Aldrich), n-Octanol (ChromasolvTM für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von Sigma Aldrich), DMSO (Fisher Scientific). TRAM-34, 1-EBIO, Paxillin und Senicapoc waren gleicher Herkunft wie in den anderen Experimenten (s. Tabelle 5)

Zuerst wurden für jeden Stoff die Spannung des Fragmentors und die Gastemperatur mittels Fließinjektionsanalyse optimiert. Dazu wurde jeweils 1,0 μ l der Proben (10 μ l 10 mM TRAM-34/1-EBIO/Paxillin/Senicapoc, 495 μ l Acetonitril, 495 μ l destilliertes Wasser) unter Variation von Spannung und Temperatur und konstanten übrigen Parametern gemessen. Die maximale Fläche unter der Kurve zeigte das Optimum für jedes Analysat an.

Am Vortag der Experimente wurde ein 20 mM MOPS-Puffer hergestellt (8,9 mM MOPS, 11,1 mM MOPS-Natriumsalz in destilliertem Wasser bei pH 7,4). Für 24 Stunden wurden der Puffer und n-Octanol vermischt und gesättigt, anschließend organische und wässrige Phase getrennt. 7,5 µl der 10 µM Kanalmodulatoren wurden mit Puffer und n-Octanol in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Es kam immer ein Gesamtvolumen von 1507,5 µl zum Einsatz, mit Phasenverhältnissen von 2:1, 1:1 und 1:2. Es folgten 10 min Vermischen und 10 min separierende Zentrifugation (16.000 rpm bei Raumtemperatur). 100 µl der wässrigen Phase wurden anschließend chromatographisch und massenspektroskopisch mit *Selected Ion Monitoring* (SIM) ausgewertet. Anhand einer Kalibrierung mit mindestens sechs Stoffproben bekannter Konzentration (Pearson-Korrelationskoeffizient > 0,98) konnte die Konzentration in der wässrigen, und durch die Massenerhaltung auch die in der lipophilen Phase ermittelt werden.

Pro Mischungsverhältnis wurde das Experiment dreifach durchgeführt, pro Analysat also neun Mal. Die Resultate wurden als dekadischer Logarithmus für neutralen pH angegeben:

$$\lg D_{7,4} = \lg ([\text{Stoff}]_{\text{Octanol}} / [\text{Stoff}]_{\text{Puffer}})$$

3. vii) Statistische Analyse

Vorangestellt sei die Betonung des explorativen Charakters dieser Arbeit, wodurch sich die Testung von der konfirmatorischer Studien unterscheidet.

Für die statistischen Berechnungen wurde OriginPro 8 SR0 (v8.0724 der OriginLab Corporation) verwendet. Die Datenreihen wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und quadriertem Levene-Test auf Homoskedastizität untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Stichprobengrößen wurde einzig für ersteren Test $\alpha = 0,01$ festgelegt.

Als parametrische Tests kamen die *Analysis Of Variance* (ANOVA, *Power* nur hier angeführt) sowie *t*-Tests zum Einsatz, nicht-parametrisch Kruskal-Wallis-, Mann-Whitney-*U*- und Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests.

Im Falle von Varianzheterogenität wurde Welchs *t*-Test genutzt.

Es wurde $\alpha = 0,05$ bestimmt. *p*-Werte und *Power* werden auf drei Nachkommastellen gerundet aufgeführt. Die in den Graphiken verwendete Asteriskenkodierung unterteilt dabei das Signifikanzniveau in drei Klassen:

*	für	$0,010 \leq p < 0,050$
**	für	$0,001 \leq p < 0,010$
***	für	$p < 0,001$

3. viii) Auflistung der Materialien und ihrer Hersteller

Material	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ampuwa™	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck Millipore, Burlington, USA
Complete Mini™	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Coomassie-Brillant-Blau R-250	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck Millipore, Burlington, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Merck Millipore, Burlington, USA SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
1-Ethyl-2-benzimidazolion (1-EBIO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Fetal Bovine/Calf Serum Gold	GE Healthcare Europe GmbH, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Fetal Bovine/Calf Serum Superior	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

Gelatine, porzin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glukose	Merck Millipore, Burlington, USA
Glutamax™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Hydrocortison	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck Millipore, Burlington, USA
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck Millipore, Burlington, USA
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck Millipore, Burlington, USA
Kaninchen-anti-Bak IgG	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Kaninchen-anti-K _{Ca} 3.1 IgG	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver, bovin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MitoTracker™ Orange CMTMRos	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Molecular, Cellular, and Developmental Biology (MCDB) 131 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumazid (NaN ₃)	Merck Millipore, Burlington, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Merck Millipore, Burlington, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Merck Millipore, Burlington, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Millipore, Burlington, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Paxillin	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
Penicillin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland Merck Millipore, Burlington, USA
Phenolrot	Sigma Aldrich, St. Louis, USA bzw. Hersteller des Nährmediums
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS +/-)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS -/-)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland Merck Millipore, Burlington, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Polyethylenglycol(40)-nonylphenoether (Tergitol NP-40)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF)	Merck Millipore, Burlington, USA
Propan-2-ol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pyruvat	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Reinstwasser (H ₂ O)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Rhodamin 123	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Rotiphorese™ Gel A	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese™ Gel B	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Senicapoc	University of California School of Medicine, Davis, USA
Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland Merck Millipore, Burlington, USA
SuperSignal™ West Femto Peroxidpuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SuperSignal™ West Femto Luminol (INN: 3-Aminophthalsäurehydrazid)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol (TRAM-34)	University of California School of Medicine, Davis, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (INN: Trometamol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100 (INN: Octoxinol 9)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland Sigma Aldrich, St. Louis, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tumor Nekrose Faktor α	tebu-bio GmbH, Offenbach, Deutschland
TWEEN™ 20 (INN: Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Qproteome™ Mitochondria Isolation Kit	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 IgG	Sigma Aldrich, St. Louis, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ziege-anti-Kaninchen Cy3 IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase IgG	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ziegennormalserum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 5: Alphabetische Materialienliste
 INN: *International Nonproprietary Name*, Freiname

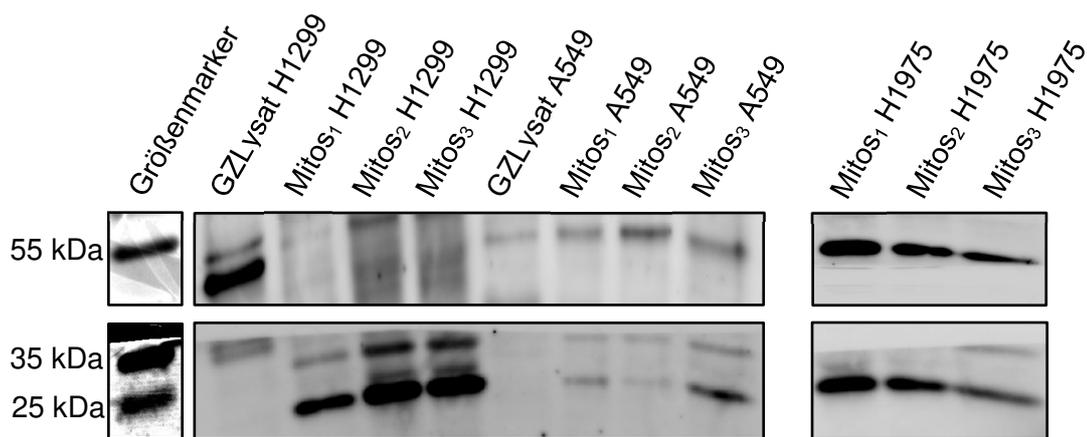
4) Ergebnisse

4. i) Western Blot

Beim Western Blotting wurden von den drei Lungenkarzinomzelllinien A549, H1975 und H1299 sowie von der endothelialen HMEC-1-Zelllinie je ein Ganzzelllysat und drei unabhängige Mitochondrienisolationen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden Antikörper gegen den $K_{Ca}3.1$ -Kanal und gegen das mitochondriale Bak eingesetzt. Zuletzt fungierte der peroxidasekonjugierte Zweitantikörper via Luminol-Chemilumineszenz als Reporter.

Beispielhaft zeigt Graphik 5 die Banden von H1299-, A549- und H1975-Zellen. Auf der mit anti-Bak-Antikörper behandelten Membran sind Banden um 25 kDa ausschließlich in den Mitochondrienisolaten zu sehen. Auf der auf Kanalproteine untersuchten Membran zeigen sich Banden unterhalb des 55 kDa-Markers in beiden Ganzzelllysaten und in den Proben der A549- und der H1975-, nicht jedoch der H1299-Mitochondrien. Das Bild des Western Blots der HMEC-1-Zellen (hier nicht gezeigt) gleicht dem Ergebnis der H1299-Zellen. In der Endothelzelllinie zeigt sich die Kanalbande nur im Ganzzelllysat und die Bak-Banden nur in den drei Organellfraktionen.

Diese Ergebnisse zeigen eine Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals in A549-3R-, H1975-, H1299- und HMEC-1-Zellen. Weiter sind sie mit der Aussage vereinbar, dass der $K_{Ca}3.1$ -Kanal in A549-3R- und in H1975-Zellen mitochondrial exprimiert wird. Diese Annahme wird für H1299- und HMEC-1-Zellen durch die vorliegenden Resultate nicht getragen.



Graphik 5: Western Blots zeigen $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in A549-3R- und H1975-Mitochondrien
 In der oberen Reihe werden Ausschnitte der mit anti- $K_{Ca}3.1$ inkubierten Membranen, der Größenmarkerbande zufolge um 55 kDa herum, angezeigt. Die Proben sind Ganzzelllysate (GZLysat) und unabhängig voneinander isolierte Mitochondrienlysate (Mitos) der NSCLC-Zelllinien H1299, A549-3R und H1975. Für A549 und H1975 sind Banden sichtbar, deren Position mit einer molekularen Masse des $K_{Ca}3.1$ -Kanals (50 kDa) vereinbar ist. Die Membranausschnitte der unteren Reihe wurden mit einem Antikörper gegen Bak (29 kDa) behandelt und weisen exklusiv in den Mitochondrienisolaten eine Doppelbande auf. Die 25 kDa-Markerbande liegt in der Höhe zwischen diesen beiden.

Zelllinie	Proteinkonzentration der Ganzzelllysate [$\mu\text{g/ml}$]	Proteinkonzentration der Mitochondrienisolationen [$\mu\text{g/ml}$]
A549	3347	750
H1975	3387	927
H1299	3155	2137
HMEC-1	616	403

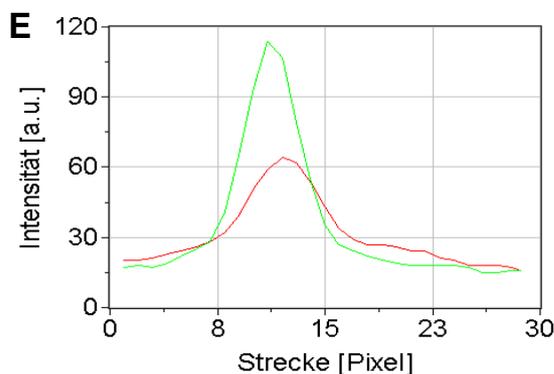
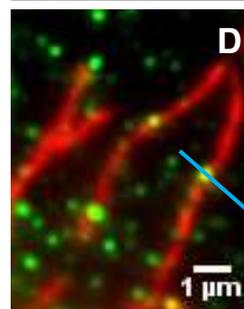
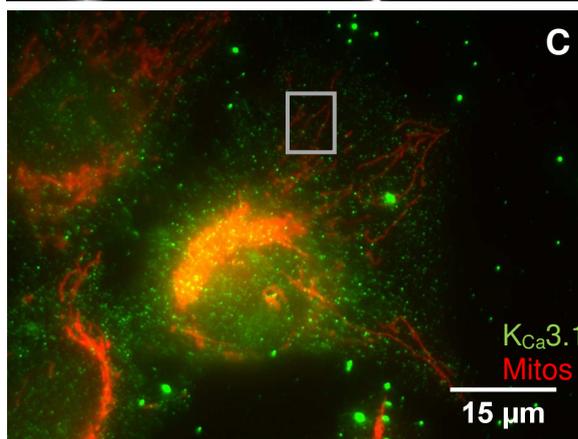
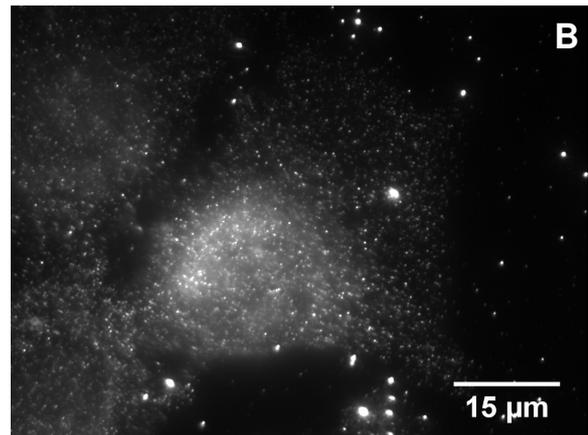
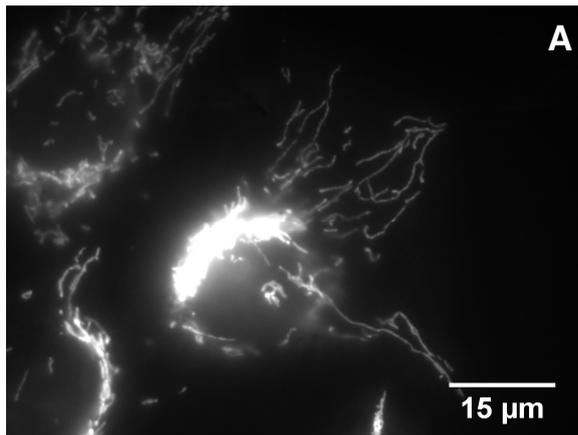
Tabelle 6: Proteinkonzentrationen der Western Blot-Proben

Der Proteingehalt der karzinomatösen Ganzzelllysate beläuft sich auf $> 3 \text{ mg/ml}$, bei den Endothelzellen hingegen nur auf $616 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (s. Tabelle 6). Heterogener verhalten sich die Resultate bei der Messung der Mitochondrienprobe mit stärkster Bak-Bande im Western Blot: von $403 \text{ }\mu\text{g/ml}$ für HMEC-1-Zellen bis zu $2.138 \text{ }\mu\text{g/ml}$ bei H1299-Zellen.

Die Gelfärbungen mit Coomassie-Blau zeigt nach > 12 Stunden Transfer keine Proteinbanden im Bereich der interessierenden Proteingrößen (< 100 kDa) mehr.

4. ii) Immunfluoreszenz

Es wurden gleichzeitig Mitochondrien und $K_{Ca}3.1$ -Kanäle angefärbt (s. Graphik 6A-C). Die Kanalproteine wurden anhand ihrer Intensitätsprofile identifiziert und als kolokalisiert zu den Mitochondrien („gelb“) und nicht-kolokalisiert („grün“) kategorisiert (s. Graphik 6D-E). Durch die optische 2D-Flächenberechnung der Mitochondrien konnten somit kolokale und nicht-kolokale Kanaldichten berechnet werden.



Graphik 6: Beispielhafte Auswertung zur Errechnung der $K_{Ca3.1}$ -Kanaldichten

Eine H1975-Krebszelle wurde mit dem mitochondrienspezifischen Fluoreszenzfarbstoff TMRM und mittels FITC-gekoppelter Immunfluoreszenz gefärbt (s. 3.iv). (A) zeigt diese Zelle unter Verwendung des TRITC-Filters, und damit die sich retikulär verzweigenden Mitochondrien. Diese zeigen perinukleär die höchste Dichte. In (B) ist ebenfalls eine rohe Aufnahme derselben Zelle zu sehen, diesmal wurde der FITC-Filter eingestellt. Das Fluoreszenzsignal repräsentiert also die $K_{Ca3.1}$ -Kanäle, die ebenfalls in räumlicher Assoziation mit dem Zellkern eine erhöhte Dichte aufweisen. Die Mitochondrien wurden rot, die Kanäle grün koloriert, und die beiden Bilder zu (C) zusammengefügt. In (D) ist ein Ausschnitt aus (C) (grauer Kasten) vergrößert dargestellt. Pixel, die sowohl ein Mitochondrien- als auch ein Kanalsignal beschreiben, werden der additiven Farbmischung entsprechend als gelb dargestellt. (E) gibt das von MetaVue registrierte Intensitätsprofil der über einen gelben Punkt gezogenen, hellblauen Linie wieder. Die Abszisse beschreibt die Strecke in Pixeln, die Ordinate die Fluoreszenzintensität in arbiträrer Einheit. Da die Halbwertsbreite der grünen Kurve ≤ 5 Pixel (entsprechend ca. 300 nm) ist, liegt *per definitionem* (s. 3.iv) ein $K_{Ca3.1}$ -Kanal vor. Der Kanal wurde als kolokalisiert bzw. „mitochondrial“ eingestuft, weil das grüne Maximum innerhalb der Halbwertsbreite des roten Signals liegt.

Die Datenakquise erfolgte aus drei unabhängigen Immunfärbungen pro Zelllinie. In jedem Durchgang wurden mindestens zehn Zellen von zwei Probengläschen ausgewertet. Die Mitochondrienfläche wurde auf eine und die Kanaldichte auf zwei Dezimalstellen genau gerundet.

Die meisten Kanäle pro Zelle werden in A549-Lungenkrebszellen gemessen (s. Tabelle 7), im Schnitt ca. 30 pro ausgewerteter 36 μm^2 -Region. Bei den Endothelzellen sind dies nur etwa 19 Kanäle pro Region. Insgesamt werden in allen 93 untersuchten Zellen 6.854 Kanäle identifiziert, von denen 21,07 % in die Kategorie „kolokalisiert“ fallen. In allen drei Zelllinien weist die mitochondriale Kanaldichte einen höheren Betrag auf als die nicht-mitochondriale Kanaldichte.

Kriterium	A549-3R	H1975	HMEC-1	H1299
Versuchszahl N	3	3	3	3
Zellanzahl n	30	33	30	-
Anzahl Kanäle	2690	2485	1679	-
davon kolokalisiert	486	594	364	-
Mitochondrienfläche insgesamt [μm^2]	460,4	641,4	510,3	-
„mitochondriale“ Kanaldichte [μm^{-2}]	1,12 \pm 0,09	0,95 \pm 0,06	0,72 \pm 0,06	-
„nicht-mitochondriale“ Kanaldichte [μm^{-2}]	0,79 \pm 0,04	0,64 \pm 0,02	0,48 \pm 0,03	-
Kanaldichten-Quotient	1,39 \pm 0,08	1,53 \pm 0,11	1,46 \pm 0,09	-

Tabelle 7: Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen (Mitochondrien und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$) mit Gegenüberstellung der unterschiedlichen Kanaldichten

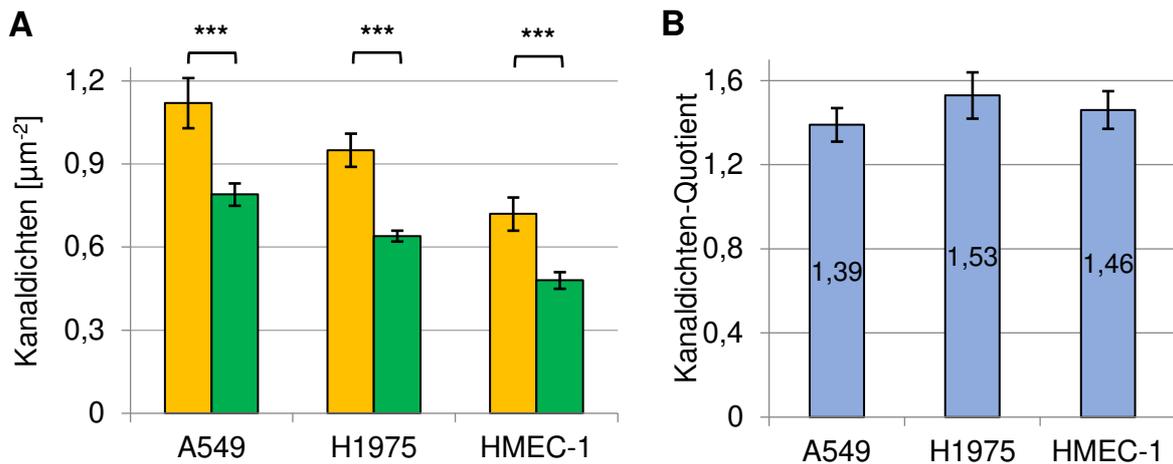
Für die „mitochondriale“ Kanaldichte der A549-Zellen ist zusätzlich der Median von 1,09 μm^{-2} anzugeben, da bei diesen Daten formal nicht von einer Normalverteilung ausgegangen wird ($p = 0,006$; Shapiro-Wilk-Test). Im Sinne der Uniformität werden in Tabelle 7 und Graphik 7 trotzdem der Mittelwert inklusive des symmetrischen Standardfehlers angegeben, die statistische Testung erfolgt allerdings nicht parametrisch. Aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer dicht perinukleär gelegenen Mitochondrien konnte die Auswertung der H1299-Zellen nicht wie in den Methoden (s. 3.iv) beschrieben erfolgen.

Im Vergleich der „mitochondrialen“ Kanaldichten mittels Kruskal-Wallis-Varianzanalyse ergibt sich mit $p = 0,001$ ein Wert, der H_0 zu verwerfen erlaubt: die Dichte der „gelben“ Kanäle ist also in den beiden NSCLC-Zellreihen und in den Endothelzellen unterschiedlich. Die

arithmetischen Mittel von H1975- zu HMEC-1-Zellen differieren um $0,23 \mu\text{m}^{-2}$ ($p = 0,010$; Zweistichproben- t -Test). Der Median von A549-Zellen ist um $0,08 \mu\text{m}^{-2}$ größer als der von H1975-Zellen ($p = 0,139$; Mann-Whitney- U -Test) und um $0,33 \mu\text{m}^{-2}$ größer als der von HMEC-1 ($p = 0,000$; Mann-Whitney- U -Test). Es lässt sich schließen, dass die Endothelzellen signifikant weniger „mitochondriale“ $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanäle exprimieren als die Krebszellen.

Auch H_{0b} kann zurückgewiesen werden, da sich die nicht-kolokalen Kanaldichten signifikant voneinander unterscheiden ($p = 0,000$, $Power: 1,000$; ANOVA). Also haben die Krebs- und Endothelzellen nicht die gleiche Dichte an „grünen“ Kanälen in der Plasmamembran. Die Rangfolge der Dichten verhält sich kongruent zu der der kolokalisierten Kanäle. Dementsprechend liegt die Differenz zwischen A549- und HMEC-1-Zellen mit $0,31 \mu\text{m}^{-2}$ ($p = 0,000$; Zweistichproben- t -Test) am höchsten, gefolgt von H1975 – HMEC-1 ($0,16 \mu\text{m}^{-2}$, $p = 0,000$; Zweistichproben- t -Test) und A549 – H1975 ($0,15 \mu\text{m}^{-2}$, $p = 0,002$; Zweistichproben- t -Test). Auch in der Plasmamembran sind bei den entarteten Zellen signifikant mehr $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanäle zu finden als auf den Endothelzellen.

Die dritte Nullhypothese H_{0c} wird ebenfalls nicht beibehalten, denn in jeder Zelllinie differieren die mitochondriale und nicht-mitochondriale Kanaldichte signifikant voneinander. In jeder der drei Zelllinien ist die kolokale Kanaldichte höher als die „nicht-mitochondriale“. Bei A549-Zellen drückt sich das in einem Medianunterschied von $0,24 \mu\text{m}^{-2}$ ($p = 0,000$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test), bei H1975-Zellen in einer Mittelwertsdifferenz von $0,30 \mu\text{m}^{-2}$ ($p = 0,000$; abhängiger t -Test) und bei HMEC-1-Zellen in einer Mittelwertsdifferenz von $0,23 \mu\text{m}^{-2}$ ($p = 0,000$; abhängiger t -Test) aus. Es stellt sich weiterführend die Frage, ob die Dichte von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanälen in der Mitochondrienmembran die Dichte in der Plasmamembran wirklich so deutlich übersteigt, oder wie genau diese Differenzen zu interpretieren sind (s. 5.ii).



Graphik 7: Erhöhte $K_{Ca}3.1$ -Kanaldichten in Superposition mit dem Mitochondriensignal für A549-, H1975- und HMEC-1-Zellen

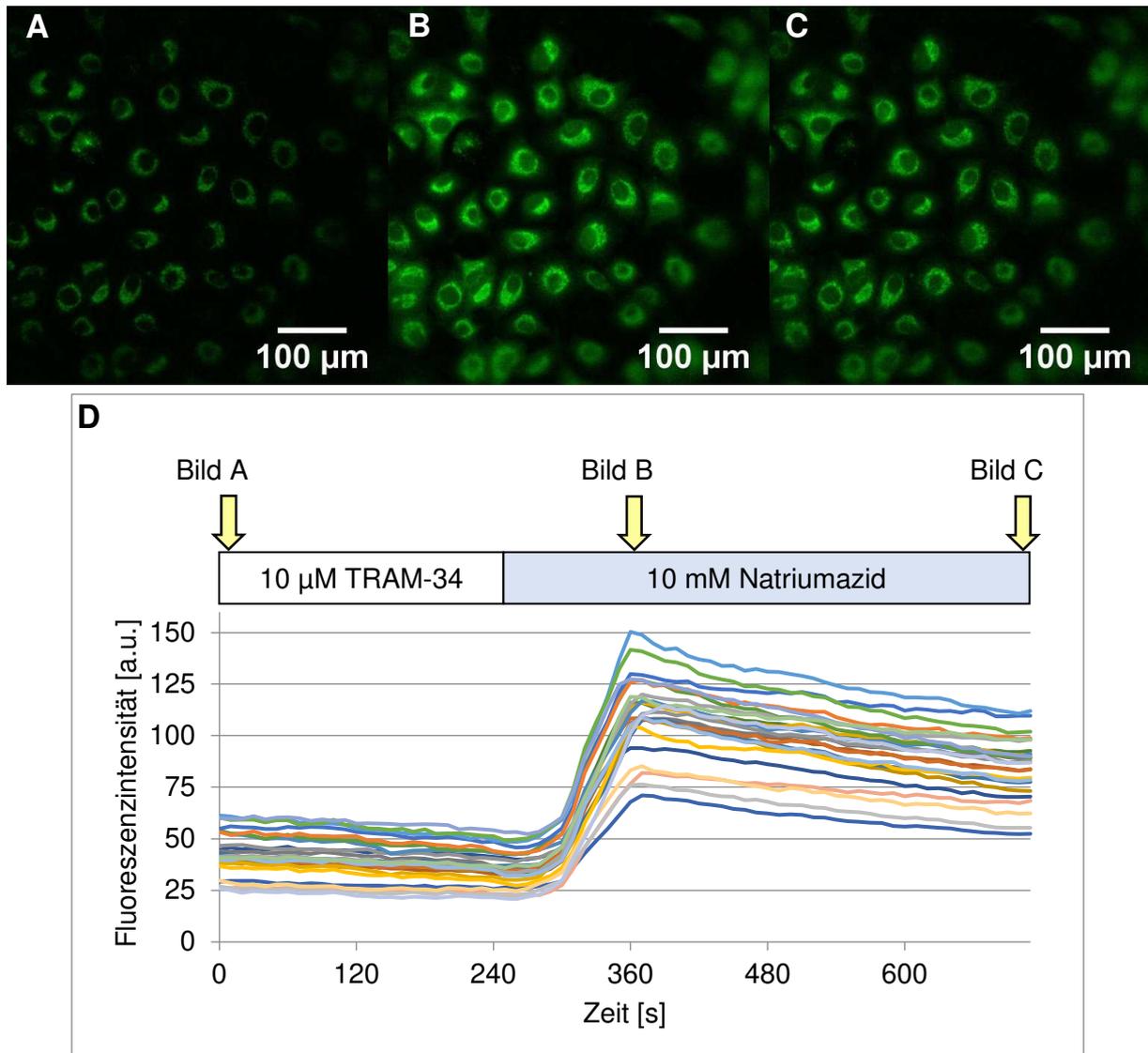
Das Diagramm (A) trägt die durchschnittlichen $K_{Ca}3.1$ -Kanaldichten in μm^{-2} für die verschiedenen Zelllinien auf. Dabei sind in Gelb die jeweiligen Dichten mit mitochondrialer Kolokalisation, in Grün die ohne Kolokalisation dargestellt. Der mitochondriale Mittelwert für A549 liegt bei $1,12 \pm 0,09 \mu\text{m}^{-2}$, der nicht-mitochondriale bei $0,79 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-2}$. Die entsprechenden Werte betragen für H1975 $0,95 \pm 0,06$ und $0,64 \pm 0,02$, für HMEC-1 $0,72 \pm 0,06$ und $0,48 \pm 0,03$. $N = 3$, $n = 93$. In (B) werden die durchschnittlichen Quotienten aus den Dichten von „gelben“ zu „grünen“ Kanälen aus 30 bzw. 33 Zellen nach Zelllinie gruppiert dargestellt. Für A549 ist dies $1,39 \pm 0,08$, für H1975 $1,53 \pm 0,11$ und für HMEC-1 $1,46 \pm 0,09$. Die statistische Analyse mittels Varianzanalyse ergibt keine Unterschiede von Signifikanz ($p = 0,567$). $N = 3$, $n = 93$.

Werden die beiden Kanaldichten ins Verhältnis gesetzt, ergibt sich je ausgewerteter Zelle ein dimensionsloser Quotient. Bei Testung dieser insgesamt 93 Einzelwerte ($n = 30$ für die A549-, $n = 33$ für die H1975- und $n = 30$ für die HMEC-1-Zellen) gegeneinander erlaubt der resultierende p -Wert von 0,567 ($Power: 0,142$; ANOVA) das Zurückweisen von H_0 nicht (s. Graphik 7.B). Der Quotient $\frac{\text{Kanaldichte}_{\text{gelb}}}{\text{Kanaldichte}_{\text{grün}}}$ unterscheidet sich zwischen den drei Zellarten nicht im statistisch signifikanten Ausmaß. Das Verhältnis von „mitochondrialer“ zu „nicht-mitochondrialer“ Kanaldichte ist für alle Zelllinien vergleichbar und bewegt sich etwa im Bereich von 1,4 – 1,5.

4. iii) Messung des mitochondrialen Membranpotenzials

a) Ganze Zellen

Die Fluoreszenz der mit Rhodamin 123 gefärbten Mitochondrien wurde unter Durchfluss der Inkubationslösung (ausschließlich HEPES-gepufferte Ringerlösung oder versetzt mit EGF, DMSO, 1-EBIO, TRAM-34 oder Paxillin) gemessen. Nach 240 Sekunden wurde die Superfusion mit einer NaN_3 -haltigen, HEPES-gepufferten Ringerlösung fortgeführt. Im Rahmen der durch das Atmungskettengift auftretenden Depolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials kam es zum Fluoreszenzintensitätsanstieg des mitochondrial akkumulierten Rhodamin 123. Somit wies jede Zelle im Mikroskopblickfeld die typische Intensitätskurve auf (s. Graphik 8). Die maximale Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle wurde als 100 % festgesetzt. Dementsprechend wurde auf Grundlage der Ausgangsintensität vor NaN_3 -Gabe ein Prozentwert pro Zelle errechnet. Niedrige Prozentwerte ergaben sich so bei einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dies ließ auf einen stark depolarisierenden Effekt des NaN_3 schließen. Bei einer besonders starken Depolarisation konnte davon ausgegangen werden, dass $\Delta\Psi_m$ unter der Inkubationslösung und vor Applikation des Gifts hyperpolarisiert gewesen war. Im Umkehrschluss bedeuteten hohe Prozentwerte, dass das zugefügte, depolarisierende Atmungskettengift $\Delta\Psi_m$ nicht mehr so stark ändern konnte. Deswegen wurden hohe Prozentwerte als eine bereits stattgefundenen Depolarisation des Potentials durch die jeweils zuvor applizierte Inkubationslösung interpretiert.



Graphik 8: Beispielhafte Auswertung der $\Delta\Psi_m$ -Messung an A549-3R-Zellen

Es sind oben drei grün nachgefärbte Fluoreszenzaufnahmen von A549-Zellen nach Rhodamin 123-Inkubation abgebildet. Bild (A) wurde nach 10, (B) nach 360 und (C) nach 710 Sekunden aufgenommen. Das Diagramm (D) trägt auf der Ordinate die perinukleär gemessene, Hintergrund-korrigierte Intensität in arbiträrer Einheit in Abhängigkeit von der Zeit in Sekunden auf. Jede farbige Kurve entspricht dem Intensitätsprofil einer Zelle. Die ersten 25 Aufnahmen erfolgten unter Superfusion mit der Inkubationslösung, hier Ringerlösung mit 10 μM TRAM-34. Dann wurde auf eine Ringerlösung mit 10 mM Natriumazid umgestellt (durch den hellblauen Balken gekennzeichnet). Mit hellgelben Pfeilen werden die Zeitpunkte der Aufnahmen von A, B und C angegeben.

Diese Methode, das Membranpotenzial der Mitochondrien zu ermitteln, ist kein Standardverfahren, wie etwa der Western Blot oder die Immunfluoreszenzaufnahmen. Deshalb musste sie (in diesem Labor) erst noch etabliert, ihre Verlässlichkeit überprüft und potenzielle Fehlerquellen ausgeschlossen werden.

Streuung und Reliabilität:

Die Interquartilsabstände^{xviii} der Endothelzellen rangieren zwischen 14,7 % für TRAM-34 und 46,0 % für 1-EBIO (s. Tabelle 12). Für die A549-Zellen liegt einzig der DMSO-Wert innerhalb dieses Intervalls (17,3 %), der minimale Interquartilsabstand von 1-EBIO beziffert sich auf 8,9 % (s. Tabelle 10). Gerade bei den Endothelzellen liegt also eine hohe Streuung vor. HMEC-1-Zellen (derselben Zellkulturschale) unterscheiden sich im Experiment hinsichtlich ihrer Depolarisation durch NaN_3 also weitaus mehr untereinander als die A549-Krebszellen untereinander.

Aufgrund dieser Datenstreuung wurde im Rahmen der Etablierung der Methode die Reliabilität der Auswertung überprüft. Dafür wurde eine Sequenz vom ersten Versuchstag (31.07.2018, Erstauswertung am 09.08.2018) am 18.10.2018 zufällig ausgewählt und am selbigen Tag sowie am 29.10.2018 erneut ausgewertet. Durch den zeitlichen Abstand zwischen den Durchgängen sollte eine Beeinflussung der *Intrarater*-Reliabilität durch Gedächtniseffekte vermieden oder wenigstens bis zur Vernachlässigbarkeit minimiert werden. Zusätzlich führte für die Testung der *Interrater*-Reliabilität ein Doktorand aus einer anderen Arbeitsgruppe nach kurzer Instruktion die Auswertung am 18.10.2018 eigenständig durch (s. Tabelle 8).

H₀h: Die ermittelten Prozentwerte auf Grundlage der A549-3R-Sequenz unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Auswertungstagen und Auswertern nicht.

Die Kruskal-Wallis-ANOVA gibt keinen Anlass, diese Nullhypothese abzulehnen ($p = 0,286$). Die Auswertungsmethode kann für die NSCLC-Zellen als verlässlich betrachtet werden, da die minimalen Abweichungen bei der Auswertung keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Reliabilität der Ergebnisse haben.

^{xviii} Die Interquartilsabstände dienen als deskriptives Dispersionsmaß. Sie beschreiben das Werteintervall, in dem die mittleren 50 % der Datenpunkte liegen, also die Differenz zwischen drittem und erstem Quartil.

Auswertung	Median [%]	erstes Quartil [%]	drittes Quartil [%]
Erstauswertung, 09.08.2018	39,9	35,5	49,3
Zweitauswertung, 18.10.2018	37,9	33,7	63,3
Drittauswertung, 29.10.2018	41,0	36,6	70,0
Fremdauswertung, 18.10.2018	36,8	33,1	62,5

Tabelle 8: Reliabilitätstestungen anhand der 1-EBIO-Sequenz der $\Delta\Psi_m$ -Messung an A549-3R-Zellen vom 31.07.2018

Da die Bildqualität bei den HMEC-1-Zellen insgesamt schlechter ist, wurde im Rahmen der *Intrarater*-Reliabilitätstestung hier die Auswahl der zu überprüfenden Sequenz nicht dem Zufall überlassen, sondern bewusst eine subjektiv niedrigqualitative vom ersten Versuchstag (04.10.2018) ausgewählt und mit zeitlichem Abstand zwei weitere Male ausgewertet (s. Tabelle 9).

H_{0i} : Die ermittelten Prozentwerte auf Grundlage der HMEC-1-Sequenz unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Auswertungstagen nicht.

Der Kruskal-Wallis-ANOVA zufolge liegt kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,901$), die Nullhypothese H_{0i} ist nicht zu verwerfen. Also kann die Auswertung auch für die endothelialen Zellen mit der Gewissheit angewandt werden, dass sie trotz schlechterer Bildqualität die Ergebnisse nicht entscheidend verzerrt.

Auswertung	Median [%]	erstes Quartil [%]	drittes Quartil [%]
Erstauswertung, 04.10.2018	25,6	22,2	33,8
Zweitauswertung, 18.10.2018	27,8	21,7	35,4
Drittauswertung, 02.11.2018	29,8	22,4	36,4

Tabelle 9: Reliabilitätstestung anhand der EGF-Sequenz der $\Delta\Psi_m$ -Messung an HMEC-1-Zellen vom 04.10.2018

Überprüfung einer möglichen Interaktion von Rhodamin 123 und DMSO:

Im Zuge der Methodenprüfung wurde des Weiteren auf eine die Fluoreszenz beeinflussende Interaktion des Kanalmodulatoren-Solvens DMSO und des Farbstoffs Rhodamin 123 getestet.

Dazu wurden Lösungen von 26 μM Rhodamin in HEPES-gepuffertes Ringerlösung mit und ohne 0,1 % DMSO angesetzt und je $5 \times 250 \mu\text{l}$ in eine schwarze 96-well-Platte pipettiert. Diese wurde, wie bei den Messungen des mitochondrialen Membranpotenzials $\Delta\Psi\text{m}$, 15 Minuten bei 37 °C in den lichtundurchlässigen Trockenschrank gestellt, und anschließend mittels des Fluoroskan II Fluorescent Microplate Reader und der Software Genesis Lite gemessen.

H_{0j} : Die Rhodamin-Lösungen mit und ohne DMSO-Zusatz unterscheiden sich in ihrer Fluoreszenzintensität nicht.

Die ausschließlich HEPES-gepufferte Ringerlösung und kein Rhodamin 123 enthaltenden Negativkontrollen stellen sich mit einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von < 1 a.u. unauffällig dar. Für die Proben ergeben sich Mittelwerte für die DMSO-freien Vertiefungen von 3792 ± 44 a.u. und von 3842 ± 56 a.u. in Anwesenheit von DMSO. Dies bietet keinerlei Grundlage, die Nullhypothese H_{0j} abzulehnen ($p = 0,503$; Zweistichproben- t -Test). Daher kann DMSO als „*Quencher*“ oder anderweitiger Störfaktor für die Fluoreszenz von Rhodamin 123 ausgeschlossen werden.

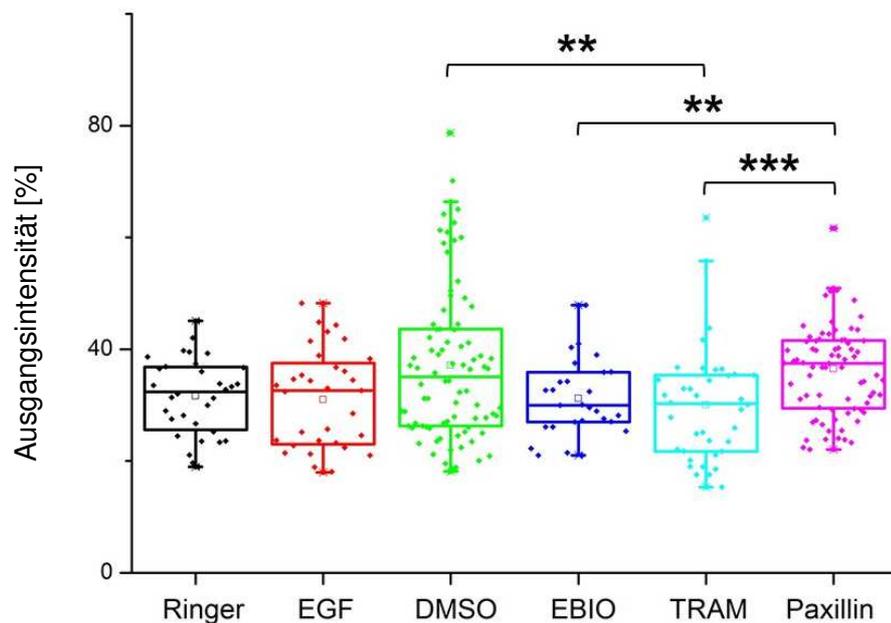
Ergebnisse der A549-Zellen:

Die Daten für jede Gruppe stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt mindestens 27 ausgewerteten Zellen (s. Tabelle 10). Die Endresultate werden auf eine Dezimalstelle gerundet. Der höchste Median ergibt sich bei Paxillin (37,5 %), der geringste bei 1-EBIO (30,0 %). Erstes und drittes Quartil liegen zwischen 8,9 % (1-EBIO) und 17,3 % (DMSO) auseinander. Die nicht-normalverteilten Datengruppen DMSO ($\gamma_m = 0,922$) und TRAM-34 ($\gamma_m = 1,211$) sind rechtsschief.

Die Kruskal-Wallis-ANOVA liefert einen p -Wert von 0,000, somit ist H_{0e} zurückzuweisen: es liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor. Also haben die unterschiedlichen Inhaltsstoffe einen Einfluss auf das Membranpotenzial der Mitochondrien. Die statistisch signifikanten Differenzen zwischen je zwei Gruppen sind in Tabelle 11 und in Graphik 9 asteriskenkodiert mitsamt Kastendiagrammen der Daten aufgeführt.

A549-3R	Ringer	EGF	DMSO	EBIO	TRAM	Paxillin
Versuchsanzahl N	4	4	6	3	5	4
Zellzahl n	32	33	84	27	38	77
Median [%]	32,4	32,6	35,1	30,0	30,3	37,5
Interquartils- abstand [%]	11,2	14,6	17,3	8,9	13,6	12,1

Tabelle 10: Zusammenfassung der $\Delta\Psi_m$ -Messung an A549-Zellen



Graphik 9: $\Delta\Psi_m$ -Hyperpolarisation in A549-3R-Zellen durch TRAM-34

Die Kastengraphik gibt Auskunft über die gemessenen Intensitäten unter Inkubation in Relation zur maximalen Intensität nach Depolarisation durch Natriumazidgabe. Die Mediane betragen 32,4 % für HEPES-gepufferte Ringerlösung, 32,6 % für EGF, 35,1 % für DMSO, 30,0 % für 1-EBIO, 30,3 % für TRAM-34 und 37,5 % für Paxillin. N = 4; 4; 6; 3; 5; 4, n = 291.

Gruppen	Mediandifferenz [%]	<i>p</i> -Wert
Paxillin – EBIO	7,5 ^a	0,004
Paxillin – TRAM	7,2	0,000
DMSO – TRAM	4,8	0,005

Tabelle 11: Übersicht aller signifikanten Mediandifferenzen für A549-3R-Zellen

Absteigend sortiert nach Betrag, getestet mittels Mann-Whitney-*U*-Test.

(a) Paxillin und 1-EBIO liefern normalverteilte Daten, die Testung erfolgt parametrisch (Zweistichproben-*t*-Test, Mittelwertsdifferenz von 5,3 %). Die angegebene Mediandifferenz ist der Uniformität der Tabelle geschuldet.

Die Bedingungen Paxillin und DMSO unterscheiden sich zueinander geringer (2,4 %, $p = 0,398$; Mann-Whitney-*U*-Test), ebenso TRAM-34 zu 1-EBIO (0,3 %, $p = 0,405$; Mann-Whitney-*U*-Test). Reziprok differieren die Gruppen jedoch teilweise signifikant voneinander. Paxillin und 1-EBIO weisen dabei den größten Unterschied zwischen zwei Medianen auf (7,5 %, $p = 0,003$ bei Testung mittels Mann-Whitney-*U*-Test).

Die Mittelwerte der beiden hydrophilen Gruppen Ringer und EGF unterscheiden sich lediglich um 0,6 % ($p = 0,761$; Zweistichproben-*t*-Test), die Mediane um 0,2 %, was den geringsten Abstand zweier Mediane zueinander darstellt. Ein Einfluss des Wachstumsfaktors auf das mitochondriale Membranpotenzial kann in diesem Kontext also nicht aufgezeigt werden.

Die Mediane der beiden Kontrolllösungen Ringer (hydrophil) und DMSO (lipophil) differieren um 2,7 % und somit ebenfalls nicht signifikant voneinander ($p = 0,126$; Mann-Whitney-*U*-Test). Dies ist ein weiteres Argument für die Verlässlichkeit der Methode und gegen mögliche Störungen durch DMSO, da sich die beiden Kontrolllösungen einzig durch das Vorhandensein von DMSO unterscheiden.

Zusammenfassend ist TRAM-34 der einzige Kanalmodulator, dessen Mediandifferenz zur Kontrolle DMSO (-4,8 %) von statistischer Signifikanz ist ($p = 0,005$; Mann-Whitney-*U*-Test). Die beobachteten Unterschiede zu DMSO unter 1-EBIO (-5,1 %) und unter Paxillin (+2,4 %) hingegen sind insignifikant ($p = 0,113$ bzw. $p = 0,398$; beides Mann-Whitney-*U*-Test). TRAM-34 verursacht also eine höhere Depolarisation von $\Delta\Psi_m$ unter Natriumazid, was durch eine vorausgegangene Hyperpolarisation erklärbar ist. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass durch die Inhibition der mitoK_{Ca}3.1-Kanäle weniger Kaliumionen aus dem Zytoplasma einströmen und somit die Polarität der Mitochondrienmembran ansteigt. Die Gegenprobe, durch Kanalaktivierung mit 1-EBIO eine Depolarisation zu bewirken, funktioniert

in diesem Experiment jedoch nicht. Und auch die als Positivkontrolle angedachte $K_{Ca1.1}$ -Inhibitor Paxillin geht nicht mit der vermuteten Hyperpolarisation einher.

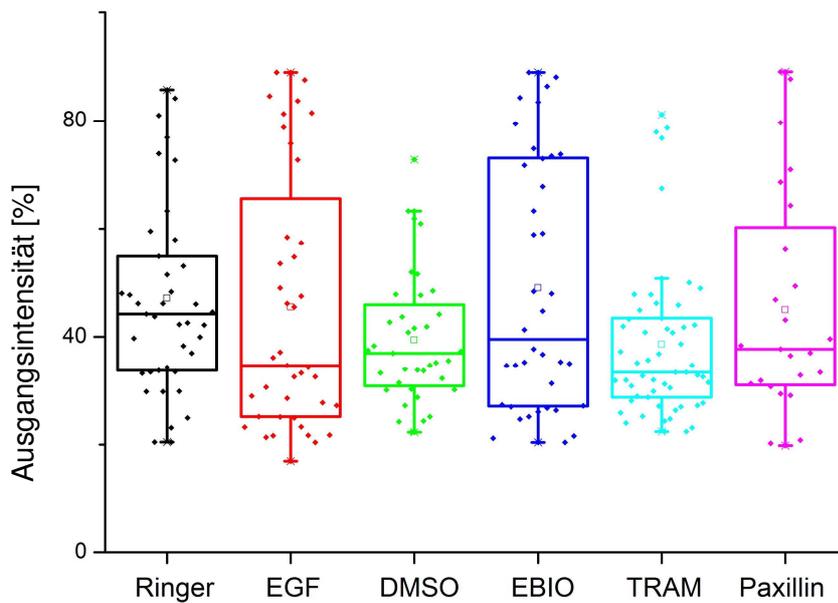
Ergebnisse der HMEC-1-Zellen:

Drei Experimente pro Gruppe mit je mindestens 25 eingeschlossenen Zellen (s. Tabelle 12) bilden die Datenbasis. Auch hier findet eine Rundung auf eine Nachkommastelle für die Prozentwerte Anwendung. Die Mediane liegen zwischen 44,2 % (Ringer) und 33,4 % (TRAM-34). Somit weist TRAM-34 bei den Endothelzellen den niedrigsten Prozentwert auf, während es bei den Karzinomzellen der zweitniedrigste ist. Die Interquartilsabstände bewegen sich für TRAM-34 in einem minimalen Intervall von 14,7 %, für 1-EBIO in einem maximalen von 46,0 %. Die nicht-normalverteilten Datengruppen EGF ($\gamma_m = 0,704$), TRAM ($\gamma_m = 1,647$), 1-EBIO ($\gamma_m = 0,437$) und Paxillin ($\gamma_m = 0,932$) sind rechtsschief.

Die statistische Testung der Nullhypothese H_0 ergibt keine Grundlage zu deren Verwerfen ($p = 0,154$; Kruskal-Wallis-ANOVA), ergo beeinflussen die verschiedenen Inkubationslösungen $\Delta\Psi_m$ der HMEC-1-Zellen nicht signifikant. Dementsprechend weist das Kastendiagramm der HMEC-1-Experimente (s. Graphik 10) auch keine Asterisken auf. Somit kann durch Kanalmodulation kein Effekt auf $\Delta\Psi_m$ nachgewiesen werden. Bei Rückschlüssen auf die Zellphysiologie der Endothelzellen, wie z. B. das Anzweifeln von funktionalen $K_{Ca3.1}$ - oder $K_{Ca1.1}$ -Kanälen in den HMEC-1-Mitochondrien, muss jedoch die hohe Datenstreuung berücksichtigt werden.

HMEC-1	Ringer	EGF	DMSO	EBIO	TRAM	Paxillin
Versuchsanzahl N	3	3	3	3	3	3
Zellzahl n	39	41	37	38	55	25
Median [%]	44,2	34,7	37,0	39,5	33,4	37,7
Interquartilsabstand [%]	21,1	40,4	15,1	46,0	14,7	29,2

Tabelle 12: Zusammenfassung der $\Delta\Psi_m$ -Messung an HMEC-1-Zellen



Graphik 10: Ergebnisse der $\Delta\Psi_m$ -Messung an HMEC-1-Zellen ohne signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationslösungen

Es werden die prozentualen Intensitäten des mitochondrialen Fluoreszenzfarbstoffs vor Natriumazidgabe für die unterschiedlichen Inkubationslösungen als Kastengraphik abgebildet. Die Mediane beziffern sich auf 44,2 % (HEPES-gepufferte Ringerlösung), 34,7 % (EGF), 37,0 % (DMSO), 39,5 % (1-EBIO), 33,4 % (TRAM-34) und 37,7 % (Paxillin). Die Gruppen differieren statistisch nicht signifikant voneinander ($p = 0,154$; Testung mit Kruskal-Wallis-ANOVA). $N = 3$, $n = 235$.

b) Isolierte Mitochondrien

Aus den vier unabhängig voneinander isolierten A549-3R-Mitochondrienfraktionen wurden 3×3 TRAM-34-Proben und 1×3 DMSO-Kontrollen gebildet (s. Tabelle 13). Wie bei den Messungen an ganzen Zellen wurde die Fluoreszenzintensität vor und nach Natriumazidgabe gemessen. Die Ausgangsintensität der Fluoreszenz wurde in Relation zur der unter NaN_3 -induzierter Depolarisation gesetzt. Bei einer Messung ohne das Atmungskettengift und zwei aufeinanderfolgenden mit ihm ergaben sich also pro 300 μl -Probe zwei Prozentwerte: der eine mit 7,5 min NaN_3 -Inkubation, und der andere mit 15 min Inkubation. Die Prozentwerte werden auf eine Dezimalstelle genau angegeben (s. Tabelle 13).

Die Ergebnisse liefern keinen Anhalt für die Abkehr von der Nullhypothese H_0 ($p_{7,5} = 0,374$ und $p_{15} = 0,506$; Zweistichproben- t -Test): Eine Beeinflussung des Membranpotenzials der isolierten Mitochondrien durch $K_{Ca}3.1$ -Hemmung kann also nicht festgestellt werden. Auch die Suche nach statistisch signifikanten Abweichungen der drei verschiedenen TRAM-34-Mitochondrienproben untereinander liefert p -Werte von 0,978 (nach 7,5 min Inkubation, $Power$: 0,052; ANOVA) und von 0,970 (nach 15 min Inkubation, $Power$: 0,053; ANOVA). Daraus kann geschlossen werden, dass sich die drei verschiedenen Mitochondrienisolate vergleichbar verhalten. Der eventuelle Fall, dass zwei Proben eine Reaktion auf TRAM-34 zeigen und eine ausreißende dritte Probe dies maskiert, ist somit ausgeschlossen.

A549-Mitochondrien	DMSO	TRAM
Isolationenanzahl N	1	3
Probenzahl n	3	9
7,5 min-Mittelwert [%]	118,3 ± 1,3	121,0 ± 1,6
15 min-Mittelwert [%]	129,0 ± 1,6	131,4 ± 1,9

Tabelle 13: Messungen von $\Delta\Psi_m$ isolierter A549-3R-Mitochondrien ergeben keine Hyperpolarisation durch TRAM-34

Alle Werte übersteigen 100 %, was bei den Messungen an den ganzen Zellen zum Ausschluss der Daten aus der Auswertung geführt hätte. Auch ohne statistische Signifikanz liegt für beide Messzeitpunkte der TRAM-34-Wert über dem von DMSO (absolut 2,7 % nach 7,5 min bzw. 2,4 % nach 15 min). Relativ ausgedrückt sind das 2,2 % nach 7,5 min bzw. 1,8 % nach 15 min. Da niedrige Prozentwerte aber eine $\Delta\Psi_m$ -Hyperpolarisation bedeuten, wie unter $K_{Ca}3.1$ -Inhibition erwartet, liegen die Ergebnisse nicht einmal tendenziell in der hypothetisierten Richtung.

4. iv) Messung der Lipophilie

Auf Grundlage der Verteilung der Analysate zwischen n-Octanol und wässrigem Puffer wurde der dimensionslose lg D-Wert für einen pH-Wert von 7,4 bestimmt. Je lipophiler ein Stoff, desto höher also der Wert.

Die stärkste Lipophilie kann für TRAM-34 gemessen werden ($\lg D_{7,4} = 5,12 \pm 0,03$), gefolgt von Senicapoc ($4,35 \pm 0,02$) und 1-EBIO ($1,73 \pm 0,01$).

Für Paxillin lagen trotz siebenfacher Optimierung die Messpunkte nicht im linearen Bereich. Die *in silico*-Analyse mit dem Programm MarvinSketch (Version 16.6.13 von ChemAxon) ergibt Werte von 3,22 nach dem ChemAxon-Algorithmus bzw. 3.62 nach dem Consensus-Algorithmus.

Diese Ergebnisse bedeuten, dass für TRAM-34 von der höchsten Diffusion durch und Verteilung in den lipophilen Plasma- und Mitochondrienmembranen ausgegangen werden kann. Entsprechend ist für 1-EBIO unter den vier getesteten Substanzen dahingehend das geringste Ein- und Durchdringen anzunehmen. Diese unterschiedlichen lipophilen Eigenschaften der Kanalmodulatoren sind für die Interpretation der Ergebnisse bedeutsam.

5) Diskussion

In diesem Abschnitt werden zuerst die präsentierten Ergebnisse interpretiert und mögliche Einschränkungen ergänzt. Zudem wird der Quervergleich zu anderen Arbeiten gezogen, bevor abschließend ein Ausblick auf das eigene Labor, und in etwas weiterer Zukunft dann eventuell auch die Klinik gegeben wird.

Die Ergebnisse des semi-quantitativen Western Blots konnten gute Argumente pro mitochondrialer $K_{Ca}3.1$ -Lokalisation für A549-3R- und H1975-Zellen schaffen. Mittels Immunfluoreszenz erfolgte eine nähere Quantifizierung des Kanalvorkommens. Die signifikant höhere Kanaldichte in Kolokalisation mit dem Mitochondriensignal untermauert die Hypothese von mito $K_{Ca}3.1$ in A549-3R-, H1975- und auch HMEC-1-Zellen. Der funktionale Ansatz mittels $\Delta\Psi_m$ -Messung lieferte für A549-3R-Zellen eine Hyperpolarisierung des mitochondrialen Membranpotenzials durch TRAM-34. Diese Zelllinie scheint also funktionale mito $K_{Ca}3.1$ zu exprimieren. Für HMEC-1-Zellen ergab sich jedoch keine signifikante Grundlage, die Hypothesen zur Regulierung von Potenzial und ROS-Genese zu bestätigen.

5. i) Western Blot

Die Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie-Blau bestätigt die Effektivität des Proteintransfers vom Gel auf die Membran.

Die Rolle von Bak als mitochondriellem Indikator wird verifiziert. In jeder Mitochondrienspur und in keinem Ganzzelllysat werden Banden detektiert. Natürlich ist das Protein in der Zelle ebenso exprimiert, allerdings in einer unterhalb der Nachweisgrenze dieses Experiments liegenden Konzentration. Das Phänomen der Doppelbande allerdings ist den Herstellerinformationen zum Antikörper nicht zu entnehmen. Dabei zeigt die obere Bande die erwartete Größe (29 kDa), die untere aber das stärkere Chemilumineszenzsignal. Nichtsdestotrotz können die Banden als Erfolgskontrolle der Organellenisolation betrachtet werden.

Die Expression des $K_{Ca}3.1$ -Kanals war für A549-3R- und HMEC-1-Zellen aus Vorversuchen bekannt. Die in den Western Blots mit den Ganzzelllysaten auftretenden Kanalbanden (50 kDa) können als Positivkontrolle dafür erachtet werden. Neu ist hingegen die Identifikation des Kanals in den Ganzzelllysaten von H1299- und H1975-Zellen, wobei diese Beobachtung allerdings jeweils nur an einem einzigen Ganzzelllysate (N = 1) gemacht wurde und somit als vorläufiges Ergebnis erachtet werden muss. Unterstützt wird diese Entdeckung von den Immunfärbungen (N = 3). Für die H1299-Zelllinie wurden mit derselben Probe zwei Western Blots durchgeführt, beide mit vergleichbarem Ergebnis.

Berichte über den Kanalnachweis in lungenkarzinomatösen Mitochondrien finden sich nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht in der Fachliteratur. Für die Zelllinien **A549-3R** und **H1975** scheint dies nun jedoch gelungen.

Unerlässlich ist bei der Interpretation auch der Blick auf die Proteinkonzentrationen. Mit > 2 mg/ml stellt sich die Proteinkonzentration der untersuchten **H1299**-Mitochondrienisolate mehr als doppelt so hoch dar wie die der anderen beiden Lungenkarzinomzelllinien. Dies spiegelt sich auch im starken Bak-Signal wider. Trotzdem lässt sich keine Kanalbande erkennen, was die mitochondriale Expression zwar nicht vollständig ausschließt, aber doch stark bezweifeln lässt.

Die korrespondierende Konzentration für **HMEC-1**-Zellen beziffert sich auf $< 0,5$ mg/ml, oder relativ ausgedrückt nur ein Fünftel von H1299 und ungefähr die Hälfte der beiden NSCLC-Reihen mit detektierbaren mito $K_{Ca}3.1$ -Banden. Die Abwesenheit ebendieser Banden ist also ein Argument geringerer Aussagekraft gegen den Kanal in der Mitochondrienmembran als bei der H1299-Zelllinie. Zudem wurden die Endothelzellen am Vortag der Isolation nicht mit $TNF\alpha$ stimuliert, was das Protokoll für die Immunfluoreszenz und die $\Delta\Psi_m$ -Messung im Gegensatz dazu vorsah. Dabei stellt $TNF\alpha$ allerdings ein wichtiges Signal für Mitochondrien dar. 2014 maßen Kastl et al. unter Gabe dieses Zytokins in murinen Hepatozyten eine Reduktion von $\Delta\Psi_m$ auf $63 \pm 3,5$ % und damit einhergehend eine gesteigerte endogene ROS-Produktion.¹⁰² Ein Mehr an Kationenkanälen (wie z. B. K^+ -Kanäle) in der Mitochondrienmembran stellt eine plausible Erklärung für diese Resultate dar. Drabarek et al. berichteten 2012 zudem von einer Zunahme der Gesamtmitochondrienmasse in endothelialen EA.hy926-Zellen nach $TNF\alpha$ -Behandlung, was angesichts der niedrigen Proteinkonzentrationen der HMEC-1-Mitochondrienisolate die Sensitivität des Western Blots unterstützen könnte.¹⁰³ Weiter führten sie ebenfalls eine Zunahme von ROS und ICAM-1 an.

Auch ist in konfluenten Zellkulturbehältern von einer geringeren Zelldichte der Endothelien auszugehen. Das liegt in erster Linie an der Größe der HMEC-1-Zellen und an deren natürlicher Kontaktinhibition, während das Wachstum der malignen Zellen nicht auf einen *Monolayer* beschränkt ist. Von geringer Relevanz, aber doch anzumerken, ist die um ca. 4,5 % kleinere Oberfläche der Zellkulturflaschen (Endothelzellen) gegenüber der der Zellkulturschalen (NSCLC-Zellen).

Bak wurde als Mitochondrienmarker eingesetzt, andererseits wurde auf die Detektion eines zellmembranspezifischen Proteins verzichtet. Dessen Bande in den Ganzzelllysaten und Abwesenheit in den Mitochondrienisolationen könnte die Reinheit letzterer untermauern. Allerdings wurde zum einen auf die Literatur zum *Mitochondria Isolation Kit* vertraut, zum anderen fungieren die H1299-Zellen als diese Negativkontrolle. Trotz hoher Proteinkonzentrationen und prägnanter Kanalbande im Ganzzelllysat war der Kanalnachweis in den mitochondrialen Proben negativ, was gegen deren Kontamination mit Plasmamembranproteinen spricht.

Alle Aussagen sollten vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass die Genexpression generell wandelbar ist. Sie kann von vielen externen wie internen Faktoren abhängen, und sowohl Nachweis als auch Abwesenheit eines Polypeptids sind nicht zwangsläufig qualitativ oder quantitativ konstant. Allein die Tatsache der Kultivierung im Zelllabor kann die externe Validität schon einschränken, klinisch isolierte Lungenkarzinomproben können also ein abweichendes Proteom translatieren. Gerade die endotheliale Modellfunktion ist wissenschaftlich diskutiert.¹⁰⁴ Dies wird auch durch die Beobachtungen zur HMEC-1-Kultivierung gestützt. Mit steigender Passagezahl wachsen die Zellen dieser Linie langsamer und werden größer. Wenn durch das bloße Kultivieren sich also die Morphologie und das Proteom der Endothelzelllinien ändert, können *in vitro* gewonnene Erkenntnisse zur Proteinexpression, aber auch zu anderen Zellfunktionen, nur bedingt auf physiologische Endothelzellen übertragen werden. Um diese Unterschiede zwischen Zelllinien und Gewebe möglichst gering zu halten, wurden die endothelialen Zellen häufiger als die malignen Zellen frisch der Kryokonservation entnommen.

5. ii) Immunfluoreszenz

Es kann für die Krebszellen A549-3R und H1975 sowie für die HMEC-1-Endothelien gezeigt werden, dass die Kanaldichte bei Kolo-kalisation mit dem Mitochondriensignal signifikant höher ist. Auch untereinander sind Unterschiede in der Anzahl von Kanalproteinen pro Quadratmikrometer zu verzeichnen.

Die einfachste Deutung der Resultate ist das Übernehmen der absoluten Kanaldichten: z. B. für H1975-Zellen in den Mitochondrien $0,95 \mu\text{m}^{-2}$, und $0,64 \mu\text{m}^{-2}$ in der Plasmamembran. Diese Interpretation setzt allerdings eine hohe Exaktheit der Aufnahmetechnik voraus. Dass ein Kanal in der Zellmembran, der auf der z-Achse im Submikrometerbereich über oder unter einem Mitochondrium liegt, ebenfalls „gelb“ (also kolo-kalisiert) dargestellt wird, entzieht sich hier der Berücksichtigung. Dies erscheint jedoch durchaus wahrscheinlich, wurden die ausgewerteten Regionen aufgrund der starken perinukleären Fluoreszenzüberlagerungen bewusst in die Zellperipherie gesetzt, wo die Zellhöhe am niedrigsten anzunehmen ist. Diese Wahl der ROI in die flache Peripherie rechtfertigt auch das Simplifizieren auf eine streng dichotome Einteilung der Kanäle auf „Plasmamembran“ oder „Mitochondrienmembran“. Natürlich müssen die Proteine bzw. ihre Vorläuferpolypeptide im Rahmen der zellulären Synthese- und Transportmechanismen noch anderweitig lokalisiert sein: am rauen endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat, oder mit Vesikeln oder Transportsignalen assoziiert im Zytoplasma. Mit zunehmender Entfernung vom Nukleus scheint deren fehlende Berücksichtigung und somit das angewandte Modell allerdings besser zuzutreffen.

Insofern sollten die Dichten der „gelben“ und „grünen“, also der kolo-kalen und nicht-kolo-kalen Kanäle miteinander verglichen werden. Absolut kann dies durch Subtraktion geschehen. Die nicht-kolo-kalen Kanäle werden als der Plasmamembran zuzuschreibender Hintergrund definiert, und nur das Plus an Kanälen über dem roten Signal wird wirklich auf eine Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran zurückgeführt. Dieses Prinzip resultiert in mitochondrialen Kanaldichten von $0,33 \mu\text{m}^{-2}$ für A549-Zellen, $0,30 \mu\text{m}^{-2}$ für H1975-Zellen und $0,23 \mu\text{m}^{-2}$ für HMEC-1-Zellen. Dem gegenüber stehen Dichten von $0,79 \mu\text{m}^{-2}$, $0,64 \mu\text{m}^{-2}$ und $0,48 \mu\text{m}^{-2}$ für die Plasmamembran.

Nichtsdestotrotz bleibt das Festlegen auf einen absoluten Wert angreifbar. Bei ausreichend starkem Kanalsignal wurden vermutlich auch Kanäle mit von der Fokusebene abweichender

z-Koordinate eingeschlossen.^{xix} Diese überhöhte Sensitivität ginge mit einer Überschätzung des wahren Dichtewertes einher. In der Fachliteratur sind Publikationen, die die $K_{Ca3.1}$ -Kanalhäufigkeit in Membranen exakt beziffern, rar. Blomster et al. untersuchten 2016 dahingehend Mikroglia.¹⁰⁵ Sie maßen die Differenz des Stromflusses unter pharmakologischer Aktivierung und Inhibition des Kanals. Auf die Kanaldichte schlossen sie dann mathematisch unter Annahme der Konstanten „Leitfähigkeit pro Kanal“ und „spezifische Zellmembrankapazität“. Dies führte u.a. zu einer Dichte von $0,22 \mu\text{m}^{-2}$ in Interleukin-4-aktivierten Gliazellen. Die Autor*innen betonten, dass in diesem simplifizierten Modell unter Kanalaktivierung von einer Öffnungswahrscheinlichkeit von 100 % ausgegangen wurde. Tatsächlich beträgt diese Wahrscheinlichkeit selbst unter unphysiologischen Kalziumionenkonzentrationen von bis zu 2 mM maximal 50 %.¹⁰⁶ Die errechnete Kanaldichte unterschätzt somit vermutlich die reale Kanaldichte um mindestens den Faktor 2.

Dementsprechend befindet sich der korrigierte Dichtewert von $> 0,44$ Kanälen pro μm^2 in der gleichen Größenordnung wie die gemessenen nicht-kolokalen Kanäle. Grade die ebenfalls physiologischen Endothelzellen differieren mit $0,48 \mu\text{m}^{-2}$ am geringsten. Die demgegenüber gesteigerte $K_{Ca3.1}$ -Expression ($0,79 \mu\text{m}^{-2}$ und $0,64 \mu\text{m}^{-2}$) entarteter Zellen ist ebenfalls plausibel und steht im Einklang mit den Ergebnissen von Bulk et al.⁵⁶

Noch zurückhaltender ist die Angabe relativer Werte. Die durchschnittlichen Quotienten aus den Dichten der „gelben“ Kanäle zu denen der „grünen“ liefern Werte von 1,39 (A549-Zellen), 1,53 (H1975-Zellen) und 1,46 (HMEC-1-Zellen). Diese Quotienten unterscheiden sich nicht signifikant, während der Western Blot eindeutige Hinweise für die Kanäle in der Mitochondrienmembran der Zelllinien A549 und H1975 gibt. Es ist nicht auszuschließen, dass die Einteilungsmethodik für „gelbe“ und „grüne“ Kanäle die Anzahl der kolokalen Kanäle systematisch überschätzt. Doch sollte diese Überkalkulation aufgrund der objektiven Kriterien dann auch konstant sein. Die Ergebnisse des Western Blots mit einbeziehend lässt sich also schließen:

Der Western Blot zeigt das Vorkommen von mito $K_{Ca3.1}$ -Kanälen in A549- und H1975-Zellen auf. Die Immunfluoreszenz ergibt für diese beiden Zelltypen und die Endothelzelllinie vergleichbare Kanaldichten-Quotienten. Die naheliegendste Erklärung scheint zu sein, dass der

^{xix} Um diesen Störfaktor zu minimieren, wurde auch die Auswertung an einem Konfokalmikroskop, das die Dreidimensionalität der Zellen besser abbilden kann, ausprobiert. Aufgrund einer niedrigeren lateralen Auflösung der Aufnahmen wurde dieser Ansatz allerdings nicht weiterverfolgt.

Kaliumkanal in den HMEC-1-Mitochondrien zwar ebenfalls vorkommt, aber (ohne TNF α -Stimulation) unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots exprimiert wird. Die niedrigen Kanaldichtewerte und die geringen Proteinkonzentrationen der endothelialen Ganzzelllysate und der Mitochondrienfraktionen untermauern diese Überlegung.

Interessant ist in diesem Kontext auch die Rolle der H1299-Zellen. Angesichts der starken Bak-Banden und hohen Proteinkonzentrationen in den Isolaten scheint eine Lokalisation von K_{Ca}3.1-Kanälen in der inneren Mitochondrienmembran unwahrscheinlich, gleichzeitig kommt der Kanal in der Plasmamembran vor. Dies wären beste Voraussetzungen für eine Negativkontrolle in der Immunfluoreszenz, um mittels des Verhältnisses der Dichten „gelber“ und „grüner“ Kanäle bestimmen zu können, welcher Anteil der Auswertung geschuldet, und welcher auf reale Kolo-kalisation zurückzuführen ist. Es wäre ein Quotient von ca. 1,00 zu erwarten. Dies würde bedeuten, dass die Kanaldichte des Hintergrunds (Plasmamembran) genauso hoch ist wie die die Kanaldichte in Superposition mit dem Mitochondriensignal. Unter Subtraktion der dem Hintergrund zuzuschreibenden Kanäle würde die Dichte der „echten mitoK_{Ca}3.1-Kanäle“ auf 0 μm^{-2} absinken, wie angesichts der Western Blot-Ergebnisse zu erwarten wäre. Doch selbst ein Quotient von z. B. 1,20 in den H1299-Krebszellen würde ein Argument für die Expression von mitoK_{Ca}3.1-Kanälen in den HMEC-1-Endothelzellen darstellen, solange der H1299-Quotient signifikant niedriger als der HMEC-1-Quotient (1,46) wäre. Die „überzähligen“ 0,20 des Quotienten wären dann als systematischer Auswertungsfehler für alle Zelllinien anzusehen, der fälschlicherweise die Anzahl der tatsächlich kolo-kalisierten Kanäle überschätzt. Leider entzieht sich die H1299-Linie aus beschriebenen Gründen derselben Auswertung wie die anderen Zellen (s. Tabelle 7).

Die Methode diskutierend ist anzumerken, dass im Gegensatz zur Detektion der Kanäle in der Plasmamembran primärer wie sekundärer Antikörper mehrere *Lipidbilayer* durchdringen müssen. Da der Erstantikörper gegen den Carboxylterminus des K_{Ca}3.1-Kanalproteins gerichtet ist, muss für die Markierung in der Zellmembran nur diese durchdrungen werden. Je nach Ausrichtung des Kanals in der inneren Mitochondrienmembran sind hier zusätzlich diese und in jedem Fall die äußere Mitochondrienmembran zu permeieren. Allerdings wurde für den Permeabilisierungsschritt mit TritonTM X-100 eine ausgedehnte Einwirkzeit von 10 min gewählt, sodass diese Barrierefunktionen für die Immunglobuline bis zur Vernachlässigbarkeit reduziert wurden.

Kritisch zu hinterfragen sind weiterhin die gewählten Ausschlusskriterien. Bei der Kanalidentifikation wurden Halbwertsbreiten ≤ 5 Pixel, also bis etwa 300 nm, als ausreichend erachtet. Der Durchmesser von Kaliumkanälen beträgt allerdings nur ca. ein Dreißigstel dessen.¹⁰⁷ Auch die Definition einer Kolo-kalisation, die zwischen Halbwertsbreite des Mitochondriensignals und Maximum des Kanalsignals einen Pixel Differenz zulässt, könnte als großzügig aufgefasst werden. Somit wäre ein Überschätzen der kolokalen Kanalanzahl die Folge. Dem entgegenzusetzen ist der divergierende Charakter des emittierten Lichts als physikalische Unumgänglichkeit. Auch geht bisweilen die Verwendung zweier Immunglobuline zur Proteindetektion sterisch bedingt mit einer lateralen Abweichung im Submikrometerbereich einher.¹⁰⁸ Nicht zuletzt kann die Bedienung des Mikroskops, wie Filterwechsel und minimales Nachfokussieren, bei aller Vorsicht zu einem Fehler auf jeder der drei räumlichen Achsen führen.⁹⁷ Mittels elaborierter Aufnahmetechniken, die sich zum Begriff der RESOLFT-Mikroskopie (*reversible saturable optical linear fluorescence transitions*) zusammenfassen lassen, könnte sich die Bildauflösung noch steigern lassen, ohne dabei die Gesamtübersicht über die Zelle zu verlieren.¹⁰⁹

5. iii) Messung des mitochondrialen Membranpotenzials

Die Untersuchung des mitochondrialen Membranpotenzials ergibt in A549-3R-Zellen eine Hyperpolarisierung durch den $K_{Ca3.1}$ -Blocker TRAM-34. Für HMEC-1-Zellen kann keine signifikante Differenz zwischen die sechs verschiedenen Inkubationslösungen gemessen werden.

Es wurde hypothetisiert (s. 1.iv), dass die Inhibition des potenziellen mito $K_{Ca3.1}$ -Kanals den dem elektrochemischen Gradienten folgenden Kationeneinstrom reduziert. Die erwartete Hyperpolarisation kann im Rahmen der Messungen an **A549**-Zellen bestätigt werden: TRAM-34 weist im Vergleich zur Kontrolle DMSO nur 86 % der Ausgangsintensität auf. Die Gegenprobe, durch 1-EBIO-Aktivierung eine $\Delta\Psi_m$ -Depolarisation zu bewirken, also einen höheren Prozentwert im Experiment zu erfassen, liefert jedoch nicht die vermuteten Ergebnisse. Zwar liegt kein signifikanter Unterschied zu DMSO vor, doch der ermittelte Median ist sogar niedriger als der von TRAM-34 (relativ 99 % dessen) und DMSO (relativ 85 % dessen). Als

Positivkontrolle sollte Paxillin als Inhibitor des $K_{Ca}1.1$ -Kanals dienen, dessen Expression in Mitochondrien mehrfach beschrieben wurde, und dessen Hemmung zu einer Hyperpolarisation von $\Delta\Psi_m$ führt.⁹⁹ Tatsächlich liefern die Paxillin-Werte jedoch den maximalen Median, was einer (nicht signifikanten) Depolarisation entspricht. Dies ist allerdings vor dem Hintergrund zu betrachten, dass der $mitoK_{Ca}1.1$ -Kanal in Lungenkarzinomen noch nicht nachgewiesen ist.

Die EGF-Lösung und ihre Kontrolle, HEPES-gepufferte Ringerlösung ohne Zusatz, zeigen zueinander die größte Übereinstimmung in ihrer durch NaN_3 provozierten Depolarisation. Bei zwei Wildtypparallelen für den EGF-Rezeptor ist beim A549- $\Delta\Psi_m$ keine Reaktion zu registrieren. Es stellt sich dabei die Frage, ob innerhalb der ca. 90-minütigen Experimentdauer die über intrazelluläre Signalkaskaden ablaufende Änderung der Genexpression bereits messbar stattfindet. Prinzipiell ist eine gesteigerte ROS-Produktion nach EGF-Stimulation plausibel.¹¹⁰ Positiv ist wiederum die Abwesenheit eines signifikanten Unterschieds zwischen den beiden Kontrolllösungen Ringer und DMSO zu sehen.

Im Vergleich der sechs **HMEC-1**-Datenreihen miteinander ergibt sich keine signifikante Abweichung. Ergänzend lässt sich anmerken, dass TRAM-34 den geringsten und 1-EBIO den zweithöchsten Median-Prozentwert aufweist. Dies ist zumindest in der Tendenz kongruent mit der Hypothese, nach der die $K_{Ca}3.1$ -Inhibition eine $\Delta\Psi_m$ -Hyperpolarisation (niedrige Prozentwerte) und die $K_{Ca}3.1$ -Aktivation eine $\Delta\Psi_m$ -Depolarisation (hohe Prozentwerte) bewirkt. Für EGF ist zu hinzuzufügen, dass er Bestandteil des normalen HMEC-1-Mediums ist, die Zellen im Rahmen des Aussiedelns damit also schon in Kontakt waren. Damit ist ein Effekt der Kanalblockade auf das mitochondriale Membranpotenzial im Endothel keinesfalls ausgeschlossen, vielmehr erscheint diese Methode nicht sensitiv genug, um ihn (signifikant) abzubilden. Oder andersherum formuliert: Bei der hohen Streuung der Daten müsste eine weit höhere Zellzahl ausgewertet werden, um geringe Effekte einer Kanalmodulation aufweisen zu können. Dass dies bei den Endothelzellen aufwendiger ist, wird zwar auch durch die Ergebnisse der Immunfluoreszenz suggeriert. Diese zeigen eine über 30 % geringere $mitoK_{Ca}3.1$ -Kanalichte in HMEC-1- gegenüber A549-Zellen auf. Eine niedrigere absolute Kanalanzahl geht jedoch nicht zwingend mit einem geringeren Einfluss auf ein Membranpotenzial bzw. einer niedrigeren Reaktion auf Kanalmanipulation einher.

Auch die Messung an den **isolierten Mitochondrien** der A549-Zelllinie bringt keine zusätzliche Erkenntnis. Anders als bei den vorherigen Experimenten ist hier nach NaN_3 -Gabe wiederholt eine abnehmende Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. Angesichts der intensiveren Belichtung im Fluoroskan II ist dies wahrscheinlich auf ein Ausbleichen des Rhodamin 123

zurückzuführen. Allerdings ist ein gleichmäßiger Effekt auf das Fluorochrom bei Probe wie Kontrolle anzunehmen. Der Hypothese zufolge sollte die Fluoreszenz durch die vorangegangene Hyperpolarisierung mit TRAM-34 bei den Proben stärker anwachsen, wenn Natriumazid hinzugegeben wird. Somit gilt, wie schon in den Ganzzellversuchen und unabhängig vom Ausbleichen: je niedriger der Prozentwert, desto polarer die innere Mitochondrienmembran zu Messbeginn. Insofern ist die Differenz der arithmetischen Mittel zwar in der Tendenz der Hypothese entgegengesetzt (s. Tabelle 13), aber nur minimal, statistisch insignifikant und von unzureichender *Power*.

Neben der Kalziumkonzentration und den Kanalmodulatoren beeinflussen noch weitere Faktoren die Öffnungswahrscheinlichkeit von kalzium-empfindlichen Kaliumkanälen (s. 1.iii). Durch die Umverteilung von Ionen folgt osmotisch auch Wasser, und die Änderung des Mitochondrienvolumens wirkt als mechanisches Signal auf die Membran und auf die darin integrierten Proteine. 2018 konnte die Mechanosensitivität von glialen $K_{Ca1.1}$ -Kanälen sowohl in der Plasma- als auch in der inneren Mitochondrienmembran aufgezeigt werden.^{111, 112} Eine klare Differenzierung des pharmakologischen und des osmotisch-mechanischen Einflusses auf das Membranpotenzial ist mit der beschriebenen Methode (s. 3.v) nicht zu erreichen.

Pharmaka:

Der Western Blot erfolgte an lysierten, die Immunfluoreszenz an permeabilisierten, die $\Delta\Psi_m$ -Messung hingegen u. a. an vitalen Zellen. Es stellte sich bei den Kanalmodulatoren also stets die Frage, ob diese in effektiver Dosis bis an die innere Mitochondrienmembran vordringen. Für von außen applizierte Kanalmodulatoren stellt die Plasmamembran den ersten, die innere Mitochondrienmembran jedoch den dritten *Lipidbilayer* dar. Des Weiteren sind zytoplasmatisch viele Makromoleküle mit potenzieller Interaktion lokalisiert. Auch die Messungen an den isolierten Mitochondrien geschahen in Anwesenheit von 0,1 % Rinderalbumin. Dabei handelt es sich um ein Serumprotein mit bekannt hohem Potenzial, hydrophobe Moleküle zu binden und transportieren.

Von **TRAM-34** als hoch lipophilem Stoff ($\lg D_{7,4} = 5,12$) ist eigentlich eine gute Verteilung in den drei Membranen anzunehmen. Auch wenn die Ganzzell-Resultate geringe Differenzen zur Kontrolllösung liefern, entsprechen sie doch der hypothetisierten Richtung. Andersherum besteht die Möglichkeit, dass über die $\Delta\Psi_m$ -Hyperpolarisation und die exzessive Produktion der zytotoxischen ROS die Zellen mit hoher TRAM-34-Aufnahme apoptotisch und unter der

Superfusion von den Glasbodenschälchen gewaschen werden.¹¹³ Insofern läge für die Messungen ein Selektionsbias hin zu Karzinomzellen niedriger TRAM-34-Sensitivität vor. Da die mikroskopisch beobachteten Zelldichten sich zwischen den verschiedenen Inkubationslösungen allerdings nicht zu unterscheiden scheinen, wird dies als unwahrscheinlich eingestuft.

1-EBIO kann als sogenanntes „*dirty drug*“ angesehen werden. Es entfaltet also unspezifische Wirkungen auf andere Ionenkanäle.¹¹⁴ Des Weiteren lässt der $\lg D_{7,4}$ -Wert von 1,73 auch auf die geringste Verteilung in einer Lipiddoppelschicht aller eingesetzten Kanalmodulatoren schließen.

Die Wahl einer angemessenen **Paxillinkonzentration** erwies sich als komplex. Während die Herstellerangabe zur Dissoziationskonstante K_i 1,9 nM beträgt, wird die Frage in der Literatur etwas differenzierter beschrieben. Sanchez und McManus kamen 1996 abhängig von der Kalziumkonzentration auf entsprechende Werte zwischen 0,92 und 4,8 nM in transfizierten Froschoozyten.¹¹⁵ Zhou und Lingle führten 2014 weiter die hochselektive Bindung von Paxillin an den $K_{Ca1.1}$ -Kanal in seiner geschlossenen Konstitution und die damit einhergehende Stabilisierung dieser Konstitution an.¹¹⁶ Daraus ergibt sich die inverse Abhängigkeit der pharmakologischen Potenz von der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, die wiederum von Kalziumspiegel und Membranpotenzial beeinflusst wird. Unter verschiedenen Bedingungen konnten so EC_{50} -Werte zwischen 10 nM und 10 μ M errechnet werden. Das Vorkommen von $K_{Ca1.1}$ -Kanälen in der inneren Mitochondrienmembran von humanen Endothelzellen (EA.hy926) wiesen Bednarczyk et al. 2013 immunologisch, elektrophysiologisch und pharmakologisch nach.⁹⁹ Auch konnte der hyperpolarisierende Effekt der paxillininduzierten Kanalblockade auf $\Delta\Psi_m$ gezeigt werden. Die für diese Arbeit verwendeten Paxillinkonzentrationen betragen 10 μ M und weniger, eine Steigerung auf 20 μ M war von keinem zusätzlichen Effekt begleitet. Allerdings wurden die Experimente nicht an ganzen Zellen, sondern Mitoplasten durchgeführt, wodurch die Übertragbarkeit auf oben beschriebene Methodik wieder relativiert wird.

Zusammenfassend lieferten Testmessungen an A549-Zellen mit 30 μ M und auch mit 1 μ M Paxillin grob die gleichen Ergebnisse wie die Experimente mit 10 μ M. Die Schwierigkeiten bei der Ermittlung der Lipophilie von Paxillin können auf eine unzureichende Ionisierbarkeit zurückgeführt werden. Auf Grundlage des Computermodells ($\lg D_{7,4} = 3,22$ bzw. 3,62) kann jedoch von einer effektiven Verteilung in Biomembranen ausgegangen werden.

Insgesamt stellt die pleiotrope Wirkung der Kanalmodulatoren auf ihre Kanäle in der Plasmamembran und in der Mitochondrienmembran vor Schwierigkeiten. Beobachtete Effekte können nicht sicher auf die Manipulation des einen oder des anderen Kanals zurückgeführt werden. Die Interferenz auf RNA-Ebene bietet nur dann eine Lösung dieses Problems, wenn sich auch die Transkriptionsprodukte des *KCNN4*-Gens in Abhängigkeit von dem zellulären Ziel des $K_{Ca3.1}$ -Kanals (Plasmamembran oder Mitochondrienmembran) unterscheiden. Durch die Verwendung von Kanalmodulatoren, die die Plasmamembran nicht permeieren, könnte ein Effekt allein den dort lokalisierten Kanälen zugeschrieben werden. Andersherum können Kanalmodulatoren auch mitochondrienspezifisch markiert werden (z. B. mit dem kationischen, lipophilen Triphenylphosphonium), um Aussagen allein über die eben dort vorkommenden Kanäle zu treffen.¹¹⁷

Aufnahmequalität und Methodenüberprüfung:

Subjektiv ist die Auswertung der mitochondrialen Membranpotenzialmessungen bei den Endothelzellen deutlich komplizierter als bei den Krebszellen. Es liegt in der Natur ersterer, dass sie dichter aneinander liegen (müssen). Des Weiteren sind sie größer und ihre Mitochondrien diffuser verteilt. Die A549-Zellen weisen dagegen einfach auszuwertende Mitochondrien auf: kompakt semilunar um den Nukleus angeordnet und mit klarem Kontrast zum Zytosol. Darüber hinaus ändern die HMEC-1-Zellen in den wenigen Minuten der Messperiode mitunter ihre Morphe, sodass die ROI ausladender und unspezifischer eingezeichnet werden müssen. Diesen Beobachtungen ist auch das Anpassen des Ausschlusskriteriums für die Endothelzellen von Werten $\geq 100\%$ auf $\geq 90\%$ geschuldet. Dieser subjektive Eindruck wird objektiv durch den Vergleich der Interquartilsabstände (s. Tabellen 10 und 12) gestützt. Das heißt natürlich nicht, dass die Streuung der Messungen allein auf die Methode und nicht auf die Zellphysiologie zurückzuführen sein muss.

Obwohl das Auge subjektiv und die Streuung objektiv also eine geringere Zuverlässigkeit der Methode bei den Endothelzellen suggerieren, ist diese dennoch mit überzeugenden Resultaten anwendbar. Dies ergibt sich aus den wiederholten Auswertungen im Rahmen der Reliabilitätsprüfungen (s. Tabellen 8 und 9).

5. iv) Ausblick

Das Vorkommen von $K_{Ca3.1}$ -Kanälen in den Mitochondrien der Lungenkrebszellen A549-3R und H1975 kann als belegt angesehen werden. Auch für die Endothelzellen HMEC-1 konnten immunhistologische, profunde Indizien dafür gesammelt werden. In A549-3R-Zellen wurde eine signifikante Hyperpolarisation von $\Delta\Psi_m$ durch den Kanalblocker TRAM-34 aufgezeigt.

Bezüglich der drei Hauptexperimente dieser Arbeit lassen sich noch vielversprechende Modulationen finden.

Die HMEC-1-Mitochondrienisolate für den **Western Blot** können zukünftig aus mehr Ausgangsmaterial gewonnen und mit $TNF\alpha$ vorbehandelt werden. Zudem könnte durch Einsatz eines gegen ein exklusiv plasmamembranöses Protein gerichteten Antikörpers die Reinheit der Mitochondrienisolate weiter bekräftigt werden. Für eine nähere Quantifizierung des Signals könnte auch eine simultane Detektion eines sogenannten *housekeeping* Proteins erfolgen. Wenn dessen Konzentration direkt in der Probe gemessen wurde, kann man die Signalintensität seiner Bande als Referenz nutzen, um auf die den anderen Banden zugehörigen Proteinkonzentrationen zu schließen. Hinsichtlich des sicheren Nachweises des $K_{Ca3.1}$ -Kanals in den Ganzzelllysaten von H1299- und H1975-Zellen ist eine Durchführung von mindestens zwei weiteren Versuchen anzustreben ($N \geq 3$).

Es muss eine Methode gefunden werden, um die verschiedenen Kanaldichten anhand der **Immunfluoreszenzfärbungen** der H1299-Zellen zu bestimmen, beispielsweise mittels der hochauflösenden *total internal reflection fluorescence*-Mikroskopie. Sollten diese Krebszellen wirklich $K_{Ca3.1}$ -Kanäle nur auf der Plasmamembran und nicht in den Mitochondrien exprimieren, könnte ihr Kanaldichten-Quotient mit den Quotienten der anderen Zelllinien verglichen werden. Ein signifikant niedrigerer Kanaldichten-Quotient, theoretisch bis zu 1,0, würde die Ergebnisse zur Abwesenheit von mito $K_{Ca3.1}$ -Kanälen in H1299-Zellen untermauern. Dies würde bedeuten, dass in Superposition mit dem Mitochondriensignal die gleiche Kanaldichte zu verzeichnen ist wie im Hintergrund, der Plasmamembran. Eventuell lassen sich weiterhin Aufnahmeprotokolle für isolierte, mit anti- $K_{Ca3.1}$ -Antikörpern behandelte Mitochondrien etablieren. Das würde die Kolokalisierung mit dem Mitochondriensignal einsparen, die nur bei Bildern von ganzen Zellen notwendig ist.

Für die $\Delta\Psi_m$ -Messungen an den isolierten Mitochondrien ist ein anderes Kolloid als Albumin und/oder ein Kanalblocker mit geringerer Interaktion als TRAM-34 ratsam. Generell könnten andere Fluoreszenzindikatoren für $\Delta\Psi_m$ getestet werden, oder Potenziale und Ionenströme unmittelbar elektrophysiologisch aufgezeichnet werden (*patch clamp*-Technik). Für die Messungen an den ganzen Zellen könnte die Verwendung von mitochondrienspezifischen Kanalinhhibitoren eindeutigere Resultate mit sich bringen.

Darüber hinaus interessierten die innere Mitochondrienmembran und ihr Potenzial dahingehend, als dass sie als die wichtigste ROS-Quelle der Zelle angesehen wird. Daher befasst sich die momentane Arbeit von Herrn Dr. Bulk aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Schwab mit der direkten Bestimmung dieses Sekundärsignals, von dem eine stimulierende Wirkung auf die ICAM-1-Präsentation an der Zelloberfläche bekannt ist.^{58, 59} Erste Ergebnisse von Messungen mit Dihydrorhodamin 123 suggerieren einen ROS-Anstieg unter TRAM-34-Gabe in A549-3R- und in HMEC-1-Zellen, keinen Anstieg unter $K_{Ca}3.1$ -Kanalblockade hingegen in H1299-Krebszellen. Auch dies unterstützt die Thesen, dass erstens mito $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in A549-3R- und in HMEC-1-, nicht jedoch in H1299-Zellen exprimiert werden; und dass zweitens diese mito $K_{Ca}3.1$ -Kanäle über die Regulation von $\Delta\Psi_m$ die ROS-Produktion an der inneren Mitochondrienmembran beeinflussen.

Die Expression funktionaler mito $K_{Ca}3.1$ -Kanäle ist kein alleiniges Merkmal von Malignomzellen. Auch im physiologischen Rahmen spielen sie eine Rolle in der Feinjustierung von mitochondrialem Membranpotenzial, von Mitochondrienvolumen, von Ca^{2+} -Spiegel, von pH-Wert und von mitochondrialem Stoffwechsel inklusive ROS-Produktion. Andererseits konnte für verschiedene Zellen, die den Kanal auf der Plasmamembran exprimieren, das Vorkommen von mito $K_{Ca}3.1$ -Kanälen nicht nachgewiesen werden, beispielsweise in dieser Arbeit für die NSCLC-Zelllinie H1299 oder für die Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und C-26.⁷¹ Diese Ergebnisse sind dabei vor dem Hintergrund zu betrachten, dass die Genexpression ein wandelbares und von vielen externen wie internen Faktoren bestimmtes Programm ist. Mito $K_{Ca}3.1$ -Kanäle sind daher nicht obligatorisch für funktionale Mitochondrien, ihre Aufgaben könnten in anderen Zellen also von anderen Kanalproteinen übernommen werden, z. B. von einem oder mehreren der anderen K_{Ca} -Kanäle. Weiterhin ist bei allen Gemeinsamkeiten der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in der Plasmamembran und in den Mitochondrien auch der unterschiedliche Effekt auf die jeweiligen Membranpotenziale zu beachten. In der Plasmamembran bewirkt ein geöffneter Kanal einen dem elektrochemischen Gradienten

folgenden Ausstrom von K^+ -Ionen, woraufhin das Plasmamembranpotenzial hyperpolarisiert. In den Mitochondrien verursacht die Kanalöffnung hingegen einen K^+ -Einstrom, der mit einer $\Delta\Psi_m$ -Depolarisation einhergeht. Dabei sind diese beiden Mechanismen keineswegs disjunkt. Die Aktivität oder auch die Manipulation der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in der Plasmamembran wirkt sich auch auf die $mitoK_{Ca}3.1$ -Kanäle aus. Die Kanäle an der Zelloberfläche beeinflussen durch Änderung des intrazellulären Wasser-, des K^+ - und insbesondere des Ca^{2+} -Haushalts (s. 1.ii) auch die Mitochondrien mitsamt deren Homöostase und deren Kanälen. Über die Expression von $K_{Ca}3.1$ -Kanälen in Mitochondrien anderer Zelltypen oder in anderen Zellorganellen ist jedoch insgesamt wenig bekannt, sodass dies weiterhin Gegenstand der Grundlagenforschung bleibt.

Die Wechselwirkungen von mitochondrialen K^+ -Strömen, von $\Delta\Psi_m$ und von reaktiven Sauerstoffspezies sowie deren Konsequenzen für Zellüberleben oder -absterben sind komplex, besonders in entarteten Zellen. Krebszellen zeichnen sich durch ihre hohe ROS-Toleranz und ihre Fähigkeiten, der Apoptose zu entgehen, aus. So erweist sich der $mitoK_{Ca}3.1$ -Kanal als ungestört funktional unter Bax-Gabe, während beispielsweise der spannungsabhängige $mitoK_V1.3$ -Kanal durch dieses pro-apoptotische Protein inhibiert wird.⁷¹ Diese Eigenschaft könnte somit ein Teil der Erklärung sein, weswegen der $K_{Ca}3.1$ -Kanal in so vielen Malignomen überexprimiert ist (s. Tabelle 14). Die zytoprotektiven Eigenschaften von mitochondrialen Kaliumkanälen lassen sich besonders am $mitoK_{ATP}$ -Kanal veranschaulichen. Dieser Adenosintriphosphat-modulierte Kaliumkanal wird durch ATP inhibiert, durch ROS hingegen geöffnet.¹¹⁸ Kommt es im Rahmen von oxidativem Stress zu einer Akkumulation der reaktiven Sauerstoffspezies und zu einer Abnahme von ATP, wird der $mitoK_{ATP}$ -Kanal sowohl direkt aktiviert als auch disinhibiert. Die mit dem K^+ -Influx einhergehende Depolarisation von $\Delta\Psi_m$ wirkt im Sinne einer negativen Rückkopplung dann abschwächend auf die ROS-Produktion. Insofern könnten mitochondriale Kaliumkanäle generell bzw. der hier thematisierte $mitoK_{Ca}3.1$ -Kanal speziell attenuierend auf die malignomtypischen und eventuell zytotoxischen ROS-Konzentrationen wirken, was wiederum einen Selektionsvorteil für die den $K_{Ca}3.1$ -Kanal überexprimierenden Krebszellen bedeuten würde. Andersherum konnte in mit dem Proteinkinaseinhibitor Vemurafenib behandelten Melanomzellen aufgezeigt werden, dass durch den $K_{Ca}3.1$ -spezifischen Kanalblocker TRAM-34 die ROS-Synthese und damit auch die Apoptoserate potenziert wird.¹¹⁹ Unterm Strich gilt auch hier der Ausspruch von Paracelsus, dass allein die Dosis das Gift ausmacht. Während z. B. die organellspezifische Inhibition des spannungsgesteuerten $mitoK_V1.3$ -Kanals in höheren Konzentrationen Apoptose induzierend auf Pankreaskarzinomzellen wirkt, geht die Applikation niedrigerer Dosen dieser Inhibitoren

mit einem milderen, subletalen ROS-Anstieg einher, der den exakt gegenteiligen Effekt hat: eine Zellzyklusprogression.¹¹⁷

Diese Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen erfolgt mit dem Blick auf potenzielle Anwendungen in der Klinik. Wie in der Einleitung beschrieben (s. 1.i), ist für Lungenkrebs bislang eine für kurative Ansätze zu späte Diagnose typisch. Es bleiben die Entwicklungen bezüglich der Früherkennungsuntersuchungen abzuwarten. Da die Sekundärprävention überwiegend an Gesunden stattfindet, gelten natürlich hohe Sicherheitsansprüche. Auch die von den gesetzlichen Krankenkassen angebotenen Vorsorgeuntersuchungen sind in ihrer exakten Ausgestaltung diskutiert. Es müssen die Faktoren Zielpopulation, Frequenz, Mortalität, Lebensqualität, Sensitivität, falsch-positive Resultate, Schäden durch die Untersuchung selbst, Inanspruchnahme durch die Berechtigten und nicht zuletzt auch Kosten austariert werden.

In naher Zukunft kann jedoch der Therapiestart eventuell deutlich früher im Krankheitsgeschehen einsetzen und der Streuung von – vielleicht bereits in der Zirkulation befindlichen – Tumorzellen zuvorgekommen werden. Auch wenn der Hintergrund dieser Arbeit das (hämatogene) Metastasierungsverhalten des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms ist, verspricht der $K_{Ca}3.1$ -Kanal als pharmakologisches Ziel noch weitere Effekte in vielen anderen Tumorentitäten und auf diverse Malignitätskriterien.

Neben der Rolle der $K_{Ca}3.1$ -Kanäle in der hämatogenen Metastasierung vom NSCLC vermerkten Bulk et al. auch eine Reduktion der malignomcharakteristischen Migration und Proliferation.⁵⁶ Für A549-3R-Lungenkarzinomzellen konnte TRAM-34 die Translokation um 33 % verringern. Zudem wurde der Einfluss von Senicapoc auf ein Tumor-Xenograft *in vivo* evaluiert: sowohl Größe als auch Proliferation, gemessen anhand der Aufnahme des Basenanalogs ^{18}F -FLT (isotopenmarkiertes Fluorothymidin) in der Positronenemissionstomographie, wurden signifikant vermindert.

Nach den Erkenntnissen zur Rolle des Kanals in der Proliferation konnte für viele ihn exprimierende Karzinome eine Wachstumshemmung durch Kanalblockade beobachtet werden. Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Ergebnisse zum $K_{Ca3.1}$ -Kanal in den verschiedensten Krebsentitäten.

Malignom	Erkenntnisse bezüglich des $K_{Ca3.1}$-Kanals
Prostatakarzinom	Proliferationshemmung durch Kanalinhhibition ¹²⁰
Melanom	Proliferationshemmung und $\Delta\Psi_m$ -Hyperpolarisation durch Kanalinhhibition ⁷³
Glioblastom	Korrelation zwischen $K_{Ca3.1}$ -Expression und Letalität; Migrations- und Invasionshemmung durch Kanalinhhibition ¹²¹
klarzelliges Nierenzellkarzinom	Korrelation zwischen $K_{Ca3.1}$ -Expression und Metastasierung sowie Letalität; Proliferationshemmung durch Kanalinhhibition; starke $K_{Ca3.1}$ -Expression in den Tumorgefäßen ¹²²
hepatozelluläres Karzinom	Proliferations- und Migrationshemmung durch Kanalinhhibition ¹²³ ; Hemmung von Invasion, Metastasierung und epithelial-mesenchymaler Transition ¹²⁴
Endometriumkarzinom	Proliferations-, Migrations- und Invasionshemmung durch Kanalinhhibition ¹²⁵
Mammakarzinom	Korrelation zwischen $K_{Ca3.1}$ -Expression und Prognose ¹²⁶ ; Hemmung von Proliferation, Migration und epithelial-mesenchymaler Transition ¹²⁷
Angiosarkom	Proliferations- und Invasionshemmung durch Kanalinhhibition ¹²⁸
pankreatisches duktales Adenokarzinom	erhöhte $K_{Ca3.1}$ -Expression, Korrelation zu TNM-Stadium und Letalität ¹²⁹ ; Proliferations- und Migrationshemmung durch Kanalinhhibition ¹³⁰
Ovarialkarzinom	Proliferationshemmung durch Kanalinhhibition ¹³¹
kolorektales Karzinom	Überwindung der Cisplatin-Resistenz durch Kanalaktivierung ¹³²

Tabelle 14: Übersicht über die Rolle des $K_{Ca3.1}$ -Kanals in der Tumorprogression

Die epithelial-mesenchymale Transition ist für Karzinome, also Malignome epithelialen Ursprungs, ein entscheidender Schritt in der Tumorprogression. Mit zunehmender Entdifferenzierung steigt die Fähigkeit der lokalen Ausbreitung inklusive Durchbrechung der Basalmembran und Intravasation.

Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal spielt für viele physiologische und entartete Zellen eine Rolle in der Migration und in der Proliferation, im Lungenkrebs auch für die Extravasation. Immer neue Erkenntnisse über Ionenkanäle in Malignomen werfen die Frage auf, inwiefern Krebs zu den

klassischen Kanalopathien^{xx} (wie Rhythmusstörungen, Mukoviszidose etc.) gezählt werden kann.¹³³ Die Forschung zum *KCNN4*-Gen belegt nicht eine Karzinogenese selbst im engeren Sinne, aber sicherlich eine Zunahme der Malignität (Wachstum, Invasion, Metastasierung) durch Dysregulation. Damit wird den Eigenschaften, die Krebs so therapieresistent und letal werden lassen, der Weg geebnet. Die Amplifikation des Kanals beruht auf epigenetischer Disinhibition. Erfolgt eine kanzerogene Protein-Überexpression aufgrund von genetischer Mutation, wird für das entsprechende physiologische Gen das Attribut „Protoonkogen“ (s. 1.i) vergeben. Ohne eine Änderung im Erbgut ist diese Bezeichnung für das *KCNN4*-Gen so zwar nicht zulässig, jedoch führen die beiden Formen – epigenetische und genetische Dysregulation – funktional zu einer Überexpression von Proteinen, die die Tumorprogression unterstützen.

Allein als Prognosemarker hat die $K_{Ca}3.1$ -Expression ihren Wert, doch das Ziel bleibt eine spezifische Therapie. Senicapoc beispielsweise ist bereits klinisch erprobt. Dabei konnten im Rahmen einer randomisierten, kontrollierten und doppelt verblindeten Studie die Patient*innensicherheit und die Effektivität der (erythrozytären) $K_{Ca}3.1$ -Inhibition unter oraler Applikation aufgezeigt werden.¹³⁴ Im Gegensatz zum strukturverwandten Clotrimazol blockt TRAM-34 nicht das Cytochrom P450, und erwies sich *in vitro* und im Kurzzeitexperiment an Nagern nicht als toxisch.⁴⁹ In *KCNN4*-Knockout-Mäusen, also der Maximalvariante der $K_{Ca}3.1$ -Kanalinhibition, wurden keine schwerwiegenden Entwicklungsstörungen beobachtet.¹³⁵ Die Tiere waren in beiden Geschlechtern unauffällig hinsichtlich Körpermasse und Fertilität, zeigten jedoch Defizite in der Volumenregulation von Erythrozyten und von T-Zellen.

Therapieansätze auf Nukleinsäuren-Ebene sind vergleichsweise jung, eine lokale Applikation ins Tumorumfeld innerhalb der nächsten Jahre jedoch durchaus im Bereich des Möglichen. Dabei gilt es nicht zuletzt aus ethischen Gründen streng zwischen Eingriffen in die Keimbahn, in das Erbgut multipotenter oder postmitotischer Zellen, und in das mRNA-Signal zu differenzieren.

^{xx} Die Erkrankungen von Ionenkanälen können selbst wiederum nach ihrer Ätiologie differenziert werden: genetisch, autoimmun, toxisch oder eben transkriptionell.

6) Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazolinon
5JÜ	5-Jahres-Überlebensrate
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
(ds)DNA	(Doppelstrang-)Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
FLT	Fluorothymidin
FWHM	<i>full width at half maximum</i> ; Halbwertsbreite
H _{0x}	Nullhypothese x
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney</i> -Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMEC-1	<i>human dermal microvascular endothelial cells</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IgG	Immunglobulin G
INN	<i>international nonproprietary name</i> , internationaler Freiname
K _{ATP}	Adenosintriphosphat-modulierter Kaliumkanal
K _{Ca} 1.1 und K _{Ca} 3.1	kalziumaktivierter Kaliumkanal 1.1 und 3.1
KCl	Kaliumchlorid

K _d	Dissoziationskonstante
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
K _v 1.3	spannungsgesteuerter Kaliumkanal 1.3
MCDB Medium	<i>Molecular, Cellular, and Developmental Biology Medium</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mitoK _{Ca} 3.1	mitochondrialer kalziumaktivierter Kaliumkanal 3.1
MMP	Matrixmetalloprotease
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NDPK-B	Nukleosiddiphosphatkinase B
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i>
O ₂ ⁻	Superoxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RESOLFT	<i>reversible saturable optical linear fluorescence transitions</i>
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitationsassaypuffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SCFS	<i>single cell force spectroscopy</i>
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMRM	Tetramethylrhodamin-methylester
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TNM	Tumor, Nodi lymphoidei, Metastasen
TRAM-34	1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität Münster
ZNS	Ziegennormalserum
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotenzial

Tabelle 15: Alphabetische Liste der Abkürzungen

7) Dankeswort

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Albrecht Schwab, Herrn Dr. Etmar Bulk, Herrn Dr. Zoltan Pethö, Frau Dr. Karolina Najder-Nalepa, Frau Sarah Sargin, Frau Sandra Schimmelpfennig, B.Sc. und auch ohne namentliche Einzelnennung den vielen anderen Mitarbeitenden und Promovierenden des Instituts für Physiologie II für wissenschaftliche Beratung, herausragende Betreuung und verschiedenste andere Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit. Als wertvoll stellte sich auch die Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie heraus, personifiziert durch dessen Doktorandin Frau Kathrin Brömmel.

Auch das großzügige Bereitstellen von Rhodamin 123 durch Frau Prof. Dr. Martina Düfer von der Pharmazeutischen und Medizinischen Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität und von Senicapoc und TRAM-34 durch Frau Prof. Dr. Heike Wulff von der Pharmakologie der University of California Davis School of Medicine soll hier Erwähnung finden.

Zugleich gilt mein Dank dem Medizinerkolleg der Medizinischen Fakultät, dessen Stipendienprogramm einen bedeutenden ideellen wie finanziellen Beitrag leisten konnte.

Zuletzt stellte auch die statistische Beratung durch Herrn Dr. Rene Schmidt vom Institut für Biometrie und Klinische Forschung und durch Frau Lena Kegel, M.Sc. vom Institut für Psychologie eine wichtige Hilfe dar.

8) Lebenslauf

9) Literaturverzeichnis

¹www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html

Herausgegeben vom Statistischen Bundesamt. *Download* am 25.11.2019.

²www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe2_form.html

Krebs in Deutschland. Herausgegeben vom Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. *Download* am 25.11.2019.

³www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c3_3_c34_lunge.pdf?__blob=publicationFile

Krebs in Deutschland. Herausgegeben vom Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. *Download* am 25.11.2019.

⁴ Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394-424.

⁵ Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, Hartge P, Gapstur SM. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Engl J Med* 2013;368(4):351-364.

⁶ Pirie K, Peto R, Reeves GK, Green J, Beral V, Million Women Study Collaborators. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. *Lancet* 2013;381(9861):133-141.

⁷ Benbrahim-Tallaa L, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Loomis D, Straif K, International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. *Lancet Oncol* 2012;13(7):663-664.

⁸ Van der Heyden JH, Schaap MM, Kunst AE, Esnaola S, Borrell C, Cox B, Leinsalu M, Stirbu I, Kalediene R, Deboosere P, Mackenbach JP, van Oyen H. Socioeconomic inequalities in lung cancer mortality in 16 European populations. *Lung Cancer* 2009;63(3):322-330.

⁹ Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, Li J, Chen Q. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* 2010;69(3):272-278.

¹⁰ Ding L, Getz G, Wheeler DA et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008;455(7216):1069-1075.

¹¹ Xie D, Lan L, Huang K, Chen L, Xu C, Wang R, Shi Y, Wu X, Wang L, Liu Y, Lu B. Association of p53/p21 expression and cigarette smoking with tumor progression and poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep* 2014;32(6):2517-2526.

¹² Spiro SG, Gould MK, Colice GL, American College of Chest Physicians. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132(3):149S-160S.

-
- ¹³ Riihimaki M, Hemminki A, Fallah M, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist J, Hemminki K. Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer* 2014;86(1):78-84.
- ¹⁴ Eberle A, Jansen L, Castro F, Krilaviciute A, Luttmann S, Emrich K, Holleczeck B, Nennecke A, Katalinic A, Brenner H, GEKID Survival Working Group. Lung cancer survival in Germany: a population-based analysis of 132,612 lung cancer patients. *Lung Cancer* 2015;90(3):528-533.
- ¹⁵ Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The eighth edition lung cancer stage classification. *Chest* 2017;151(1):193-203.
- ¹⁶ Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, Mok TS, Reck M, Van Schil PE, Hellmann MD, Peters S, ESMO Guidelines Committee. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29(4):iv192-iv237.
- ¹⁷ National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Berg CD, Black WC, Church TR, Fagerstrom RM, Galen B, Gareen IF, Gatsonis C, Goldin J, Gohagan JK, Hillman B, Jaffe C, Kramer BS, Lynch D, Marcus PM, Schnall M, Sullivan DC, Sullivan D, Zylak CJ. The National Lung Screening Trial: overview and study design. *Radiology* 2011;258(1):243-253.
- ¹⁸ National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med* 2011;365(5):395-409.
- ¹⁹ Aberle DR, DeMello S, Berg CD, Black WC, Brewer B, Church TR, Clingan KL, Duan F, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis CA, Gierada DS, Jain A, Jones GC, Mahon I, Marcus PM, Rathmell JM, Sicks J, National Lung Screening Trial Research Team. Results of the two incidence screenings in the National Lung Screening Trial. *N Engl J Med* 2013;369(10):920-931.
- ²⁰ Wille MM, Dirksen A, Ashraf H, Saghir Z, Bach KS, Brodersen J, Clementsen PF, Hansen H, Larsen KR, Mortensen J, Rasmussen JF, Seersholm N, Skov BG, Thomsen LH, Tonnesen P, Pedersen JH. Results of the Randomized Danish Lung Cancer Screening Trial with focus on high-risk profiling. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193(5):542-551.
- ²¹ Wang Z, Han W, Zhang W, Xue F, Wang Y, Hu Y, Wang L, Zhou C, Huang Y, Zhao S, Song W, Sui X, Shi R, Jiang J. Mortality outcomes of low-dose computed tomography screening for lung cancer in urban China: a decision analysis and implications for practice. *Chin J Cancer* 2017;36(1):57.
- ²² Nawa T, Fukui K, Nakayama T, Sagawa M, Nakagawa T, Ichimura H, Mizoue T. A population-based cohort study to evaluate the effectiveness of lung cancer screening using low-dose CT in Hitachi city, Japan. *Jpn J Clin Oncol* 2019;49(2):130-136.
- ²³ Horeweg N, van der Aalst CM, Vliegenthart R, Zhao Y, Xie X, Scholten ET, Mali W, Thunnissen E, Weenink C, Groen HJ, Lammers JW, Nackaerts K, van Rosmalen J, Oudkerk M, de Koning HJ. Volumetric computed tomography screening for lung cancer: three rounds of the NELSON trial. *Eur Respir J* 2013;42(6):1659-1667.
- ²⁴ Walter JE, Heuvelmans MA, Ten Haaf K, Vliegenthart R, van der Aalst CM, Yousaf-Khan U, van Ooijen PMA, Nackaerts K, Groen HJM, De Bock GH, de Koning HJ, Oudkerk M. Persisting new nodules in incidence rounds of the NELSON CT lung cancer screening study. *Thorax* 2019;74(3):247-253.
- ²⁵ Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1958;30(3):653-654.
- ²⁶ Hanley PJ, Musset B, Renigunta V, Limberg SH, Dalpke AH, Sus R, Heeg KM, Preisig-Muller R, Daut J. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(25):9479-9484.

-
- ²⁷ Varnai P, Demaurex N, Jaconi M, Schlegel W, Lew DP, Krause KH. Highly co-operative Ca^{2+} activation of intermediate-conductance K^+ channels in granulocytes from a human cell line. *J Physiol* 1993;472:373-390.
- ²⁸ Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, Aiyar J. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 1997;272(52):32723-32726.
- ²⁹ Wright JR, Amisten S, Goodall AH, Mahaut-Smith MP. Transcriptomic analysis of the ion channelome of human platelets and megakaryocytic cell lines. *Thromb Haemost* 2016;116(2):272-284.
- ³⁰ Mahaut-Smith MP. Calcium-activated potassium channels in human platelets. *J Physiol* 1995;484(1):15-24.
- ³¹ Pena TL, Rane SG. The fibroblast intermediate conductance K_{Ca} channel, FIK, as a prototype for the cell growth regulatory function of the IK channel family. *J Membr Biol* 1999;172(3):249-257.
- ³² Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in vascular smooth muscle: relationship between K_{Ca} channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ Res* 1999;85(9):e33-43.
- ³³ Kohler R, Degenhardt C, Kuhn M, Runkel N, Paul M, Hoyer J. Expression and function of endothelial Ca^{2+} -activated K^+ channels in human mesenteric artery: a single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ Res* 2000;87(6):496-503.
- ³⁴ Chen MX, Gorman SA, Benson B, Singh K, Hieble JP, Michel MC, Tate SN, Trezise DJ. Small and intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369(6):602-615.
- ³⁵ Turner RW, Kruskic M, Teves M, Scheidl-Yee T, Hameed S, Zamponi GW. Neuronal expression of the intermediate conductance calcium-activated potassium channel $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ in the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 2015;467(2):311-328.
- ³⁶ Furness JB, Kearney K, Robbins HL, Hunne B, Selmer IS, Neylon CB, Chen MX, Tjandra JJ. Intermediate conductance potassium (IK) channels occur in human enteric neurons. *Auton Neurosci* 2004;112(1-2):93-97.
- ³⁷ Nguyen HM, Grossinger EM, Horiuchi M, Davis KW, Jin LW, Maezawa I, Wulff H. Differential $\text{K}_{\text{v}1.3}$, $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, and $\text{K}_{\text{ir}2.1}$ expression in "classically" and "alternatively" activated microglia. *Glia* 2017;65(1):106-121.
- ³⁸ Christophersen P. Ca^{2+} -activated K^+ channel from human erythrocyte membranes: single channel rectification and selectivity. *J Membr Biol* 1991;119(1):75-83.
- ³⁹ Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(21):11651-11656.
- ⁴⁰ Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, Kaczmarek LK. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(20):11013-11018.
- ⁴¹ Ghanshani S, Coleman M, Gustavsson P, Wu AC, Gargus JJ, Gutman GA, Dahl N, Mohrenweiser H, Chandy KG. Human calcium-activated potassium channel gene KCNN4 maps to chromosome 19q13.2 in the region deleted in diamond-blackfan anemia. *Genomics* 1998;51(1):160-161.
- ⁴² Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002;417(6888):523-526.

-
- ⁴³ Lee CH, MacKinnon R. Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures. *Science* 2018;360(6388):508-513.
- ⁴⁴ Wulf A, Schwab A. Regulation of a calcium-sensitive K⁺ channel (cIK1) by protein kinase C. *J Membr Biol* 2002;187(1):71-79.
- ⁴⁵ Srivastava S, Li Z, Ko K, Choudhury P, Albaqumi M, Johnson AK, Yan Y, Backer JM, Unutmaz D, Coetzee WA, Skolnik EY. Histidine phosphorylation of the potassium channel K_{Ca}3.1 by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of K_{Ca}3.1 and CD4 T cells. *Mol Cell* 2006;24(5):665-675.
- ⁴⁶ Pena TL, Chen SH, Konieczny SF, Rane SG. Ras/MEK/ERK up-regulation of the fibroblast K_{Ca} channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- β suppression of myogenesis. *J Biol Chem* 2000;275(18):13677-13682.
- ⁴⁷ Wulff H, Kolski-Andreaco A, Sankaranarayanan A, Sabatier JM, Shakkottai V. Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Curr Med Chem* 2007;14(13):1437-1457.
- ⁴⁸ De Marchi U, Sassi N, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabo I, Zoratti M. Intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channel (K_{Ca}3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium* 2009;45(5):509-516.
- ⁴⁹ Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IK_{Ca}1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):8151-8156.
- ⁵⁰ Stocker JW, De Franceschi L, McNaughton-Smith GA, Corrocher R, Beuzard Y, Brugnara C. ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice. *Blood* 2003;101(6):2412-2418.
- ⁵¹ Jensen BS, Strobaek D, Christophersen P, Jorgensen TD, Hansen C, Silahtaroglu A, Olesen SP, Ahring PK. Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am J Physiol* 1998;275(3):C848-C856.
- ⁵² Devor DC, Singh AK, Frizzell RA, Bridges RJ. Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel. *Am J Physiol* 1996;271(5):L775-784.
- ⁵³ Nguyen HM, Singh V, Pressly B, Jenkins DP, Wulff H, Yarov-Yarovoy V. Structural insights into the atomistic mechanisms of action of small molecule inhibitors targeting the K_{Ca}3.1 channel pore. *Mol Pharmacol* 2017;91(4):392-402.
- ⁵⁴ Brown BM, Shim H, Zhang M, Yarov-Yarovoy V, Wulff H. Structural determinants for the selectivity of the positive K_{Ca}3.1 gating modulator 5-Methylnaphtho[2,1-d]oxazol-2-amine (SKA-121). *Mol Pharmacol* 2017;92(4):469-480.
- ⁵⁵ Biasiotta A, D'Arcangelo D, Passarelli F, Nicodemi EM, Facchiano A. Ion channels expression and function are strongly modified in solid tumors and vascular malformations. *J Transl Med* 2016;14(1):285.
- ⁵⁶ Bulk E, Ay AS, Hammadi M, Ouadid-Ahidouch H, Schelhaas S, Hascher A, Rohde C, Thoennissen NH, Wiewrodt R, Schmidt E, Marra A, Hillejan L, Jacobs AH, Klein HU, Dugas M, Berdel WE, Muller-Tidow C, Schwab A. Epigenetic dysregulation of K_{Ca}3.1 channels induces poor prognosis in lung cancer. *Int J Cancer* 2015;137(6):1306-1317.

-
- ⁵⁷ Bulk E, Kramko N, Liashkovich I, Glaser F, Schillers H, Schnittler HJ, Oberleithner H, Schwab A. K_{Ca}3.1 channel inhibition leads to an ICAM-1 dependent increase of cell-cell adhesion between A549 lung cancer and HMEC-1 endothelial cells. *Oncotarget* 2017;8(68):112268-112282.
- ⁵⁸ Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol* 1993;264(4):L406-412.
- ⁵⁹ Fontani F, Domazetovic V, Marcucci T, Vincenzini MT, Iantomasi T. Tumor necrosis factor- α up-regulates ICAM-1 expression and release in intestinal myofibroblasts by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Biochem* 2016;117(2):370-381.
- ⁶⁰ Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GR, Chandel NS. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(19):8788-8793.
- ⁶¹ Ren T, Zhang H, Wang J, Zhu J, Jin M, Wu Y, Guo X, Ji L, Huang Q, Zhang H, Yang H, Xing J. MCU-dependent mitochondrial Ca²⁺ inhibits NAD⁺/SIRT3/SOD2 pathway to promote ROS production and metastasis of HCC cells. *Oncogene* 2017;36(42):5897-5909.
- ⁶² Cheng G, Lanza-Jacoby S. Metformin decreases growth of pancreatic cancer cells by decreasing reactive oxygen species: role of NOX4. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;465(1):41-46.
- ⁶³ Tang ZH, Cao WX, Su MX, Chen X, Lu JJ. Osimertinib induces autophagy and apoptosis via reactive oxygen species generation in non-small cell lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017;321:18-26.
- ⁶⁴ Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health* 2009;6(2):445-462.
- ⁶⁵ Tagawa Y, Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Okamura M, Yao J, Kitamura M. Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP). *Free Radic Biol Med* 2008;45(1):50-59.
- ⁶⁶ St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002;277(47):44784-44790.
- ⁶⁷ Gerencser AA, Chinopoulos C, Birket MJ, Jastroch M, Vitelli C, Nicholls DG, Brand MD. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J Physiol* 2012;590(12):2845-2871.
- ⁶⁸ Kaim G, Dimroth P. ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage. *EMBO J* 1999;18(15):4118-4127.
- ⁶⁹ Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997;416(1):15-18.
- ⁷⁰ Starkov AA, Fiskum G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem* 2003;86(5):1101-1107.
- ⁷¹ Sassi N, De Marchi U, Fioretti B, Biasutto L, Gulbins E, Franciolini F, Szabo I, Zoratti M. An investigation of the occurrence and properties of the mitochondrial intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel mtK_{Ca}3.1. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797(6-7):1260-1267.
- ⁷² Kovalenko I, Glasauer A, Schockel L, Sauter DR, Ehrmann A, Sohler F, Hagebarth A, Novak I, Christian S. Identification of K_{Ca}3.1 channel as a novel regulator of oxidative phosphorylation in a subset of pancreatic carcinoma cell lines. *PLoS One* 2016;11(8):e0160658.

-
- ⁷³ Quast SA, Berger A, Buttstadt N, Friebel K, Schonherr R, Eberle J. General sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC. *PLoS One* 2012;7(6):e39290.
- ⁷⁴ Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51(5):1417-1423.
- ⁷⁵ Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 1976;17(1):62-70.
- ⁷⁶ Hascher A, Haase AK, Hebestreit K, Rohde C, Klein HU, Rius M, Jungen D, Witten A, Stoll M, Schulze I, Ogawa S, Wiewrodt R, Tickenbrock L, Berdel WE, Dugas M, Thoennissen NH, Muller-Tidow C. DNA methyltransferase inhibition reverses epigenetically embedded phenotypes in lung cancer preferentially affecting polycomb target genes. *Clin Cancer Res* 2014;20(4):814-826.
- ⁷⁷ Phelps RM, Johnson BE, Ihde DC, Gazdar AF, Carbone DP, McClintock PR, Linnoila RI, Matthews MJ, Bunn PA Jr, Carney D, Minna JD, Mulshine JL. NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base. *J Cell Biochem Suppl* 1996;24:32-91.
- ⁷⁸ Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1974;60(3):673-684.
- ⁷⁹ Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992;99(6):683-690.
- ⁸⁰ Katakura Y, Alam S, Shirahata S. Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol* 1998;57:69-91.
- ⁸¹ Li D, Peng SY, Zhang ZW, Feng RC, Li L, Liang J, Tai S, Teng CB. Complete disassociation of adult pancreas into viable single cells through cold trypsin-EDTA digestion. *J Zhejiang Univ Sci B* 2013;14(7):596-603.
- ⁸² Graham-Pole J, Davie M, Willoughby ML. Cryopreservation of human granulocytes in liquid nitrogen. *J Clin Pathol* 1977;30(8):758-762.
- ⁸³ Azimzadeh P, Asadzadeh Aghdaei H, Tarban P, Akhondi MM, Shirazi A, Khorram Khorshid HR. Comparison of three methods for mitochondria isolation from the human liver cell line (HepG2). *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016;9(2):105-113.
- ⁸⁴ Hartwig S, Feckler C, Lehr S, Wallbrecht K, Wolgast H, Muller-Wieland D, Kotzka J. A critical comparison between two classical and a kit-based method for mitochondria isolation. *Proteomics* 2009;9(11):3209-3214.
- ⁸⁵ Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(9):4350-4354
- ⁸⁶ Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999;144(5):903-914.
- ⁸⁷ Olson BJ, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci* 2007;48(1):3.4.1-3.4.29.
- ⁸⁸ Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 1950;91(1):1-13.

-
- ⁸⁹ Balkwill F, Osborne R, Burke F, Naylor S, Talbot D, Durbin H, Tavernier J, Fiers W. Evidence for tumour necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet* 1987;2(8570):1229-1232.
- ⁹⁰ Song XY, Zhou SJ, Xiao N, Li YS, Zhen DZ, Su CY, Liu ZD. Research on the relationship between serum levels of inflammatory cytokines and non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(8):4765-4768.
- ⁹¹ Scaduto RC Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 1999;76(1):469-477.
- ⁹² Jamur MC, Oliver C. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol* 2010;588:63-66.
- ⁹³ Miozzari GF, Niederberger P, Hutter R. Permeabilization of microorganisms by Triton X-100. *Anal Biochem* 1978;90(1):220-233.
- ⁹⁴ Burry RW. Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem* 2011;59(1):6-12.
- ⁹⁵ Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 1995;70(5):220-233.
- ⁹⁶ Grunwald D, Shenoy SM, Burke S, Singer RH. Calibrating excitation light fluxes for quantitative light microscopy in cell biology. *Nat Protoc* 2008;3(11):1809-1814.
- ⁹⁷ Wasch DE, Fabian A, Budde T, Schwab A. Dual-color quantum dot detection of a heterotetrameric potassium channel (hK_{Ca}3.1). *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300(4):C843-849.
- ⁹⁸ Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 1986;850(3):436-448.
- ⁹⁹ Bednarczyk P, Koziel A, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A. Large-conductance Ca²⁺-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(11):H1415-1427.
- ¹⁰⁰ Kahlert S, Zundorf G, Reiser G. Detection of de- and hyperpolarization of mitochondria of cultured astrocytes and neurons by the cationic fluorescent dye rhodamine 123. *J Neurosci Methods* 2008;171(1):87-92.
- ¹⁰¹ Brown MR, Sullivan PG, Geddes JW. Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca²⁺ overload than nonsynaptic mitochondria. *J Biol Chem* 2006;281(17):11658-11668.
- ¹⁰² Kastl L, Sauer SW, Ruppert T, Beissbarth T, Becker MS, Suss D, Krammer PH, Gulow K. TNF- α mediates mitochondrial uncoupling and enhances ROS-dependent cell migration via NF- κ B activation in liver cells. *FEBS Lett* 2014;588(1):175-183.
- ¹⁰³ Drabarek B, Dymkowska D, Szczepanowska J, Zablocki K. TNF α affects energy metabolism and stimulates biogenesis of mitochondria in EA.hy926 endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(9):1390-1397.
- ¹⁰⁴ Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc Res* 2002;64(3):384-397.
- ¹⁰⁵ Blomster LV, Strobaek D, Hougaard C, Klein J, Pinborg LH, Mikkelsen JD, Christophersen P. Quantification of the functional expression of the Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}3.1 on microglia from adult human neocortical tissue. *Glia* 2016;64(12):2065-2078.
- ¹⁰⁶ Schwab A, Geibel J, Wang W, Oberleithner H, Giebisch G. Mechanism of activation of K⁺ channels by minoxidil-sulfate in Madin-Darby canine kidney cells. *J Membr Biol* 1993;132(2):125-136.

-
- ¹⁰⁷ Sokolova O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure* 2001;9(3):215-220.
- ¹⁰⁸ Hartmann WK, Saptharishi N, Yang XY, Mitra G, Soman G. Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection. *Anal Biochem* 2004;325(2):227-239.
- ¹⁰⁹ Sharma R, Singh M, Sharma R. Recent advances in STED and RESOLFT super-resolution imaging techniques. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2019:117715.
- ¹¹⁰ Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997;272(1):217-221.
- ¹¹¹ Wawrzekiewicz-Jalowiecka A, Trybek P, Machura L, Dworakowska B, Grzywna ZJ. Mechanosensitivity of the BK channels in human glioblastoma cells: kinetics and dynamical complexity. *J Membr Biol* 2018;251(5-6):667-679.
- ¹¹² Walewska A, Kulawiak B, Szewczyk A, Koprowski P. Mechanosensitivity of mitochondrial large-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2018;1859(9):797-805.
- ¹¹³ Chou HL, Fong Y, Wei CK, Tsai EM, Chen JY, Chang WT, Wu CY, Huang HW, Chiu CC. A quinone-containing compound enhances camptothecin-induced apoptosis of lung cancer through modulating endogenous ROS and ERK signaling. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2017;65(3):241-252.
- ¹¹⁴ Pedarzani P, Mosbacher J, Rivard A, Cingolani LA, Oliver D, Stocker M, Adelman JP, Fakler B. Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Biol Chem* 2001;276(13):9762-9769.
- ¹¹⁵ Sanchez M, McManus OB. Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* 1996;35(7):963-968.
- ¹¹⁶ Zhou Y, Lingle CJ. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J Gen Physiol* 2014;144(5):415-440.
- ¹¹⁷ Peruzzo R, Mattarei A, Romio M, Paradisi C, Zoratti M, Szabo I, Leanza L. Regulation of proliferation by a mitochondrial potassium channel in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Front Oncol* 2017;7:239.
- ¹¹⁸ Fornazari M, de Paula JG, Castilho RF, Kowaltowski AJ. Redox properties of the adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel in brain mitochondria. *J Neurosci Res* 2008;86(7):1548-1556.
- ¹¹⁹ Bauer D, Werth F, Nguyen HA, Kiecker F, Eberle J. 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* 2017;8(2):e2594.
- ¹²⁰ 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, Bonnall JL, Skryma R, Prevarskaya N. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* 2009;28(15):1792-1806.
- ¹²¹ Turner KL, Honasoge A, Robert SM, McFerrin MM, Sontheimer H. A proinvasive role for the Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}3.1 in malignant glioma. *Glia* 2014;62(6):971-981.

-
- ¹²² Rabjerg M, Oliván-Viguera A, Hansen LK, Jensen L, Sevelsted-Møller L, Walter S, Jensen BL, Marcussen N, Kohler R. High expression of $K_{Ca}3.1$ in patients with clear cell renal carcinoma predicts high metastatic risk and poor survival. *PLoS One* 2015;10(4):e0122992.
- ¹²³ Liu Y, Zhao L, Ma W, Cao X, Chen H, Feng D, Liang J, Yin K, Jiang X. The blockage of $K_{Ca}3.1$ channel inhibited proliferation, migration and promoted apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *J Cancer* 2015;6(7):643-651.
- ¹²⁴ Du Y, Song W, Chen J, Chen H, Xuan Z, Zhao L, Chen J, Jin C, Zhou M, Tuo B, Zhao Y, Zheng S, Song P. The potassium channel $K_{Ca}3.1$ promotes cell proliferation by activating SKP2 and metastasis through the EMT pathway in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2019;145(2):503-516.
- ¹²⁵ Zhang Y, Feng Y, Chen L, Zhu J. Effects of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels on human endometrial carcinoma cells. *Cell Biochem Biophys* 2015;72(2):515-525.
- ¹²⁶ Ko JH, Ko EA, Gu W, Lim I, Bang H, Zhou T. Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer. *Mol Cancer* 2013;12(1):106.
- ¹²⁷ Zhang P, Yang X, Yin Q, Yi J, Shen W, Zhao L, Zhu Z, Liu J. Inhibition of SK4 potassium channels suppresses cell proliferation, migration and the epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* 2016;11(4):e0154471.
- ¹²⁸ Chen Y, Kuang D, Zhao X, Chen D, Wang X, Yang Q, Wan J, Zhu Y, Wang Y, Zhang S, Wang Y, Tang Q, Masuzawa M, Wang G, Duan Y. miR-497-5p inhibits cell proliferation and invasion by targeting $K_{Ca}3.1$ in angiosarcoma. *Oncotarget* 2016;7(36):58148-58161.
- ¹²⁹ Jiang S, Zhu L, Yang J, Hu L, Gu J, Xing X, Sun Y, Zhang Z. Integrated expression profiling of potassium channels identifies KCNN4 as a prognostic biomarker of pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;494(1-2):113-119.
- ¹³⁰ Bonito B, Sauter DR, Schwab A, Djamgoz MB, Novak I. $K_{Ca}3.1$ (IK) modulates pancreatic cancer cell migration, invasion and proliferation: anomalous effects on TRAM-34. *Pflugers Arch* 2016;468(11-12):1865-1875.
- ¹³¹ Robles-Martinez L, Garay E, Martel-Gallegos MG, Cisneros-Mejorado A, Perez-Montiel D, Lara A, Arellano RO. $K_{Ca}3.1$ activation via P2y2 purinergic receptors promotes human ovarian cancer cell (Skov-3) migration. *Sci Rep* 2017;7(1):4340.
- ¹³² 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 KG, Becchetti A, Arcangeli A. The combined activation of $K_{Ca}3.1$ and inhibition of $Kv11.1/hERG1$ currents contribute to overcome cisplatin resistance in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2018;118(2):200-212.
- ¹³³ Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol Rev* 2018;98(2):559-621.
- ¹³⁴ Ataga KI, Smith WR, De Castro LM, Swerdlow P, Sauntharajah Y, Castro O, Vichinsky E, Kutlar A, Orringer EP, Rigdon GC, Stocker JW, ICA-17043-05 Investigators. Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood* 2008;111(8):3991-3997.
- ¹³⁵ Begenisich T, Nakamoto T, Ovitt CE, Nehrke K, Brugnara C, Alper SL, Melvin JE. Physiological roles of the intermediate conductance, Ca^{2+} -activated potassium channel KCNN4. *J Biol Chem* 2004;279(46):47681-47687.