

Aus dem Fachbereich Molekulare Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

REGULATION DER KALZIUM HOMÖOSTASE IN IMMUNZELLEN UND
IN ALZHEIMER-MODELL ZELLINIEN

REGULATION OF CALCIUM HOMEOSTASIS IN IMMUNE CELLS AND IN
CELLULAR MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2017

vorgelegt von

ANNA-MARIA MIEDERER

geb. am 17/07/1987 in Nürnberg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Kalzium und Kalziumhomöostase	11
1.2	Speichergesteuerter Kalziumeinstrom (SOCE)	13
1.2.1	Orai Proteine	14
1.2.2	STIM Proteine	16
1.2.3	Funktion von STIM2	20
1.2.4	Die Rolle des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms in Krankheiten	21
1.3	Spannungsgesteuerter Kalziumeinstrom	24
1.3.1	Die Rolle des spannungsgesteuerten Kalziumeinstroms in Krankheiten	26
1.4	Zielsetzung	27
2	Materialien	29
2.1	Antikörper	29
2.1.1	Primärantikörper	29
2.1.2	Sekundärantikörper	29
2.2	Bakterienstämme	30
2.3	Chemikalien	30
2.4	Größenstandards	31
2.5	Laborgeräte	31
2.6	Lösungen	32
2.6.1	Imaging Lösungen	32
2.6.2	SDS-Page (Polyacrylamid Gel Elektrophorese) und Westernblotlösungen	33
2.6.3	sonstige Lösungen	34
2.7	Mikroskope und Filtersets	35
2.7.1	Ca^{2+} -Imaging	35
2.7.2	FRET und Kolokalisationsstudien	35
2.7.3	Konfokale Aufnahmen: Immunzytochemie	35
2.8	Enzyme	36
2.8.1	Modifizierende Enzyme	36
2.8.2	Restriktionsenzyme	36
2.9	Oligonukleotide	36
2.9.1	Klonierungsprimer	36
2.9.2	qRT-PCR Primer	37
2.9.3	siRNA	37
2.10	Kits	37
2.11	Vektoren und Konstrukte	38
2.11.1	Ausgangsvektoren für Klonierungen	38

2.11.2	Verwendete Konstrukte	38
2.12	Verbrauchsmaterialien	39
2.13	Zellkulturmaterialien	39
2.13.1	Medien	39
2.13.2	Transfektionsreagenzien	39
2.13.3	Zellkulturzusätze	40
2.13.4	Zelllinien und Primärzellen	40
3	Methoden	41
3.1	Gentechnische Methoden zur Generierung rekombinanter DNA	41
3.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	41
3.1.2	Kolonie-PCR	42
3.1.3	Restriktionsverdau von DNA	43
3.1.4	Dephosphorylierung von DNA	43
3.1.5	DNA Analyse und gelelektrophoretische Auftrennung	44
3.1.6	Ligation	45
3.1.7	Expression und Isolation heterologer DNA-Konstrukte	46
3.1.8	Klonierte Konstrukte	47
3.2	Arbeiten mit humanen Zellen	48
3.2.1	Zellkultur	48
3.2.2	Quantitative Echtzeit-PCR	49
3.2.3	Transfektion	50
3.2.4	Etablierung stabiler Zelllinien	51
3.3	Proteinbiochemie	52
3.3.1	<i>in vivo</i> Biotinylierung via APEX2	52
3.3.2	SDS-Page und Westernblot	52
3.3.3	Immunzytochemie	55
3.3.4	Massenspektrometrie	56
3.3.5	Immunpräzipitation GFP-markierter Fusionsproteine	60
3.4	Mikroskopie	60
3.4.1	Ca ²⁺ -Imaging mit Fura2-AM	60
3.4.2	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie	63
3.4.3	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	64
3.5	Bildbearbeitung	66
3.6	Statistik	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Spleißvarianten	67
4.1.1	Nachweis der Spleißvarianten	67
4.1.2	Neue Spleißvariante ist nicht in der Lage Orail zu aktivieren	69
4.1.3	STIM2.1 ist kein spezifischer Orail2 Aktivator	70
4.1.4	Spleißspezifische Herunterregulation deckt gegensätzliche Effekte der Spleißvarianten auf	70
4.1.5	Inhibitorischer Effekt von STIM2.1 auf endogenen SOCE in Jurkat T Zellen	73
4.1.6	STIM2.1 wirkt dominant negativ sowohl auf STIM2.2-Orail1 als auch auf STIM1-Orail1 mediierten SOCE	74
4.1.7	STIM2.1 zeigt eine beeinträchtigte Interaktion mit Orail1 trotz sehr guter Kolokalisation	76

4.1.8	Spleißvarianten liegen in gemischten Clustern vor	79
4.1.9	Exon 9 spezifisches IQ-Calmodulin-Bindemotiv ist nicht verantwort- lich für die inhibitorische Wirkung von STIM2.1	80
4.2	Proteomik	82
4.2.1	Klonierung eines STIM2-APEX2-Fusionskonstrukts	82
4.2.2	Biotinylierte Proteine kolokalisieren mit YFP-STIM2	83
4.2.3	Biotinylierung findet nur in Anwesenheit von Biotin-Phenol und H ₂ O ₂ statt	84
4.2.4	Vorbereitung und Analyse der Massenspektrometrie	85
4.2.5	Versuch der Validierung von Profilin 1 als STIM2 Interaktionspartner mittels Ko-Immünpräzipitation	89
4.3	SOCE und Ca _v -Kanäle in Alzheimer Modell-Zelllinien	91
4.3.1	Expressionslevel von APP und Präsenilin 1 beeinflussen SOCE	91
4.3.2	Einfluss von APP und Präsenilin 1 auf die relative Proteinmenge von STIM2 und die relativen mRNA Mengen der SOCE-Gene	92
4.3.3	Differenzierung der SH-SY5Y mit Retinsäure verändert den span- nungs- und speichergesteuerten Kalziumeinstrom	94
4.3.4	Expressionslevel von APP und Präsenilin 1 beeinflussen spannungs- gesteuerten Kalziumeinstrom	95
4.3.5	Expressionslevel von APP und Präsenilin 1 beeinflussen die relative mRNA Menge verschiedener Ca _v -Kanäle	96
4.3.6	Ca _v 3.1 lässt sich nicht mittels schwacher Depolarisation aktivieren	97
4.3.7	Eine Überexpression von APP revidiert den APP-/- spezifischen Phänotyp nicht	98
5	Diskussion	101
5.1	Spleißvarianten	101
5.2	Proteomik-Screen für neue STIM2 Interaktionspartner	109
5.3	Einfluss von APP und Präsenilin 1 auf Kalziumkanäle	112
	Literaturverzeichnis	118
	Abbildungsverzeichnis	135
	Tabellenverzeichnis	137
	Abkürzungsverzeichnis	139

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Regulation von Kalziumsignalen genauer zu untersuchen und neue Gene zu identifizieren und charakterisieren die hierauf Einfluss haben. Ca^{2+} Signale regulieren genau kontrolliert verschiedene zelluläre Prozesse, wie u.a. Proliferation, Effektorfunktionen, Neurotransmitterabgabe oder Muskelkontraktionen. Dabei kann Ca^{2+} u.a. durch verschiedene Liganden-, speicher- oder spannungsgesteuerte Kanäle in die Zelle gelangen.

In dieser Arbeit wurde ein neuer Regulator des speichergesteuerten Kalziumeinstroms (SOCE) identifiziert und charakterisiert. Bei STIM2.1, einer Spleißvariante des Kanal-Aktivators STIM2.2 (vorher STIM2), handelt es sich um eine um acht Aminosäuren längere Variante, die durch Retention und Translation eines zusätzlichen Exons entsteht. Bei dem hierdurch veränderten Bereich handelt es sich um die Kanal-aktivierende Domäne, der Interaktionsdomäne zwischen dem Aktivatorprotein und der Kanaluntereinheit Orai. Diagnostische PCRs und quantitative RT-PCRs zeigten, dass es sich bei STIM2.1 um eine ubiquitär exprimierte Variante handelt, wobei die höchste Expression im Vergleich zur konventionellen Variante STIM2.2 in unstimulierten T Zellen nachgewiesen wurde. Eine spleißspezifische siRNA Herunterregulation in CD4^+ T Zellen enthüllte in Ca^{2+} -Imaging Experimenten den inhibitorischen Effekt der neuen Spleißvariante auf SOCE. Eine heterologe Überexpression der Spleißvarianten zeigte, dass STIM2.1 im Gegensatz zu STIM2.2 nicht in der Lage ist die Kanalkomponenten Orai1 oder Orai2 zu aktivieren. Mit Hilfe von heterologen Koüberexpressionen in HEK-Orai1 stabilen Zelllinien wurde der dominant-negative Effekt von STIM2.1 sowohl auf STIM2.2 als auch auf STIM1 mediierten SOCE, sowie auf den endogenen SOCE in Jurkat T Zellen bestätigt. Anhand von FRET Analysen gelang es die fehlende Aktivierungsfähigkeit von STIM2.1 auf eine stark reduzierte Interaktion zwischen STIM2.1 und Orai1 zurückzuführen.

Des Weiteren wurde mit beiden Spleißvarianten eine SILAC basierte Proteomanalyse zur Identifikation neuer STIM2 Interaktionspartner durchgeführt, um Regulatoren der STIM2 Funktion oder des speichergesteuerten Kalziumeinstroms zu finden. Dafür wurden Fusionskonstrukte aus STIM2.1 bzw. STIM2.2 mit APEX2 kloniert. Bei APEX2 handelt es sich um ein Enzym, das in Anwesenheit von H_2O_2 die Umwandlung von Biotin-Phenol in sein Radikal katalysiert, welches mit sich in der unmittelbaren Nähe befindenden Proteinen reagiert und so zur Biotinylierung dieser Proteine führt. Mittels Ca^{2+} -Imaging, Westernblot

Analyse und Immunzytochemie wurde sowohl die Funktionalität der STIM2-Konstrukte, als auch die lokal begrenzte Funktionalität von APEX2 bestätigt. Eine massenspektrometrische Analyse der biotinylierten Proteine ergab eine Reihe möglicher Hits, darunter je einen spleißspezifischen Hit. Die erfolgreich durchgeführte Proteomanalyse stellt einen guten Ausgangspunkt für eine zukünftige Validierung einiger der gefundenen Proteine als STIM2 Interaktionspartner dar.

Der dritte Teil der Arbeit befasst sich mit neuronalem SOCE und dem spannungsgesteuerten Kalziumeinstrom (VOCE) und dem Einfluss von APP und Präsenilin 1 auf diese beiden. Bei APP und Präsenilin 1 handelt es sich um Proteine, die vor allem im Bezug auf ihre Rolle in der Alzheimer Krankheit untersucht sind. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression und ein Ausschalten von APP, ebenso wie ein Ausschalten von PS1 zu einem verringerten SOCE führt. Zudem erhöht der *knock out* von APP den spannungsgesteuerten Kalziumeinstrom, während die Überexpression von APP695 swedish diesen erniedrigte. qRT-PCR Daten sprechen dafür, dass $Ca_v2.2$ der hierfür verantwortliche Kanal ist. In PS1 *knock out* Zellen, die auch einen drastisch vergrößerten depolarisationsinduzierten Ca^{2+} -Einstrom aufwiesen, konnten erhöhte relative mRNA Mengen von $Ca_v2.2$ und $Ca_v3.1$ gezeigt werden.

Zusammengefasst gelang es in dieser Arbeit neue Regulationsmechanismen der Ca^{2+} -Homöostase und hieran beteiligte Proteine zu identifizieren und charakterisieren. Zusätzlich wurde ein guter Ausgangspunkt für die Identifikation neuer STIM2 Interaktionspartner und somit möglichen weiteren Regulatoren der Ca^{2+} -Homöostase geschaffen.

Summary

Changes in intracellular calcium play an essential role in many signaling pathways. As a second messenger it controls proliferation, differentiation, muscle contraction, neurotransmitter release but also cell death. The spatio-temporal pattern of these signals, restricted and defined in amplitude, kinetics and frequency is crucial to control the outcome on a cellular level. In this work new mechanisms to fine tune calcium signals via different calcium entry mechanisms were identified.

The main calcium entry in non-excitabile cells is store operated calcium entry (SOCE). We found that in addition to the known molecular players, Orai1, Orai2 and Orai3 as the pore forming channel subunits and STIM1 and STIM2 (now STIM2.2) as the channel activator, a STIM2 splice variant, STIM2.1, exists. The new variant is slightly longer (8 aa) due to the retention of an additional exon within the interaction domain of STIM and Orai. The ubiquitous expressed variant is highly conserved within mammals and comparatively equal expression levels in comparison to STIM2.2 were found in naïve CD4⁺ T cells. Ca²⁺ imaging experiments in these cells revealed that STIM2.1 influences calcium entry via Orai in a substantial and unexpected way. Splice specific siRNA knock down experiments proved that, instead of being an activator as its homologues, STIM2.1 influences SOCE in a dominant negative way. Heterologous overexpression of the new splice variant showed that STIM2.1 by itself is not able to active Orai1 and that co-overexpression with its homologues revealed its inhibitory effect on STIM2.2- and STIM1-mediated SOCE. The decreased ability to interact with the channel component Orai1 was shown by FRET experiments.

To further identify regulators of calcium signals, and SOCE more specifically, both STIM2 splice variants were used to perform a SILAC based proteomic screen using mass spectrometry to determine new interaction partners. Thereby APEX2, an engineered ascorbate peroxidase with the ability to initiate biotinylation of nearby proteins in the presence of biotin-phenol and H₂O₂, was cloned into the C-terminal variable region of STIM2.1 and STIM2.2. Western blot analysis and immunocytochemistry were used to confirm the local action of APEX2 and functionality of the assay. Mass spectrometry analysis revealed many potential interaction partners, amongst others one specific prediction for each splice variant. First steps to try to validate two candidates were taken but have to be followed up.

Neuronal SOCE seems to be principally mediated by STIM2 that had been shown to

be downregulated in Alzheimer's disease (AD) and thereby aggravating the disease. Stable AD model cell lines with knock outs of the familiar AD associated genes APP or Presenilin 1 or overexpressing APP were used to identify the influence of these proteins on store operated and voltage gated calcium channels. Whereas effects on SOCE were relatively small striking differences were identified analyzing Ca_v channels. Knockout of APP and PS1 increases voltage operated calcium entry (VOCE) most likely through $Ca_v2.2$ and $Ca_v2.2$ and $Ca_v3.1$ respectively whereas the overexpression of APP695 swedish decreases VOCE in line with a decrease in relative mRNA level of $Ca_v2.2$.

Altogether this work identified and characterized a new modulator of SOCE and shows that APP and PS1, genes related with familiar AD, influence calcium signals by modifying SOCE and VOCE. Furthermore a successful screen to identify new STIM2 interaction partners was performed and sets the foundation to investigate their impact in STIM2 function and calcium signaling.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Kalzium und Kalziumhomöostase

Kalzium (Ca^{2+}) ist das fünfthäufigste Element des menschlichen Körpers [Peacock, 2010]. Es spielt als Kalziumphosphat in kristallisierter Form eine entscheidende Rolle bei der Mineralisierung von Knochen und als Ca^{2+} -Ion als intrazellulärer sekundärer Botenstoff. Sekundäre Botenstoffe dienen der Weiterleitung eines Primärsignals ins Zellinnere und sind von großer Bedeutung in der Zell-Zell-Kommunikation, Muskelkontraktion, neuronalen Reizweiterleitung, sowie der Differenzierung von Zellen. Kalzium, als einer von ihnen, nimmt hierbei eine besondere Rolle ein. Es findet sich ubiquitär, wird nicht hergestellt und kann nicht abgebaut werden. Um als sekundärer Botenstoff dienen zu können ist ein starker Konzentrationsgradient notwendig, so dass eine schnelle Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration möglich ist. Somit ist es besonders wichtig die Kalziumkonzentrationen der verschiedenen Kompartimente streng zu kontrollieren. Dies geschieht über Zellkompartimentierung, Pumpen und Transporter, die die Kalziumhomöostase stetig aufrecht erhalten [Saul et al., 2014]. Zusätzlich haben Ca^{2+} -bindende Proteine die Fähigkeit freies Kalzium im Zytosol zu reduzieren. Ca^{2+} passt in spezifisch geformte Protein-Bindetaschen und der relativ großen Ionenradius im Vergleich zur Ladung reduziert seine Fähigkeit zur Polarisierung drastisch [Carafoli et al., 2001]. Eine intrazellulär niedrige freie Ca^{2+} -Konzentration ist neben dem Aufrechterhalten des Konzentrationsgradienten auch deswegen sinnvoll, da Phosphat, das aus dem Abbau von ATP zu ADP resultiert, zusammen mit Kalzium kristallisieren und ausfallen könnte [Carafoli et al., 2001].

Die zytosolische Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_z$) ist mit ~ 100 nM im Vergleich zum Extrazellulärraum ca. 10.000-fach geringer. Für das konstant niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_z$ sorgen u.a. die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX: $\text{Na}^+ \text{Ca}^{2+}$ exchanger, bzw. $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Ca}^{2+}$ Austauscher in Abhängigkeit vom Zelltyp), die Ca^{2+} aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum pumpen. Während der Antiporter NCX eine relativ geringe Affinität für Kalzium aufweist, ist die PMCA auch bei den niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen ruhender Zellen in der Lage Kalzium entgegen seines Gradienten

nach außen zu pumpen. NCX weist mit einer Transportgeschwindigkeit von 2500 - 5000 Ca^{2+} Ionen pro Sekunde eine hohe Effizienz auf und ist in der Lage hohe $[\text{Ca}^{2+}]_z$ schnell zu reduzieren [Hilgemann et al., 1991]. Zusätzlich sorgt die SERCA (Sarco-/Endoplasmatische Reticulum Calcium ATPase)-Pumpe dafür, dass Ca^{2+} aus dem Zytosol zurück ins ER gelangt und der ständige Verlust geringer Mengen an Kalzium aus dem ER ausgeglichen wird, wodurch die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ konstant gehalten wird. Bei einer Entleerung des ERs, z.B. aufgrund einer Aktivierung des IP_3 -Rezeptors, sorgt die Pumpenaktivität der SERCA dafür, dass das ER wieder aufgefüllt wird und die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ von ~ 500 nM erreicht wird.

Zu einer Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_z$ kann es entweder durch das Öffnen Plasmamembranständiger Kanäle (u.a. durch Orai, NMDA, Ca_v , TRPC) oder durch das Entleeren intrazellulärer Speicher, wie dem ER, kommen. Dabei gibt es unterschiedliche Klassen von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran [Meldolesi and Pozzan, 1987]. Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (Ca_v) reagieren auf eine Depolarisation der Zellen. Rezeptor aktivierte oder Liganden aktivierte Kanäle öffnen nach Binden eines externen Liganden (z.B. NMDA durch Glutamat), während eine dritte Klasse von Ca^{2+} durch einen intrazellulären Kontakt mit einem Molekül oder Protein aktiviert werden (u.a. Orai durch STIM) [Rizzuto et al., 2009].

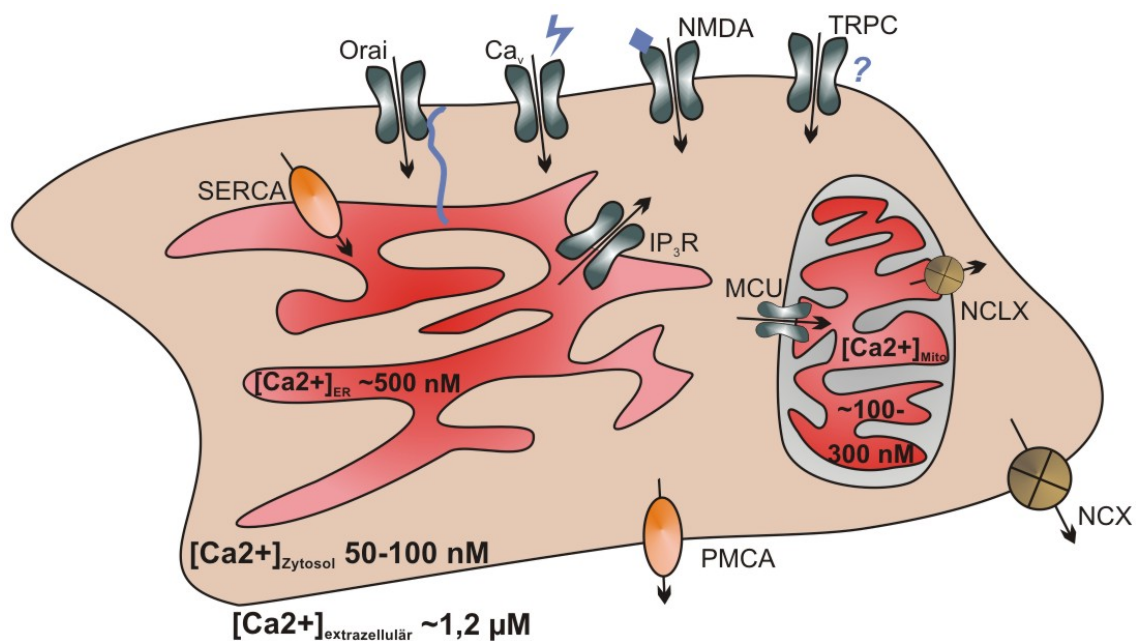


Abbildung 1: Übersicht über Pumpen, Transporter und Kanäle, die an der Kalziumhomöostase beteiligt sind. **Plasmamembran:** Durch verschiedene Liganden-aktivierte (NMDA), spannungsgesteuerte (Ca_v), durch Proteininteraktion-aktivierte (Orai) Kalziumkanäle oder Kanäle mit verschiedenen Aktivierungsmechanismen (TRPC) kann Ca^{2+} über die Plasmamembran in die Zelle gelangen. Die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) oder der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) pumpen Ca^{2+} aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum. **ER:** Durch Aktivierung des IP_3 -Rezeptors kommt es zum Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER. Die SERCA katalysiert den stetigen Transport von Ca^{2+} aus dem Zytosol ins ER. **Mitochondrien:** Über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) kommt es zur Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien, während der mitochondriale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCLX) Ca^{2+} aus dem Inneren der Mitochondrien ins Zytosol pumpt.

Das ER als der Hauptkalziumspeicher der Zelle spielt eine wichtige Funktion in der Ca^{2+} -Homöostase. Somit ist der IP_3 -Rezeptor (bzw. der Ryanodin Rezeptor in Muskelzellen) der intrazelluläre Ca^{2+} -Kanal mit maßgeblicher Beteiligung zur Freisetzung von Kalzium ins Zytosol. Durch lokale Interaktionsstellen von ER und Mitochondrien, und das Vorhandensein der IP_3 -Rezeptoren in den Komplexen, kann dieser Ca^{2+} -Kanal direkt die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme beeinflussen [Rizzuto et al., 2009; Cui et al., 2017]. Der mitochondriale Kalziumuniporter (MCU) lässt Ca^{2+} , in Abhängigkeit des Membranpotentials der inneren mitochondrialen Membran, und kontrolliert durch MICU1 und MICU2, in die Mitochondrien [Perocchi et al., 2010; Raffaello et al., 2016]. Der Natrium-Kalzium-Austauscher NCLX funktioniert analog zu NCX in der Plasmamembran und transportiert Ca^{2+} aus dem Inneren der Mitochondrien ins Zytosol [Palty et al., 2009].

Eine feine Abstimmung und genaue Regulation aller Ca^{2+} -Kanäle, Pumpen und Transporter führt zu Kalziumsignalen, die sich in ihrer Amplitude, Kinetik und Dauer unterscheiden. Die genaue zeitliche und räumliche Auflösung der Kalziumsignale führt u.a. zur Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und einer Aktivierung weiterer intrazellulärer Signalmechanismen und hierdurch zu einer präzisen Zellantworten.

1.2 Speichergesteuerter Kalziumeinstrom (SOCE)

Der speichergesteuerte Kalziumeinstrom (SOCE Store Operated Calcium Entry) ist der Hauptmechanismus für einen Kalziumeintritt in nicht-erregbare Zellen. Das erste Mal vorgeschlagen wurde dieser Mechanismus von Putney [Putney, 1986] als sogenannter kapazitiver Kalziumeinstrom. Speichergesteuerte Kanäle tragen diesen Namen, weil sie abhängig vom Füllungsstatus des ERs (Endoplasmatisches Reticulum) aktiviert werden. Der Zusammenhang zwischen Entleerung der Speicher und dem darauf folgenden Kalziumeinstrom über die Plasmamembran konnte erstmals von Hoth und Penner in Mastzellen [Hoth and Penner, 1992] und später in Jurkat T Zellen von Zweifach und Lewis gezeigt werden [Zweifach and Lewis, 1993].

Zur Entleerung der Speicher kommt es physiologisch u.a. durch IP_3 (Inositol 1,4,5-Trisphosphat) [Streb et al., 1983; Berridge and Irvine, 1984]. Dieses wird nach Aktivierung von Zell-Oberflächen-Rezeptoren und dadurch verursachte Aktivierung der Phospholipase C gebildet. So spaltet die Phospholipase C PIP_2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) in Diacylglycerol und IP_3 [Berridge, 1993]. IP_3 induziert durch Binden an die zytosolische Seite des ER-ständigen IP_3 -Rezeptor den Kalzium-Austritt aus dem ER [Streb et al., 1983; Berridge, 1993], wodurch die freie ER-Kalziumkonzentration von $\sim 500 \mu\text{M}$ abfällt. Ein Mittel um die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ zu reduzieren und damit SOCE zu initiieren ist Thapsigargin (Tg), ein Pflanzenextrakt, welches durch Hemmen der SERCA Pumpe zu einer passiven Kalziumentleerung des ERs führt [Thastrup et al., 1989]. Die physiologische Speicherentleerung durch IP_3 , ebenso wie die artifiziell durch Tg herbeigeführte, führen zu einer Dissoziation von Kalzium von STIM-Proteinen, ER-ständigen Kalziumsensoren. Daraufhin kommt es zu

einer Änderung der Konformation der luminalen, sowie zytosolischen Domäne des Proteins, woraufhin STIM-Proteine oligomerisieren und in Bereiche nahe der Plasmamembran (PM) wandern und an diese über ihre C-terminale polybasische Domäne binden und dort innerhalb von Clustern mit dem Kanal-bildenden Protein Orai interagieren [Luik et al., 2008; Prakriya, 2013]. Durch das Nachverfolgen einzelner gelabelter STIM und Orai Moleküle in unstimulierten Zellen konnte gezeigt werden, dass beide Proteine in ihren Membranen mobil bleiben und durch Diffusion in die ER-PM nahen Bereiche gelangen [Wu et al., 2014], wo sie durch eine Interaktion miteinander verbleiben.

So führt die Entleerung der Speicher zu einer dynamischen Umverteilung der zwei Hauptmoleküle des speichergesteuerten Kalziumeinstroms von gleichmäßig über die ER- bzw. Plasmamembran verteilten Proteinen in die selben Cluster (siehe Abb. 2) [Prakriya and Lewis, 2015]. Durch ein direktes Binden von STIM-Proteinen an Orai-Proteine öffnet der Kalziumkanal, wodurch es zum Kalziumeinfluss aus dem Extrazellulärraum kommt. Hierdurch wird u.a. das zuvor entleerte ER wieder aufgefüllt, sowie $[Ca^{2+}]_z$ -abhängige Prozesse, wie die Aktivierung des Ca^{2+} -abhängigen Transkriptionsfaktor NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) durch Calcineurin, initiiert [Feske et al., 2001, 2006; Prakriya and Lewis, 2015]. Aufgrund der starken Erhöhung des zytosolischen Kalziums, sowie das Füllen des ERs ändern STIM-Moleküle ihre Konformation und dissoziiert von Orai1, wodurch der speichergesteuerte Kalziumeinstrom beendet wird [Malli et al., 2008].

Die Hauptkomponenten des speichergesteuerten Kalziumeinstroms sind die jeweils 2005 und 2006 entdeckten STIM [Liou et al., 2005; Roos et al., 2005] und Orai Proteine [Zhang et al., 2006; Vig et al., 2006; Feske et al., 2006]. Die STIM-Familie besteht aus STIM1 und STIM2, wobei es sich bei ihnen um ER-ständige Kalziumsensoren handelt, die den Füllungszustand des ERs detektieren und in Abhängigkeit davon hoch Kalzium-selektive Orai-Kanäle aktivieren. Von den Orai Proteinen gibt es drei Homologe: Orai1, Orai2 und Orai3.

1.2.1 Orai Proteine

Ein funktioneller Orai-Kanal kann aus Homo- bzw. Heteromultimeren bestehen. Dabei entscheidet die Zusammensetzung über die Leitfähigkeit, aber auch Redoxsensitivität des Kanals [Gross et al., 2007; Gwack et al., 2007; Lis et al., 2007; Bogeski et al., 2010; Alansary et al., 2015]. Während das 301 Aminosäuren lange Orai1 die überwiegende Isoform in den meisten Zellen zu sein scheint und reine Orai1-Kanäle die größte Leitfähigkeit aufweisen, reduzieren Orai3 Untereinheit die Redoxsensitivität des gesamten Komplexes aufgrund eines im Vergleich zu Orai1 fehlenden extrazellulären Cysteins [Bogeski et al., 2010; Alansary et al., 2015]. Die 2012 veröffentlichte Kristallstruktur des hexameren Orai1 Kanalkomplexes in *Drosophila Melanogaster* von Hou *et al.* scheint die Kontroverse, aus wie vielen Untereinheiten der CRAC-Kanal (Calcium Release Activated Calcium) besteht, zu lösen. Dabei interagieren die C-Termini von zwei nebeneinanderliegenden Orai1 Untereinheiten in antiparalleler Form [Hou et al., 2012].

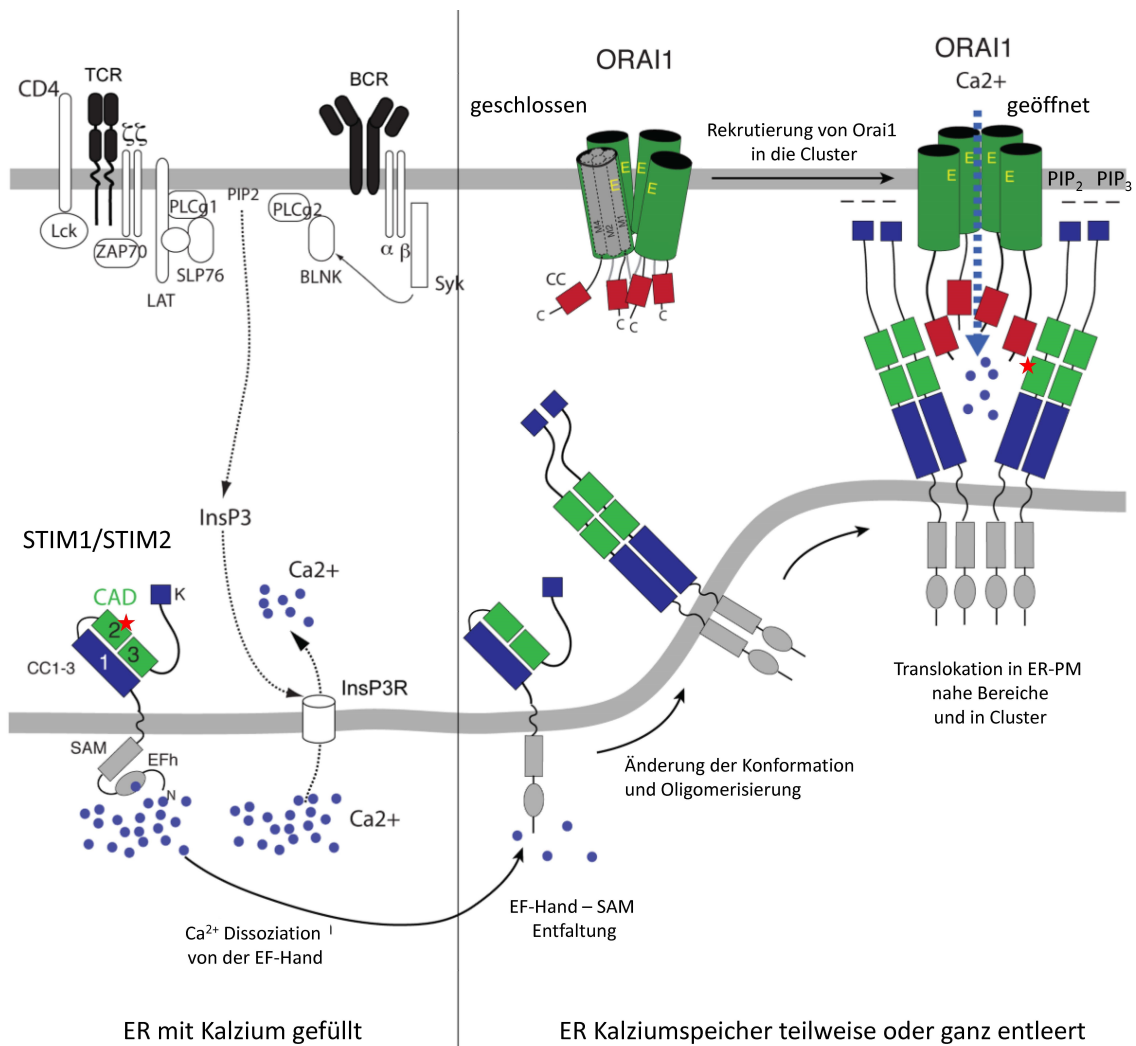


Abbildung 2: **Molekulare Umgestaltung während des speichergesteuerten Kalziumeinstroms in Lymphozyten:** In ruhenden Zellen ist das ER mit Kalzium gefüllt. Durch Binden von Ca^{2+} an die EF-Hand von STIM Molekülen verweilen die Proteine in einem inaktiven Zustand. Durch Rezeptorstimulation gerät eine Signalkaskade in Gang in Zuge derer IP_3 (InsP₃) gebildet wird. Dieses bindet an den IP_3 -Rezeptor, worauf Ca^{2+} aus dem ER strömt. Bei kleineren Schwankungen der Kalziumkonzentration aktiviert ausschließlich STIM2, bei größeren zusätzlich STIM1. Durch den Verlust von Kalzium aus der EF-Hand, entfaltet sich die EF-SAM-Domäne, was zu einer Reorganisation des zytosolischen Teils der Proteine führt. Nach Konformationsänderung und Oligomerisierung translozieren die STIM-Moleküle in Plasmamembran-nahe Bereiche. Dort interagiert STIM1 mit PIP_2 und STIM2 mit PIP_2 und PIP_3 . STIM-Moleküle binden Orail Proteinen innerhalb von Clustern und aktivieren diese durch eine direkte Interaktion, woraufhin Kalzium in die Zelle strömt. Der Stern markiert das zusätzliche Exon in STIM2.1, welches STIM2 in einen Inhibitor von SOCE verwandelt. Kristalle des Orail-Kanals zeigen, dass es sich bei dem Kanal um ein Hexamer handelt. Abbildung bearbeitet aus [Feske et al., 2013]. [Prakriya, 2013]

Die hydrophobe Interaktion der benachbarten Orail Untereinheiten erfolgt über I316 und L319 (entspricht L273 und L276 in humanem Orail) [Hou et al., 2012]. Eben jene Aminosäuren sind kritisch für die Orail-STIM Bindung und ihre Mutation zerstört die Interaktion zwischen STIM und Orail [Navarro-Borelly et al., 2008; Frischauf et al., 2009;

Muik et al., 2009]. STIM-Proteine binden an zwei bekannten Interaktionsseiten an Orai, sowohl C- als auch N-terminal. C-terminal binden die Residuen 254 – 301 an STIM1, wie u.a. *in vitro* Pulldown Assays ergaben [Muik et al., 2009; Park et al., 2009; Zhou et al., 2010]. Eine Ko-Immunpräzipitation zwischen dem STIM1-Kanal-interagierenden Fragment und einem Peptid der Aminosäuren 68-91 von Orai1 charakterisierte die Region des Orai1 N-Terminus, die mit STIM1 interagiert [Park et al., 2009]. Bisher deutet es darauf hin, dass Orai1 zunächst über eine direkte C-terminale Interaktion mit STIM in die ER-Plasmamembran-nahen Bereiche rekrutiert wird. Ob die Kanalöffnung im Anschluss daran durch ein Binden des N-Terminus an STIM Proteine erfolgt [Prakriya, 2013] oder der C-Terminus mit einer kritischen Nexus-Region aus den Aminosäuren 261–265 dafür ausreicht [Zhou et al., 2016] wird weiterhin diskutiert.

Neben Orai1 existieren die weniger gut untersuchten Isoformen Orai2 und Orai3, die jedoch ebenfalls hoch selektive Kalziumkanäle bilden [Lis et al., 2007]. Während Orai3, wie beschrieben, die Redoxsensitivität des Kanals verringert [Bogeski et al., 2010; Alansary et al., 2015], scheint die Beteiligung von Orai2 in Abhängigkeit vom Zellsystem zu variieren. So exprimieren Neuronen isoliert aus Maus mehr Orai2 als Orai1 und in dendritischen Zellen aggregiert und interagiert Orai2 nach Thapsigargin Stimulation mit STIM2, der ebenfalls vorwiegenden Isoform in dendritischen Zellen [Berna-Erro et al., 2009; Bandyopadhyay et al., 2011]. Sowohl Orai2 als auch Orai3 interagieren wie Orai1 über ihren C-Terminus mit STIM1 [Frischauf et al., 2009]. Interessanterweise bindet die L373S STIM1 Mutante in der zweiten *coiled-coil* Domäne von STIM1 noch teilweise an Orai2 und Orai3, während die Interaktion mit Orai1 verloren geht [Frischauf et al., 2009].

1.2.2 STIM Proteine

Aufbau der STIM-Proteine

STIM Proteine sind ER-ständige Typ I Transmembranproteine. Nach dem Signalpeptid besteht der hochkonservierte N-Terminus aus zwei EF-Händen und der SAM- (steriles α -Motiv) Domäne. STIM2 besitzt im Vergleich zu STIM1 ein ungewöhnlich 101 Aminosäuren langes Signalpeptid, welches NF- κ B-abhängig die Transkription beeinflussen kann [Graham et al., 2011]. Trotz der zwischen STIM1 und STIM2 bestehenden 85 %igen Sequenzidentität der EF-SAM Region [Zheng et al., 2011], tragen die vorhandenen Unterschiede wesentlich zu den individuellen Eigenschaften der Aktivatorproteine bei. Im Kalzium-gebundenen Zustand interagiert die Kalzium-bindende cEF-Hand mit der SAM-Domäne und STIM-Proteine verweilen in einem monomeren inaktiven Zustand. Dabei weist STIM2, aufgrund von stärkeren hydrophoben und ionischen Interaktionen zwischen den Domänen, eine stabilere EF-Hand - SAM-Domänen Bindung im Vergleich zu STIM1 auf [Zheng et al., 2011]. Diese könnte eine ständige Aktivität von STIM2 verhindern, da STIM2 aufgrund seiner geringeren Kalziumaffinität ($EC_{50, STIM2}$: 406 μ M und $EC_{50, STIM1}$: 210 μ M [Brandman et al., 2007]) bereits in ruhenden Zellen teilweise und bei geringen Schwankungen

der ER-Kalziumkonzentration voll aktiv ist. Durch den Verlust von Kalzium wird die Bindung der EF-Hand an die SAM-Domäne destabilisiert. Die hierdurch hervorgerufene Konformationsänderung führt zur Oligomerisierung der STIM-Proteine [Stathopoulos et al., 2009], dem ersten Schritt des speichergesteuerten Kalziumeinstroms. Dabei vermittelt u.a. die SAM-Domäne die Oligomerisierung. Aufgrund der zuvor beschriebenen stärkeren EF-SAM Interaktion für STIM2 und der damit verbundenen höheren Stabilität, weist STIM2 eine geringere Oligomerisierungstendenz als STIM1 auf [Stathopoulos et al., 2009; Zheng et al., 2011].

Über eine α -helikale einfache Transmembrandomäne sind der luminaler N-Terminus und der zytosolischer C-Terminus miteinander verbunden. Während der luminaler Teil von STIM mittels der EF-Hand über die Initiation von SOCE entscheidet, wird der zytosolische Teil nach Aktivierung des Proteins zur Stabilisierung der Oligomere, zur Verankerung in der Plasmamembran, der Rekrutierung und Bindung an Orai, sowie dessen Aktivierung und schließlich Inaktivierung benötigt [Prakriya, 2013].

Der zytosolische Teil von STIM1 und STIM2 besteht aus drei CC-Domänen (Coiled-Coil Domäne), einer inhibitorischen Domäne, einer Prolin/Serin reichen Sequenz und dem polybasischen C-Terminus. Der C-Terminus von STIM-Proteinen, sowie möglicherweise zytosolische Faktoren, die mit dem C-Terminus interagieren, scheinen einen Einfluss auf die Mobilität von STIM zu haben. So stabilisiert die CC1-Domäne in STIM1 die ruhende Protein-Konformation [Covington et al., 2010]. Die minimale Domäne, die für eine Aktivierung von Orai benötigt wird, umfasst die CC2- und CC3-Domäne und trägt den Namen CAD (CRAC Activation Domain), SOAR (STIM Orai Activating Region) oder Ccb9 und umfasst die Aminosäuren 342 - 448, 344 - 442 bzw. 339 - 444 [Park et al., 2009; Yuan et al., 2009; Kawasaki et al., 2009]. Interessanterweise wird die CAD-Domäne jedoch auch für eine stabile Oligomerisierung der STIM-Proteine benötigt. So zeigten Muik *et al.* 2009, dass ein Orai1-aktivierendes Fragment (OASF Orai Activating Small Fragment) aus den Aminosäuren 233 - 450 homomerisiert, wozu ein um 30 Aminosäuren verkürztes Konstrukt (233 -420) nicht mehr in der Lage ist [Muik et al., 2009]. Covington *et al.* zeigten 2010, dass unter Verwendung von Konstrukten, mit intaktem N-Terminus und Transmembrandomäne, auch ein C-terminal verkürztes Konstrukt instabile Oligomere bildet, diese jedoch die CAD-Domäne zur Stabilisierung benötigen [Covington et al., 2010]. Somit übernimmt die CAD Domäne sowohl die Aufgabe der Stabilisierung der Oligomere, als auch der Aktivierung von Orai-Kanälen. Obwohl die Interaktionsdomäne des Aktivatorproteins hauptsächlich für STIM1 charakterisiert wurde, spricht die 76 %ige Sequenzidentität und 91 %ige Sequenzähnlichkeit zwischen der CAD-Domäne von STIM1 und STIM2 dafür, dass die Aktivierung von Orai durch die zwei Homologe ähnlich erfolgt [Prakriya, 2013]. Für STIM2 ist zudem gezeigt, dass Calmodulin in der CAD-Domäne bindet. Wie Peptidspot-Bindeassays zeigten, überlagert die linearisierte Orai1-bindende Sequenz von STIM2 teilweise mit einer Calmodulin-bindenden Sequenz [Miederer et al., 2015].

Zusätzlich besitzt STIM1 eine inhibitorische Domäne aus sieben negativ geladenen Aminosäuren (470 HFIMTDDVDDMDEEIV 485), die in Abhängigkeit von Kalzium zur Inaktivierung von SOCE führt. Eine Mutation dieser Domäne führt zum Verlust der typischen Kalzium-abhängigen Inhibierung von SOCE [Derler et al., 2009; Lee et al., 2009; Mullins et al., 2009]. Unklar ist, ob dieser Mechanismus in STIM2 aufgrund von zwei fehlenden negativ geladenen Aminosäuren (479 GGVDDLDED 487) ebenso abläuft. C-terminal schließen STIM-Moleküle mit einer polybasischen Domäne ab. Im Gegensatz zu STIM1 besitzt STIM2 am C-Terminus ein klassisches ER-Retentionssignal (KKXX), welches möglicherweise dafür sorgt, dass STIM1, nicht aber STIM2 auch an der Plasmamembran vorhanden ist. Die ER-Lokalisierung von STIM1 gelingt durch eine Lysin-reiche Domäne und ein Di-Arginin ER-Retentions-Signal [Ercan et al., 2009, 2012].

Spleißvarianten der STIM Proteine

Bei STIM1 und STIM2 handelt es sich um Homologe, die eine ~74 %ige Sequenzähnlichkeit aufweisen [Prakriya and Lewis, 2015]. Jedoch gibt es verschiedene bereits bekannte, sowie weitere vorhergesagte Spleißvarianten (siehe Abbildung 3).

So veröffentlichte die Gruppe um Niemeyer 2015, mit aus dieser Arbeit stammenden Daten, zu einer neuen STIM2 Spleißvariante, STIM2.1, die aufgrund alternativen Spleißens ein zusätzliches Exon enthält. Dieses 8 Aminosäuren kurze Exon wird in die CAD-Domäne von STIM2 gespleißt und wandelt das Protein von einem Aktivator in einen Inhibitor des speichergesteuerten Kalziumeinstroms [Miederer et al., 2015]. Rana *et al.* bestätigte kurz darauf die Existenz und Funktion von STIM2.1, genannt bzw. STIM2 β [Rana et al., 2015]. So zeigten siRNA-Experimente, dass die Variante einen dominant negativen Einfluss auf SOCE in unstimulierten CD4⁺-Zellen hat. Anhand von Patch-Clamp Experimenten konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von STIM2.1 Ca²⁺-abhängig zu sein scheint. Zusätzlich erhöhte das Einfügen der VAASYLIQ-Sequenz die Calmodulinbindung von STIM2.1 im Gegensatz zu STIM2.2 (konventionelle Variante) noch weiter [Miederer et al., 2015].

Neben der neuen Variante STIM2.1 und der konventionellen Variante STIM2.2 gibt es Datenbanken-Vorhersagen für eine dritte Variante, STIM2.3, die auch zu Beginn dieser Arbeit nachgewiesen werden sollte. Hier kommt es durch alternatives Spleißen zur Retention eines zusätzlichen Exons 13. Durch Insertion des Exons kommt es zu einer Leserasterverschiebung und dadurch zu einem vorzeitigen Stop-Codon, so dass nach der Translation der mRNA ein um 147 Aminosäuren verkürztes Konstrukt entsteht (686 AS). Unveröffentlichte Daten aus der Niemeyer-Gruppe bestätigen inzwischen die Existenz von STIM2.3 in verschiedenen Gehirnregionen der Maus [Gilson, 2016], dessen Funktion bleibt jedoch weiterhin unbekannt. Die verkürzte Variante beinhaltet weiterhin die CAD, sowie die putative inhibitorische Domäne, wobei ihr die eine Serin/Prolin-reiche Domäne mit bisher unbekannter Funktion und die C-terminale polybasische Domäne zur Interaktion mit der Plasmamembran fehlt (siehe Abb. 3).

Die erste und bisher einzig charakterisierte Spleißvariante von STIM1, STIM1L, wurde 2011 von Darbellay *et al.* beschrieben. Aufgrund alternativen Spleißens des Exon 11 entsteht eine um 106 Aminosäuren verlängerte Variante. Diese wird in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert und ist in der Lage aufgrund einer Interaktion mit Aktin permanente STIM1L-Orai1 Cluster zu formen. Hierdurch erfolgt eine schnellere SOCE Aktivierung als durch die konventionelle STIM1 Variante, ein Mechanismus, der im Skelettmuskel eine entscheidende Rolle spielt [Darbellay *et al.*, 2011].

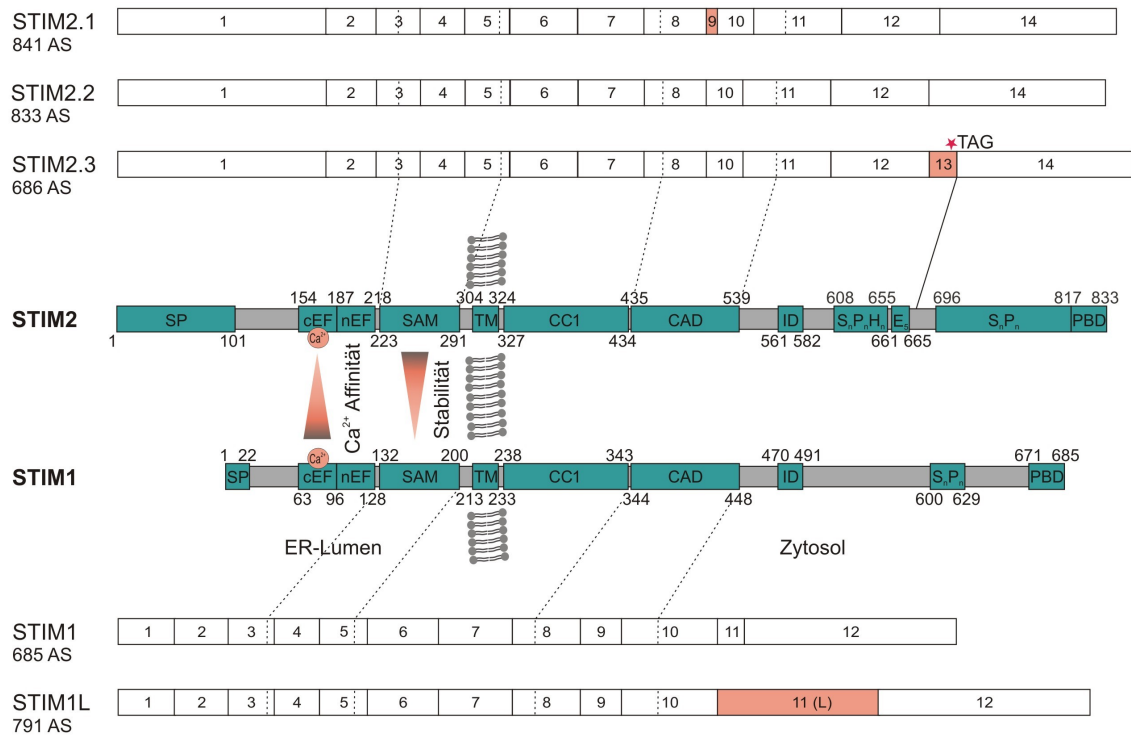


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Domänenstruktur von STIM1 und STIM2 unter Angabe der Exonstruktur der Spleißvarianten beider Isoformen:** Die Darstellung zeigt beide Varianten mit ihrem jeweils Volllängen-Signalpeptid (STIM2: 101 AS, STIM1: 22 AS). **Mittig:** Domänenstruktur von STIM2 und STIM1 mit Signalpeptid (SP), der kanonischen (cEF) und nicht-kanonischen (nEF) EF-Hand und dem sterilen- α -Motiv (SAM) im ER-Lumen. Luminaler und zytosolischer Teil sind über eine einfache Transmembrandomäne (TM) verbunden. C-terminal schließen sich die *coiled-coil*-Domäne, die Kanal-aktivierende Domäne (CAD), sowie eine inhibitorische Domäne (ID) an. In STIM2 folgt eine Serin/Prolin/Histidin-reiche Domäne und ein Glutaminsäurecluster (E₅), die in STIM1 fehlen. In beiden Isoformen findet sich eine weitere Serin/Prolin-reiche Region vor der polybasischen Domäne (PBD). Die angegebenen Zahlen an den Domänen beschreiben die Aminosäurepositionen der ersten und letzten Aminosäure, die die Domäne beinhaltet. **Oben:** Exonstrukturen der STIM2 Spleißvarianten unter Angabe der Längen der Proteine nach Datenbankvorhersagen. STIM2.1 enthält ein zusätzliches Exon 9. STIM2.2 stellt die konventionelle STIM2 Variante da, auf der die Domänenstruktur basiert. STIM2.3 weist ein zusätzliches Exon 13 auf. Der Stern markiert das durch das alternative Exon eingefügte vorzeitige Stop-Codon (TAG). **Unten:** Exonstrukturen der STIM1 Spleißvarianten unter Angabe der Länge der Proteine. Die konventionelle Variante von STIM1 besteht aus 12 Exons. STIM1L enthält ein durch alternatives Spleißen verlängertes Exon 11 (11 (L)).

1.2.3 Funktion von STIM2

Trotz einer sehr ähnlichen Domänenstruktur und hohen Homologie, übernehmen STIM1 und STIM2 distinkte Aufgaben in der Kalziumhomöostase der Zelle. Sowohl STIM1, als auch STIM2 wurden beide bereits 2005 als Aktivatoren des speichergesteuerten Kalziumeinstroms identifiziert [Liou et al., 2005]. Nach verschiedenen widersprüchlichen Veröffentlichungen über die Rolle von STIM2 im speichergesteuerten Kalziumeinstrom identifizierten Brandman *et al.* 2007 STIM2 als Regulator des basalen Kalziums. Aufgrund der verringerten Kalziumaffinität der EF-Hand liegt STIM2 bereits in ruhenden Zellen teilweise in aktivierter Form vor und aktiviert vollständig bei kleineren Schwankungen der Kalziumkonzentration des ERs. Aufgrund dieser Eigenschaft ist STIM2 einer der Regulatoren der Kalziumhomöostase der Zelle und schafft eine Verbindung zwischen der luminalen und zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. So gewährleistet STIM2, dass die Zelle durch genau regulierte Kalziumlevel in der Lage ist auf Rezeptorstimulationen zu antworten, ohne durch zu hohe basale Kalziumlevel irrtümlich aktiviert zu werden [Brandman et al., 2007].

Eine Erklärung für frühere widersprüchliche Ergebnisse bezüglich STIM2 lieferten die dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten (veröffentlicht in Miederer *et al.*), sowie Rana *et al.* mit ihrer Identifikation einer STIM2 Spleißvariante, die SOCE inhibiert. Die neue stark konservierte und ubiquitär exprimierte Variante STIM2.1 [Miederer et al., 2015] bzw. STIM2 β [Rana et al., 2015] enthält ein zusätzliches Exon und ist in Überexpressionsversuchen nicht mehr in der Lage Orai1, Orai2 oder Orai3 zu aktivieren [Miederer et al., 2015; Rana et al., 2015]. In unstimulierten CD4⁺ ist der endogene SOCE nach siRNA Behandlung mit STIM2.1 vergrößert, was die dominant-negative Wirkung von STIM2.1 bestätigte [Miederer et al., 2015]. Rana *et al.* folgern aufgrund von Punkt-Mutationen im spleißspezifischen Exon, dass es sich um eine Sequenz-spezifische aktive Inhibierung der neuen Variante handelt, obwohl sie in Kolokalisationsanalysen keine Kolokalisation zwischen STIM2.1 und Orai1 beobachten [Rana et al., 2015]. Die Gruppe um Niemeyer geht aufgrund von FRET-Studien davon aus, dass obwohl STIM2.1 eine unbeeinträchtigte Kolokalisation mit Orai1 zeigt, das zusätzliche Exon die für eine Aktivierung notwendige Interaktion verhindert [Miederer et al., 2015]. So handelt es sich bei der konventionellen Variante STIM2.2 um einen Aktivator, bei der neuen Variante STIM2.1 um einen dominant negativen Regulator des speichergesteuerten Kalziumeinstroms.

Ein weitere Besonderheit, die STIM2 auszeichnet ist das ungewöhnlich lange Signalpeptid. Erst durch Graham *et al.* wurde es letztendlich als solches identifiziert und die daraus resultierenden drei möglichen posttranslational modifizierten STIM-Proteine charakterisiert [Graham et al., 2011]. Kommt es zur vollständigen Abspaltung des Signalpeptids entsteht das erwartete, zuvor beschriebene ER-lokalisierte Protein STIM2. Wird das Signalpeptid in 2 - 10 % der Fälle nicht abgespalten verbleibt preSTIM2 (STIM2 mit Signalpeptid) im Zytosol, wo es mit der Plasmamembran interagieren kann und Speicher-unabhängig die basale Kalziumkonzentration zu regulieren scheint. Die dritte Form von STIM2 entsteht aus dem 101 Aminosäure langen Signalpeptid und kann nach der Abspaltung in der ER-

Membran weiter prozessiert werden, wodurch ein 91 AS langes Signalpeptidfragment (SPF) entsteht. Nachdem das SPF ins Zytosol entlassen wurde, kann es dort NF- κ B beeinflussen [Graham et al., 2011].

1.2.4 Die Rolle des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms in Krankheiten

Vor allem in Immunzellen spielt das korrekte Zusammenspiel der verschiedenen SOCE-Komponenten eine entscheidende und gut untersuchte Rolle. So verursacht ein *Orai1 knock out* oder eine *loss-of-function* Mutation in diesem Protein einen verringerten I_{CRAC} in T Zellen. Dies hat einen negativen Einfluss auf die Produktion von Schlüsselzytokinen verschiedener T Zell-Subtypen [Feske et al., 2001; Gwack et al., 2008]. Ein ähnlicher Effekt auf SOCE in verschiedenen Immunzellen wurde in *STIM1 knock out* Mäusen beobachtet, wodurch deren Effektorfunktionen stark beeinträchtigt waren [Baba et al., 2008; Braun et al., 2009; Oh-Hora et al., 2009; Beyersdorf et al., 2009]. Obwohl der Effekt auf SOCE bei einem *STIM2* Verlust nicht so drastisch ausfällt wie bei den anderen Komponenten, ist auch in *STIM2 knock out* Zellen eine gestörte Zytokin Produktion zu beobachten [Oh-Hora et al., 2009]. Trotz der Tatsache, dass die für die Zytokin-Produktion entscheidende Translokation von NFAT in den Nukleus in der initialen Phase unbeeinträchtigt war, konnte die NFAT Translokation langfristig nicht aufrecht erhalten werden. Hierfür wird *STIM2*, mit seiner Fähigkeit auch bei einem nicht vollständig entleertem Kalziumspeicher aktiv zu sein, benötigt [Oh-Hora et al., 2009]. Im Menschen verursachen Mutationen in den SOCE-Komponenten *STIM1* und *Orai1* und die damit einhergehende unzureichende Translokation von NFAT eine schwerwiegende Immundefizienz (SCID: Severe Combined Immuno Deficiency) [Feske et al., 2000a,b, 2006].

Eine Fehlregulation der Kalziumhomöostase ist jedoch nicht nur in SCID-Patienten zu beobachten. Auch neurodegenerative, muskuläre und kardiovaskuläre Krankheiten oder der fortschreitende Krankheitsverlauf bei Krebspatienten zeichnet sich durch eine veränderten Ca^{2+} -Homöostase aus [Zui and Jianjie, 2015]. Viele Publikationen zeigen, dass in verschiedenen Krebsarten veränderte Protein- bzw. Transkriptmengen der CRAC-Gene nachzuweisen sind. Eine kürzlich publizierte ausführliche Analyse der Literatur zu der Beteiligung der SOCE-Gene an der Entstehung von Krebs zeigt, dass *STIM* und *Orais* jedoch vermutlich nicht der unmittelbare Auslöser sind, sondern wahrscheinlich im Verlauf der Krebsentstehung mutieren und u.a. durch verstärkte Proliferation, Invasion, Migration und Metastasierung der Krebszellen zum Fortschreiten der Krankheit beitragen [Hoth, 2016].

Mit Ausnahme von Prostata-Karzinomen, in denen verringerte *STIM1* und *Orai1* Proteinmengen nachgewiesen wurden [Xu et al., 2015], weisen alle anderen bisher untersuchten Krebsgewebe, wie u.a. Nieren- [Kim et al., 2014], Lungen- [Li et al., 2013] und Brustkrebs [Chang et al., 2014; Hu et al., 2011; Yang et al., 2009b], sowie Melanoma [Umemura et al., 2014; Stanisz et al., 2014], mehr *STIM1* und/oder *Orai1* auf. Dies trifft teilweise auch für *Orai2* [Haglund et al., 2012] und *Orai3* zu [Hoth, 2016]. Jedoch gibt es auch unter-

suchte krebsbefallene Gewebe, wie Prostatakrebs, die geringere Orai3 Mengen aufweisen [Holzmann et al., 2013].

Teilweise kann die Expressionsstärke der CRAC-Varianten zusätzlich mit einer Prognose für den Krankheitsverlauf korreliert werden: So geht viel Orai1 in NSC Lungenkrebs (non small cell lung carcinoma) [Zhan et al., 2015] und eine STIM1 Überexpression in einem kolorektalem Karzinom mit einer negative Prognose einher [Zhang et al., 2015c]. In unterschiedlichen Brustkrebsarten sorgt besonders viel STIM1 im Vergleich zu STIM2 für schlechtere Heilungschancen [McAndrew et al., 2011].

Während eine steigende Expressionsstärke von Orai1, Orai2, Orai3 und STIM1 kanzerogen zu wirken scheint, weisen kolorektale Karzinome mit erhöhten STIM2 Mengen eine verminderte Ca^{2+} -abhängige Proliferation auf [Aytes et al., 2012; Hoth, 2016], ähnlich wie für die Melanoma-Zelllinie SK-Mel-5 beobachtet [Stanisz et al., 2014]. Ob dies auch auf andere Karzinome zutrifft, die eine verstärkte STIM2 Expression aufweisen, wie beispielsweise Glioblastoma multiforme [Ruano et al., 2006] oder Melanoma [Stanisz et al., 2014], muss in Zukunft getestet werden.

Die Rolle von STIM2 in Alzheimer

Neben den seit Langem beforschten Amyloid β und Tau-Hypothesen, in denen Ablagerungen dieser Proteine zum neurodegenerativen Verfall führen [Hardy and Gwinn-Hardy, 1998a], rückt in den vergangenen Jahren die „ Ca^{2+} -Hypothese“ für die Alzheimer Krankheit (AD Alzheimer's Disease) in den Fokus [Khachaturian, 1989]. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf STIM2. Alzheimer ist eine neuronal degenerative Krankheit, die vor allem im Alter auftritt. Mit Fortschreiten der Krankheit kommt es bei den Patienten aufgrund eines progressiven Verlusts von Neuronen zu immer schwerwiegenderen kognitiven Ausfällen und Verhaltensänderungen.

Obwohl nur 5 % der Krankheit eine genetische Ursache hat (familiärer Alzheimer), sind dies die am Besten untersuchten Fälle. Ihr liegen typischerweise Mutationen im Amyloid Vorläufer Protein (APP Amyloid Precursor Protein) oder Präsenilin 1 bzw. Präsenilin 2 (PS1, PS2) zugrunde [Hardy and Gwinn-Hardy, 1998b]. Diese Proteine sind an der Produktion des bei Akkumulation toxischen $\text{A}\beta$ (Amyloid β) Peptides beteiligt. Während $\text{A}\beta$ ein Teil von APP ist, bildet PS1 die katalytische Einheit der γ -Sekretase, die APP prozessiert. Die in der familiären Alzheimer Krankheit beobachteten Mutationen vergrößern typischerweise den Anteil an prozessiertem $\text{A}\beta$. Meist tritt Alzheimer jedoch spontan auf, die Ursachen hierfür sind weiter unbekannt. Die endogenen Funktionen und Auswirkungen dieser beiden Alzheimer assoziierten Proteine ist bislang nur rudimentär geklärt.

In den vergangenen Jahren wurde vermehrt die Funktion von STIM2 im Gehirn oder die Wirkung der AD assoziierten Proteine APP (Amyloid Precursor Protein) und PS1 (Präsenilin 1) auf die CRAC-Gene Fokus der Forschung. Präseniline, als ein Teil der γ -Sekretase, prozessieren das membranständige APP, wodurch u.a. $\text{A}\beta$ entsteht. 2009 zeigten

Berna-Erro *et al.*, dass STIM2 die Hauptisoform in Neuronen ist und neuronaler SOCE (nSOCE) vorwiegend über STIM2 vermittelt wird [Berna-Erro *et al.*, 2009]. Bojarski *et al.* beobachteten in MEF (Murine Embrionic Fibroblasts) PS1^{-/-} Einzel- und MEF PS1^{-/-} PS2^{-/-} Doppel-*knock out* Zellen einen verstärkten SOCE und erklären dies über erhöhte STIM1 und verringerte STIM2 Proteinmengen.

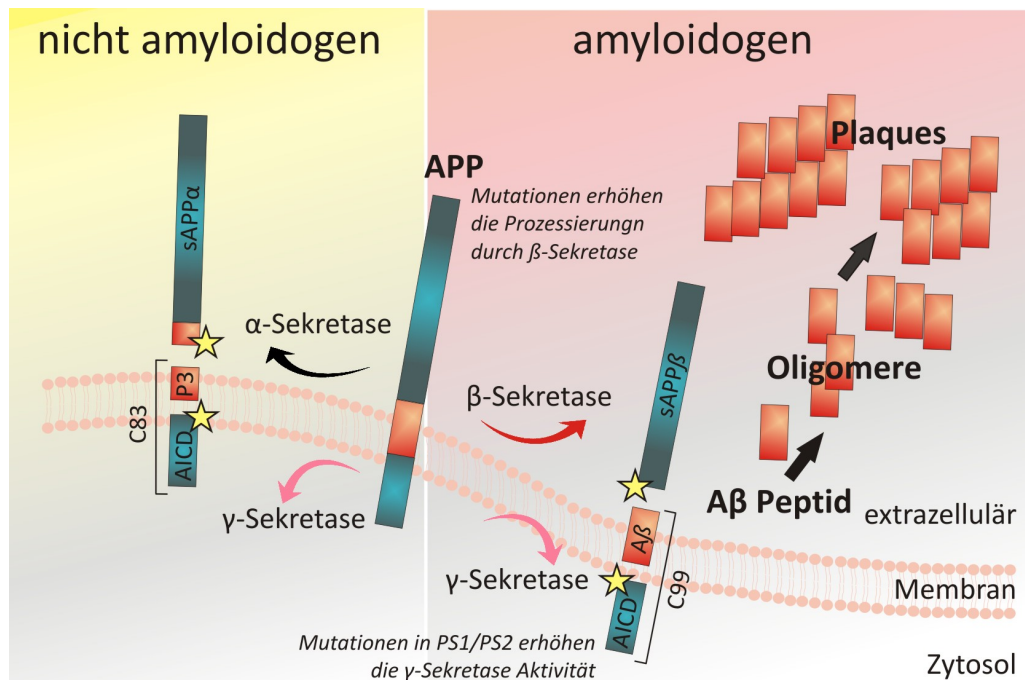


Abbildung 4: **Schematische Darstellung der APP Prozessierung im amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Weg:** Das Plasmamembran Protein APP kann auf zwei verschiedene Arten prozessiert werden. **Nicht-amyloidogener Weg** (links): APP wird zuerst in der A β Domäne durch die α -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten. Dabei entsteht unter anderem das transkriptionell aktive AICD (APP IntraCelluläre Domäne). **Amyloidogener Weg** (rechts): Durch die Prozessierung des Proteins durch die β -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase entsteht neben AICD das A β (Amyloid β) Peptid. Dieses formt durch Oligomerisierung Aggregate und lagert in Form von Plaques im Gehirn ab. Diese Plaques können post mortem in Alzheimer Patienten gefunden werden.

Sie sehen so einen Zusammenhang zwischen den Expressionsleveln der Präseniline und STIM [Bojarski *et al.*, 2009]. Gravierende Konsequenzen einer verringerten STIM2 Proteinmenge beschrieben Sun *et al.* 2014. In einem Mausmodell für familiären Alzheimer (Präsenilin 1 M146V *knock in*) beobachteten sie weniger pilzförmige Dornenfortsätze (Mushroom spines) an Dendriten, jene Dornen, die speziell für Lernen und Gedächtnisbildung wichtig sind. Darüber hinaus fanden sie verminderte STIM2 Proteinmengen in *knock in* Neuronen, in Neuronen alter Mäuse, sowie in Cortex-proben von Alzheimer-Patienten [Sun *et al.*, 2014]. Eine Überexpression von STIM2 war in der Lage die Anzahl an pilzförmigen Dornen in den Präsenilin 1 M146V *knock in* Mäusen, als auch in APP *knock in* Mäusen zu normalisieren [Sun *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015a]. Somit scheint der STIM2 vermittelte neuronalen SOCE die Stabilität von pilzförmigen Dornenfortsätzen

positiv zu regulieren [Sun et al., 2014]. Garcia-Alvarez *et al.* zeigen, dass STIM2 maßgeblich durch Regulierung der Phosphorylierung und des Transports von AMPA Rezeptoren zur Plasmamembran zur Plastizität von dendritischen Dornenfortsätzen in erregbaren Synapsen von Neuronen beiträgt. Die STIM2 Clusterbildung wird durch cAMP initiiert, wobei dies unabhängig von einer Speicherentleerung geschieht und daraufhin kein Kalziumeinstrom erfolgt [Garcia-Alvarez et al., 2015]. Weiterhin bleibt kontrovers, ob SOCE in Neuronen ein relevanter und messbarer Ca^{2+} -Einstrom Mechanismus ist [Berna-Erro et al., 2009; Gemes et al., 2011; Gruszczynska-Biegala et al., 2011; Sun et al., 2014] oder nicht [Park et al., 2010; Garcia-Alvarez et al., 2015] oder dies abhängig vom Entwicklungsstatus der Neuronen ist [Bouyon et al., 2005]. Obwohl bisher nur für STIM2 die Proteinmenge in Alzheimer Modell Mäusen in Verbindung mit dem Krankheitsauftreten gebracht werden konnte [Sun et al., 2014; Zhang et al., 2015a], zeigt eine kürzlich erschienene Veröffentlichung, dass auch STIM1 durch eine Feedback Inhibierung von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen (Ca_v) in Abhängigkeit von NMDA Rezeptoren einen Einfluss auf die Plastizität von postsynaptischen dendritischen Fortsätzen hat [Dittmer et al., 2017].

1.3 Spannungsgesteuerter Kalziumeinstrom

Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle übersetzen elektrische Signale in eine Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration und sind der wichtigste depolarisierungsabhängige Kalziumeinstrommechanismus u.a. in Neuronen. Die verschiedenen Isoformen übernehmen spezialisierte Rollen in nicht-neuronalen Zellen, neuronalen Subtypen, aber auch innerhalb einer Zelle in subzellulären Kompartimenten. Die große Vielfalt entsteht durch unterschiedliche Gene, die für die Poren-formende Kalziumkanal $\alpha 1$ -Untereinheit kodieren, durch alternatives Spleißen, oder aber durch den Zusammenbau der Poren-formenden Untereinheit mit einer Vielzahl von regulierenden Untereinheiten.

Spannungsgesteuerten Kalziumkanäle (VOC Voltage Operated Calcium) können in HVA (High Voltage Activated) und LVA (Low Voltage Activated) unterteilt werden. Während HVA-Kanäle bei einer starken Membrandepolarisation öffnen, aktivieren LVA-Kanäle bei einer schwachen Depolarisation des ruhenden Membranpotentials [Armstrong and Matteson, 1985; Bean, 1985]. Sowohl HVA, als auch LVA-Kanäle besitzen eine Poren-formende $\text{Ca}_v\alpha 1$ -Untereinheit. HVA-Kanäle bestehen aus einem heteromultimeren Proteinkomplex, bei dem zusätzliche Untereinheiten ($\text{Ca}_v\beta$ und $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$) benötigt werden, um den funktionellen Kanal zu bilden [Curtis and Catterall, 1984; Simms and Zamponi, 2014]. Die verschiedenen VOC Kanäle werden aufgrund ihrer $\text{Ca}_v\alpha 1$ Untereinheit unterschieden und können somit in drei Familien eingeteilt werden: $\text{Ca}_v 1$, $\text{Ca}_v 2$ und $\text{Ca}_v 3$.

Die $\text{Ca}_v 1$ Familie besteht aus vier Varianten. Während $\text{Ca}_v 1.1$ Skelett-Muskel-spezifisch vorkommt, handelt es sich bei $\text{Ca}_v 1.2$, $\text{Ca}_v 1.3$ um weit verbreitete Isoformen u.a. in Herz, Gehirn und endokrinen Zellen. $\text{Ca}_v 1.4$ ist hauptsächlich in der Retina zu finden [Bech-Hansen et al., 1998; Mikami et al., 1989; Williams et al., 1992b; Zamponi et al., 2015].

Dabei werden sie auch als L-Typ Kalzium-Kanäle beschrieben, die einen lang-anhaltenden Kalziumeinstrom bewirken (L Longlasting).

Zur Ca_v2 Familie gehört der im Cerebellum vorkommende P/Q-Typ Kalziumkanal $Ca_v2.1$ (P Purkinje-Zellen) [Bourinet et al., 1996], der neuronale N-Typ Kalziumkanal $Ca_v2.2$ (N Neither; weder L- noch T-Typ Kalziumkanal) [Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992a], sowie der R-Typ $Ca_v2.3$ (R Remaining) [Soong et al., 1993].

Zu den T-Typ Kalziumkanälen (T Transient) gehören die eine relativ geringe Stromgröße aufweisenden $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ und $Ca_v3.3$ [Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999; Perez-Reyes et al., 1998]. Während alle Isoformen der Ca_v3 Familie bei schwachen Depolarisationen öffnen (LVA), sind Ca_v1 und Ca_v2 Teil der HVA-Kanäle. LVA-Kanäle öffnen um das Ruhepotential und inaktivieren schon bei kleinen Depolarisationen. Dies führt dazu, dass ein großer Teil der Kanäle bei einem regulären Ruhepotential von ~ 70 mV wie es in Neuronen zu finden ist inaktiviert vorliegt. Erst eine Hyperpolarisation führt dazu, dass der Kanal wieder aktiviert werden kann [Zamponi et al., 2015].

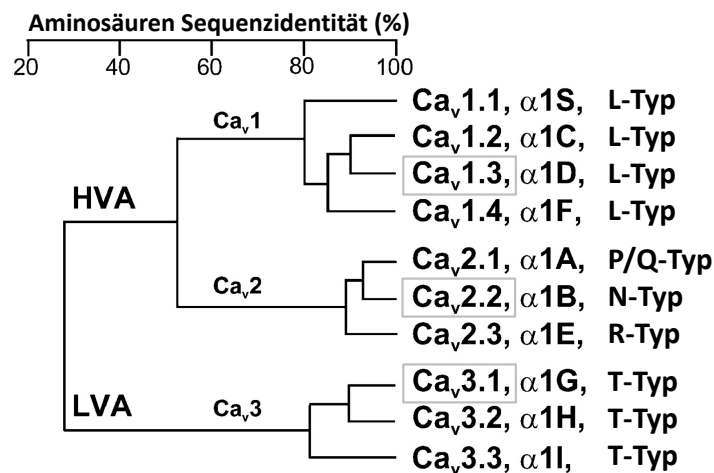


Abbildung 5: **Evolutionärer Baum der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle:** Aminosäureidentität basiert auf dem Abgleichen der putativen Membrandomänen, sowie des die Pore flankierenden Loops. Die HVA-Familien Ca_v1 und Ca_v2 weisen eine höhere Sequenzübereinstimmung zueinander auf als zu Ca_v3 . Zusätzlich angegeben ist der Name der α -Untereinheit, sowie die Klassifizierung in L-, P/Q-, N-, R- oder T-Typ. Graue Kästchen markieren die Ca_v Isoformen, die in SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen identifiziert wurden [Sousa et al., 2013]. Modifiziert aus [Perez-Reyes, 2003].

Obwohl ein Nachweis der L-Typ Kalziumkanäle auch in elektrisch nicht erregbaren Zellen Lymphozyten gelang, ist ihre Funktion in diesen Zellen weiterhin unklar [Zamponi et al., 2015]. Funktionell spielen die unterschiedliche Ca_v -Isoformen im Herz, Gehirn, endokrinen Zellen ($Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$), präsynaptischen Nervenenden (Ca_v2), Neuronen und dem kardiovaskulären System (Ca_v3) eine entscheidende Rolle [Zamponi et al., 2015].

In der für diese Arbeit verwendeten Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y gelang es Sousa *et al.* $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v2.2$ und $\text{Ca}_v3.1$ nachzuweisen [Sousa et al., 2013].

1.3.1 Die Rolle des spannungsgesteuerten Kalziumeinstroms in Krankheiten

Die Vielfalt an Ca_v -Kanälen und ihren Isoformen, sowie die distinkten Rollen, die die Isoformen übernehmen, resultieren in einer großen Anzahl an Krankheiten, die mit Mutationen in den einzelnen Genen einhergehen. Im Folgenden wird auf Krankheiten eingegangen, die im Zusammenhang mit $\text{Ca}_v1.3$, $\text{Ca}_v2.2$ und $\text{Ca}_v3.1$ gebracht werden.

So weisen Menschen wie Mäuse mit einer Mutation in $\text{Ca}_v1.3$ Arrhythmien aufgrund einer Störungen im Sinusknoten auf. Ein weiteres Symptom ist Taubheit [Baig et al., 2010]. Mutationen, die zu einer verstärkten Funktion von $\text{Ca}_v1.3$ führen werden mit Autismus, Entwicklungsverzögerungen, Aldosteroidismus und Epilepsie in Verbindung gebracht [Azizan et al., 2013; Iossifov et al., 2012; O’Roak et al., 2012; Pinggera et al., 2015; Zamponi et al., 2015]. $\text{Ca}_v2.2$ *knock out* Mäuse weisen nur milde Phänotypen auf. Sie zeigen ein vermindertes Schmerzempfinden gegenüber entzündungsbedingten und neuropathischen Schmerzen (Hatakeyama 2001, Kim 2001a, Saegusa 2001), sind hyperaktiv (Beuckmann 2003) und gleichzeitig weniger ängstlich (Saegusa 2001). Mäuse ohne $\text{Ca}_v3.1$ überleben mit nur kleinen Verhaltensauffälligkeiten [Kim et al., 2001], jedoch weisen sie ein u.a. verstärktes viszerales Schmerzempfinden [Kim et al., 2003] und Bradykardien (Herzschlag <60 Schläge pro Minute) [Mangoni et al., 2006] auf. Bisher gibt es keine eindeutige Verbindung zwischen Mutationen in $\text{Ca}_v2.2$ oder $\text{Ca}_v3.1$ und Krankheiten im Menschen [Zamponi et al., 2015].

Jedoch führen nicht nur Mutationen in den CACNA1 Genen zu einer verstärkten Aktivität der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle. So steht die neurodegenerative Wirkung von $A\beta$ im Zusammenhang mit einem verstärkten Kalziumeinstrom durch L-Typ Kalziumkanälen: In Neuroblastoma MC65 Zellen, einer Zelllinie, die stabil das APP Fragment APP-C99 überexprimiert, führen endogene $A\beta$ -Oligomere zu einer Hochregulation der relativen $\text{Ca}_v1.2$ mRNA Menge. Dies geht einher mit einer höheren intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [Anekonda et al., 2011]. Ein verstärkter Kalziumeinstrom durch L-Typ Kalziumkanäle konnte auch durch eine mittels Hypoxie induzierte Produktion von $A\beta$ beobachtet werden [Webster et al., 2006]. Zusätzlich bewirkt $A\beta$ in HEK293 Zellen eine verstärkte Insertion von $\text{Ca}_v1.2$ in die Plasmamembran durch eine direkte Interaktion mit dessen $\alpha1c$ Untereinheit [Scragg et al., 2004].

Der lösliche extrazelluläre Teil von APP ($\text{APP}\alpha$ siehe Abbildung 4) scheint in der Lage L-Typ Kalziumkanäle in entgegengesetzter Weise zu regulieren. So zeigten Schnitte aus dem Hippocampus von APP *knock out* Mäusen einen verstärkten Kalziumeinfluss nach Hypoxie. Dieser Effekt war durch spezifische L-Typ Kalziumkanalblocker oder die Zugabe von $\text{APP}\alpha$ revidierbar [Heftner et al., 2016]. Neben APP reguliert auch das zweite Alzheimer assoziierte Protein Präsenilin 1 VOC Kanäle. Kortikale Neuronen aus PS1 *knock out* Mäusen weisen verstärkte L- und P-Typ Ströme auf, wobei der Grund hierfür möglicherweise die durch

den PS1 *knock out* verringerte intrazelluläre Kalziumkonzentration ist [Cook et al., 2005].

1.4 Zielsetzung

Unterschiedliche Kalziumeinstrom-Mechanismen, wie u.a. der speicher- oder der spannungsgesteuerte Kalziumeinstrom tragen zur Kalziumhomöostase und der Funktion von Zellen bei. Mutationen in einzelnen der beteiligten Komponenten können schwerwiegende Krankheiten zur Folge haben. Zudem haben auch Mutationen in Alzheimer assoziierten Genen eine Auswirkung auf die Kalziumhomöostase verschiedener Zellen.

Ziel dieser Arbeit war es neue Mechanismen zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Kalziumsignale in Immunzellen oder Alzheimer Modellzelllinien haben. Dafür sollte die Spleißvariante STIM2.1 und ihr Einfluss auf SOCE charakterisiert werden. Im Anschluss hatte eine proteomische Analyse zum Ziel mögliche STIM2 Interaktionspartner zu identifizieren, um so den Grundstein dafür zu legen in Zukunft weitere Regulatoren der STIM2-abhängigen Ca^{2+} -Homöostase analysieren zu können. Im dritten Teil der Arbeit war das Ziel den Einfluss der beiden familiären Alzheimer-assoziierten Gene Amyloid-Vorläuferprotein (APP) und Präsenilin 1 mit Hilfe von stabilen Überexpressions- und Deletionszelllinien von Neuroblastomazellen auf den speicher- und spannungsgesteuerten Kalziumeinstrom genauer zu untersuchen.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Antikörper

2.1.1 Primärantikörper

Tabelle 1: **Verwendete Primärantikörper** unter Angabe von Spezifität (Antikörper gegen), Klonalität, Ursprungsorganismus (Org), Hersteller, Bestellnummer (Bestellnr) und Verdünnung

Antikörper gegen	Klonalität	Org	Hersteller	Bestellnr	Verdünnung
α -Calnexin	polyklonal	Hase	Assay design	SPA865	1 : 2000
α -GAPDH	polyklonal	Hase	Cell Signaling	2118	1 : 2000
α -GFP	polyklonal	Hase	Cell Signaling	2956	1 : 1000
α -Orai1	polyklonal	Hase	Abcam	ab78471	1 : 500
α -Orai1	polyklonal	Hase	Anaspec	54653	1 : 500
α -Profilin 1	polyklonal	Hase	Abcam	ab124904	1 : 10000
α -Stim1	monoklonal	Maus	BD-Bioscience	610954	1 : 250
α -STIM2.1	polyklonal	Hase	Martin Jung	-	1 : 100-200
α -STIM2 (C-Term)	polyklonal	Hase	Sigma Aldrich	S8572	1 : 1000
α -STIM2 (N-Term)	polyklonal	Hase	Sigma Aldrich	PRS4125	1 : 1000
α -Streptavidin-HRP	-	-	JIR	016030084	0.3 μ g/mL
α -Streptavidin-AF568	-	-	Thermo Fisher	S11226	1 : 500
α - γ -Tubulin	polyklonal	Hase	Sigma	T5192	1 : 1000

Bei den α -Streptavidin Antikörpern handelt es sich um direkt gekoppelte Antikörper. Somit wurde hier zur Detektion kein Sekundärantikörper benötigt.

2.1.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2: **Verwendete Sekundärantikörper** unter Angabe von Hersteller, Bestellnummer und Verdünnung

Antikörper	Hersteller	Bestellnr	Verdünnung
α -Hase-AF568	Invitrogen	A-11036	1 : 200
α -Hase-HRP	GE Healthcare Amersham	NA9340	1 : 25000
α -Maus-HRP	Amersham Bioscience	NA931	1 : 5000

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 3: **Bakterienstamm** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Bakterienstamm	Hersteller	Bestellnummer
XL-1 Blue Subcloning Grade	Agilent Technologies (Stratagene)	200249

2.3 Chemikalien

Tabelle 4: **Chemikalien und Reagenzien** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
2-Mercaptoethanol	Acros Organics	125472500
2-Propanol	Sigma	19516
Acrylamid-Bisacrylamid	Sigma	A7168
Agar Select	Sigma	A5054
Agarose broad range	Roth	T846.3
Agarose GTQ	Roth	6352.4
Albumin, Bovine Serum	Sigma	A6003
Ampicillin	Sigma	A9393
APS	Sigma	248614-56
Benzonase	Sigma	E1014-5KU
Biotin	Sigma	B4501
Biotin-Phenol	Adipogen	CDX-B0270-M100
Borsäure	Sigma	B0394
Calciumchlorid	Merck	102382
Glucose	Merck	102382
Glutaminsäure	Sigma	G1626
cOmplete Proteinaseinhibitor	Roche	05892791001
DMSO	Sigma	D8418
DTT	Sigma	D9779
EDTA	Sigma	ED2SS
EGTA	Sigma	E4378.2506
Fura-2-AM	Invitrogen	F1221
GelRed	Biotium	41003
Glycin	Applichem	R030
H ₂ O ₂	Fisher Scientific	H325-500
Hefeextrakt	Difco	212750
HEPES	Sigma	H7523
Ionomycin	Calbiochem	407950
Kaliumchlorid	AnalaR	46764298
Magermilchpulver	Sucofin	-
Magnesiumchlorid	Merck	105833025
Methanol	Fisher Chemicals	M3950
Natriumascorbat	Sigma	-
Natriumazid	Sigma	S8032
Natriumchlorid	Sigma	S9888

Tabelle 4: **Chemikalien und Reagenzien** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
OptiMEM	Thermo Fisher	31985088
Paraformaldehyd	Polysciences	00380-250
PeqGold dNTP Mix	Peqlab	20-3011
PeqGreen DNA/RNA Dye	Peqlab	37-500
Polyornithin	Sigma	P3655
SDS	Acrosorganics	327315000
Thapsigargin	Invitrogen	T7458
TEMED	Sigma	T9281
Triton X-100	Eurobio	18774
Trizma	Sigma	T1503
TRIzol	Life Technologies	15596018
Trolox	Sigma Aldrich	238813-1MG
Trypsin	Fisher Scientific	25300-062
Trypton	Sigma	T9410
Tween20	Sigma	P1379
Urea	Sigma	U5378

2.4 Größenstandards

Tabelle 5: **Größenstandards** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Größenstandard	Hersteller	Bestellnummer
1 Kb Plus Ladder	Invitrogen	10787-018
100 bp Ladder	NEB	N3231S
Precision Plus Protein Dualcolor Standard	Bio-Rad	161-0325

2.5 Laborgeräte

Tabelle 6: **Laborgeräte** unter Angabe des Herstellers

Laborgerät	Hersteller
4D Nukleofektor	Lonza
Bio-Photometer	Eppendorf
ChemiDoc TM XRS	Biorad
CO ₂ Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific
CO ₂ Inkubator Heraeus	Thermo Scientific
Gelelektrophorese Mini-Protean Tetra Cell	Biorad
Gelelektrophorese GIBCO BRC Horizontal	Life Technologies
Heizblock	Bioer
Hybridisierungsöfen UM 400B Hyb	Bachhofer
Inkubationsschüttler Minitron CH-4103	Infors HT
Inkubationsschüttler Unimax 1010	Heidolph

Tabelle 6: **Laborgeräte** unter Angabe des Herstellers

Laborgerät	Hersteller
Magnetschüttler Variomag Teleshake 4	Variomag
Magnetrührer IKA RCT basic	Sigma
Mastercycler Personal 5332	Eppendorf
pH Elektrode accumet Basic	Fisher Scientific
Pipetboy acy	Integra Biosciences
Platereader GENIos Pro	Tecan
Semi Dry Blotter	Tyler Research
Sterilwerkbank	HERAsafe
Stromquelle Power Pac HC	Biorad
Sub-cell Agarode Gel Elektrophorese Systems	Biorad
Thermomixer Univortemp Universal	Labortechnik
Universal Trockenschrank UM500	Memmert
Vortex Thriller	Peqlab
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge Mikro 220R	Hettich
Zentrifuge Mini Spin 5452	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

2.6 Lösungen

2.6.1 Imaging Lösungen

Ca²⁺-Imaging Lösungen mit mit 0,5; 1,0 bzw. 1,5 mM CaCl₂

145 mM NaCl
 4 mM KCl
 10 mM HEPES pH 7,4
 10 mM Glucose
 2 mM MgCl₂
 0.5/1/1.5 mM CaCl₂
 310 mosm; pH 7,4 (Titration mit NaOH)

Ca²⁺-Imaging Lösung mit mit 145 mM KCl

4 mM NaCl
 145 mM KCl
 10 mM HEPES pH 7,4
 10 mM Glucose
 2 mM MgCl₂
 1.5 mM CaCl₂
 310 mosm; pH 7,4

Ca²⁺-Imaging Lösung mit 10 mM KCl

139	mM	NaCl
10	mM	KCl
10	mM	HEPES pH 7,4
10	mM	Glucose
2	mM	MgCl ₂
1.5	mM	CaCl ₂
310 mosm; pH 7,4		

2.6.2 SDS-Page (Polyacrylamid Gel Elektrophorese) und Westernblot-lösungen

Blottingpuffer, pH 8.3

20	%	Methanol
1	%	SDS
250	mM	Tris-HCl
1,92	M	Glycin

Lämmli-puffer 2x

8	%	SDS
120	mM	Tris pH 6,8
0,1	%	Bromphenolblau
20	%	Glycerin
0,1	%	β -Mercaptoethanol

Lämmli-puffer 5x

125	mM	Tris pH 6,8
2,5	%	SDS
0,1	%	Bromphenolblau
60	%	Glycerin
25	%	β -Mercaptoethanol

Primärantikörperlösung

Antikörper in entsprechender Verdünnung

1	%	BSA
0,02	%	Natriumazid
in PBS		

RIPA-Lysepuffer

10	mM	Tris pH 7.4
1	%	Triton X-100
0,5	%	NP40
150	mM	NaCl
in PBS; pH 7,4		

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl
0,4 % SDS
in Wasser; pH 6,8

SDS-Elektrophoresepuffer, 10 x, pH 8.3

250 mM Tris base (Trizma)
1,92 M Glycin
1 % SDS

Sekundärantikörperlösung

Antikörper (in entsprechender Verdünnung)
5 % Magermilch in TBST

TBS, 10 x, pH 7.5

500 mM Tris base (Trizma)
1,5 M NaCl

TBST

0,1 % Tween
10 % TBS, 10 x

Trenngelpuffer

1,6 M Tris-HCl
0,4 % SDS
in Wasser; pH 8,8

2.6.3 sonstige Lösungen**2XY Medium, pH 7**

1,6 % Trypton
1 % Select Yeast Extract
0,5 % NaCl
Antibiotikum

Antibiotika mit Endkonzentration

100 µg/ml Ampicillin (Stock: 50 mg/ml in H₂O)
60 µg/ml Kanamycin (Stock: 50 mg/ml in H₂O)

Bakterienlagermedium

50,7 % K₂HPO₄
0,3 % KH₂HPO₄
0,05 % Na₃Citrat
0,01 % MgSO₄
50 % Glycerin

LB-Agarplatten

LB-Medium

1,5 % Agar
Antibiotikum

LB-Medium, pH 7,5

1 % Select Pepton oder Trypton
1 % Select Pepton oder NaCl
0,5 % Select Yeast Extract
Antibiotikum

Quencher-Lösung

10 mM Natriumazid
10 mM Natriumascorbat
5 mM Trolox

TBE, 10 x, pH 8.3

89 mM Tris Base (Trizma)
89 mM Borsäure
10 mM EDTA

2.7 Mikroskope und Filtersets

2.7.1 Ca²⁺-Imaging

Ca²⁺-Imaging Experimente wurden mit Hilfe der Soft- und Hardware von Till Photonics (FEI Munich GmbH) durchgeführt. Durchlichtquelle (Power supply), Monochromator (Polychrome V), Kamera (Imago CCD Camera Andor Clara) und Kontrolleinheit (ICU, Imaging Control Unit) sind von Till Photonics. Als Mikroskop wurde der Zeiss Observer.A1 verwendet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines 20 × Objektivs und unter Verwendung eines Fura-2 Filters (F76-521) gemacht. Alle Filter wurden von Analysetechnik AG bezogen. Fluoreszenztransfizierte Zellen wurden mittels verschiedener Filter (YFP: F36-528; CFP: F26-511; mCherry: F20-451) identifiziert.

2.7.2 FRET und Kolokalisationsstudien

Für FRET und Kolokalisationsstudien wurde das Leica AM TIRF MC System verwendet. Das Mikroskop wurde mittels der LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence) Software gesteuert, welche auch zur Analyse der FRET Studien verwendet wurde. Für alle Aufnahmen wurde das Leica HCX Plan Apo Öl-Objektiv (100 ×; 1.46 numerische Apertur) verwendet. GFP wurde mittels eines 488 nm Lasers angeregt, wobei ein Suppressionsfilter mit einer Bandbreite von 525/50 verwendet wurde. mCherry wurde mit einem 561 nm Laser angeregt (Bandbreit Suppressionsfilter: 600/40). Für FRET Aufnahmen wurde der GFP-Laser und mCherry Suppressionsfilter verwendet.

2.7.3 Konfokale Aufnahmen: Immunzytochemie

Zur Aufnahme von gefärbten Zellen wurde ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop von Leica (Leica TCS SP5) mit der TCS Arbeitsstation unter Verwendung eines 100 × Öl-Objektivs genutzt. Die Steuerung des Mikroskops, sowie die Aufnahmen erfolgten mittels

der LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence) Software. Für die Aufnahmen wurden drei Anregungslaser verwendet: 405 Diode für DAPI; Argon-Laser für YFP; HeNe 543 (Helium-Neon-Laser) für AF568. Die Messungen wurden an der Universität von Alberta durchgeführt.

2.8 Enzyme

2.8.1 Modifizierende Enzyme

Tabelle 7: **Verwendete modifizierende Enzyme** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Modifizierende Enzyme	Hersteller	Bestellnummer
Antartic Phosphatase	NEB	M0289S
Phusion Polymerase	Finnzymes	F-530S
T4 DNA-Ligase	Finnzymes	M0289S
SuperScript II RT	Life Technologies	18064

2.8.2 Restriktionsenzyme

Tabelle 8: **Verwendete Restriktionsenzyme** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Restriktionsenzyme	Hersteller	Puffer	Bestellnummer
BlnI	NEB	CutSmart	R0585S
EcoRV	NEB	CutSmart	R3195S
KpnI	NEB	NEB1.1	R0142S
SnaBI	NEB	CutSmart	R0130S

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 Klonierungsprimer

Tabelle 9: **Klonierungsprimer** unter Angabe des Endkonstrukts, der amplifizierten DNA, Vorwärts- und Rückwärtsprimer

Konstrukt	amplifizierte DNA	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
STIM2.1/STIM2.2-mcherry	mcherry	BAN1005	BAN1004
STIM2.1/STIM2.2-GFP	GFP	BAN1005	BAN1004
YFP-STIM2.1/STIM2.2-APEX2	APEX2 (+BlnI)	BAN1239	BAN1240

BAN1004: ATCTTGACAGCTCGTCCATG

BAN1005: ATGGTGAGCAAGGGCGAG

BAN1239: GGCCGCTCAGCTGGACTACAAGGATGACGAC

BAN1240: CGGCGCTGAGCGTCCAGGGTCAGGCGCTC

2.9.2 qRT-PCR Primer

Tabelle 10: **Verwendete qRT-PCR Primer** unter Angabe der Ziel-mRNA und der Sequenzen der Vorwärts- sowie Rückwärtsprimer

Ziel-mRNA	Vorwärtsprimer 5'-3'	Rückwärtsprimer 5'-3'
Cav1.3	TCAGCCGAATAGCTCCAAGC	TCGGATGGGGTTATTGAGTGA
Cav2.2	GACAACGTCGTCCGCAAATAC	CCCGATGAAATAGGGCTCCG
Cav3.1	TGTCTCCGCACGGTCTGTAA	AAGCCGGTTCCAAGTGTCTC
Orai1	ATGAGCCTCAACGAGCACT	GTGGGTAGTTCGTGGTCAG
Orai2	TGGAAC TGGT CACCTCTAAC	GGTACTGGTACTGCGTCT
Orai3	GTACCGGGAGTTCGTGCA	GGTACTCGTGGTCACTCT
STIM1	CAGAGTCTGCATGACCTTCA	GCTTCCTGCTTAGCAAGGTT
STIM2.1	CTCTGAAAAAGGCCGAAAAA	TGAAGCAGCAACCTCATCTTT
STIM2.2	CTCTGAAAAAGGCCGAAAAA	TTTTCTGCCTCATCTTTAGCAA
STIM2	GTCTCCATTCCACCCTATCC	GGCTAATGATCCAGGAGGTT
TBP	CGGAGAGTTCTGGGATTGT	GGTTCGTGGCTCTCTTATC

2.9.3 siRNA

Tabelle 11: **erwendete siRNA** unter Angabe von Hersteller und Sequenz

siRNA	Hersteller	Sequenz
ns (unmod)	Microsynth	TTCTCCGAACGTGTACGTTT
STIM2.1 (unmod)	Microsynth	GATGAGGTTGCTGCTTCATTT
STIM2.2 (unmod)	Microsynth	AGATGAGGCAGAAAAAATTTT

2.10 Kits

Tabelle 12: **Verwendete Kits** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Kit	Hersteller	Bestellnummer
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
Clarity Western ECL	Biorad	1705060
DC Protein Assay	Biorad	500-0116
Dream Taq Green PCR Master Mix	Thermo Scientific	K1081
Phusion High Fidelity PCR Kit	NEB	F553S
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen	27106
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen	28706
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12662
Dynalbeads Untouched Human CD4	Dynal Biotech	11346D
QuantiTect SYBRgreen kit	Qiagen	204145
T4 Ligase Kit	Life Technologies	EL0012
pJet PCR Cloning Kit	Thermo Scientific	K1231

2.11 Vektoren und Konstrukte

2.11.1 Ausgangsvektoren für Klonierungen

Tabelle 13: **Verwendete Zielvektoren für Klonierungen** unter Angabe der Bezugsquelle

Ausgangsvektor	Bezugsquelle/Kloniert von
pCDNA5-FRT/TO	Bernd Bufe
pEX-YFP-STIM2.2	Addgene #18862/Tobias Meyer
pIRES1neo-STIM2.2	Annette Lis
pIRES1neo-STIM2.1	Anna-Maria Miederer
pMAX-IRES-GFP	modifiziert durch Hawraa Bzeih/Maik Konrad

2.11.2 Verwendete Konstrukte

Tabelle 14: **Verwendete Konstrukte** unter Angabe von Vektor und Verwendungszweck. *Konstrukte mit Kürzel der Person, die das Konstrukt kloniert hat: MK: Maik Konrad, DA: Dalia Alansary, AM: Anna-Maria Miederer

Konstrukt	Vektor	Verwendungszweck
AICD	pMAX-IRES-GFP *MK	Ca ²⁺ -Imaging
APP	pMAX-IRES-GFP *MK	Ca ²⁺ -Imaging
APP Δ CT	pMAX-IRES-GFP *MK	Ca ²⁺ -Imaging
CFP-STIM2.2	pEX	Ca ²⁺ -Imaging
GFP	pMax	Klonierung
mCherry	pMax	Klonierung
Orai1-C-mEGFP	pMax	FRET/Kolokalisation
Orai2	pCAGGS-IRES-RFP	Ca ²⁺ -Imaging
STIM1	pCAGGS-IRES-RFP	Ca ²⁺ -Imaging
STIM2.1-mcherry	pIRES1neo-SPS2-STIM2.1 *AM	FRET/Kolokalisation
STIM2.1-GFP	pIRES1neo-SPS2-STIM2.1 *AM	FRET/Kolokalisation
STIM2.2-mcherry	pIRES1neo-SPS2-STIM2.2 *AM	FRET/Kolokalisation
STIM2.2-GFP	pIRES1neo-SPS2-STIM2.2 *AM	FRET/Kolokalisation
YFP	pEYFP	Ca ²⁺ -Imaging
YFP-STIM2.1	pEX *AM	Ca ²⁺ -Imaging
YFP-STIM2.1-IQ/AA	pEX *DA	Ca ²⁺ -Imaging
YFP-STIM2.2	pEX	Ca ²⁺ -Imaging
YFP-STIM2.1	pCDNA5-FRT/TO *AM	stabile Zelllinien
YFP-STIM2.1-APEX2	pCDNA5-FRT/TO *AM	Biotinylierung
YFP-STIM2.2	pCDNA5-FRT/TO *AM	stabile Zelllinien
YFP-STIM2.2-APEX2	pCDNA5-FRT/TO *AM	Biotinylierung

2.12 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: **Arbeitsmaterialien** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Arbeitsmaterialien	Hersteller	Bestellnummer
6 × Loading Dye	Thermo Scientific	R0619
Baysilon-Paste hochviskos	ZCHL	700514
Deckgläschen 12 mm; 25 mm	ORSATec/Kindler	02R1215-D
Elektroporationsküvetten	BioBudget	75-02-SE
my-Budget Einmalpipetten	BioBudget	75-50-PP
Nitrozellulosemembran Hybond N	Amersham	RPN303E
PVDF-Transfermembran	Fisher Scientific	IPVH00010
Streptavidin-gecoatete magnetische Beads	NEB	S1420S
Whatman Filterpapier	Whatman	512-3939

Alltägliche Verbrauchsmaterialien für Zellkultur und Molekularbiologie, wie u.a. serologische Pipetten, Zellkulturflaschen, Reaktionsgefäße, (gestopfte) Spitzen und 6 bis 96-well Platten wurden soweit nicht anders angegeben von VWR, BD, Corning, PEQLAB, Sarstedt bezogen.

2.13 Zellkulturmaterialien

2.13.1 Medien

Tabelle 16: **Verwendete Medien** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Medium	Hersteller	Bestellnummer
AIMV	Life Technologies	112055-083
DMEM	Fisher Scientific	41966-052
DMEM	Sigma Aldrich	D5796-500ML
Dulbecco's PBS	Fisher Scientific	14190-094
MEM	Fisher Scientific	31095-029
RPMI	Fisher Scientific	21875-034

2.13.2 Transfektionsreagenzien

Tabelle 17: **Transfektionsreagenzien** unter Angabe von Transfektionsgerät, Hersteller und Bestellnummer

Transfektionsreagenz	Gerät	Hersteller	Bestellnummer
FuGENE	-	Promega	E2321
Cell line Kit V	Nucleofector 2b	Lonza	VVCA-1003
Lipofectamin2000	-	Thermo Scientific	11668027
Opti-MEM	Nucleofector 2b	Life Technologies	51985-034
P3 Primary Cell 4D kit	4D Nucleofector	Lonza	V3XP-3024

2.13.3 Zellkulturzusätze

Tabelle 18: **Zellkulturzusätze** unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Zellkulturzusatz	Hersteller	Bestellnummer
Arginin0	Sigma Aldrich	A5006-100G
Arginin10	Silantes	201603902
Blasticidin S	Fisher Scientific	10648203
FBS	Sigma Aldrich	A9418-100G
FCS dialysiert	Sigma Aldrich	F0392-100ML
Hygromycin B	VWR	400052-5
Hygromycin B	PAN-Biotech	P06-08020
Lysin0	Sigma Aldrich	L5501-10MG
Lysin8	Silantes	211603902
MEM NEAA	Fisher Scientific	11140-050
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333-100ML
Puromycin	VWR	540411-25

2.13.4 Zelllinien und Primärzellen

CD4 ⁺	unstimuliert
HEK293	wt
HEK293	Orai1
HEK293T	
Jurkat E6.1	
SH-SY5Y	mock
SH-SY5Y	APP695 swedish (APP Überexpressionszelllinie)
SH-SY5Y	Crispr mock
SH-SY5Y	APP ^{-/-} (<i>Knock out</i> Zelllinie)
SH-SY5Y	PS1 ^{-/-} (<i>Knock out</i> Zelllinie)
T-REx293	wt
T-REx293	YFP-STIM2.1
T-REx293	YFP-STIM2.2

Kapitel 3

Methoden

3.1 Gentechnische Methoden zur Generierung rekombinanter DNA

3.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) ist eine *in vitro* Methode zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Die Amplifikation erfolgt in zyklischen Schritten mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase, wobei der zu vervielfältigende Bereich von zwei kurzen Oligonukleotiden (= Primer) begrenzt wird. In einem Zyklus, der aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer (= Annealing) und Elongation besteht, wird die DNA verdoppelt. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Phasen ausschließlich durch ihre Temperatur.

Bei der Denaturierung wird eine Temperatur in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase zwischen 94 - 98 °C gewählt, die dazu dient die Bindungskräfte zwischen den zwei Einzelsträngen der DNA und den Primern zu überwinden, so dass diese sich voneinander trennen und einzelsträngig vorliegen. Die Dauer der Denaturierung hängt von der Länge der DNA ab, die als Vorlage (= Template) dient.

Für die anschließende Annealing-Phase wird die Temperatur gesenkt. Dadurch können die Primer mit der Template-DNA hybridisieren. Dabei ist ein Primer komplementär zum Beginn des zu amplifizierenden Bereiches, während der andere Primer komplementär zum Ende des gewünschten DNA-Abschnitts auf dem Gegenstrang ist. Primer können dazu verwendet werden, um Phosphate oder zusätzliche Schnittstellen an den zu amplifizierenden Bereich anzufügen, um so eine spätere gerichtete Klonierung zu erleichtern. Die Temperatur in der Annealing-Phase liegt unter der Denaturierungstemperatur der Primer und ist somit abhängig von der Nukleotid-Zusammensetzung der Primer und kann nach der Wallace-Regel bestimmt werden: $T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$

In der Elongationsphase kommt es schließlich zur Anlagerung der DNA-Polymerase an die 3' Enden der Primer und zur komplementären Vervollständigung des DNA-Stranges mit freien Desoxynukleotiden in 5' - 3' Richtung. Die Temperatur ist abhängig vom

Temperaturoptimum der Polymerase, die Dauer der Elongation steigt mit der Länge des zu amplifizierenden Bereiches und variiert je nach Kapazität der Polymerase (15 - 30 sec pro 1000 Basenpaaren (bp)).

Nach der Elongation liegt der DNA-Abschnitt wieder als Doppelstrang vor und ein neuer Zyklus beginnt, in dem die bereits amplifizierte DNA nun als Vorlage dient, wodurch es zur exponentiellen Vervielfältigung der DNA kommt. Präparative PCR-Reaktionen wurden nach dem aufgeführten Schema in Tabelle 19 angesetzt. Eine Übersicht der gewählten Temperaturzyklen und gewählten Zyklendauer ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 19: **Pipettierschema für präparative PCR-Reaktionen**

1	μl	Template DNA (= 20 ng)
2,5	μl	<i>Primer</i> 1 (10 pmol/μl)
2,5	μl	<i>Primer</i> 2 (10 pmol/μl)
10	μl	5x High fidelity Puffer
1	μl	dNTPs (je 10 mM: dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
32,5	μl	H ₂ O
0,5	μl	Phusion Polymerase
<hr/>		
50 μl Gesamtvolumen		

Tabelle 20: **Temperatur-Zyklus-Konditionen für präparative PCR-Reaktionen**

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	
98	180	
98	17	x28-32
T _m (X-Y)	15-30	
72	30	
72	600	
4	∞	

3.1.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Variante der Polymerase-Ketten-Reaktion, die nach einer Transformation von Bakterien dazu dient, die Klone zu identifizieren, die den Vektor mit dem klonierten Konstrukt in der richtigen Orientierung enthalten. Da als Template direkt gepickte Kolonien verwendet werden und somit eine vorangehende Plasmid-Aufreinigung unnötig ist, können viele Klone parallel und zügig getestet werden. Während des ersten Denaturierungszykluses werden die Bakterienzellen aufgeschlossen, wodurch die DNA als Vorlage für die PCR freigesetzt wird. Um neben dem Nachweis der gelungenen Insertion des DNA-Abschnitts in den Vektor auch die richtige Orientierung zu überprüfen, wird ein Primer komplementär zum Insert, der andere komplementär zum Gegenstrang des Vektors gewählt. Auf diese Weise entsteht das PCR-Produkt ausschließlich bei korrekter Orientierung des Insert. Tabelle 21 führt das Pipettierschema der Kolonien-PCR auf; Tabelle 22 die verwendeten Temperaturzyklen und Zyklendauer.

Tabelle 21: **Pipettierschema für Kolonie-PCR**

1/2	Kolonie	DNA-Template
12,5	µl	DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Fermentas; enthält DreamTaq™ DNA Polymerase, DreamTaq™ Green Puffer, MgCl ₂ , dNTPs)
1,25	µl	<i>Primer 1</i> (10 pmol/µl)
1,25	µl	<i>Primer 2</i> (10 pmol/µl)
10	µl	H ₂ O
25 µl Gesamtvolumen		

Über ein Agarosegel wurde das PCR-Produkt aufgetrennt und die Klone identifiziert, die das Plasmid mit dem Insert in der richtigen Orientierung enthielten. Anschließend wurde die zweite Hälfte einer positiv getesteten Kolonie verwendet, um LB-Medium für eine spätere Plasmid-Aufreinigung und Sequenzierung anzuimpfen.

Tabelle 22: **Temperatur-Zyklus-Konditionen für Kolonie-PCR**

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	
95	180	
95	30	x32
T _m (58)	20	
68	22	
68	300	
4	∞	

3.1.3 Restriktionsverdau von DNA

DNA kann an spezifischen Stellen mit Hilfe von Restriktionsenzymen (= Restriktionsendonukleasen) geschnitten werden. Restriktionsenzyme spalten an bestimmten Erkennungssequenzen die Phosphodiesterbrücken des Desoxyribonucleinsäurerückgrats der DNA. Dabei können glatte Enden (blunt ends) oder überhängende Enden (sticky ends) mit einem kurzen End-Einzelstrang entstehen. Bei den Erkennungssequenzen, die Restriktionsenzym-spezifisch sind, handelt es sich meist um ein vier bis sechs Basenpaar langes Palindrom. Typischerweise werden Vektor und Insert für eine spätere Ligation mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten. In Tabelle 23 ist das verwendete Pipettierschema aufgelistet.

3.1.4 Dephosphorylierung von DNA

Wenn blunt geschnittene oder nur mit einem Restriktionsenzym geschnittene Vektor-DNA in einer Ligation eingesetzt wird, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass der Vektor mit sich selbst ligiert, ohne das gewünschte DNA-Fragment (= Insert) aufzunehmen. Um dies zu vermeiden, wurde die Vektor-DNA vor einer Ligation dephosphoryliert. Das

Tabelle 23: **Pipettierschema für Restriktionsverdau**

X	μg	DNA (1-2 μg)
1	μl	<i>Restriktionsenzym I</i>
1	μl	<i>Restriktionsenzym II</i>
3	μl	Puffer (entsprechend Restriktionsenzymen)
3	μl	BSA (10x)
ad 30	μl	H ₂ O

4 h bei 37 °C

5' Phosphat, das für eine Ligation nötig ist, wird durch eine Phosphatase entfernt, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Plasmids sinkt. Für eine erfolgreiche Ligation sind somit Phosphate an den 5' Enden des Inserts nötig, die entweder über phosphorylierte Primer eingefügt werden oder durch einen Restriktionsverdau des DNA-Produkts vorhanden sind.

Tabelle 24: **Pipettierschema für Dephosphorylierungen mit alkalischer Phosphatase**

30	μl	Ansatz Restriktionsverdau
4	μl	Antarktischer Phosphatase-Puffer
2	μl	Antarktischer Phosphatase
4	μl	H ₂ O

15 min bei 37 °C

Nach der Inkubation des Ansatzes (siehe Pipettierschema in Tabelle 24) wurde die Phosphatase für 5 min bei 60 °C inaktiviert.

3.1.5 DNA Analyse und gelelektrophoretische Auftrennung

Die Gelelektrophorese wird verwendet, um DNA durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Ladung nach in einer Gelmatrix aufzutrennen. Bei einem Agarosegel handelt es sich um über Wasserstoffbrücken quer-vernetzte Moleküle. Je nach enthaltener Menge an Agarose sind die dadurch entstehenden Poren größer oder kleiner. Die negativ geladene DNA, deren negative Ladung proportional zur Größe des Moleküls ist, wandert in Richtung der Anode durch die Poren, wobei kleinere Moleküle weniger stark retiniert werden. Durch einen mitlaufenden Größen-Standard kann eine Aussage über die Größe der Fragmente getroffen werden und durch die Verwendung spezieller GTQ-Agarose (3.1.5) ist eine Reisolation aus dem Gel und somit einer Aufreinigung zur Weiterverwendung möglich.

Agarose-Gel

Ein Agarose-Gel wurde zur Kontrolle eines Restriktionsverdaus, einer RNA-Isolation oder eines Test-Verdaus verwendet.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde Agarosepulver abgewogen, bis zum vollständigen Auflösen in TBE-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlunen auf ~50 °C mit einem

DNA-bindenden Farbstoff (Safe-Red; 1 : 30.000) versehen. Dieser Farbstoff interkaliert in stöchiometrischer Menge in die Helix der DNA und emittiert unter UV-Licht eine grüne Fluoreszenz, wodurch die DNA im Gel detektiert werden kann. Als Laufpuffer wird TBE verwendet. Typischerweise wird eine Agarosekonzentration zwischen 0,8 %-2 % gewählt, wobei gilt: je größer die erwarteten DNA Fragmente sind, desto niedrig-prozentig wird das Gel gegossen. Die Lauffront kann durch Versetzen der Proben mit Probenpuffer sichtbar gemacht werden. Der Probenpuffer stabilisiert den pH-Wert der DNA. Abhängig von der Größe der Gelkammer, wird für 20 - 60 min eine Spannung von 80 - 150 V angelegt.

GTQ-Gel

Soll die DNA nach der Auftrennung weiterverwendet werden, wird GTQ-Agarose (GenTechnologie-Qualität) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine reinere, RNase- und DNase-freie Agarose mit einer niedrigen Schmelztemperatur. Dadurch kann DNA durch Schmelzen des Gels reisoliert werden, ohne die DNA-Doppelstränge durch Denaturierung zu aufzutrennen. GTQ-Agarose Gele werden ebenso in TBE-Puffer angesetzt und mit Safe-Red zur Visualisierung der Banden versehen. Unter UV-Licht können entsprechende Banden ausgeschnitten werden und mit Hilfe des Gel Extraktion Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll isoliert werden.

3.1.6 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die enzymatische Verknüpfung von DNA, katalysiert durch das Enzym Ligase. Dabei werden freie 3'-Hydroxy-Enden mit freien 5'-Phosphat-Enden kovalent verknüpft. Die durch einen Restriktionsverdau entstandenen komplementären Basen der freien Einzelstränge von Vektor- und Ziel-DNA hybridisieren unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und die losen Enden werden über eine Phosphodiesterbindung verknüpft, wodurch rekombinante DNA entsteht. Für die Ligation wird ein molares Verhältnis von 3:1 Inset:Vektor eingesetzt, wobei die eingesetzte Gesamtmenge 100 ng nicht überschreiten sollte. Das Pipettierschema ist in Tabelle 25 aufgeführt. Das Ligationsprodukt kann im Anschluss direkt in kompetente Bakterien eingebracht werden.

Tabelle 25: Pipettierschema für Ligationen

X	μl	Vektor-DNA
Y	μl	Insert-DNA
2	μl	T4 Ligase Puffer
1	μl	T4 Ligase
ad 20	μl	H ₂ O
<hr/>		
3-6 h bei RT oder 16 °C über Nacht		

3.1.7 Expression und Isolation heterologer DNA-Konstrukte

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Um die klonierte rekombinante DNA zu vervielfältigen werden kompetente Bakterien verwendet. Kompetente Zellen sind in der Lage Fremd-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Diese Fähigkeit erlangen Bakterienzellen durch eine Behandlung mit Kalzium- oder Magnesiumchlorid in der Log-Phase ihres Wachstums.

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen werde XL-1 Blue Zellen auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wird am nächsten Tag verwendet um 5 ml einer Vorkultur anzupflanzen. Diese wird nach ~16 h in eine Hauptkultur (200 ml) überführt und weiter inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von OD₆₀₀ ~0,4 wird die Hauptkultur bei 4000 ×g und 4 °C für 15 min pelletiert und in Abhängigkeit der Pelletgröße in 5-10 ml kalten TSS-Puffer aufgenommen. Anschließend werden 200 µl Aliquots der Bakteriensuspension in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Um die Kompetenz der hergestellten Zellen zu berechnen wird eine bekannte Menge Test-DNA (20 ng pMAX-GFP) transformiert und die Transformationseffizienz nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kompetenz} = \text{Koloniezahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{V(\text{ausplattiert})}{V(\text{Gesamt})} \times \frac{1}{\mu\text{g Plasmid}}$$

Hitzeschocktransformationen von Bakterien

Unter Transformation versteht man das nicht-virale Einbringen von Fremd-DNA in Bakterienzellen.

Dabei werden durch einen Hitzeschock Lipide aus der äußeren Membran freigesetzt, wodurch Poren entstehen. DNA kann so durch die durchlässige Membran in die Bakterienzelle gelangen. Der Hitzeschock bewirkt zusätzlich eine Depolarisierung der inneren Membran, wodurch die negativ geladene DNA leichter ins Zellinnere gelangt. Durch einen anschließenden Kälteschock und Freisetzung von Proteinen der äußeren Membran wird die Fluidität der äußeren Membran wiederhergestellt und die innere Membran wieder polarisiert [Panja et al.]

Für die Hitzeschocktransformation wurden kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des gesamten Ligationsansatzes und vorsichtigem Mischen wurden die Zellen 30 min auf Eis ruhen gelassen. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C. Nach weiteren 2 min auf Eis wurde 1 ml XY-Medium pro Ansatz hinzugegeben und für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 5000 ×g zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet in ~100 µl des verbleibenden Mediums resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten mit dem Vektor entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Plasmidpräparation: Mini- und Maxiprep

Nachdem das Plasmid in der Bakterienkultur vervielfältigt wurden, verwendet man eine Plasmidpräparation zur Isolation der DNA. In Abhängigkeit der eingesetzten Kulturmenge unterscheidet man zwischen der Mini- und der Maxiprep. Für die Miniprep werden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum, für eine Maxiprep 200 ml, mit einer Bakterien-Kolonie angeimpft und ~16 h unter Schütteln bei 37 °C wachsen gelassen. Der gesamte Ansatz wurde für die Präparation unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen (bzw. QIAprep Spin Maxiprep Kit) nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

Dabei unterscheidet sich das Isolationsprinzip der beiden Kits grundlegend. Die Plasmid Miniprep basiert auf drei Schritten: Die Freisetzung der Plasmid-DNA durch alkalische Lyse; das Binden der DNA in einem neutralisierenden, stark salzhaltigen Puffer an eine Silicagel-Membran, wobei RNA, Proteine und Metabolite nicht haften und schließlich die Elution der DNA nach mehreren Waschschritten durch einen schwach salzigen Puffer.

Bei der DNA-Maxiprep unterscheiden sich der zweite und dritte Schritt. Die DNA bindet hier in einem schwach salzigen Puffer an eine Anionen-Austauscher-Membran und wird nach dem Waschen mit einem stark salzigen Puffer eluiert. Zur Isolation wird die Plasmid-DNA dann mit Isopropanol gefällt.

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt.

3.1.8 Klonierte Konstrukte

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Konstrukte kloniert. Alle Konstrukte wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Diese sind, unter Auflistung der Klonierungsseite und des Zielvektors in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26: **Klonierte Konstrukte** unter Aufführung des Zielvektors und der verwendeten Restriktionsenzyme

Konstrukt	Zielvektor	Restriktionsenzyme
STIM2.1-mcherry	pIRES1neo-SPS2-STIM2.1	EcoRV
STIM2.1-GFP	pIRES1neo-SPS2-STIM2.1	EcoRV
STIM2.2-mcherry	pIRES1neo-SPS2-STIM2.2	EcoRV
STIM2.2-GFP	pIRES1neo-SPS2-STIM2.2	EcoRV
YFP-STIM2.1	pCDNA5-FRT/TO	SnaBI/KpnI
YFP-STIM2.1-APEX2	pCDNA5-FRT/TO	BlpI
YFP-STIM2.2	pCDNA5-FRT/TO	SnaBI/KpnI
YFP-STIM2.2-APEX2	pCDNA5-FRT/TO	BlpI

Die Funktionalität aller STIM2-Konstrukte wurde mittels Fura2-basiertem Ca^{2+} -Imaging (siehe Abschnitt 3.4.1) in HEK-Orai1 stabilen Zelllinien überprüft. Die Funktionalität von APEX2 wurde mittels Kollokalisationsstudien (siehe Abschnitt 3.4.3) und Westernblot (siehe Abschnitt 3.3.2) nachgewiesen.

3.2 Arbeiten mit humanen Zellen

3.2.1 Zellkultur

Kultivierung und Passage

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien und Primärzellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Gewährleistung der sterilen Bedingungen wurde eine Steril-Bank mit laminarer Luftströmung (Biological safety cabinet, HERAsafe) verwendet. Adhärente Zellen wurden zur Passage oder Transfektion mittels 0,05 % Trypsin + 1x EDTA (Gibco) abgelöst.

Die primäre Zellpräparation erfolgte durch Carmen Hässig aus Leukozyten-Reduktionskammern, die als Abfallmaterial nach der Thrombozytenapherese in der Blutbank anfallen (Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin; Ethikkommission 146/12; AK Saarland).

Verwendete Medien

- MEM: + 10 % FCS wurde für die Kultivierung von HEK293, sowie HEK293-O1 Zellen verwendet.
- RPMI1640: + 10 % FCS wurde für die Kultivierung von Jurkat Zellen verwendet.
- AIMV: Primäre CD4⁺ T Zellen wurden in AIMV Medium mit 10 % FCS kultiviert.
- D-MEM: Die in D-MEM kultivierten Zellen sind unter Angabe der Zusätze in Tabelle 27 aufgelistet.

T-REx ÜE* betrifft die Überexpressionslinien: Flp-In T-REx293-S2.1-APEX2, Flp-In T-REx293-S2.2-APEX2, Flp-In T-REx293-YFP-S2.1 und Flp-In T-REx293-YFP-S2.2 SH-SY5Y ÜE** gilt für: SHSY5Y-APP695 swedish und SH-SY5Y mock, während SH-SY5Y KO*** die Crispr CAS Knock out Zelllinien Zelllinien SH-SY5Y-APP/- und SH-SY5Y-PS1/- betrifft.

Tabelle 27: **Übersicht über die in D-MEM kultivierten Zellen** unter Angabe der Mediums-Zusätze und der kultivierten Zelltypen: Flp-In T-REx293 = T-REx; HEK293T = 293T; ÜE = stabile Überexpression; KO = Knock out

	D-MEM				
	T-REx	T-REx ÜE*	293T	SH-SY5Y ÜE**	SH-SY5Y KO***
+ FCS	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
+ P/S	–	–	1 %	–	–
+ NEAA	–	–	–	1 %	1 %
+ Blastocidin	15 µg/ml	15 µg/ml	–	–	–
+ Hygromycin B	–	200 µg/ml	–	300 µg/ml	–
+ Puromycin	–	–	–	–	2 µg/ml

Differenzierung von SH-SY5Y Zellen

Die Differenzierung von SH-SY5Y Zellen erfolgte mit Hilfe von 10 μM Retinsäure (retinoic acid = RA) [Dwane et al., 2013]. Für die Differenzierung wurden SH-SY5Y Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von $\sim 60\%$ wurde das Kulturmedium durch Differenzierungsmedium ersetzt: D-MEM mit 0,1 % FCS, 1 % NEAA und 10 μM RA (+/- oder Puromycin). Am 6. Tag der Differenzierung, wobei täglich ein Mediumswechsel erfolgte, und 24 h vor der Messung wurden das Serum auf 10 % erhöht.

3.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR = qRT-PCR) ist eine Variante der PCR, bei der mittels des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green (Qiagen) eine Quantifizierung des PCR Produkts möglich ist. Hierzu wird in einem ersten Schritt die aus den geernteten Zellen isolierte RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt wird die generierte cDNA als Matrize für die qRT-PCR eingesetzt.

RNA Isolation

Zur RNA Isolation wurden geerntete und pelletierte Zellen in 700 μl TRIzol (life technologies) resuspendiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur RNA Isolation gelagert. Die RNA Isolation erfolgt nach Herstellerprotokoll. Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe eines 1 % Agarose-Gels kontrolliert, die Konzentration der RNA mit Hilfe eines Photometers bestimmt.

Reverse Transkription

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung der SuperScript II Reversen Transkriptase (Life technologies). Die Besonderheit dieser Polymerase ist, dass sie neben DNA auch RNA als Template verwenden kann. Für die reverse Transkription wurden 0,8 μg der RNA eingesetzt; die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

qRT-PCR

Während der Amplifikation der gewünschten Sequenz, in Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green), kommt es zur Einlagerung des Farbstoffes in die DNA. Der DNA-Farbstoff-Komplex weist eine gesteigerten Fluoreszenz auf. Die Steigerung der Fluoreszenz pro Zyklus ist linear zum Grad der Amplifikation der DNA, da stöchiometrisch mehr DNA-Farbstoff-Komplexe gebildet werden. Aufgrund der Fluoreszenz kann die amplifizierte DNA eines Gens pro Verdopplungszyklus visualisiert und durch einen Vergleich mit einem Referenzgen quantifiziert werden.

Für die qRT-PCR wurden 0,5 μl cDNA, je 300 nM Primer, sowie das QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen) verwendet. Die Spezifität der Produkte wurde anhand ihrer

Schmelzkurve unter Verwendung des Bio-Rad CFX96 Real Time System überprüft. Die Expression der Ziel-Gene wurde auf die Expression des Referenzgens TATA Box Binde-Protein (TBP) normiert. Die verwendeten Temperatur-Zyklen sind in Tabelle 28 aufgeführt. Die in dieser Arbeit abgebildeten qRT-PCR Daten wurden von Gertrud Schwär (AG Hoth), Heike Grimm und Olga Streidenberger (beide AG Hartmann) durchgeführt.

Tabelle 28: **Temperatur-Zyklus-Konditionen für qRT-PCR-Reaktionen**

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	
95	900	
95	30	x45
T _m (58)	30	
72	30	
95	60	
60 - 95	1 °C/5	

3.2.3 Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen von DNA oder RNA in Zellen unter der Verwendung von Plasmid-DNA oder siRNA (small interfering RNA). Hierbei kann zwischen einer zeitlich limitierten Überexpression eines Plasmids (transiente Transfektion) oder einem stabil überexprimiertem Konstrukt (stabile Transfektion, siehe Abschnitt 3.2.4), durch Insertion des Plasmids in das Genom der Zelle, unterschieden werden. Die Transfektion mit Plasmid-DNA führt zu einer heterologen Überexpression eines oder mehrerer Proteine, während das Einbringen von siRNA die Herunterregulation des gewünschten Gens durch Degradation der mRNA (messenger RNA) bewirkt.

Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch kurze elektrische Impulse durchlässig gemacht, so dass Plasmid-DNA oder siRNA in die Zelle eindringen können.

Die Transfektionsbedingungen wurden nach Herstellerangaben (Lonza Amaxa) dem Zelltyp entsprechend angepasst. Nach Abzentrifugation der Zellen wurden das Zellpellet in jeweils 100 µl Opti-MEM oder Nukleofectorlösung aufgenommen und X µg DNA zugegeben. Die gewählten Parameter sind die Tabelle 29 aufgeführt.

Lipofektion

Bei der Lipofektion erfolgt das heterologe Einbringen der DNA mittels Liposomen. Dabei wird die DNA mit lipophilen Agenzien inkubiert, wodurch Lipid-Vesikel gebildet werden, welche die DNA enthalten. Durch Endocytose der Vesikel gelangt die DNA ins Zellinnere.

Für die Lipofektion wurde Lipofectamin2000 (Thermo Fisher) bzw. FuGENE (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Lipofektion wurde für die Plasmid-

Tabelle 29: **Elektroporationsbedingungen** der aufgeführten Zelltypen unter Angabe der transfizierten Konstrukte (P = Plasmid; si = siRNA), der eingesetzten Zellzahl, der verwendeten Nukleofector-Lösung (Lsg), dem gewählten Programm (Prog.), sowie dem Gerät

Zelltyp	Konstrukt	Zellzahl	Lsg	Programm	Gerät
HEK	P/si	1,5-2 x 10 ⁶	Opti-MEM	Q-001	NF II
HEK-O1	P	1,5-2 x 10 ⁶	Opti-MEM	Q-001	NF II
Jurkat	P	T25 ZKF	SE	Cell line	NF 4D
CD4 ⁺	si	5 x 10 ⁶	T-Cell	U-014	NF II

Tabelle 30: **Transfektion via Lipofektion** unter Angabe der Fläche für Zellwachstum (Größe ZKG), der eingesetzten DNA und Menge, sowie des verwendete Transfektionsreagenz (Reagenz).

Größe ZKG	DNA	Menge	Reagenz
75 cm ²	20 µg	60 µl	Lipofectamin2000
25 cm ²	7 µg	21 µl	Lipofectamin2000
9,5 cm ²	total 1 µg (siehe 3.2.4)	3 µl	FuGENE
18 mm ²	0,2 µg	1 µl	Lipofectamin2000

Transfektion von HEK293T Zellen, sowie zur Generierung der stabilen Flp-In T-Rex293 verwendet. Die verwendeten Mengen DNA und Lipofektionsreagenz in Abhängigkeit der Oberfläche des Zellkulturgefäßes (ZKG) und somit Zellzahl sind in Tabelle 30 aufgeführt.

3.2.4 Etablierung stabiler Zelllinien

Eine stabile Zelllinie entsteht, wenn das transfizierte Konstrukt in das Genom inseriert. Dies geschieht selten und im Abhängigkeit vom gewählten Vektorsystem zufällig. Durch eine Resistenz, die auf dem Plasmid kodiert ist, werden die Zellen selektiert, die das Konstrukt und die damit verbundene Resistenz aufgrund einer Integration des Vektors ins Genom dauerhaft exprimieren.

Für die Generierung stabiler Zelllinien wurde hier ein Zellsystem verwendet, dass nicht auf eine zufällige Integration angewiesen ist, die Flp-In T-Rex293 Zelllinie. Diese Zellen enthalten eine stabil integrierte FRT Seite. Durch die Verwendung eines Vektors, der ebenfalls eine FRT Seite enthält (pCDN5-FRT/TO) und die Kotransfektion mit einem Flipase kodierenden Plasmid (pOG44) wird die Wahrscheinlichkeit für eine stabile Integration durch homologe Rekombination gesteigert. Die Expression des gewünschten Gens liegt unter der Kontrolle eines CMV/TetO₂ Promotors, der in Absenz von Induktion die Expression des Gens unterdrückt. Diese Zelllinie gewährleistet, dass das Gen nicht zufällig integriert, sondern immer an die gleiche transkriptionell aktive Stelle im Genom integriert. Dies garantiert eine vergleichbare Genexpression in verschiedenen stabilen Zelllinien.

Folgende Zelllinien wurden unter Verwendung dieses Systems hergestellt: Flp-In T-REx 293-YFP-S2.1, sowie -YFP-S2.2. Dabei wurden die Zellen in 6 well Platten ausplattiert und am Folgetag transfiziert. Das Verhältnis von pOG44 (Flipase tragender Vektor) und

pCDNA5-FRT/TO-X (mit entsprechendem Gen) betrug 4:1 (800 ng pOG44 und 200 ng pCDNA5-FRT/TO). 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium erneuert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen gesplittet. 24 Stunden nach Überführen der Zellen in ein frisches Zellkulturgefäß wurde die Selektion mittels Hygromycin B gestartet. Die Selektion der stabilen Zellen erfolgte über mehrere Wochen.

Die Zelllinien Flp-In T-REx 293-YFP-S2.1 und Flp-In T-REx 293-YFP-S2.2 wurden polyklonal weiterverwendet.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 *in vivo* Biotinylierung via APEX2

Die *in vivo* Biotinylierung ist eine effiziente Methode Interaktionspartner für ein Protein zu identifizieren. Hierfür wird eine artifiziell konstruierte monomere Ascorbat Peroxidase (=APEX2) [Lam et al, Martell et al] verwendet. Diese ist durch fehlende Disulfide und Ca^{2+} -Bindestellen, im Gegensatz zu beispielsweise der Meerrettich Peroxidase (HRP = horseradish peroxidase), auch im reduzierenden Zytosol lebender Zellen aktiv. Durch APEX2 und in Anwesenheit von H_2O_2 wird die Oxidation von Biotin-Phenol zu Biotin-Phenoxyl katalysiert. Hierbei handelt es sich um ein sehr reaktives kurzlebige Radikal, das mit elektronenreichen Aminosäuren benachbarter Proteine reagiert und kovalent an diese bindet [Lam et al]. Indem APEX2 mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert wird, können die Proteine in unmittelbarer Nähe markiert werden. Dabei beträgt der Reaktionsradius <20 nm, welches die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es sich bei den biotinylierten Proteinen um Interaktionspartner handelt.

Für die *in vivo* Biotinylierung wurden HEK293T Zellen bei ~60 % Konfluenz mit einem APEX2-markiertem Konstrukt transfiziert. 16 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 30 Minuten mit 500 μM Biotin-Phenol inkubiert und die Peroxidase-Aktivität durch Zugabe von 1 μM H_2O_2 initiiert. Die Reaktion wurde nach einer Minute durch mehrmaliges Waschen gestoppt. Die Waschlösung enthielt sowohl Antioxidantien (Trolox, Natriumascorbat), um eine weitere Radialbildung von Biotin-Phenol durch H_2O_2 zu verhindern, als auch Natriumazid, dass durch ein Binden an Häm-Gruppen die Peroxidase-Aktivität inhibiert. Anschließend wurden die Zellen für Immunzytochemie fixiert (siehe Abschnitt 3.3.3), für Westernblot geerntet (siehe Abschnitt 3.3.2) oder die biotinylierten Proteine angereichert und via Massenspektrometrie (siehe Abschnitt 3.3.4) analysiert.

3.3.2 SDS-Page und Westernblot

Der Westernblot dient zur Untersuchung und dem Nachweis von Proteinen. Hierfür werden Zelllysate zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran übertragen. Auf dieser können die untersuchten Proteine durch die Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Herstellen von Zellysaten

Zur Herstellung von Zellysaten wurden die Zellen aus T25 Kulturflaschen mittels eines Zell-schabers geerntet, pelletiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde zum langsamen Aufbrechen der Zellstruktur über Nacht bei -20 °C bzw. -80 °C eingefroren und anschließend in RIPA-Puffer ($\sim 50\text{ }\mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen) für 1-3 Stunden unter Schütteln bei 4 °C lysiert. Der Abbau von Proteinen wurde durch die Zugabe von Proteinaseinhibitor (5 Units) minimiert. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde das Lysat 20 Minuten bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und während der Proteinbestimmung auf Eis gelagert. Die Aufbewahrung der Lysate erfolgte bei -20 °C , eine Langzeitlagerung bei -80 °C .

Bestimmung der Proteinkonzentration: BCA und DC Protein Assay

BCA Assay

Die BCA-Reaktion (bicinhonic acid) basiert auf dem Prinzip, dass die Peptidbindungen von Proteinen zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) in einer Temperatur-abhängigen Reaktion zu Cu^+ reduzieren. Daraufhin chelieren zwei BCA-Moleküle mit dem einwertigen Kupferion. Die Absorption des violetten BCA-Kupfer-Komplexes kann bei 562 nm photometrisch vermessen werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) verwendet und nach Herstellerangaben in 96-well Platten durchgeführt. Zur Erstellung der Eichgerade wurden BSA-Standard Stocklösungen ($0,01$; $0,02$; $0,04$; $0,06$; $0,08$ und $0,1\text{ mg/ml}$) verwendet. Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde anhand einer Dreifachbestimmung unter der Verwendung drei verschiedener Verdünnungen bestimmt. Die Platte wurde $45 - 60$ Minuten bei $\sim 50\text{ °C}$ inkubiert und nach Abkühlen bei 540 nm im Plattenreader analysiert. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte über die mitgemessene Eichgerade.

DC Protein Assay

Das DC (detergent compatible) Protein Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration, bei der in einem ersten Schritt, ebenso wie im BCA-Assay zweiwertige Kupferionen mit den Proteinen reagieren. Der Unterschied der beiden Reaktionen liegt im zweiten Schritt. Hier reagiert beim DC Protein Assay nicht das Cu^+ Ion, sondern der Protein-Kupfer Komplex und reduziert das gelbe Substrat Folin, wodurch ein Farbumschlag zu blau innerhalb von 15 Minuten eintritt. Zur Bestimmung wurde das DC Protein Assay von BioRad verwendet. Hierfür wurde $10\text{ }\mu\text{l}$ des Lysats in $190\text{ }\mu\text{l}$ RIPA Puffer oder H_2O gegeben. Hierzu wurden $65\text{ }\mu\text{l}$ Reagenz A, $500\text{ }\mu\text{l}$ Reagenz B und $4\text{ }\mu\text{l}$ Reagenz S pipettiert, sorgfältig gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte bei 750 nm in Küvetten im Photometer. Eine Eichgerade wurde mit Hilfe von BSA-Standard Lösungen erstellt ($0,0$; $0,25$; $0,5$; $0,75$; $1,0$ und $1,5\text{ mg/ml}$).

SDS-Page

Die Sodium Dodecyl Sulfat - Polyacrylamid Geleelectrophorese (SDS-Page) ist eine Methode um Proteine aufzutrennen. Typischerweise hängt die Geschwindigkeit mit der Proteine im Gel in Richtung Anode wandern von ihrer Größe, Ladung und Konformation ab. Durch Erhitzen der Probe und das Zugeben von β -Mercaptoethanol sowie SDS wird die Probe linearisiert, wodurch die Abhängigkeit der Laufgeschwindigkeit auf Größe und Ladung des Proteins reduziert wird. Das anionische Tensid SDS bindet mit 1,4g/g Protein an Proteine, zerstört die Tertiärstruktur von Proteinen durch das Aufbrechen von nicht-kovalenten Bindungen und überdeckt mit seiner negativen Ladung die Eigenladung der Probe. Dies gewährleistet eine Auftrennung der Proteine ausschließlich nach Größe auf dem diskontinuierlichen Gel. Die beiden Gele (Trenn- und Sammelgel) unterscheiden sich in ihrem pH und der Porengröße und werden verwendet, um die Proteine zunächst im Sammelgel (neutral; große Poren) zu sammeln, bevor die Auftrennung im Trenngel (basisch, kleinere Poren) erfolgt. An der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel kommt es zu einem Sprung im elektrischen Feld, wodurch eine Kondensation der Proteine ermöglicht wird.

Typischerweise wurde ein 8 - 10 % Trenngel und ein 5 % Sammelgel verwendet. Als Größenstandard wurde der Dual Colour Marker (BioRAD) verwendet. Die Proben wurden mit 2 \times bzw. 5 \times Lämmli gemischt und aufgetragen. Leere Taschen wurden mit Lämmli-puffer aufgefüllt. Die Herstellung von Trenn- und Sammelgel erfolgte nach dem Schema aufgeführt in den Tabellen 31 und 32 unter der Verwendung von BioRad Glasplatten zur Herstellung von SDS-Gelen. Die Auspolymerisierung der Gele erfolgte bei Raumtemperatur.

Tabelle 31: **Pipettierschema für 8 % (10 %) Trenngele**

2,5	ml	Trenngelpuffer
2,0 (2,5)	ml	Acrylamid
5,41 (4,91)	ml	H ₂ O
75	μ l	APS
15	μ l	TEMED

Tabelle 32: **Pipettierschema für Sammelgele**

1,25	ml	Sammelgelpuffer
0,63	ml	Acrylamid
3,08	ml	H ₂ O
37,5	μ l	APS
7,5	μ l	TEMED

Das Gel wurde in einem 1 \times SDS-Laufpuffer an die Stromquelle angeschlossen, welche zunächst auf 80 V eingestellt wurde. Nach Einlaufen der Proben in das Trenngel, was anhand der beginnenden Auftrennung des Markers zu erkennen ist, wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

Westernblot

Proteintransfer

Vor der Detektion des Proteins, müssen die Proteinbanden, nach erfolgreicher Auftrennung im Gel, auf die Trägermembran übertragen werden. Hierfür wird eine Spannung quer zur Laufrichtung der Banden angelegt. Dieser Vorgang wird als „blotten“ bezeichnet. Als Trägermembran kann Nitrozellulose oder PVDF (Polyvinylidendifluorid) verwendet werden. Bei der Verwendung einer PVDF-Membran wird durch vorheriges Einlegen in Methanol die Hydrophobie der Membran gemindert. Durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen haften die Proteine an der PVDF-Membran, durch ionische und polare an der Nitrozellulosemembran.

Das Blotten erfolgte entweder in eine BioRad-Kammer gefüllt mit Transferpuffer für 90 Minuten bei 4 °C unter Anlegen einer Stromstärke von 350 mA oder für 70-80 Minuten mit Hilfe des halb-trockenen elektrophoretischen Transfermoduls von Tyler Research bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Markerbanden auf der Trägermembran nachgezeichnet.

Proteindetektion

Um zu verhindern, dass der zur Proteindetektion verwendete Antikörper an freie Stellen der Membran bindet, werden diese geblockt. Hierzu wurde die Membran 60 - 90 Minuten in 5 % Milchpulver unter Schütteln inkubiert und anschließend mit dem Antigen-spezifischen Primärantikörper für 16 - 72 Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Vor der Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurde die Membran 3 × 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Verwendung eines Sekundärantikörpers ist von Vorteil, da sie nicht nur eine Kostenersparnis darstellt, da nicht jeder Primärantikörper gekoppelt werden muss, sondern ebenso, da es hierdurch zu einer Verstärkung des Signals kommt. Dies ist der Fall, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 60 Minuten auf dem Schüttler. Anschließend wurde der Blot zwei weitere Male mit TBST (je 10 Minuten) und im letzten Waschschrift mit TBS gewaschen, da Tween 20 mit der ECL-Lösung reagieren kann. Die Membran wurde für 1 - 5 Minuten in der ECL-Lösung inkubiert und entweder mittels des ChemiDoc XRS oder auf einem Röntgenfilm entwickelt.

3.3.3 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie (ICC = immunocytochemistry) wird verwendet, um bestimmte Proteine oder Zellstrukturen mittels Antikörper anzufärben und somit unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Dabei kann man zwischen der direkten und der indirekten Methode unterscheiden. Die indirekte Methode wird ein Primär-Antikörper mit einem gegen das Protein gerichtete Epitop verwendet, der dann durch einen an ein Reporterenzym gekoppeltes Sekundärantikörper erkannt wird. Bei der direkten Methode ist der gegen ein

Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtete Antikörper direkt an ein Reporterenzym, beispielsweise ein Fluorophor gekoppelt.

Diese Art der Immunfärbung kam bei der Analyse der Biotinylierung zum Einsatz. Hier wurde die *in vivo* Biotinylierung mittels Alexa Fluor 568 gekoppeltes Streptavidin detektiert. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz von ~60 % mit APEX2-gekoppelten Konstrukten transfiziert und wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben behandelt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit $1 \times$ PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit kaltem 4 % PFA fixiert. Alle weiteren Waschschrte wurden mit $1 \times$ PBS durchgeführt, wobei waschen ausschließlich zugeben, schwenken und absaugen der Waschlösung bedeutete. Nach zwei weiteren Waschschrten wurden PFA neutralisiert, indem für 10 Minuten 50 mM Ammonium Chlorid zu den Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden diese drei Mal gewaschen, mit eiskaltem Methanol (10 Minuten bei 4 °C) bzw. 0,2 % Triton-X (10 Minuten bei Raumtemperatur) permeabilisiert und erneut drei Mal gewaschen. Das Blocken erfolgte in 5 % Ziegen Serum für 45 - 60 Minuten. Anschließend wurden die Zellen mit Streptavidin-AF568 (Thermo Fisher) für 60 Minuten im Dunkeln inkubiert, um durch die starke nicht kovalente Bindung von Streptavidin an Biotin die biotinylierten Proteine zu detektieren. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend wurden die Deckgläschen kurz in H₂O eingetaucht, überschüssiges Wasser entfernt und das Deckgläschen in Eindeckmedium (Pro-Long Diamond Antifade Mountant with DAPI von Thermo Fisher) auf einen Objektträger gegeben. Das Eindeckmedium wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln trocknen gelassen, die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln. Zur Analyse wurde ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop von Leica (Leica TCS SP5) verwendet.

3.3.4 Massenspektrometrie

SILAC

SILAC steht für stabile Isotop-Markierung durch Aminosäuren in Zellkultur (st^abⁱl^e is^to^pe lab^elⁱng wit^h amⁱn^o acⁱd^s in ce^ll cu^lt^ur^e). Hierfür werden Zellen in einem Nährmedium kultiviert, welches anstatt der leichten Aminosäuren in herkömmlichem Kulturmedium Aminosäuren mit schweren Isotopen enthält. Diese werden bei der Proteinsynthese eingebaut, so dass bei der Analyse zwischen Zellen, die in schwerem oder leichtem Nährmedium kultiviert wurden, unterschieden werden kann. Bei der Massenspektrometrie nutzt man dieses System, um Kontrollen mitzuführen. Die gängigsten verwendeten Aminosäuren sind Arginine und Lysine, da die für Proteomik hauptsächlich verwendete Protease Trypsin die Peptidbindungen nach eben diesen basischen Aminosäuren schneidet und so gewährleistet ist, dass nahezu alle entstehenden Peptide markiert sind.

Ein Schema für die in der Arbeit verwendeten Durchführung ist in Abbildung 6 dargestellt. Für das Markieren der Proteine wurden HEK293T Zellen mit einer Konfluenz von ~10-15 % in T25 Zellkulturflaschen gesplittet und 10 Tage lang entweder in schwerem oder

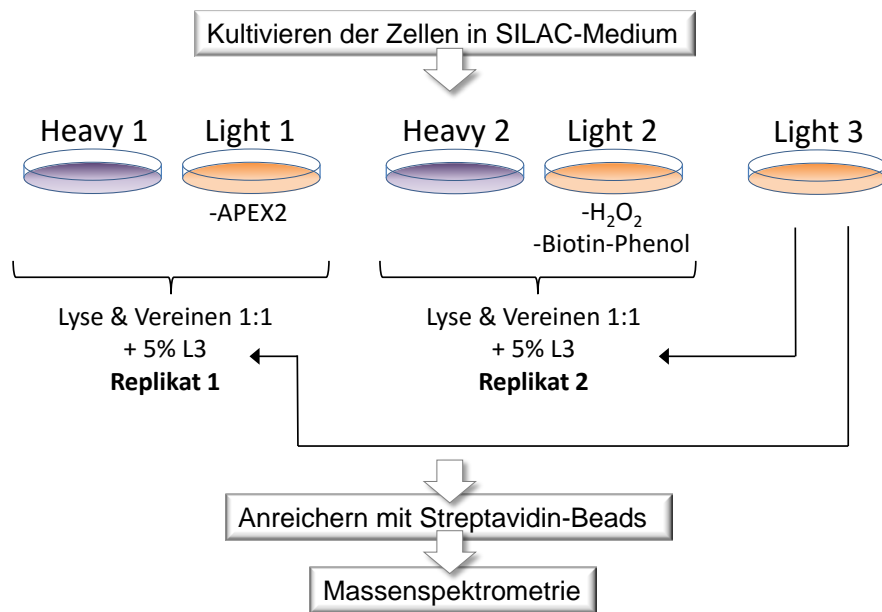


Abbildung 6: Darstellung der Durchführung von SILAC und zur Vorbereitung der Proben für eine massenspektrometrische Analyse

leichtem Nährmedium kultiviert. Dabei wurde D-MEM Medium für SILAC (ohne L-Arginin und L-Lysin) mit 84 mg/L L-Arginin und 146 mg/L L-Lysin für das leichte Kulturmedium komplementiert. Die entsprechende Konzentration markierter Aminosäuren wurde für das schwere Nährmedium eingesetzt, d.h. aufgrund ihres erhöhten Molekulargewichts 106 mg/L L-Arginin- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ (Arg10) und 191 mg/L L-Lysin $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ (Lys8). Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz alle zwei Tage gesplittet und an Tag 7 auf zwei T75 Zellkulturflaschen mit schwerem Medium (H1, H2 [Heavy]) und drei Zellkulturflaschen mit leichtem Medium (L1, L2 L3 [Light]) expandiert. An Tag 9 wurden alle Zellen, ausgenommen L1, transfiziert und 18 Stunden nach Transfektion die Biotinylierung mit Ausnahme von L2 durchgeführt. In Tabelle 33 ist die Kultivierung und Behandlung der verschiedenen Ansätze aufgeführt.

Tabelle 33: Übersicht über Behandlung der Zellen für Masspektroskopie

	schwere AS	leichte AS		
	H1 / H2	L1	L2	L3
+ YFP-STIM2-APEX2	✓	-	✓	✓
+ Biotin-Phenol + H ₂ O ₂	✓	✓	-	✓

Nach dem Ernten der Zellen, der Zellyse (siehe Abschnitt 3.3.2) und der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 3.3.2) wurden H1 und L1 zum Replikat 1 (R1), ebenso wie H2 und L2 (Replikat 2 = R2) in einem Proteinverhältnis von 1:1 vermischt. Zu beiden Lysat-Mischungen wurde 5 % L3 dazugegeben, um im späteren Verlauf die Quantifizierung der Isotopenverhältnisse zu erleichtern.

Anreicherung biotinylierter Proteine

Für die Analyse im Massenspektrometer wurden die biotinylierten Proteine aus den Proteinlysaten R1 und R2 angereichert. Hierfür wurden magnetische Streptavidin-beschichtete Kügelchen verwendet. Dabei wurden 4 mg/ml beider Replikate über Nacht bei 4 °C mit 5 mg der Streptavidin-beschichteten Partikeln (NEB) auf einem Rotator inkubiert. Die Bindekapazität der eingesetzten Partikel betrug 30-40 µg des biotinylierten Proteins pro mg Kügelchen. Am Folgetag wurde das Partikel-Lysat Gemisch eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 2 × mit RIPA Puffer, 1 × 2 M Urea in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und weitere 2 × mit RIPA Puffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der biotinylierten Proteine von den Kügelchen erfolgte durch Erhitzen der Proben für 5 Minuten bei 95 °C in 60 µl 4 × Laemmli Puffer mit 2 mM freiem Biotin.

Silber-Blau Coomassie Färbung

Nach der Anreicherung der biotinylierten Proteine wurden die Replikate 1 und 2 auf ein SDS-Gel aufgetragen (5 % Sammelgel, 12 % Trenngel) und zu $\frac{2}{3}$ des Trenngels laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel in einer Lösung aus 30 % Methanol und 10 % Essigsäure für 45 min fixiert, 3 × in ddH₂O gewaschen und über Nacht auf einem Schüttler mit Hilfe von silber-blau Coomassie gefärbt.

Tabelle 34: Silber blau Coomassie Färbung

100 g	Phosphorsäure (10 %)
100 g	Ammoniumsulfat (10 %)
1,2 g	Coomassie Blue G-250
<hr/>	
ad 800 ml dH ₂ O	
<hr/>	
+ 200 ml 100 % Methanol	

Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wird zur Messung der Masse von Molekülen verwendet. Hierfür müssen die Proben mittels eines In-Gel-Verdaus vorbereitet werden. Dies beinhaltet die Entfärbung der durch Silver-Blue Coomassie Staining angefärbten Proteinbanden, die Reduktion und Alkylierung der in den Proteinen enthaltenen Cysteine, was zu einer Entfaltung des Proteins führt, sowie die Gelextraktion der Peptide, die zuvor durch eine proteolytische Spaltung der Proteine durch Trypsin erzeugt wurden. Die Peptide werden nun in ihre Gasphase überführt und ionisiert. Durch eine Beschleunigung in einem elektrischen Feld, können die Ionen nach ihrem Masse zu Ladungs Verhältnis (m/z Verhältnis) aufgetrennt werden. Über die Kopplung des Massenspektrometers an einen Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (high performance liquid chromatography, HPLC) können die Peptide zusätzlich identifiziert und quantifiziert werden.

Die massenspektrometrische Analyse wurde in der Massenspektrometrie-Einrichtung der Alberta Universität durch Jack Moore durchgeführt. Hierfür wurden die zu untersuchenden Spuren aus dem Gel ausgeschnitten, in 10 gleich große Banden unterteilt und mit Hilfe von 100 mM Ammonium Bicarbonat/Acetonitril (50:50) entfärbt. Der nächste Schritt umfasste die Reduktion (10 mM BME in 100 mM Bicarbonat) und die Alkylierung (55 mM Iodacetamid in 100 mM Bicarbonat) von Cysteinen, welche die Auftrennen der Disulfidbrücken von Proteinen bewirken. Dies gewährleistet, dass die Proteine entfaltet vorliegen. Nach dem Trocknen wurden die Gelstücke mit Trypsin bedeckt (6 ng/ μ l) und 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die trypsinisierten Peptide wurden zweifach extrahiert. Zunächst mit Hilfe von 97 % Wasser, 2 % Acetonitril und 1 % Ameisensäure und anschließend in einem zweiten Schritt unter Verwendung von 50 % des vorher verwendeten Extraktionspuffers, sowie 50 % Acetonitril.

Die Peptid-enthaltenden Fraktionen wurden in einer wässrigen Lösung mit 25 % Acetonitril und 1 % Ameisensäure gelöst und mittels einer mit einem LTQ XL-Orbitrap Hybrid-Massenspektrometer verbundenen nanoflow HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Easy-nLC II, Thermo Scientific) ionisiert. Für die Nanoflow-Chromatographie und die Elektrospray-Ionisierung wurde eine PicoFrit-Silica-Kapillarsäule (ProteoPepII, C18) mit einem Innendurchmesser von 100 μ m verwendet. Das Peptid-Gemisch wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 3000 nL/min in die Säule injiziert und mit 500 nL/min über 75 Minuten über einen linearen Gradienten (0 - 40 % wässriges Acetonitril) in 0.2 % Ameisensäure aufgetrennt. Das Massenspektrometer wurde im Daten-abhängigen Aufnahme-modus verwendet und zeichnete hoch-auflösende Orbitrap Untersuchungsspektren auf. Dabei wurde eine externe Massenkalkulation, mit einer Auflösung von 30.000 und einer m/z (Masse zu Ladung) Spannbreite von 400-2000, verwendet. Die 14 Stärksten mehrfach geladenen Ionen wurden nacheinander durch Kollisions-induzierte Dissoziation fragmentiert und ihre Spektren wurden in einer linearen Ionenfalle aufgenommen. Nach zwei Fragmentierungen wurden alle für die Dissoziation ausgewählten Vorläufer für 60 s dynamisch ausgeschlossen. Die Datenprozessierung erfolgte mittels Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) und eine humane Datenbank (Uniprot) wurde mittels SEQUEST (Thermo Scientific) durchsucht. Die Suchparameter schlossen eine Massentoleranz der Vorläufer von 10 ppm (parts per million) und eine Massentoleranz von 0.8 Da für die Fragmente ein. Die Peptide wurden unter der Annahme von Carbamidomethyl-Cysteinen als eine statische Modifikation und schwerem Arginin ($^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$) und Lysin ($^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$), oxidiertem Methionin und desamidiertem Glutamin und Asparagin als dynamische Modifikation untersucht.

Auswertung Massenspektrometrie

Für die Auswertung der Massenspektrometrie-Daten der zwei Replikate für jeweils STIM2.1 und STIM2.2 wurde Excel verwendet. Da vor der Probenvorbereitung die Zellen in SILAC Medium kultiviert wurden, wurden die gefundenen Hits entsprechend ihres H/L Wertes (H

= heavy; L = light) sortiert. Ein hoher H/L Wert steht für einen möglichen Interaktionspartner da dieses Protein vermehrt in den behandelten Zellen (Heavy) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Light) gefunden wurde. Für jedes Replikat der beiden Spleißvarianten wurde der Mittelwert des H/L Wertes aller gefundenen Proteine, sowie die Standardabweichung bestimmt. Nur Proteine, deren H/L Werte einen Grenzwert überschritten (Mittelwert plus eine Standardabweichung) wurden für die weitere Analyse verwendet. Anschließend wurden die Protein-spezifische Zugangsnummern (Accession Code) der vier verschiedenen Replikate (zwei pro Spleißvariante), die mit ihrem H/L Wert über dem Grenzwert lagen, alphabetisch geordnet und auf die Anzahl ihrer Vorkommen untersucht.

3.3.5 Immunpräzipitation GFP-markierter Fusionsproteine

Zum Nachweis der Interaktion zweier Proteine eignet sich die biochemische Methode der Ko-Immunpräzipitation. Hierbei wird mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen eines der Proteine dieses aus Zelllysaten angereichert. Dies geschieht durch Kopplung des Antikörpers an eine Trägersubstanz, wie Agarose- oder magnetische Kügelchen, die nach Antikörper-Antigen Bindung isoliert werden kann. Neben der Isolation des Antigen-tragenden Proteins kann es zur Ko-Immunpräzipitation von Interaktionspartnern kommen. Mittels Westernblot-Analyse können im Anschluss neben dem angereicherten Protein auch dessen Interaktionspartner nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurden zur Isolation von YFP-STIM2.1 und YFP-STIM2.2 und deren jeweiligen Interaktionspartnern GFP-Trap[®]_M Partikel der Firma chromotek verwendet. Dabei sind Fragmente des rekombinanten GFP-Antikörpers kovalent an magnetische Kügelchen gebunden. Als Zellsystem wurden die stabilen T-REx293-YFP-STIM2.1 und T-REx293-YFP-STIM2.2 eingesetzt. Die Immunpräzipitation wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Nach Sammeln der verschiedenen Fraktionen (Input, nicht-gebundene Fraktion und gebundene Fraktion) wurden diese auf ein SDS-Gel geladen und per Westernblot analysiert.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Ca²⁺-Imaging mit Fura2-AM

Zur Untersuchung der Aktivität von Ca²⁺-Kanälen gibt es verschiedene Herangehensweisen. Neben der elektrophysiologischen Patch-clamp Technik, bei der Ionenströme über die Plasmamembran gemessen werden, gibt es die Mikroskopie-Methode des Fura2-AM basierendem Ca²⁺-Imaging. Diese gibt Auskunft über die globale zytosolische Ca²⁺-Konzentration. Durch die Verwendung verschiedener Messprotokolle und die Anpassung der extrazellulären Lösungen, in denen die Zellen gehalten werden, können dabei verschiedene Kalziumkanäle untersucht werden.

Methode

Zur Analyse der intrazellulären, zytosolischen Kalziumkonzentration werden die Zellen 30 min mit 1 - 2 μM des ratiometrischen Fura2-AM, einem Ca^{2+} -Chelator, inkubiert und beladen. Über eine Acetoxymethylester-Gruppe (AM-Gruppe) gelangt das unpolare Molekül Fura-2 AM mittels passiver Diffusion in die Zelle. Nach der intrazellulären Abspaltung der AM-Gruppe durch zelleigene Esterasen verbleibt das polare Molekül in der Zelle. Fura-2 kann mit 340 nm und 380 nm angeregt werden, wobei hierbei die Kalzium-gebundene (340 nm) bzw. Kalzium-ungebundene (380 nm) Fraktion angeregt werden. Die Emission erfolgt jeweils bei 510 nm. Bei einer Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verändert sich anteilig der Kalzium-gebundene, sowie -freie Teil der Farbstoffmoleküle. Durch das Bilden des 340/380 Quotienten kann somit die Änderung über Zeit verfolgt werden. Durch eine *in vitro* Kalibration können Ratiowerte im linearen Bereich des Quotienten für R vs. Ca^{2+} in Kalziumkonzentrationen umgerechnet werden. Hierfür wird der minimale Ratiowert durch Entleerung aller intrazellulären Ca^{2+} -Speicher mittels Ionomycin und Thapsigargin, sowie der maximale Ratiowert durch Perfusion mit einer 20 mM haltigen Ca^{2+} -Lösung bestimmt. Die Umrechnung der Ratiowerte in Kalzium erfolgt mit Hilfe folgender Formel [Grynkiewicz et al., 1985]:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

Dabei beschreibt K_d die Dissoziationskonstante. R steht für den individuell gemessenen Ratio-Wert zu jedem Zeitpunkt, R_{\min} für den minimalen Wert des gebildeten Quotienten, der mit Hilfe einer Kalibration festgestellt wurde und R_{\max} für den maximalen Wert. S_{f2} ist der Ca^{2+} -freie Wert bei 380 nm, während S_{b2} für den Ca^{2+} -gebundenen Wert von Fura-2 bei $\lambda_{380 \text{ nm}}$ steht.

Für die Messungen wurden adhärente Zellen nach der Transfektion oder mindestens 16 h vor der Messung auf Glas-Deckgläschen ausgesät. Sollten Suspensionszellen gemessen werden, wird der Glasträger am Messtag 30 min mit Poly-L-Ornithin beschichtet und anschließend die Zellen anhaften gelassen (10 min). Der Glasträger wurde in eine Perfusionskammer eingebaut, welche von oben durch ein weiteres Deckgläschen verschlossen wurde. Über einen Zulauf kann Lösung zu den Zellen gegeben werden, wobei überschüssige Flüssigkeit über einen Ablauf abgesaugt wurde. Dieses System ermöglichte einen Austausch der die Zellen umspülenden Lösung, so dass, anhand von aufeinanderfolgenden Perfusionsritten oder spezifischen Lösungen, verschiedene Kalziumkanäle aktiviert und untersucht werden konnten. Während der gesamten Messung erfolgte alle 5 sec eine Aufnahme des 340 nm und 380 nm Kanals, um so die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration über Zeit aufzuzeichnen.

Messprotokolle

Im Zuge dieser Arbeit wurden sowohl der Orai-vermittelte speichergesteuerte Kalziumeinfluss, als auch spannungsgesteuerte Kanäle (Ca_v) analysiert. Um SOCE zu messen, wurden das Ca^{2+} Readditions-Protokoll verwendet; für Ca_v -Kanäle ein „hoch Kalium“ Protokoll. Eine schematische Übersicht über die Perfusionschritte ist in Abbildung 7 dargestellt. Mit Hilfe des Ca^{2+} Readditions-Protokolls können verschiedene Parameter des STIM-Orai vermittelten speichergesteuerten Kalziumeinstroms analysiert werden: das basale Kalzium, d.h. die Kalziumkonzentration, die in ruhenden Zellen vorliegt; Kalzium-Rate, -Maximum (Peak) und -Plateau, die Auskunft über die Aktivität von SOCE geben.

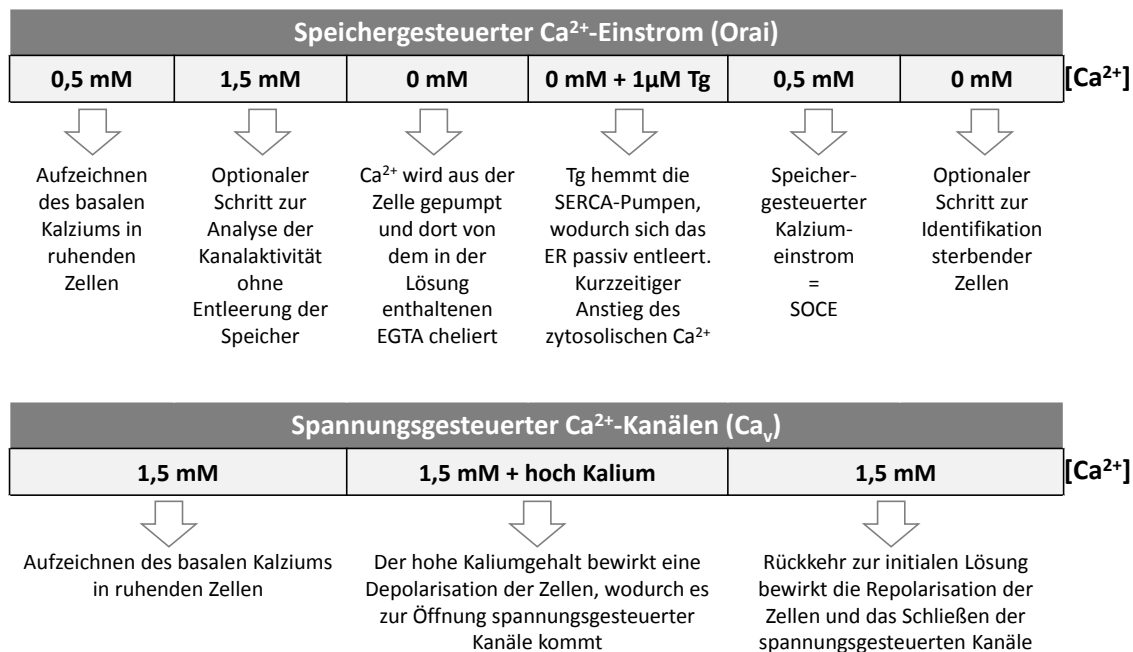


Abbildung 7: **Darstellung der Lösungswechsel bei der Analyse von SOCE bzw. Ca_v -Kanälen.** Tg = Thapsigargin; Ca^{2+} -Imaging Protokoll für SOCE (oben) und Ca^{2+} -Imaging Protokoll für Ca_v -Kanäle (unten) unter Angabe der verwendeten Kalziumkonzentrationen der Perfusionslösungen, sowie weiteren Zusätzen.

Hierfür werden die Zellen zunächst in einer 0,5 mM - 1,5 mM Ca^{2+} -Ringerlösung gehalten. Die Quantifizierung dieses Bereiches gibt Auskunft über das basale zytosolische Kalzium der Zellen. Anschließend wird die externe Lösung durch eine Ca^{2+} -freie Lösung ersetzt. Die abfallenden Kalziumkonzentration nach dem Lösungswechsel in [nM/s] gibt Auskunft über die Pumprate. Nach einigen Zyklen wird eine Thapsigargin (Tg)-haltige Ca^{2+} -freie Lösung zugegeben, die durch irreversible Hemmung der SERCA-Pumpe eine Entleerung des Kalziumspeichers bewirkt. Durch Subtraktion des maximalen Werts in Folge der Tg-Applikation und des letzten Wertes vor Tg-Applikation erhält man den

ΔTg -Peak. Hierauf folgt der Readditionsschritt, in dem die Zellen mit einer 0,5 mM - 1,5 mM Ca^{2+} -Lösung perfundiert werden. Hierauf kommt es zum Kalziumeinstrom durch speichergesteuerte Kalziumkanäle. In dieser Phase können die Parameter Kalziumrate (Steigung des Anstiegs), Kalziumpeak (Maximalwert) und Kalziumplateau (Mittelwert über mehrere Zyklen) bestimmt werden. Der letzte Perfusionsschritt erfolgt mit einer kalziumfreien Lösung, um so sterbende Zellen identifizieren und aussortieren zu können.

Das „hoch Kalium“ Protokoll wird bei der Analyse von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen (Ca_v) verwendet. Hierfür werden die Zellen nach Analyse des basalen Kalziums in einer 1,5 mM Ca^{2+} -Lösung (4 mM KCl) mit einer hoch kaliumhaltigen Lösung (145 mM KCl) perfundiert. Die Kalziumkonzentration der Lösung unterscheidet sich hierbei jedoch nicht und beide Lösungen sind isoosmolar. Die Kalium-induzierte Depolarisation verändert das Membranpotenzial, wodurch spannungsgesteuerte Kanäle geöffnet werden. Die quantifizierten Parameter in dieser Phase sind Einstromrate und maximaler Ca^{2+} -Peak. Nach 60 sec erfolgt ein weiterer Wechsel auf die Ausgangslösung.

3.4.2 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie

Die TIRF-Mikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence) ist eine Methode der Lichtmikroskopie bei der nur eine dünne Schicht der Zelle unmittelbar an der Grenze zum Deckgläschen, typischerweise < 200 nm angeregt wird. Hierfür wird ein Laser so ausgerichtet, dass er an der Schnittfläche des Glases (Coverslip) und der Flüssigkeit (Öl) vollständig reflektiert wird. Aufgrund dieser totalen Reflexion entsteht ein evaneszentes, exponentiell abklingendes Feld. Dies führt zur Anregung von in dieser Ebene vorhandenen Fluoreszenzmoleküle, deren Emission über eine Kamera detektiert werden kann.

Für die Aufnahmen zur FRET-, sowie zur Kolokalisationsanalyse wurde das Leica AM TIRF MC System unter Verwendung eines $100 \times$ Öl-Objektives genutzt. HEK293 Zellen wurden 24 Stunden vor Messung mit $6 \mu g$ STIM2.1-mcherry bzw. STIM2.2-mcherry (pIRES) und $2 \mu g$ Orai1-eGFP (pMAX) kotransfiziert und auf 25 mm Deckgläschen ausgesät. Zur Entleerung des ERs und Induktion der Clusterbildung wurden die Zellen 15 min in 1 mM Thapsigargin und 0 mM Ca^{2+} Ringer inkubiert. Die Fluorophore wurden mittels unterschiedlicher Laser angeregt: eGFP wurde mittels des 488 nm Lasers (Suppressionsfilter BP 525/50), mcherry mittels des 561 nm Lasers (Suppressionsfilter BP 600/40) detektiert. Die gewählte Laserintensität beträgt 40 %, die Belichtungsdauer 100 ms und die eingestellte Eindringtiefe 200 nm. Die Fokusebene wurde auf STIM2.1-mcherry bzw. STIM2.2-mcherry (Akzeptor für FRET-Studien) gelegt.

Die Aufnahmen für Kolokalisations- und FRET-Analysen erfolgten unter Verwendung des LAS (Leica Application Suite) FRET Moduls.

Förster Resonanzenergietransfer

Der Förster Resonanzenergietransfer, kurz FRET (Förster Resonance Energy Transfer), beschreibt den Prozess der Energieübertragung von einem ersten angeregten Farbstoff (Donor) auf einen zweiten. Das Akzeptor-Fluorophor wird angeregt und dessen Emission im Folgenden gemessen. Dieser physikalische Mechanismus wird in der Biologie verwendet, um die Interaktion von zwei Proteinen zu untersuchen, da kein Energietransfer bei einer Distanz >10 nm messbar ist. Damit FRET gelingt, muss das Emissionsspektrum des Donorfarbstoffes mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfluorophors überlappen. Dies ist bei dem für diese Arbeit gewählten GFP-mcherry FRET-Paar der Fall, das einen kalkulierten R_0 Wert (d.h. 50 % Energietransfer) von 5.24 nm aufweist [Akrap et al., 2010] (E^0_{GFP} 5.1 nm [Albertazzi et al., 2009]).

Zusätzlich zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Aufnahmen wurden an jedem Messtag Aufnahmen von Einzel-transfizierten Zellen gemacht, um den Anteil an „*bleed through*“ (Artefakte, die durch eine Überlappung der Spektren der verschiedenen Fluorophore entstehen) zu bestimmen. Die FRET-Effizienz (EA = Apparent FRET Efficiency) wurde anhand von Hintergrundkorrigierten Aufnahmen unter Verwendung folgender Gleichung kalkuliert [van Rheenen et al., 2004]:

$$E_A(i) = \frac{B - A \times \beta - C \times (\gamma - \alpha \times \beta)}{C \times (1 - \beta \times \delta)}$$

A, B und C stehen für Donor-, FRET- und Akzeptorkanal; α , β , γ und δ für verschiedene „*bleed through*“ Faktoren.

Da die Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Messtagen eine bestimmte Variabilität aufwies, wurde für jeden experimentellen Tag der Mittelwert des Akzeptor zu Donor Verhältnisses bestimmt. Ausschließlich Cluster, die eine Ratio innerhalb dieses Mittelwertes \pm eine Standardabweichung aufwiesen, wurden für die finale Auswertung verwendet.

Kolokalisation

Die Kolokalisationsanalyse erfolgte nach der Bildbearbeitung (siehe Abschnitt 3.5) der TIRF-Aufnahmen mit Hilfe von ImageJ unter Verwendung des JACoP Plugins. Dabei wurden der Mander's Koeffizient zur Analyse ausgewählt. Dabei steht M1 für die Kolokalisation von STIM2.1 oder STIM2.2 mit Orail, während M2 zeigt, wie gut Orail mit den Spleißvarianten kolokalisiert.

3.4.3 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop (laser scanning microscope = LSM) scannt eine Probe mit Hilfe eines Lasers Punkt für Punkt. Dieses Raster-Scannen wird durch zwei Spiegel, die den Laser in X- und Y-Richtung ableiten, ermöglicht. Dabei werden

die emittierten Photonen jedes Punktes nicht durch eine Kamera, sondern durch einen Photoelektronenvervielfacher (photomultiplier tube = PMT) aufgenommen, der eintretende Photonen in Elektronen umwandelt. Dabei wird jede Position ausschließlich angeregt, wenn der fokussierte Laserstrahl diesen Punkt trifft. Durch die Verwendung eines PMTs können auch schwache Signale detektiert werden, da die Elektronen im PMT vervielfältigt werden. Dies geschieht durch mehrere Dynoden (= Elektroden). Die ersten Elektronen werden im elektrischen Feld zur ersten Dynode hin beschleunigt und setzen durch ihr Auftreffen weitere Elektronen frei. Diese werden nun in Richtung der zweiten Dynode beschleunigt. Die exponentielle Vervielfältigung der Elektronen bis zur letzten Dynode resultiert in einem Stromstoß (ca. 50 Nanosekunden nach Eintreten des Photons), der durch den PMT leicht detektiert und aufgenommen werden kann. Ein entsprechendes Abbild wird durch die Software zusammengesetzt und auf den Bildschirm projiziert.

Eine im Strahlengang des emittierten Lichts angebrachte Lochblende, die sich vor dem Detektor befindet, blockiert Fluoreszenz aus anderen Ebenen außerhalb der Fokusebene. Dies ermöglicht einen stärkeren Kontrast der erzeugten Aufnahmen. Die Pixelverweildauer definiert die Zeit, bis ein Signal dem folgenden Pixel zugeteilt wird. Dies, zusammen mit der Anzahl der Bildzeilen, erlaubt es unabhängig vom Objektiv unterschiedliche Vergrößerungen zu erzeugen (z.B. 512 x 512 bzw. 1024 x 1024). Die Scangeschwindigkeit wird in Hertz gemessen. Hertz steht hierbei für Bildzeile pro Sekunde. Bei der Wahl von langsameren Geschwindigkeiten wird ein mögliches Hintergrundrauschen in der Aufnahme reduziert, jedoch führt dies zu einem schnelleren Ausbleichen des Präparats. Um ein zu schnelles Ausbleichen des Präparats zu verhindern wird normalerweise die Laserintensität mit der der Laserstrahl auf das Präparat trifft reduziert. Dies geschieht über akkusto-optische Modulatoren. Hierbei handelt es sich um transparente Festkörper, die durch Schallwellen welche ein optisches Gitter erzeugen, die Lichtfrequenz des darauff treffenden Lichtes ablenken oder ändern.

Zur Analyse wurde ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop von Leica (Leica TCS SP5) unter Verwendung eines 100 × Öl-Objektives genutzt. Die 1024 × 1024 Aufnahmen erfolgten mit 100 Hz, wobei der Zoom so gewählt wurde, dass eine ideale Auflösung der Aufnahmen von 70 - 100 Pixel erreicht wurde. Die Laserintensität für die drei verwendeten Anregungslaser (405 Diode für DAPI; Argon-Laser für YFP; HeNe 543 (Helium-Neon-Laser) für AF568) lag bei ~40 % (Imaging Einrichtung, Universität von Alberta, Edmonton).

3.5 Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der Aufnahmen (TIRF und LSM) erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Dabei wurden die Aufnahmen auf unterschiedliche Weisen bearbeitet. Der Kontrast der Aufnahmen wurde mittels des Befehls „*enhance contrast*“ (Kontrast verstärken) bearbeitet. Hierfür wurde die Aufnahme in ein HSB-Stack (Hue [Farbton], Saturation [Sättigung], Brightness [Helligkeit]) umgewandelt und die Helligkeit normalisiert (gesättigte Pixel auf 0 %). Dies bewirkt, dass die Intensität der Pixel der Aufnahme auf die erlaubte Bandbreite ausgedehnt wird. Hierbei handelt es sich um eine lineare Transformation der Aufnahme, die die Intensität der Pixel zueinander in den verschiedenen Kanälen nicht beeinflusst.

Eine Hintergrundkorrektur wurde mit Hilfe des rollenden Ball (rolling ball) Algorithmus vorgenommen. Hierfür wurde die Aufnahme in einen RGB-Stack (Rot, Grün, Blau) umgewandelt. Hierbei wurde eine Pixelgröße von 25 Pixeln für die Hintergrundkorrektur der Kollokalisationsanalyse verwendet, eine Pixelgröße von 50 - 100 Pixeln für die Bildbearbeitung der FRET- und konfokalen Aufnahmen.

Alle vorgenommenen Änderungen und Verbesserungen wurden einheitlich für alle Kanäle vorgenommen.

3.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von Excel durchgeführt. Stichprobenartig wurden die Proben auf Normalverteilung hin überprüft und anschließend der ungepaarte, zweiseitige student's T-Test verwendet. Dargestellte p-Werte stehen für: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Spleißvarianten

4.1.1 Nachweis der Spleißvarianten

STIM2, viel stärker als sein Homolog STIM1, wird bis heute kontrovers diskutiert. Während seine Rolle als Regulator des basalen Kalziums eindeutig gezeigt ist, scheint die Beteiligung dieses Proteins am speichergesteuerten Kalziumeinstrom zellspezifisch zu sein.

Eine Analyse verschiedener Datenbanken ergab Vorhersagen für drei STIM2 Spleißvarianten [Miederer, 2013]: STIM2.1, das im Gegensatz zu der konventionellen Variante (STIM2.2), ein zusätzliches acht Aminosäure langes Exon 9 (siehe Abbildung 8A, rot markierte Sequenz) enthält, sowie STIM2.3, dem wie STIM2.2 Exon 9 fehlt und durch ein frühes Stop-Codon in Exon 13 eine verkürzte Variante darstellt (siehe Abbildung 8A, orange markiert 13*). Somit entstehen Varianten von unterschiedlichen Längen: STIM2.1 mit 754 Aminosäuren, STIM2.2 mit 746 und STIM2.3 mit 599 Aminosäuren.

Zur Identifikation der Varianten wurden verschiedene Primer-Paare abgeleitet. Trotz mehrerer Primer-Paare konnte STIM2.3 in den von uns untersuchten Zelltypen nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Mit dem das Exon 9 flankierenden Primerpaar a und b (Abbildung 8A) konnten in unstimulierten und CD3/CD28 Bead-stimulierten Effektor CD4⁺ (Abb. 8C grauer Kasten) und CD8⁺ T Zellen (Abb. 8B), sowie in Jukat T Zellen und Monozyten zwei Banden nachgewiesen werden. Eine anschließende Sequenzierung ließ eine eindeutige Zuordnung der oberen Bande zur Variante STIM2.1 bzw. der unteren Bande zur konventionellen Variante STIM2.2 zu. Quantitative qRT-PCR bestätigte das Vorhandensein der neuen Variante in verschiedenen Zelltypen (siehe Abb. 8C) und zeigte, dass das Verhältnis der beiden Spleißvarianten zueinander zellspezifisch und variabel ist. Wie in Abbildung 8A dargestellt wurden für beide Varianten der gleiche Vorwärtsprimer und spleiß-spezifische Rückwärtsprimer verwendet. Da die höchste mRNA Expression von STIM2.1 in unstimulierten T Zellen festgestellt wurde, wurden CD4⁺ T Zellen mit CD3/CD28 beschichteten Kügelchen stimuliert und die mRNA Expression von STIM1, STIM2.1 und STIM2.2 über 72 h, mit Probennamen nach 7 h, 24 h, 48 h und 72 h, überprüft.

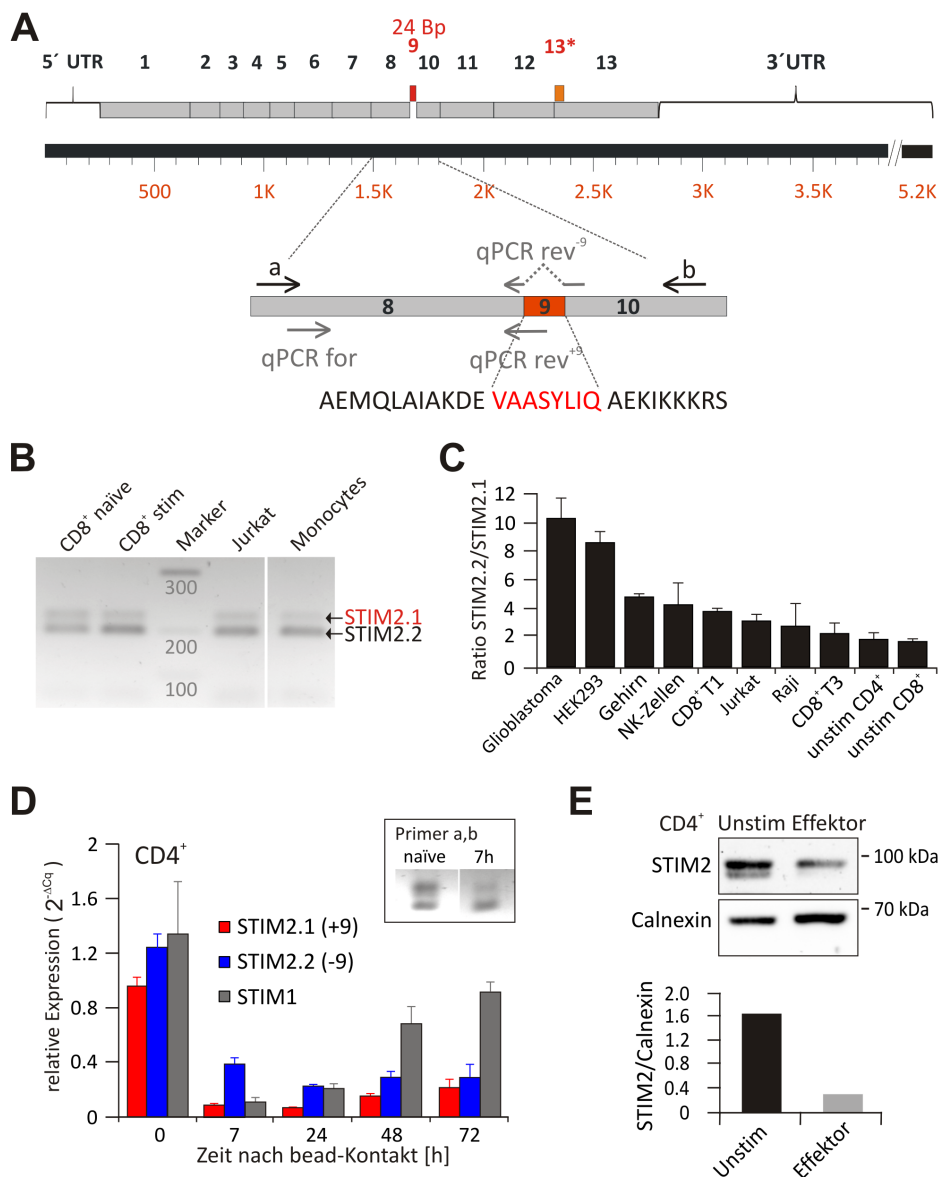


Abbildung 8: **Nachweis einer neuen STIM2 Spleißvariante, STIM2.1, mittels PCR und qRT-PCR.** **A:** Schematische Darstellung der Exon-Struktur von STIM2.1 (+Exon 9, rot) und STIM2.2 (-Exon 9). Zusätzlich ist STIM2.3 mit einem alternativem Exon 13 (13*, orange) eingezeichnet. Weiterhin ist der Bereich um Exon 9 (Exon 8 bis Exon 10) dargestellt, mit dem für den Nachweis verwendeten Primer: PCR-Primer (schwarze Pfeile, a und b) und qRT-PCR Primer (grau). In rot, in die Aminosäuresequenz eingefügt, sind die STIM2.1 spezifischen Aminosäuren aufgezeigt. **B:** Aufnahme des Agarosegels, das die aus CD8⁺ (unstimuliert und stimuliert), Jurkat und Monocyten cDNA amplifizierten spleißspezifischen PCR-Banden (Primer a und b Abbildung A) zeigt. **C:** STIM2.2/STIM2.1 Ratio der relativen mRNA Menge verschiedener Zelltypen, die mit Hilfe von qRT-PCR bestimmt wurde. Für jeden der angegebenen Zelltypen wurde 3 - 12 unabhängige RNA Präparationen mit anschließender qRT-PCR durchgeführt. **D:** Darstellung der relativen mRNA Menge von STIM1, STIM2.1 und STIM2.2 in unstimulierten und stimulierten (7, 24, 48 und 72 h) CD4⁺ T Zellen. **E:** Abbildung des Westernblots der Lysate von unstimulierten und 72 h mit anti-CD3/CD28 Beads stimulierten CD4⁺ T Zellen (oben). Quantifizierung des Blots mit Hilfe von Calnexin als Ladekontrolle (unten) (n = 1). *Experimentelle Durchführung B - D: Gertrud Schwär; Analyse A - D: Barbara A. Niemeyer* Abbildung modifiziert aus [Miederer et al., 2015].

Wie in Abbildung 8D dargestellt, war eine stark verringerte relative mRNA Menge aller untersuchten Varianten 7 h nach Stimulation zu beobachten. Gleichzeitig verschob sich das Verhältnis von STIM2.2 zu STIM2.1 zu Gunsten von STIM2.2 auf einen Wert von $4 \pm 0,5$. Während sich das mRNA Level von STIM1 nach 72 h weitestgehend erholte, blieb die mRNA Menge beider STIM2 Spleißvarianten niedrig, wobei sich die Ratio STIM2.2/STIM2.1 mit einem Wert von $1,6 \pm 0,56$ wieder dem Wert vor Stimulation näherte. Abbildung 8E zeigt im Westernblot und nach Normierung auf das Haushaltsgen Calnexin, dass 72 h nach Stimulation von CD4⁺ T Zellen auch die Proteinkonzentration von STIM2 verringert war.

Die Suche nach der STIM2.1 spezifischen Sequenz (VAASILIQ) mittels eines BLAST-Programms (Basic Local Alignment Search Tool) in anderen Organismen ergab, dass sich die Expression der neuen Variante STIM2.1 nicht ausschließlich auf humane Zellen beschränkt. So ist die Sequenz über viele Spezies zu 100 % konserviert, oder aber weist nur kleinere Abweichungen auf. In *Mus musculus* lautet die Sequenz VASSILLQ. Auch gelang es mit Hilfe einer konventionellen PCR in der Maus zwei Banden nachzuweisen (Gertrud Schwär, Daten nicht gezeigt). Das Bandenmuster bestätigte erneut das Ergebnis der Datenbankanalyse, dass beide Varianten nicht nur in humanem Gewebe, sondern in Säugern, wie auch in Maus, vorhanden sind.

4.1.2 Neue Spleißvariante ist nicht in der Lage Orai1 zu aktivieren

Um die funktionelle Rolle von STIM2.1 zu untersuchen, wurden die 24 bp des zusätzlichen Exons im Zuge der Masterarbeit mit Hilfe von zwei Primern mit einem jeweils 12 bp Überhang in ein existierendes YFP-STIM2.2 kloniert [Miederer, 2013]. Die jeweils YFP-getaggten Spleißvarianten wurden in stabilen HEK-O1 Zellen überexprimiert und ihre Funktion mit Hilfe von Ca²⁺-Imaging untersucht. In Abbildung 9A sind die Verläufe der mittleren Kalziumkonzentration über Zeit in HEK-O1 Zellen abgebildet, die entweder mit STIM2.1, STIM2.2 oder Leervektor transfiziert waren. STIM2.2 zeigte ein signifikant erhöhtes basales Kalzium in 0,5 mM Ca²⁺ im Vergleich zur Leervektorkontrolle, das bei einer Erhöhung auf 1,5 mM Ca²⁺ sogar noch weiter stieg. Anders verhält es sich bei der neuen Variante STIM2.1. In 0,5 mM Ca²⁺ unterschied sich die Überexpression nicht von der Kontrolle, jedoch stieg das basale Kalzium nach einem Wechsel auf die 1,5 mM Ca²⁺-haltige Lösung leicht an (siehe Abbildung 9B). Während eine Überexpression von STIM2.2 einen Einfluss auf die Kalziumspeicher hatte und diese verringerte, führte die Überexpression von STIM2.1 zu keiner Veränderung der intrazellulären Speicher (Abb. 9B). Nach Readdition von [Ca²⁺]_e nach der Entleerung des ERs wurde sichtbar, dass STIM2.2 die Einflussrate durch Orai1 signifikant erhöhte, während STIM2.1 diese signifikant erniedrigte. Der bereits kleine endogenen SOCE in HEK-O1 stabilen Zellen wurde durch die Überexpression von STIM2.1 zusätzlich verringert. Zusammengefasst war STIM2.1 nicht in der Lage Orai1 zu aktivieren und schien zusätzlich den endogenen speichergesteuerten Kalziumeinstrom zu inhibieren.

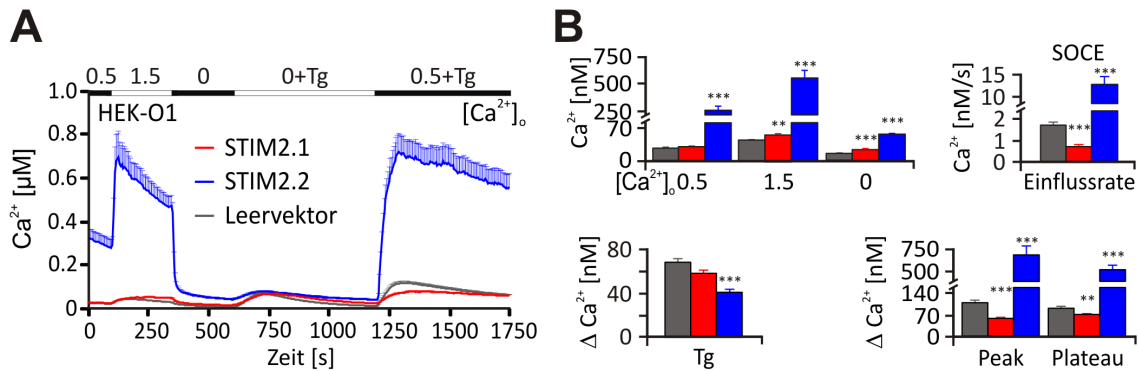


Abbildung 9: **STIM2.1 ist nicht in der Lage Orai1 im Überexpressionssystem zu aktivieren.** **A:** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) über Zeit in HEK-O1 stabilen Zellen bei Überexpression von STIM2.1 (rot, $n = 96$), STIM2.2 (blau, $n = 107$) bzw. Leervektor (pEYFP, grau, $n = 72$). **B:** Quantifizierung der Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ aus A unter Analyse von basalem Kalzium, SOCE-Einflussrate, Tg-Peak, sowie SOCE-Peak und Plateau; Abbildung erweitert (zusätzliche Leervektorkontrolle) aus der Masterarbeit von A.-M. Miederer (2013) und modifiziert aus [Miederer, 2013].

4.1.3 STIM2.1 ist kein spezifischer Orai2 Aktivator

Noch unklarer als die Rolle von STIM2 bezüglich SOCE ist die Rolle und Beteiligung von Orai2 an SOCE. Deswegen sollte getestet werden, ob es sich bei der neu entdeckten Variante um einen spezifischen Orai2 Aktivator handelt. Um dies zu untersuchen wurde RFP-markiertes Orai2 mit jeweils einer der YFP-markierten Spleißvariante überexprimiert und am Folgetag im Ca^{2+} -Imaging untersucht. Beide Varianten wurden in ähnlichem Maß exprimiert, wie anhand eines STIM2 spezifischen Antikörpers mit einer Westernblot Analyse nachgewiesen wurde (Abb. 10C). Im Ca^{2+} -Imaging zeigte STIM2.2 eine Aktivierung von Orai2, welche sich zum einem durch ein erhöhtes basales Kalzium (siehe Abb. 10A und B) als auch durch einen erhöhten speichergesteuerten Kalziumeinstrom zeigte. Im Vergleich dazu, zeigte STIM2.1 in Koüberexpression mit Orai2 ein niedriges basales Kalzium und kaum SOCE. Allerdings wiesen diese Zellen einen größeren Tg-peak auf (Abb. 10B). Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei der neuen Spleißvariante um keinen Orai2 spezifischen Aktivator handelt.

4.1.4 Spleißspezifische Herunterregulation deckt gegensätzliche Effekte der Spleißvarianten auf

Nachdem STIM2.1 weder Orai1 noch Orai2 aktivieren konnte, jedoch beide Varianten in unstimulierten $CD4^+$ T Zellen ähnliche relative mRNA Mengen aufwiesen (vergleiche Abbildung 8D), wurde im Weiteren untersucht, ob eine Verminderung der Proteinmenge von STIM2.1 einen Einfluss auf SOCE hat. Hierfür wurden unstimulierte $CD4^+$ T Zellen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer spleißspezifischen siRNA transfiziert und an Tag 3 im Imaging untersucht. Dabei wurde die siRNA so gewählt, dass sie teilweise

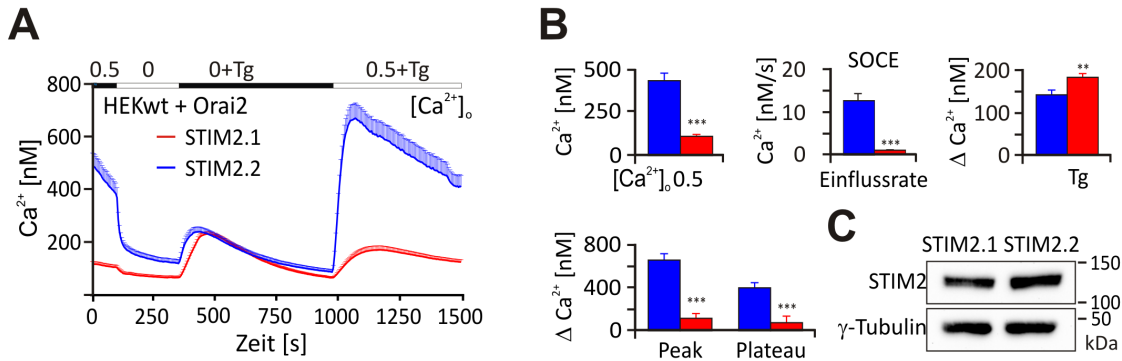


Abbildung 10: **STIM2.1 ist nicht in der Lage Orai2 im Überexpressionssystem zu aktivieren.** **A:** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) über Zeit in HEKwt Zellen bei Überexpression von Orai2-RFP zusammen mit YFP-STIM2.1 (rot, $n = 70$) bzw. YFP-STIM2.2 (blau, $n = 92$). **B:** Quantifizierung der Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ aus A unter Analyse von basalem Kalzium, SOCE-Einflussrate, Tg-Peak, sowie SOCE-Peak und Plateau. **C:** Abbildung des Westernblots nach FACS-Sortierung der fluoreszenten Überexpressionskonstrukte STIM2.1 und STIM2.2 mit jeweiliger Ladekontrolle γ -Tubulin ($n = 1$). Abbildung modifiziert aus [Miederer et al., 2015].

komplementär zur Exon 9 Sequenz war, um so ausschließlich gegen STIM2.1 gerichtet zu sein. Mittels qRT-PCR wurde die Effektivität der Herunterregulation der relativen mRNA Menge überprüft und mögliche unspezifische Nebeneffekte der siRNA auf STIM1 und STIM2.2 ausgeschlossen (Abbildung 11C). So war die relative mRNA Menge von STIM2.1 nach der Transfektion der siRNA auf ~40 % reduziert, während die relativen mRNA Mengen von STIM1 und STIM2.2 nicht verändert waren. Die Herunterregulation auf mRNA Ebene konnte auf Proteinebene bestätigt werden. So zeigte eine Westernblot-Analyse (Abbildung 11), dass ~20 % weniger STIM2 Gesamtprotein im Zelllysate von STIM2.1 siRNA transfizierten Zellen vorhanden war. Da STIM2.1 laut mRNA Analyse ~40 % des Gesamt-STIM2 (STIM2.1 + STIM2.2) ausmacht und die siRNA die relative STIM2.1 mRNA Menge auf ~40 % verminderte, entsprach ein um ~20 % verringertes Proteinlevel der Erwartung. In Abbildung 11A ist der zeitliche Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration, nach siRNA Transfektion bzw. Kontroll-Transfektion (*non silencing* RNA, nsRNA), sowie die Quantifizierung (Abbildung 11B) dargestellt. Hierfür wurden 3 Donoren analysiert (nsRNA (schwarz): $n = 698$); siRNA STIM2.1 (rot): $n = 579$). Die Herunterregulation von STIM2.1 hatte keinen Einfluss auf das basale Kalzium, erhöhte jedoch signifikant die Kalziumeinflussrate, sowie Ca^{2+} -Peak und -Plateau. In Abbildung 11E ist zu sehen, dass die siRNA keinen Einfluss auf die zusätzlich nur durch Ionomycin-entleerbare Kalziumspeicher hatte. Somit bestätigt die siRNA vermittelte Herunterregulation den inhibitorischen Effekt von STIM2.1, der bereits in der Überexpression zusammen mit Orai1 vermutet werden konnte.

Ebenso wurde mit der konventionellen Variante STIM2.2 verfahren. Die spleißspezifische STIM2.2 siRNA wurde gegen den Übergang zwischen Exon 8 und Exon 10 abgeleitet, so

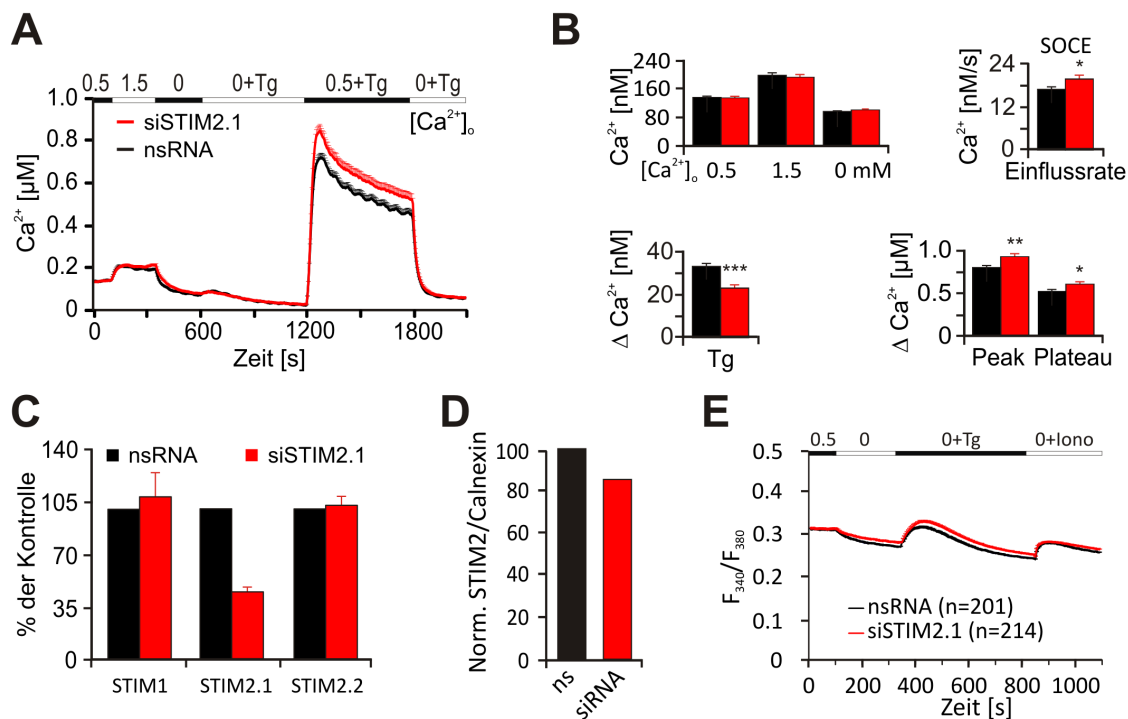


Abbildung 11: **Herunterregulation von STIM2.1 in unstimulierten CD4⁺ T Zellen vergrößert SOCE.** **A:** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) über Zeit in unstimulierten CD4⁺ T Zellen nach Behandlung mit STIM2.1 siRNA (rot, 3 Donor, n = 579) bzw. nsRNA (schwarz, 3 Donor, n = 698). **B:** Quantifizierung der Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ aus A unter Analyse von basalem Kalzium, SOCE-Einflussrate, Tg-Peak, sowie SOCE-Peak und Plateau. **C:** Relative mRNA Expression von STIM1, STIM2.1 und STIM2.2 in siRNA und Kontroll-transfizierten CD4⁺ T Zellen. **D:** Abbildung des Westernblots der Lysate der siRNA und Kontroll-transfizierten CD4⁺ T Zellen unter Normierung auf das Haushaltsgen Calnexin und anschließender Normierung auf die nsKontrolle (n = 1 Donor). **E:** Verlauf von $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Zugabe von Tg und Ionomycin. Abbildung modifiziert aus [Miederer et al., 2015].

dass sie ausschließlich gegen die Variante ohne Exon 9 gerichtet war. Abbildung 12C zeigt, dass die relative mRNA Menge nach zweimaliger Behandlung mit siRNA um ~30 % sank. Die siRNA wies allerdings keine perfekte Spezifität auf, da auch die mRNA von STIM1 und STIM2.1 tendenziell, jedoch nicht signifikant, herunterreguliert wurden (Abb. 12C). Trotz der mäßigen Effizienz der siRNA war eine Beteiligung von STIM2.2 an SOCE in unstimulierten CD4⁺ T Zellen nachzuweisen (Abb. 12A und B). Basales Kalzium sowie SOCE waren in den siRNA behandelten Zellen (n = 776, 3 Donoren, blau) kleiner als die ns-Kontrolle (n = 978, 3 Donoren, schwarz). Sowohl Einflussrate, als auch Ca^{2+} -Peak und -Plateau waren um $\sim 1/3$ reduziert (auf 71,1 %, 67,3 % bzw. 65,5 % der ns Kontrolle). Der Tg-Peak war, ebenso wie in den STIM2.1 siRNA behandelten CD⁺ T Zellen, kleiner. Jedoch konnte anhand der Ionomycin-behandelten Kontrolle gezeigt werden, dass die intrazellulären Ionomycin-sensitiven Kalziumspeicher der siRNA transfizierten Zellen keinen Unterschied zur Kontrolle zeigten (Abb. 12D).

Zusammengefasst zeigten die siRNA Experimente, dass die Spleißvarianten entgegengesetzte Rollen beim speichergesteuerten Kalziumeinstrom einnehmen. Die siRNA gegen die STIM2.2 mRNA bestätigte seine bereits bekannte Rolle als Regulator des basalen Kalziums und bekannter Aktivator des SOCE, da basales Kalzium, sowie SOCE verringert waren. Die Herunterregulation von STIM2.1 machte seine Rolle als Inhibitor deutlich, da SOCE in diesen Zellen verstärkt wurde.

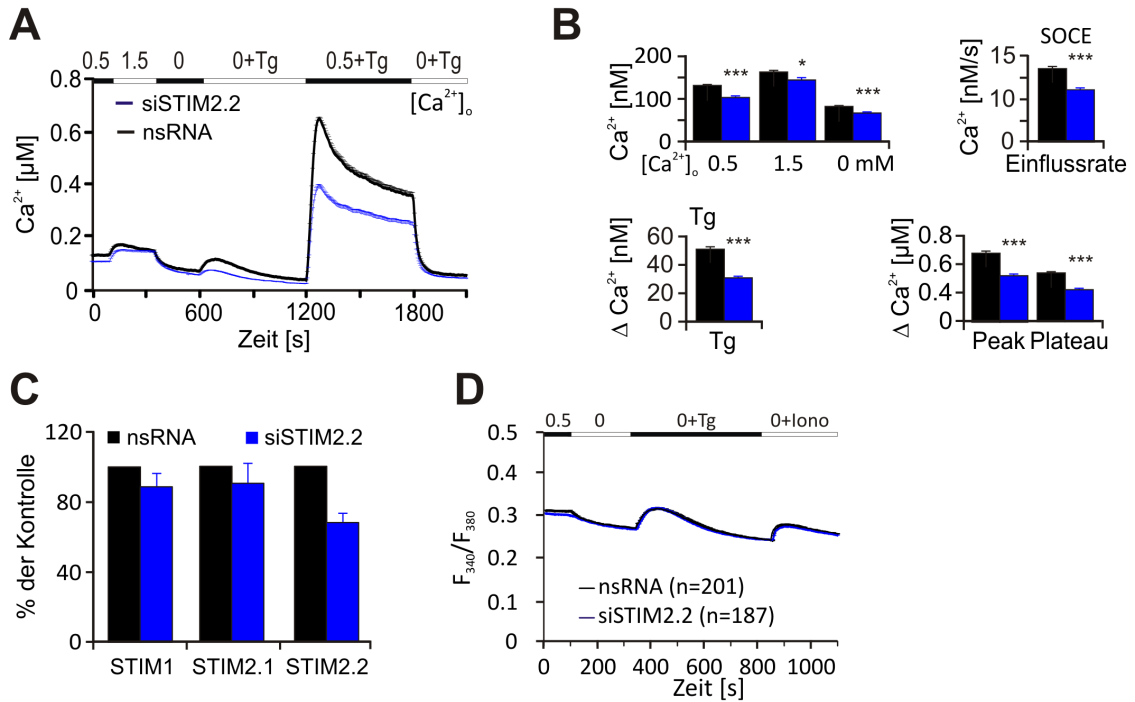


Abbildung 12: **Herunterregulation von STIM2.2 in unstimulierten CD4⁺ verringert basales Kalzium und SOCE.** **A:** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) über Zeit in unstimulierten CD4⁺ T Zellen nach Behandlung mit STIM2.2 siRNA (blau, 3 Donor, n = 776) bzw. nsRNA (schwarz, 3 Donor, n = 978). **B:** Quantifizierung der Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ aus A unter Analyse von basalem Kalzium, SOCE-Einflussrate, Tg-Peak, sowie SOCE-Peak und Plateau. **C:** Relative mRNA Expression von STIM1, STIM2.1 und STIM2.2 in siRNA und Kontroll-transfizierten CD4⁺ T Zellen **D:** Verlauf von $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Zugabe von Tg und Ionomycin. ns-Kontrolle aus Abbildung 11D entspricht der ns-Kontrolle aus Abbildung 12D. Abbildung modifiziert aus [Miederer et al., 2015].

4.1.5 Inhibitorischer Effekt von STIM2.1 auf endogenen SOCE in Jurkat T Zellen

Im nächsten Schritt sollte der inhibitorische Effekt von STIM2.1, wie in der Überexpressionsstudie in HEK-O1 Zellen und dem siRNA Experiment in CD4⁺ T Zellen bereits beobachtet, weiter untersucht werden und, wenn möglich, bestätigt werden. Hierfür wurde die T-Zelllinie Jurkat T Zellen verwendet und 16 -24 h vor der Ca^{2+} -Imaging Messung mit STIM2.1-, STIM2.2- bzw. Leervektor transfiziert. Abbildung 13A und B zeigt, dass

sowohl in STIM2.1 als auch STIM2.2 transfizierten Zellen nach Überexpression das basale Kalzium erhöht und der Tg-Peak verkleinert war. Im zweiten Teil der Messung waren im Ca^{2+} -Verlauf (Abbildung 13A) und in der Quantifizierung (Abbildung 13B) zu erkennen, dass in STIM2.2 überexprimierenden Zellen Einflussrate, Ca^{2+} -Peak und -Plateau im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen signifikant erhöht waren. STIM2.1 überexprimierende Zellen wiesen eine signifikant verminderte Einflussrate und einen kleineren Ca^{2+} -Peak und ein verringertes Plateau auf. Somit wirkte STIM2.1 nicht nur in HEK-O1, sondern auch in Jurkat T Zellen dominant negativ auf den endogenen SOCE, was nochmals auf eine inhibitorische Rolle der neuen Spleißvariante hinwies.

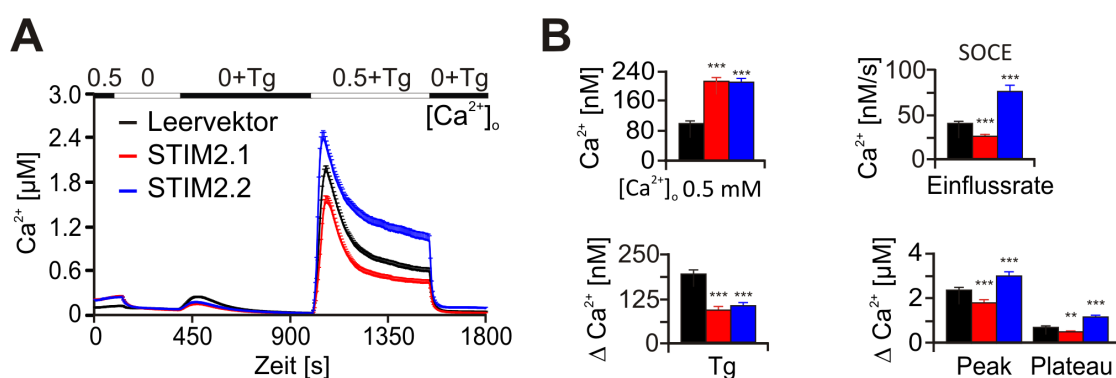


Abbildung 13: **Überexpression von STIM2.1 in Jurkat T Zellen verringert endogenen SOCE.** **A:** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) über Zeit in Jurkat T Zellen nach Transfektion mit Leervektor (schwarz, $n = 216$), STIM2.1 (rot, $n = 151$) bzw. STIM2.2 (blau, $n = 131$). **B:** Quantifizierung der Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus A unter Analyse von basalem Kalzium, SOCE-Einflussrate, Tg-Peak, sowie SOCE-Peak und Plateau. Abbildung modifiziert aus [Miederer et al., 2015].

4.1.6 STIM2.1 wirkt dominant negativ sowohl auf STIM2.2-Orai1 als auch auf STIM1-Orai1 medierten SOCE

Nachdem im ersten Teil der Arbeit der inhibitorische Effekt der neu beschriebenen Spleißvariante analysiert wurde, stellte sich die Frage, ob STIM2.1 diesen Effekt auf STIM2.2 oder STIM1 ausübt. Vorher verwendete Zellsysteme, wie Jurkat T Zellen oder unstimulierte CD4^+ T Zellen, enthalten sowohl STIM1 als auch STIM2.2. Um diese Frage zu klären, wurden HEK-O1 Zellen mit CFP-STIM2.2 (0,5 µg) und YFP-STIM2.1 (1 µg) bzw. CFP-STIM2.2 und einer equimolaren Menge einer Leervektorkontrolle (pEYFP) kotransfiziert, um so durch die Überexpression einen hauptsächlich STIM2.2 vermittelten SOCE zu generieren und den Einfluss von STIM2.1 auf diesen zu untersuchen.

Der Verlauf der mittleren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über Zeit während verschiedener Wechsel der extrazellulären Lösungen ist in Abbildung 14A dargestellt. Die Quantifizierung (Abbildung 14B) zeigte, dass das basale Kalzium in den STIM2.2 enthaltenden HEK-O1 Zellen bei ~ 1 mM liegt. Das basale Kalzium war jedoch um ~ 50 % verringert bei gleichzeitiger Überexpression von STIM2.1. Ebenso waren in jenen Zellen zusätzlich Ca^{2+} -Peak und Plateau

signifikant kleiner. Hinzu kommt, dass die Einflussrate in den Zellen, die beide Spleißvarianten überexprimieren, tendenziell geringer war. In dieser Bedingung wurde zusätzlich die Rate der Pumpen analysiert, um herauszufinden, ob der dominant negative Effekt von STIM2.1 möglicherweise durch eine Wechselwirkung mit Pumpen und einer erhöhten Pumpenaktivität einhergeht. Zur Analyse der Pumprate wurden Zellen ausgewählt, die in 1,5 mM Ca^{2+} einen ähnlichen Ca^{2+} -Ausgangswert vor Zugabe von 0 mM Ca^{2+} hatten (Mittelwert nach Selektion der Zellen: STIM2.2 $893,39 \pm 138,22$ nM, STIM2.1+STIM2.2 $899,07 \pm 139,40$ nM, $n = 33$). Dies stellte sicher, dass ein möglicher Effekt nicht auf einer unterschiedlichen Triebkraft für Ca^{2+} basierte. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Koüberexpression und STIM2.2. Die analysierten Zellen ($n = 33$) zeigten trotz der Selektion auf ähnliche Kalziumwerte am Ende der Plateauphase in 1,5 mM Ca^{2+} den dominant-negativen Phänotyp im basalen Kalzium, sowie in Ca^{2+} -Rate und -Plateau (Daten nicht gezeigt).

Somit zeigte die Koüberexpression von STIM2.2 und STIM2.1, dass die neue Variante im Ca^{2+} -Imaging dominant negativ auf die konventionelle Variante, STIM2.2, wirkt.

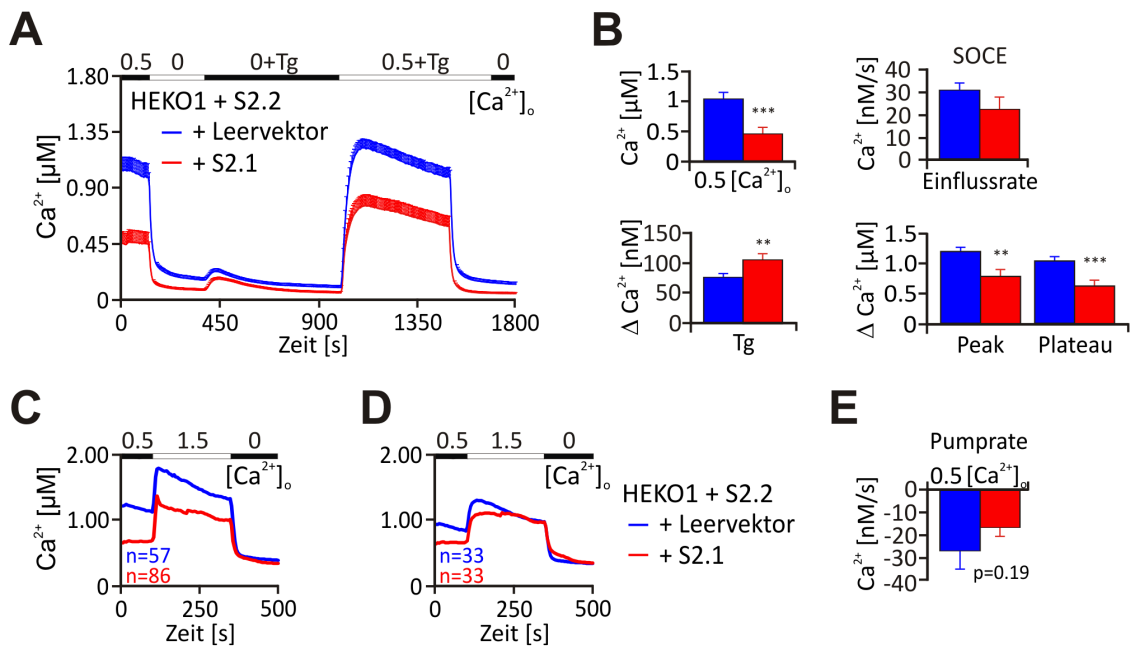


Abbildung 14: **STIM2.1 wirkt dominant negativ auf den STIM2 vermittelten SOCE.**
A: Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) über Zeit in HEK-O1 T Zellen nach Transfektion mit CFP-STIM2.2 und Leervektorkontrolle (blau, $n = 69$) bzw. CFP-STIM2.2 und YFP-STIM2.1 (rot, $n = 66$). **B:** Quantifizierung der Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus A unter Analyse von basalem Kalzium, SOCE-Einflussrate, Pumprate ($n = 33$), Tg-Peak, sowie SOCE-Peak und Plateau. Teile der Abbildung modifiziert aus [Miederer et al., 2015].

Zur Analyse, ob STIM2.1 ausschließlich inhibitorisch auf STIM2.2 wirkt, oder den gleichen Effekt auf STIM1 hat, wurde das im vorherigen Abschnitt beschriebene Experiment in Koüberexpression von STIM1 durchgeführt. Hierfür wurde 24 Stunden vor Messung HEK-

O1 stabile Zellen mit 1 μg STIM1-IRES-RFP zusammen mit 1 μg Leervektor (pEYFP) bzw. YFP-STIM2.1 oder YFP-STIM2.2 transfiziert. Abbildung 15A zeigt den Verlauf von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über Zeit nach Perfusion mit verschiedenen Lösungen unterschiedlicher Kalziumkonzentrationen. Im Vergleich zu der Leervektorkontrolle zeigte STIM2.2 in Koüberexpression mit STIM1 ein noch weiter erhöhtes basales Kalzium, während SOCE durch die zusätzliche Koüberexpression von STIM2.2 nicht beeinflusst wurde (Abbildung 15B). Umgekehrt verhielt es sich bei Überexpression von STIM1 zusammen mit STIM2.1. Während dies keinen Einfluss auf das basale Kalzium hatte, waren Ca^{2+} -Peak und -Plateau um knapp $\sim 50\%$ verringert. Somit übt STIM2.1 seinen inhibitorischen Effekt sowohl auf die andere Spleißvariante STIM2.2 als auch auf das Homolog STIM1 aus.

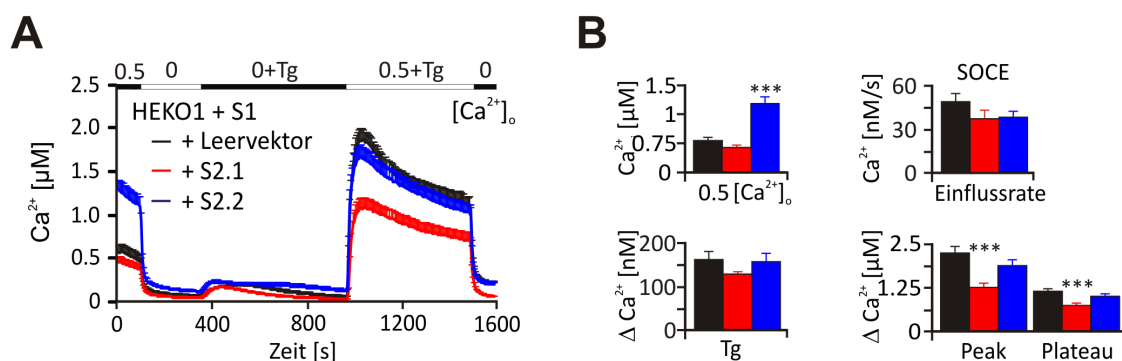


Abbildung 15: **STIM2.1 wirkt dominant negativ auf den STIM1 vermittelten SOCE.**

A: Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) über Zeit in HEK-O1 Zellen nach Kotransfektion mit STIM1-IRES-RFP und Leervektorkontrolle (schwarz, $n = 125$), bzw. YFP-STIM2.1 (rot, $n = 124$) oder YFP-STIM2.2 (blau, $n = 98$). **B:** Quantifizierung der Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus A unter Analyse von basalem Kalzium, SOCE-Einflussrate, Tg-Peak, sowie SOCE-Peak und Plateau. Abbildung modifiziert aus [Miederer et al., 2015].

4.1.7 STIM2.1 zeigt eine beeinträchtigte Interaktion mit Orail trotz sehr guter Kolo-kalisation

Die bisherige Arbeit zeigt, dass die neue Spleißvariante STIM2.1 in allen getesteten Zelltypen nachgewiesen werden konnte und einen dominant negativen Effekt auf den STIM1- und STIM2.2-vermittelten speichergesteuerten Kalziumeinstrom ausübte. Dass dies nicht nur im Überexpressionssystem von Relevanz ist, wurde anhand der siRNA Experimente gegen die endogene mRNA der Spleißvarianten in CD4^+ T Zellen festgestellt. Die Einzelüberexpression von STIM2.1 deckte auf, dass dieses Protein nicht in der Lage war Orail zu aktivieren. Allerdings klärten diese Experimente nicht, warum die neue Variante inhibitorisch wirkt. Zur Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus wurden Kolo-kalisation und FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) zwischen Kanalprotein Orail und STIM2-Spleißvarianten untersucht.

Hierfür wurden zunächst Konstrukte kloniert, die für eine FRET-Analyse verwendet

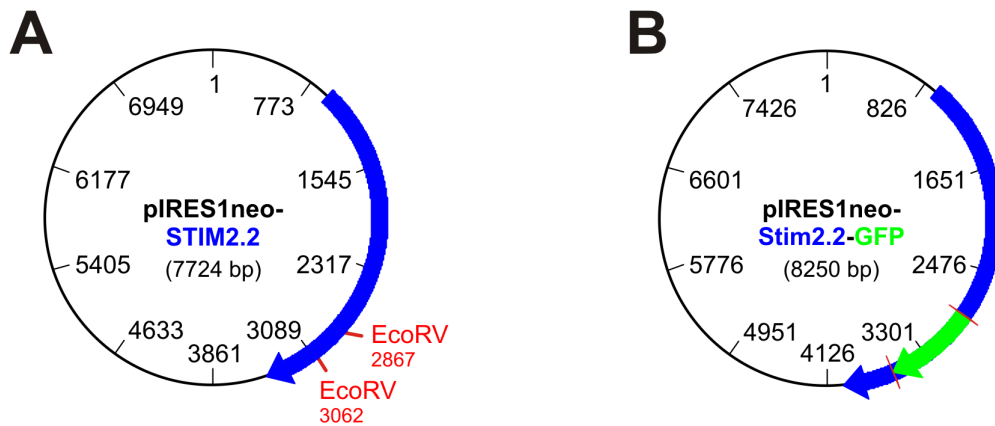


Abbildung 16: Vektorkarte des neu klonierten STIM2.2-GFP unter Anzeige der entfernten Basenpaare. **A:** Vektorkarte des Ausgangsvektors unter Anzeige der EcoRV Schnittstellen, die für die Klonierung verwendet wurden. **B:** Beispielhafte Vektorkarte des klonierten Fusionskonstrukts STIM2.2-GFP.

werden können. Aufgrund bereits vorhandener GFP- als auch RFP-markierter Orai1-Konstrukte, sollten für die Spleißvarianten ebenfalls grün- und rot-fluoreszierende Varianten kloniert werden. Da FRET eine Distanz von <10 nm benötigt, musste für ein Gelingen die Fluoreszenzmarkierung in den C-Terminus von STIM kloniert werden. Um nicht den mit der Plasmamembran interagierenden polybasischen C-Terminus durch das Fluoreszenzprotein zu maskieren, wurde der pIRES1neo-SPS2-STIM2.1 bzw. -STIM2.2 Vektor mit EcoRV linearisiert (Abbildung 16A) und GFP bzw. mcherry in eine variable und bisher uncharakterisierte Domäne des C-Terminus kloniert. Dabei kam es zu einer Deletion von 195 bp aus dem C-Terminus von STIM2. Abbildung 16B zeigt beispielhaft die Vektorkarte für pIRES1neo-STIM2.2-GFP. Über die gleiche Klonierungsstrategie wurde pIRES1neo-STIM2.2-mcherry, sowie die entsprechenden STIM2.1-Konstrukte hergestellt.

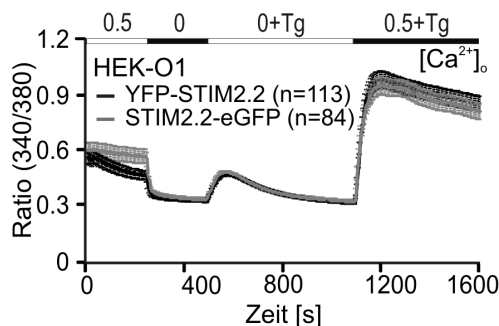


Abbildung 17: Lokalisierung der Fluoreszenzmarkierung beeinflusst die Funktionalität von STIM2.2 nicht. Verlauf der mittleren intrazellulären Ratio (340/380) über Zeit in HEK-O1 T Zellen nach Transfektion mit YFP-STIM2.2 bzw. STIM2.2-GFP.

Um die Funktionalität der neuen Konstrukte zu testen und sicherzustellen, dass die Insertion der Fluoreszenzmarkierung bzw. das Entfernen von 195 bp durch die Restriktion mit EcoRV die Aktivität von STIM2.2 nicht beeinträchtigte, wurde das neue Konstrukt und ein Kontrollkonstrukt (pEX-YFP-STIM2.2) in HEK-O1 Zellen transfiziert und mittels Ca^{2+} -Imaging analysiert. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, unterschieden sich die beiden

Konstrukte kaum. Somit war STIM2.2 trotz Insertion des Tags, sowie der fehlenden Basen weiterhin funktionell und in der Lage Orai1 zu aktivieren.

Für die FRET- und Kolokalisationsanalyse wurden HEKwt Zellen mit C-terminal markiertem Orai1-GFP und einer der mcherry-markierten Spleißvarianten kotransfiziert und am Folgetag mittels TIRF-Mikroskopie analysiert. Abbildung 18A zeigt TIRF-Aufnahmen der Fluoreszenz-markierten Proteine nach Inkubation mit Thapsigargin. Die eingetragene Skala entspricht 10 μm .

Zu sehen war, dass nach Entleerung der Kalziumspeicher durch Thapsigargin STIM2.2, aber ebenso STIM2.1, in Clustern vorlag. Kleinere Cluster der Spleißvarianten waren bereits in Zellen sichtbar, die nicht mit Thapsigargin präinkubiert wurden (Abbildung 18D). Beide Spleißvarianten zeigten große Cluster nach der Speicherentleerung durch Thapsigargin (roter Kanal, Abbildung 18A); diese Clusterbildung war auch für Orai1 (grün) der Fall. Die übereinander gelegten Aufnahmen in beiden Kanälen der gleichen Zelle (gelb) zeigen, dass beide Spleißvarianten in den gleichen Clustern wie Orai1 vorkamen. Die Quantifizierung der Kolokalisation mittels Manders ist in Abbildung 18B dargestellt. M1 steht für den Anteil an STIM2, der in den Orai1-Clustern zu finden ist. Bei M2 verhält es sich umgekehrt. Beide Spleißvarianten zeigten eine sehr hohe Kolokalisation mit dem Kanalprotein, wobei sich etwas weniger Orai1 in den STIM2.1 Clustern befand, als in den STIM2.2 Clustern. In der vierten Spalte ist die FRET-Effizienz dargestellt. Die Quantifizierung (Abbildung 18C) ergab eine FRET-Effizienz von $0,058 \pm 0,041$ für STIM2.2-Orai1. Die FRET Effizienz von STIM2.1 und Orai1 war im Gegensatz dazu mit einem Wert von $0,0077 \pm 0,014$ stark reduziert.

Zusammengefasst ergab die Kolokalisationsstudie, dass beide Spleißvarianten eine eindeutige Clusterbildung zeigten, die Insertion des Exons dementsprechend diese nicht beeinträchtigte, und sich sowohl STIM2.1 als auch STIM2.2 zum größten Teil in den gleichen Clustern wie das Kanalprotein Orai1 befanden. Ein signifikanter Unterschied wurde allerdings bei der FRET-Analyse beobachtet, da die FRET Effizienz zwischen Orai1 und STIM2.1 im Vergleich zu Orai1-STIM2.2-FRET drastisch reduziert war.

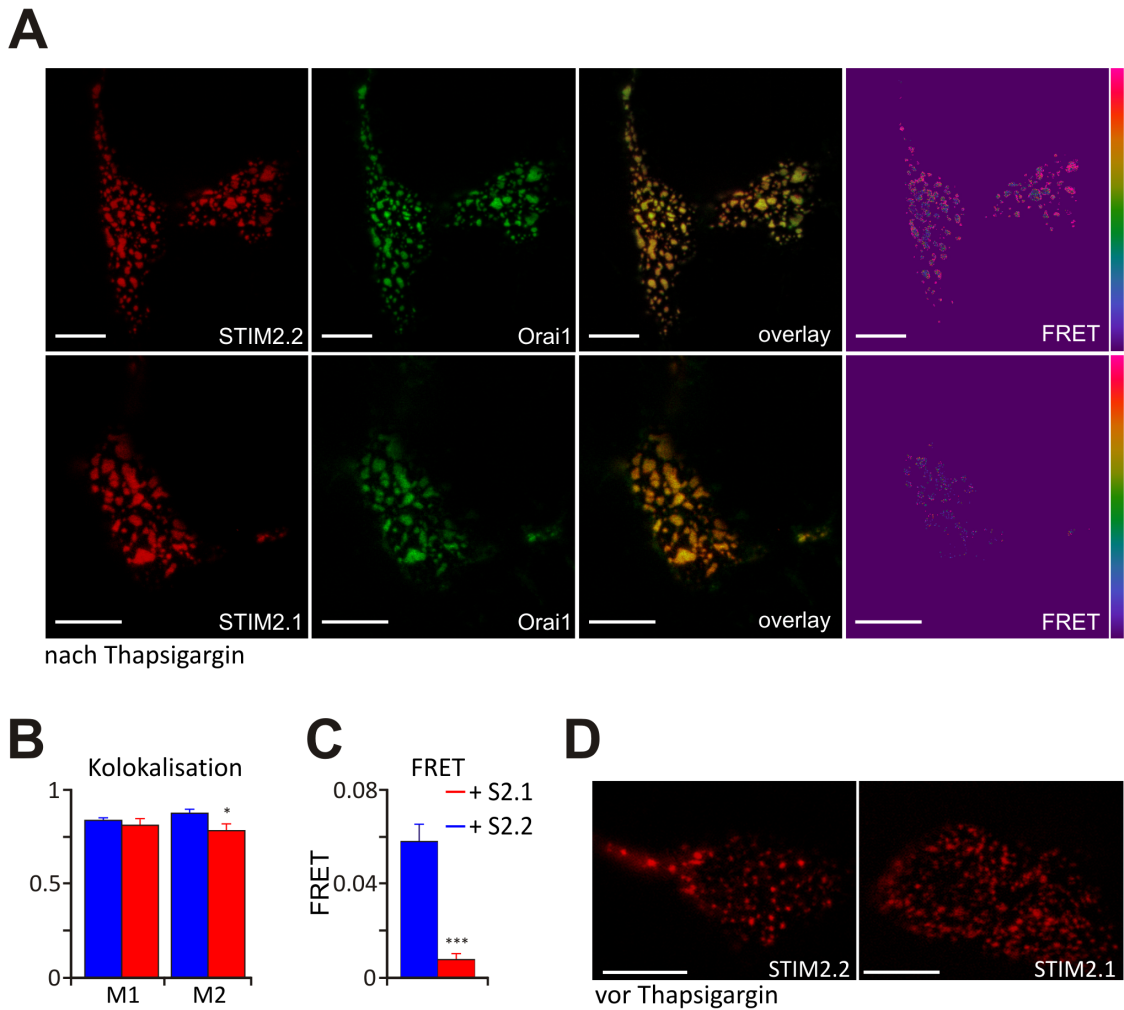


Abbildung 18: **STIM2.1 zeigt bei vergleichbarer Kolokalisation eine beeinträchtigte Interaktion mit Orai1 im Vergleich zu STIM2.2-Orai1.** **A:** Beispielhafte TIRF-Aufnahmen von HEKwt Zellen kotransfiziert mit STIM2.1- (Spalte 1 unten) bzw. STIM2.2-mcherry (Spalte 1 oben) und Orai1-GFP (Spalte 2). Spalte 3 zeigt die übereinandergelegten Einzelkanäle. In Spalte 4 ist die FRET-Effizienz mit Hilfe einer Regenbogenskala visualisiert. Die LUT-Skala geht von 0,0 - 0,3. **B:** Quantifizierung der Kolokalisation mit Hilfe des Manders Koeffizienten aus den Aufnahmen in A. M1 steht für die Menge STIM2 in Orai1 Clustern, während M2 die Anzahl grüner Pixel in roten Pixeln untersucht. Für beide Spleißvarianten wurde ein n = 9 Zellen analysiert. **C:** Quantifizierung der FRET-Effizienz gemessen in A (STIM2.1 n = 36; STIM2.2 n = 31). **D:** Beispielhafte TIRF-Aufnahme von Zellen aus A vor Thapsigargin-Inkubation. Die eingezeichnete Größenskala beträgt 10 μ m. Abbildung modifiziert aus [Miederer et al., 2015]

4.1.8 Spleißvarianten liegen in gemischten Clustern vor

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Spleißvarianten eine unterschiedliche Kolokalisation in Abhängigkeit von der STIM2 Zusammensetzung in der Zelle zeigten. Dies diente dazu herauszufinden, ob eine der Spleißvarianten präferenziell Cluster mit sich selbst bildet oder beide in gemischten Clustern vorliegen.

Hierfür wurde die jeweils STIM2.1 bzw. STIM2.2 mcherry- und GFP-markierte Konstrukte in einem Verhältnis 1 : 1 in HEKwt Zellen überexprimiert. Daraus entstanden

folgende drei Paarungen: STIM2.1-mcherry + STIM2.1-GFP; STIM2.1-mcherry + STIM2.2-GFP; STIM2.2-mcherry + STIM2.2-GFP. Zur Analyse der Kolokalisation wurde der Pearson's, sowie der Manders Koeffizient verwendet. Abbildung 19 zeigt, dass in keinem der Parameter ein Unterschied zu sehen war. D.h. STIM2.1 befindet sich ebenso häufig in Clustern mit sich selbst, wie mit STIM2.2 und umgekehrt. M1 steht für den Anteil an rot-fluoreszierendem Protein (STIM2.1-mcherry in Abbildung 19M1 lila), der in Kolokalisation mit grün-fluoreszierenden Proteinen (STIM2.2-GFP in Abbildung 19M1 lila) zu finden war. Da es sich bei M2 um den umgekehrten Fall handelt, definierte dieser Koeffizient die Menge an STIM2.2-GFP in STIM2.1-mcherry Clustern.

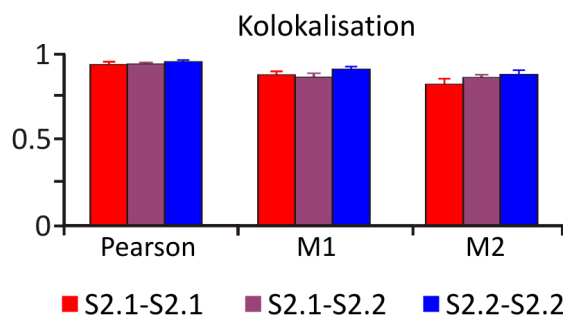


Abbildung 19: **Spleißvarianten liegen in gemischten Clustern vor.** Kolokalisationsanalyse erfolgte mittels Pearson's und Manders Koeffizienten. Rot: STIM2.1-mcherry + STIM2.1-GFP; Lila: STIM2.1-mcherry + STIM2.2-GFP; Blau: STIM2.2-mcherry + STIM2.2-GFP.

4.1.9 Exon 9 spezifisches IQ-Calmodulin-Bindemotiv ist nicht verantwortlich für die inhibitorische Wirkung von STIM2.1

In den vorherigen Abschnitten der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich STIM2.1 in den gleichen Clustern wie STIM2.2 befindet, selbst noch zur Clusterbildung fähig ist und mit dem Kanalprotein kolokalisiert. Allein die Interaktion, wie anhand von FRET gezeigt, war stark verringert. Bei eingehender Betrachtung der Exon 9 kodierenden Aminosäuresequenz fiel auf, dass durch die Insertion der zusätzlichen 8 Aminosäuren (VAASYLIQ) beinahe ein klassisches IQ-Motiv als Calmodulinbindemotiv ($\text{IQ}_{xxx}\text{KI}_{xxx}\text{RxxV}$) entsteht: **IQAEKIKKKRSTV** in STIM2.1. Die Datenbank *Calmodulin Target Database* bewertet Sequenzen anhand ihrer Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei um Calmodulin-Bindestellen handelt. Bei Eingabe der STIM2.1 und STIM2.2 spezifischen Sequenzen zeigte sich, dass die Insertion des zusätzlichen Exons zu einer starken Bewertung eben jener Sequenz im Bezug auf Calmodulin-Bindung führte (8 Punkte von maximal 9). Bei STIM2.2 befindet sich die Sequenz mit der besten Wertung (4 von 9) um 40 Aminosäuren in Richtung C-Terminus verschoben.

Um zu untersuchen, ob eine stärkere Calmodulin-Bindung mittels des IQ-Motivs für die Inaktivität von STIM2.1 verantwortlich ist, wurde eine IQ-Mutante (STIM2.1-IQ/AA) in HEK-O1 Zellen überexprimiert und mit STIM2.1 verglichen. Abbildung 20A zeigt, dass sich der Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration über Zeit nach Perfusion mit Lösungen unterschiedlicher Kalzium-Konzentrationen in der Mutante leicht veränderte. So wurde der Tg-Peak kleiner und SOCE leicht erhöht. Jedoch wird weiterhin keine Aktivierung von Orai1 erreicht, wie dies bei STIM2.2 (siehe Abbildung 17) der Fall war.

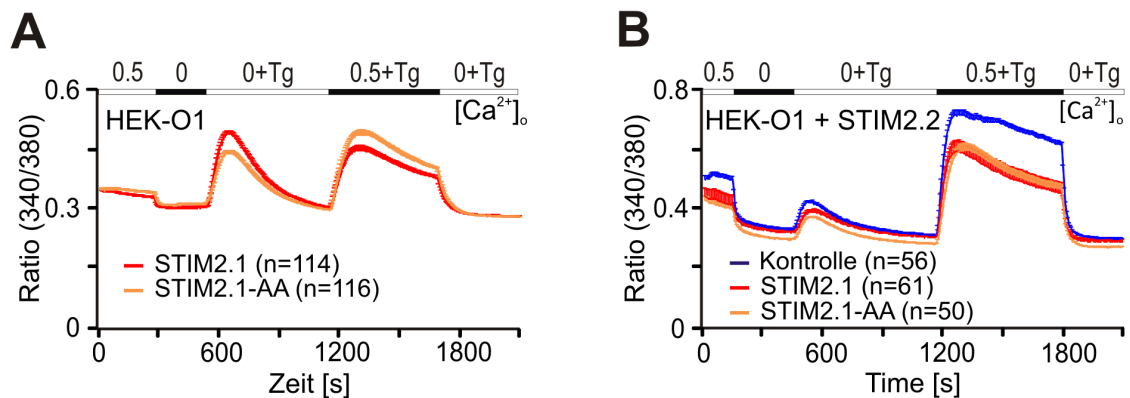


Abbildung 20: **Mutation des putativen Calmodulin-Bindemotivs von STIM2.1 hat keinen Einfluss auf SOCE.** **A:** Verlauf der mittleren intrazellulären Ratio (340/380) über Zeit in HEK-O1 Zellen nach Transfektion mit YFP-STIM2.1 (rot, n = 114, 1 Messtag) bzw. YFP-STIM2.1-IQ/AA (orange, n = 116, 1 Messtag). **B:** Verlauf der mittleren intrazellulären Ratio (340/380) über Zeit in HEK-O1 Zellen nach Kotransfektion mit STIM2.2-mcherry und YFP-STIM2.1 (rot, n = 61, 2 Messtage) bzw. YFP-STIM2.1-IQ/AA (orange, n = 50, 2 Messtage) bzw. Leervektor (blau, n = 56, 2 Messtage).

Weiterhin blieb die Frage, ob es sich bei der Inaktivität von STIM2.1 im Bezug auf die Orail-Aktivierung um den Grund für den inhibitorischen Effekt handelt oder ob es sich dabei um zwei unterschiedliche Mechanismen handelt und der dominant-negative Effekt auf einer aktiv vermittelten Inhibition durch STIM2.1 basiert. Hierbei könnte eine stärkere Bindung an Calmodulin eine Rolle spielen. Um zu untersuchen, ob die STIM2.1-IQ/AA Mutante weiterhin dominant negativ wirkt, wurden beide STIM2.1-Konstrukte zusätzlich mit STIM2.2 in HEK-O1 Zellen überexprimiert und im Ca^{2+} -Imaging analysiert. Der Verlauf der Ratio während des Experiments ist in Abbildung 20B dargestellt. Beide STIM2.1 Varianten zeigten ein, in Koüberexpression gleichermaßen, verringertes basales Kalzium und einen kleineren SOCE im Vergleich zur STIM2.2/Leervektor-Kontrolle, wobei sie sich untereinander nicht unterschieden. Somit ist das STIM2.1 spezifische IQ-Motiv alleine wahrscheinlich weder ausschlaggebend für die Inaktivität der neuen Spleißvariante noch für den durch STIM2.1 vermittelten inhibitorischen Effekt verantwortlich.

4.2 Proteomik

4.2.1 Klonierung eines STIM2-APEX2-Fusionskonstrukts

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine neue STIM2 Spleißvariante, STIM2.1, im Vergleich zur konventionellen Variante STIM2.2 beschrieben und charakterisiert. Zusätzlich wurde der Mechanismus des von ihr vermittelten inhibitorischen Effekts auf STIM1- und STIM2.2-Orai1 mediierten SOCE untersucht. Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2015 identifizierte STIMATE als positiven Regulator des speichergesteuerten Kalziumeinstroms und Interaktionspartner von STIM1 [Jing et al., 2015] und gab so neue Einblicke in Regulationsmechanismen des speichergesteuerten Kalziumeinstroms. Über mögliche Interaktionspartner von STIM2 und deren regulativen Einfluss auf SOCE ist bisher wenig bekannt. Eine Identifikation von Interaktionspartnern bietet die Möglichkeit mehr über die Funktion des Ursprungsproteins und dessen Regulationsmechanismen, sowie Beteiligung an verschiedenen Prozessen herauszufinden. Besonders geeignet, um erste Eindrücke für mögliche interagierende Proteine zu finden ist eine *in situ* Protein-Markierungstechnik in der unter räumlicher und zeitlicher Auflösung Proteine in unmittelbarer Nähe zum Ausgangsprotein biotinyliert werden [Lam et al., 2015; Martell et al., 2012]. Für diese Herangehensweise wurde das Reporterenzym Ascorbat Peroxidase 2 (APEX2) verwendet und als Fusionskonstrukt in die Spleißvarianten kloniert. Mit Hilfe von APEX2 können in Anwesenheit von Zell-permeablen Biotin-Phenol Proteine in unmittelbarer Nähe zum Fusionsprotein biotinyliert werden. Die Biotinylierung kann dann für eine Aufreinigung der Proteine und anschließende Analyse verwendet werden. Diese Methode zeichnet sich besonders dafür aus, dass sie endogene nahestehende Proteine des APEX2-markierten Proteins in einem intakten Zellsystem biotinyliert. Im nativen System können so theoretisch durch die Reaktion des Biotin-Phenol-Radikals mit nahestehenden Proteinen auch transiente oder schwache Interaktionen beobachtet werden.

In einem ersten Schritt wurden das 804 bp lange APEX2 über eine singuläre Bsp2 Schnittstelle in eine variable Region des C-Terminus der cDNA von YFP-STIM2.1 bzw. YFP-STIM2.2 kloniert. Im Vergleich zur vorher verwendeten Klonierungsstrategie (Absatz 4.1.7) wurde kein Teil der cDNA Sequenz entfernt. Abbildung 21A zeigt die Vektorkarte für das 8932 bp große Konstrukt pCDNA5-FRT/TO-YFP-STIM2.2-APEX2. Das YFP-STIM2.1-APEX2 Konstrukt ist aufgrund der zusätzlichen 24 bp von Exon 9 dementsprechend 8956 bp groß.

Nach der erfolgreichen Klonierung wurde die Funktionalität der neuen Konstrukte mittels heterologer Überexpression im Ca^{2+} -Imaging in HEK-O1 überprüft (Abb. 21). Hier war zu sehen, dass beide Spleißvarianten, trotz der Insertion der zusätzlichen ~28 kDa von APEX2 in die C-terminale Region von STIM2 weiterhin ihren erwarteten Phänotyp zeigten (vergleiche Abbildungen 21 und 9). Somit beeinflusste APEX2 die STIM2.2-vermittelte Orai1 Aktivierung bzw. Inhibierung mittels STIM2.1 nicht und wurde für weitere Experimente verwendet.

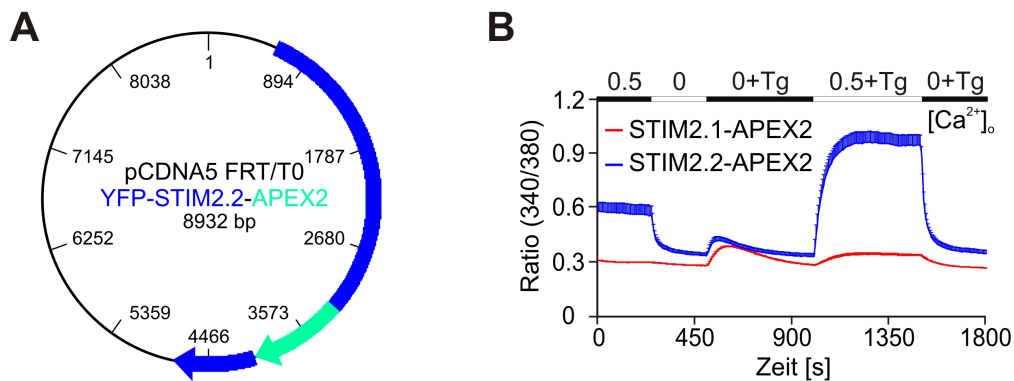


Abbildung 21: **Spleißvarianten zeigen ihren jeweiligen Phänotyp trotz Insertion von APEX2.** **A:** Schematische Darstellung des Fusionskonstrukts mittels Vektormap von pCDNA5-FRT/TO-YFP-STIM2.2-APEX2 unter Angabe der Vektorgöße. **B:** Verlauf der mittleren intrazellulären Ratio (340/380) über Zeit in HEK-O1 Zellen nach Transfektion mit YFP-STIM2.1-APEX2 (rot, n = 51, 1 Messtag) bzw. YFP-STIM2.2-APEX2 (blau, n = 47, 1 Messtag).

4.2.2 Biotinylierte Proteine kolokalisieren mit YFP-STIM2

Zur Kontrolle der Funktionalität des Experiments sollte der Reaktionsradius der Biotinylierung um das Fusionsprotein überprüft werden. Bei der Identifikation von neuen STIM2-Interaktionspartnern ist es wichtig, dass sich die indirekt durch APEX2 biotinylierten Proteine in unmittelbarer Nähe von STIM2 befinden. Dies sollte anhand von Immunzytochemie überprüft werden. Hierzu wurden HEK293T Zellen mit den spleißspezifischen APEX2 Konstrukten transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Membran-gängigen Biotin-Phenol inkubiert und die Peroxidase-Aktivität durch H_2O_2 induziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mikroskopiert, wobei STIM2 mittels der YFP-Markierung und die biotinylierten Proteine mittels Streptavidin-AF568 detektiert wurden.

Abbildung 22 zeigt die Aufnahmen der konfokalen Mikroskopie. Dabei wurde in Spalte 1 die YFP-Fluoreszenz von STIM2 dargestellt, in Spalte 2 die Biotinylierung, während Spalte 3 ein übereinandergelagertes Bild der beiden Kanäle mit zusätzlicher DAPI-Färbung abgebildet ist. Die erste Zeile stellt die Negativkontrolle dar. Hierbei handelte es sich um Zellen, die mit einem Kontrollkonstrukt (YFP-STIM2.2 ohne APEX2) transfiziert wurden. Diese Zellen zeigten trotz der Behandlung keine Biotinylierung (Abbildung 22a2), wie anhand der fehlenden Fluoreszenz im Rotkanal zu beobachten war. Sowohl die HEK293T Zellen, die mit STIM2.2-APEX2 (Abbildung 22b), als auch die STIM2.1-APEX2 (Abbildung 22c) transfizierten Zellen zeigten ein deutliches Signal im Rotkanal. Folglich war die enzymatische Aktivität von APEX2, obwohl es in die STIM2-Sequenz kloniert wurde, nicht beeinträchtigt. In beiden Fällen war in Spalte 3 (Overlay) zu sehen, dass die Biotinylierung in unmittelbarer Nähe zu STIM2 geschah, wie das kolokalisierende YFP- und das AF568-Signal zeigen.

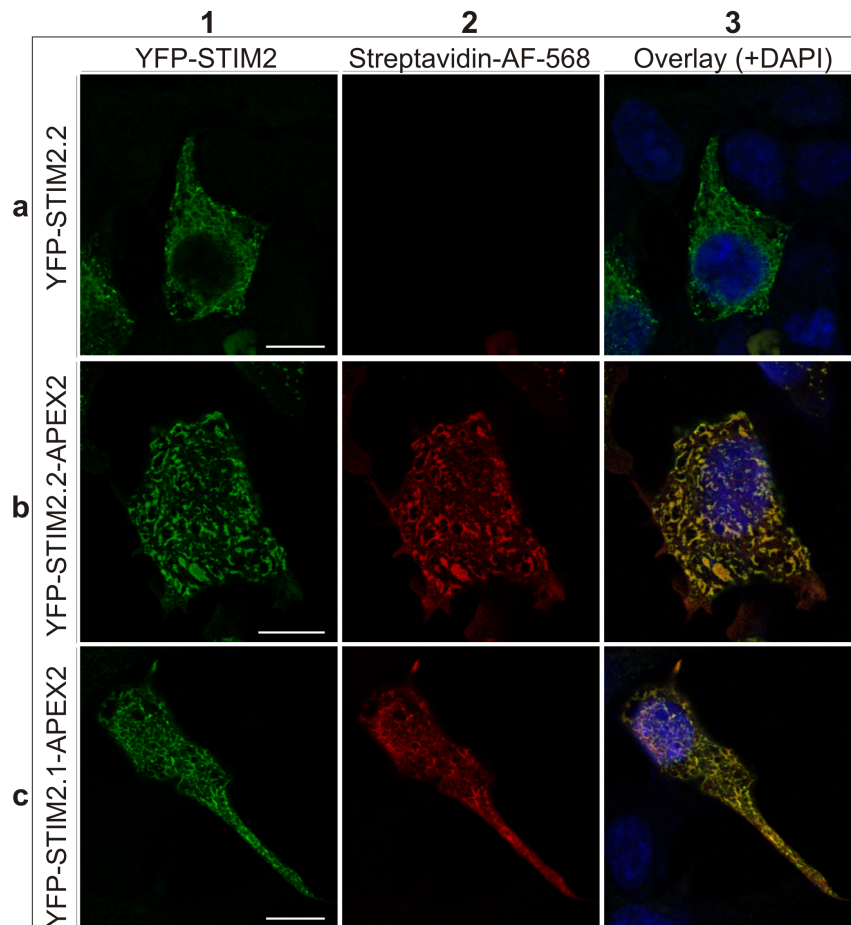


Abbildung 22: **APEX2** vermittelte Biotinylierung findet in unmittelbarer Umgebung zu **STIM2** statt. Exemplarische Aufnahme nach Immunzytochemie von HEK293T Zellen nach Transfektion von YFP-STIM2.2 (Zeile a), YFP-STIM2.2-APEX2 (Zeile b) bzw. YFP-STIM2.1-APEX2 (Zeile c). Spalte 1 zeigt im Grünkanal die Detektion von YFP-STIM2, Spalte 2 zeigt die Streptavidin-AF568 vermittelte Detektion biotinylierter Proteine und Spalte 3 die Übereinanderlagerung beider Kanäle zusammen mit DAPI. Der eingezeichnete Maßstab beträgt 10 μm .

4.2.3 Biotinylierung findet nur in Anwesenheit von Biotin-Phenol und H_2O_2 statt

Nachdem die Aktivität von APEX2 bestätigt wurde und gezeigt werden konnte, dass die Biotinylierung in unmittelbarer Nähe zu STIM2 geschieht, sollte sichergestellt werden, dass eine Inkubation der Zellen mit Biotin-Phenol nötig ist und die Peroxidase-Aktivität mittels H_2O_2 induziert werden kann. Um dies zu überprüfen wurde ein Westernblot von unterschiedlich behandelten Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 23). Die Detektion der biotinylierten Proteine geschah direkt mittels Streptavidin-HRP.

Bei den in Spur 1 dargestellten Zellen handelte es sich um untransfizierte HEK293T Zellen. Die Zellen, deren Lysate in Spur 2 und 3 aufgetragen wurden, wurden mit Biotin-Phenol präinkubiert und die Peroxidase durch H_2O_2 aktiviert. Diese Spuren zeigten Proteinbanden aus *STIM2.1-APEX2* bzw. *STIM2.2-APEX2* exprimierenden Zellen, welche

ein sehr ähnliches Bandenmuster von ~30 kDa bis > 245 kDa aufwiesen. Zusätzlich waren definierte und gut voneinander abgetrennte Banden zu erkennen, was erneut auf eine lokale Aktivität der Peroxidase hinwies. In Spur 4 und 5 wurden Lysate von STIM2.2-APEX2 transfizierten Zellen aufgetragen. Dabei entfiel bei der einen Probe die Inkubation mit Biotin-Phenol (Abbildung 23 Spur 4), bei der anderen Probe die Zugabe von H₂O₂ (Abbildung 23 Spur 5). In beiden Spuren fehlte das in Spur 2 und 3 zu sehende Bandenmuster. Ebenso wie in den untransfizierten Zellen war jedoch eine Bande bei ~63 kDa zu sehen. Diese zog sich jedoch gleichermaßen über den gesamten Westernblot und erschien auch zwischen den Spuren. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um ein Artefakt. Somit fand in den untransfizierten (Spur 1), ebenso wie in den Kontroll-Zellen (Spur 4 & 5) keine Biotinylierung statt. Dies zeigte, dass APEX2 keine Hintergrundaktivität hatte und nur nach Induktion aktiv war. Somit war für eine erfolgreiche Biotinylierung sowohl Biotin-Phenol, als auch H₂O₂ notwendig.

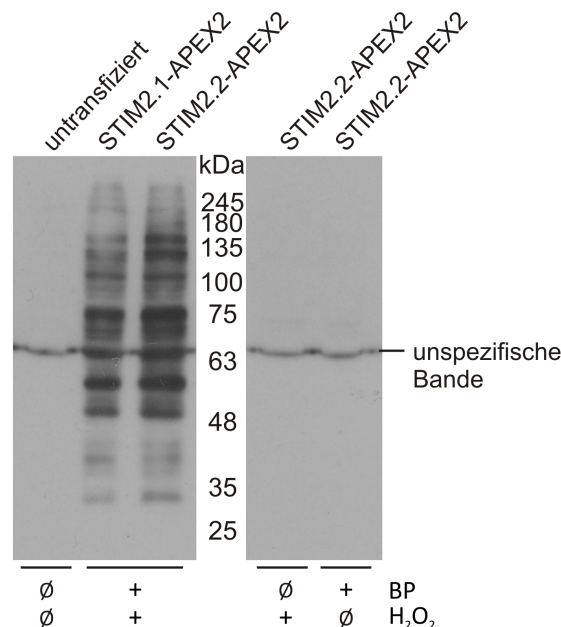


Abbildung 23: Nachweis der Biotinylierung in Anwesenheit von Biotin-Phenol und H₂O₂ durch Streptavidin-HRP. Westernblot der Lysate von untransfizierten (Spur 1) und mit STIM2.1-APEX2 (Spur 2) bzw. STIM2.2-APEX2 (Spur 3-5) transfizierten HEK293T Zellen nach unterschiedlicher Behandlung der Zellen.

4.2.4 Vorbereitung und Analyse der Massenspektrometrie

Unser Ziel war es mittels Massenspektrometrie neue, den Spleißvarianten gemeinsame, sowie spleißspezifische, Interaktionspartner zu identifizieren. Hierfür wurde die Herangehensweise mittels APEX2-vermittelter Biotinylierung gewählt, vorbereitet und validiert. Um bei der Analyse der Resultate der Massenspektrometrie leichter falsch positive Hits identifizieren zu können, wurden die Zellen in SILAC-Medium kultiviert. Diese Methode ermöglicht, aufgrund der Kultivierung der Zellen in mit unterschiedlich schweren Isotopen versetzten

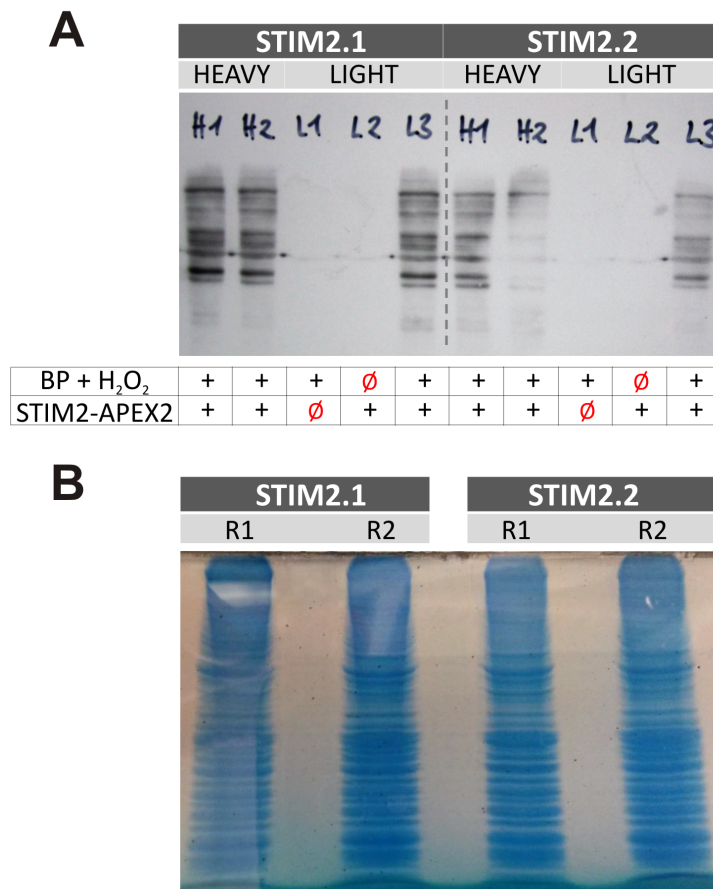


Abbildung 24: **Aufnahme des Kontroll-Westernblots und SDS-Gels vor Massenspektrometrie.** **A:** Western blot der Lysate der in verschiedenen Medien (Heavy vs. Light) kultivierten Zellen. Spur 1-5: STIM2.1-APEX2 transfizierte Zellen; Spur 6-10: STIM2.2-APEX2 transfizierte Zellen. Die unterschiedlichen Behandlungen sind in der Tabelle unter der Aufnahme angegeben. **B:** Abbildung des SDS-Gels nach silber-blau Coomassie Färbung.

Medien, eine Negativkontrolle mit den behandelten Zellen zu mischen und als ein Replikat mittels Massenspektrometrie und HPLC zu analysieren. Auf diese Weise können die identifizierten Peptide anhand des H/L-Faktors klassifiziert werden, was das Einschränken der Resultate auf mögliche echte Interaktionspartner erleichtert (siehe 3.3.4).

Abbildung 24A zeigt den Kontroll-Western blot der Lysate der unterschiedlich kultivierten Zellen. Die ersten fünf Spuren zeigten Lysate von STIM2.1-transfizierten Zellen, Spur 6 - 10 zeigten STIM2.2-transfizierte Zellen. Vor dem Mischen von H1 und L1 (+ 5 % L3) zu Replikat R1 und H2 und L2 (+ 5 % L3) zu R2 (für mehr Details siehe Abschnitt 3.3.4) wurde 1 µl der Lysate für einen Kontroll-Western blot verwendet, um sicherzustellen, dass H1, H2 und L3 biotinyliert waren (in schwerem bzw. leichtem Medium kultiviert; transfiziert; behandelt mit Biotin-Phenol und H₂O₂) und die Negativkontrollen (L1 & L2) keine Biotinylierung aufwiesen. Wie Abbildung 24A zeigt, waren ausschließlich in den erwarteten Spuren Proteinbanden zu sehen. Die artifizielle Bande, die bereits zuvor beschrieben wurde, zog sich auch hier über den gesamten Blot.

Nach dem erfolgreichen Kontroll-Westernblot wurden die verschiedenen Lysate zu Replikate R1 und R2 für STIM2.1 und STIM2.2 vereinigt, die biotinylierten Proteine über Streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen angereichert, eluiert und anschließend auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen, welches zu $\sim 3/4$ laufen gelassen wurde. Durch eine silber-blau Coomassie Färbung wurden die Proteinbanden angefärbt. Abbildung 24B zeigt eine Aufnahme des Gels nach der Färbung. Das Gel wies ungewöhnlich viele Banden für die zwei STIM2.1-, sowie beide STIM2.2-Replikate auf. Zusätzlich entsprach das Bandenmuster nicht den in den Westernblots detektierten Banden.

Im Anschluss wurde das Gel von der Massenspektrometrie-Einrichtung prozessiert und die Proben analysiert. Für die unterschiedlichen Replikate ergaben sich folgende Anzahl an gefundenen Proteinen: STIM2.1: R1 1018 Hits und R2 1004 Hits; STIM2.2: R1 977 Hits und R2 989 Hits. Nach Setzen eines individuellen Grenzwerts für jedes Replikate (Einzelheiten siehe 3.3.4) verblieben 95 Top-Hits für STIM2.1-R1, 63 Top-Hits für STIM2.1-R2, 49 für STIM2.2-R1, sowie 57 Hits für STIM2.2-R2. Nach der Prozessierung der Vorhersagen, wie in Abbildung 25 dargestellt, blieben die in Tabelle 35 aufgeführten Hits.

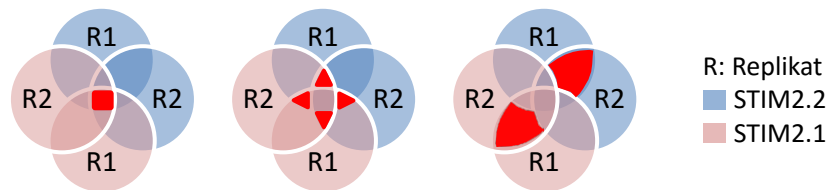


Abbildung 25: **Darstellung der relevanten Schnittmengen aller Replikate** Blaue Kreise stehen für die Hits des Replikats 1 und 2 (R1 bzw. R2) von STIM2.2, rote für R1 und R2 aus STIM2.1. **A:** Schnittmenge aller vier Replikate; **B:** Schnittmenge aus drei der vier Replikate; **C:** Spleißspezifische Hits.

Dabei wurden neun Proteine in den Top-Hits aller vier Replikate (je zwei Replikate für STIM2.1 und STIM2.2) gefunden. 14 Vorhersagen wurden in drei der vier Replikate unter den besten Hits gefunden. Acht der 14 dreimal vorkommenden Proteine wurden ebenfalls in dem vierten Replikate gefunden, allerdings nicht unter den besten Hits. Die angegebene Zahl in Tabelle 35 markiert die Position an der Protein X, nach Sortieren der Hits entsprechend ihres H/L-Wertes, gefunden wurde. Dies markiert eine Position außerhalb der Top-Hits. Mehrere Proteine wurden in nur zwei der vier Replikate gefunden. Hier wurde überprüft, ob diese ausschließlich in den STIM2.1 bzw. STIM2.2 transfizierten Zellen identifiziert wurden. Alle Proteine, die zweimal in den Top-Hits einer Spleißvariante gefunden wurden, jedoch in den Gesamt-Hits der anderen Spleißvariante vorkamen, wurden nicht aufgeführt. Nach dieser Sortierung blieb jeweils ein spleißspezifisches Protein pro Variante. Auch diese finden sich in Tabelle 35. STIM2 selbst wurde in zwei der vier Replikate oberhalb und in zwei der vier Replikate unterhalb des individuell gesetzten Schwellenwerts gefunden.

Tabelle 35: Übersicht über die gefundenen biotinylierten Proteine nach massenspektrometrischer Analyse unter Angabe des Protein-Identifikationsnummer (Accession), des Names, der Replikatnummer und das Anzahl wie oft das Protein in den Top-Hits der vier Replikate vorkam (Anz.). Angegebene Zahlen stehen für den Rang des Proteins in der Liste der Gesamt-Hits unterhalb des individuell gesetzten Schwellenwerts.

Accession	Proteinname	STIM2.1		STIM2.2		Anz.
		R1	R2	R1	R2	
P63104	14-3-3 Protein ζ/δ	✓	✓	✓	✓	4
Q00610	Clathrin schwere Kette 1	✓	✓	✓	✓	4
P29692	Elongationsfaktor 1- δ	✓	✓	✓	✓	4
P26641	Elongationsfaktor 1- γ	✓	✓	✓	✓	4
P04075	Fruktose-bisphosphat Aldolase A	✓	✓	✓	✓	4
P07900	Hitzeschockprotein HSP 90- α	✓	✓	✓	✓	4
P32119	Peroxiredoxin-2	✓	✓	✓	✓	4
Q13162	Peroxiredoxin-4	✓	✓	✓	✓	4
P55072	Transitionelle ER ATPase	✓	✓	✓	✓	4
P62258	14-3-3 Protein ϵ	✓	✓	✓	# 60	3
Q13155	AARS-interagierendes multifunktionales Protein 2	✓	✓	✓	# 65	3
O43175	D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase	✓	-	✓	✓	3
Q92616	eIF-2- α Kinase Aktivator GCN1	✓	✓	# 82	✓	3
Q13347	Euk. Translationsinitiationsfaktor 3 Untereinheit I	✓	-	✓	✓	3
Q9BSJ8	<i>Extended</i> Synaptotagmin-1	✓	-	✓	✓	3
P49327	Fettsäuresynthase	✓	✓	# 63	✓	3
P00492	Hypoxanthin-Guanine Phosphoribosyltransferase	✓	-	✓	✓	3
P07195	L-Laktatdehydrogenase B Kette	✓	✓	# 71	✓	3
Q9BV20	Methylthioribose-1-Phosphatisomerase	✓	✓	# 100	✓	3
P22234	Multifunktionales Protein ADE2	✓	-	✓	✓	3
P07737	Profilin 1	✓	✓	✓	-	3
P37802	Transgelin-2	✓	# 958	✓	✓	3
P07437	Tubulin β Kette	✓	✓	# 85	✓	3
P04080	Cystatin-B	✓	✓	-	-	2
P22392	Nucleosid-diphosphate Kinase B	-	-	✓	✓	2

4.2.5 Versuch der Validierung von Profilin 1 als STIM2 Interaktionspartner mittels Ko-Immünpräzipitation

Für einige der vielversprechenden Hits die anhand der Proteom-Analyse bestimmt werden konnten, sollte mit Hilfe einer Ko-Immünpräzipitation die Interaktion mit STIM2 (STIM2.1 und STIM2.2) bestätigt werden. Hierfür wurde mit Hilfe von GFP-bindenden Partikeln YFP-STIM2.1 und YFP-STIM2.2 aus stabilen TReX293 Zelllysaten isoliert und nach SDS-Page und Westernblot mit Antikörpern gegen Extended Synaptotagmin-1 und Profilin 1 geprobt. Weder für Profilin 1 (siehe Abbildung 26) noch für Extended Synaptotagmin-1 (Daten nicht gezeigt) gelang ein Nachweis der Interaktion mit STIM2 anhand der Ko-Immünpräzipitation.

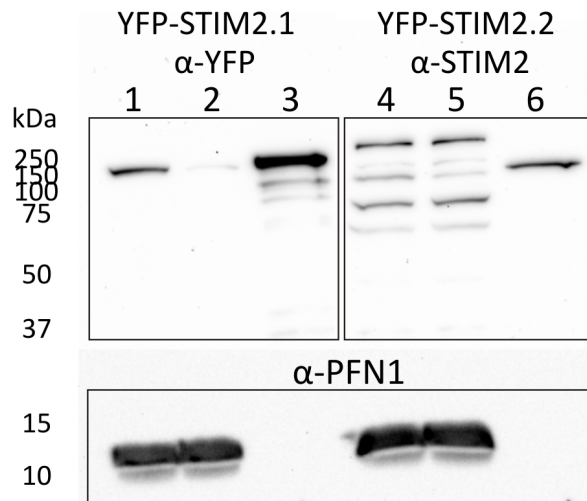


Abbildung 26: **Erfolgreiche Ko-Immünpräzipitation von STIM2 und Profilin 1.** Aufnahme eines repräsentativen Proteinblots nach Ko-Immünpräzipitation des YFP-STIM2 Konstrukts mit magnetischen GFP-Kügelchen. Spuren 1 - 3: mit YFP-STIM2.1 transient transfizierte HEK293T Zellen. Spur 4 - 6: mit YFP-STIM2.2 transient transfizierte HEK293T Zellen. Spur 1 & 4: Input; Spur 2 & 5: nicht-Kügelchen gebundene Fraktion; Spur 3 & 6: Kügelchen gebundene Fraktion.

Abbildung 26 zeigt eine Aufnahme der Membran nach Proben mit GFP- (erkennt YFP), STIM2-, und Profilin 1-Antikörper (PFN 1). Der verwendete GFP-Antikörper zeigte, dass das System der GFP-Trap Partikel funktioniert. Während hier in der Input Spur (Spur 1) eine Bande in der erwarteten Höhe von ~150 kDa (YFP-STIM2) sichtbar war, fehlte diese Bande in der Fraktion, die nicht an die Partikel band (Spur 2). In der Kügelchen gebundenen Elution, aufgetragen in Spur 3, war eine Anreicherung von YFP-STIM2 zu beobachten. Eine ähnliche Bestätigung gelang unter Verwendung des STIM2-Antikörpers. Hier sind mehrere Banden in der Aufnahme des Westernblots in Spur 4 und 5 zu erkennen, die sowohl das YFP-markierte STIM2, als auch endogenes STIM2 nachweisen. In der Partikel-isolierten Fraktion reduzierte sich das Bandenmuster auf eine einzelne Bande in Höhe von YFP-STIM2 (Spur 6). Wie im unteren Teil der Abbildung zu sehen ist, war in der Input und nicht-gebundenen Fraktion Profilin 1 nachweisbar (Spur 1, 2, 4 und 5),

während keine Bande in der Höhe von ~11 kDa in den Kügelchen-gebundenen Elutionen zu erkennen war (Spuren 3 und 6). Somit reichte die versuchte Ko-Immunpräzipitation von YFP-STIM2 und endogenem PFN 1 bzw. Extended Synaptotagmin-1 (Daten nicht gezeigt) nicht aus, um eine Interaktion der Spleißvarianten mit den genannten Proteinen zu bestätigen.

4.3 SOCE und Ca_v-Kanäle in Alzheimer Modell-Zelllinien

4.3.1 Expressionslevel von APP und Präsenilin 1 beeinflussen SOCE

Kalziumsignale, wie u.a. SOCE, sind in vielen Krankheiten fehlreguliert. Dies wurde unter anderem bereits für Alzheimer (Alzheimer's Disease; AD) gezeigt. Verschiedene Publikationen zeigen bereits die Wichtigkeit von SOCE Komponenten für neuronalen SOCE. Sun *et al.* beobachten, dass eine Überexpression von STIM2 eine Ca²⁺-Dysregulation, die durch eine Präsenilin 1 (PS1) Mutante verursacht wird, revidieren kann [Sun et al., 2014]. Tong *et al.* führen einen verstärkten SOCE in PS1 defizienten Neuroblastoma Zellen auf eine nicht mehr vorhandene STIM1 Prozessierung durch PS1 [Tong et al., 2016] zurück. Weiterhin fehlen jedoch grundlegende Informationen, welchen Einfluss Alzheimer-assoziierte Proteine, wie PS1 und APP (Amyloid Precursor Protein) auf Kalziumsignale, bzw. spezifischer auf SOCE, haben. Zur Untersuchung, wie sich SOCE in Abhängigkeit von PS1 und APP verändert, ob die Spleißvarianten in AD-Modellzelllinien unterschiedlich reguliert sind und ob APP und PS1 einen Einfluss auf die Expression einzelner SOCE-Gene hat, wurden stabile Überexpressions- und *knock out* Neuroblastoma Zelllinien (SH-SY5Y, AG Hartmann) verwendet.

Zur Untersuchung des SOCE in SH-SY5Y wurden verschiedene Modelllinien herangezogen. Zum einen „APP-/-“ und „PS1-/-“ defiziente Zellen in denen *APP* bzw. *PS1* mittels CRISPR/Cas9 stabil entfernt wurde, sowie die dazugehörige mock-Kontrolle genannt „Crispr Ctrl“. Zum anderen diente als Überexpressionszelllinie die APP695-Überexpressionslinie „swedish“, sowie die dazugehörige Kontrolle „mock“. Der Zusatz „swedish“ steht für eine Mutation im APP, die dazu führt, dass APP achtmal stärker im amyloidogenen Pfad prozessiert wird [Mullan et al., 1992]. Abbildung 27 zeigt die Einzelverläufe der intrazellulären Kalziumsignale dieser Zelllinien über Zeit (A - E), sowie die Quantifizierung (G - I). In Abbildung 27F wurden die einzelnen Kinetiken übereinandergelegt.

Wie aus der Quantifizierung hervorgeht verkleinerten beide Deletionen (APP & PS1-/-) das SOCE Signal. Sowohl Einflussrate, als auch Kalzium-Peak und Plateau waren signifikant kleiner. So war sowohl der maximale SOCE, als auch das Kalzium-Plateau in den APP-/- Zellen um ~20 % verringert, in den PS1-/- Zellen sogar um ~30 %. Überraschenderweise verhält sich das Kalziumsignal in der Überexpressionszelllinie swedish ebenso wie in den *knock out*-Linien. So führte mehr APP695 zu einer stark verkleinerten Einflussrate, einem kleineren maximalen SOCE und einem leicht verringerten Plateau.

Vor der Durchführung des Kalzium-Readditionsprotokolls zur Messung von SOCE, wie in Abbildung 27 dargestellt, wurden die Zellen depolarisiert und hierfür mit einer hoch Kalium-haltigen Lösung perfundiert. Die zu Beginn der in Abb. 27F gezeigten Messung erkennbaren Unterschiede (0 - 100 sec) in den Kalziumkonzentrationen sind auf eine unterschiedliche Reaktion der Zelllinien auf diese hohe Kalium-Konzentration zurückzuführen (siehe Abb. 30) und repräsentieren nicht die basale Kalziumkonzentration

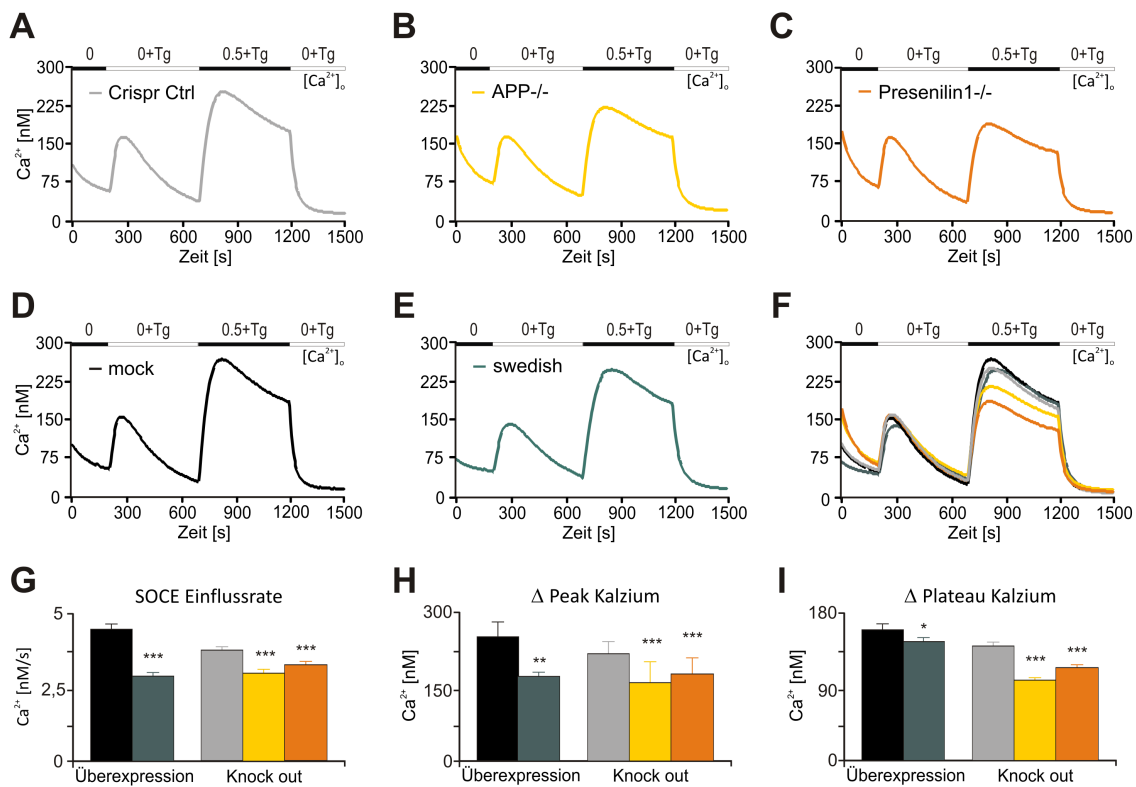


Abbildung 27: **Alzheimer Modellzelllinien unterscheiden sich in ihrem SOCE.** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) über Zeit in stabilen SH-SY5Y Zellen: **A:** *knock out* Kontrolle Crispr ctrl (grau, n = 646); **B:** APP-/- (gelb, n = 685); **C:** Präsenilin 1-/- (orange, n = 429); **D:** Überexpression-Kontrolle „mock“ (schwarz, n = 314); **E:** APP Überexpression „swedish“ (grün, n = 315); **F:** Darstellung aller Einzelverläufe in einem Graphen; **G-I:** Quantifizierung der Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ aus A - E unter Analyse von SOCE-Einflussrate, SOCE-Peak und Plateau.

ruhender Zellen.

4.3.2 Einfluss von APP und Präsenilin 1 auf die relative Proteinmenge von STIM2 und die relativen mRNA Mengen der SOCE-Gene

Sun *et al.* und Zhang *et al.* zeigten in der Vergangenheit den protektiven Einfluss von STIM2 in AD-Mausmodellen [Sun *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015a]. Beide Studien verwenden *knock in* Mäuse von Alzheimer-assoziierten Präsenilin 1 (M146V) oder APP (KM670/671NL und I716F) Mutanten und beobachten einen beeinträchtigten neuronalen SOCE. Im Abschnitt 4.3.1 konnte gezeigt werden, dass sowohl die Alzheimer-typische *swedish* Mutante als auch die Deletionen von Präsenilin 1 und APP in diesem Zellsystem den endogenen SOCE in SH-SY5Y Zellen verringert. Deswegen sollte untersucht werden, ob in den stabilen Zelllinien (mock & *swedish*, Crispr Ctrl & APP-/- & PS1-/-) die relative Proteinmenge von STIM2 verändert ist.

Wie in Abbildung 28A zu sehen ist und aus der Quantifizierung (B) hervorgeht, war in der relativen Proteinmenge von STIM2 in allen Zelllinien, unabhängig von der vorhandenen

Menge von APP oder PS1, kein Unterschied festzustellen. Im Proteinblot für STIM2 waren Banden in unterschiedlichen Höhen zu erkennen. Bei ~100 kDa befand sich die STIM2-spezifische Bande in erwarteter Höhe. Darunter verlaufen weitere Banden im für diesen Antikörper typischen Muster. Die Bande über 250 kDa markiert nicht in das SDS-Gel eingelaufenes Proteinlysat. Aufgrund eines $n = 2$ wurde für PS1^{-/-} keine Statistik erhoben.

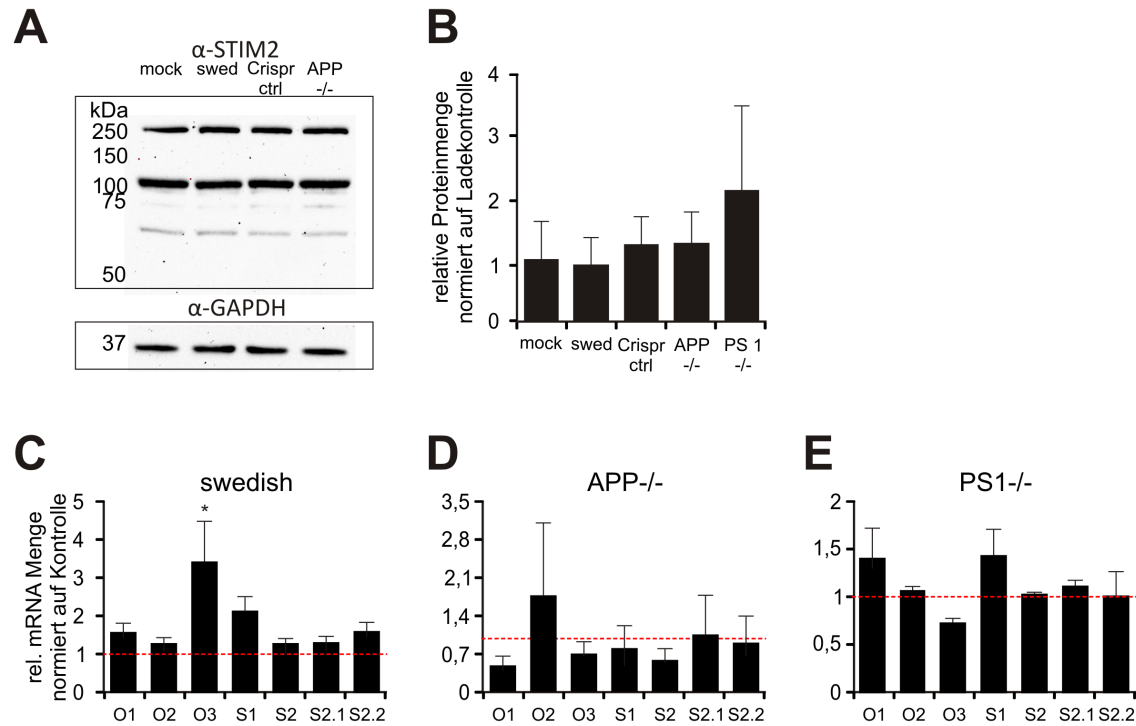


Abbildung 28: **STIM2 Proteinmenge und relative mRNA Menge der SOCE-Komponenten sind kaum beeinflusst von APP und PS1.** **A:** Aufnahme eines repräsentativen Proteinblots nach Proben der Membran mit einem C-terminalen STIM2 Antikörper (oben) bzw. GAPDH (unten). **B:** Quantifizierung der Proteinblots ($n = 4$ für mock, swed, Crispr Ctrl und APP^{-/-}; $n = 2$ für PS1^{-/-}). **C-E:** Darstellung der relativen mRNA Menge von Orai1 (O1), Orai2 (O2), Orai3 (O3), STIM1 (S1), STIM2 (S2), STIM2.1 (S2.1) und STIM2.2 (S2.2) normiert auf die dazugehörigen Werte der Kontrollzellen (rote gestrichelte Linie): **C:** SH-SY5Y swedish Zellen ($n = 8$). **D:** SH-SY5Y APP^{-/-} Zellen ($n = 6$). **E:** SH-SY5Y PS1^{-/-} Zellen ($n = 2$). *Experimentelle Durchführung der qRT-PCR: Heike Grimm/Olga Streidenberger/Gertrud Schwär; Auswertung: Anna-Maria Miederer.*

Obwohl die STIM2 Proteinmenge unbeeinflusst war, wiesen die Überexpressions- und verschiedenen *knock out* Zelllinien im Vergleich zu den spezifischen Kontrollen einen verringerten SOCE auf. Um Auskunft darüber zu erhalten, ob andere SOCE-Gene von APP oder PS1 beeinflusst werden, wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt. Abbildung 28C - E zeigt die relative mRNA Menge der SOCE-Komponenten der stabilen Zelllinien, normiert auf die entsprechende Kontrolle. Die Überexpression von APP (swedish) führte zu einer erhöhten relativen Orai3 mRNA Menge, während die anderen SOCE Komponenten unverändert blieben (Abb 28C). Im Gegensatz dazu hatte die Deletion von APP keinen signifikanten Einfluss auf die relative mRNA Menge der STIMs und Orais. Jedoch zeigten APP deletierte

SH-SY5Y Zellen Orai1 ($p = 0,074$) und STIM2 ($p = 0,062$) tendenziell niedrigere mRNA Mengen. Die Präsenilin 1 Deletion führte zu einer tendenziell verringerten relativen mRNA Menge von Orai3, jedoch konnte hier aufgrund der zu geringen Anzahl an Experimenten ($n = 2$) keine Statistik durchgeführt werden.

4.3.3 Differenzierung der SH-SY5Y mit Retinsäure verändert den spannungs- und speichergesteuerten Kalziumeinstrom

Die Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y wird nicht nur gerne als *in vitro* Modell für neurologische Funktionen verwendet, sondern kann mit Hilfe von Retinsäure auch differenziert und somit weiter in Richtung eines neuronalen Phänotyps getrieben werden. Um zu untersuchen, wie sich die 7-tägige Differenzierung auf SOCE auswirkt, wurde die Zellen mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht.

Bei neuronalen Zellen, bzw. der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y, handelt es sich im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Zellen um elektrisch erregbare Zellen. Eine Depolarisation, hervorgerufen durch eine hoch Kalium (K^+)-haltige Lösung, führt zur Öffnung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen (Ca_v für voltage gated Ca²⁺ channel), wobei die verwendete Ca^{2+} -Konzentration der Lösungen sich nicht unterscheidet. Dies führt zu einem Kalziumeinstrom, bis es zur Repolarisation der Zelle kommt, welche experimentell durch eine Lösung mit geringerer Kalium-Konzentration herbeigeführt wurde.

In Abbildung 29A ist zu beobachten, dass sowohl spannungs- (erste Phase der Messung, $+\text{K}^+$) als auch speichergesteuerte Kalziumkanäle (hinterer Teil der Messung, $1.5+\text{Tg}$) durch die Differenzierung beeinflusst wurden. Während der Kalziumeinstrom nach Depolarisation stark anstieg, war SOCE in den differenzierten Zellen kaum messbar. Abbildung 29 stellt die Morphologie der undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) Fura-2 geladene SH-SY5Y dar. Während die undifferenzierten länglichen Zellen wenige und kurze Zellfortsätze zeigten, bewirkte die Differenzierung mit Retinsäure eine Verlängerung und Verzweigung der Zellfortsätze.

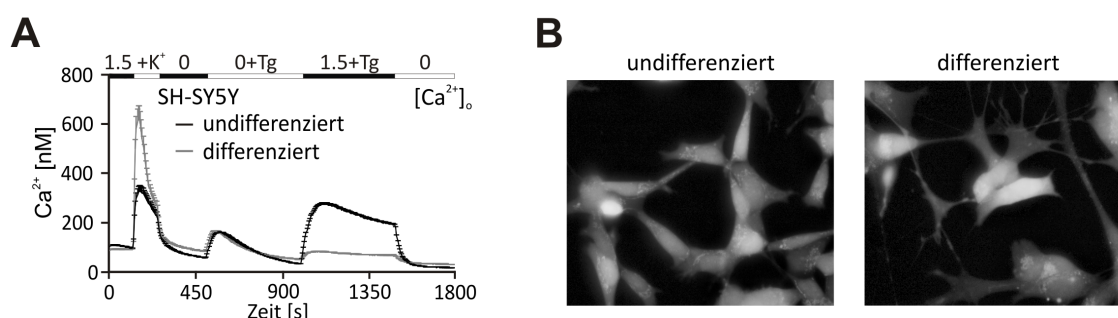


Abbildung 29: **Retinsäure induzierte Differenzierung von SH-SY5Y verstärkt den Kalziumeinstrom nach Depolarisation und führt zu einem kleineren SOCE.** **A:** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) über Zeit in differenzierten (grau, $n = 94$) und undifferenzierten (schwarz, $n = 314$) SH-SY5Y Zellen **B:** Repräsentative Abbildung der Morphologie Fura2-geladener undifferenzierter (links) und differenzierter (rechts) SH-SY5Y nach 7-tägiger Kultivierung in Differenzierungs- bzw. normalen Kulturmedium.

4.3.4 Expressionslevel von APP und Präsenilin 1 beeinflussen spannungsgesteuerten Kalziumeinstrom

Nachdem der in SH-SY5Y Zellen beobachtete Depolarisations-induzierte Kalziumeinstrom ähnlich groß war wie SOCE und sich die verschiedenen stabilen Zelllinien in ihrem SOCE unterschieden (vgl. 4.3.1), wurde zudem der Einfluss von APP und PS1 auf den spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Einstrom untersucht.

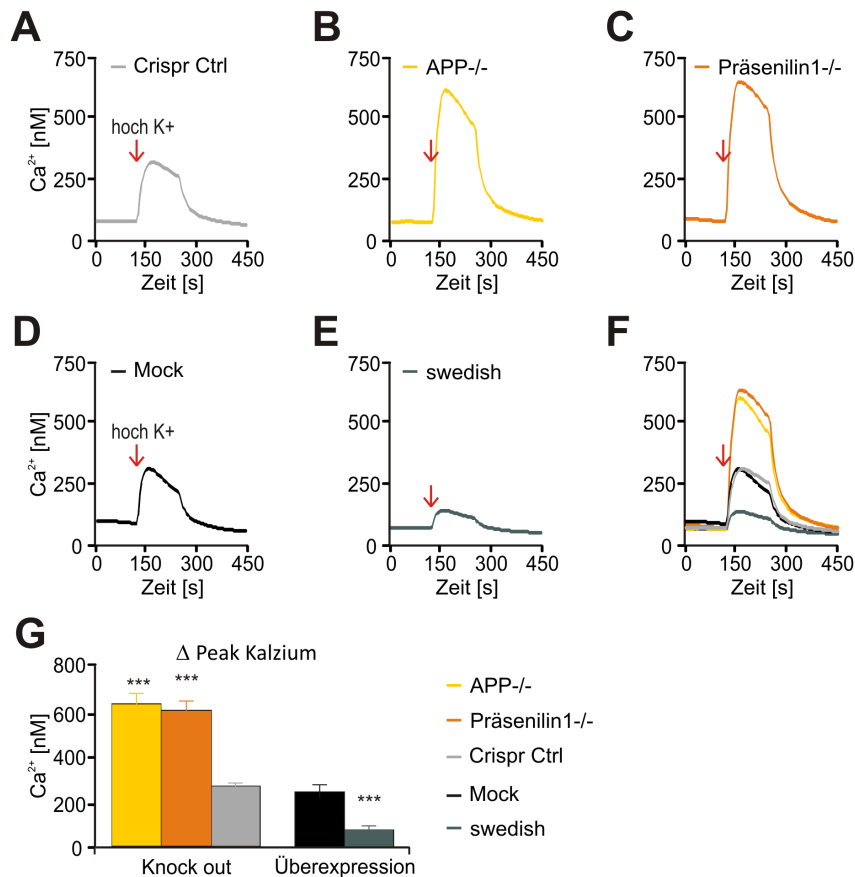


Abbildung 30: **Alzeheimer Modellzelllinien unterscheiden sich in ihrem spannungsgesteuertem Kalziumeinstrom.** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nach Depolarisation (Pfeil) mit 145 mM K^+ der stabilen SH-SY5Y Zellen: **A:** *knock out* Kontrolle Crispr Ctrl (grau, n = 646); **B:** APP-/- (gelb, n = 685); **C:** Präsenilin 1-/- (orange, n = 429); **D:** Überexpression-Kontrolle „mock“ (schwarz, n = 314); **E:** APP-Überexpression „swedish“ (grün, n = 315); **F:** Darstellung aller Einzelverläufe in einem Graphen; **G:** Quantifizierung der Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus A - E unter Analyse des Ca_v -Peaks.

Für die Analyse, ob Präsenilin 1 und APP einen Einfluss auf die Ca_v -Kanäle haben, wurden die zuvor beschriebenen SH-SY5Y Zelllinien (Überexpressionssystem: swedish; *knock out*: PS1-/- und APP-/-) auf Unterschiede hinsichtlich des Kalziumeinstroms nach Depolarisierung untersucht. Dafür wurden die Zellen konstant in 1,5 mM Ca^{2+} gehalten und zum angegebenen Zeitpunkt (Abbildung 30 Pfeil) die extrazelluläre Kaliumkonzentration erhöht. Wie aus Abbildung 30A-E hervorgeht, und aus der Übereinanderlagerung der Kinetiken

deutlich wird (Abbildung 30F), reagierten alle Zelllinien mit einem Kalziumeinstrom auf die Depolarisierung. Jedoch unterschieden sie sich hinsichtlich der Stärke des Ca^{2+} -Einstroms. So war dieser in den APP^{-/-} und PS1^{-/-} Zellen signifikant größer als in der Kontrolle (Crispr Ctrl) (siehe Abbildung 30G), während die APP überexprimierenden Zellen swedish einen signifikant kleineren Einstrom im Vergleich zu ihrer Kontrolle (Mock) zeigten. Dabei wiesen beide Kontrollen trotz Verwendung unterschiedlicher Selektionsantibiotika keinen Unterschied zueinander in ihrem Kalziumeinstrom auf.

Zusammengefasst zeigten die verschiedenen stabilen SH-SY5Y Zellen hinsichtlich ihres Kalziumeinstroms nach einer K^+ -induzierten Depolarisation starke Unterschiede, wobei sich beide Kontroll-Zelllinien ähnlich zueinander verhielten. Während die APP und PS1 Deletion einen größeren spannungsgesteuerten Kalziumeinstrom zur Folge hatte, führte mehr APP695 swedish zu einem verringerten Ca^{2+} -Einstrom durch Ca_v -Kanäle.

4.3.5 Expressionslevel von APP und Präsenilin 1 beeinflussen die relative mRNA Menge verschiedener Ca_v -Kanäle

Nachdem die Ca^{2+} -Imaging Analyse klare Unterschiede bezüglich des spannungsgesteuerten Kalziumeinstroms ergab, wurde der relative mRNA Gehalt ausgewählter Ca_v -Kanäle untersucht. Die Auswahl basierte auf der Veröffentlichung von Sousa *et al.*, die SH-SY5Y auf ihre Ca_v -Kanal Expression hin untersuchten und drei hauptsächlich vorhandene Varianten fanden: $\text{Ca}_v1.3$ (CACNA1D), $\text{Ca}_v2.2$ (CACNA1B) und $\text{Ca}_v3.1$ (CACNA1G) [Sousa et al., 2013].

Abbildung 31 zeigt den relativen mRNA Gehalt der drei untersuchten Ca_v -Kanäle für alle stabilen Zelllinien (SH-SY5Y swedish, APP^{-/-} und PS1^{-/-}) normiert auf die jeweilige Kontrolle (mock bzw. Crispr Ctrl). Die APP überexprimierenden Zellen, die weniger Kalziumeinstrom nach Depolarisation aufwiesen (Abbildung 30E), enthielten signifikant weniger $\text{Ca}_v2.2$ mRNA (CACNA1B) als die Kontroll-Zellen, während die qRT-PCR für $\text{Ca}_v1.3$ und $\text{Ca}_v3.1$ keinen Unterschied zur Kontrolle ergab.

Die relative mRNA Menge von $\text{Ca}_v1.3$ und $\text{Ca}_v3.1$ schienen sich auch bei einer Deletion von APP nicht zu verändern, während hier $\text{Ca}_v2.2$ um ~42 % signifikant erhöht war (Abbildung 31B). So ist möglicherweise $\text{Ca}_v2.2$ der verantwortliche Kanal für den erhöhten Ca^{2+} -Einfluss nach Depolarisation (siehe Abbildung 30B). In SH-SY5Y PS1 knock out Zellen (PS1^{-/-}) war sowohl der mRNA Gehalt von $\text{Ca}_v2.2$ um den Faktor 1,8, als auch von $\text{Ca}_v3.1$ (7,7-facher Anstieg) signifikant hoch reguliert. Auch diese Zellen zeigten zuvor einen in Vergleich zur Kontrolle verstärkten Ca^{2+} -Einstrom. Dies führte zu der Frage, ob der verstärkte Kalziumeinfluss nach Depolarisation in beiden Deletionszelllinien nur zum Teil von gleichen Kanal, $\text{Ca}_v2.2$, vermittelt wurde und in PS1^{-/-} Zellen zusätzlich $\text{Ca}_v3.1$ den beobachteten Kalziumanstieg verursachte.

In allen drei Zelllinien konnten Veränderungen hinsichtlich einzelner relativer Ca_v mRNA Mengen beobachtet werden. In der APP-Überexpressionszelllinie SH-SY5Y swedish lag $\text{Ca}_v2.2$ herunterreguliert vor, während in der APP^{-/-} Zelllinie mehr $\text{Ca}_v2.2$ mRNA als

in der Kontrolle nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich zu einer veränderten relativen mRNA Menge dieses Kanals, schien Präsenilin 1 auch einen Einfluss auf $\text{Ca}_v3.1$ zu haben, da die $\text{PS1}^{-/-}$ Zelllinien 7,7 mal mehr $\text{Ca}_v3.1$ mRNA aufwiesen als die Kontrollzellen.

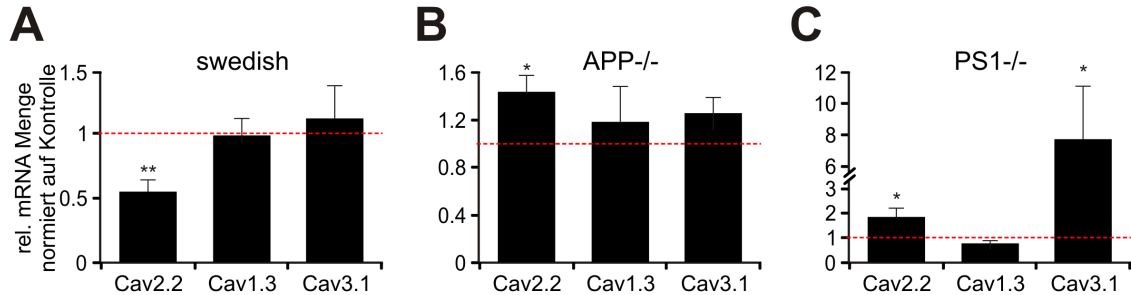


Abbildung 31: **Alzheimer-assoziierte Gene beeinflussen die relative mRNA Menge von Ca_v -Kanälen.** Darstellung des relativen mRNA Gehalts von $\text{Ca}_v2.2$ (CACNA1B), $\text{Ca}_v1.3$ (CACNA1D) und $\text{Ca}_v3.1$ (CACNA1G) normiert auf die dazugehörigen Werte der Kontrollzellen (rote gestrichelte Linie): **A:** SH-SY5Y swedish Zellen **B:** SH-SY5Y $\text{APP}^{-/-}$ Zellen **C:** SH-SY5Y $\text{PS1}^{-/-}$ Zellen. *Experimentelle Durchführung: Heike Grimm/Olga Streidenberger; Auswertung: Anna-Maria Miederer.*

4.3.6 $\text{Ca}_v3.1$ lässt sich nicht mittels schwacher Depolarisation aktivieren

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, wiesen die PS1 Deletionszellen eine 7,7-fach erhöhte $\text{Ca}_v3.1$ relative mRNA-Menge auf (Abschnitt 4.3.5). $\text{Ca}_v3.1$ ist ein spannungsgesteuerter Kalziumkanal, der bereits bei schwachen Depolarisationen öffnet und bei starken Depolarisationen inaktiviert [Isope et al., 2010]. Da die zuvor verwendete 145 mM KCl haltige Ca^{2+} -Lösung das Membranpotential auf ~ 0 mV (berechnet über Nernst-Potential Rechner: www.physiologyweb.com) brachte, konnte aus diesem Experiment wahrscheinlich kein Rückschluss auf $\text{Ca}_v3.1$ gezogen werden.

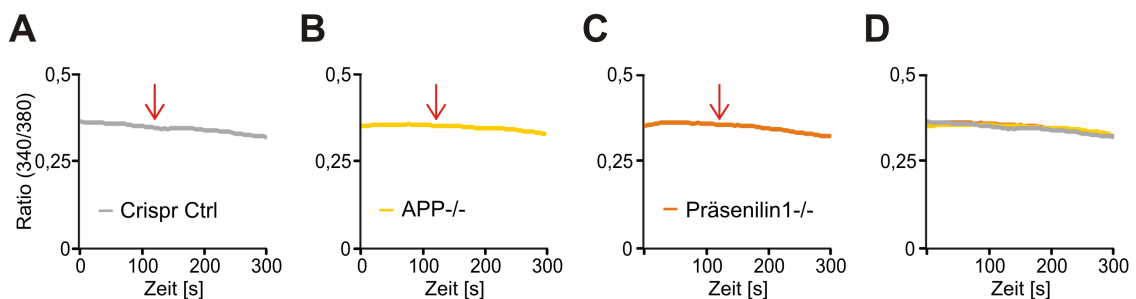


Abbildung 32: **Eine schwache Depolarisation bewirkt keinen Ca^{2+} -Einstrom.** Verlauf der mittleren Ratio (340/380) nach schwacher Depolarisation (Pfeil; 10 mM KCl) der stabilen SH-SY5Y Zellen: **A:** *knock out*-Kontrolle Crispr Ctrl (grau, $n = 40$); **B:** $\text{APP}^{-/-}$ (gelb, $n = 40$); **C:** Präsenilin 1-/- (orange, $n = 80$); **D:** Darstellung aller Einzelverläufe in einem Graphen. Daten entstammen einem experimentellen Tag.

Um $\text{Ca}_v3.1$ gezielter zu aktivieren wurde eine 10 mM KCl-Lösung verwendet, wodurch das Membranpotential von ~ 70 mV auf ~ 55 mV erhöht wurde (berechnet über Nernst-

Potential Rechner). Abbildung 32 zeigt, dass keine der Zelllinien (Kontrolle, APP^{-/-}, PS1^{-/-}) auf die schwache Depolarisation mit einem Kalziumstrom reagierte. Somit reichte die gewählte schwache Depolarisation nicht aus, um eine Ca_v3.1-Kanalaktivität zu beobachten.

Dass dies nicht an der absoluten mRNA-Menge lag wurde aus den 2^{-(ΔCq)}-Werten der qRT-PCR ersichtlich. Während die Ca_v3.1 mRNA in den Crispr Ctrl Zellen im Vergleich zu Ca_v2.2 und Ca_v1.3 stark vermindert vorlag (2^{-(ΔCq)} **0,070** : 0,203 : 0,219), fanden sich in den PS1^{-/-} Zellen sogar höhere relative mRNA Mengen für Ca_v3.1 (2^{-(ΔCq)} **0,416** : 0,313 : 0,154). Möglicherweise reichte eine Erhöhung des Membranpotentials um 10 - 15 mV bzw. die gewählten Bedingungen nicht aus, um Ca_v3.1 zu aktivieren.

4.3.7 Eine Überexpression von APP revidiert den APP^{-/-} spezifischen Phänotyp nicht

Um zu untersuchen, ob der im Vergleich zur Kontrolle erhöhte spannungsgesteuerte Kalziumstrom (Abschnitt 4.3.4) direkt mit dem fehlenden APP zusammenhängt, wurden die SH-SY5Y APP^{-/-} Zellen mit unterschiedlichen Konstrukten transfiziert. Hierfür wurden eine Leervektorkontrolle, ein APP-Überexpressionskonstrukt, AICD (APP Intracellular Domain) oder eine APPΔCT Mutante eingebracht und 48 h nach Transfektion gemessen.

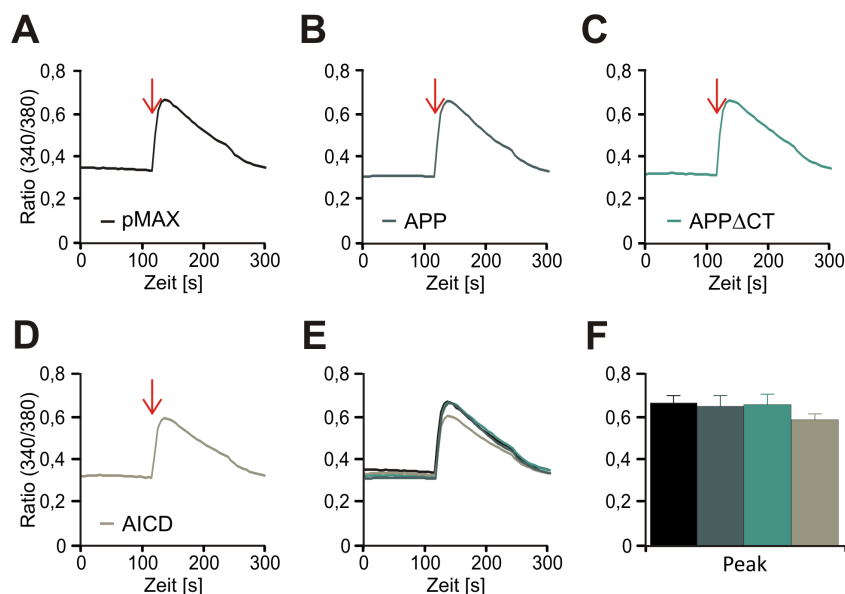


Abbildung 33: **Eine Überexpression von APP in APP^{-/-} Zellen revidiert nicht den Ca²⁺-Phänotyp.** Verlauf der mittleren Ratio (340/380) 48 h nach Transfektion der stabilen SH-SY5Y APP^{-/-} Zellen mit verschiedenen Konstrukten. Der Pfeil zeigt den Moment der Depolarisation mit 145 mM KCl: **A:** pMAX-IRES-GFP (schwarz, n = 97); **B:** APP (dunkelgrün, n = 49); **C:** APPΔCT (grün, n = 52); **D:** AICD (hellgrün, n = 90). Daten entstammen einem experimentellen Tag.

Das intrazelluläre APP Fragment AICD entsteht nach Prozessierung von APP durch die γ -Sekretase und bildet mit dem nukleären Adapterprotein Fe65 und der Histonacetyl-

transferase Tip60 einen Komplex, welcher vermutlich transkriptionell aktiv ist [Cao and Südhof, 2001]. Der APP Δ CT Mutante fehlen 15 AS am C-Terminus des Proteins, so dass hier AICD nicht vollständig gebildet werden kann. Auf diese Weise sollte analysiert werden, ob der Ca²⁺-Phänotyp möglicherweise in Verbindung mit dem Vollängenprotein oder dem AICD-Fragment stand.

Wie aus Abbildung 33A hervorgeht, zeigte die pMAX-IRES-GFP-Kontrolle einen starken Kalziumeinstrom nach Depolarisierung. Dieser war vergleichbar mit den zuvor für SH-SY5Y APP^{-/-} Zellen gemessenen 340/380 Fura-2 Werten. Jedoch bewirkte keines der Überexpressionskonstrukte (Abb. 33B-D) eine signifikante Veränderung des Kalziumsignals, wie aus der Übereinanderlagerung der Kinetiken und der Quantifizierung des maximalen Kalziums (Abb. 33E und F) ersichtlich wurde. Somit schien die heterologe Überexpression von APP oder Teilkonstrukten in der *knock out* Zelllinie nicht auszureichen, um den verstärkten Kalziumeinstrom auf Kontrolllevel zu reduzieren.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Spleißvarianten

STIM2.1 ist eine neue Spleißvariante von STIM2

Datenbankanalysen ergaben Vorhersagen für zwei nicht-charakterisierte STIM2 Spleißvarianten: STIM2.1, eine 8 Aminosäuren längere Variante mit einem zusätzlichen Exon (Exon 9), und STIM2.3, einer um ~17 kDa verkürzten Variante aufgrund eines durch alternatives Spleißen entstandenen Stop-Codons. Der Nachweis der neuen Varianten gelang mittels diagnostischer PCR für STIM2.1, schlug jedoch zunächst für STIM2.3 in unterschiedlichen getesteten Zelllinien fehl. Neben der Möglichkeit, dass diese Variante nicht in diesen Zelllinien existiert, könnte es sein, dass die Primer, die zum Nachweis verwendet wurden, nicht hinreichend funktionell waren. Da beim Spleißen von STIM2.3 nur eine kurze spezifische Sequenz entsteht, ist die Anzahl an Basen für den *reverse* Primer begrenzt. Eine andere Sequenz um STIM2.3 mittels PCR nachzuweisen fehlt. Inzwischen gibt es eindeutige, bisher unpublizierte PCR-Daten, die STIM2.3 in verschiedenen Gehirnregionen in Mäusen nachweisen [Gilson, 2016].

Für STIM2.1 gelang der Nachweis mittels PCR und konnte anschließend durch qRT-PCR bestätigt und zusammen mit STIM1 und STIM2.2 (konventionelle Variante ohne Exon 9) in unterschiedlichen Zellen quantifiziert werden. Hierbei fiel auf, dass STIM2.1 überall nachgewiesen werden konnte, das mRNA Level jedoch stark in Abhängigkeit von Zelltyp und Aktivierungsstatus der Zelle schwankt. Bemerkenswert ist, dass unstimulierte CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen relativ ähnliche mRNA Level beider Varianten (Ratio STIM2.1 : STIM2.2 beträgt ~1 : 1,5) aufweisen, während sich die Ratio nach Aktivierung mit CD3/CD28 Beads in Richtung STIM2.2 verschiebt. Insgesamt ähneln sich die mRNA Level von STIM1, STIM2.1 und STIM2.2 in naiven CD4⁺ T Zellen und sind nach Aktivierung der Zellen alle stark vermindert. Über einen Zeitraum von 72 h war jedoch zu beobachten, dass sich STIM1 eher dem Ausgangslevel annähert, als die beiden STIM2 Spleißvarianten (Abb. 8D). Kritisch zu betrachten ist, dass keine absolute Aussage über die mRNA Menge von STIM2.1 und STIM2.2 getroffen werden kann, da die Primer nicht auf ihre Effizienz getestet wurden. Interessanterweise haben unstimulierte Primärzellen viel STIM2.1 mRNA, während Zelllinien, wie u.a. HEK293 oder Glioblastoma-Zelllinien, bis zu acht Mal mehr

STIM2.2 aufweisen (Abb. 8C). PCR und qRT-PCR Resultate weisen darauf hin, dass es sich beim Spleißen von STIM2 um einen regulierten und Zell-spezifischen Prozess handelt, der jedoch über verschiedene Organismen hinweg konserviert ist. Ein Überprüfen der Sequenz mittels einem Blast-Programm der STIM2.1 spezifischen VAASYLIQ-Sequenz zeigt, dass diese in vielen Säugern zu 100 % konserviert ist oder nur leicht abweicht (VAASILLQ in *Mus musculus* ebenfalls von *Rana et al.* bestätigt. Hier gelang der Nachweis von STIM2.1 (genannt STIM2 β) in verschiedenen Geweben und ebenso wurde ein Zellsystem gefunden, in dem sich die STIM2.1/STIM2.2 Ratio nach Differenzierung ändert, wobei hier die STIM2.1 mRNA Menge nach Differenzierung anstieg [Rana et al., 2015].

STIM2.1 ist nicht in der Lage Orai1 oder Orai2 zu aktivieren

Nach dem gelungenen Nachweis und der Klonierung der neuen Spleißvariante wurde getestet wie sich STIM2.1 im Vergleich zu der konventionellen Variante STIM2.2 im HEK-O1 Überexpressionssystem verhält. Hier war zu beobachten, dass STIM2.2, wie bereits zuvor beschrieben, das basale Kalzium erhöhte und einen großen Kalziumeinstrom nach Entleerung der Speicher zeigte [Brandman et al., 2007]. STIM2.1 schien nicht in der Lage Orai1 oder Orai2 zu aktivieren, wie anhand des geringen SOCE zu beobachten war (Abb. 9 und 10). Diese Beobachtung wurde durch eine zusätzliche Analyse des durch Orai1 getragenen Ca²⁺-Einstroms mittels Patch Clamp Analyse, in denen kein CRAC in HEK-O1 STIM2.1 Zellen gemessen werden konnte, bestätigt [Miederer et al., 2015]. Der im Ca²⁺-Imaging analysierte speichergesteuerte Kalziumeinstrom war zusätzlich kleiner als in HEK-O1 Kontrollzellen, ein erster Hinweis für eine inhibitorische Wirkung von STIM2.1. Während das basalen Kalziums in 0,5 mM Ca²⁺ nicht erhöht im Vergleich zu Kontrolle war, stieg es nach der Perfusion mit 1,5 mM Ca²⁺ signifikant über die Kontrolle (Abbildung 9). Die Messung des basalen Kalziums umfasst die Analyse des zytosolischen Kalziums in ruhenden, nicht stimulierten Zellen. Bei dem kleinen, jedoch signifikanten Anstieg bei einem Wechsel auf 1,5 mM extrazelluläres Ca²⁺ könnte es sich um ein Perfusionsartefakt handeln. Eine andere Möglichkeit wäre, dass STIM2.1 über Zeit zu einer geringen Aktivierung von Orai1 in der Lage ist. Dies widerlegen doch Patch Clamp Analysen, in denen STIM2.1 auch nach 10 min keine Aktivierung von Orai1 vermittelten Kalziumeinstroms zeigt [Miederer et al., 2015]. Vorstellbar wäre, dass STIM2.1 über einen weiteren unbekanntem Mechanismus einen Orai1 unabhängigen, zytosolischen Kalziumanstieg bewirkt. Der STIM2.1 spezifische Phänotyp, dass die neue Spleißvariante nicht in der Lage ist Orai1 zu aktivieren und den endogenen SOCE in HEK293 Zellen reduziert, wurde auch von *Rana et al.* bestätigt. Jedoch konnte hier zusätzlich ein negativer Einfluss auf das basale Kalzium festgestellt werden. Dieser kleine Effekt wurde bei der Analyse der relativen Häufigkeit der Zellen in ihrem basalem 340/380 Ratio-Wert festgestellt [Rana et al., 2015]. Dabei beobachteten sie, dass mehr STIM2.1 heterolog überexprimierende Zellen eine niedrigere 340/380 Ratio aufwiesen, als die Leervektor-Kontrolle. Ob die unterschiedliche Auswertung der Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse ist, bleibt fraglich, da das geringere basale Kalzium im

Verlauf der mittleren 340/380 Ratio nicht zu sehen ist [Rana et al., 2015].

Ebenso wurde untersucht, ob es sich bei STIM2.1 eventuell um einen Orai2-spezifischen Aktivator handelt. Hierfür wurden HEKwt Zellen mit Orai2 und einer der Spleißvarianten kotransfiziert. Dabei ergab sich ein ähnliches Bild. Während die Koüberexpression von STIM2.2 zu einem erhöhten basalen Kalzium und SOCE führte war STIM2.1 nicht in der Lage Orai2, und wie zusätzlich in Rana *et al.* gezeigt ebenso wenig Orai3 [Rana et al., 2015], zu aktivieren. Die analysierten Parameter, wie basales Kalzium, Einflussrate, Ca^{2+} -Peak und -Plateau waren kleiner, während der Tg Peak teilweise vergrößert war. Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rana *et al.*, die unter Verwendung eines ER- Ca^{2+} -Sensors feststellten, dass STIM2.1 überexprimierende HEK-O1 Zellen eine geringere Ca^{2+} -Konzentration im ER aufwiesen, wobei hier die STIM2.2 (STIM2 α) Kontrolle zum Vergleich fehlte [Rana et al., 2015]. Da die Ergebnisse im Bezug auf den Kalziumgehalt des ERs in dieser Arbeit sehr heterogen (vergleiche Abb. 9 bis 14) und unabhängig vom zusätzlich durch Ionomycin-entleerbaren Kalziumpool der Zelle waren (Abb. 11E und 12E), kann zum Einfluss von STIM2.1 auf die Kalziummenge im ER keine abschließende Aussage getroffen werden.

Dass die Inaktivität von STIM2.1 nicht auf eine fehlende Translation zurückzuführen ist und die beiden Spleißvarianten nach Transfektion in einem ähnlichen Maßstab gebildet wurden, wurde durch Nachweis der heterolog überexprimierten Proteine mittels Westernblot bestätigt.

Die neue Spleißvariante ist ein Inhibitor des speichergesteuerten Kalziumeinstroms

Zur weiteren Analyse der neuen Spleißvariante wurden spleißspezifische siRNA generiert und ihre Funktionalität mittels qRT-PCR bestätigt (Abb. 11C und 12C). Die Herunterregulation von STIM2.2 in unstimulierten CD4^+ Zellen führte zu der erwarteten Reduktion des basalen Kalziums [Brandman et al., 2007] und einer Reduktion von Kalziumpeak und -Plateau um ~30 % (Abb. 12). Dies zeigte, dass SOCE in unstimulierten CD4^+ Zellen nicht hauptsächlich nur durch STIM1, sondern zu einem großen Teil auch über STIM2 vermittelt ist. Die Herunterregulation von STIM2.1 hatte keinen Einfluss auf das basale Kalzium, offenbarte jedoch die inhibitorische Wirkung der neuen Spleißvariante, da mehr SOCE messbar war (Abb. 11). Der kleine, jedoch konsistente Effekt, könnte möglicherweise bei einer stärkeren spleißspezifischen Herunterregulation prägnanter ausfallen. Die Herunterregulation auf ~44 % wurde mittels qRT-PCR und Westernblot bestätigt. Das auf Proteinebene nur eine Verminderung um 20 % zu detektieren war, lässt sich durch den verwendeten STIM2 Antikörper, der sowohl STIM2.1 als auch STIM2.2 erkannte, erklären. Ob ein kompletter STIM2.1 *knock out* eine Verstärkung des basalen Kalziumspiegels aufdecken würde, bleibt spekulativ. Bisherige, teils widersprüchliche Ergebnisse zur Funktion von STIM2.2 (vorher STIM2) könnten aufgrund der siRNA vermittelten Herunterregulation beider Varianten liegen.

Der dominant-negative Effekt auf endogenen SOCE wurde zusätzlich in Jurkat T Zellen bestätigt (Abb. 13). Diese haben, im Gegensatz zu HEK293 oder HEK-O1 Zellen einen großen endogenen SOCE. Auch hier konnte beobachtet werden, dass STIM2.1 nach Überexpression den endogenen SOCE verringert, während STIM2.2 diesen erhöht. Da der STIM2.1 spezifische inhibitorische Effekt nur nach Stimulation mit Tg und dadurch verursachter Entleerung beobachtet wurde, benötigt STIM2.1 möglicherweise eine volle Aktivierung oder höhere Kalziummengen und funktioniert in diesem Fall als Barriere, die einen noch größeren Kalziumeinfluss erschwert. Dies könnte gerade in naiven T Zellen, in denen die STIM2.1-Expression am Höchsten ist, von Bedeutung sein, um die Zelle nicht ungewollt zu aktivieren. Nach Aktivierung und/oder Differenzierung verliert STIM2.1 in diesem Szenario an Relevanz und wird herunterreguliert. Dies würde zu der Beobachtung passen, dass STIM2.1 in aktivierten T Zellen, sowie allen Zelllinien, weit weniger vorhanden war, als STIM2.2. Um dies zu überprüfen könnte getestet werden, ob sich die Aktivierungsmarker, wie CD25, CD69 oder HLA-DR [Sallusto et al., 1999] nach Stimulation von CD4⁺ T Zellen in STIM2.1 überexprimierenden Zellen verändern.

Der Einfluss von STIM2.1 auf das basale Kalzium ist weniger eindeutig. In der Einzelüberexpression (Abb. 9), sowie in der Überexpression in Jurkat T Zellen (Abb. 13) war ein leichter Anstieg des basalen Kalziums zu beobachten, während in Koüberexpression mit STIM2.2 eine eindeutige Reduktion festgestellt wurde (Abb. 14) und die Herunterregulation von STIM2.1 in unstimulierten CD4⁺ T Zellen keinen Einfluss auf das basale Kalzium hatte. Eine Erklärung für das erhöhte basale Kalzium und den kleineren Tg-Peak in Jurkat T Zellen könnte ein vermuteter Zusammenhang zwischen beiden Parametern sein. Erfahrungsgemäß wiesen präaktivierte Zellen ein erhöhtes basales Kalzium auf, wobei sie gleichzeitig kleinere Ca²⁺-Speicher hatten. Da aufgrund der Überexpression von STIM2.2, mit einem erwarteten Anstieg im basalen Kalzium, präaktivierte Zellen nicht aussortiert wurden, könnte dies eine Erklärung für das überraschend hohe basale Kalzium in Jurkat T Zellen mit STIM2.1 sein. Eine Möglichkeit, wie das erhöhte basale Kalzium in Jurkat T Zellen zu erklären ist, wäre eine Interaktion von STIM2.1 mit dem IP₃ Rezeptor. Wenn dies zu einem verstärkten Kalziumausstrom aus dem ER führt, könnte dies eine Erklärung für ein verminderten Ca²⁺-Gehalt im ER und ein erhöhtes basales Kalzium sein. Ausführliche Analysen eines Zusammenhangs dieser beiden Parameter fehlen jedoch an dieser Stelle, so dass diese Hypothese rein spekulativ bleibt. Zudem handelte es sich bei dem erhöhten basalen Kalzium, sowie die reduzierte [Ca²⁺]_{ER} nicht um einen konsistenten Effekt. Zusammengefasst ist die Auswirkung von STIM2.1 in ruhenden Zellen widersprüchlich.

STIM2.1 hat einen inhibitorischen Effekt auf den STIM1 als auch STIM2.2 vermittelten SOCE nach vollständiger Speicherentleerung

Die Koüberexpression von STIM2.1 mit STIM2.2 (Abb. 14) bzw. STIM1 (Abb. 15) ergab, dass sich der dominant-negative Effekt nicht ausschließlich auf STIM2.2 beschränkt, sondern STIM2.1 auch auf den STIM1 vermittelten SOCE inhibitorisch wirkt. In heterologer

Überexpression mit STIM2.2 bewirkte es sowohl eine Abnahme des STIM2.2 induzierten, hohen basalen Kalziums als auch des STIM2.2-Orai1 vermittelten SOCE, was belegt, dass STIM2.1 nicht nur bei voller ER-Entleerung von Ca^{2+} inhibitorisch wirken kann. Dies lässt vermuten, dass STIM2.1, ebenso wie STIM2.2, aufgrund der geringen Ca^{2+} -Affinität der EF-Hände bereits in ruhenden Zellen teilweise aktiv ist. Die zusätzlich analysierte Pumprate zeigte, dass der dominant-negative Effekt von STIM2.1 nicht auf eine verstärkte Pumpenaktivität zurückzuführen ist (Abbildung 14). Durch das Auswählen von Zellen, die einen ähnlichen Ca^{2+} -Ausgangswert vor dem Lösungswechsel aufwiesen, wurde ein Unterschied aufgrund einer unterschiedlichen zugrundeliegenden Ca^{2+} -Triebkraft ausgeschlossen. Zusätzlich zeigten die ausgewählten Zellen weiterhin den dominant-negativen STIM2.1 Effekt in 0,5 mM Ca^{2+} zu Beginn der Messung. Somit konnte eine verstärkte Aktivierung der Pumpen, vermittelt durch STIM2.1, ausgeschlossen werden. Obwohl der inhibitorische Effekt von STIM2.1 auf den speichergesteuerten Kalziumeinstrom in STIM2.2-Orai1 überexprimierenden Zellen im Ca^{2+} -Imaging eindeutig war, ergaben Patch Clamp Analysen, dass zur Verminderung des Orai1 getragenen I_{CRAC} spezifische Bedingungen notwendig sind. Die heterologe Koüberexpression zeigte keinen dominant-negativen Effekt auf I_{CRAC} bei einem Puffern der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf 0 mM Ca^{2+} . Der phasenweise Nachweis des inhibitorischen Effekts von STIM2.1 gelang unter Verwendung einer internen Patchlösung von 150 nM Ca^{2+} mit IP_3 [Miederer, 2013]. Dies deutet darauf hin, dass STIM2.1 nur in Anwesenheit von zytosolischem Kalzium inhibitorisch wirken kann. Dass ein starkes Puffern der intrazellulären Kalziumkonzentration eine Aktivität von STIM2.1 bewirkt und deshalb der I_{CRAC} in der Koüberexpression mit STIM2.2 genauso groß ist wie in der Einzelüberexpression von STIM2.2 scheint unwahrscheinlich, da STIM2.1 alleine unter den gleichen Pufferbedingungen keine Aktivierung von Orai1 in Patch Clamp Analysen zeigt [Miederer, 2013].

In der Koüberexpression von STIM2.1 zusammen mit STIM1 konnte der Effekt auf SOCE, jedoch kein Effekt auf das basale Kalzium, beschrieben werden (Abb. 15). Vergleicht man dies mit der Kontroll-Koüberexpression STIM1+STIM2.2, sieht man einen starken Anstieg des basalen Kalziums, jedoch keinen vergrößerten SOCE im Vergleich zu einer Einzelüberexpression von STIM1. Das bedeutet, dass in HEK-O1 Zellen mit zusätzlicher Überexpression von STIM1 SOCE nach Entleerung des ERs hauptsächlich durch STIM1-Orai1 Paarungen bewirkt wird, wobei in ruhenden Zellen STIM2.2 das basale Kalzium zusätzlich drastisch erhöht. Eine Erklärung, warum im basalen Kalzium kein inhibitorischer Effekt von STIM2.1 auf STIM1 zu erkennen war, könnten die in Miederer *et al.* zusätzlich gezeigten Patch-Daten liefern. Hier war der dominant-negative Effekt von STIM2.1 auf STIM2.2 erst teilweise nach Puffern der intrazellulären Kalziumkonzentration auf 150 nM zu erkennen, während er in 0 mM Ca^{2+} nicht vorhanden war. Dies macht deutlich, dass es sich bei der inhibitorischen Wirkung von STIM2.1 um einen Ca^{2+} -abhängigen Prozess handelt [Miederer et al., 2015]. Eine Ca^{2+} -abhängige inhibitorische Wirkung auf STIM2 (STIM2.2) und nicht auf STIM1 durch Ca^{2+} /Calmodulin ist bereits für die polybasische C-terminale

Sequenz von STIM2 bekannt; hier konkurriert Ca^{2+} /Calmodulin in Anwesenheit von hohem Ca^{2+} Konzentrationen mit PIP_2 , mutmaßlich, um STIM2 an der PM zu destabilisieren und einen zu starken Kalziumeinfluss zu verhindern [Bhardwaj et al., 2013]. So könnte möglicherweise das basal vorhandene Kalzium in HEK-O1 STIM1-Zellen nicht ausreichen, um die dominant-negative Wirkung von STIM2.1 zu entfalten. Dies würde auch erklären, warum der inhibitorische Effekt auf das basale Kalzium grundsätzlich nur in Koüberexpression zusammen mit STIM2.2 zu beobachten war. Rana *et al.* argumentieren, dass STIM2.1 STIM1 benötigt, um in STIM-Orai Cluster zu gelangen und dort inhibitorisch zu wirken [Rana et al., 2015]. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass STIM2.1 in ruhenden HEK-O1-STIM1 Zellen keinen dominant negativen Effekt zeigt, da STIM1 mit einer K_d von $\sim 0,2 - 0,6$ mM [Brandman et al., 2007; Stathopoulos et al., 2006; Zheng et al., 2011] in ruhenden Zellen mit Ca^{2+} -gefüllten ER nicht aktiv ist, während in Koüberexpression der beiden STIM2 Spleißvarianten STIM2.2 durch seine Aktivität in ruhenden Zellen in der Lage wäre, STIM2.1 in die ER-PM-Zonen zu bringen. Die Patch Clamp Analysen beider Gruppen zeigen zusätzlich die CRAC-typische Strom-Spannungskurve. Dies impliziert, dass STIM2.1 nicht die Ionen-Selektivität für Orai1 ändert [Miederer et al., 2015; Rana et al., 2015].

STIM2.1 inhibitorischer Mechanismus ist auf eine fehlende kanalöffnende Interaktion mit Orai1 zurückzuführen

Für die fehlende Aktivierung von Orai1 durch STIM2.1 sind verschiedene Ursachen vorstellbar. So könnte eine fehlerhafte Lokalisation in anderen Kompartimenten als dem ER, eine beeinträchtigte Clusterbildung, eine fehlende Kolokalisation mit dem Kanalprotein Orai1 oder auch eine fehlerhafte Interaktion verantwortlich sein. Jedoch konnten wir zeigen, dass sowohl ER Lokalisation, als auch Clusterbildung von STIM2.1 alleine, sowie zusammen mit STIM2.2 (Abb. 19), sowie die Kolokalisation von STIM2.1 mit Orai1 vergleichbar mit der aktiven Variante STIM2.2 war (Abb. 18A, B und D). STIM2.1 zeigte ebenso wie STIM2.2 bereits Clusterbildung vor Entleerung des ERs von Kalzium, was dem bekannten STIM2-Phänotyp, auch in ruhenden Zellen teilweise aktiviert vorzuliegen, entspricht [Brandman et al., 2007]. Auch hatte die Zusammensetzung der STIM2 Varianten in der Zelle (STIM2.1 alleine, STIM2.1 und STIM2.2 bzw. STIM2.2 alleine) keine Auswirkung auf die Clusterbildung und ist wohl nicht der Grund für die inhibitorische Wirkung von STIM2.1.

Die Kolokalisationsanalyse stellt einen kritischen Unterschied zwischen den zwei Veröffentlichungen aus den Niemeyer und Lewis Arbeitsgruppen dar. Letztere beobachtet eine stark verminderte Kolokalisation zwischen STIM2.1 und Orai1 und erklären, dass STIM2.1 STIM1 braucht, um in die STIM-Orai-Punctae zu gelangen [Rana et al., 2015]. Kritisch hierbei zu betrachten ist, dass sie in HEK293 Zellen nur eine schwache Kolokalisation zwischen STIM2.1 und Orai1 messen, jedoch in HEK293T Zellen zusammen mit einer Überexpression von Orai1 in der Lage sind den dominant-negativen Effekt von STIM2.1

auf SOCE zu beobachten. Eine Erklärung für diese Beobachtung liefern sie jedoch nicht. Da jedoch STIM2.1 mit STIM2.2 gemischte Cluster bildet (Abb. 19) ist es gut vorstellbar, dass STIM2.2 STIM2.1 mit an die Plasmamembran bringt und somit dessen inhibitorische Wirkung unterstützt. Ein gravierender Unterschied zwischen den beiden Kollokalisationsstudien ist, dass in dieser Arbeit ein Konstrukt verwendet wurde, welches die polybasische Lysin-reiche Domäne von STIM2, die für eine Verankerung von STIMs via PIP₂ und PIP₃ in der Plasmamembran verantwortlich gemacht wird [Walsh et al., 2010], nicht durch eine Fluoreszenzmarkierung maskiert wurde. Der gewählte Fluoreszenztag lag im C-Terminus innerhalb des Proteins, lies die polybasische Domäne frei und beeinflusste die Aktivität der Spleißvarianten nicht (Abb. 17). Rana und Kollegen verwenden ein C-terminales Fluoreszenz-markiertes STIM2, bei dem davon ausgegangen werden muss, dass hierdurch die polybasische Domäne maskiert wurde. Diese ist jedoch im endogenen SOCE notwendig, um STIMs an der Plasmamembran zu verankern. Zwar kann eine Überexpression von Orai1 durch direkte Interaktion auch STIM1- Δ K (Deletion des polybasischen Segments) in Cluster bringen [Walsh et al., 2010], jedoch hat STIM2 generell eine höhere Affinität als STIM1 zu PIP₂ [Bhardwaj et al., 2013] und ist zusätzlich in der Lage mit PIP₃ zu interagieren [Ercan et al., 2009], möglicherweise um eine schwächere Interaktion mit Orai1 zu kompensieren. Ercan *et al.* zeigen, dass bereits die letzten 27 Aminosäuren in STIM2, nicht aber in STIM1, ausreichen, um PI(4,5)P₂-enthaltende PM-ähnliche Liposomen zu binden [Ercan et al., 2009]. Möglich wäre also, dass der C-terminale Tag hier eine wichtige Sequenz maskiert und diese Ergebnisse beeinflusst. Da STIM2.1, wie beide Arbeitsgruppen mittels FRET-Messungen zeigen, im Gegensatz zu STIM2.2 kaum in der Lage ist mit Orai1 zu interagieren (Abb. 18A und C), könnte die feste Verankerung in der Plasmamembran umso entscheidender sein, um doch in Orai1 Clustern vorhanden zu sein und dort inhibitorisch zu wirken. Das Fluorophor an Orai1 befand sich C-terminal, einem Bereich der vermutlich für die Rekrutierung von Orai1 an STIM verantwortlich ist [Prakriya, 2013]. Da sich STIM2.1 und Orai1 jedoch weiterhin in den gleichen Clustern befinden, könnte dies dafür sprechen, dass Orai1 durch weitere Faktoren und nicht durch STIM2.1 in die vorhandenen Cluster rekrutiert wird. Interessant wäre es zu untersuchen, ob auch unter Verwendung eines N-terminal markierten Orai1 unterschiedliche FRET-Werte für STIM2.1 und STIM2.2 zu beobachten wären oder ob diese Interaktion von dem zusätzlichen Exon unbeeinflusst bleibt.

Rana *et al.* vermuten aufgrund von verschiedenen Mutationen in der Exon 9 kodierten Maus-Sequenz (VAASILLQ), dass es sich bei der Inhibition um eine Sequenz-spezifische Inhibition handelt. Sie diskutieren, dass ein inhibitorischer Faktor durch Interaktion mit VAASILLQ in die Nähe von Orai1 gebracht wird und nur nach Überexpression von STIM2.1 die Inhibition über einen passiven Mechanismus, d.h. über eine Blockade aktiver Bindeseiten, vermittelt wird [Rana et al., 2015]. Wir vermuteten, dass es sich bei dem inhibitorischen Faktor um CaM handelt, da durch die Insertion VAASYLIQ (human) ein klassisches CaM-Bindemotiv (IQ-Motiv) entsteht. Dabei konnten wir zeigen, dass beide Spleißvarianten in

dieser Region der CAD-Domäne mit einer sehr hohen Affinität (STIM2.1 10 nM; STIM2.2 40 nM) mit CaM interagieren [Miederer et al., 2015]. In der C-terminalen Region wurden zuvor bereits weitere STIM2 Regionen mit einer im Vergleich zur CAD-Domäne niedrigeren Affinität für CaM charakterisiert (C-Terminus: 1mM [Bauer et al., 2008; Bhardwaj et al., 2013]). Obwohl die CaM-Bindeseite teilweise mit der Orai1 Bindeseite überlappt [Miederer et al., 2015] und molekulare Evidenz für die Vermutung von Parvez *et al.* liefern, dass es sich bei CaM um einen löslichen Faktor handelt, der an STIM2 bindet und für das typische zwei-Phasen Aktivierungsprofil von STIM2-vermitteltem I_{CRAC} verantwortlich ist [Parvez et al., 2008], konnte CaM alleine nicht den inhibitorischen Effekt von STIM2.1 erklären. Zum einen zeigte Orai1 zusammen mit STIM2.1 während der kompletten Patch Clamp Analyse in Anwesenheit von BAPTA keine Aktivität, selbst wenn zu erwarten wäre, dass nach einigen Minuten der Messung ein löslicher Faktor bereits wegdiffundiert wäre, zum anderen bindet STIM2.2 auch stark an CaM [Miederer et al., 2015], so dass dies alleine nicht den STIM2.1-typischen Phänotyp erklären kann. Zuletzt bleibt auch eine STIM2.1-Mutante (VAASYLIQ zu VAASYLAA) weiterhin unfähig Orai1 zu aktivieren und verlor ebenso wenig die STIM2.1-spezifische inhibitorische Wirkung (Abb. 20). Jedoch wurde diese Mutante nicht auf eine verringerte CaM Bindung untersucht.

Aus Homologie-Modellierungen der CAD Domäne der STIM2 Spleißvarianten auf der Basis der veröffentlichten Kristallstruktur der STIM1 CAD Domäne (PDB ID: 3TEQ) [Yang et al., 2012] ergaben sich verschiedene Vorhersagen wie die Insertion von VAASYLIQ sich auf die Struktur des STIM2.1 Homodimers auswirkt. Docking Analysen dieser Modelle zeigten, dass die zusätzlichen acht Aminosäuren die vorhergesagte Orai-Bindeseite verschieben, während die Analyse der elektrostatischen Potentials von STIM2.1 ergab, dass dieses im Bereich der Dimerisierungsdomäne im Vergleich zu STIM1 und STIM2.2 positiver geladen ist. Dies könnte dazu führen, dass STIM2.1 aufgrund der abstoßenden Kräfte weniger stabile Dimere bildet, als dies für STIM1 und STIM2.2 der Fall ist [Miederer et al., 2015].

Wie genau der inhibitorische Effekt vermittelt wird, ob durch sterische oder elektrostatische Folgen der Insertion der VAASYLIQ Sequenz auf die Struktur des Proteins [Miederer et al., 2015], passives Blocken von Orai1-Bindungsstellen oder durch einen aktiven Mechanismus über einen dritten Faktor [Rana et al., 2015], muss durch weitere Experimente, möglicherweise mit Hilfe eines biochemischen Ansatzes zur Identifikation von spleißspezifischen STIM2-Interaktionspartnern, wie in dieser Arbeit initiiert und im Folgenden diskutiert, geklärt werden.

Der Nachweis von STIM2.1 in allen bisher getesteten Zelltypen und Geweben, sowie die starke Konservierung in Säugetieren, spricht dafür, dass STIM2.1 ein wichtiger regulativer Mechanismus für SOCE ist. Außerdem sollten bereits publizierte und widersprüchliche oder kleine Effekte bezüglich STIM2 in einem anderen Licht betrachtet werden, da bisher nur ein Teil des Puzzles STIM2.2 (als STIM2) in Überexpressionsanalysen analysiert wurden. Zusätzlich wurde bei siRNA-Experimenten außer Acht gelassen, dass sie gleichzeitig einen Aktivator und einen Inhibitor herunterreguliert. STIM2.1 *knock out* Mäuse könnten in

Zukunft dazu beitragen mehr über die Rolle der Spleißvariante in Erfahrung zu bringen und möglicherweise gewebsspezifische Funktionen aufzudecken.

5.2 Proteomik-Screen für neue STIM2 Interaktionspartner

Mit der Identifikation von STIM2.1 wurde eine neue Komponente zur Regulation des speichergesteuerten Kalziumeinstroms charakterisiert. Neben den Hauptmolekülen Orai und STIM, die für SOCE verantwortlich sind, gibt es verschiedene regulatorische Proteine, die mit einem der beiden interagieren und somit SOCE beeinflussen. Während für STIM1 bereits Interaktionspartner wie u.a. Juncate, POST oder SARAF bekannt sind [Prakriya and Lewis, 2015], existieren bislang wenige Studien, die sich mit STIM2 spezifischen Interaktionspartnern beschäftigen und hierdurch zusätzliche Informationen zur Regulation von SOCE oder möglicherweise sogar weitere Mechanismen, in die STIM2 involviert ist, liefern.

Ein erster Schritt in diese Richtung gelang in dieser Arbeit mit dem durchgeführten Proteomik-Screen nach STIM2.1 und STIM2.2 assoziierten Proteinen. Hierfür wurde APEX2 (*engineered ascorbate peroxidase 2*) [Lam et al., 2015] in die C-terminale Region von STIM2.1 und STIM2.2 kloniert, ohne hierbei Aminosäuren zu entfernen. Das 28 kDa große eingefügte APEX2 störte dabei die Funktionalität der beiden Spleißvarianten nicht (Abb. 21). Verschiedene Experimente wurden durchgeführt, um die Funktionalität von APEX2 zu bestätigen (Durchgeführt in der AG Fliegel, Universität von Alberta). So konnte gezeigt werden, dass Biotinylierung ausschließlich in Anwesenheit von APEX2 geschah und dass die biotinylierten Proteine mit der YFP-Fluoreszenzmarkierung von STIM2 kolokalisieren (Abb. 22). Aus dieser relativen Nähe der gelabelten Proteine zu STIM2 kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei den markierten Proteinen möglicherweise um Interaktionspartner handelt. Mittels des durchgeführten Westernblots konnte ausgeschlossen werden, dass es bei dem gewählten System zu einer spontanen Aktivität der Peroxidase kam (Abb. 23). Dies war wichtig, da es sonst bereits während der Proteinsynthese und Prozession zu Biotinylierung kommen könnte, was zu falsch-positiven Hits führen würde. Bei der Bande von ~65 kDa, die in allen Spuren zu sehen ist, handelt es sich um eine unspezifische Bande, eindeutig daran zu erkennen, dass sie auch in untransfizierten und unbehandelten HEK293T Zellen und zwischen den Spuren erkannt wurde. Die Replikate für die Massenspektrometrie wurden wie im Schema in Abbildung 6 aufgeführt angesetzt und in der Massenspektroskopie-Einrichtung der Universität von Alberta analysiert. Obwohl es sich bei den Hits nicht gezwungenermaßen um Interaktionspartner, sondern ebenfalls um in der Nähe befindliche Proteine handeln kann, deutet die große Menge an gefundenen Proteinen (STIM2.1: 1018 und 1004 Hits; STIM2.2: 977 und 989 Hits) darauf hin, dass ein Punkt der Durchführung Optimierungspotential enthält. Da dies auf alle Replikate zutraf, muss es sich um einen systematischen Fehler handeln, wahrscheinlich durch eine unvollständige Aufreinigung der biotinylierten Proteine durch Streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen. Der, nach Behandlung der Zellen

und vor Zusammenführung der einzelnen Lysate, gemachte Kontroll-Westernblot (Abb. 24A) zeigte, dass in den behandelten Zellen biotinylierte Proteine nachzuweisen waren, während die Negativkontrollen erwarteterweise keine Biotinylierung aufwiesen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der hohe Hintergrund auf fehlerhafte Negativkontrollen zurückzuführen war. Wie das Coomassie-gefärbte Gel zeigte sind bereits im Gel sehr viele Banden angefärbt (Abb. 24B). Auch stimmte das Färbemuster im Gel nicht mit den Westernblots überein, was teilweise dadurch zu erklären ist, dass eine Coomassie-Färbung im Vergleich zur Antikörper-Färbung sensitiver ist, jedoch wäre ein eindeutigeres Bandenmuster zu erwarten gewesen. Somit muss der Fehler zwischen dem Kontrollwesternblot und dem Auftragen der Proben auf das Coomassie-Gel liegen, was bedeutet, dass die Anreicherung der biotinylierten Proteine mittels magnetischen Streptavidin-Kügelchen nicht ausreichend erfolgreich verlief. Ob hier die Pufferzusammensetzung für das Binden an die Kügelchen oder die Elution besser gewählt hätte werden können, Kügelchen einer anderen Firma effizienter gewesen wären oder diese überladen waren, kann hier nicht geklärt werden und müsste in weiteren Experimenten getestet und optimiert werden. Dennoch konnten die Daten für eine weitere Analyse verwendet werden, da mittels SILAC-Medium behandelte Zellen (kultiviert in schwerem Medium: H), sowie Negativkontrolle (kultiviert in leichtem Medium: L) in einem Replikat vereint wurden und so der H/L-Wert zur Analyse verwendet werden konnte. Ein hoher Wert bedeutet, dass dieses Protein vermehrt in den behandelten Zellen gefunden wurde und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um einen möglichen Interaktionspartner von STIM2 handelt. Alle, nach der durchgeführten Analyse der Daten, identifizierten Proteine stimmen theoretisch von ihrer bekannten Lokalisation mit den Erwartung überein, da es sich um zytosolische oder ER-Membran-Proteine handelt, kommen somit grundsätzlich als Interaktionspartner in Frage. Ein Finden von mitochondrialen oder ER-luminalen Hits hätte auf einen fehlerhaften Screen hingewiesen.

Aus der Literatur sind bereits verschiedene STIM-Interaktionspartner zu entnehmen. Bekannte Proteine, die bereits zuvor als Interaktionspartner für STIM1 und STIM2 identifiziert wurden, wie Transportin1, Exportin1 [Saitoh et al., 2011], CRACR2A [Srikanth et al., 2010], SERCA3 [López et al., 2008] oder POST (*Partner of STIM*) [Krapivinsky et al., 2011] wurden nicht in diesem Screen gefunden. Calnexin, das ebenfalls von Saitoh *et al.* et al. als Interaktionspartner beschrieben wurde [Saitoh et al., 2011], konnte in einem der Replikate von STIM2.2 mit einem sehr guten Wert identifiziert werden. Dies unterstreicht, dass die Methode grundsätzlich funktioniert, jedoch die bisher durchgeführte Analyse verbessert werden kann. Ein weiterer Grund, warum Calnexin nur in einem der Replikate gefunden wurde, könnte sein, dass sich der größte Teil des Proteins ER-luminal befindet und nur ein kurzes 90 Aminosäuren langes Ende ins Zytoplasma ragt. In dieser Arbeit wurden nur Proteine aufgeführt, die in mindestens drei der vier Replikate oder spleißspezifisch vorkamen. Dass eine Optimierung der Auswertung weitere mögliche Interaktionspartner liefern könnte, wird auch anhand von Junctate sichtbar. Das Ca²⁺-bindende ER-Membranständige Protein interagiert bekanntermaßen mit STIM [Srikanth et al., 2012] und wurde

in allen Replikaten identifiziert. Jedoch mit einem sehr geringen H/L-Wert, so dass es bei der anschließenden Analyse nicht mehr unter den besten Hits geführt wurde. Die bekannte Interaktionsdomäne von Junctate mit STIM1 befindet sich jedoch im ER Lumen citepSrikanth2012. Ob beide Proteine auch mit ihren zytosolischen Domänen interagieren können, ist ungeklärt. Weitere Unterschiede können zudem teils durch das Fehlen der Verwendung eines Stimulus erklärt werden. So wurde weder Orai noch STIM1 als Interaktionspartner identifiziert. Um diese zu finden, hätten die Kalziumspeicher der Zelle möglicherweise entleert werden müssen, so dass STIM2 aktiviert und in Clustern vorliegt. So wäre eine Möglichkeit den durchgeführten Screen unter Verwendung von Thapsigargin zu wiederholen, um so Proteine zu identifizieren, die sich in unmittelbarer Nähe zu einem aktivierten STIM2 befinden. Durch eine bioinformatische Analyse könnten möglicherweise aus dem existierenden Datensatz mehr Informationen verwertet werden, so dass weitere Proteine, die in einzelnen Replikaten gefunden wurden oder auch Hits, die einen niedrigen H/L-Wert aufwiesen, in der Analyse berücksichtigt werden.

SARAF, das wie anhand von Ko-Immunpräzipitation und FRET-Studien für STIM1 und SARAF gezeigt, bindet sowohl an STIM1 als auch an STIM2, wurde jedoch in keinem der Replikate gefunden [Palty et al., 2012]. Bei der Interaktion von SARAF mit STIM handelt es sich um eine sehr komplexe Bindung, die womöglich durch eine Großzahl anderer Moleküle, wie PIP₂, Septine oder auch extended Synaptotagmin (E-Syt), reguliert wird [Palty et al., 2012]. 2013 zeigten Giordano *et al.*, dass E-Syt 1-3 mit PIP₂ interagieren, allerdings nur E-Syt 1 hierfür erhöhte Kalziumlevel benötigt. Obwohl ein dreifach *knock down* dieser Proteine keinen Effekt auf SOCE zu haben schien [Giordano et al., 2013], könnte es sich lohnen dies nochmal eingehender möglicherweise mit einem STIM2 spezifischeren Imaging Protokoll zu untersuchen. Da E-Syt 1 erhöhte zytosolische Kalziumkonzentrationen benötigt, wäre es interessant zu untersuchen, ob ein Knock down von STIM2 die Lokalisation von E-Syt 1 ändert. Der vielversprechende H/L-Wert in drei der vier Replikate (Tab. 35) und bekannte Literatur machen E-Syt 1 zu einem vielversprechenden Kandidaten, der in naher Zukunft eingehender untersucht werden sollte. Ein weiterer Hit, der mit sehr hohem H/L-Wert gefunden wurde ist Profilin 1, ein Protein, das u.a. in Abhängigkeit seiner Konzentration die Aktin-Polymerisierung katalysiert [Alkam et al., 2017]. Dieses fungiert durch direktes Binden als Inhibitor der PIP₂ Hydrolyse [Goldschmidt-Clermont et al., 1990], ein essentieller Schritt zur Bildung von IP₃ und damit Aktivierung von SOCE durch Entleerung des ERs. STIM2 bindet mit Hilfe der C-terminalen 27 AS an PIP₂ und PIP₃ [Ercan et al., 2009]. Somit interagieren sowohl extended Synaptotagmin, als auch Profilin 1 und STIM2 mit PIP₂, was ein Vorhandensein dieser Proteine in den gleichen subzellulären Regionen und Clustern möglich macht.

Alle gefundenen Hits müssen durch sekundäre Experimente, wie bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC), FRET, Kolokalisationsanalysen, siRNA und Überexpressions-Experimente auf eine direkt Interaktion mit STIM2 hin bestätigt werden. Eine Ko-Immunpräzipitation wurde bereits für die Kandidaten Profilin 1 und Extended Syn-

apoptogamin 1 versucht, allerdings ohne ein eindeutig positives Ergebnis. Eine Erklärung für unterschiedliche Ergebnisse nach der massenspektrometrischen Analyse und Ko-Immunpräzipitation könnte sein, dass APEX2 alle sich in unmittelbarer Nähe (<20 nm) befindlichen Proteine biotinyliert und somit möglicherweise nicht ausschließlich Interaktionspartner markiert werden. Aufgrund der Markierung aller nahestehenden Proteine ist APEX2 jedoch auch in der Lage transiente oder schwache Interaktionen einzufangen. Zusätzlich geschieht die Biotinylierung im intakten Zellsystem, während der Ko-Immunpräzipitation eine Lyse vorangeht, so dass die Interaktion durch ein Ersetzen des Zytosols und das Aufbewahren der Proteine in einer Ringerlösung verloren gehen könnte. Abbildung 26 zeigt ein sehr starkes Signal von Profilin 1. Vorstellbar ist, dass nur ein kleiner Prozentsatz von Profilin 1 mit STIM2 interagiert und das Signal so nicht detektierbar ist. Eine Überexpression von Profilin 1 könnte möglicherweise den Anteil des mit STIM2 interagierenden Proteins erhöhen, so dass es in einer Westernblot-Analyse sichtbar werden könnte. Dennoch wäre es weiterhin sinnvoll die massenspektrometrische Analyse nicht nur in stimulierten Zellen zu wiederholen, sondern zusätzlich in einem anderen Zellsystem. Während HEK293T Zellen selbst relativ geringen SOCE zeigen, könnten andere Zellen, wie z.B. neuronale Zellen, ein besseres System darstellen, um STIM2 Interaktionspartner zu identifizieren. Eine weitere wichtige Kontrolle wäre die Cysteine im C-Terminus von STIM2 zu mutieren und die Analyse zu wiederholen. Aufgrund der Aktivierung von APEX2 durch H₂O₂ könnten die Cysteine untereinander Disulfidbrücken ausbilden, was einen Einfluss auf die Tertiärstruktur von STIM2 hätte. Somit könnten durch eine veränderte Faltung von STIM2 Proteine markiert worden sein, die sich sonst nicht in unmittelbarer Nähe befinden oder Interaktionen aufgrund einer veränderten Tertiärstruktur verloren gingen und somit nicht detektiert werden konnten. Jedoch zeigen die bisher erhobenen Daten, dass APEX2-Fusionskonstrukte eine Möglichkeit darstellen eine unvoreingenommene erste Analyse zu möglichen Interaktionspartnern durchzuführen.

5.3 Einfluss von APP und Präsenilin 1 auf Kalziumkanäle

Speichergesteuerter Kalziumstrom

Alzheimer ist in den meisten Fällen eine spontan auftretende Krankheit, wobei weniger als 5 % der Patienten an der autosomal dominant vererbaren Form FAD (familial Alzheimer's Disease) erkrankt. FAD liegen Mutationen in Präsenilin 1, Präsenilin 2 oder APP (Amyloid Precursor Protein) zugrunde. Eine der kontrovers diskutierten Annahmen als Grund für die Krankheit ist, dass veränderte Kalziumsignale bei der Entwicklung der Krankheit eine Rolle spielen [Tu et al., 2006; Bezprozvanny and Mattson, 2008; Sun et al., 2014; Popugaeva et al., 2015]. Mehrfach wurde gezeigt, dass STIM2 einen positiven Einfluss auf die Stabilität von pilzförmigen Dornfortsätzen (Mushroom Spines) hat, welche besonders für das Erinnerungsvermögen essentiell sind und durch Überexpression die Toxizität von A β 42 Plaques ausgleichen kann [Popugaeva et al., 2015] bzw. ebenso in der Lage ist eine Ca²⁺-

Dysregulation, verursacht durch die Präsenilin 1 Mutante PS-M146V, zu kompensieren [Sun et al., 2014]. Verschiedene Alzheimer-assoziierte Mutationen wurden in der Literatur eingehend beschrieben, jedoch ist weniger gut untersucht, welchen Anteil die Proteine Präsenilin 1 und APP alleine an den Kalziumsignalen der Zelle haben.

In Abbildung 27 ist zu sehen, dass in SH-SY5Y Zellen sowohl Überexpression, als auch Deletion (*knock out*) von APP zu einem verminderten SOCE führten. Ein verringerter SOCE war auch in den SH-SY5Y PS1-/- Zellen zu beobachten. Tong *et al.* beschreiben jedoch eine Verstärkung von SOCE nach PS1 *knock out* und erklären ihn durch eine verminderte STIM1 Prozessierung, verursacht durch Präsenilin 1. Eine Erklärung, warum jedoch ausschließlich in PS1-M146V und nicht in PS1 wt überexprimierenden Zellen ein verringerter SOCE zu beobachten war und warum die Menge an STIM1 Vollängenprotein trotz Überexpression des prozessierenden Proteins gleich blieb, bleiben Tong *et al.* schuldig [Tong et al., 2016]. Während zuvor mehr STIM1 und weniger STIM2 Protein in PS1-defizienten MEF-Zellen beschrieben wurden [Bojarski et al., 2009], konnte in den SH-SY5Y PS1 *knock out* Zellen keine Veränderung der Proteinmenge von STIM2 festgestellt werden (Abb. 28A, B).

Teilweise könnten die Ergebnisse zur relativen mRNA Menge der SOCE Komponenten den beobachteten Ca^{2+} -Phänotyp erklären. In den APP überexprimierenden Zellen (swedish), die einen kleineren SOCE aufwiesen, lag mehr Orai3 mRNA vor, als in den entsprechenden Kontrollzellen (Abb. 28C). Aufgrund seiner geringeren Leitfähigkeit führt mehr Orai3 in den Zellen zu einem kleineren SOCE [Lis et al., 2007] und könnte den kleineren SOCE in SH-SY5Y swedish erklären. Aufgrund eines Mangels an einem Orai3 spezifischen Antikörper war es nicht möglich zu überprüfen, ob die erhöhte relative mRNA Menge sich auch auf Proteinebene spiegelt. Eine Möglichkeit indirekt eine erhöhte Menge von Orai3 zu überprüfen wäre, die Sensitivität von SOCE gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu untersuchen. Da Orai3 als Teil der heteromeren Kanäle die ROS-Sensitivität verringert [Bogeski et al., 2010; Alansary et al., 2015], sollten die SH-SY5Y swedish Zellen weniger ROS-induzierte Inhibition von SOCE zeigen. In den anderen Modellzelllinien konnten die relativen mRNA Mengen der SOCE Gene die gemessenen Effekte nicht erklären (Abb. 28D, E). Die durchgeführten Experimente konnten keinen Aufschluss über die beobachteten Ca^{2+} -Phänotypen der stabilen SH-SY5Y liefern.

Eine mögliche Ursache für die Unterschiede in den Beobachtungen bei der Verwendung von SH-SY5Y könnte die Heterogenität der Neuroblastoma-Zelllinien sein, welche drei Zell-Phänotypen aufweisen: N-Typ (Neurolastisch), S-Typ (Substrat-adhärenz) und I-Typ (Intermediär) [Biedler et al., 1973; Ross et al., 2003]. Bei der ursprünglichen SH-SY5Y Zelllinie handelte es sich um eine reine N-Typ Zelllinie. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass N-Typ und S-Typ in Zellkultur jeweils ihren Phänotyp verändern können [Ciccarone et al., 1989], wodurch es fraglich ist, ob es sich dabei weiterhin um eine reine N-Typ-Linie handelt. Zusätzlich zeigen Bell *et al.*, dass sich aus SH-SY5Y sowohl N- als auch S-Typ Zellen isolieren lassen [Bell et al., 2013]. S-Typ Neuroblastoma Zellen weisen

niedrigere Orai1 und TRPC1 Expressionslevel auf, was mit niedrigeren SOCE-Einflussraten in Vergleich zu N-Typ Zellen einhergeht [Bell et al., 2013]. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Beobachtung der Beobachtungen von Tong *et al.* und den Ergebnissen dieser Arbeit bezüglich SOCE in PS1-KO SH-SY5Y Zellen könnte sein, dass es sich zwar namentlich um die gleiche Zelllinie handelte, diese jedoch nicht aus ähnlichen Anteilen von N- und S-Typ Zellen bestand bzw. ähnliche Proteinlevel der SOCE-Proteine aufwies. Zusätzlich könnten sowohl Überexpression bzw. Deletion von APP und PS1 einen Einfluss auf den Zell-Phänotyp haben und diesen eher in die eine oder andere Richtung treiben. Zukünftig sollte der überwiegende Phänotyp anhand von spezifischen N- bzw. S-Typ Antikörperfärbungen [Katsetos et al., 2003; Ciccarone et al., 1989] determiniert werden, um hierauf zurückzuführende Unterschiede in den Kalziumsignalen aufdecken oder ausschließen zu können. Eine weitere Ursache von veränderten Kalziumsignalen könnten weitere Spleißvarianten sowohl von STIM1 als auch von STIM2 sein. Das verkürzte STIM2.3 konnte inzwischen in cDNA menschlichen Gehirns nachgewiesen werden [Gilson, 2016]. So könnten möglicherweise vorhandene Unterschiede unentdeckt bleiben, wenn eine Spleißvarianten hoch- und eine andere herunterreguliert wird. Ob dies einen Einfluss hat könnte anhand von spleißspezifischen qRT-PCR Primern oder wenn möglich Antikörpern überprüft werden und könnte helfen die unterschiedlichen SOCE-Signale zu interpretieren.

Spannungsgesteuerter Kalziueinstrom

Elektrisch erregbare Zellen, wie neuronale Zellen, exprimieren funktionell aktive spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (VOC Kanäle: Voltage-Operated Calcium). Während in nicht erregbaren Zellen, wie beispielsweise Immunzellen, kein spannungsgesteuerter Kalziueinstrom zu beobachten ist, können SH-SY5Y Zellen mittels einer hoch Kalium-haltigen Lösung depolarisiert und daraufhin ein Ca^{2+} -Einstrom gemessen werden. Zusätzlich verändert sich der Depolarisations-induzierte Kalziueinstrom durch die Differenzierung von SH-SY5Y Zellen mittels Retinsäure.

Wie bereits zuvor gezeigt, wirkte sich die Differenzierung der SH-SY5Y Zellen sowohl auf den spannungsgesteuerten als auch auf den speichergesteuerten Kalziueinstrom aus [Bell et al., 2013; Brown et al., 2005; Toselli et al., 1991]. Die Retinsäure-verursachte Differenzierung vergrößerte den Depolarisations-induzierten Kalziueinstrom, während SOCE drastisch reduziert wurde (Abb. 29). Toselli *et al.* führen den verstärkten Ca_v auf HVA Kanäle (Ca_v1 und Ca_v2 -Familie) zurück [Toselli et al., 1991]. 2005 zeigen Brown et al. zum ersten Mal, dass SOCE durch Differenzierung der Zellen herunterreguliert wird, während der Mechanismus hierfür weiter unklar bleibt [Brown et al., 2005]. Eine eingehende Analyse der verschiedenen Subtypen von SH-SY5Y Zellen ergab, dass SOCE vor allem in differenzierten N-Typ SH-SY5Y Zellen herunterreguliert wird, während die S-Typ SH-SY5Y Zellen einen ähnlichen SOCE wie vor Retinsäurebehandlung aufweisen [Bell et al., 2013]. Jedoch muss hier angemerkt werden, dass S-Typ SH-SY5Y bereits vor Differenzierung einen niedrigeren SOCE aufwiesen.

Da bereits in den undifferenzierten Kontrollzellen ein VOCE (Voltage Operated Calcium Entry) messbar war, wurden die stabilen Zelllinien auf Unterschiede im spannungsgesteuerten Kalziumeinstrom hin untersucht. Während die stabilen Neuroblastoma Zelllinien SH-SY5Y APP^{-/-} und PS1^{-/-} einen verstärkten VOC-Einstrom aufwiesen, zeigten APP überexprimierende Zellen einen verminderten spannungsgesteuerten Kalziumeinstrom (Abb. 30A-G). Angelehnt an die von Sousa *et al.* durchgeführten Analysen zur Expression von Ca_v-Kanälen in SH-SY5Y Zellen, die ausschließlich auf eine Expression von Ca_v1.3, Ca_v2.2 und Ca_v3.1 hindeuteten [Sousa et al., 2013], wurde untersucht, ob sich die relativen mRNA Mengen dieser Kanalvarianten durch eine Überexpression von APP oder ein Ausschalten von APP bzw. PS1 veränderten. Die verminderte relative Ca_v2.2 mRNA Menge in APP überexprimierenden Zellen (Abb. 31A swedish) bzw. erhöhte relative Ca_v2.2 mRNA Menge in APP^{-/-} Zellen (Abb. 31B APP^{-/-}) wies darauf hin, dass APP einen Einfluss auf die Expression des N-Typ Ca²⁺-Kanals hat. So scheint APP die relative mRNA Menge von Ca_v2.2 negativ zu beeinflussen und zu verringern, so dass diese in Abwesenheit von APP anstieg. Da die qRT-PCR Ergebnisse keine Veränderungen für die anderen Kanäle zeigten, lässt dies darauf schließen, dass Ca_v2.2 alleine für das im Ca²⁺-Imaging beobachtete veränderte Kalziumsignal verantwortlich war (Abb. 30B und E). Eine Möglichkeit dies zu überprüfen, wäre Ca_v2.2 in SH-SY5Y swedish Zellen transient überzuexprimieren, bzw. in SH-SY5Y APP^{-/-} und PS1^{-/-} diesen siRNA vermittelt herunterzuregulieren, um zu überprüfen, ob der daraufhin gemessene spannungsgesteuerte Kalziumeinstrom dem der Kontrollzellen entspricht.

In PS1^{-/-} Zellen war ebenso ein verstärkter Kalziumeinstrom zu beobachten. Dies entspricht früheren Beobachtungen, in denen ein verstärkter Strom in Primärkulturen von Neuronen aus PS1^{-/-} Mäusen gemessen wurde. Cook *et al.* führen dies anhand der Verwendung spezifischer Ca_v-Kanal Blocker auf L- und P-Typ Ca²⁺-Kanäle zurück (Ca_v1 und Ca_v2.1). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Hier wurde auf mRNA Ebene keine Veränderung des L-Typ Kalziumkanals Ca_v1.3 beobachtet. Jedoch konnte zusätzlich zu einer erhöhten relativen Ca_v2.2 mRNA Menge, wie zuvor in APP^{-/-} Zellen beobachtet, auch eine drastische Erhöhung der relativen mRNA Menge von Ca_v3.1 gezeigt werden (Abb. 31C PS1^{-/-}). So wäre zu vermuten, dass das vergrößerte Kalziumsignal nach Depolarisation von PS1^{-/-} Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 30) sowohl von Ca_v2.2 als auch von Ca_v3.1 getragen wurde. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da T-Typ Kalziumkanäle (Ca_v3.1) bereits bei kleinen Depolarisationen nahe dem ruhenden Membranpotential öffnen bzw. teilweise bereits in ruhenden Zellen geöffnet sind und bei starken Depolarisationen inaktivieren. Ohne eine vorherige Hyperpolarisation sind sie dann nicht mehr im Stande zu öffnen [Isopé et al., 2010]. Die gewählte starke Depolarisation mit 145 mM KCl, die das Membranpotential auf ~0 mV brachte, hätte Ca_v3.1 wahrscheinlich direkt inaktiviert. Die durchgeführten Experimenten zu einer spezifischen Ca_v3.1 Aktivierung mittels schwacher Depolarisation konnte in keinem der Zelltypen einen Kalziumeinstrom bewirken (Abb. 32). Dass dies an den absoluten Ca_v3.1 mRNA Mengen liegt erscheint

unwahrscheinlich, da in PS1^{-/-} Zellen 7,7-mal mehr dieser mRNA vorhanden war als in den Kontrollzellen. Zusätzlich waren auch die absoluten Werte ($2^{(\Delta CQ)}$) von Ca_v3.1 in PS1^{-/-} Zellen die höchsten verglichen mit Ca_v1.3 oder Ca_v2.2 in allen untersuchten Zelllinien. Da die verwendeten Primer jedoch nicht auf absolute Werte normiert wurden, kann keine abschließende Aussage über die Menge der einzelnen Kanäle zueinander getroffen werden. Weiterhin bleibt fraglich, ob diese Werte das Verhältnis auf Proteinebene spiegeln, da dies aufgrund von nicht ausreichend funktionalen Ca_v-Antikörpern für alle drei Varianten nicht geklärt werden konnte. Anhand der 10 mM KCl Lösung wurde das Membranpotential von ~ 70 mV auf ~ 55 mV erhöht. Eine im Vergleich zur 10 mM KCl Lösung etwas stärker depolarisierende KCl-Lösung könnte verwendet werden, um zu überprüfen, ob somit eine Ca_v3.1 Aktivierung erreicht werden kann. Eine andere Möglichkeit wäre die Zellen vor der Aktivierung zu hyperpolarisieren, da der Großteil von T-Typ Kalziumkanälen bei dem für Neuronen typischen Ruhepotential von ~ 70 mV bereits inaktiviert vorliegen und somit nicht in der Lage sind zu öffnen [Simms and Zamponi, 2014]. Zusätzlich sollten die Ströme mittels der Patch Clamp Analyse untersucht werden, da hier die Möglichkeit besteht eindeutiger zwischen den HVA und LVA Kanälen zu unterscheiden.

Zusammengefasst bestätigten die nachgewiesenen relativen mRNA Mengen von Ca_v1.3, Ca_v2.2 und Ca_v3.1 die Daten vorheriger Veröffentlichungen [Sousa et al., 2013], wobei jedoch unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe darauf hindeuten, dass auch mRNA von Ca_v1.2 in SH-SY5Y Zellen nachweisbar ist (Sarah Kircher, Gertrud Schwär; unveröffentlichte Daten). Zusätzlich zeigten 2010 bereits Park *et al.* eine Ko-Immünpräzipitation von endogenem STIM1 und Ca_v1.2 in SH-SY5Y Zellen [Park et al., 2010]. Deswegen sollte auch Ca_v1.2, der ~ 80 % der Ca_v1-Kanäle im Gehirn ausmacht [Calin-Jageman and Lee, 2008], in weitere Untersuchungen mit einbezogen werden.

Auch deshalb weil bereits eine direkte Interaktion von STIM1 mit dem L-Typ VOC-Kanal Ca_v1.2 und eine hierdurch reziproke Kontrolle der VOC- und SOC-Kanäle ist bereits bekannt ist [Wang et al., 2010; Park et al., 2010]. Ob die unterschiedlichen Phänotypen (N-, S- und I-Typ) der SH-SY5Y Zellen unterschiedlich starke Expressionslevel der Ca_v-Kanäle aufweisen und/oder sich in ihrem VOC-Einstrom unterscheiden, sollte in zukünftige Untersuchungen einbezogen werden. Da die verschiedenen Phänotypen sich in ihrem SOCE unterscheiden [Bell et al., 2013], wäre es interessant zu analysieren, ob dies mit dem VOC-Einstrom korreliert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl APP, als auch PS1 einen Einfluss auf die relative mRNA Menge einzelner Ca_v-Kanäle haben (Abb. 31). Auf welche Weise APP und PS1 die relative mRNA Mengen von Ca_v2.2 und Ca_v3.1 beeinflussen, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Bekannt ist jedoch bereits, dass APP direkt mit Ca_v1.2 in GABAergen Neuronen interagiert und dessen Proteinmenge in gleicher Weise beeinflusst wie hier für Ca_v2.2 und Ca_v3.1 mRNA beobachtet [Yang et al., 2009a]. So führte eine Deletion von APP in Mäusen zu mehr Ca_v1.2 und damit einhergehend zu stärkeren Strömen [Yang et al., 2009a]. Die in APP^{-/-} Mäusen durchgeführte Studie konnte jedoch keine Ver-

änderung der Proteinlevel für andere L-Typ Kalziumkanäle oder den N-Typ Kanal $Ca_v2.2$ finden [Yang et al., 2009a]. Unterschiedliche Beobachtungen könnten hier auf unterschiedliche Systeme, Maus bzw. Mensch, zurückzuführen sein bzw. die verwendeten Zelltypen (GABEerge Neuronen vs. Neuroblastoma). Undifferenzierte SH-SY5Y Zellen erinnern am Ehesten an unreife catecholaminerge Neuronen [Xie et al., 2010; Martins et al., 2010]. Eine weitere Diskrepanz ist, dass Yang *et al.* keine veränderten mRNA-Level beobachteten und die Hochregulation der Kanalkomponente auf eine veränderte direkte Interaktion von APP mit $Ca_v1.2$ zurückführen [Yang et al., 2009a]. Dass den zuvor veröffentlichten und hier beschriebenen Phänotypen andere Regulationsmechanismen zugrunde liegen, lassen auch die Rettungsexperimente vermuten. Während Yang *et al.* durch eine lentivirale Transfektion von APP695 den verstärkten Strom auf Kontrolllevel reduzieren konnten, bewirkte die transiente Überexpression von APP695 keine Veränderung des Kalziumsignals nach 48 h (Abb. 33). Möglicherweise führten die unterschiedlichen Transfektionsweisen zu unterschiedlichen Messzeitpunkten, so dass die transiente Plasmidtransfektion nicht ausreichte, um den APP^{-/-} Phänotyp zu revidieren. Eine lentivirale Transfektion oder eine Inkubation mit einem AICD Peptid über eine Woche könnte hier helfen Langzeiteffekte von APP bzw. AICD zu untersuchen. Kürzlich beschrieben Hefter *et al.* die neuroprotektive Funktion von APP. So wiesen APP defiziente Schnitte aus dem Hippocampus von Mäusen eine verminderte Erholungsrate nach Hypoxiebehandlung auf. Dies ging einher mit einem erhöhten Kalziumeinstrom. Sowohl Nifedipin, ein L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker, als auch das extrazelluläre lösliche Fragment von APP (APP α) waren in der Lage die Erholungsrate auf Kontrolllevel zu erhöhen [Hefter et al., 2016]. Somit scheint APP α spannungsgesteuerte Kalziumkanäle zu beeinflussen und auf diese Weise das neuronale Netzwerk zu schützen. Dass es sich hierbei um den gleichen Mechanismus handelt, der einen größeren Kalziumeinstrom in den SH-SY5Y APP^{-/-} verursacht, bleibt zu überprüfen. Die erhöhte mRNA Menge von $Ca_v2.2$ (N-Typ) weist darauf hin, dass mehr Kanalprotein gebildet wird und eher hierdurch, als durch eine extrazelluläre Modulation des Kanals, ein vergrößerter Kalziumeinstrom zu messen ist. Jedoch sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob ein L-Typ Kalziumkanalblocker den Kalziumeinstrom in SH-SY5Y APP^{-/-} auf Kontrolllevel vermindern könnte, um zu überprüfen, ob das von Hefter *et al.* beschriebene Zusammenspiel von APP und L-Typ Kalziumkanälen auch hier eine Rolle spielt. Interessanterweise wurde ein altersbedingter Anstieg des L-Typ VOCE bereits in Nagetieren und Hasen beobachtet und konnte teilweise mit altersabhängigen Defiziten im Lernverhalten und Erinnerungsvermögen in Zusammenhang gebracht werden [Thibault et al., 2007].

Überraschend war, dass sowohl PS1^{-/-} als auch APP^{-/-} einen ähnlichen Phänotyp zeigten. Sowohl Präsenilin 1 als auch APP werden benötigt, um AICD (APP Intracellulär Domain) zu bilden: APP, da es sich bei AICD um den C-Terminus handelt und PS1, da es der katalytisch aktive Teil des essentiellen γ -Sekretase-Komplexes ist, der APP so prozessiert, dass AICD entstehen kann. Dies lässt vermuten, dass AICD für die beobachteten

Phänotypen verantwortlich ist, da in beiden Deletionszelllinien wahrscheinlich weniger AICD gebildet wird. Da es sich bei der stabilen APP^{-/-} Zelllinie jedoch nur um einen APP *knock out* handelt und die Homologe APLP1 und APLP2 (β -Amyloid Precursor Protein like Protein 1 und 2), die ebenfalls AICD bilden, weiter vorhanden sind, kommt es nicht zum totalen Verlust von AICD. Des Weiteren ist nicht bekannt, wie sich APP, APLP1 und APLP2 gegenseitig beeinflussen. AICD bildet zusammen mit Fe65 und der Histonacetyltransferase Tip60 einen transkriptionell aktiven Komplex [Cao and Südhof, 2001], so dass vorstellbar ist, dass AICD einen direkten Einfluss auf die Transkription von Ca_v2.2 haben könnte.

Eine Erklärung warum in PS1^{-/-} Zellen, nicht aber in APP^{-/-} Zellen, auch Ca_v3.1 hochreguliert war, könnten weitere Ziele der γ -Sekretase sein. So bildet Präsenilin 1 einen wichtigen Bestandteil der Notch Prozessierung [Strooper et al., 1999; Struhl and Greenwald, 1999; Ye et al., 1999], wodurch die transkriptionell aktive intrazelluläre Notch-Domäne (Notch Intracellular Domain: NICD) entsteht. NICD interagiert mit dem DNA Bindefaktor CSL, der in Abwesenheit von NICD als Transkriptionsrepressor fungiert [Aster et al., 1997; Jarriault et al., 1995; Tamura et al., 1995; Struhl and Adachi, 1998]. NICD Level beeinflussen die Menge von NF- κ B, das wiederum einen Einfluss auf Ca_v haben kann. So wurde bereits gezeigt, dass T-Typ Kalziumkanäle (Ca_v3) in Entzündungsreaktionen durch Aktivierung des NF- κ B/ET-1 Signalwegs hochreguliert werden [Zhang et al., 2015b]. Ob dies der Grund für die veränderten mRNA Level sind oder es sich um einen anderen PS1-vermittelten Mechanismus handelt, muss in Zukunft getestet werden. Dies könnte beispielsweise über einen NICD-spezifischen Antikörper geschehen, um so zu vergleichen, ob SH-SY5Y PS1^{-/-} eine veränderte Menge an NICD im Vergleich zu den Kontrollzellen aufweisen. Eine Möglichkeit die direkte Beteiligung von Präsenilin 1 zu testen wäre nach Inkubation mit γ -Sekretase Inhibitoren die Expressionslevel der Ca_v-Kanäle zu testen.

Ob der Einfluss von APP und PS1 auf die speichergesteuerten Kalziumkanäle und die damit einhergehenden veränderten Ca²⁺-Signale ausreichen, um Auswirkungen auf den Transkriptionsfaktor NFAT zu haben und somit die Genexpression der SH-SY5Y Zellen beeinflusst, sollte in Zukunft getestet werden. Ein geeignetes Zellsystem wären möglicherweise MEF (mouse embrionic fibroblasts) Zellen der AG Hartmann, von denen sowohl APP/APLP als auch PS1/PS2 Deletionszelllinien existieren. Hierdurch könnten weitere Mechanismen identifiziert werden, auf welche Weise APP und APLP, sowie PS1 und PS2 Einfluss auf die Zelle und die Ca²⁺-Homöostase nehmen. Weitere Untersuchungen in diese Richtung könnten dazu dienen neue Zusammenhänge für die A β - und die Ca²⁺-Hypothese bezüglich der Krankheitsentstehung und dem Voranschreiten von Alzheimer zu finden. Da APP und PS1 in familiärer AD oft Mutationen aufweisen, könnten neu charakterisierte Signalwege, auf die APP und PS1 Einfluss nehmen, in Zukunft dazu dienen neue Therapieansätze zu finden.

Literaturverzeichnis

- Akrap, N., Seidela, T., and Barisas, B. G. (2010). Förster distances for FRET between mCherry and other Visible Fluorescent Proteins. *Analytic Biochemistry*, 402(1):105–106.
- Alansary, D., Bogeski, I., and Niemeyer, B. A. (2015). Facilitation of Orai3 targeting and store-operated function by Orai1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(7):1541–1550.
- Albertazzi, L., Arosio, D., Marchetti, L., Ricci, F., and Beltram, F. (2009). Quantitative FRET Analysis With the E0GFP-mCherry Fluorescent Protein Pair. *Photochemistry and Photobiology*, 85:287–297.
- Alkam, D., Feldman, E. Z., Singh, A., and Kiaei, M. (2017). Profilin1 biology and its mutation, actin(g) in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(6):967–981.
- Anekonda, T. S., Quinn, J. F., Harris, C., Frahler, K., Wadsworth, L., and Woltjer, R. L. (2011). L-type voltage-gated calcium channel blockade with isradipine as a therapeutic strategy for Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Disease*, 41:62–70.
- Armstrong, C. and Matteson, D. (1985). Two Distinct Populations of Calcium Channels in a Clonal Line of Pituitary Cells. *Science*, 227:65–68.
- Aster, J. C., Robertson, E. S., Hasserjian, R. P., Turner, J. R., and Kieff, E. (1997). Oncogenic Forms of NOTCH1 Lacking Either the Primary Binding Site for RBP-Jk or Nuclear Localization Sequences Retain the Ability to Associate with RBP-Jk and Activate Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(17):11336–11343.
- Aytes, A., Mollevi, D. G., Martinez-Iniesta, M., Nadal, M., Vidal, A., Morales, A., Salazar, R., Capella, G., and Villanueva, A. (2012). Stromal Interaction Molecule 2 (STIM2) Is Frequently Overexpressed in Colorectal Tumors and Confers a Tumor Cell Growth Suppressor Phenotype. *Molecular Carcinogenesis*, 51:746–753.
- Azizan, E. A. B., Poulsen, H., Tuluc, P., Zhou, J., Clausen, M. V., Lieb, A., Maniero, C., Garg, S., Bochukova, E. G., Zhao, W., Shaikh, L. H., Brighton, C. A., Teo, A. E. D., Davenport, A. P., Dekkers, T., Tops, B., Kuesters, B., Ceral, J., Yeo, G. S. H., Neogi, S. G., Mcfarlane, I., Rosenfeld, N., Marass, F., Hadfield, J., Margas, W., Chaggar,

- K., Solar, M., Deinum, J., Dolphi, A. C., Farooqi, I. S., Striessnig, J., Nissen, P., and BrownJames, M. J. (2013). Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nature Publishing Group*, 45:1055–1060.
- Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2008). Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nature immunology*, 9(1):81–88.
- Baig, S. M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M. J., Brandt, N., Engel, J., Mangoni, M. E., Farooq, M., Khan, H. U., Nürnberg, P., Striessnig, J., and Bolz, H. J. (2010). Loss of Cav1.3 (CANA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nature Neuroscience*, 3.
- Bandyopadhyay, B. C., Pingle, S. C., and Ahern, G. P. (2011). Store-operated Ca²⁺ signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1. *Journal of leukocyte biology*, 89:57–62.
- Bauer, M. C., O’Connell, D., Cahill, D. J., and Linse, S. (2008). Calmodulin binding to the polybasic C-termini of STIM proteins involved in store-operated calcium entry. *Biochemistry*, 47:6089–6091.
- Bean, B. P. (1985). Two Kinds of Calcium Channels in Canine Atrial Cells Differences in Kinetics, Selectivity, and Pharmacology. *Journal of General Physiology*, 86:1–30.
- Bech-Hansen, N. T., Naylor, M. J., Maybaum, T. A., Pearce, W. G., Koop, B., Fishman, G. A., Mets, M., Musarella, M. A., and Boycott, K. M. (1998). Loss-of-function mutations in a calcium-channel α 1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature*, 19:264–267.
- Bell, N., Hann, V., Redfern, C. P. F., and Cheek, T. R. (2013). Store-operated Ca²⁺ entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(3):643–651.
- Berna-Erro, A., Braun, A., Kraft, R., Kleinschnitz, C., Schuhmann, M. K., Stegner, D., Wultsch, T., Eilers, J., Meuth, S. G., Stoll, G., and Nieswandt, B. (2009). STIM2 Regulates Capacitive Ca²⁺ Entry in Neurons and Plays a Key Role in Hypoxic Neuronal Cell Death. *Neuroscience*, 2(93):1–11.
- Berridge, M. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361:315–325.
- Berridge, M. and Irvine, R. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312:315–321.

- Beyersdorf, N., Braun, A., Vo, T., Varga-szabo, D., Galdos, R. R., Kissler, S., Kerkau, T., and Nieswandt, B. (2009). STIM1-Independent T Cell Development and Effector Function In Vivo. *The Journal of Immunology*, 182:3390–3397.
- Bezprozvanny, I. and Mattson, M. M. P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Trends in neurosciences*, 31(9):454–463.
- Bhardwaj, R., Müller, H.-M., Nickel, W., and Seedorf, M. (2013). Oligomerization and Ca²⁺/calmodulin control binding of the ER Ca²⁺-sensors STIM1 and STIM2 to plasma membrane lipids Bioscience Reports. *Bioscience Reports*, 33:833–845.
- Biedler, J. L., Helson, L., and Spengler, B. a. (1973). Morphology and Growth , Tumorigenicity , and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Research*, 33:2643–2652.
- Bogeski, I., Kummerow, C., Al-Ansary, D., Schwarz, E. C., Koehler, R., Kozai, D., Takahashi, N., Peinelt, C., Griesemer, D., Bozem, M., Mori, Y., Hoth, M., and Niemeyer, B. A. (2010). Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Science signaling*, 3(115).
- Bojarski, L., Pomorski, P., Szybinska, A., Drab, M., Skibinska-Kijek, A., Gruszczynska-Biegala, J., and Kuznicki, J. (2009). Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca²⁺ entry in familial Alzheimer’s disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(6):1050–1057.
- Bourinet, E., Zamponi, G. W., Stea, A., Soong, T. W., Lewis, B. A., Jones, L. P., Yue, D. T., and Snutch, T. P. (1996). The alpha1E Calcium Channel Exhibits Permeation Properties Similar to Low-Voltage-Activated Calcium Channels. *The Journal of Neuroscience*, 16(16):4983–4993.
- Bouron, A., Altafaj, X., Boisseau, S., and De Waard, M. (2005). A store-operated Ca²⁺ influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca²⁺ stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice. *Developmental Brain Research*, 159:64–71.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., and Meyer, T. (2007). STIM2 is a Feedback Regulator that Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Levels. *Cell*, 131(7):1327–1339.
- Braun, A., Gessner, J. E., Varga-szabo, D., Syed, S. N., Konrad, S., Stegner, D., Schmidt, R. E., and Nieswandt, B. (2009). STIM1 is essential for Fcγ receptor activation and autoimmune inflammation. *Blood*, 113(5):1097–1105.
- Brown, A. M., Riddoch, F. C., Robson, A., Redfern, C. P. F., and Cheek, T. R. (2005). Mechanistic and functional changes in Ca²⁺ entry after retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *The Biochemical journal*, 388(Pt 3):941–948.

- Calin-Jageman, I. and Lee, A. (2008). Cav1 L-type Ca²⁺ channel signaling complexes in neurons. *Journal of Neurochemistry*, 105:573–583.
- Cao, X. and Südhof, T. (2001). A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60. *Science*, 293:115–120.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., Brini, M., Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001). Generation, Control, and Processing of Cellular Calcium Signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36:107–260.
- Chang, W.-c., Fang, Y.-y., Chang, H.-w., Chuang, L.-y., and Lin, Y.-d. (2014). Identifying association model for single-nucleotide polymorphisms of ORAI1 gene for breast cancer. *Cancer Cell International*, 14:1–6.
- Ciccarone, V., Spengler, B. a., Meyers, M. B., Biedler, J. L., and Ross, R. a. (1989). Phenotypic Diversification in Human Neuroblastoma Cells: Expression of Distinct Neural Crest Lineages. *Cancer Research*, 49:219–226.
- Cook, D. G., Li, X., Cherry, S. D., and Cantrell, A. R. (2005). Presenilin 1 Deficiency Alters the Activity of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels in Cultured Cortical Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 94:4421–4429.
- Covington, E. D., Wu, M. M., and Lewis, R. S. (2010). Essential Role for the CRAC Activation Domain in Store-dependent Oligomerization of STIM1. *Molecular Biology of the Cell*, 21:1897–1907.
- Cribbs, L. L., Lee, J.-h., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., and Perez-Reyes, E. (1998). Cloning and Characterization of alpha1H From Human Heart, a Member of the T-Type Ca²⁺ Channel Gene Family. *Circulation Research*, 83:103–109.
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L., and Pan, Z. (2017). Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(1):3–17.
- Curtis, B. M. and Catterall, W. A. (1984). Purification of the Calcium Antagonist Receptor of the Voltage-Sensitive Calcium Channel from Skeletal Muscle Transverse Tubules. *Biochemistry*, 23(10):2113–2118.
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C. R., König, S., and Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *Journal of Cell Biology*, 194(2):335–346.
- Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Lackner, B., Schindl, R., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). A Ca²⁺ Release-activated Ca²⁺ (CRAC) Modulatory Domain (CMD) within STIM1 Mediates Fast Ca²⁺-dependent Inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(37):24933–24938.

- Dittmer, P. J., Wild, A. R., Acqua, M. L. D., and Sather, W. A. (2017). STIM1 Ca²⁺ Sensor Control of L-type Ca²⁺ -Channel-Dependent Dendritic Spine Structural Plasticity and Nuclear Signaling. *CellReports*, 19:321–334.
- Dubel, S. J., Starr, T. V. B., Hellt, J., Ahluwalia, M. K., Enyeartt, J. J., Catterall, W. A., and Snutch, T. P. (1992). Molecular cloning of the alpha1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Physiology*, 89:5058–5062.
- Dwane, S., Durack, E., and Kiely, P. A. (2013). Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. *BMC research notes*, 6(366).
- Ercan, E., Chung, S.-h., and Seedorf, M. (2012). Di-Arginine Signals and the K-Rich Domain Retain the Ca²⁺ Sensor STIM1 in the Endoplasmic Reticulum. *Traffic*, 13:992–1003.
- Ercan, E., Momburg, F., Engel, U., Temmerman, K., Nickel, W., and Seedorf, M. (2009). A conserved, lipid-mediated sorting mechanism of yeast Ist2 and mammalian STIM proteins to the peripheral ER. *Traffic*, 10(12):1802–1818.
- Feske, S., Draeger, R., and Peter, H.-h. (2000a). The Duration of Nuclear Residence of NFAT Determines the Pattern of Cytokine Expression in Human SCID T Cells. *The Journal of Immunology*, 165:297–305.
- Feske, S., Draeger, R., Peter, H.-H., and Rao, A. (2000b). Impaired NFAT Regulation and its Role in a Severe Combined Immunodeficiency. *Immunobiology*, 202:134–151.
- Feske, S., Giltman, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M., and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature immunology*, 2(4):316–324.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-h., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441:179–185.
- Feske, S., Skolnik, E. Y., and Prakriya, M. (2013). Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature reviews Immunology*, 12:532–547.
- Frischauf, I., Muik, M., Derler, I., Bergsmann, J., Fahmer, M., Schindl, R., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). Molecular determinants of the coupling between STIM1 and Orai channels: Differential activation of Orai1-3 channels by a STIM1 coiled-coil mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32):21696–21706.
- Garcia-Alvarez, G., Lu, B., Yap, K. a. F., Wong, L. C., Thevathasan, J. V., Lim, L., Ji, F., Tan, K. W., Mancuso, J. J., Tang, W., Poon, S. Y., Augustine, G. J., and Fivaz, M. (2015). STIM2 regulates PKA-dependent phosphorylation and trafficking of AMPARs. *Molecular Biology of the Cell*, 26(6):1141–1159.

- Gemes, G., Bangaru, M. L. Y., Wu, H.-E., Tang, Q., Weihrauch, D., Koopmeiners, A. S., Cruikshank, J. M., Kwok, W.-M., and Hogan, Q. H. (2011). Store-operated Ca²⁺ entry in sensory neurons: functional role and the effect of painful nerve injury. *Journal of Neuroscience*, 31(10):3536–3549.
- Gilson, A. (2016). *Identification of new STIM splice variants and expression in the mouse brain during healthy ageing*. Bachelor thesis, Saarland University.
- Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-hagren, O., Colombo, S. F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E. O., Bagriantsev, S. N., and Borgese, N. (2013). ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins. *Cell*, 153(7):1494–1509.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Machesky, L. M., Baldassare, J. J., and Pollard, T. D. (1990). The Actin-Binding Protein Profilin Binds to PIP₂ and Inhibits Its Hydrolysis by Phospholipase C. *Science*, 247:1575–1578.
- Graham, S. J. L., Dziadek, M. a., and Johnstone, L. S. (2011). A cytosolic STIM2 preprotein created by signal peptide inefficiency activates ORAI1 in a store-independent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 286(18):16174–16185.
- Gross, S. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Freichel, M., Cavalié, A., and Flockerzi, V. (2007). Murine ORAI2 splice variants form functional Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27):19375–19384.
- Gruszczynska-Biegala, J., Pomorski, P., Wisniewska, M. B., and Kuznicki, J. (2011). Differential Roles for STIM1 and STIM2 in Store-Operated Calcium Entry in Rat Neurons. *PLOS one*, 6(4):1–10.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6):3440–3450.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., Hogan, P. G., and Rao, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22):16232–16243.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-hora, M., Hogan, P. G., Lamperti, E. D., Yamashita, M., Gelinis, C., Neems, D. S., Sasaki, Y., Feske, S., Prakriya, M., Rajewsky, K., and Rao, A. (2008). Hair Loss and Defective T- and B-Cell Function in Mice Lacking ORAI1. *Molecular and Cellular Biology*, 28(17):5209–5222.
- Haglund, F., Ma, R., Huss, M., Sulaiman, L., Lu, M., Nilsson, I.-I., Ho, A., Juhlin, C. C., Hartman, J., and Larsson, C. (2012). Evidence of a Functional Estrogen Receptor in Parathyroid Adenomas. *Endocrine Research*, 37(12):4631–4639.

- Hardy, J. and Gwinn-Hardy, K. (1998a). Genetic Classification of Primary Neurodegenerative Disease. *Neurodegeneration*, 282:1075–1079.
- Hardy, J. and Gwinn-Hardy, K. (1998b). Genetic Classification of Primary Neurodegenerative Disease. *Neurodegeneration*, 282:1075–1079.
- Hefter, D., Kaiser, M., Weyer, S. W., Papageorgiou, I. E., Both, X., Kann, O., Mu, U. C., and Draguhn, X. A. (2016). Amyloid Precursor Protein Protects Neuronal Network Function after Hypoxia via Control of Voltage-Gated Calcium Channels. *The Journal of Neuroscience*, 36(32):8356–8371.
- Hilgemann, D., Nicoll, D., and Philipson, K. (1991). Charge movement during Na⁺ translocation by native and cloned cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature*, 352:715–718.
- Holzmann, C., Kilch, T., Kappel, S., Armbrüster, A., Stöckle, M., Bogeski, I., Schwarz, E. C., and Peinelt, C. (2013). ICRAC controls the rapid androgen response in human primary prostate epithelial cells and is altered in prostate cancer. *Oncotarget*, 4(11):2096–2107.
- Hoth, M. (2016). CRAC channels , calcium , and cancer in light of the driver and passenger concept. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863:1408–1417.
- Hoth, M. and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355:353–356.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., and Long, S. B. (2012). Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai. *Science*, 338:1308–1313.
- Hu, J., Qin, K., Zhang, Y., Gong, J., Li, N., Lv, D., Xiang, R., and Tan, X. (2011). Down-regulation of transcription factor Oct4 induces an epithelial-to-mesenchymal transition via enhancement of Ca²⁺ influx in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411:786–791.
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.-h., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., Pradhan, K., Ghiban, E., Kramer, M., Parla, J., Demeter, R., Fulton, L. L., Fulton, R. S., Magrini, V. J., Ye, K., Darnell, J. C., Darnell, R. B., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Schatz, M. C., McCombie, W. R., and Wigler, M. (2012). De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron*, 74:285–299.
- Isope, P., Hildebrand, M. E., and Snutch, T. P. (2010). Contributions of T-Type Voltage-Gated Calcium Channels to Postsynaptic Calcium Signaling within Purkinje Neurons. *Cerebellum*, 11:651–665.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*, 377:355–358.

- Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., Tan, P., Liang, X., Zheng, X., Chen, L., Shi, X., Zhang, S. L., Zhong, L., Huang, Y., Dong, M.-Q., Walker, C. L., Hogan, P. G., Wang, Y., and Zhou, Y. (2015). Proteomic mapping of ER - PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx. *Nature Cell Biology*, 17(1339-1347).
- Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., and Mörk, S. J. (2003). Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *Journal of child neurology*, 18(12):851–866.
- Kawasaki, T., Lange, I., and Feske, S. (2009). A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385:1–11.
- Khachaturian, Z. (1989). The role of calcium regulation in brain aging: reexamination of a hypothesis. *Aging*, 1:17–34.
- Kim, D., Park, D., Choi, S., Lee, S., Sun, M., Kim, C., and Shin, H.-S. (2003). Thalamic Control of Visceral Nociception Mediated by T-Type Ca²⁺ Channels. *Science*, 302:117–119.
- Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M.-J., Kim, S.-S., Mcenery, M. W., and Shin, H.-S. (2001). Lack of the Burst Firing of Thalamocortical Relay Neurons and Resistance to Absence Seizures in Mice Lacking alpha1G T-Type Ca²⁺ Channels. *Neuron*, 31:35–45.
- Kim, J.-H., Lkhagvadorj, S., Lee, M.-R., Hwang, K.-H., Chul, H., Hung, J., Cha, S.-K., and Eom, M. (2014). Orai1 and STIM1 are critical for cell migration and proliferation of clear cell renal cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 448:76–82.
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Stotz, S. C., Manasian, Y., and Clapham, D. E. (2011). POST , partner of stromal interaction molecule 1 (STIM1), targets STIM1 to multiple transporters. *PNAS*, 108(48):19234–19239.
- Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K., and Ting, A. Y. (2015). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, 12(1):51–54.
- Lee, J.-h., Daud, A. N., Cribbs, L. L., Lacerda, A. E., Pereverzev, A., Klo, U., Schneider, T., and Perez-reyes, E. (1999). Cloning and Expression of a Novel Member of the Low Voltage- Activated T-Type Calcium Channel Family. *The Journal of Neuroscience*, 19(6):1912–1921.
- Lee, P. K., Yuan, J. P., Zeng, W., So, I., Worley, P. F., and Muallem, S. (2009). Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *PNAS*, 106(34):14687–14692.

- Li, W., Zhang, M., Xu, L., Lin, D., Cai, S., and Zou, F. (2013). The apoptosis of non-small cell lung cancer induced by cisplatin through modulation of STIM1. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65:1073–1081.
- Liou, J., Kim, M. L., Won, D. H., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺ store depletion triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology*, 15(13):1235–1241.
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., and Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are Store-Operated Ca²⁺ Channels with Distinct Functional Properties. *Current Biology*, 17(9):794–800.
- López, J. J., Jardín, I., Bobe, R., Pariente, J. A., Enouf, J., Salido, G. M., and Rosado, J. A. (2008). STIM1 regulates acidic Ca²⁺ store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets. *Biochemical Pharmacology*, 75(11):2157–2164.
- Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M., and Lewis, R. S. (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, 454:538–542.
- Malli, R., Naghdi, S., Romanin, C., and Graier, W. F. (2008). Cytosolic Ca²⁺ prevents the subplasmalemmal clustering of STIM1: an intrinsic mechanism to avoid Ca²⁺ overload. *Journal of Cell Science*, 121:3133–3139.
- Mangoni, M. E., Traboulsie, A., Leoni, A.-L., Couette, B., Marger, L., Quang, K. L., Kupfer, E., Cohen-solal, A., Shin, H.-S., Escande, D., Charpentier, F., and Lory, P. (2006). Bradycardia and Slowing of the Atrioventricular. *Circulation Research*, pages 1422–1430.
- Martell, J. D., Deerinck, T. J., Sancak, Y., Poulos, T. L., Mootha, V. K., Sosinsky, G. E., Ellisman, M. H., and Ting, A. Y. (2012). Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology*, 30(11):1143–1148.
- Martins, F., Schröder, R., Luiz, M., Júnior, F., Zanotto-Filho, A., Beatriz, C., Simões, A., Thereza, R., Delevati, G., and Pens, D. (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research*, 1337:85–94.
- McAndrew, D., Grice, D. M., Peters, A. A., Davis, F. M., Stewart, T., Rice, M., Smart, C. E., Brown, M. A., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., and Monteith, G. R. (2011). ORAI1-Mediated Calcium Influx in Lactation and in Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(3):448–461.
- Meldolesi, J. and Pozzan, T. (1987). Pathways of Ca²⁺ Influx at the Plasma Membrane: Voltage-, Receptor-, and Second Messenger-Operated Channels. *Experimental Cell Research*, 171:271–283.

- Miederer, A.-M. (2013). *Charakterisierung der Spleißvarianten von STIM2*. Master thesis, Saarland University.
- Miederer, A.-M., Alansary, D., Schwär, G., Lee, P.-H., Jung, M., Helms, V., and Niemeyer, B. A. (2015). A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nature Communications*, 6:1–12.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., and Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, 340:230–233.
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1 C terminus determine coupling to ORAI1 channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13):8421–8426.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer’s disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature genetics*, 1:345–347.
- Mullins, F. M., Young, C., Dolmetsch, R. E., and Lewis, R. S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *PNAS*, 106(36):15495–15500.
- Navarro-Borelly, L., Somasundaram, A., Yamashita, M., Ren, D., Miller, R. J., and Prakriya, M. (2008). STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy. *The Journal of physiology*, 586:5383–5401.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., and Rao, A. (2009). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*, 9(4):432–443.
- O’Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., Turner, E. H., Stanaway, I. B., Vernot, B., Malig, M., Baker, C., Reilly, B., Akey, J. M., Borenstein, E., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., Bernier, R., Shendure, J., and Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485:246–250.
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., and Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell*, 149(2):425–438.
- Palty, R., Silverman, W. F., Hersh, M., Caporale, T., Sensi, S. L., and Parnis, J. (2009). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *PNAS*, 107(1):436–441.

- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E., and Lewis, R. S. (2009). STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell*, 136(5):876–890.
- Park, C. Y., Shcheglovitov, A., and Dolmetsch, R. (2010). The CRAC Channel Activator STIM1 Binds and Inhibits L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Science*, 330(8):101–105.
- Parvez, S., Beck, A., Peinelt, C., Soboloff, J., Lis, A., Monteilh-Zoller, M., Gill, D. L., Fleig, A., and Penner, R. (2008). STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *FASEB J.*, 22(3):752–761.
- Peacock, M. (2010). Calcium Metabolism in Health and Disease. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, 5:23–30.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 83:117–161.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., and Daud, A. (1998). Molecular characterization of a neuronal low voltage activated T-type calcium channel. *Nature*, 391(896-900).
- Perocchi, F., Gohil, V. M., Girgis, H. S., Bao, X. R., McCombs, J. E., Palmer, A. E., and Mootha, V. K. (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake. *Nature*, 467:291–296.
- Pinggera, A., Lieb, A., Benedetti, B., Lampert, M., Monteleone, S., Liedl, K. R., Tuluc, P., and Striessnig, J. (2015). Archival Report CACNA1D De Novo Mutations in Autism Spectrum Disorders Activate Cav1.3 L-Type Calcium Channels. *Biological Psychiatry*, 77:816–822.
- Popugaeva, E., Pchitskaya, E., Speshilova, A., Alexandrov, S., Zhang, H., Vlasova, O., and Bezprozvanny, I. (2015). STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. *Molecular Neurodegeneration*, 10.
- Prakriya, M. (2013). *Store-Operated Calcium Channels*, volume 71. Elsevier Inc., 1 edition.
- Prakriya, M. and Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 95(4):1383–1436.
- Putney, J. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7:1–12.
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., and Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(12):1035–1049.

- Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A. M., Malmersjö, S., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E., and Lewis, R. S. (2015). Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *Journal of Cell Biology*, pages 1–23.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., Stefani, D. D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., Zecchini, E., and Pinton, P. (2009). Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787:1342–1351.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velichebi, G., and Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *Journal of Cell Biology*, 169(3):435–445.
- Ross, R. A., Biedler, J. L., and Spengler, B. A. (2003). A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Letters*, 197(1-2):35–39.
- Ruano, Y., Mollejo, M., Ribalta, T., Fiaño, C., Camacho, F. I., Gómez, E., Lope, A. R. D., Hernández-moneo, L., Martínez, P., and Meléndez, B. (2006). Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Molecular Cancer*, 5:1–12.
- Saitoh, N., Oritani, K., Saito, K., Yokota, T., Ichii, M., Sudo, T., Fujita, N., Nakajima, K., Okada, M., and Kanakura, Y. (2011). Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(1):147–156.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401:708–712.
- Saul, S., Stanisz, H., Backes, C. S., Schwarz, E. C., and Hoth, M. (2014). How ORAI and TRP channels interfere with each other: Interaction models and examples from the immune system and the skin. *European Journal of Pharmacology*, 739:49–59.
- Scragg, J. L., Fearon, I. M., Boyle, J. P., Ball, S. G., Varadi, G., and Peers, C. (2004). Alzheimer’s amyloid peptides mediate hypoxic up-regulation of L-type Ca²⁺ channels. *FASEB*.
- Simms, B. A. and Zamponi, G. W. (2014). Review Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction. *NEURON*, 82:24–45.
- Soong, T. W., Stea, A., Hodson, C. D., Dubel, S. J., Vincent, S. R., and Snutch, T. P. (1993). Structure and Functional Expression of a Member of the Low Voltage-Activated Calcium Channel Family. *Science*, 260:1133–1136.

- Sousa, S. R., Vetter, I., Ragnarsson, L., and Lewis, R. J. (2013). Expression and Pharmacology of Endogenous Cav Channels in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Physiological Reviews*, 8(3).
- Srikanth, S., Jew, M., Kim, K.-d., Yee, M.-k., Abramson, J., and Gwack, Y. (2012). Junctate is a Ca²⁺-sensing structural component of Orai1 and stromal interaction molecule 1 (STIM1). *PNAS*, 109(22):8682–8687.
- Srikanth, S., Jung, H.-J., Kim, K.-D., Souda, P., Whitelegge, J., and Gwack, Y. (2010). A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nature cell biology*, 12(5):436–46.
- Stanisz, H., Saul, S., Müller, C. S. L., Kappl, R., Niemeyer, B. A., Vogt, T., Hoth, M., Roesch, A., and Bogeski, I. (2014). Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry. *Pigment Cell Melanoma*, 27:442–453.
- Stathopoulos, P. B., Li, G. Y., Plevin, M. J., Ames, J. B., and Ikura, M. (2006). Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47):35855–35862.
- Stathopoulos, P. B., Zheng, L., and Ikura, M. (2009). Stromal Interaction Molecule (STIM) 1 and STIM2 Calcium Sensing Regions Exhibit Distinct Unfolding and Oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2):728–732.
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca²⁺ from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306:67–69.
- Strooper, B. D., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., and Kopan, R. (1999). A presenilin-1 dependent gamma-secretase like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398:518–522.
- Struhl, G. and Adachi, A. (1998). Nuclear Access and Action of Notch In Vivo. *Cell*, 93:649–660.
- Struhl, G. and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature*, 398:522–525.
- Sun, S., Zhang, H., Liu, J., Popugaeva, E., Xu, N. J., Feske, S., White, C. L., and Bezprozvanny, I. (2014). Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. *Neuron*, 82(1):79–93.

- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-Jk/Su(H). *Current Biology*, 5:1416–1423.
- Thastrup, O., Dawson, P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P., Drobak, B., Bjerrum, P., Christensen, S., and Hanley, M. (1989). Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*, 27:187–193.
- Thibault, O., Gant, J. C., and Landfield, P. W. (2007). Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer’s disease: minding the store. *Aging Cell*, 16:307–317.
- Tong, B. C.-K., Lee, C. S.-K., Cheng, W.-H., Lai, K.-O., Kevin Foscett, J., and Cheung, K.-H. (2016). Familial Alzheimer’s disease-associated presenilin 1 mutants promote γ -secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca^{2+} entry. *Science Signaling*, 9(444).
- Toselli, M., Masetto, S., Rossi, P., and Taglietti, V. (1991). Characterization of a Voltage-dependent Calcium Current in the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y During Differentiation. *European Journal of Neuroscience*, 3:514–522.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.-F., Yi-Hao, H., Serneels, L., Strooper, B. D., Yu, G., and Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins Form ER Ca^{2+} Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer’s Disease-Linked Mutations. *Cell*, 126(5):981–993.
- Umemura, M., Baljinnayam, E., Feske, S., Lorenzo, M. S. D., Xie, L.-h., Feng, X., Oda, K., Makino, A., Fujita, T., Yokoyama, U., Iwatsubo, M., Chen, S., Goydos, J. S., Ishikawa, Y., and Iwatsubo, K. (2014). Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE) Regulates Melanoma Proliferation and Cell Migration. *PLOS one*, 9:1–11.
- van Rheenen, J., Langeslag, M., and Jalink, K. (2004). Correcting Confocal Acquisition to Optimize Imaging of Fluorescence Resonance Energy Transfer by Sensitized Emission. *biophysical Journal*, 86:2517–2529.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.-P. (2006). CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca^{2+} Entry. *Science*, 312:1220–1223.
- Walsh, C. M., Chvanov, M., Haynes, L. P., Petersen, O. H., Tepikin, A. V., and Burgoyne, R. D. (2010). Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry. *Biochemical Journal*, 168:159–168.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Soboloff, J., Tang, X. D., and Gill, D. L. (2010). The Calcium Store Sensor, STIM1, Reciprocally Controls Orai and Cav1.2 Channels. *Science*, 330:105–109.

- Webster, N. J., Ramsden, M., Boyle, J. P., Pearson, H. A., and Peers, C. (2006). Amyloid peptides mediate hypoxic increase of L-type Ca²⁺ channels in central neurones. *Neurobiology of Aging*, 27:439–445.
- Williams, M. E., Brust, P. F., Feldman, D. H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., Mccue, A. F., Velicelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (1992a). Structure and Functional Expression of an ω-Conotoxin-Sensitive Human N-Type Calcium Channel. *Science*, 257:389–395.
- Williams, M. E., Feldman, D. H., Mccue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, C., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (1992b). Structure and Functional Expression of α₁, α₂, and β Subunits of a Novel Human Neuronal Calcium- Channel Subtype. *Neuron*, 8:71–84.
- Wu, M. M., Covington, E. D., Lewis, R. S., and Lippincott-schwartz, J. (2014). Single-molecule analysis of diffusion and trapping of STIM1 and Orai1 at endoplasmic reticulum - plasma membrane junctions. *Molecular Biology of the Cell*, 25:3672–3685.
- Xie, H.-R., Hu, L.-S., and Li, G.-Y. (2010). Transplantation of retinoic acid treated murine embryonic stem cells & behavioural deficit in Parkinsonian rats. *Chin Med J*, 123(8):1086–1092.
- Xu, Y., Zhang, S., Niu, H., Ye, Y., Hu, F., Chen, S., and Li, X. (2015). STIM1 accelerates cell senescence in a remodeled microenvironment but enhances the epithelial- to-mesenchymal transition in prostate cancer. *Scientific Reports*, 5:1–17.
- Yang, L., Wang, Z., Wang, B., Justice, N. J., and Zheng, H. (2009a). Amyloid Precursor Protein Regulates Cav1.2 L-type Calcium Channel Levels and Function to Influence GABAergic Short-Term Plasticity. *Neuroscience*, 29(50):15660 –15668.
- Yang, S., Zhang, J. J., and Huang, X.-y. (2009b). Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis. *Cancer Cell*, 15:124–134.
- Yang, X., Jin, H., Cai, X., Li, S., and Shen, Y. (2012). Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15):5657–5662.
- Ye, Y., Lukinova, N., and Fortini, M. E. (1999). Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in Drosophila Presenilin mutants. *Nature*, 398:525–529.
- Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y.-j., Paul, F., and Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate the Orai channels. *Nature cell biology*, 11(3):337–343.
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacological Reviews*, 7:821–870.

- Zhan, Z.-y., Zhong, L.-x., Feng, M., Wang, J.-f., Liu, D.-b., and Xiong, J.-p. (2015). Over-expression of Orai1 mediates cell proliferation and associates with poor prognosis in human non-small cell lung carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(5):5080–5088.
- Zhang, H., Wu, L., Pchitskaya, E., Zakharova, X. O., Saito, T., and Saido, T. (2015a). Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *The Journal of Neuroscience*, 35(39):13275–13286.
- Zhang, L., Wang, L. I. N., Jiang, J., Zheng, D., Liu, S., and Liu, C. (2015b). Lipopolysaccharides upregulate calcium concentration in mouse uterine smooth muscle cells through the T-type calcium channels. *International Journal of Molecular Medicine*, 35:784–790.
- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *PNAS*, 103(24):9357–9362.
- Zhang, Z., Liu, X., Feng, B., Liu, N., Wu, Q., Han, Y., Nie, Y., Wu, K., Shi, Y., and Fan, D. (2015c). STIM1, a direct target of microRNA-185, promotes tumor metastasis and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Oncogene*, 34:4808–4820.
- Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Li, G.-Y., Romanin, C., and Ikura, M. (2011). Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *PNAS*, 108(4):1337–42.
- Zhou, Y., Caia, X., Nwokonkoa, R. M., LoktionovaWang, N. A., Wang, Y., and Gill, D. L. (2016). The STIM-Orai coupling interface and gating of the Orai1 channel. *Cell Calcium*, (2016):1–6.
- Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H. T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P. G. (2010). STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nature structural & molecular biology*, 17(1):112–116.
- Zui, P. A. N. and Jianjie, M. A. (2015). Open Sesame: treasure in store-operated calcium entry pathway. *Science China Life Science*, 58:48–53.
- Zweifach, A. and Lewis, R. (1993). Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13):6295–6299.

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht über Pumpen, Transporter und Kanäle, die an der Kalziumhomöostase beteiligt sind	12
2	Molekulare Umgestaltung während des speichergesteuerte Kalziumeinstroms in Lymphozyten	15
3	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von STIM1 und STIM2 unter Angabe der Exonstruktur der Spleißvarianten beider Isoformen	19
4	Schematische Darstellung der APP Prozessierung im amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Weg	23
5	Evolutionärer Baum der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle	25
6	Darstellung zur Durchführung von SILAC und zur Vorbereitung der Proben für eine massenspektrometrische Analyse	57
7	Darstellung der Lösungswechsel bei der Analyse von SOCE bzw. Ca _v -Kanälen	62
8	Nachweis einer neuen STIM2 Spleißvariante, STIM2.1, mittels PCR und qRT-PCR	68
9	STIM2.1 ist nicht in der Lage Orai1 im Überexpressionssystem zu aktivieren	70
10	STIM2.1 ist nicht in der Lage Orai2 im Überexpressionssystem zu aktivieren	71
11	Herunterregulation von STIM2.1 in unstimulierten CD4 ⁺ T Zellen vergrößert SOCE	72
12	Herunterregulation von STIM2.2 in unstimulierten CD4 ⁺ verringert basales Kalzium und SOCE	73
13	Überexpression von STIM2.1 in Jurkat T Zellen verringert endogenen SOCE	74
14	STIM2.1 wirkt dominant negativ auf den STIM2 vermittelten SOCE	75
15	STIM2.1 wirkt dominant negativ auf den STIM1 vermittelten SOCE	76
16	Vektorkarte des neu klonierten STIM2.2-GFP unter Anzeige der entfernten Basenpaare	77
17	Lokalisierung der Fluoreszenzmarkierung beeinflusst die Funktionalität von STIM2.2 nicht	77
18	STIM2.1 zeigt bei vergleichbarer Kollokalisierung eine beeinträchtigte Interaktion mit Orai1 im Vergleich zu STIM2.2-Orai1	79
19	Spleißvarianten liegen in gemischten Clustern vor	80

20	Mutation des putativen Calmodulin-Bindemotivs von STIM2.1 hat keinen Einfluss auf SOCE	81
21	Spleißvarianten zeigen ihren jeweiligen Phänotyp trotz Insertion von APEX2	83
22	APEX2 vermittelte Biotinylierung findet in unmittelbarer Umgebung zu STIM2 statt	84
23	Nachweis der Biotinylierung in Anwesenheit von Biotin-Phenol und H ₂ O ₂ durch Streptavidin-HRP	85
24	Aufnahme des Kontroll-Westernblots und SDS-Gels vor Massenspektrometrie	86
25	Darstellung der relevanten Schnittmengen aller Replikate	87
26	Erfolgreiche Ko-Immunopräzipitation von STIM2 und Profilin 1	89
27	Alzheimer Modellzelllinien unterscheiden sich in ihrem SOCE	92
28	STIM2 Proteinmenge und relative mRNA Menge der SOCE-Komponenten sind kaum beeinflusst von APP und PS1	93
29	Retinsäure induzierte Differenzierung von SH-SY5Y verstärkt den Kalziumeinfluss nach Depolarisation und führt zu einem kleineren SOCE	94
30	Alzheimer Modellzelllinien unterscheiden sich in ihrem spannungsgesteuertem Kalziumeinstrom	95
31	Alzheimer-assoziierte Gene beeinflussen die relative mRNA Menge von Ca _v -Kanälen	97
32	Eine schwache Depolarisation bewirkt keinen Ca ²⁺ -Einstrom	97
33	Eine Überexpression von APP in APP ^{-/-} Zellen revidiert nicht den Ca ²⁺ -Phänotyp	98

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Primärantikörper	29
2	Verwendete Sekundärantikörper	29
3	Bakterienstamm	30
4	Chemikalien und Reagenzien	30
4	Chemikalien und Reagenzien	31
5	Größenstandards	31
6	Laborgeräte	31
6	Laborgeräte	32
7	Verwendete modifizierende Enzyme	36
8	Verwendete Restriktionsenzyme	36
9	Klonierungsprimer	36
10	Verwendete qRT-PCR Primer	37
11	Verwendete siRNA unter Angabe von Hersteller und Bestellnummer	37
12	Verwendete Kits	37
13	Verwendete Zielvektoren für Klonierungen	38
14	Verwendete Konstrukte	38
15	Arbeitsmaterialien	39
16	Verwendete Medien	39
17	Transfektionsreagenzien	39
18	Zellkulturzusätze	40
19	Pipettierschema für präparative PCR-Reaktionen	42
20	Temperatur-Zyklus-Konditionen für präparative PCR-Reaktionen	42
21	Pipettierschema für Kolonie-PCR	43
22	Temperatur-Zyklus-Konditionen für Kolonie-PCR	43
23	Pipettierschema für Restriktionsverdau	44
24	Pipettierschema für Dephosphorylierungen mit alkalischer Phosphatase	44
25	Pipettierschema für Ligationen	45
26	Klonierte Konstrukte	47
27	Übersicht über die in D-MEM kultivierten Zellen	48
28	Temperatur-Zyklus-Konditionen für qRT-PCR-Reaktionen	50
29	Bedingungen Elektroporation	51

30	Transfektion via Lipofektion	51
31	Pipettierschema für 8 % (10 %) Trenngele	54
32	Pipettierschema für Sammelgele	54
33	Übersicht über Behandlung der Zellen für Massspektroskopie	57
34	Silber-Blau Coomassie Färbung	58
35	Übersicht über die gefundenen biotinylierten Proteine nach massenspektrometrischer Analyse	88

Abkürzungsverzeichnis

Abk.	englisch	deutsch
1-3		
aa/AS	amino acids	Aminosäuren
AD	Alzheimer's disease	Alzheimer Krankheit
AF	Alexa Fluor	Alexa Fluor
AICD	APP intracellular domain	APP intrazelluläre Domäne
APEX	engineered ascorbate peroxidase	gentechnisch veränderte Ascorbat-Peroxidase
APP	amyloid precursor protein	Amyloid Vorläuferprotein
APS	ammonium persulfate	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchonin acid	Bicinchoninsäure
bp	base pair	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin	Bovines Serum-Albumin
CAD	CRAC activation domain	CRAC-Aktivierungsdomäne
CAM	Calmodulin	Calmodulin
Ca _v	voltage gated calcium channel	spannungsgesteuerter Ca ²⁺ Kanal
CC	coiled-coil	
CFP	cyan fluorescent protein	cyan fluoreszierendes Protein
CRAC	calcium release activated calcium	durch Ca ²⁺ Freisetzung aktivierter Ca ²⁺ Einstrom
DC	dendritic cell	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DTT	dithiothreitol	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemi luminescence	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum	Fetales Kälber-Serum
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster-Resonanzenergietransfer

Abk.	englisch	deutsch
1-3		
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
InsP3/IP ₃	inositol-1,4,5-trisphosphate	Inositol-1,4,5-trisphosphat
HRP	horseradish peroxidase	Meerrettichperoxidase
kDa	kilodalton	Kilodalton
LV	empty vector	Leervektor
MEM	minimum essential media	minimal essentielles Medium
NEAA	Non essential amino acids	nicht essentielle Aminosäuren
NFAT	nuclear factor of activated T cells	nukleärer Faktor aktivierter T Zellen
NF-κB	nuclear factor-κB	nukleärer Faktor κB
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	periphere Mononukleäre-Blutzellen
PBS	phosphate-buffered saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction	Polymerasekettenreaktion
PS1	Presenilin 1	Präsenilin 1
PVDF	polyvinylidene fluoride	Polyvinylidenfluorid
RA	retinoic acid	Retinsäure
RFP	red fluorescent protein	rot fluoreszierendes Protein
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer	Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer
RISC	RNA induced silencing complex	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium	
RT	room temperature	Raumtemperatur
SAM	sterile alpha motif	steriles Alpha-Motiv
SCID	severe combined immunodeficiency	schwere kombinierte Immunschwäche
SDS	sodium dodecyl sulfate	Natriumlaurylsulfat
SERCA	sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase	Sarkoplasmatische/ endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SILAC	stable isotope labeling with aa in cell culture	Stabile Isotopenmarkierung mit Hilfe von AS in Zellkultur
SOCE	store operated calcium entry	speichergesteuerter Kalzium-Einstrom
SP	signal peptide	Signalpeptid
SR	sarcoplasmic reticulum	sarkoplasmatisches Retikulum
STIM	stromal interaction molecule	stromaständiges Interaktionsmolekül
TBP	TATA-binding protein	TATA bindendes Protein

Abk.	englisch	deutsch
1-3		
TBS	Tris-buffered saline	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-buffered saline with Tween20	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TCR	t cell receptor	T-Zell-Rezeptor
TEMED	tetramethylethylenediamine	Tetramethylethylenediamin
TM	transmembrane domain	Transmembrandomäne
TRP	transient receptor potential cation channel	Transientes-Rezeptor-Potential-Kationen-Kanal
UdS	Saarland University	Universität des Saarlandes
UTR	untranslated region	Untranslatierte Region
VOCE	voltage operated calcium entry	spannungsgesteuerter Kalziumeinstrom
YFP	yellow fluorescent protein	gelb fluoreszierendes Protein

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Teile der Abbildungen oder die Abbildung in modifizierter Form (8 - 15, sowie 18 - 20) wurden 2015 in *Nature communications* veröffentlicht: Miederer et al. [2015]

Die Immunocytochemie und Westernblots, dargestellt in den Abschnitten 4.2.2 und 4.2.3 wurden an der Universität von Alberta (Kanada) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Larry Fliegel durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch die massenspektrometrische Einrichtung der Universität von Alberta und wurde von Jack Moore durchgeführt.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

- Die Etablierung der stabilen SH-SY5Y Crispr Ctrl, APP^{-/-} und PS1^{-/-} Zelllinien erfolgte durch Christoph Stahlmann, AG Hartmann
- Die Etablierung der stabilen T-REx293 YFP-STIM2.1 und YFP-STIM2.1 erfolgte unter Mithilfe von Nadine Schönwies
- Alle qRT-PCRs wurden von Gertrud Schwär, Heike Grimm und Olga Streidenberger durchgeführt
- Die Auswertung der qRT-PCRs in Abbildung 8 erfolgte durch Barbara A. Niemeyer
- Die Isolierung von naiven Lymphozyten erfolgte durch Carmen Hässig
- Die regelmäßig Passage aller beschriebenen Zelllinien wurde von Gertrud Schwär, Cora Hoxha, Nadine Schönwies und Sandra Janku übernommen
- Alle verwendeten Imaging-Lösungen wurden von Gertrud Schwär und Petra Fries vorbereitet

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs-

bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Promovierenden

.....
Unterschrift der die Versicherung an Eides statt
aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden
Beamten

Danksagung

Mein erster Dank geht an Barbara Niemeyer. Danke für deine Unterstützung und Freiheit zur beruflichen, sowie persönlichen Weiterentwicklung. Danke für die Möglichkeit mein Projekt bei dir durchzuführen und dabei von deiner Begeisterung für Forschung und deinem unglaublichen Wissen immer wieder neu inspiriert zu werden. Ich denke es wird hart für jegliche meiner zukünftigen Chefs da mitzuhalten!

Ein Dankeschön an Markus Hoth, ohne den ich ich weder in diese Arbeitsgruppe gekommen wäre und dessen Art eine Arbeitsgruppe zu leiten ein Grund dafür war hier zu bleiben. Danke für diese Möglichkeit!

Ich bin unglaublich dankbar für all die prägenden Erfahrungen, Seminare und Workshops, an denen ich dank des IRTG1830 teilhaben durfte. Danke an Gabriele Amoroso, die das IRTG zusammenhält und zu dem macht was es ist. Einen besseren Rahmen hätte ich mir für meine Promotion nicht basteln können!

Damit einhergehend möchte ich Larry Fliegel danken. Danke für die Bereitschaft mich mit einem unbekanntem Thema und unbekanntem Methoden ins Labor aufzunehmen und hierbei bestmöglich zu unterstützen.

Danke an Dalia Alansary für das gern geteilte unglaubliche Wissen bezüglich Tipps und Tricks im Labor.

Ein besonderer Dank geht an Carmen, Cora, Gertud, Nadine und Sandra. Danke für all die bereitstehenden Zellen, Lösungen und helfenden Hände.

Meiner ersten Betreuerin, meinem Yoda und der Blotmeisterin Kathrin Dörr gilt mein herzlicher Dank. Dein Einsatz und deine Geduld vor so vielen Jahren haben mir die Angst und Zweifel vor den unbekanntem Dimensionen der Laborräume genommen und deine Freundschaft hat mir den Weg in die Arbeitsgruppe geebnet.

Für die jahrelange Unterstützung, den vielen Spaß, die geteilten Tränen und Träume und manchmal auch wissenschaftlichen Diskussionen möchte ich Sarah, Steffi, Kaddy, Kim, Sabrina und Hélène danken. Ihr habt bewirkt, dass ich auch während wissenschaftlichen Durststrecken gerne auf die Arbeit gekommen bin.

Ein großes Dankeschön geht an meine einzigartige Familie. Hierbei besonders an meine Großeltern, die mich bereits für den Menschen halten, der ich eines Tages gerne sein möchte.

Mein letzter und herzlichster Dank gilt meinem Teampartner. Ich kann mir keinen großartigeren, verlässlicheren und besseren Menschen an meiner Seite vorstellen. Gemeinsam bewältigen wir jedes Abenteuer.