

**Funktionelle Analyse der
Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase 2 -PMCA2-
in Modellen der Neurodegeneration**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Alexander Brendel

geboren am 04.12.1975 in Frankfurt a.M.

Mainz, den 18.01.2013

Dekan: x

1.Berichterstatter: x

2.Berichterstatter: x

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

1	EINLEITUNG	7
1.1	Physiologie der Ca ²⁺ -vermittelten Signalgebung	8
1.1.1	Mechanismen des Ca ²⁺ -Ein- und Ausstroms	8
1.1.1.1	Expressionsmuster, Isoformen, Struktur und Funktion der Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase PMCA	10
1.1.2	Ca ²⁺ -bindende Proteine: Intrazelluläre Ca ²⁺ -Effektoren	12
1.2	Die neuronale Ca ²⁺ -Homöostase	13
1.2.1	Die Bedeutung der neuronalen Ca ²⁺ -Homöostase im Alterungsprozess	13
1.2.2	Die Rolle von Ca ²⁺ bei neurodegenerativen Erkrankungen	14
1.3	Das MPP ⁺ -basierte Modell der Parkinson-Erkrankung	17
1.3.1	Komplex I-Inhibition, Ca ²⁺ und die Parkinson-Erkrankung	18
1.4	Bildgebende Fluoreszenz-gestützte Verfahren für die Ca ²⁺ -Messung	19
1.5	Zielsetzung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Modelle	22
2.2	Material	22
2.2.1	Chemikalien, Kits	22
2.3	Methoden	22
2.3.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.3.1.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien mittels Hitzeschock	22
2.3.1.2	Plasmidpräparationen	23
2.3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
2.3.1.4	Quantitative Echtzeit RT-PCR-Analyse (qPCR)	23
2.3.1.5	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	25
2.3.1.6	Präparative Gelelektrophorese	25
2.3.1.7	A-Tailing und TOPO-TA-Ligation	25
2.3.1.8	Restriktionsverdau	26
2.3.1.9	Klonierung eines PMCA2-Expressionsplasmids pPMCA2.EGFP-N1	26
2.3.2	Zellkulturtechniken	27
2.3.2.1	Bestimmung der Zellzahl	28
2.3.2.2	Kultivierung, Subkultivierung und Kryokonservierung klonaler Zellen	28

2.3.2.3	Assay zur Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials in Korrelation mit dem mitochondrialen Ca ²⁺ -Spiegel	29
2.3.2.4	Präparation und Kultivierung neuronaler Primärzellen	29
2.3.2.5	Überlebensanalysen durch Bestimmung der Zellvitalität mit „Cell Titer Blue“	30
2.3.2.6	Transiente Transfektionen	30
2.3.3	Ca ²⁺ -Messungen, Live Cell Imaging und Fluoreszenzmikroskopie	32
2.3.4	Proteinbiochemische Methoden	32
2.3.4.1	Proteinpräparation und -quantifizierung	32
2.3.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western Blot Analyse und immunochemische Detektion	33
2.3.4.3	Immunozytochemie	36
2.3.5	Statistische Auswertung	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Veränderungen der neuronalen Ca ²⁺ -Homöostase in MPP ⁺ -Modellen der Parkinson- Erkrankung	37
3.1.1	MPP ⁺ verändert die basalen Ca ²⁺ -Konzentration im Zytosol und den Mitochondrien <i>in vitro</i>	37
3.1.2	Der zelluläre Ca ²⁺ -Efflux ist durch MPP ⁺ beeinträchtigt	40
3.1.3	MPP ⁺ induziert die Abnahme der Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase 2 (PMCA2) auf Proteinebene	41
3.1.4	MPP ⁺ inhibiert die Transkription von PMCA2-mRNA	44
3.2	Physiologische und pathophysiologische Regulation der PMCA2-Expression	45
3.2.1	MPP ⁺ reduziert Phospho-CREB-Level	45
3.2.2	Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 nach MPP ⁺ -Behandlung	47
3.2.3	siRNA-vermittelte Abregulation von CREB reduziert PMCA2	49
3.2.4	siRNA-vermittelte Reduktion von ERK1/2 hat keinen Effekt auf die PMCA2-Expression	49
3.2.5	Die „loss-of-function“-Mutante CREB M1 und siCREB-RNA führen zu einer Abnahme der PMCA2-Expression in Primärneuronen	50
3.2.6	Inhibition der CaMKII/IV hat keinen Effekt auf die PMCA2-Expression	53
3.2.7	Inhibition der Proteinkinase A (PKA) resultiert in einer Abregulation von PMCA2 und einer Erhöhung der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration	54
3.2.8	PKA-Aktivierung verhindert sowohl die MPP ⁺ -induzierte PMCA2-Reduktion als auch die Erhöhung der basalen [Ca ²⁺] _i	55
3.3	Auswirkung der Inhibition der ATP-Synthese auf die PMCA2-Expression und die Ca ²⁺ - Homöostase	58
3.3.1	Rotenon, Oligomycin und 2-desoxy-Glucose verringern die PMCA2-Expression und erhöhen die basale zytosolische Ca ²⁺ -Konzentration	58

3.4	Die Bedeutung von PMCA2 für das neuronale Überleben	62
3.4.1	siRNA-vermittelte PMCA2-Herunterregulation erhöht die Vulnerabilität von Neuronen des Mesencephalons	62
3.4.2	Transiente Überexpression von PMCA2 und das neuronale Überleben im MPP ⁺ -Modell	65
3.5	Altersabhängige Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	66
3.5.1	Gealterte IMR-90-Fibroblasten weisen Veränderungen des Ca ²⁺ -Efflux-Systems und erhöhte basale Ca ²⁺ -Level auf	66
3.5.2	Die PMCA2 Expression ist im Mittelhirn von gealterten Mäusen reduziert	69
4	DISKUSSION	70
4.1	Veränderungen der Ca ²⁺ -Homöostase bei neurodegenerativen Prozessen	70
4.1.1	Der Einfluss von MPP ⁺ auf die Ca ²⁺ -Homöostase	71
4.1.2	Regulation der PMCA2-Expression	74
4.1.3	Mögliche Ursachen der MPP ⁺ -induzierten PMCA2-Reduktion	77
4.1.4	Relevanz der PMCA2-Expression für das neuronale Überleben	79
4.2	Altersabhängige Veränderungen der Ca ²⁺ -Homöostase	81
4.3	Perspektiven	82
5	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	85
6	LITERATUR	89
7	ANHANG	100
7.1	Publikationen	100
7.2	Kongresse	100
7.3	Vektorkarte	101
7.4	Abkürzungen	106
7.5	Curriculum Vitae	108
7.6	Eidesstattliche Erklärung	109

1 Einleitung

Bei der zellulären Signalweiterleitung vermittelt durch Calcium (Ca^{2+}) handelt es sich um einen grundlegenden, evolutionär ursprünglichen und ubiquitären Mechanismus, der eine Vielzahl alltäglicher Funktionen der Zelle reguliert. So können u.a. die Muskelkontraktion, die neuronale Kommunikation, die Proliferation oder auch die Apoptose Ca^{2+} -abhängig gesteuert werden (zur Übersicht Carafoli und Brini, 2001). Der reguläre zytosolische Ca^{2+} -Gehalt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ liegt zwischen 50 und 150 nM und kann bei einem Ca^{2+} -Einstrom (Influx) kurzfristig bis auf 5 μM ansteigen, was die Aktivierung verschiedenster Ca^{2+} -abhängiger Effektoren, wie Enzyme, Transkriptionsfaktoren u.a. zur Folge haben kann. Die Einhaltung eines Ca^{2+} -Homöostase muss daher streng kontrolliert werden (s. 1.1), was durch spezielle Ca^{2+} -Pumpen, -Kanäle, Ca^{2+} -bindende Proteine und durch Ca^{2+} selbst erfolgt. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften neigt Ca^{2+} zur Komplexbildung mit niedermolekularen Anionen und löst sich dadurch z.B. schlechter als Magnesium in wässrigem Milieu, womit Ca^{2+} selbst zur Erhaltung der Homöostase beiträgt. Ob und welche Störungen des Ca^{2+} -Gleichgewichts in pathologischen, neurodegenerativen Prozessen, wie sie z.B. der Parkinson-Krankheit (PD, engl.: Parkinson's Disease) ablaufen, ist von großer Bedeutung für die Aufklärung von Krankheitsursachen und letztendlich bei der Verbesserung von Prävention und Therapiekonzepten. Interessant ist im Weiteren v.a. die Beantwortung der Frage, welche altersabhängigen Veränderungen bei der Ca^{2+} -Homöostase auftreten und, ob diese bei der Entstehung von altersabhängigen neurodegenerativen Krankheiten eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Dissertation wurden diese Fragestellungen unter Anwendung einer neuen, auf dem grün fluoreszierenden Protein (GFP, engl.: green fluorescent protein) basierenden Generation von optischen Ca^{2+} -Indikatoren, „Cameleon“, untersucht. Um Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase bei altersassoziierten neurodegenerativen Prozessen zu analysieren, wurden primäre Mittelhirnzellen und SH-SY5Y-Neuroblastomazellen mit dem am Tiermodell eine Parkinson-Symptomatik auslösenden experimentellen Neurotoxin, dem Methyl-Phenyl-Pyridin (MPP^+), behandelt. Weiterhin wurden gealterte primäre Fibroblasten, sowie Mittelhirne gealterter Mäuse für die Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase während der normalen Alterung herangezogen.

1.1 Physiologie der Ca^{2+} -vermittelten Signalgebung

Ca^{2+} dient der Zelle, Signale von außen in das Innere weiterzuleiten und innerhalb der Zelle und ihrer Kompartimente molekulare Prozesse zu steuern (Berridge et al., 2000; Berridge, 2005). Der Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol erfolgt aus dem Extrazellulärraum oder aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), angetrieben durch einen starken elektrochemischen Gradienten. Die Ströme werden über Pumpen und Kanäle (s. 1.1.1) gesteuert und können sich in Form von Wellen mit variabler Amplitude, Frequenz oder Stärke über die ganze Zelle ausbreiten oder als lokales Ereignis auftreten. Diese sogenannten Ca^{2+} -Mikrodomänen (Rizzuto et al., 1992, 1993; Cheng et al., 1993; Bootman et al., 1997), sind entweder an der Zellmembran in der Nähe von Ca^{2+} -Influx-Kanälen, am ER oder Mitochondrium in der Nähe dort lokalisierter Ca^{2+} -Kanäle zu finden. Neben Ca^{2+} -bindenden Proteinen, die als Effektoren dienen (s. 1.1.2), sind das ER und das Mitochondrium als Ca^{2+} -Puffer und Reservoir wesentliche Faktoren für die Ca^{2+} -Homöostase (Laude und Simpson, 2009). So wird diskutiert, dass das Mitochondrium über die transiente Ca^{2+} -Aufnahme Signale möglicherweise dekodiert bzw. integriert und damit einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase ausübt (Robb-Gaspers et al., 1998). Außerdem besitzen Mitochondrien kurzfristig eine sehr hohe Ca^{2+} -Kapazität, da Ca^{2+} in den Mitochondrien in Form von Hydroxyapatit präzipitieren kann. Im Zytosol hat Ca^{2+} nur sehr begrenzte Diffusionsstrecken, da es, aufgrund der großen Anzahl an Ca^{2+} -bindenden Proteinen, rasch gebunden wird. Über diese Ca^{2+} -aktivierten Ca^{2+} -bindenden Proteine werden verschiedenste zelluläre Prozesse von der Enzymaktivität bis zu der Genexpression reguliert (s. 1.1.2).

1.1.1 Mechanismen des Ca^{2+} -Ein- und Ausstroms

Der Ca^{2+} -Einstrom wird über (1) spannungsgesteuerte Kanäle (VGCC, engl.: voltage gated calcium channel) und (2) ligandengesteuerte (ionotrope) Rezeptoren (ROC, engl.: receptor operated calcium channel) an der Zellmembran (z.B. glutamterge Rezeptoren) sowie über (3) Rezeptoren des ER, dem Inositoltriphosphat(IP_3)-Rezeptor und Ryanodinrezeptor (RyR) verwirklicht. Außerdem kann Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern über die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR, engl.: Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (s. Abb. 1) mobilisiert werden (Galione and Churchill, 2002), was bedeutet, dass Ca^{2+} bei einer IP_3 - oder RyR-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung diese selbst potenzieren kann. Durch einen noch wenig verstandenen Mechanismus kann der Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum zusätzlich auch über intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher gesteuert werden (Liao et al., 2008).

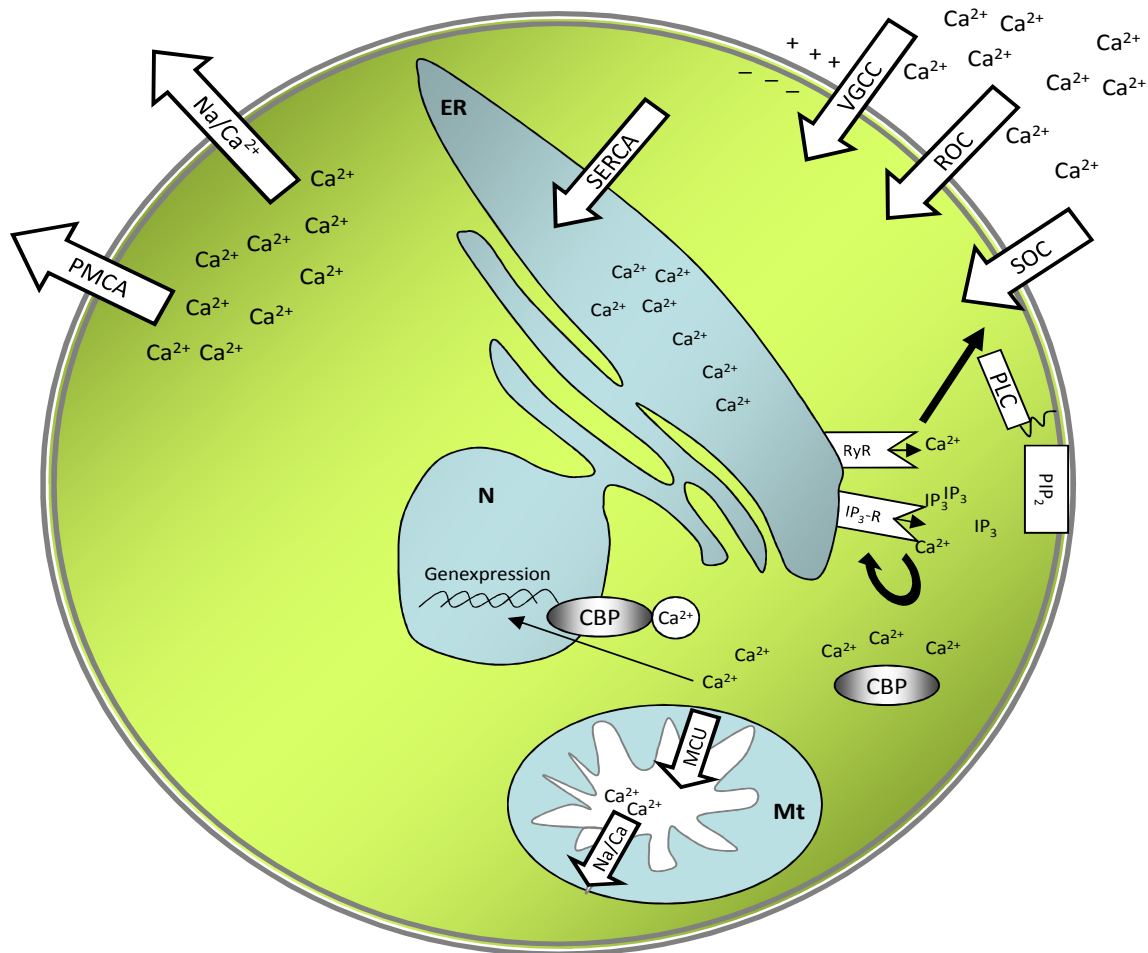


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mechanismen der zellulären Ca²⁺-Homöostase.

Der Ca²⁺-Flux über die Membranen der Zelle und ihrer Kompartimente erfolgt u.a. über die verschiedenen dargestellten Kanäle und Pumpen (s. auch Text 1.1.1): Der Efflux aus dem Zytosol erfolgt über PMCA (Plasmamembran Ca²⁺-ATPase), Na/Ca²⁺ (Natrium/Calcium-Austauscher), SERCA (Sarko/Endoplasmatisches Retikulum Ca²⁺-ATPase), SPCA (Ca²⁺-ATPase des Golgi-Apparat, nicht abgebildet). Der Influx kann aus dem Extrazellulärraum über spannungs (VGCC)-, rezeptor (ROC)-, oder speichergesteuerte (SOC, s. gerader Pfeil) Kanäle erfolgen. Außerdem kann Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden, vermittelt über Ryanodinrezeptoren (RyR) und IP₃-Rezeptoren (IP₃-R). Auf diese Weise freigesetztes Ca²⁺ kann wiederum Ca²⁺ freisetzen (gebogener Pfeil: CICR, gerader Pfeil SOC). Mitochondrien dienen der transienten Ca²⁺-Aufnahme und Dekodierung. Der mitochondriale Flux wird über einen bislang noch postulierten Kanal (MCU: mitochondrial Ca²⁺-Uniporter bzw. über den mitochondrialen Na/Ca²⁺-Austauscher und H/Ca²⁺-Austauscher (nicht abgebildet) gesteuert. Diese und andere Ca²⁺-bindende Proteine (CBP) halten [Ca²⁺]_i im unteren nanomolaren Bereich. Während des Alterns kommt es zu Fehlfunktionen. Der Funktionsverlust dieser regulatorischen Faktoren kann die Ca²⁺-Homöostase empfindlich beeinträchtigen, somit zu Veränderungen lokaler Ca²⁺-Ströme und -Konzentrationen führen, was letztendlich durch die Veränderung der Genexpression und von Enzymaktivitäten degenerative Prozesse einleiten kann (ER: Endoplasmatisches Retikulum, IP₃: Inositol-Tris-Phosphat, Mt: Mitochondrium, N: Nucleus, PLC: Phospholipase C, PIP₂: Phosphatidyl-Inositol-Bis-Phosphat).

Man spricht dabei von „store operated Ca^{2+} entry“ (SOCE). Dabei wird vermutet, dass die transienten Rezeptor-Potential-Proteine (TRPC) im Komplex mit ORAI-Proteinen, die mit 4 Domänen die Membran durchspannen, einen nicht selektiven Ca^{2+} -permeablen Kationenkanal bilden, der über das Transmembranprotein STIM-1 reguliert wird. Des Weiteren befinden sich Ca^{2+} -ATPasen an der Plasmamembran (PMCA1-4) sowie in den Membranen des ER (SERCA1 u. 2) und des Golgi-Netzwerks (SPCA1-3), die mit den Na/Ca^{2+} -Austauschern der Plasmamembran ein System bilden, das den Ca^{2+} -Efflux steuert. Diese und weitere Kanäle sorgen für eine strenge Kontrolle der Ca^{2+} -Homöostase und halten die intrazelluläre Konzentration so stabil im unteren nanomolaren Bereich. Veränderungen der basalen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sind grundsätzlich durch einen veränderten Ca^{2+} -Influx bzw. -Efflux bedingt.

1.1.1.1 Expressionsmuster, Isoformen, Struktur und Funktion der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase PMCA

Die PMCA-Familie umfasst vier Isoformen und mindestens 20 Splicevarianten, die gewebespezifisch exprimiert werden und somit unterschiedlichen Anforderungen verschiedener Gewebe, einzelner Zelltypen oder Erfordernissen während bestimmter Entwicklungsphasen gerecht werden (Brini, 2008; Di Leva et al., 2008). Während PMCA1 und 4 ubiquitär vorkommen, werden PMCA2 und 3 gewebespezifisch, vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS), exprimiert (Stauffer et al., 1995, 1997; Zacharias et al., 1995; Burette et al., 2003; Strehler et al., 2007). Im ZNS sind PMCA1 und 4 im Telencephalon (Endhirn) besonders stark vertreten. PMCA2 kommt dagegen vergleichsweise häufig im Zerebellum (Kleinhirn) vor und PMCA3 im Plexus Choroideus, einem Adergeflecht der Ventrikel. Es zeigen sich jedoch auch innerhalb topographisch eng benachbarter Gebiete Unterschiede. So ist z.B. PMCA2, die im Mittelhirn in relativ geringen Mengen vorkommt, die dominierende Isoform des Striatums. Das Striatum besteht aus den zu den Basalganglien gehörenden Strukturen Putamen und Nukleus Kaudatus, welche sich bereits im Telencephalon befinden, jedoch über die dopaminergen Bahnen aus dem Mittelhirn versorgt werden.

Die vier PMCA-Isoformen werden durch vier verschiedene Gene kodiert, die auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (12q21-q23, 3p25-p26, Xq28 und 1q25-q32). Alle Genprodukte weisen eine durchgehenden Polypeptidkette auf, die vier zytosolische Schleifen und zehn Transmembransegmente (TM) umfasst (s. Abb. 2). Beginnend am

zytosolischen N-Terminus ist die A-Domäne lokalisiert, die sich in einer Schleife zwischen dem 2. und 3. Membransegment fortsetzt, die die sogenannte Spleißstelle A (splicing site A) beinhaltet und für die Lokalisation in apikalen Membranen polarer Zellen von Bedeutung ist (Antalffy et al., 2011).

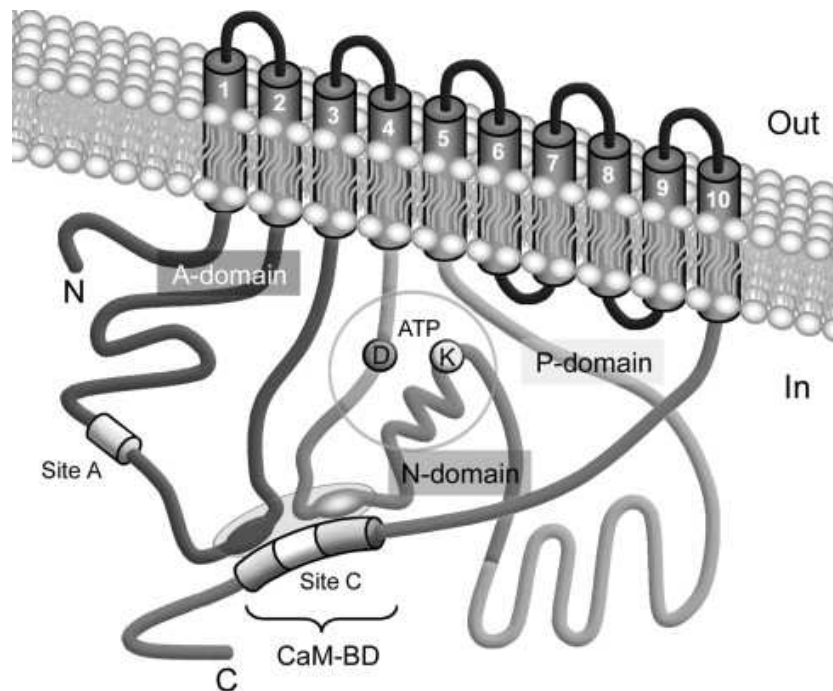


Abbildung 2: Struktur der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA). PMCA besitzt zehn Transmembransegmente (TM), sowie die zytosolisch gelegene N-terminale und C-terminale Domäne und zusätzlich die zytosolische Schleifen zwischen TM 2 und 3 und zwischen TM4 und 5. (Quelle: (Di Leva et al., 2008), weitere Beschreibung s. Text 1.1.1.1)

Zwischen TM 4 und 5 befindet sich die 2. intrazelluläre Domäne, die die katalytische ATPase-Funktion, besitzt, einen als N-Domäne bezeichneten konservierten Lysin-(K)-Rest besitzt, der als ATP-Bindungsstelle dient und eine als P-Domäne bezeichnete Phosphorylierungsstelle in Form eines Aspartat-(D)-Restes. Der C-Terminus bildet letztendlich die dritte intrazelluläre Domäne, die zum einen eine weitere Spleißstelle (splice site C) besitzt und zum anderen wichtig für die Regulation der Aktivität ist. Die zytosolische Schleife besitzt eine Calmodulin-Bindestelle (CaM-BD), die bei Bindung von Calmodulin aktivierend wirken kann (Brini et al., 2003), während bei Abwesenheit von Calmodulin ein autoinhibitorischer Effekt ausgeübt werden kann. Des Weiteren besitzt dieser Abschnitt Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) (James et al., 1989) und Proteinkinase C (PKC) (Enyedi et al., 1996), wobei es jedoch Isoformen spezifische Unterschiede gibt, sowie eine Erkennungssequenz für

Calpaine. Calpaine sind Ca^{2+} -abhängige Proteasen, die die Ca^{2+} -ATPasen nach proteolytischer Abspaltung der inhibitorischen Domäne dauerhaft aktivieren können.

1.1.2 Ca^{2+} -bindende Proteine: Intrazelluläre Ca^{2+} -Effektoren

Ca^{2+} -bindende Proteine (CBP, engl.: calcium binding proteins) werden in zwei große Gruppen unterteilt: Zum einen gibt es CBP, die typischerweise das EF-Hand-Motiv enthalten (engl.: EF-hands-proteins) s.u., das für die Bindung von Ca^{2+} notwendig ist, und ihrerseits zumeist wieder Effektoren haben. Die zweite große Gruppe umfasst die Annexine, Gelsoline und C_2 -Domänen-CBP, die alle kein EF-Hand-Motiv besitzen (engl.: non EF-hand calcium binding proteins (zur Übersicht Carafoli et al., 2001)). Ein großer Teil der CBP dient der Dekodierung des Ca^{2+} -Signals, indem die CBP aktiviert durch die Ca^{2+} -Bindung, wiederum Effektoren aktivieren können oder selbst als Effektorenzym fungieren, das durch Ca^{2+} allosterisch aktiviert werden kann. Daneben scheinen einige Bindungsproteine lediglich zur Ca^{2+} -Pufferung zu dienen, ohne einen unmittelbaren Effekt zu haben.

Bei der EF-Hand bilden die Helices E und F ein Ca^{2+} -Bindemotiv mit jeweils zwei Bindestellen. Dieses Motiv wurde erstmals nach Entschlüsselung der kristallinen Struktur von Parvalbumin beschrieben und gleicht einer Faust, bei der die Helices E und F, die ein Helix-Loop-Helix-Motiv bilden, als ausgestreckter Daumen und Zeigefinger dargestellt sind. Nach der reversiblen Bindung von 4 Ca^{2+} , koordiniert durch Sauerstoffatome, kommt es bis auf wenige Ausnahmen zu Konformationsänderungen, wodurch das Ca^{2+} -Signal weitergeleitet werden kann. Davon ausgenommen sind Calbindin und Parvalbumin selbst. Zu den bekanntesten und am besten untersuchten Vertretern der EF-Hand Proteine, gehört das hochkonservierte 15 kDa Protein Calmodulin. Zu dessen bedeutendsten Effektoren zählen die Ca^{2+} -Calmodulin abhängigen Kinasen CaMK I-IV. CaM-Kinasen regulieren ein breites Spektrum zellulärer Prozesse. So können CaM-Kinasen u.a. die Transkription über zyklische Adenosinnukleotide (CREB, engl.: cAMP-response element binding protein)-abhängige Signalwege regulieren oder die IP_3 -vermittelte intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung beeinflussen. CaM-Kinase-abhängige Effektoren können je nach Gewebe gänzlich verschieden sein. Es ist im Übrigen ein generelles Merkmal der Ca^{2+} -vermittelten Signalübertragung, dass in unterschiedlichen Geweben gegensätzliche Effekte hervorgerufen werden können. Neben Calmodulin sind die Calpaine zu nennen. Man zählt sie zu den wichtigsten Ca^{2+} -abhängigen intrazellulären Proteasen. Eine weitere

Untergruppe von EF-Hand-Proteinen sind die neuronalen Ca^{2+} -Sensoren (NCS), die sich wiederum unterteilen lassen, wie z.B. Frequentin, Visinin, Neurocalcin u.a. NCS sind weit verbreitet im zentralen Nervensystem (ZNS) und besitzen überwiegend die Eigenschaft, N-terminal acetyliert oder myristoyliert werden zu können, was eine Verankerung dieser Proteinen in Membranen ermöglicht. Dadurch könnten Ca^{2+} -Signale in Kompartimente übertragen werden.

Intrazelluläre Ca^{2+} -Effektoren, die kein EF-Hand-Motiv enthalten, haben im Allgemeinen eine geringere Affinität zu Ca^{2+} . Zu ihnen zählt man die C_2 -Domänen-Proteine (z.B. Phospholipase C und Proteinkinase C), Synaptotagmine, Annexine und Gelsoline.

1.2 Die neuronale Ca^{2+} -Homöostase

Ca^{2+} -abhängige Effekte nehmen im Nervensystem eine besondere Stellung ein, da Neurone aufgrund ihrer Eigenschaft als anregbare Zellen einen hohen Ca^{2+} -Umsatz haben. So ist Ca^{2+} z.B. bei der Entstehung des postsynaptischen Potentials, des Aktionspotentials und der Vesikelfusion bei der Transmitterfreisetzung beteiligt. Neurone sind damit einem permanenten Ca^{2+} -Flux, der bewältigt werden muss, in hohem Maße ausgesetzt. Diese Eigenschaft bedeutet auch, dass die neuronale Ca^{2+} -Homöostase mehr Angriffsfläche bietet als in anderen Zellen und somit leichter aus dem Gleichgewicht zu bringen ist. Dieser Umstand spielt für den Alterungsprozess und bei neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle und soll im Folgenden veranschaulicht werden.

1.2.1 Die Bedeutung der neuronalen Ca^{2+} -Homöostase im Alterungsprozess

Während des Alterungsprozesses sind verschiedene Aspekte der Ca^{2+} -Homöostase von elementaren Modifikationen betroffen (Toescu et al., 2004). Bereits 1984 wurde die Hypothese aufgestellt, dass Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase bei der neuronalen Alterung von Bedeutung sein könnten (Khachaturian, 1994). Danach kommt es im Zuge der Alterung zu Alterationen in den Kontrollsystemen der Ca^{2+} -Homöostase, was zur Verschiebung des intrazellulären Ca^{2+} -Gleichgewichts führt, z.B. kommt es während des Alterns durch eine Abnahme der PMCA-Aktivität (Michaelis et al., 1996) zu einem verminderten Ca^{2+} -Efflux. Zudem konnte mit eigenen Arbeiten der Arbeitsgruppe in gealterten primären hippocampalen Neuronen gezeigt werden, dass sich der zytosolische Ca^{2+} -Spiegel erhöht, einhergehend mit einer Aktivierung von Calpainen und einem reduzierten Zellüberleben (Hajieva et al., 2009a). In wie weit Beeinträchtigungen des

Efflux oder des Influx zu einer zytosolische Ca^{2+} -Erhöhung führen, bedarf weiterer Analysen. Während eine mögliche Beeinträchtigung des Effluxsystems im Alterungsprozess wenig untersucht worden ist, war und ist das Influxsystem Gegenstand intensiver Forschung. In gealterten Neuronen lässt sich sowohl zu eine Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle als auch durch eine erhöhte IP_3 -vermittelte Freisetzung aus dem ER feststellen (Landfield und Pitler, 1984; Foster, 2007; Thibault et al., 2007). Darüber hinaus kommt es zu einer Abnahme Ca^{2+} -bindender Proteine und somit zu einer geringeren Kapazität, Ca^{2+} zu puffern (Tonkikh et al., 2006; Tonkikh and Carlen, 2009). Solche Ereignisse tragen z.B. zu einer Induktion der Langzeitdepression (LTD, engl.: Longterm Depression) bzw. einer Inhibition der Langzeitpotenzierung (LTP, engl.: Longterm Potentiation) bei, was die synaptische Plastizität beeinflussen und milde kognitive Beeinträchtigungen nach sich ziehen kann (Rosenzweig and Barnes, 2003). Schon geringe Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase können über einen langen Zeitraum zu ähnlichen Effekten führen wie die akute Wirkung von stärkeren Ca^{2+} -Konzentrationschwankungen. Hier wäre die Bedeutung von Ca^{2+} bei Apoptose, Exzitotoxizität und Zelltod zu nennen. All diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass altersbedingte Veränderungen des Ca^{2+} -Gleichgewichts zu einer erhöhten Vulnerabilität gealterter Neuronen beitragen. Dies ist besonders für pathologische Prozesse, die speziell die Ca^{2+} -Homöostase zusätzlich beeinflussen.

Die Aufklärung altersabhängiger Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase und deren Folgen ist daher insbesondere im Zusammenhang mit altersassoziierten Erkrankungen interessant. Zudem wird der Alterungsprozess selbst als primäre Ursache solcher Erkrankungen intensiv diskutiert (Collier et al., 2011).

1.2.2 Die Rolle von Ca^{2+} bei neurodegenerativen Erkrankungen

Ähnlich wie während des Alterungsprozesses kommt es bei vielen neurodegenerativen, größtenteils altersassoziierten Erkrankungen, wie der Parkinson-Krankheit (PD), der Alzheimer-Krankheit (AD), der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), der Huntington-Krankheit (HD) oder der spinocerebellären Ataxie (SCA), zu Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase (Wojda et al., 2008; Bezprozvanny, 2009). Trotz dieser Gemeinsamkeit führen diese Erkrankungen jedoch zu dem Verlust von distinkten Neuronen in spezifischen Arealen und haben eine krankheitsspezifische Pathologie. Dennoch werden Medikamente entwickelt, die auf die Ca^{2+} -Homöostase zielen, mit der Absicht, erstens die

Widerstandsfähigkeit von Neuronen zu verbessern, die aufgrund der genannten altersabhängigen Veränderungen (s. 1.2.1) *per se* vulnerabler sind und zweitens mögliche Kombinationstherapien zu entwickeln, bei denen ein zusätzliches, für die jeweilige Krankheit spezielles Präparat verabreicht wird. Es muss aber grundsätzlich aufgeklärt werden, ob die Störung der Ca^{2+} -Homöostase eine Folge der Erkrankungen ist und möglicherweise eine gemeinsame Endstrecke bei der Neurodegeneration darstellt, oder ob diese eine kausale Bedeutung hat. In diesem Fall muss angenommen werden, dass je nach Erkrankung bestimmte Aspekte bei der Ca^{2+} -vermittelten Signalgebung gestört sind, oder dass solche Störungen auf bestimmte Neuronenpopulationen beschränkt sind. Hinweise dafür gibt es z.B. bei AD und PD.

Auf diese Weise ist die inzwischen etablierte Ca^{2+} -Hypothese der Alzheimer Demenz entstanden (Berridge, 2009). Danach verursacht das AD-spezifische $\text{A}\beta_{42}$ -Peptid Ca^{2+} -durchlässige Poren in der Zellmembran, was eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Folge hat. Diese Erhöhung führt wiederum zu einer vermehrten CICR (Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung). Das $\text{A}\beta_{42}$ -Peptid ist ein Spaltprodukt, das bei der pathologischen amyloiden Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (engl.: Amyloid Precursor Protein, APP) durch die β -Sekretase entsteht und im Krankheitsverlauf in amyloiden Plaques akkumuliert. Physiologischerweise katalysiert die α -Sekretase die Abspaltung kürzerer, nicht pathologischer Peptide aus APP. Bei der weiteren Prozessierung durch die γ -Sekretase entsteht auf dem amyloiden Weg ein intrazelluläres Spaltprodukt (engl.: APP intracellular domain, AICD), welches als Transkriptionsfaktor beschrieben ist und als solcher für die erhöhte Expression von Ryanodinrezeptoren (RyR) in Mausmodellen der AD verantwortlich ist. Dies wiederum führt potentiell zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Folgen der Ca^{2+} -Dyshomöostase sind die Aktivierung von Calpainen, Veränderungen der synaptischen Plastizität verbunden mit kognitiven Beeinträchtigungen und letztendlich der apoptotische Zelltod.

Auch bei PD gibt es charakteristische Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase. Die dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra pars compacta (SNpc) im Mittelhirn, die im Verlauf der Erkrankung degenerieren, was für die motorischen Symptome verantwortlich gemacht wird (Riederer and Wuketich, 1976), weisen besondere Eigenschaften der Ca^{2+} -Homöostase auf (Chan et al., 2010; Surmeier et al., 2010a). Zum einen exprimieren diese Neurone eine besondere Isoform spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (VGCC, engl.: voltage

gated calcium channel) des L-Typs (CaV 1.3), die mit einem Anteil von 10% an der Gesamtexpression von L-Typ-Kanälen nur gering im ZNS verbreitet sind (Sinnegger-Brauns et al., 2009). Diese VGCCs generieren einen ständigen Ca^{2+} -Flux über die Zellemembran, während es bei den anderen Neuronen üblicherweise nur zu einem vorübergehenden Ca^{2+} -Einstrom, z.B. induziert durch die Aktivierung eines postsynaptischen Rezeptors oder durch ein Aktionspotential, kommt. Dazu besitzen diese dopaminergen Neuronen ein autonomes Schrittmacherpotential (Grace and Bunney, 1983), vergleichbar mit dem erregbaren Myokard. Der Ca^{2+} -Flux scheint jedoch nicht essentiell für das Schrittmacherpotential (Guzman et al., 2009), wovon ursprünglich ausgegangen wurde (Chan et al., 2007). Trotzdem bedeutet er für diese Neuronenpopulation eine ständige Belastung, den zytosolischen Ca^{2+} -Gehalt permanent auszugleichen. Damit verbunden ist ein erhöhter ATP-Bedarf der Ca^{2+} -Effluxpumpen. Dieser wiederum benötigt einen höheren Umsatz der mitochondrialen Atmungskette, was eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl.: reactive oxygene species) zur Folge haben kann (Guzman et al., 2010). Interessanterweise sind die noradrenergen Neuronen des Locus Coeruleus, die einen ähnlichen Phänotyp hinsichtlich der Ca^{2+} -Homöostase besitzen, ebenfalls bei PD betroffen (Williams et al., 1984; German et al., 1992). Davon unterscheiden sich die dopaminergen Neuronen des Tegmentums, die bei PD weniger betroffen sind (Kish et al., 1988). Ca^{2+} hat für das Schrittmacherpotential hier überhaupt keine Bedeutung (Khaliq and Bean, 2010). Dass der besondere Phänotyp für die Pathologie von Bedeutung sein könnte, zeigen Studien in Mausmodellen von PD. Durch Gabe des spezifischen Inhibitors für L-Typ-Kanäle Isradipin konnte die Degeneration von dopaminergen Neuronen reduziert werden (Ilijic et al., 2011).

Zum anderen gibt es Veränderungen in den dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten in der Expression der Ca^{2+} -bindenden Proteine Calbindin D28k, Calretinin und Parvalbumin. So wurde etwa beobachtet, dass das Überleben verbleibender Neurone in der Substantia Nigra mit der Expression von Calbindin (Damier et al., 1999) oder Calretinin (Nemoto et al., 1999) zusammen hängen könnte. Jedoch zeigten Calbindin-defiziente Mäuse keine Unterschiede in Bezug auf das neuronale Überleben nach Behandlung mit MPTP (Airaksinen et al., 1997), einem Neurotoxin, das bei experimentellen Parkinsonmodellen verwendet wird (s. 1.3). Somit konnte ein möglicher neuroprotektiver Effekt durch Calbindin nicht bestätigt werden.

Aufgrund der Besonderheiten dieser Neuronenpopulationen sind diese bei einer Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase anfälliger für Ca^{2+} -abhängige degenerative Prozesse. An diesen Beispielen wird zudem deutlich, dass verschiedene Ursachen zu einer krankheitsspezifischen Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase führen könnten, die letztendlich gemeinsam in die Neurodegeneration münden. Es ist daher von erheblichem Interesse, Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase im Zuge der altersassoziierten Neurodegeneration aufzuklären. Dies könnte letztendlich neue Möglichkeiten für therapeutische Interventionen eröffnen, die neurodegenerative Prozesse zumindest verlangsamen könnte.

1.3 Das MPP^+ basierte Modell der Parkinson Erkrankung

Die Parkinson-Erkrankung (PD, engl.: Parkinson's Disease) ist eine altersassoziierte fortschreitende neurodegenerative Erkrankung (zur Übersicht Beal, 2001; Dauer und Przedborski, 2003; Dawson und Dawson, 2003; Meredith et al., 2008; Schapira, 2010; Bevard and Przedborski, 2011), bei der es zu einem massiven Absterben der dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra pars compacta im Mittelhirn kommt. Der Verlust dieser Neurone wird mit den Kardinalsymptomen Rigidität, Ruhetremor und Bradykinese in Zusammenhang gebracht. Darüber hinaus kommt es zu kognitiven Störungen. Ein pathologisches biochemisches Hauptmerkmal ist das Auftreten von Lewy-Körpern im ZNS, die Protein- und Lipidaggregate enthalten. α -Synuklein und Ubiquitin machen dabei einen großen Anteil der Proteinaggregate aus. Des Weiteren wurden bei der familiären Form von PD, d.h. der Form mit einem genetischen Hintergrund, die etwa 5-10% der Fälle ausmacht, als erstes Mutationen im Gen für α -Synuklein beschrieben (Polymeropoulos et al., 1997). Inzwischen konnte eine Reihe weiterer genetischer Loci identifiziert werden, die der erblichen Form von PD zu Grunde liegen. Die Ursache der sporadischen Form ist hingegen ungeklärt. Jedoch eröffnete in den 1980ern die zufällige Entdeckung, dass die synthetische Substanz 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetra-Hydropyridin (MPTP) die meisten Symptome von PD hervorruft, die Möglichkeit, nach den Ursachen der sporadischen Form zu forschen und pathobiochemische Mechanismen der Erkrankung zu charakterisieren. So verursacht MPTP die genannten Kardinalsymptome, führt zu dem Untergang der dopaminergen Neuronen und der Formation von Lewy-Körper-ähnlichen Einschlusskörpern (Beal, 2001). Das Blut-Hirnschranken-gängige MPTP wird vermutlich durch die gliale Monoaminoxidase B (MAO B) in das instabile Methyl-Phenyl-Di-Hydropyridin umgewandelt, welches spontan zu 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridin (MPP^+)

reagiert, auf dem die Toxizität beruht. MPP^+ wird über den Dopamintransporter DAT-1 in die dopaminergen Neuronen aufgenommen und inhibiert dort den mitochondrialen Komplex I (NADH-Reduktase) der Atmungskette. Neben 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) und den Umweltgiften Rotenon und Paraquat ist MPP^+ bzw. MPTP ein etabliertes Parkinson-Toxin-Modell, das sehr gut untersucht ist und viele Vorteile bietet.

1.3.1 Komplex I-Inhibition, Ca^{2+} und die Parkinson Erkrankung

Der Befund, dass MPP^+ seine Toxizität über die Komplex I-Inhibition vermittelt, führte zu der Hypothese, dass auch bei PD-Patienten eine Beeinträchtigung des Komplex I vorliegen könnte (Blin et al., 1994). Verschiedene Studien konnten belegen, dass die Funktion von Komplex I in verschiedenen Geweben, wie im Muskel, in Blutplättchen (Benecke et al., 1993), im frontalen Kortex (Parker et al., 2008) und auch in der Substantia Nigra selbst reduziert ist (Schapira et al., 1989). Diese Befunde könnten darauf hinweisen, dass bei PD eine systemische Funktionsminderung der NADH-Reduktase vorliegt, was einerseits eine Störung der ATP-Produktion zur Folge haben könnte. Andererseits könnte die eingeschränkte Fähigkeit der mitochondrialen Atmungskette, Elektronen aufzunehmen ebenfalls zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen. Darüber hinaus würde ein verminderter Protonenfluss über die innere Mitochondrienmembran in einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials resultieren (Nakai et al., 2003). Die genannten Veränderungen stehen wiederum in direktem Zusammenhang mit der Ca^{2+} -Homöostase. Zum einen ist das mitochondriale Membranpotential die treibende Kraft für den Ca^{2+} -Einstrom in das Mitochondrium über den postulierten mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) (Rottenberg and Scarpa, 1974; Walsh et al., 2009; Hoppe, 2010). Zum anderen spielt Ca^{2+} eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung (McCormack and Denton, 1984; Jouaville et al., 1999; Territo et al., 2000; Griffiths and Rutter, 2009). Sehr interessant sind zudem Untersuchungen, bei denen mittels mitochondrialer DNA aus Blutplättchen von Parkinson Patienten Cybridzellen generiert wurden (Esteves et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Cybrid-Modell die Komplex I-Aktivität abnimmt und die mitochondriale Ca^{2+} -Kapazität verringert ist, was zu einer Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} und einer Induktion von Calpainen führt (Esteves et al., 2010). Die Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase in PD-Modellen könnten im Hinblick auf die besonderen Eigenschaften der dopaminergen Neurone der SNpc (s. 1.2.2) eine kritische Rolle bei der selektiven Vulnerabilität spielen.

1.4 Bildgebende Fluoreszenz-gestützte Verfahren für die Ca^{2+} -Messung

Für die Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist eine Vielzahl von optischen Indikatoren verfügbar. Das Funktionsprinzip der Ca^{2+} -Indikatoren basiert darauf, dass diese ihre optischen Eigenschaften nach der Bindung von Ca^{2+} ändern. Diese kann man durch fluorometrische Verfahren nachweisen, um den Ca^{2+} -Gehalt ratiometrisch zu bestimmen. Unter den Ca^{2+} -komplexbildende Chemikalien hat FURA-2, ein (EGTA)-Derivat, wohl die breiteste Anwendung gefunden. Bei neueren Generationen von Ca^{2+} -Indikatoren verwendet man rekombinante Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP, engl.: green fluorescent protein) für die Fluorometrie, die mit Ca^{2+} -bindenden Domänen aus Ca^{2+} -bindenden Proteinen, wie z.B. der EF-Hand aus Calmodulin (s. 1.1.2), gekoppelt sind. Beide Methoden haben ihre Vorzüge. So hat z.B. FURA-2 den Vorteil, dass man damit sämtliche Zellen einer Kulturschale beladen kann, wogegen bei den rekombinanten GFP-basierten „Cameleon“-Indikatoren, die durch ein Plasmid kodiert werden, die Anzahl messbarer Zellen von der Transfektionseffizienz abhängig ist. „Cameleon“-Indikatoren haben jedoch den Vorteil, dass sie sich organellen-spezifisch und gewebespezifisch exprimieren lassen. Darüber hinaus lassen sich transgene Modelle generieren, die Ca^{2+} -Messungen *in vivo* zulassen. Für die zytosolischen Ca^{2+} -Messungen der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich der GFP-basierte Indikator „Yellow Cameleon YC 3.6“ (Miyawaki et al., 1999; Truong et al., 2001; Nagai et al., 2004) verwendet (s. Abb. 3). Für Ca^{2+} -Messungen im ER bzw. im Mitochondrium standen Varianten mit einer entsprechenden Zielsequenz zur Verfügung (Palmer et al., 2004, 2006).

YC 3.6 besteht aus dem N-terminal lokalisierten blau (cyan) fluoreszierenden Protein CFP(engl.: cyan fluorescent protein) und dem C-terminal gelegenen gelben YFP (engl.: yellow fluorescent protein), die über das Ca^{2+} -bindende EF-Hand-Motiv des Calmodulins und das Bindepeptid M13 der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase verbunden sind. Es wird grundsätzlich bei 440 nm angeregt, worauf es zu einer Emission im blauen Spektrum kommt, solange sich $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht erhöht. Diese Emission wird bei 480 nm gemessen. Steigt nun $[\text{Ca}^{2+}]_i$, kommt es nach der Ca^{2+} -Bindung an Calmodulin zu einer Konformationsänderung, die dazu führt, dass die beiden Fluorophore in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Dies wiederum bewirkt, dass das angeregte CFP seine Energie nicht mehr emittiert, sondern auf YFP überträgt. Durch diesen Energietransfer, auch Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genannt, wird YFP angeregt, das seinerseits Licht emittiert, was bei 535 nm gemessen werden kann (s. Abb. 3).

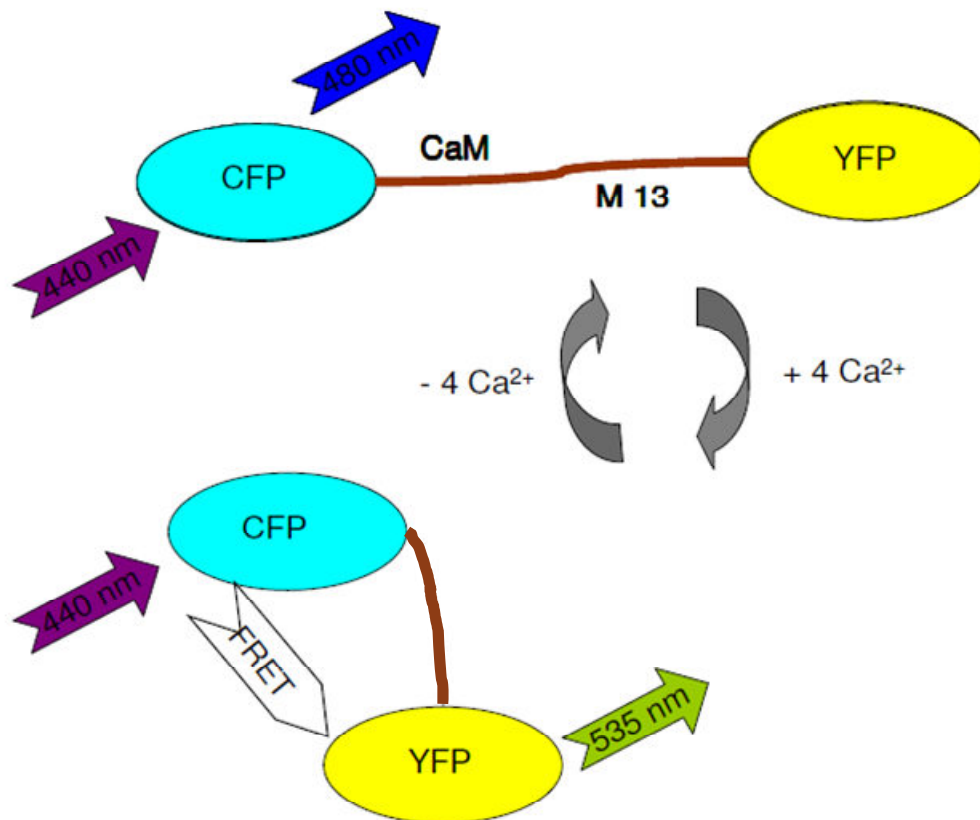


Abbildung 3: Prinzip der Ca^{2+} -Messung mittels des GFP-basierten Indikators „Yellow Cameleon cpYC 3.6“. Eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt die beiden Fluorophore in räumliche Nähe und verschiebt das Verhältnis der Emissionen von blau nach gelb (s. auch Erklärungen im Text).

Auch für die Ca^{2+} -Messung mit dem „Yellow Cameleon“ gilt das ratiometrische Prinzip. Es wird das Verhältnis, die Ratio, aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten von YFP und CFP gebildet. Da die Ratio beider Signale herangezogen wird, ist diese Detektionsmethode unabhängig von dem Expressionsniveau.

1.5 Zielsetzung

Ca^{2+} ist als zelluläres Signalmolekül in zahlreiche Prozesse, von der Proliferation bis zum programmierten Zelltod, involviert und die Ca^{2+} -Homöostase muss daher streng kontrolliert werden. Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase könnten bei der Entstehung altersabhängiger neurodegenerativer Erkrankungen eine ursächliche Rolle spielen (Bezprozvanny, 2009). Es ist bekannt, dass es zu einer altersabhängigen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in hippocampalen Neuronen kommt (Hajieva et al., 2009a). Auch in Bezug auf neurodegenerative Prozesse bei der Parkinson-Erkrankung wird einer Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase eine prominente Rolle für den selektiven Untergang der dopaminergen Neuronen zugeschrieben. Es wird vermutet, dass die betroffenen Neuronen aufgrund einer besonderen Isoform eines spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals, CaV 1.3 vom L-Typ, über den ein ständiger Ca^{2+} -Influx generiert wird, einer stetigen Belastung ausgesetzt sind, wodurch diese Neuronen vulnerabler sind (Chan et al., 2007). Darüber hinaus konnte mittels eines spezifischen Antagonisten für solche L-Typ-Kanäle ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden (Ilijic et al., 2011). Dennoch sind die Mechanismen, die für einen möglichen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich sind bzw. den ständigen Ca^{2+} -Influx möglicherweise ungenügend kompensieren, nicht vollständig aufgeklärt.

Ziel der Dissertation war es daher, erstens die Auswirkungen des mit der Parkinson-Symptomatik und -Pathologie assoziierten Neurotoxins Methyl-Phenyl-Pyridin (MPP^+) auf die Ca^{2+} -Homöostase, im Besonderen auf das Ca^{2+} -Effluxsystem, zu untersuchen, und zweitens altersabhängige Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase zu analysieren. Dazu wurden die klonale Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y und neuronale Primärzellen aus dem Mittelhirn der Ratte mit MPP^+ behandelt. Um die Auswirkungen auf Ca^{2+} -Aktivitäten und regulierende Faktoren der Ca^{2+} -Homöostase, hauptsächlich die ATP-abhängigen Ca^{2+} -Pumpen des Effluxsystems, zu untersuchen, wurden Organellen-spezifische Veränderungen analysiert. Dazu wurden die relativen Ca^{2+} -Konzentrationen mit dem GFP-basierten optischen Ca^{2+} -Indikator „Cameleon“ gemessen und die zu Grunde liegenden Mechanismen mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden analysiert. Um Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase während der physiologischen Alterung zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit gealterte primäre Fibroblasten, sowie neuronale Zellen des Mesencephalons gealterter Mäuse verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Modelle

Zellkulturmodelle	Quelle
SH-SY5Y Neuroblastom-Zelllinie	American Type Culture Collection
primäre Mittelhirnzellen	entnommen aus Rattenembryonen
primäre IMR-90-Lungenfibroblasten	Coriell Institute for Medical Research
Tiere	
Mausstamm: C57BL/6 (black six)	
Rattenstamm: Sprague Dawley	

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien, Kits

Alle verwendeten Chemikalien und Kits in dieser Arbeit wurden von den Firmen Abcam, AppliChem, Bacto, Fluka, Gibson, Invitrogen, Jackson, Macherey und Nagel, Merck (Calbiochem bzw. Millipore), Roche, Roth, Santa Cruz oder Sigma Aldrich bezogen, soweit keine anderen Angaben gemacht sind.

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

2.3.1.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien mittels Hitzeschock

Chemisch kompetente Bakterien vom Stamm DH-5 α *E. coli* (Invitrogen) wurden zur Anreicherung von Plasmiden transformiert. Dazu wurden die zu je 100 μ l aliquotierten Bakterien auf Eis vorsichtig aufgetaut und 50 bis 300 ng des jeweiligen Plasmids in 3 bis 5 μ l gelöst hinzugegeben. Durch vorsichtiges Klopfen wurde die Suspension mit dem Plasmid vermischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 30 s und eine anschließende Inkubation auf Eis für 2 min. Zunächst wurden 300 μ l S.O.C.-Medium (Invitrogen) zu dem Ansatz gegeben, der dann für 30 bis 60 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert wurde, um die Expression von Resistenzgenen zu gewährleisten. 50 bis 100 μ l des Ansatzes wurden letztlich auf einer LB-Platte mit geeignetem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Platten wurden bis zu vier Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Für die

Plasmidanreicherung wurden einzelne Kolonien gepickt und in 100 bis 300 ml Antibiotikum-haltigem Selektions-LB-Medium über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, um am Folgetag eine Plasmidpräparation durchzuführen wie unten beschrieben(s. 2.3.1.2).

LB (Lauria Bertani)-Medium

10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1l H₂O; autoklaviert, Zusatz von 100 µg/ml eines geeigneten Selektionsantibiotikums

2.3.1.2 Plasmidpräparationen

Zur Gewinnung eines angereicherten Plasmids wurden die bakteriellen Übernachtskulturen (s. 2.3.1.1) pelletiert und anschließend eine Plasmid-Maxipräparation unter Verwendung eines Kits von Macherey und Nagel gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm 1:20 und 1:100 in destilliertem Wasser verdünnter Proben in Quarzküvetten gemessen. Als Referenzwert diente das Verdünnungsmittel. Auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes und unter Berücksichtigung der Verdünnung entsprach ein Extinktionswert von 1 gleich 50 µg/µl DNA bzw. 40 µg/µl RNA. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm ermittelt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Für Proteine liegt das Absorptionsmaximum aufgrund der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm.

2.3.1.4 Quantitative Echtzeit RT-PCR-Analyse (qPCR)

Isolierung von Gesamt-RNA aus neuronalen Primärzellen und SH-SY5Y-Zellen wurde mittels des NucleoSpin RNA II-Kits von Macherey und Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die cDNA-Synthese mittel Omniscript von Quiagen wurden 1 µg RNA eingesetzt. Es wurden jeweils 1 µl cDNA, 12,5 µl 2 x Absolute SYBR Green Mix von Thermo Scientific, 10,5 ml H₂O und je 0,5 µl Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer (100 pmol/µl, s. Tab. 1) pro Well (25 µl Gesamtvolumen) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die cDNA wurde dann im iCycler von Bio-Rad nach folgendem Protokoll amplifiziert:

Initiale Aktivierung:	15 min, 95 °C
Amplifikation (35 Zyklen):	20 s, 95 °C (Denaturierung) 20 s, 58 °C (Anlagerung) 30 s, 72 °C (Elongation)
Finale Denaturierung:	1 min, 95 °C
Abkühlung:	1 min, 55 °C
Schmelzkurve (88 Zyklen):	8 s, 55 °C (+0,5 °C/Zyklus)

Tabelle 1: qPCR-Primerpaare

GAPDHfor	5'-GCACCACCAACTGCTTAGCAC-3'
GAPDHrev	5'-CACCACCTTCTTGATGTCATC-3'
humanNCXfor	5'-TGTGCATCTCAGCAATGTCA-3'
humanNCXrev	5'-TTCCTCGAGCTCCAGATGTT-3'
humanPCMA2for	5'-ACCAAAGAAATGAGTCGAGCC-3'
humanPMCA2rev	5'-GTCTCCTTGATCTTGACCACAG-3'
humanSERCFor	5'-ACCCACATTCGAGTTGGAAG-3'
humanSERCRev	5'-CCAACGAAGGTCAGATTGGT-3'
ratNCXfor	5'-TGCATCTTAGCAACGTCAGG-3'
ratNCXrev	5'-CACGGGTTCCCTCGAAAGTAA-3'
ratPMCA2for	5'-CAGAACAGAAAGCCATTCC-3'
ratPMCA2rev	5'-GACCCACAAAGTGCTTAG-3'
ratSERCFor	5'-AAGCTATGGGAGTGGTGGTG-3'
ratSERCRev	5'-GCAATGCAAATGAGGGAGAT-3'

Der Zyklus (Thresholdcycle), in der die Fluoreszenz des Amplifikats eine gesetzte Grenzwelle, die den Übergang in die exponentielle Phase markiert, erreicht, ergibt den CT-Wert. Diese Werte wurden mit der Anwendung „Relative Expression Software Tool“ (Pfaffl et al., 2002) ausgewertet. Dabei wurden jeweils die CT-Werte des Zielgens der Behandlungsgruppe mit dem der Kontrollgruppe und die CT-Werte des Referenzgens der Behandlungsgruppe mit dem der Kontrollgruppe verglichen, unter Anwendung folgender mathematischer Formel:

$$R = 2^{\Delta CT(\text{Zielgen})} / 2^{\Delta CT(\text{Referenzgen})}$$

wobei R = relative Veränderung,

$\Delta CT(\text{Zielgen}) = (\text{CT Kontrollgruppe} - \text{CT Behandlungsgruppe})_{\text{Zielgen}}$

und $\Delta CT(\text{Referenzgen}) = (\text{CT Kontrollgruppe} - \text{CT Behandlungsgruppe})_{\text{Referenzgen}}$

2.3.1.5 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Agarose ist ein Polysaccharid aus Seetang. Mit der Agarosegelelektrophorese lassen sich Nucleinsäuren mit einer Länge von 100 bis 20000 Nucleotide auftrennen, je nach Agarosegehalt. Die Nucleinsäuren wandern aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Agarosegel unter angelegter Spannung zum Pluspol. Durch den Molekularsiebeffekt werden die Nucleinsäuren dabei ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgt mit dem Nucleinsäuren-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid nach UV-Lichtbestrahlung der Wellenlänge 254-366 nm. Für die Herstellung der Gele wurde 1% Agarose in TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst. Die Plasmid-DNA wurde in Bromphenolblauhaltigem 6× Auftragspuffer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Flachbettkammer durchgeführt, die mit 1× TAE-Puffer bis über das Gel gefüllt wurde. Als Längenstandard wurde 10 µl Mass Ruler™ DNA Ladder mit auf jedes Gel aufgetragen. Die Gele wurden unter UV-Beleuchtung fotografiert.

2.3.1.6 Präparative Gelelektrophorese

Im Agarosegel aufgetrennte PCR-Produkte, die im Rahmen der Klonierung synthetisiert wurden, wurden unter UV-Licht (312 nm) mit einer Rasierklinge herausgeschnitten und mittels des „Gel-Extract“-Kits von Macherey und Nagel nach Herstellerangaben extrahiert.

2.3.1.7 A-Tailing und TOPO-TA-Ligation

Zur Generierung von 3'-A-Überhängen wurden 7 µl des mittels Gelextraktion gereinigten Fusionsproduktes mit 1 µl 2 mM dATP, 1 µl 10 mM MgCl₂ und 1 µl Taq-Polymerase (entsprechen 5 Units) bei 70°C für 30 min in einem Biometra Thermocycler inkubiert.

4 µl des A-Tailing-Ansatzes wurden für 5 min bei 25°C mit 1 µl TOPO-Salzlösung und 1 µl des TOPO-pCR/GW/H8-Vektors inkubiert. 3 µl dieses Ansatzes wurden für die anschließende Hitzeschock-Transformation chemisch kompetenter TOP-10 E. coli s. 2.3.1.1 verwendet.

2.3.1.8 Restriktionsverdau

Restriktionsanalysen wurden zur Kontrolle von Klonierungen mit Enzymen der New England Biolabs nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 2 µl Plasmid, 1 µl Enzym, 1 µl 10x BSA, 1 µl NEB-Puffer und 5 µl dH₂O

wurden bei 37°C für 1,5 h inkubiert. Das restringierte Plasmid wurde im Agarosegel aufgetrennt (s. 2.3.1.5).

2.3.1.9 Klonierung eines PMCA2-Expressionsplasmids pPMCA2.EGFP-N1

Für die transiente Überexpression der humanen PMCA2 im Zellkultursystem wurde ein PMCA2-Expressionsvektor kloniert. Dazu wurde folgende Klonierungsstrategie durchgeführt:

1. Gewinnung humaner cDNA aus SH-SY5Y-Zellen (s. 2.3.1.4) als Ausgangsmaterial
2. Amplifikation der für die PMCA2 kodierenden Sequenz (PMCA2-CDS) aus humaner cDNA
3. Präparative Agarosegelelektrophorese
4. A-tailing des PCR-Produktes (Anfügen eines 3'-A-Überhangs)
5. TOPO-TA-Ligation (Einbringen des PCR-Produktes in den -pCR8/GW/TOPO-Vektors
6. Amplifikation der PMCA2-CDS aus dem TOPO-Vektor unter Verwendung von verlängerten Primern mit spezifischen Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen des Expressionsvektors pEGFP-N1 und anschließende Ligation

Die PMCA2-CDS wurde unter Verwendung der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) gemäß den Herstellerangaben aus humaner cDNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden darauf im Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Amplifikat unter UV-Licht (312 nm) mit einer Rasierklinge herausgeschnitten und mittels des „Gel-Extract“-Kits von Macherey und Nagel nach Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt. Da für die folgende TOPO-TA-Ligation 3'-A-Überhänge vorhanden sein müssen, wurden diese nachträglich generiert, was als A-Tailing bezeichnet wird. Zur Generierung von 3'-A-Überhängen wurden 7 µl des mittels Gelextraktion gereinigten Fusionsproduktes mit 1 µl 2 mM dATP, 1 µl 10 mM MgCl₂ und 1 µl Taq-Polymerase (entsprechen 5 Units) bei 70 °C für 30 min in einem Biometra Thermocycler inkubiert. Für die anschließende TOPO-TA-Ligation wurden 4 µl des A-Tailing-Ansatzes für 5 min bei 25 °C mit 1 µl TOPO-Salzlösung und 1 µl des pCR8/GW/TOPO-Vektors inkubiert. 3 µl dieses Ansatzes wurden

nun für die anschließende Hitzeschock-Transformation (s. 2.3.1.1) chemisch kompetenter *E. coli* (DH5 α) verwendet.

Nach Isolierung des Plasmids wurde dieses für die PMCA2-Amplifikation verwendet mit entsprechenden Primersequenzen (s. Tab. 2) für die Klonierung in den Expressionsvektor pEGFP-N1 nach Restriktion mit Nhe I und Hind III. Das Amplifikat wurde nach präparativer Agorosegelelektrophorese (wie oben) aufgereinigt, über Nacht mit den Restriktionsenzymen Nhe I und Hind III bei 37 °C inkubiert und dann unter Verwendung des Rapid DNA-Ligation-Kits (Roche) mit dem verdauten linearisierten Expressionsvektor ligiert. 3 μ l des Ligationsansatzes wurden dann für die Transformation (s. 2.3.1.1) zur Vervielfältigung eingesetzt (s. 2.3.1.2).

Tabelle 2: Primer für die Klonierung eines humanen PMCA2-Expressionsplasmids pPMCA2:EGFP-N1

Primer für die Amplifikation aus cDNA	
PMCA2 for	5'-ATGGGTGACATGACCAACAGCG-3'
PMCA2 rev	5'-CTAAAGCGACGTCTCCAGGCTG-3'
Primer für die Klonierung	
PMCA2ext lng f	5'-TACGCTAGCTATATGGGTGACATGACCAACAGCG-3'
PMCA2gfp lng r	5'-CACAAGCTTTACAAGCGACGTCTCCAGGCTGTG-3'

2.3.2 Zellkulturtechniken

Für die *in vitro* Untersuchungen der Ca²⁺-Homöostase in Toxin-basierten Modellen der Parkinson-Erkrankung wurden die klonale Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y (American Type Cell Collection) sowie Primärneuronen aus dem Mittelhirn von embryonalen Ratten (E 17, Sprague Dawley) kultiviert. Für die Untersuchungen der altersassoziierten Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase wurden adhärenente IMR-90 Lungenfibroblasten verwendet.

Kulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) + 4,5 g Glucose, 2 mM L-Glutamin
weitere Zusätze: 10% inaktiviertes, fötales Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat

Neurobasalmedium (Gibco)

unter Zusatz von 1 mM Glutamax (Gibco), 50X Supplement B 27 (Invitrogen), 0,5% Gentamycin (Gibco)

2.3.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer verwendet. Dazu wurden die Zellen 4 min bei 1200 rpm sedimentiert und in 1 ml DMEM oder Neurobasalmedium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurde ein Aliquot 1 zu 1 mit Trypanblau in PBS (Invitrogen) vermischt und zur Bestimmung der genauen Zellzahl in der Lösung in einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

2.3.2.2 Kultivierung, Subkultivierung und Kryokonservierung klonaler Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml auf 37 °C erwärmtes DMEM resuspendiert. Nach Sedimentation für 4 min bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml DMEM resuspendiert, in eine 10 cm Kulturschale gebracht und unter Standardkulturbedingungen (37 °C und 5% CO₂) kultiviert. Zur weiteren Kultivierung wurde nach 24 - 48 h das Medium abgesaugt, die adhären Zellen mit auf 37 °C erwärmtem PBS gewaschen und für wenige Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, um sie voneinander und vom Boden zu lösen. Die Reaktion wurde mit 5 ml Serum-haltigem Medium abgestoppt, in das die Zellen dann aufgenommen und für 4 min bei 1200 rpm sedimentiert wurden. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension in 10 ml Medium wurden die Zellen im Verhältnis von 1 zu 5 passagiert und hiernach in 10 cm Kulturschalen gebracht. Zur Subkultivierung wurden die Zellen alle drei bis vier Tage nach dem gleichen Verfahren passagiert. Nach der 25. Passage wurden die Zellen verworfen.

Zur Konservierung wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, sedimentiert, das Pellet nun in 900 µl Einfriermedium wieder aufgenommen, in ein Einfrierröhrchen überführt und als Gefrierschutz 100 µl DMSO hinzugefügt. Die Zellen wurden danach stufenweise eingefroren, zunächst bei -80 °C für 24 h bis 48 h, um dann in einen Tank mit flüssigem Stickstoff bei -180 °C umgelagert zu werden.

2.3.2.3 Assay zur Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials in Korrelation mit dem mitochondrialen Ca^{2+} -Spiegel

Um eine mögliche Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit dem mitochondrialen Ca^{2+} -Spiegel zu untersuchen wurden SH-SY5Y-Zellen wie unter 2.3.2.5.1 beschrieben mit dem mitochondrialen „Cameleon“-Plasmid transfiziert und am Folgetag mit 250 μM MPP⁺ behandelt. 17 h nach der Behandlung wurden die Zellen mit 100 nM Mitotracker Red CMX-Ros (Invitrogen), einem Membranpotential-sensitiven und Mitochondrien-spezifischen Fluorophor, für 1 h inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden jeweils in identischen Zellen der Behandlungsgruppe bzw. in der unbehandelten Kontrolle der mitochondriale Ca^{2+} -Spiegel (s. 2.3.3), sowie die Fluoreszenzintensität des Mitotrackers ermittelt. Aufgrund der kationischen Eigenschaft von Mitotracker Red CMX-Ros wird es in der Mitochondrienmatrix abhängig vom physiologischen Membranpotential angereichert. Zur Ermittlung der Fluoreszenzintensität wurden die Zellen mit einer CCD-Kamera unter Verwendung eines 535/610 nm-Filters fotografiert und mit der Olympussoftware Cell^R ausgewertet.

2.3.2.4 Präparation und Kultivierung neuronaler Primärzellen

Es wurden embryonale Zellen aus dem Mittelhirn der Ratte präpariert. Die Embryonen wurden einer schwangeren Ratte am 17. Tag der Embryonalentwicklung entnommen. Dazu wurden die schwangeren Ratten mit dem Inhalationsnarkotikum Halothan (Isofluran, Abott) auf folgende Weise betäubt: Die Ratte wurde in einen abgedeckten Eimer gebracht, der mit Narkotikum beträufeltes Zellstoffpapier enthält, wobei darauf geachtet wurde, dass die Ratte selbst nicht mit dem ätzenden Betäubungsmittel in Berührung kam. Dieser Schritt wurde unter einem Abzug durchgeführt. Nach 2 min wurde der Wirkungseintritt überprüft, indem der Schwanz gekniffen wurde und auf ein Zucken der Ohren und Augen geachtet wurde. Zeigte die Ratte keine Reaktion, wurde der Tod durch Genickbruch mit Hilfe einer Guillotine herbeigeführt. Nach der Tötung wurde die Bauchdecke mit 70% Ethanol desinfiziert und aufgeschnitten. Die Embryonen wurden von der Placenta getrennt und in eine Petrischale überführt. Die Köpfe wurden abgetrennt und in einer Petrischale mit kaltem PBS auf Eis gesammelt. Darauf wurde die noch weiche, knorpelige Schädeldecke geöffnet, um die Gehirne zu entnehmen, die wiederum in einer Petrischale mit kaltem PBS auf Eis gesammelt wurden. Die Mittelhirnareale, die die dopaminergen Neurone der Substantia Nigra enthalten, wurden unter dem Binokular isoliert und in Petrischalen mit Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco) gesammelt. Um das Gewebe zu dissoziieren,

wurde es für 20 min in 10 ml Trypsin-haltiger PBS-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem die Gewebestücke mit einer 10 ml Plastikpipette in 10 ml FCS haltige HBSS gegeben wurden und darin auf- und abpipettiert wurden. Darauf wurden die gelösten Zellen durch eine zuvor mit 100% Ethanol desinfizierte GAZE filtriert und direkt in 10 ml FCS/HBSS aufgenommen und für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach der Sedimentation wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 5 ml Supplement B27-haltigem Neurobasalmedium resuspendiert, in einer Neubauerkammer gezählt und zu 1×10^5 Zellen pro Well in einer mit Poly-L-Ornithin (0,1 mg/ml) beschichteten 24-Well-Kulturplatte ausplattiert. Die frisch ausplattierten Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

2.3.2.5 Überlebensanalysen durch Bestimmung der Zellvitalität mit „Cell Titer Blue“

Bei dieser fluorometrischen Methode wird die metabolische Aktivität von Zellen mittels des Indikators Resazurin, der im oxidierten Zustand vorliegt, bestimmt. Ist Zellaktivität vorhanden, wird blaues Resazurin zu rotem Resorufurin reduziert, welches ein Fluoreszenzsignal generiert. Resorufin lässt sich mit Licht bei einer Wellenlänge von 530 nm anregen und emittiert bei einer Wellenlänge von 590 nm, was im Fluorometer gemessen werden kann. Das Fluoreszenzsignal ist dann proportional zu der Zahl der lebenden Zellen.

2.3.2.6 Transiente Transfektionen

Für die transiente Transfektion mit Plasmiden oder small interfering RNA (siRNA, s. Tab. 2) wurde die Elektroporations- oder Lipofektionstechnik angewendet. siRNA Oligonukleotide wurden über MWG Eurofins bezogen und entworfen. Die siRNAs wurden in 1x siMAX Universal Buffer (1 µg/µl) gelöst und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3: small interfering RNAs

CREB (1)	5'-UGACUUAUCUUCUGAUGCAdTdT-3'
CREB (2)	5'-ACAGUUCAGUCUCCUGUATTdTdT-3'
ERK1/2	5'-UGACCAUAUCUGCUACUUCdTdT-3'
humanPMCA2	5'-UGACCUCAAGAUUUGAUGAAdTdT-3'
human-nonsense	5'-GGGAAAUGCGUUAGCAGUGAUdTdT-3'
ratPMCA2 (1)	5'-UGCAGCUUUUCAACGAGAUdTdT-3'
rat-PMCA2 (2)	5'-UGCAGCUUUUCAACGAGAUdTdT-3'
rat-nonsense	5'-AGAGACUCGGAAACCCAUAUdTdT-3'

2.3.2.6.1 Elektroporation von SH-SY5Y-Zellen

Für die transiente Expression von Plasmiden oder siRNA-Transfektion in SY5Y-Zellen wurden die Zellen elektroporiert. Dazu wurde ein Amaxa[®]-Elektroporator verwendet und folgendes Protokoll durchgeführt: ca. 70% konfluente Zellen wurden wie unter 2.3.2.2 beschrieben sedimentiert, in 1 ml Standard-Medium aufgenommen und gezählt. Davon wurden 5×10^6 Zellen in 400 μ l Standard-Medium mit 40 μ g Plasmid oder 20 μ g siRNA in eine Elektroporationsküvette (4 mm, Sigma) pipettiert und elektroporiert. Darauf wurde der Ansatz für 8 min ruhen gelassen, um den Eintritt des Transgens in die Zelle durch die mittels des Stromstoßes induzierten Poren zu gewährleisten. Nach der Ruhephase wurden die Zellen in 6-Well-Platten mit einer Anzahl von 5×10^5 pro Well und 2 ml Medium kultiviert. Für die Durchführung von Ca^{2+} -Imaging-Experimenten wurde die gleiche Zellzahl in 1 ml Medium in 35 mm Ibidi[®]-Schalen gegeben.

2.3.2.6.2 Lipofektion von Primärneuronen

Für die transiente Expression von Plasmiden oder siRNA-Transfektion in Primärneuronen wurden die Zellen nach der Präparation sieben Tage *in vitro* (DIV, engl.: days in vitro) kultiviert und dann mittels Lipofektion transfiziert. Dazu wurde Lipofectamine[®] 2000 für Plasmide bzw. Lipofectamine RNAiMAX von Invitrogen für siRNA nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.3 Ca²⁺-Messungen, Live Cell Imaging und Fluoreszenzmikroskopie

Messungen basaler zytosolischer, mitochondrialer oder retikulärer Ca²⁺-Spiegel, sowie Aktivitätsmessungen zytosolischer Ca²⁺-Bewegungen wurden in Echtzeit mittels des GFP-basierten „Cameleon“-Sensors durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine zirkulär permutierte, „Venus“ Version Yellow Cameleon 3.6 (Nagai et al., 2004) für die zytosolische Ca²⁺-Messung verwendet. Für die Messungen im ER bzw. im Mitochondrium wurden „Cameleon“-Varainten mit einer entsprechenden mitochondrialen Zielsequenz (mt-cameleon) bzw. mit einer ER-Signalsequenz (D1ER-cameleon) verwendet (Palmer et al., 2004, 2006). SH-SY5Y-Zellen wurden entsprechen 2.3.2.6.1 bzw. 2.3.2.6.2. mit „Cameleons“ transfiziert und auf Ibidi- μ -Kulturschalen (3,5 cm) kultiviert. Nach gewünschter Behandlung wurden Ca²⁺-Messungen an lebenden Zellen mit einem invertierten Olympus IX 81 Fluoreszenzmikroskop unter Standardzellkulturbedingungen (s. 2.3.2.2) durchgeführt. Transfizierte Zellen wurden unter Verwendung von 40x- und 60x-Ölimmersionsobjektiven (numerische Apertur NA 1.35) bei 430/25 nm mit dem MT 20 Illumination System von Olympus angeregt. Für die Dual-Emission des blauen CFP und gelben YFP wurde ein schnelles externes Filterrad mit einem 475/20 nm- und einem 542/72 nm-Filter eingesetzt. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Olympus CCD-FV2D Kamera durchgeführt. Um ein Ausbleichen und Fluoreszenzlicht-induzierten Stress zu vermeiden, wurden die Zellen maximal 75 ms bei einem 4x Binning und höchstens 7% Intensität exponiert. Sämtliche Parameter wurden mittels CellR-Software von Olympus gesteuert. Messungen mit dem Ca²⁺-Indikator Fura-2 AM (Invitrogen) wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.4 Proteinbiochemische Methoden

2.3.4.1 Proteinpräparation und -quantifizierung

Gesamtproteinisolierung

Dazu wurden in 6- oder 12-Well-Platten kultivierte Zellen nach Entfernung des Mediums mit kaltem PBS gewaschen und nach vorsichtigem Absaugen des PBS mit 65 μ l SDS-Protein-Lysispuffer behandelt, vom Boden der Kulturschale abgeschabt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße gebracht. Dem Lysispuffer wurde kurz vor Gebrauch ein Protease-/Phosphataseinhibitor-Cocktail zugefügt (Sigma). Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

SDS Protein Lysispuffer

62.5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2% SDS, 10% Saccharose

Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurden die Proben zuerst 10 s bis 20 s sonifiziert. Die Konzentration wurde mittels eines BCA-Assay der Firma Pierce ermittelt. 5 µl der Proteinproben wurden mit 20 µl Wasser verdünnt, als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe verwendet. Nach Zugabe von 100 µl BCA-Reagenz wurden die Proben bei 60 °C für 15 min inkubiert. Danach wurden die Proben bei 562 nm photometrisch gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der Standardkurve der BSA-Verdünnung verglichen, um die Konzentration zu ermitteln.

2.3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western Blot Analyse

und immunochemische Detektion

Die Proteine wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht im denaturierten Zustand aufgetrennt. Es wurden Protean-3-Elektrophoresekammern von Biorad für Minigele benutzt. Die Gele wurden in zwei Glasplatten mit 1,5 mm Abstandshaltern gegossen. Nach dem Gießen des angesetzten Trenngels wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet, um eine möglichst flache Grenzfläche herzustellen. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und die Grenzschicht mit bidestilliertem Wasser ausgespült. Danach wurde der Sammelgelansatz darüber gegossen und mit einer Schablone für 10-15 Taschen versehen, die nach Polymerisation vor dem Auftragen der Proben entfernt wurde. Es wurden jeweils 5-15 µg der Lysate mit Lysispuffer auf 9 µl aufgefüllt und mit 3 µl 4×Auftragspuffer vermischt. Die 12 µl einer Probe wurden pro Tasche aufgetragen. Als Größenstandard wurden 2 µl des PeqGOLD Proteinmarker IV und PageRuler (prestained) der Firma Peqlab verwendet. Um eine möglichst gerade Auftrennung der Proteinbanden zu erreichen, wurde in die Seitentaschen nur in Lysispuffer verdünnter Auftragspuffer aufgetragen. Der Sammelgellauf erfolgte bei 90 V, der Trenngellauf bei 165 V in 1× Bis-Tris Gels mit MES running buffer (Invitrogen) oder in einem Tris/SDS-Gel in SDS-Laufpuffer.

Bis-Tris-Sammelgel

0,354 M Bis-Tris pH (6,8), 4% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40%), 0,07% APS
0,3% TEMED

Bis-Tris-Trenngel

0,367 M Bis-Tris (pH 6,8), 8%-12% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40%), 0,07% APS
0,1% TEMED

SDS-Trenngel

0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 8%-12% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40%), 0,1% SDS
0,05% TEMED, 0,1% APS

SDS-Sammelgel

0,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 5% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40%), 0,1% SDS,
0,05% TEMED, 0,1% APS

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM Glycin, 0,1% SDS

4xProbenpuffer

200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40% Glycerin, 4% SDS, 0,02% Bromphenolblau
20% β -Mercaptoethanol

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine weiter elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (geblottet). Der Sandwichblot war in folgender Reihenfolge aufgebaut: Pluspol (rot), 1 x Schwamm, 1 x Gel-Blotting-Papier, Nitrozellulose-Membran, Gel, 1 x Gel-Blotting-Papier, 1 x Schwamm, Minuspol (schwarz). Der Transfer wurde in Mini-Trans-Blot-Zellen für Minigele von Biorad oder NuPage in Transferpuffer bei 20 °C über Nacht bei 30 V oder für 2,5 h bei 48 V durchgeführt. Zur Kontrolle eines gelungenen Blots und des korrekten quantitativen Übertrags der Proteine wurde die Membran PonceauS gefärbt. Vor und nach der Färbung wurde die Membran in bidestilliertem Wasser gewaschen.

Transferpuffer

25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20% Methanol

PonceauS-Lösung

0,02% PonceauS, 0,3% Trichloressigsäure, 0,3% Sulphosalicylsäure

Zwischen jedem der folgenden Schritte wurde die Membran dreimal je 5 min in PBST oder TBST, je nach Antikörperherstellerangaben, gewaschen. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit Blockingpuffer inkubiert (PBS oder TBS/0,05% Tween mit 5% w/v Trockenmilchpulver/0,1% NaN₃). Dadurch sollten unspezifische Bindungsstellen der Membran abgedeckt werden. Danach wurde die Membran mit dem jeweiligen für das gesuchte Protein spezifischen primären Antikörper (s. Tab. 3) über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei 20 °C unter sanftem Schütteln inkubiert. Der Antikörper wurde in PBST oder TBST nach Herstellerangaben verdünnt. Der Sekundärantikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet und mit einer Peroxidase gekoppelt.

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper für Western Blot (ohne Kennzeichnung) und für Immunocytochemie (IZ)

anti-PMCA2	P1244; Sigma
anti-panPMCA (H-300)	sc-28765; Santa Cruz
anti-SERCA2	4388; Cell Signaling
anti-panNCX (H-300)	sc-32881; Santa Cruz
anti-p44/42 (Erk1/2)	9102; Cell Signaling
anti-phospho-p44/42 (phospho-ERK1/2)	9106; Cell Signaling
anti-CREB	06-863; Millipore
anti-phospho-CREB (Ser133)	06-519; Millipore
anti-Tyrosinhydroxylase	T2928; Sigma
anti-Caveolin1	610406; BD Biosciences
anti-MAP2	M3696; Sigma
anti-MAP2, IZ	M4403; Sigma
anti-Tubulin	T9026; Sigma
anti-Aktin	A5060; Sigma

Das Enzym löst nach Zugabe des Substrats eine Lumineszenzreaktion aus, wodurch das detektierte Protein letztendlich visualisiert wird. Der Sekundärantikörper wurde 1:5000 – 1:10000 in PBST bzw. TBST mit 5% w/v Trockenmilchpulver verdünnt und bei Raumtemperatur für 1,5 h unter Schütteln auf der Membran belassen. Zur Visualisierung

wurde die Membran mit 1 ml ECL-Lösung inkubiert und mit einer Fuji LAS-300 Intelligent Dark Box fotografiert. Zur Quantifizierung wurde die Bildbearbeitungssoftware ImageJ verwendet.

2.3.4.3 Immunozytochemie

Um immunochemische Fluoreszenzfärbungen mittels optischer Techniken optisch darzustellen, wurden die Zellen in 12- oder 24-Well-Platten auf zuvor mit Poly-L-Ornithin (Sigma) beschichteten Deckgläschen kultiviert und nach der gewünschten Behandlung mit eiskaltem PBS gewaschen und darauf mit einer 4%igen Paraformaldehyd-PBS-Lösung für 20 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/0,2% TritonX100 (je 15 min) wurden die Zellen mit PBS/3% Rinderserumalbumin bei 20 °C für 1 h geblockt und dann mit dem entsprechenden Primärantikörper (s. Tab. 3) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Darauf wurden die Zellen nach dreimaligem kurzem Waschen mit PBS mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 h bei 20 °C inkubiert, nochmals gewaschen, mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI; 1 µg/ml) zur Markierung von DNA des Zellkerns gegengefärbt und ein letztes Mal gewaschen. Die Deckgläschen wurden nach dem letzten Waschschrift unter Zugabe von 11 µl Moviol mit der mit den Zellen fixierten Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt. Die Färbungen wurden so über Nacht abgedunkelt bei -20 °C ruhen gelassen und dann mittels Fluoreszenzmikroskopie (Axiovert 200, Zeiss ausgestattet mit einer Spot RT CCD-Kamera, Visitron) analysiert.

2.3.5 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders beschrieben, wurden zu jedem Experiment mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt und dann mit dem Studentischen t-Test statistisch ausgewertet. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet bei einer Zufallswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (gekennzeichnet mit *; bei $p < 0,01$ gekennzeichnet mit **; bei $p < 0,001$ gekennzeichnet mit ***). Die statistische Auswertung wurde mit der Anwendungssoftware „GraphPad Prism“ durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Veränderungen der neuronalen Ca^{2+} -Homöostase in MPP^+ -Modellen der Parkinson-Erkrankung

3.1.1 MPP^+ verändert die basalen Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol und den Mitochondrien *in vitro*

Inwiefern eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase bei altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen, besonders bei PD, zum Untergang von Neuronen führt bzw. von Relevanz in der Pathophysiologie ist, wird intensiv erforscht und ist nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen zu Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase nach MPP^+ -Behandlung in der Vergangenheit haben gezeigt, dass dieses Neurotoxin zu einer akuten Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt (Lee et al., 2006). Weiterhin zeigten Sørensen et al. nach einer Inkubationszeit von 24 h mit MPP^+ einen Anstieg der zellulären Ca^{2+} -Konzentration, wobei jedoch eine verhältnismäßig hohe Dosis (2 mM) eingesetzt wurde (Sørensen et al., 2009). Ferner wurde in Experimenten mit Cybriden (Esteves et al., 2010) eine Verminderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Kapazität beobachtet. Bei Cybriden handelt es sich um hybride Zelllinien, bei welchen nach Entfernen der eigenen mitochondrialen DNA mitochondriale DNA aus Blutplättchen von PD-Patienten bzw. Kontrollpatienten ein- und zur Expression gebracht wird. Es wird somit grundsätzlich angenommen, dass Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase eine Rolle bei der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen spielen könnten. Daher sollte der Einfluss von MPP^+ bei geringerer Konzentration und kürzerer Inkubationszeit auf die Ca^{2+} -Homöostase in der vorliegenden Arbeit genauer analysiert werden.

Um Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase zu untersuchen, wurden humane SH-SY5Y-Zellen und neuronale Primärzellen aus dem Mittelhirn von Rattenembryonen mit dem Ca^{2+} -Indikator „Cameleon“ transfiziert und mit 250 μM MPP^+ behandelt. Die Ratio aus den YFP- und CFP-Emissionen des Ca^{2+} -Indikators wurden zur Bestimmung der relativen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ herangezogen. Während sich in SH-SY5Y-Zellen nach 18 h eine milde Erhöhung der Ca^{2+} -Spiegel zeigte, konnte in den Primärneuronen ein Anstieg des Ca^{2+} -Signals von etwa 75 % gemessen werden (s. Abb. 4). Die möglichen Ursachen dieser Erhöhung wurden unter 3.1.2 bis 3.1.4 näher untersucht.

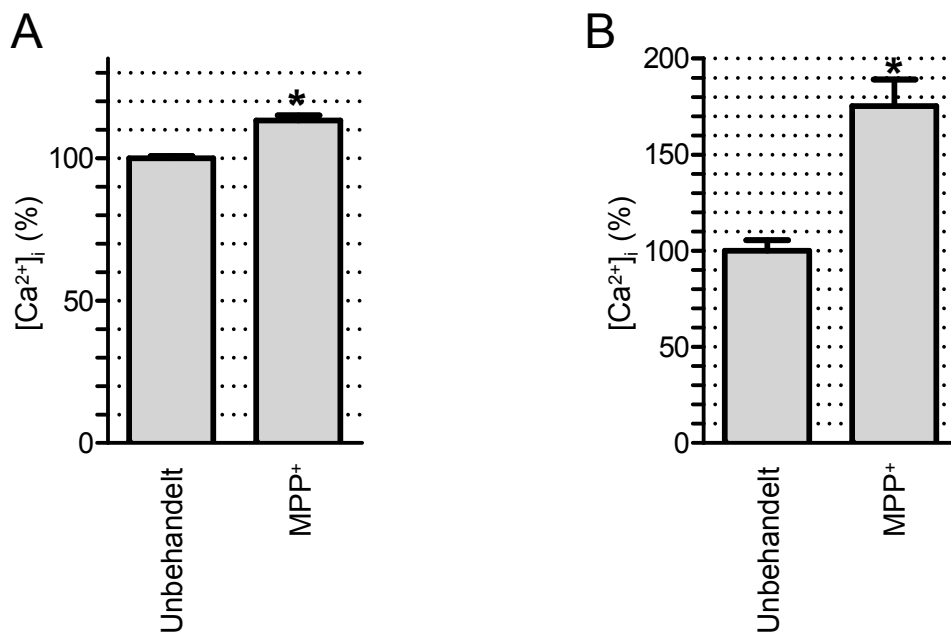


Abbildung 4: Erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen im Zytosol nach MPP⁺-Behandlung. In den Balkendiagrammen sind jeweils die zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen nach MPP⁺-Behandlung dargestellt. Die Messwerte wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. **(A)** In SH-SY5Y-Zellen, die mit 250 µM MPP⁺ inkubiert wurden, wurde eine leichte Erhöhung der basalen zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach 18 h gemessen (* MPP⁺ zu Kontrolle, $p < 0,05$, $n = 3$). **(B)** In primären Mittelhirnneuronen aus Rattenembryonen wurde nach 4 h Inkubation mit 250 µM MPP⁺ ein deutlicher Anstieg der basalen zytosolischen Ca²⁺-Konzentration ermittelt (* MPP⁺ zu Kontrolle, $p < 0,05$, $n = 4$).

Des Weiteren wurde der Einfluss von MPP⁺ auf die Ca²⁺-Homöostase im ER und im Mitochondrium in SH-SY5Y-Zellen untersucht. Während die basalen Level im ER keine Veränderungen zeigten (ohne Abbildung), konnte in den Mitochondrien eine Abnahme des Ca²⁺-Signals beobachtet werden (s. Abb. 5A). Eine mögliche Ursache könnte in der Depolarisation des Membranpotentials liegen. Zum einen ist eine Abnahme dieses Membranpotentials nach MPP⁺-Behandlung beschrieben worden (Hajieva et al., 2009b). Zum anderen bildet das mitochondriale Membranpotential die Grundlage für den elektrochemischen Gradienten, der für den mitochondrialen Ca²⁺-Einstrom notwendig ist. Daher wurde das mitochondriale Membranpotential mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Mitotracker Red bestimmt und gleichzeitig der mitochondriale Ca²⁺-Gehalt untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zu untermauern.

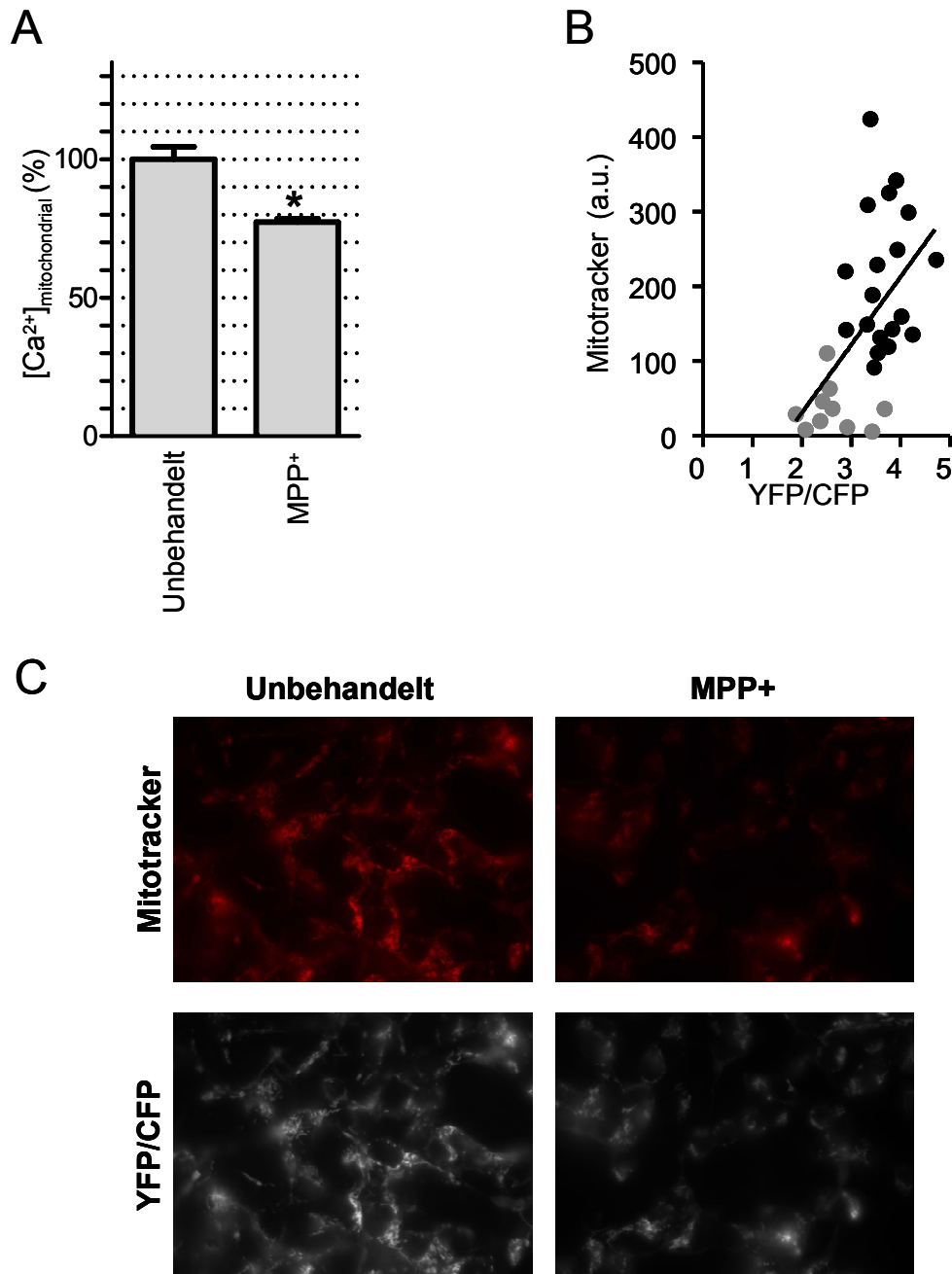


Abbildung 5: Der Einfluss von MPP⁺ auf die mitochondriale Ca²⁺-Homöostase. (A) Darstellung des mitochondrialen Ca²⁺-Spiegels: Nach 18 h Inkubation mit 250 μM MPP⁺ nimmt das Ca²⁺-Signal, gemessen mit einer Mitochondrien-spezifischen „Cameleon“-Variante, in SH-SY5Y-Zellen um etwa 23 % ab (* MPP⁺ zu Kontrolle, $p < 0,05$, $n = 5$). (B) zeigt die Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit dem mitochondrialen Ca²⁺-Spiegel. In MPP⁺-behandelten Zellen (graue Punkte) korreliert die Ca²⁺-Abnahme mit der Abnahme des Fluoreszenz-Indikators Mitotracker Red bzw. die Ca²⁺-Zunahme mit der Zunahme des Fluoreszenz-Indikators Mitotracker Red (schwarze Punkte) in unbehandelten Zellen ($r = 0,5504$ (Bestimmtheitsmaß), $p < 0,01$, die Korrelation ist somit signifikant. Die Regressionsgerade ist durch $y = 91,06x - 151,23$ definiert.). In (C) sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Mitochondrien von SH-SY5Y-Zellen dargestellt.

Die Messungen zeigten, dass eine Abnahme des Membranpotentials in derselben Zelle mit der Abnahme der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration korreliert (s. Abb. 5B).

In den folgenden Experimenten sollte mittels funktioneller und biochemischer Analysen näher untersucht werden, welcher Prozess der zytosolischen Ca^{2+} -Erhöhung zu Grunde liegt und welche Folgen die erhöhte Ca^{2+} -Last auf Dauer hat.

3.1.2 Der zelluläre Ca^{2+} -Efflux ist durch MPP^+ beeinträchtigt

Unsere Vorarbeiten haben gezeigt, dass es unter MPP^+ -Einfluss zu Veränderungen der basalen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kommt. Man nimmt an, dass solche Veränderungen durch eine Zu- oder Abnahme bzw. eine Störung des Ca^{2+} -Influx- oder Ca^{2+} -Efflux-Systems hervorgerufen werden können, da die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration im Wesentlichen das Ergebnis des Gleichgewichts zwischen Ein- und Ausstrom ist (Berridge et al., 2003). Die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase 2 (PMCA2) ist essentiell für den neuronalen Ca^{2+} -Efflux. Eine direkte Messung der Aktivität der PMCA2 in einem Zellkultursystem ist bisher nicht möglich: Zum einen sind keine selektiven Inhibitoren bzw. Aktivatoren verfügbar, die es erlauben einen PMCA2-abhängigen Ca^{2+} -Efflux zu untersuchen. Zum anderen beruht die enzymatische Aktivität von PMCA2 auf der hydrolytischen Spaltung von ATP, die zwar generell, jedoch nicht für eine spezifische ATPase, über enzymgekoppelte Methoden bestimmt werden kann. Um die Enzymaktivität einer spezifischen ATPase, wie PMCA2, zu messen, muss diese daher aufgereinigt und in einem zellfreien *in vitro*-System untersucht werden (Mohamed et al., 2010). Alternativ wurden indirekte Methoden etabliert, die einen Hinweis auf die grundsätzliche Ca^{2+} -Efflux-Leistung geben können (Fernandes et al., 2007), wobei Ca^{2+} -Messungen nach einem experimentell stimulierten Ca^{2+} -Einstrom vorgenommen werden.

Um den Ca^{2+} -Efflux im MPP^+ -Modell zu untersuchen, wurde daher mittels einer KCl-induzierten Membrandepolarisation ein Ca^{2+} -Influx hervorgerufen, um dann die Wiederherstellungszeit zu messen, die die Zelle nach der Repolarisation für die Regeneration von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ benötigt.

Mit MPP^+ behandelte Zellen benötigten nach einem experimentell induzierten Ca^{2+} -Influx im Mittel etwa doppelt so lange wie unbehandelte Zellen, bis sie das Ausgangsniveau wieder erreichten (s. Abb. 6). Dieser deutliche Anstieg der Wiederherstellungszeit ist ein

Indiz für eine Störung des Ca^{2+} -Efflux-Systems, das im nächsten Abschnitt genauer untersucht wurde.

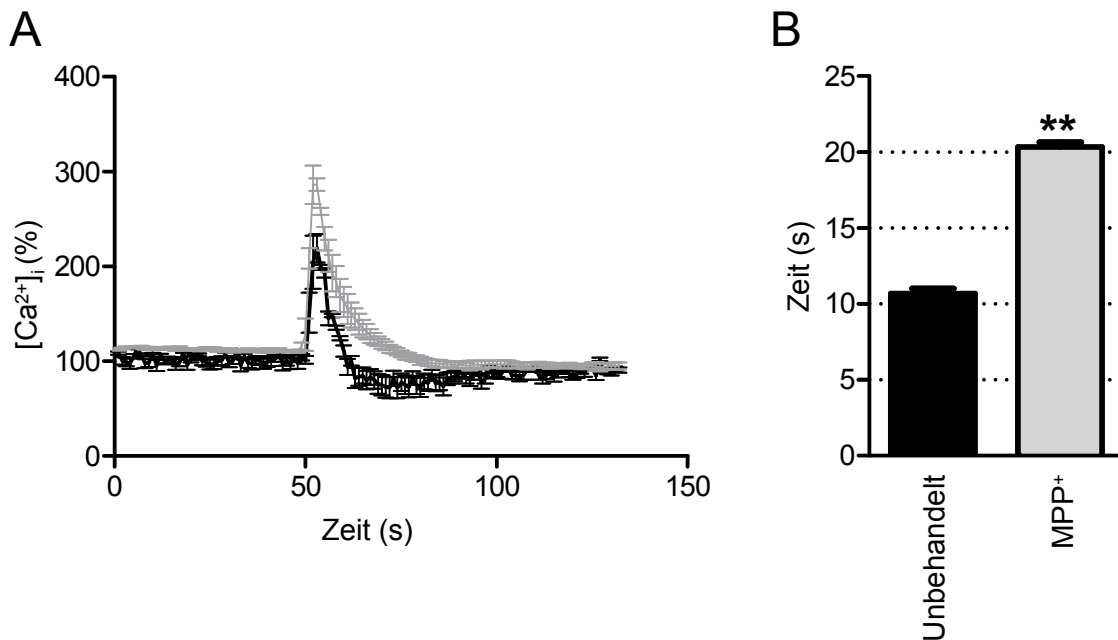


Abbildung 6: Untersuchung der Ca^{2+} -Effluxleistung nach KCl-induziertem Ca^{2+} -Influx und MPP^+ -Behandlung. (A) Darstellung des relativen zytosolischen Ca^{2+} -Einstroms in Abhängigkeit von der Zeit, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. Die schwarze Kurve stellt den Ca^{2+} -Influx in unbehandelten SH-SY5Y-Zellen dar. Grau ist der Ca^{2+} -Einstrom in 18 h MPP^+ (250 μM) behandelten SH-SY5Y-Zellen dargestellt. **In (B)** ist die durchschnittliche Zeit gezeigt, die die Zelle benötigt, bis das Ausgangsniveau der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach dem experimentell induzierten Ca^{2+} -Influx wieder erreicht ist. (** MPP^+ zu Kontrolle, $p < 0,01$, $n = 3$).

3.1.3 MPP^+ induziert die Abnahme der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase 2 (PMCA2) auf Proteinebene

Um die Ursache der erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bzw. des beeinträchtigten Ca^{2+} -Effluxes nach MPP^+ -Inkubation zu erschließen, wurde das Ca^{2+} -Efflux-System zunächst auf Veränderungen in der Proteinexpression biochemisch untersucht.

Dabei zeigte sich nach MPP^+ -Behandlung eine signifikante Abnahme von PMCA2 um etwa 30 % in SH-SY5Y-Zellen und um etwa 40 % in primären Mittelhirnzellen, während SERCA, die Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums, sowie der membranständige

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX, die ebenfalls an dem Ca^{2+} -Efflux beteiligt sind, nicht signifikant verändert waren (s. Abb. 7).

Der vorher beobachtete Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels und der verzögerte Ca^{2+} -Efflux nach MPP^+ -Behandlung könnten somit durch die Abnahme der PMCA2-Proteinexpression hervorgerufen werden. Der direkte Zusammenhang zwischen PMCA2 und zytosolischem Ca^{2+} -Spiegel wurde in funktionellen Experimenten untersucht (s. 3.4.1).

Die Isoform PMCA2 wird besonders in erregbaren Zellen exprimiert und ist somit überwiegend Neuronen-spezifisch. Interessanterweise war die Abnahme der PMCA2-Proteinmengen in den Primärneuronen deutlicher und wurde bereits nach 4 h MPP^+ -Behandlung beobachtet. Obgleich die PMCA2-Abnahme in SH-SY5Y-Zellen erst nach 18 h eintrat, stellte sich die Frage, ob eine Herabregulation auf Transkriptionsebene für die verringerte PMCA2-Expression eine ursächliche Rolle spielt.

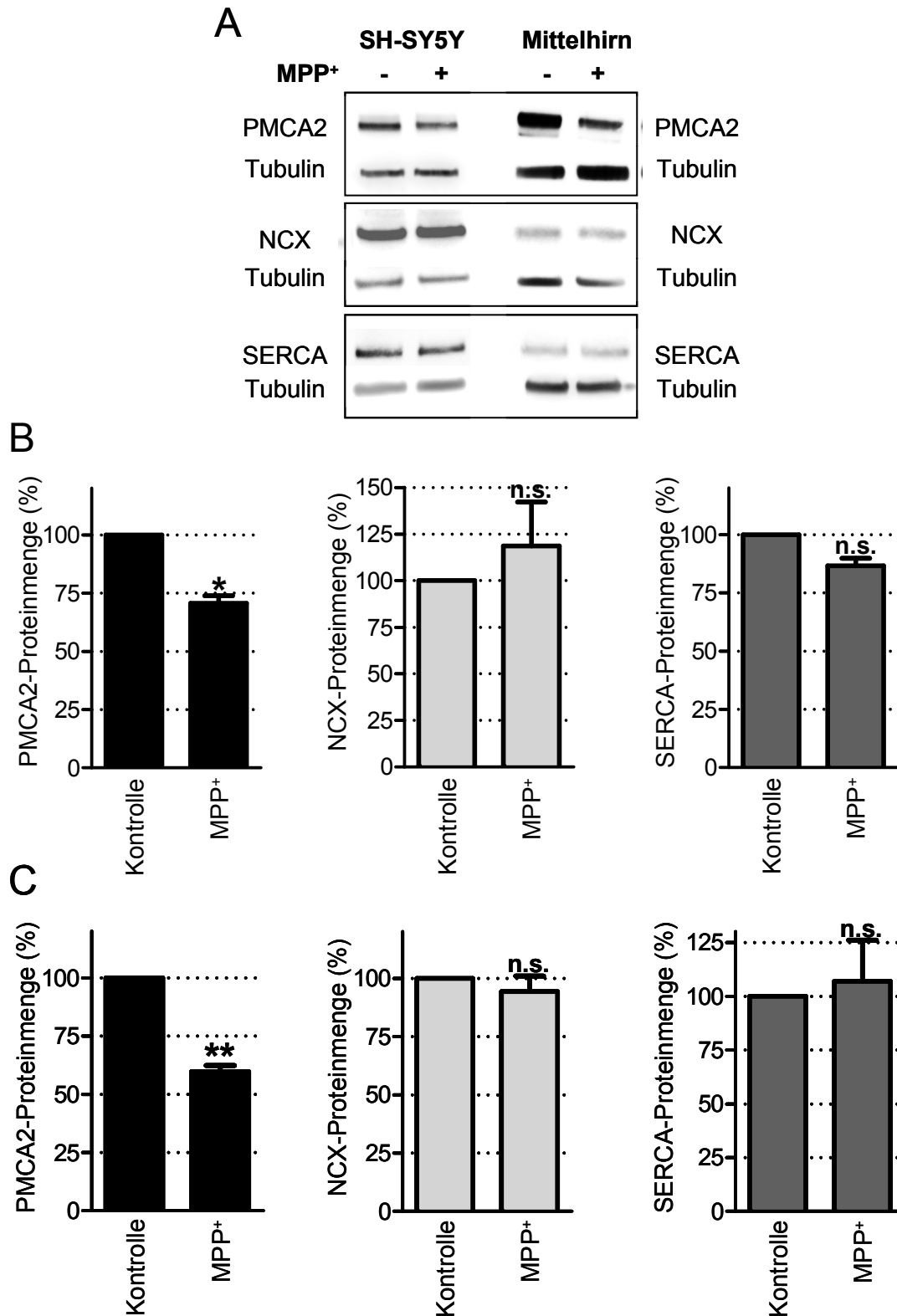


Abbildung 7: Analyse der Proteinexpression von PMCA2, NCX und SERCA nach MPP⁺-Behandlung. (A) zeigt die immunoreaktiven Banden des Western Blots. Jeweils 10 µg (SH-SY5Y-Zellen) oder 5 µg (Primärneuronen) Gesamtproteinmenge wurden in einem BIS-TRIS-gepufferten 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. Die Banden (aus A) wurden densitometrisch quantifiziert und in (B) SH-SY5Y und (C) Primärneuronen im Balkendiagramm dargestellt. (* $p < 0,05$, $n = 3$; ** $p < 0,01$, $n = 3$, n.s.: nicht signifikant, $n = 3$).

3.1.4 MPP⁺ inhibiert die Transkription von PMCA2-mRNA

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der Abnahme der PMCA2-Proteinexpression nach MPP⁺-Behandlung eine transkriptionelle Regulation zu Grunde liegen könnte.

Für die relative Quantifizierung von mRNA, welche für die am Ca²⁺-Efflux beteiligten Proteine kodiert, wurden quantitative PCRs durchgeführt. Die molekularbiologischen Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass die PMCA2-Transkription in SH-SY5Y-Zellen und Primärneuronen signifikant vermindert ist (s. Abb. 8).

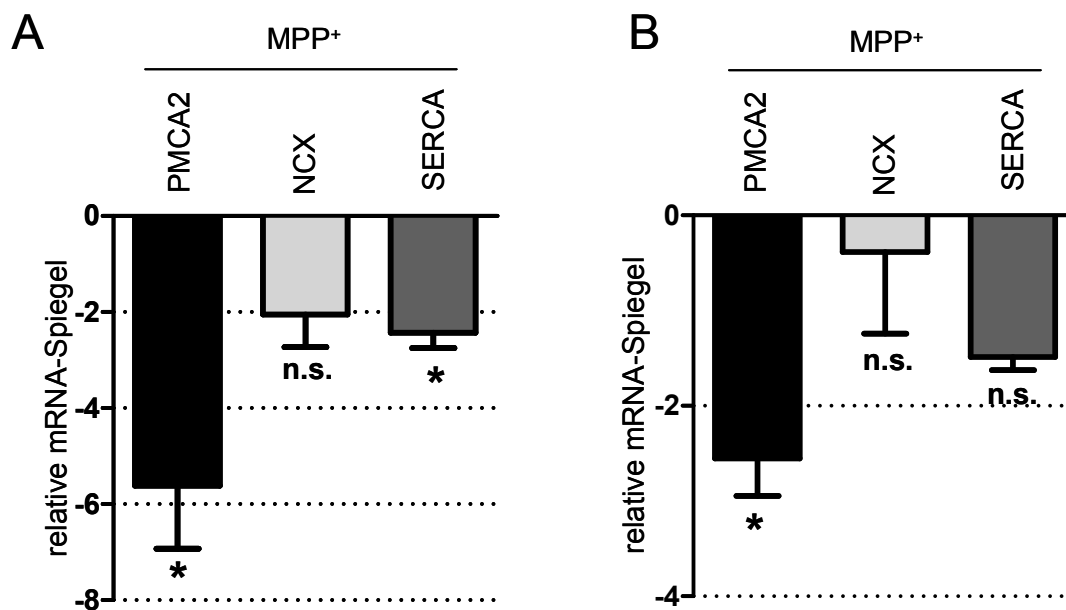


Abbildung 8: Relative Veränderungen spezifischer mRNAs nach MPP⁺-Behandlung. Abgebildet ist die relative Veränderung der mRNA von PMCA2 (schwarz), SERCA (grau) und NCX (weiß) im Verhältnis zu mRNA von GAPDH als Referenzgen in SH-SY5Y-Zellen (A) und Primärneuronen (B) nach MPP⁺-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. SH-SY5Y-Zellen wurden 18 h, Primärneuronen 4 h mit 250 μ M MPP⁺ behandelt. (A) In SH-SY5Y-Zellen wurde eine relative Abnahme der mRNA von PMCA2 und SERCA festgestellt. (B) In Primärneuronen wurde nur eine signifikante relative Abnahme der PMCA2-mRNA beobachtet. (* MPP⁺ zu unbehandelten Kontrolle, $p < 0,05$, $n = 3$, n.s.: nicht signifikant, $n = 3$;).

Die PMCA2-mRNA war in beiden Zellsystemen nach MPP⁺-Behandlung reduziert. Bei der mRNA von SERCA und NCX zeigten sich in Primärneuronen keine signifikanten Veränderungen, während in SH-SY5Y-Zellen neben der PMCA2-mRNA auch die SERCA-mRNA eine signifikante relative Abnahme, wenn auch nur in geringerem

Ausmaß, aufwies. Die Abnahme der PMCA2-mRNA in SH-SY5Y-Zellen war nicht nur gegenüber der unbehandelten Kontrolle sondern auch gegenüber der SERCA- und NCX-mRNA signifikant verringert. In den nächsten Schritten sollte daher der für die transkriptionelle Regulation von PMCA2 verantwortliche Mechanismus aufgeklärt werden.

3.2 Physiologische und pathophysiologische Regulation der PMCA2-Expression

3.2.1 MPP⁺ reduziert die Phospho-CREB-Level

Genomweite Promotorstudien über das palindromische cAMP-response-element-(cre), das den Transkriptionsfaktor CREB binden kann (Montminy and Bilezikjian, 1987), haben gezeigt, dass innerhalb des Promotors des PMCA2-Gens eine Konsensussequenz des Palindroms lokalisiert ist (Zhang et al., 2005). Das cre-Motiv konnte in dieser Studie von Zhang et al. insgesamt 4000-fach im Genom detektiert werden, in einer Promotorreichweite von 3000 kb aufwärts bis 300 kb abwärts. Aktiv bei der Regulation der Transkription beteiligt sind aber lediglich ca. 10% der CREB-Bindemotive. Das Vorhandensein von cre im Promotor ist somit *per se* kein Kriterium, ob CREB an der Transkriptionsinitiation beteiligt ist. Weiterhin können dieselben Gene gewebeabhängig über verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Die cre-Sequenz (TGACGTCA) ist ein Palindrom, das jedoch auch als halbes Palindrom (TGACG/CGTCA) vorkommen kann und trotzdem als Transkriptionsverstärker (Enhancer) voll funktionsfähig ist. Bis jetzt sind einige Faktoren und Voraussetzungen bekannt, die für die Transkriptionsinitiation durch CREB relevant sind (Mayr and Montminy, 2001; Sakamoto et al., 2011). Zunächst kommt es zu einer Dimerbildung von CREB, das dann an die Konsensussequenz binden kann. Außerdem kann CREB am Serinrest 133 (Ser133) durch die Proteinkinase A (PKA) (Gonzalez and Montminy, 1989) oder die Ca²⁺-Calmodulin-abhängigen Kinasen II und IV (CaMKII/IV) phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung ist Voraussetzung für die Aktivierung der Transkription, wobei jedoch umstritten ist, ob dieser Schritt vor oder nach der DNA-Bindung erfolgt. Zudem sind weitere Phosphorylierungsstellen von CREB identifiziert worden. Dabei kann eine Phosphorylierung auch einen inhibitorischen Effekt haben.

Letztendlich sind weitere Kofaktoren notwendig, die an der CREB-induzierten Assemblierung des Initiationskomplexes mitwirken und für die Aktivierung der RNA-Polymerase II sorgen. Die spezifische Phosphorylierung von CREB am Serin-Rest 133 (Ser133) durch PKA bewirkt die Rekrutierung des CREB-Bindeproteins CBP (Chrivia et al., 1993) und von dessen Homolog p300 (Chakravarti et al., 1996), die als notwendige Koaktivatoren fungieren.

Die Betrachtung des PMCA2-Gens und seiner Promotorregion zeigt (s. Abb. 9), dass 1237 Basenpaare abwärts des Transkriptionsstarts das CREB-Bindemotiv CGTCA lokalisiert ist (s. Abb. 9C). Interessanterweise konnte aber keine Sequenz für ein „serum-responsive-element“ (sre) identifiziert werden. Die Sequenzsuche wurde mit Hilfe der SABiosciences-Datenbank, die über 200 Transkriptionsfaktoren beinhaltet und Daten des „University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browsers“ verwendet, durchgeführt.

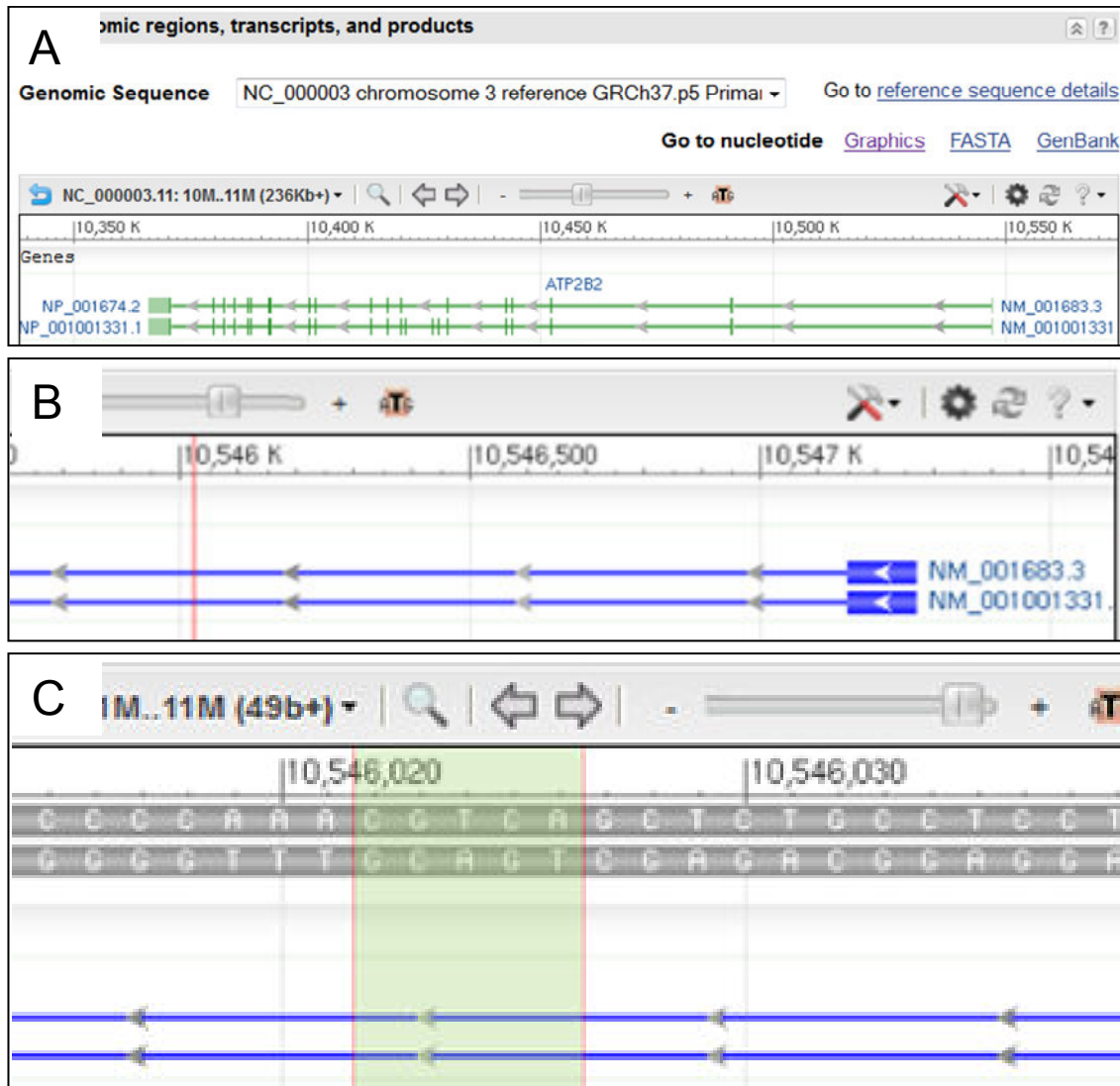


Abbildung 9: Darstellung des humanen PMCA2-Gens und seiner Promotorregion. A) Dargestellt ist die Position des PMCA2-Gens innerhalb von Chromosom 3. In **B)** ist innerhalb eines vergrößerten Abschnitts aus A der Transkriptionsstartpunkt sowie die Position des CREB-Bindemotivs (rote Linie) abgebildet. **C)** zeigt in einer Vergrößerung aus B die cre-Sequenz und deren Position. Die Abbildung ist verändert nach: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=49

Um in dieser Arbeit eine mögliche Beteiligung von CREB an der Regulation der PMCA2-Transkription nach MPP⁺-Behandlung zu untersuchen, wurde mittels Western Blot zunächst das Verhältnis von phospho-CREB zu CREB quantifiziert. Dabei hat sich gezeigt, dass die Phosphorylierung von CREB sowohl in SH-SY5Y-Zellen als auch in Primärneuronen nach MPP⁺-Behandlung signifikant abnimmt (s. Abb. 10A und B). Dies deutete darauf hin, dass CREB weniger aktiv und die Expression CREB-regulierter Zielgene reduziert sein könnte.

3.2.2 Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 nach MPP⁺-Behandlung

In diesem Schritt sollte untersucht werden, ob möglicherweise auch bei den extrazellulär regulierbaren Proteinkinasen 1 und 2 (engl.: extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2) Veränderungen des Phosphorylierungsstatus unter MPP⁺-Einfluss hervorgerufen werden. Der Ras-Raf-ERK-Signalweg ist neben dem CREB-Signalweg von zentraler Bedeutung bei der Regulation der Genexpression. Zudem können beide Signalwege konvergieren oder wechselseitigen Einfluss ausüben. Während nach einer MPP⁺-Behandlung nach vier Tagen eine Zunahme von Phospho-ERK1/2 in SH-SY5Y-Zellen gezeigt wurde (Gomez-Santos et al., 2002), wurde hier in SH-SY5Y-Zellen nach 18 h eine signifikante Abnahme beobachtet (s. Abb. 10 A und B). In den Primärneuronen dagegen, die 4 h mit MPP⁺ behandelt wurden, zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (s. Abb. 10 C).

Ob die Abnahme von Phospho-CREB eine spezifische Bedeutung für die Regulation der PMCA2-Expression haben könnte, wurde somit nicht untermauert. Die Abnahme von Phospho-CREB sowie das Vorhandensein von cre im PMCA2-Promotor lassen dennoch eine Beteiligung von CREB an der Regulation der PMCA2-Expression vermuten, was Gegenstand der folgenden funktionellen Untersuchungen war.

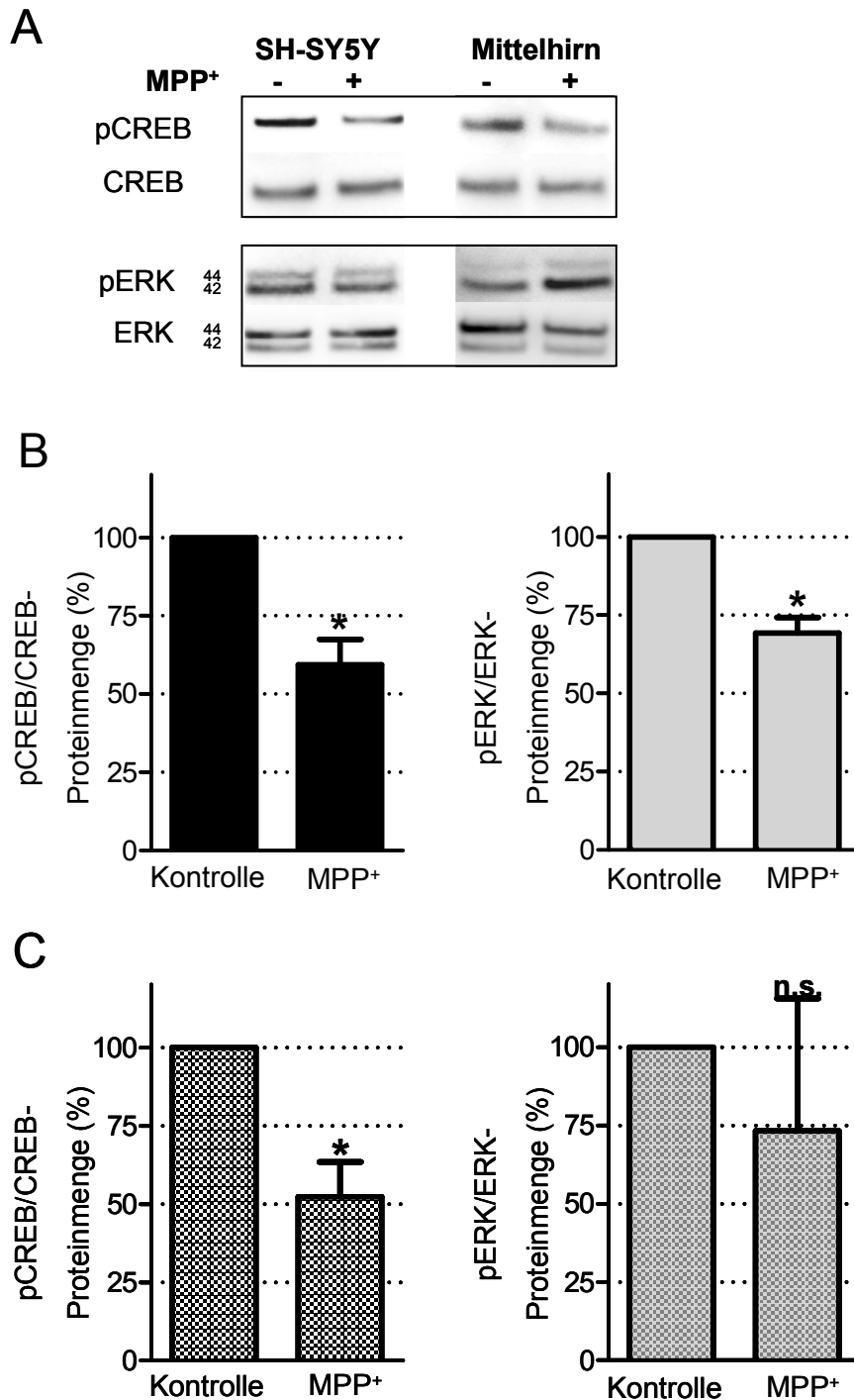


Abbildung 10: Immunoblotanalyse von Phospho-CREB und Phospho-ERK1/2 nach MPP⁺-Behandlung. (A) Nach der Proteinauftrennung aus SH-SY5Y-Zellen und Primärzellen mittels SDS-PAGE wurden phospho-CREB, CREB, Phospho-ERK und ERK mittels Western Blot durch spezifische Antikörper detektiert. Dargestellt sind die immunoreaktiven Banden. Die nicht phosphorylierte Form diente jeweils als Kontrolle für die Gesamtproteinspiegel. (B,C) Immunoreaktive Banden von Phospho-CREB und Phospho-ERK1/2 wurden densitometrisch quantifiziert und im Verhältnis zu CREB bzw. ERK1/2 im Balkendiagramm dargestellt. (B) zeigt die Quantifizierung der Banden von SH-SY5Y-Zellen nach 18 h, (C) von Primärneuronen nach 4 h jeweils mit 250 μ M MPP⁺ inkubiert (* MPP⁺ zu Kontrolle, $p < 0,05$, $n = 3$; n.s.: nicht signifikant, $n = 3$).

3.2.3 siRNA-vermittelte Abregulation von CREB reduziert PMCA2

Um den möglichen Zusammenhang zwischen CREB und der PMCA2-Transkription genauer zu untersuchen, wurde CREB experimentell mittels siRNA in SH-SY5Y-Zellen herunterreguliert. Bereits 24 h nach siRNA-Transfektion zeigte sich eine signifikante Abnahme von PMCA2 (s. Abb. 11) in der biochemischen Analyse.

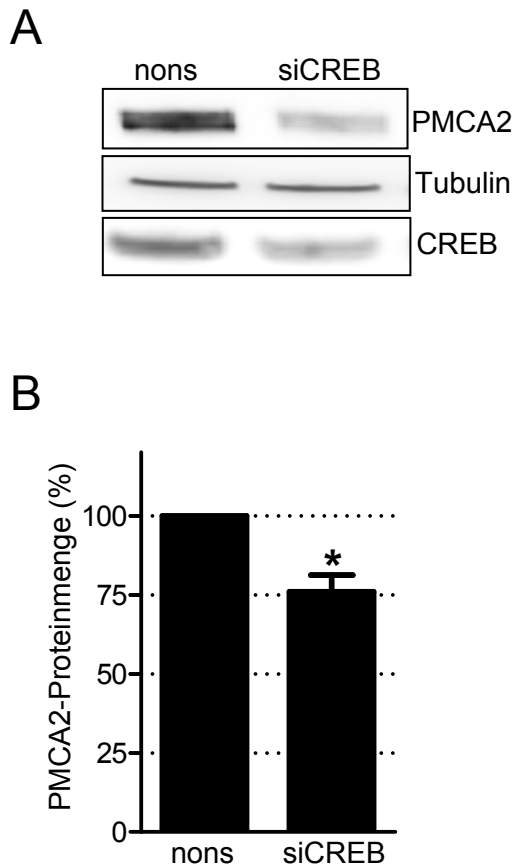


Abbildung 11: Die Immunoblotanalyse von PMCA2 zeigt eine Reduktion der Expression nach siRNA-vermittelter CREB-Herunterregulation. (A) Abbildung der immunoreaktiven Banden im Western Blot. Jeweils 10 µg Gesamtproteinmenge wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Anti-CREB- bzw. Anti-PMCA2-Antikörpern analysiert. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. Die Detektion von CREB diente dem Nachweis einer erfolgreichen Herunterregulation. **(B)** PMCA2-immuno-reaktive Banden wurden densitometrisch quantifiziert und im Balkendiagramm dargestellt. PMCA2 ist nach CREB-Herabregulation signifikant reduziert (* siCREB-RNA zu nonsense-siRNA-Kontrolle (nons), $p < 0,05$, $n = 3$).

Dadurch wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von PMCA2 und dem Transkriptionsfaktor CREB demonstriert. Dies erhärtete die Vermutung, dass CREB an der Regulation der PMCA2-Expression beteiligt sein könnte.

Weiterhin muss erwähnt werden, dass bei der Immunoblotanalyse von PMCA2 zwei Banden zu erkennen sind, was auf eine Splicevariante zurückzuführen ist, die jedoch nicht immer detektiert wird.

3.2.4 siRNA-vermittelte Reduktion von ERK1/2 hat keinen Effekt auf die PMCA2-Expression

Ob die Expression von PMCA2 durch ERK1/2 ebenfalls beeinflusst wird, sollte mittels einer vergleichenden experimentellen siRNA-vermittelter Abregulation aufgeklärt werden.

SH-SY5Y-Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen ERK1/2 transfiziert und biochemisch auf die Expression von PMCA2 untersucht. Die Westernblot-Analyse bestätigte eine Abregulation von ERK1/2 (s. Abb. 12). Bei den immunreaktiven PMCA2-Banden wurde jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der ERK-Signalweg nicht direkt in die Regulation der PMCA2-Expression involviert ist.

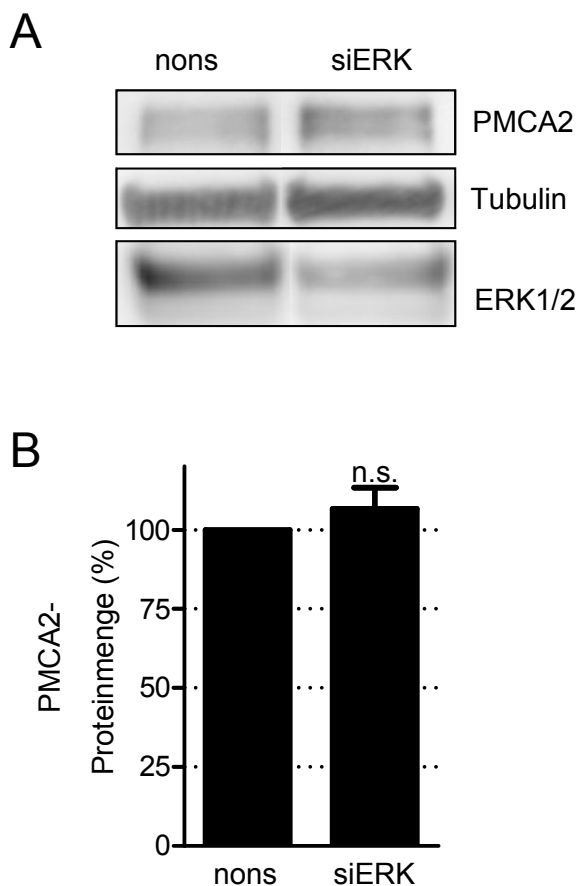


Abbildung 12: Immunoblotanalyse von PMCA2 und ERK1/2 nach siRNA-vermittelter ERK1/2-Herunterregulation. (A) In der Abbildung sind die PMCA2-Banden nach siERK-RNA-Transfektion in SH-SY5Y-Zellen gezeigt. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. Die Detektion von ERK1/2 diente dem Nachweis einer Herunterregulation. **(B)** Darstellung der densitometrischen Quantifizierung der immunreaktiven PMCA2-Banden 48h nach siERK-RNA-Transfektion (nons: nonsense-siRNA-Kontrolle, n.s.: nicht signifikant, n = 3).

3.2.5 Die „loss-of-function“-Mutante CREB M1 und siCREB-RNA führen zu einer Abnahme der PMCA2-Expression in Primärneuronen

Um eine mögliche Beteiligung von CREB an der Regulation der PMCA2-Expression zu untermauern, wurden Primärneuronen aus dem Mittelhirn mit CREB-spezifischer siRNA transfiziert. Die Westernblot-Analyse bestätigte den erfolgreichen CREB-„Knockdown“ nach 24 h (s. Abb. 14C). Auch in den Primärneuronen wurde nach der experimentellen Abregulation von CREB eine signifikante Abnahme der PMCA2-Proteinmengen detektiert (s. Abb. 14A und B). Diese Befunde sollten nun weiter gestärkt werden, indem die Primärneuronen mit der dominant-negativen Mutante M1 von CREB transfiziert wurden.

CREB M1 (Gonzalez and Montminy, 1989) ist am Ser133, das für die Aktivierung durch Phosphorylierung über PKA essentiell ist, durch ein Alanin substituiert. Somit kann CREB M1 nicht durch die Serin/Threonin-spezifische PKA via Phosphorylierung aktiviert werden (s. Abb. 13).

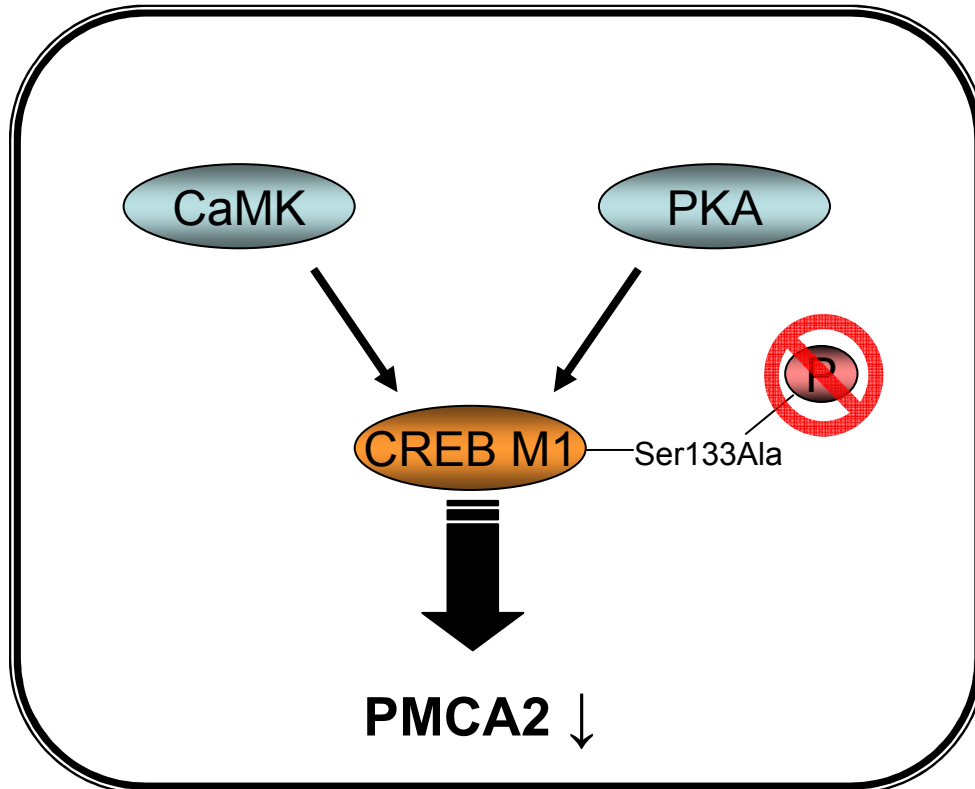


Abbildung 13: CREB M1 (Gonzalez and Montminy, 1989). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB erfolgt über die Phosphorylierung des Serin 133 durch Serin-Threonin-Kinasen wie die Proteinkinase A oder die CaM-Kinase. Durch die Serin-Substitution mit Alanin der CREB M1-Mutante ist eine solche Phosphorylierung und damit Aktivierung nicht mehr möglich, was eine Abregulation von PMCA2 zur Folge haben kann.

Die Primärneuronen wurden 24 h nach der Transfektion mit CREB M1 und dem wildtypischen CREB (wt) untersucht. Dabei wurde in der Westernblot-Analyse eine Reduktion der PMCA2-Expression unter CREB M1-Einfluss im Vergleich zu der wt-Transfektion beobachtet (s. Abb. 14A und B). Die Transfektionseffizienz wurde durch die Kotransfektion mit GFP fluoreszenzmikroskopisch überprüft (s. Abb. 14D).

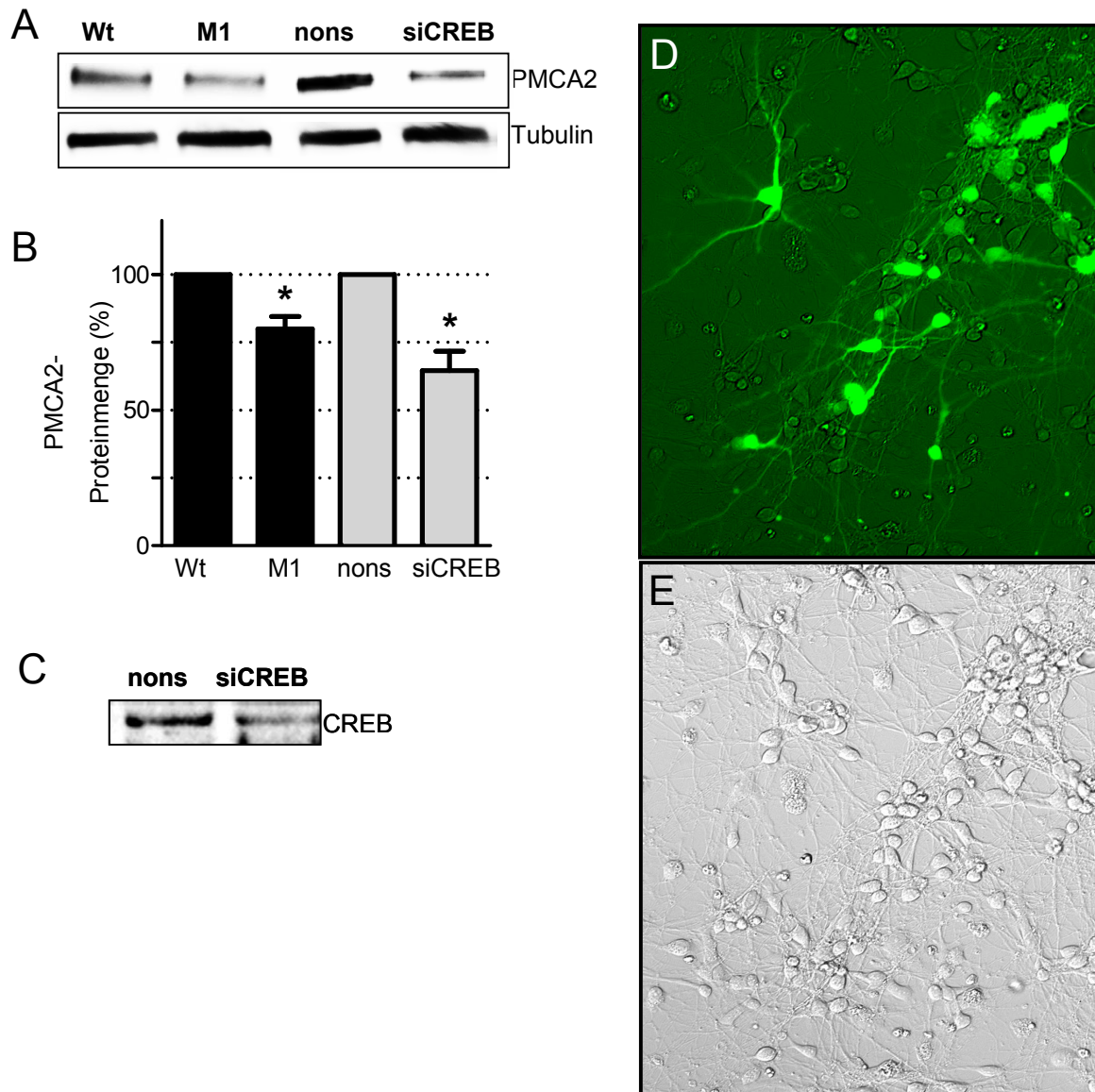


Abbildung 14: Analyse der PMCA2 -Expression in primären Mittelhirnneuronen der Ratte nach Transfektion mit siCREB-RNA und der dominant-negativen Mutante M1 von CREB. (A) Jeweils 5 μ g Gesamtproteinmenge wurden in einem BIS-TRIS-gepufferten 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und PMCA2 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. **(B)** PMCA2-immunoreaktive Banden wurden densitometrisch quantifiziert und auf Tubulin normiert. PMCA2 ist nach CREB-„Knockdown“ und nach CREB M1-Transfektionen signifikant reduziert (* siCREB-RNA oder CREB M1 zu nonsense-Kontrolle, $p < 0,05$, $n = 3$). **(C)** Jeweils 5 μ g Gesamtproteinmenge wurden in einem BIS-TRIS-gepufferten 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und CREB mit spezifischen Antikörpern detektiert. siCREB-RNA resultierte im Vergleich zur nonsense-siRNA-Kontrolle zu einer Abnahme des CREB-Signals. **(D)** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Primärneuronen, die mit CREB M1 und GFP kotransfiziert wurden, um die Transfektionseffizienz zu ermitteln. **(E)** Phasenkontrastdarstellung der Aufnahme D.

Diese Ergebnisse belegten, dass die PMCA2-Expression in der Tat abhängig von CREB ist. Interessanterweise war dies zudem ein Hinweis darauf, dass die CREB-gesteuerte PMCA2-Expression abhängig von der Aktivierung durch die Phosphorylierung des Ser133 sein könnte. Somit könnte die PKA oder die CaMKII/IV (s. dazu auch 3.2.1) bei Regulation der Expression von PMCA2 von Bedeutung sein (s. Abb. 15).

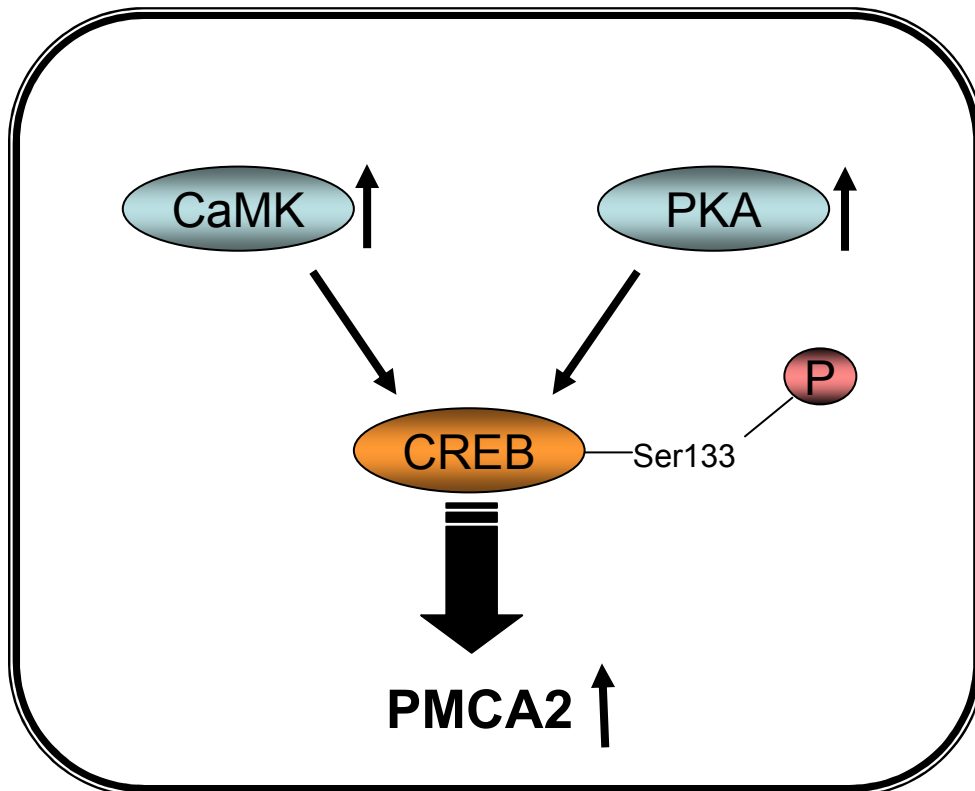


Abbildung 15: PMCA2-Expression in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors CREB. Der in Abb. 14 gezeigte Einfluss von CREB auf die PMCA2-Expression könnte abhängig von der Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) oder CaM-Kinase (CaMK) sein. Die Untersuchungen dieser Annahme sind in den Abschnitten 3.2.6 und 3.2.7 beschrieben.

3.2.6 Inhibition der CaMKII/IV hat keinen Effekt auf die PMCA2-Expression

Da CREB ein potenzielles Substrat der CaMKII/IV ist, wurde im nächsten Schritt deren Einfluss auf die PMCA2-Expression untersucht. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen mit dem spezifischen CaMKII/IV-Inhibitor KN-62 (Tokumitsu et al., 1990; Gao et al., 2004) behandelt. Die biochemische Analyse der PMCA2-Proteinmengen zeigte bei verschiedenen Konzentrationen von KN-62 keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 16).

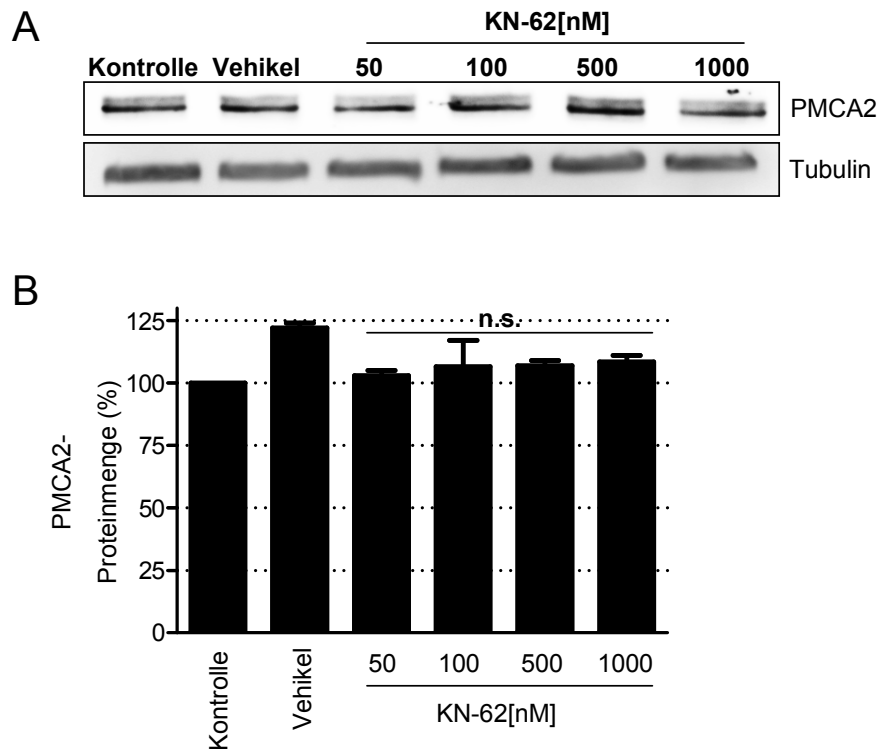


Abbildung 16: PMCA2-Expression nach CaMKII/IV-Inhibition. (A) Jeweils 10 μ g Gesamtproteinmenge von SH-SY5Y-Zellen 18 h behandelt mit KN-62 in verschiedenen Konzentrationen wurden mittels eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt und PMCA2 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (B) PMCA2-immunoreaktive Banden wurden densitometrisch quantifiziert und im Verhältnis zu der Kontrolle bzw. dem Vehikel (DMSO) im Balkendiagramm dargestellt (Vehikel: DMSO; n.s.: nicht signifikant zu Kontrolle und Vehikel, n = 2).

3.2.7 Inhibition der Proteinkinase A (PKA) resultiert in einer Abregulation von PMCA2 und einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

Nachdem eine mögliche Beteiligung der CaMKII/IV (s. dazu auch 3.2.1) an der Regulation der PMCA2-Expression ausgeschlossen werden konnte, sollte im Experiment nun untersucht werden, ob die Proteinkinase A (PKA), als CREB phosphorylierendes Enzym für die Expression von PMCA2 eine Rolle spielen könnte. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen mit dem spezifischen PKA-Inhibitor Rp-cAMP (s. Abb. 17A und B) und einem spezifischen zellpermeablen Inhibitorpeptid (nicht dargestellt) behandelt. Die biochemische Analyse nach 18 h demonstrierte eine Reduktion der PMCA2-Proteinlevel. Somit konnte gezeigt werden, dass die PKA wichtig für die PMCA2-Expression ist.

Da ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen einer Abnahme von PMCA2 und erhöhten zellulären Ca^{2+} -Spiegeln vermutet wurde, müsste eine durch die Inhibition der PKA induzierte PMCA2-Reduktion ebenfalls zu einem erhöhten Ca^{2+} -Spiegel führen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die basalen zytosolischen Ca^{2+} -Level nach PKA-Inhibition ermittelt (s. Abb. 17). Die Ca^{2+} -Messungen ergaben einen leichten, aber signifikanten Anstieg der basalen Ca^{2+} -Konzentration nach PKA-Inhibition mittels Rp-cAMP. Durch diese Untersuchungen konnte somit ein Zusammenhang zwischen PKA-abhängiger Reduktion der PMCA2-Expression und einer erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ demonstriert werden.

3.2.8 PKA-Aktivierung verhindert sowohl die MPP⁺-induzierte PMCA2-Reduktion als auch die Erhöhung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Die Relevanz der PKA-Aktivität für die PMCA2-Expression sollte in einem Rescue-Experiment tiefer untersucht werden. Die vorangegangenen Ergebnisse aus 3.2.7 implizierten, dass eine PKA-Stimulation einen gegensätzlichen Effekt auf die PMCA2-Expression hervorrufen könnte. Daher wurden SH-SY5Y-Zellen, die 18 h mit MPP⁺ behandelt wurden, gleichzeitig mit dem PKA-Aktivator db-cAMP inkubiert, der bereits zwei Stunden vor MPP⁺-Behandlung appliziert wurde. Diese Zellen wurden nun proteinbiochemisch auf die PMCA2-Proteinmenge und die basale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration untersucht.

Die Immunoblotanalyse (s. Abb. 17A und B) zeigte zum einen die PMCA2-Abnahme bei Zellen, die ausschließlich mit MPP⁺ behandelt wurden, doch interessanterweise wiesen die mit dem PKA-Aktivator pre- und koinkubierten Zellen keine signifikante PMCA2-Reduktion auf. Zum anderen konnte mittels Ca^{2+} -Messung auch keine signifikante Erhöhung der Ca^{2+} -Level in Zellen, die mit MPP⁺ behandelt und dem PKA-Aktivator pre- und koinkubiert wurden, beobachtet werden (s. Abb. 17).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Modulation der PKA in Veränderungen der PMCA2-Expression resultiert, mit der weiteren Folge, dass sich die basalen zytoplasmatischen Ca^{2+} -Level ändern (s. Abb. 19).

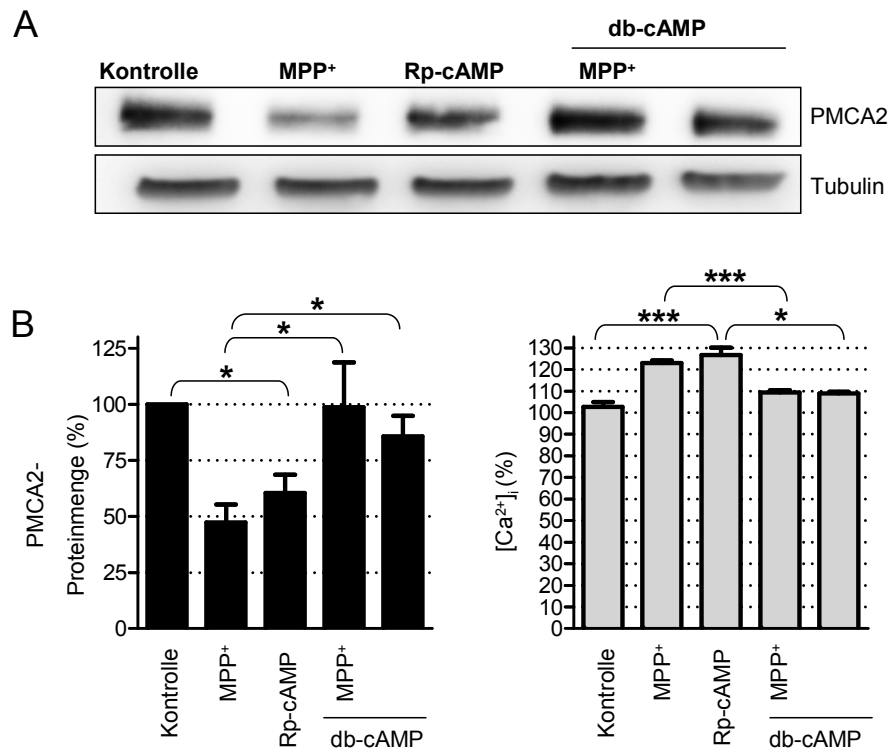


Abbildung 17: Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase nach Modulation der PKA-Aktivität und MPP⁺-Behandlung in SH-SY5Y-Zellen. (A) Western Blot-Analyse der PMCA2-Expression nach 18 h Behandlung mit 250 µM MPP⁺, 100 µM Rp-cAMP (PKA-Inhibitor) oder 100 µM db-cAMP (PKA-Aktivator). Bei der gleichzeitigen Behandlung mit MPP⁺ und db-cAMP wurden die Zellen zusätzlich 2h mit db-cAMP vorbehandelt. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtproteinmenge von SH-SY5Y-Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und PMCA2 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (B) links: PMCA2-immunoreaktive Banden wurden densitometrisch quantifiziert und im Balkendiagramm dargestellt. (* p < 0,05, n = 4) (B) rechts zeigt im Balkendiagramm die zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen normalisiert auf die Kontrollmessungen mittels „Cameleon“. Erhöhte Signale wurden bei der Behandlung mit MPP⁺ (250 µM, 18 h) und dem PKA-Inhibitor Rp-cAMP (100 µM, 18 h) detektiert. Zusätzliche Vorbehandlung (2 h) und anschließende Kokubation mit dem PKA-Aktivator db-cAMP (100 µM) konnte wiederum einen MPP⁺ induzierten Ca²⁺-Anstieg verhindern (* p < 0,05, *** p < 0,001, n = 3).

Natürlich war es von großem Interesse zu untersuchen, ob diese Effekte auch in Primärneuronen induziert werden können und somit eine Relevanz für die *in vivo* Situation besitzen. Dazu wurden primäre Mittelhirnneuronen ebenfalls mit dem PKA-Inhibitor behandelt und vor der MPP⁺-Behandlung mit dem PKA-Aktivator präinkubiert (s. Abb. 18).

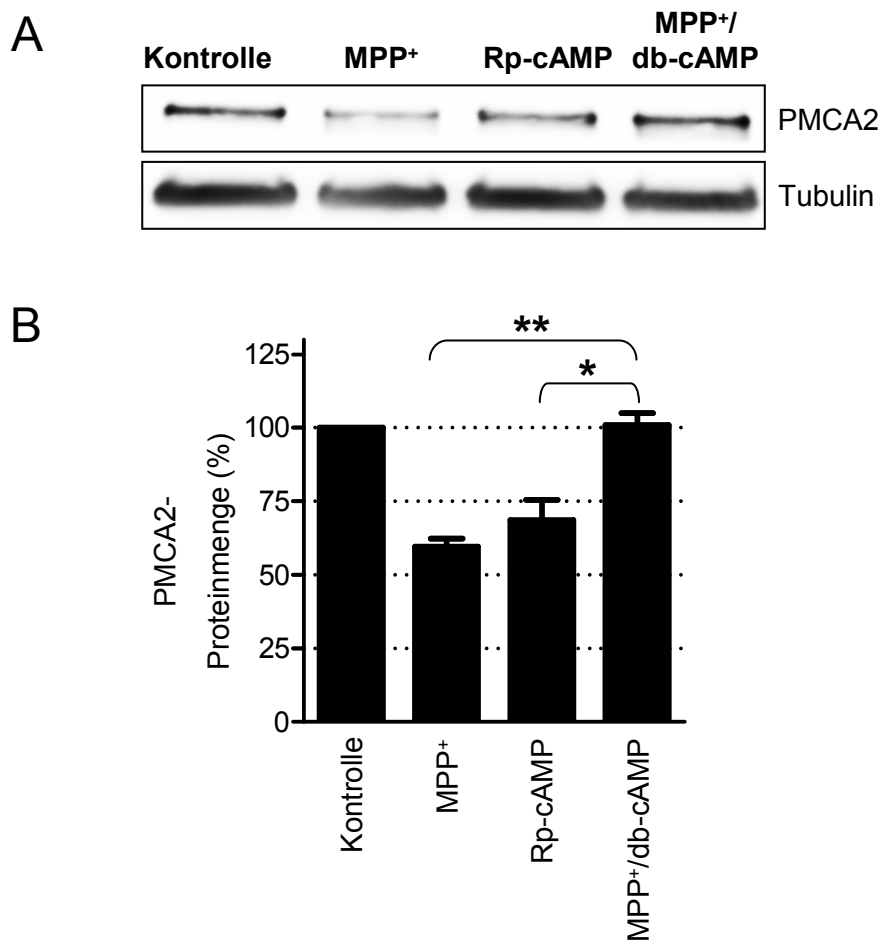


Abbildung 18: Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase nach Modulation der PKA-Aktivität und MPP⁺-Behandlung in Primärneuronen. (A) Abgebildet sind immunoreaktive PMCA2-Banden nach 4 h Behandlung mit 250 μ M MPP⁺, 100 μ M Rp-cAMP und gleichzeitiger Behandlung mit 250 μ M MPP⁺ und 100 μ M db-cAMP, wobei mit db-cAMP zusätzlich 2 h vorbehandelt wurde. Jeweils 5 μ g Gesamtproteinmenge von Primärneuronen wurden in einem BIS-TRIS-gepufferten 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (B) Die Quantifizierung der PMCA2-immunoreaktive Banden sind auf die Kontrolle normiert im Verhältnis zu Tubulin im Balkendiagramm dargestellt. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ $n = 3$; MPP⁺/db-cAMP-Koinkubation $n = 2$)

Durch die Westernblot-Analyse konnte in der Tat bestätigt werden, dass die PMCA2-Expression auch in Primärneuronen PKA-abhängig ist. Zudem konnte auch in Primärneuronen demonstriert werden, dass die vorherige Stimulierung der PKA eine durch MPP⁺ induzierte PMCA2-Reduktion verhindern kann. Dadurch wurde die Bedeutung der PKA-Aktivität für die CREB-abhängige PMCA2-Expression auch für Primärneuronen eindrucksvoll demonstriert (s. Abb. 19).

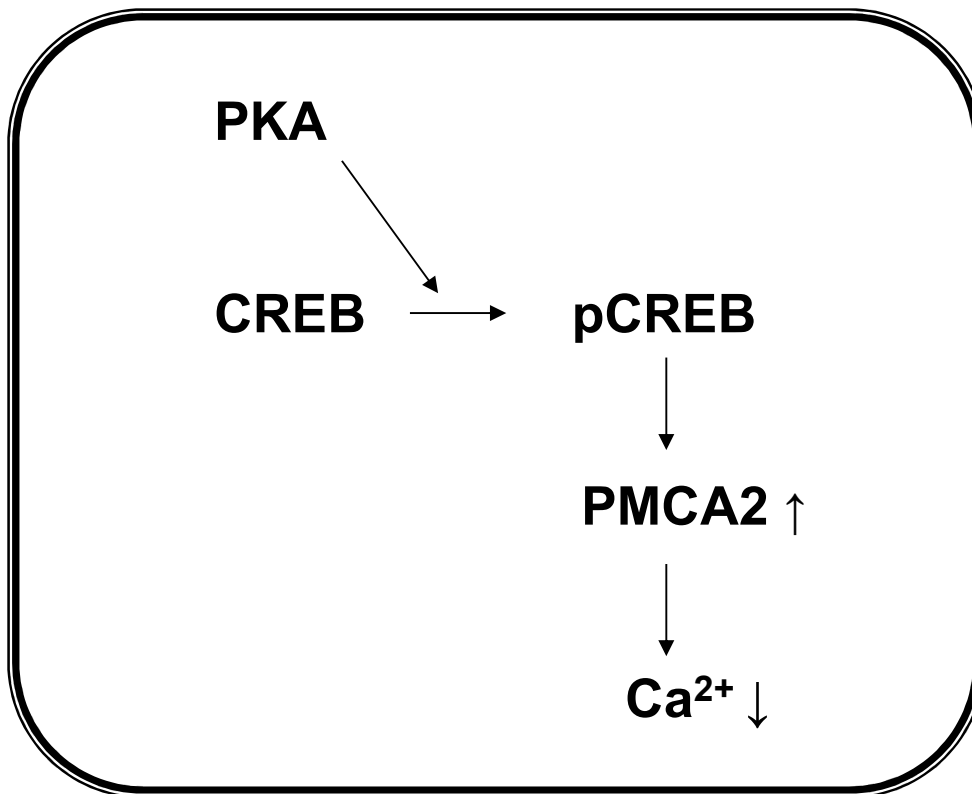


Abbildung 19: Hypothetischer Mechanismus der Regulation der PMCA2-Expression. In den Analysen zu der PMCA2-Expression konnte demonstriert werden, dass die PMCA2-Expression sowohl nach experimenteller CREB-Abregulation als auch unter dem Einfluss der dominant negativen Mutante CREB M1 reduziert war. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Inhibition der PKA zu einer PMCA2-Reduktion führt, was wiederum einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel zur Folge hat.

3.3 Auswirkung der Inhibition der ATP-Synthese auf die PMCA2-Expression und die Ca^{2+} -Homöostase

3.3.1 Rotenon, Oligomycin und 2-desoxy-Glucose verringern die PMCA2-Expression und erhöhen die basale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration

MPP^+ übt als Komplex I-Inhibitor direkten Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette und somit auch auf die oxidative Phosphorylierung bzw. die ATP-Synthese aus (Nakai et al., 2003). So könnte eine Beeinträchtigung der ATP-Synthese als Ursache für die PMCA2-Abnahme in Frage kommen. Daher sollte untersucht werden, inwiefern weitere Substanzen, die die ATP-Synthese reduzieren, auch Veränderungen in der PMCA2-Expression bzw. der Ca^{2+} -Homöostase bewirken. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen und Primärneuronen mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon, mit Oligomycin, einem Inhibitor der ATP-Synthase

(Komplex V) und mit 2-Desoxy-Glucose, einem Glykolyse-Inhibitor behandelt. Für diese Substanzen ist gezeigt worden, dass diese die ATP-Synthese signifikant beeinträchtigen können (Sherer et al., 2003; Gandhi et al., 2009).

Interessanterweise ergaben die biochemischen Analysen ebenfalls reduzierte PMCA2-Proteinspiegel nach Behandlung mit Rotenon, Oligomycin und 2-desoxy-Glucose in beiden Zellsystemen (s. Abb. 20 und 21).

Analog zu den vorangegangenen Experimenten würde man auch hier erhöhte Ca^{2+} -Spiegel nach einer induzierten PMCA2-Abnahme erwarten. Deshalb wurden in SH-SY5Y-Zellen nach Behandlung mit Rotenon, Oligomycin und 2-desoxy-Glucose Ca^{2+} -Messungen durchgeführt. Die Messungen bestätigten einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol nach der Behandlung mit allen Substanzen (s. Abb. 20).

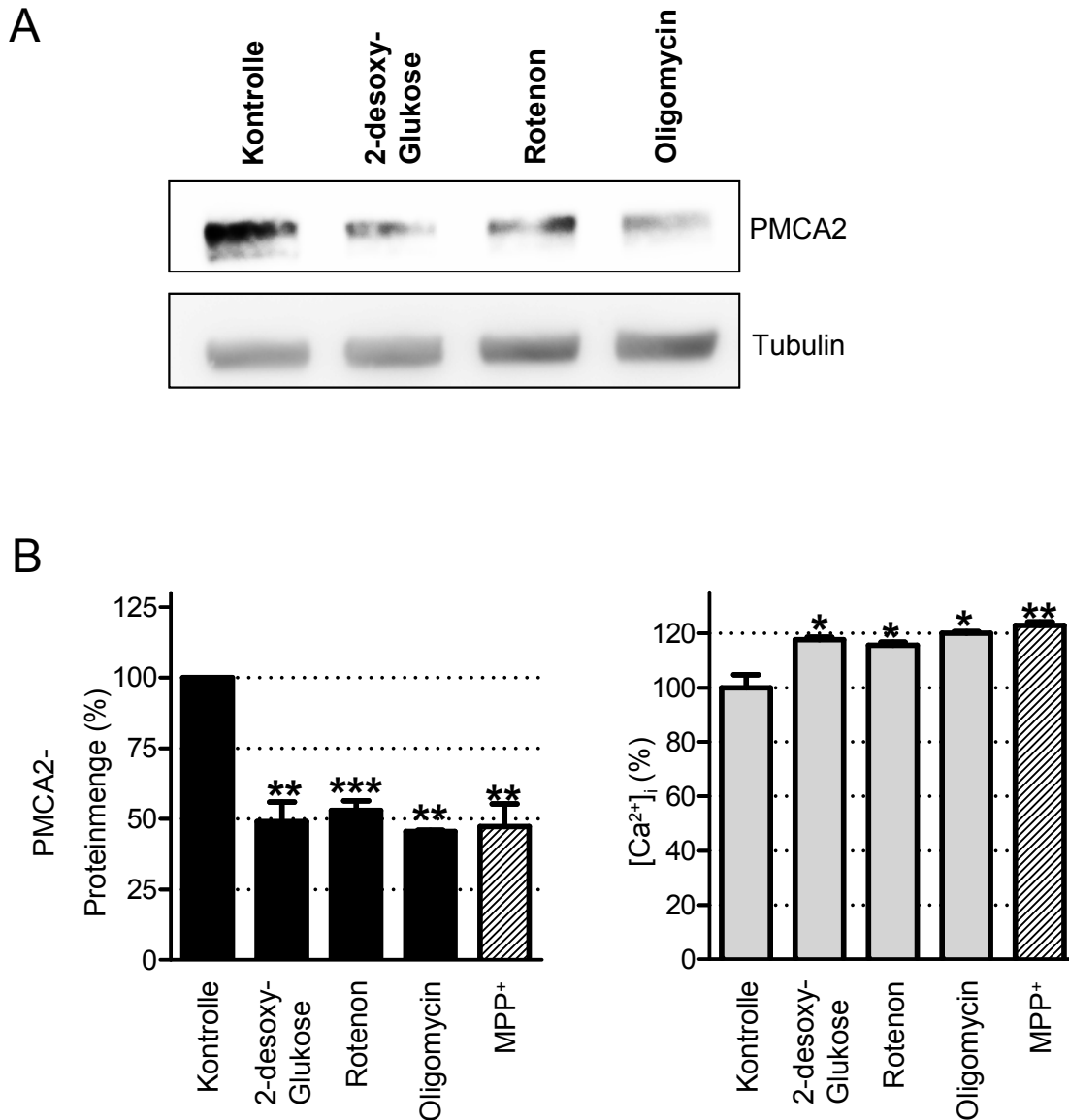


Abbildung 20: Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase nach Inhibition der ATP-Synthese in SH-SY5Y-Zellen. (A) Abbildung der PMCA2-Banden nach Western Blot-Analyse. Jeweils 10 µg Gesamtproteinmenge von SH-SY5Y-Zellen wurden aufgetrennt. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. **(B)** links, PMCA2-immunoreaktive Banden wurden densitometrisch quantifiziert und im Verhältnis zu der Kontrolle im Balkendiagramm dargestellt. 2-desoxy-Glukose (10 mM), Rotenon (100 nM) und Oligomycin (100 µM) induzierten jeweils nach 18 h eine Abnahme des PMCA2-Signals (** Behandlung zu Kontrolle, $p < 0,01$, *** Behandlung zu Kontrolle, $p < 0,001$, $n = 4$, Oligomycin $n = 2$). **(B)** rechts zeigt im Balkendiagramm die Messungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen mittels „Cameleon“. Erhöhte Signale wurden bei allen Behandlungen wie unter (B, links) im Vergleich zur Kontrolle detektiert. Die Messwerte sind auf die Kontrolle normalisiert (* Behandlung zu Kontrolle, $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 3$).

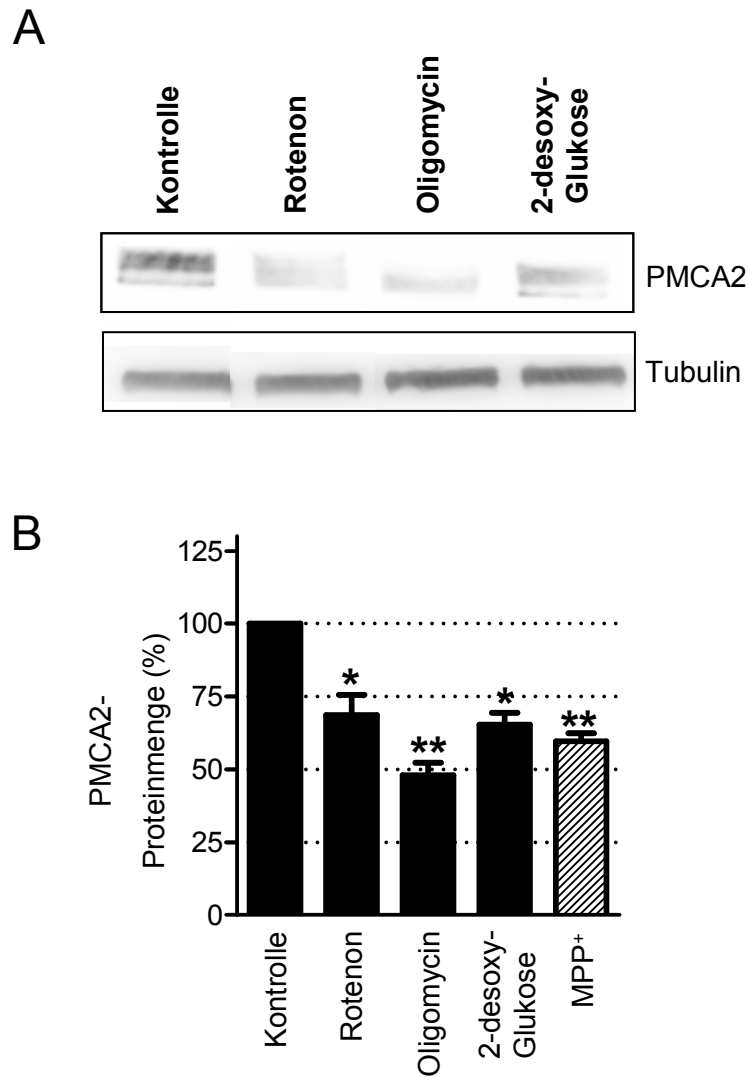


Abbildung 21: Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase nach Inhibition der ATP-Synthese in Primärneuronen. (A) Jeweils 5 μg Gesamtproteinmenge von Primärneuronen wurden in einem BIS-TRIS-gepufferten 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und PMCA2 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Tubulin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (B) PMCA2-immunoreaktive Banden wurden densitometrisch quantifiziert und im Verhältnis zu der Kontrolle im Balkendiagramm dargestellt. 2-desoxy-Glukose (10 mM), Rotenon (100 nM) und Oligomycin (100 μM) induzierten jeweils nach 4 h eine Abnahme des PMCA2-Signals. (* Behandlung zu Kontrolle, $p < 0,05$, ** Behandlung zu Kontrolle, $p < 0,01$, $n = 3$, Oligomycin $n = 4$).

Da die Reduktion der PMCA2-Expression durch verschiedene, sowohl mitochondriale als auch zytosolische, Inhibitoren der ATP-Synthese induziert werden konnte, wurde angenommen, dass die MPP^+ -induzierte PMCA2-Reduktion möglicherweise durch eine ATP-Supplementierung durch Substitution mittels Methyl-Succinat, einem zellpermeablen Komplex-II-Substrat der mitochondrialen Atmungskette (Gandhi et al., 2009), verhindert werden kann. Daher wurden SH-SY5Y-Zellen 2 h mit Methyl-Succinat (5 mM) präinkubiert und darauf folgend mit MPP^+ und Methyl-Succinat koinkubiert. Die

biochemische Analyse der PMCA2-Expression zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der MPP⁺-Inkubation alleine und der Prä- und Koinkubation mit Methyl-Succinat (nicht gezeigt). Somit konnte nicht bestätigt werden, dass durch Stimulation der ATP-Synthese die MPP⁺-induzierte PMCA2-Reduktion verhindert werden kann. Ob der Energiemetabolismus eine mögliche Relevanz für die PMCA2-Expression hat, lässt sich mittels der durchgeführten Experimente nicht eindeutig sagen und muss durch zukünftige Experimente geklärt werden.

3.4 Die Bedeutung von PMCA2 für das neuronale Überleben

3.4.1 siRNA vermittelte PMCA2-Herunterregulation erhöht die Vulnerabilität von Neuronen des Mesencephalons

Dass PMCA2 für das neuronale Überleben eine Rolle spielen könnte, wurde kürzlich beschrieben. So wurden reduzierte PMCA2-mRNA-Spiegel bei der Huntington-Erkrankung (Kuhn et al., 2007) und der Parkinson-Erkrankung (Simunovic et al., 2009) detektiert. Weiterhin wurde der Untergang von Motorneuronen im lumbalen Rückenmark in PMCA2-defizienten Mäusen beobachtet (Souayah et al., 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine experimentelle Reduktion von PMCA2 mittels siRNA zu einem verminderten Überleben von spinalen Neuronen führt (Kurnellas et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass MPP⁺ den Ca²⁺-Efflux beeinträchtigt und zu einer Abnahme der PMCA2-Expression führt. Daher war es von Interesse aufzuklären, ob die Primärneuronen nach einer experimentellen PMCA2-Reduktion vulnerabler sind und, ob die experimentelle PMCA2-Abregulation den zellulären Ca²⁺-Spiegel beeinflusst. Um das Überleben von mesencephalischen Primärneuronen nach experimenteller PMCA2-Herunterregulation zu untersuchen, wurden diese mit siRNA gegen PMCA2 transfiziert nach 72 h proteinbiochemisch und nach 96 h immunozytochemisch und analysiert. Dazu wurden neuronale Zellen mit dem neuronenspezifischen Antikörper MAP2 inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Die immunozytochemische Auswertung ergab einen Rückgang des neuronalen Überlebens um beinahe 50 % nach siRNA-Transfektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 22A und B). Für die Untersuchungen der zellulären Ca²⁺-Spiegel wurden Ca²⁺-Messungen in Primärneuronen und SH-SY5Y-Zellen, die mit siRNA transfiziert wurden, nach 24 h

durchgeführt. In Abb. 22C ist gezeigt, dass es in beiden Zellmodellen zu einem leichten Anstieg der zellulären Ca^{2+} -Konzentration nach siRNA-Transfektion kam.

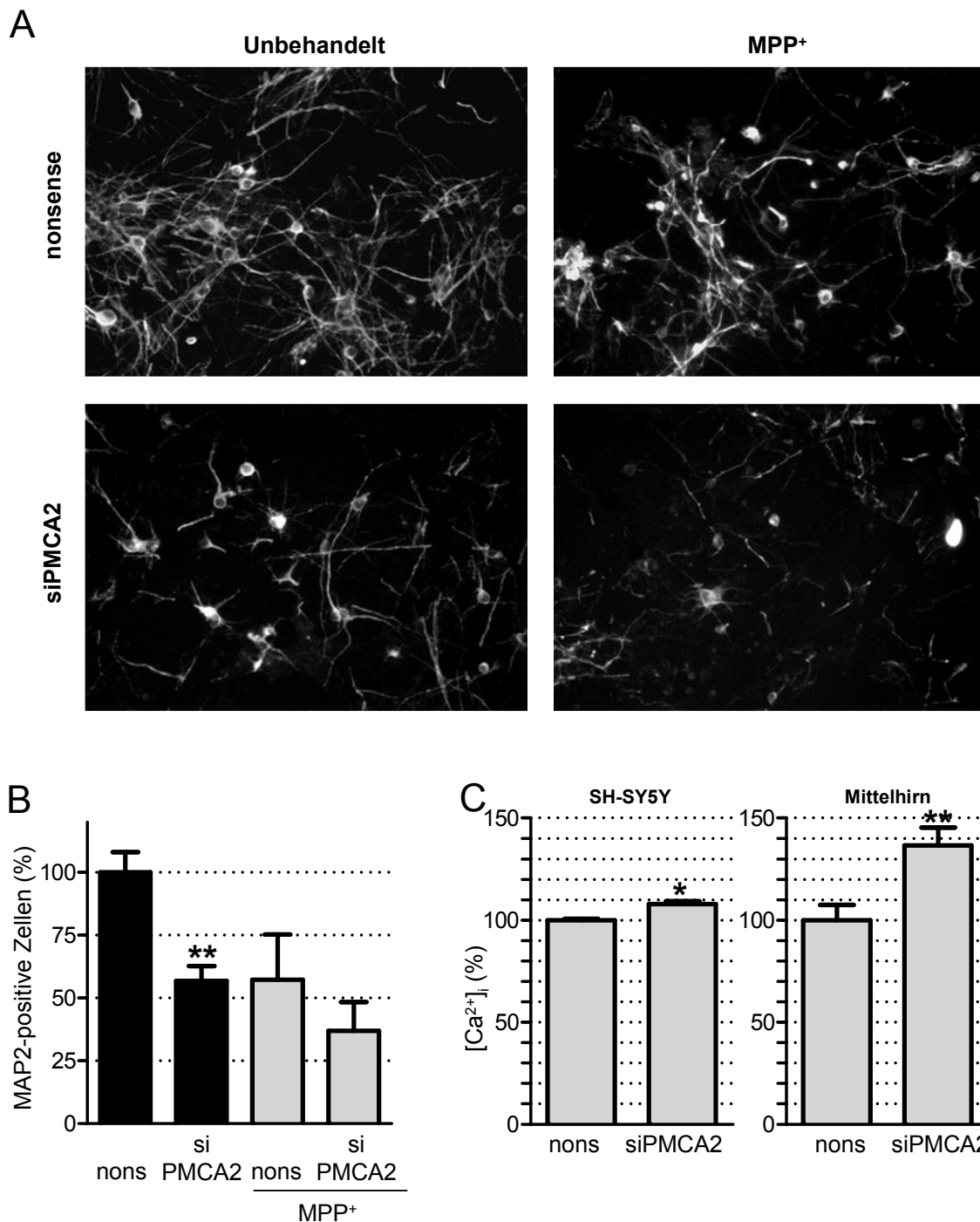


Abbildung 22: Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase und des neuronalen Überlebens nach experimenteller PMCA2-Herunterregulation. (A) 4×10^6 Primärzellen aus dem Mittelhirn von Rattenembryonen wurden nach 7 Tagen *in vitro*-Kultur mit siPMCA2-RNA oder nonsense-siRNA als Kontrolle transfiziert. 96 h nach der Transfektion wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit dem neuronenspezifischen MAP2-Antikörper und einem entsprechenden Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt. (B) Die MAP2-positiven Neuronen wurden gezählt und dienten der Bestimmung für

das neuronale Überleben (** siPMCA2 zu nonsense-siRNA $p < 0,01$, $n = 3$). **(C)** In SH-SY5Y-Zellen (links) und Primärneuronen (rechts) wurde 24 h nach der Transfektion $[Ca^{2+}]_i$ bestimmt. Die Messungen in SH-SY5Y-Zellen wurden mit „Cameleon“, das kotransfiziert wurde, durchgeführt. In den Primärneuronen wurde die Bestimmung der zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel mit FURA durchgeführt (* siPMCA2 zu nonsense-siRNA, $p < 0,05$, $n = 4$; ** siPMCA2 zu nonsense-siRNA, $p < 0,01$, $n = 7$).

Die biochemische Analyse ergab eine Abnahme der PMCA2-Proteinspiegel nach siPMCA2-RNA-Transfektion nach 72 h, was die experimentelle Abregulation belegt (s. Abb. 23A). Weiterhin wurde eine signifikante Abnahme der Tyrosinhydroxylase (TH), jedoch nicht für MAP2, beobachtet (s. Abb. 23B). Die Tyrosinhydroxylase ist essentiell für die Dopaminsynthese und wird als Marker für die dopaminergen Neuronen verwendet.

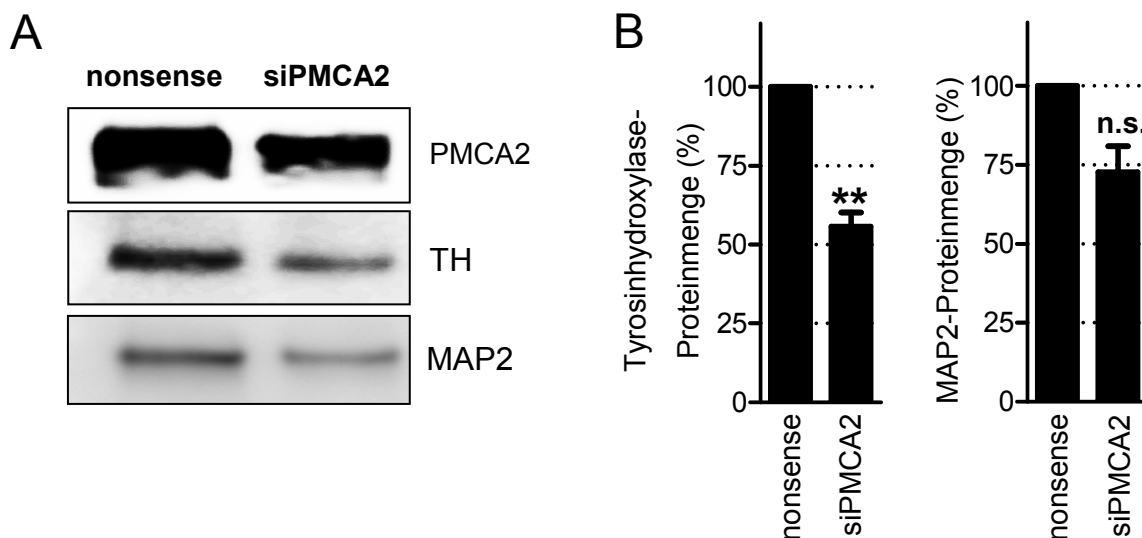


Abbildung 23: Analyse der Tyrosinhydroxylase- und MAP2-Proteinmengen nach siPMCA2-Transfektion in Primärneuronen (A) 72 h nach siRNA-Transfektion wurden jeweils 5 μ g Gesamtproteinmenge von Primärneuronen durch SDS-PAGE aufgetrennt und PMCA2-, TH-, und MAP2-Proteinmengen detektiert. Diese Analyse diente der Kontrolle der PMCA2-Herunterregulation und der indirekten Untersuchung des Überlebens dopaminergen Neuronen. **(B)** Immunoreaktive TH- und MAP2-Banden wurden densitometrisch quantifiziert und die TH- bzw. MAP2-Mengen relative ausgewertet (* siPMCA2 zu nonsense-siRNA, $p < 0,05$, $n = 3$)

Durch die beschriebenen Experimente wurde demonstriert, dass PMCA2 eine funktionelle Bedeutung für die Ca^{2+} -Homöostase hat. Es konnte nachgewiesen werden, dass PMCA2 relevant für das neuronale Überleben ist. Zudem gab die Abnahme der Tyrosinhydroxylase einen Hinweis darauf, dass dopaminerge Neuronen vulnerabler auf die PMCA2-Reduktion reagieren könnten als andere Neuronenpopulationen des Mittelhirns.

3.4.2 Transiente Überexpression von PMCA2 und das neuronale Überleben im MPP⁺-Modell

VanHouten et al. konnten demonstrieren, dass (1) in PMCA2-defizienten Mäusen in Epithelzellen der Brustdrüse Apoptose induziert wird und, (2) dass die Überexpression von PMCA2 in der Brustkrebszelllinie T47D die Apoptose inhibiert (VanHouten et al., 2010). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die experimentelle PMCA2-Reduktion das zelluläre Überleben beeinträchtigt, sollte in einem Rescue-Experiment untersucht werden, ob die transiente Transfektion mit PMCA2 einen protektiven Effekt auf das zelluläre Überleben im MPP⁺-Modell haben könnte. Dazu wurde die kodierende Sequenz der humanen PMCA2 in einen pEGFP-N1-Expressionsvektor kloniert (s. Anhang für Sequenz und Vektorkarte).

SH-SY5Y-Zellen wurden mit pEGFP-N1 oder pEGFP-N1-PMCA2 transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit MPP⁺ inkubiert. Nach weiteren 72 h wurden Überlebensanalysen mittels „Cell Titer Blue“, einem fluorometrischen Indikator zur Bestimmung der metabolischen Aktivität, durchgeführt. Bei dieser Analyse wurde eine signifikante Abnahme des Überlebens nach MPP⁺-Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt (s. Abb. 24). Die transiente Transfektion mit pEGFP-N1-PMCA2 hatte jedoch hinsichtlich einer möglichen Protektion gegen MPP⁺ keinen deutlichen Effekt im Vergleich zu der Transfektion mit pEGFP-N1. Als Ursache dafür könnte in Betracht gezogen werden, dass bei der Klonierung der PMCA2-Sequenz ein Aminosäureaustausch aufgetreten ist, wodurch dieses Konstrukt möglicherweise nicht funktionell war.

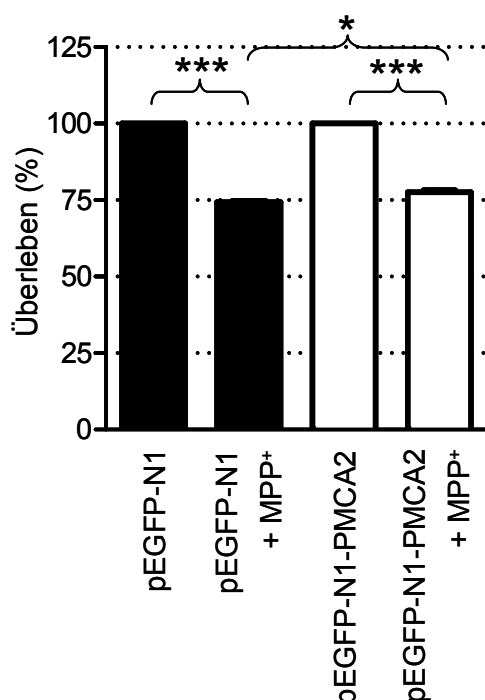


Abbildung 24: Überlebensanalyse nach MPP⁺-Inkubation von SH-SY5Y-Zellen nach transientser Transfektion mit pEGFP-N1 oder pEGFP-N1-PMCA2. Dargestellt ist das prozentuale Überleben analysiert mittels „Cell Titer Blue“-Analyse nach 72 h MPP⁺-Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. 250 μM MPP⁺ wurde jeweils 48 h nach Transfektion mit pEGFP-N1 oder pEGFP-N1-PMCA2 appliziert (* pEGFP-N1 + MPP⁺ zu pEGFP-N1-PMCA2 + MPP⁺, p < 0,05; *** Behandlung zu Kontrolle, p < 0,001).

In weiteren Experimenten soll untersucht werden, ob die PMCA2-Überexpression einen protektiven Effekt auf das Überleben im MPP⁺-Modell hat. Dazu soll der PMCA2-Expressionsvektor (VanHouten et al., 2010) verwendet werden, der im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand.

3.5 Altersabhängige Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase *in vitro* und *in vivo*

3.5.1 Gealterte IMR-90 Fibroblasten weisen Veränderungen des Ca²⁺-Efflux-Systems und erhöhte basale Ca²⁺-Level auf

Im Zuge der Alterung kommt es zu Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase, die die Widerstandsfähigkeit von Neuronen beeinträchtigen können (Hajieva et al., 2009a). Die beobachteten Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase in den MPP⁺-basierten Zellkultur-Modellen der Parkinson-Erkrankung in der vorliegenden Arbeit führten zu der Frage, ob diese auch bei der nicht-pathologischen Alterung auftreten.

Um altersassoziierte Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase zu untersuchen, wurden humane IMR-90 Fibroblasten als zelluläres Altersmodell verwendet. Diese seneszenten Fibroblasten weisen mit zunehmendem Alter, das durch die Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) bestimmt wird, eine verringerte Teilungsaktivität bis zu einem vollständigen Teilungsstopp (Campisi et al., 1996) auf, was als replikative Seneszenz bezeichnet wird. Weiterhin kommt es bei der zellulären Alterung zu Veränderungen in der Proteinzusammensetzung, wie z.B. erhöhten Caveolin1-Proteinmengen (Linge et al., 2007). Diese Merkmale können daher zur Bestimmung eines seneszenten Phänotyps herangezogen werden (Kern et al., 2006).

Zur Charakterisierung des seneszenten Phänotyps wurden daher die PDs bis zu dem Eintreten eines vollständigen Teilungsstopps analysiert. Ein Wachstumsarrest wurde ab der 46. PD beobachtet (s. Abb. 25D). Daher wurden Lysate ab PD 46, sowie bei PD 22, bei der sich die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden, verwendet und biochemisch auf den Altersmarker Caveolin1 untersucht (s. Abb. 25A). Die Analyse zeigte einen Anstieg von Caveolin1 bei den gealterten Zellen. Dadurch wurde der seneszente Phänotyp nachgewiesen.

Um nun den Einfluss der zellulären Alterung auf die Ca²⁺-Homöostase zu untersuchen, wurde das Ca²⁺-Effluxsystem in gealterten Fibroblasten biochemisch analysiert und mit dem junger Fibroblasten verglichen. Da die Isoform PMCA2 überwiegend in neuronalen

Zellen exprimiert wird, wurde bei den Immunoblotanalysen ein panPMCA-Antikörper verwendet, der alle vier PMCA-Isoformen detektieren kann. Dabei konnte eine deutliche Abnahme von PMCA und SERCA in gealterten Zellen demonstriert werden (s. Abb. 25A), während NCX weder bei PD 22 noch bei PD 46 oder höher detektiert werden konnte (nicht dargestellt).

In einer weiteren Untersuchung sollte geprüft werden, ob die Abnahme der PMCA- und SERCA-Proteinspiegel das Ca^{2+} -Gleichgewicht verändern. Deswegen wurden Ca^{2+} -Messungen im Zytosol, im ER und in den Mitochondrien durchgeführt. Interessanterweise wurde ein leicht erhöhtes Ca^{2+} -Signal im Zytosol, jedoch nicht im ER und Mitochondrium, ermittelt (s. Abb. 25C).

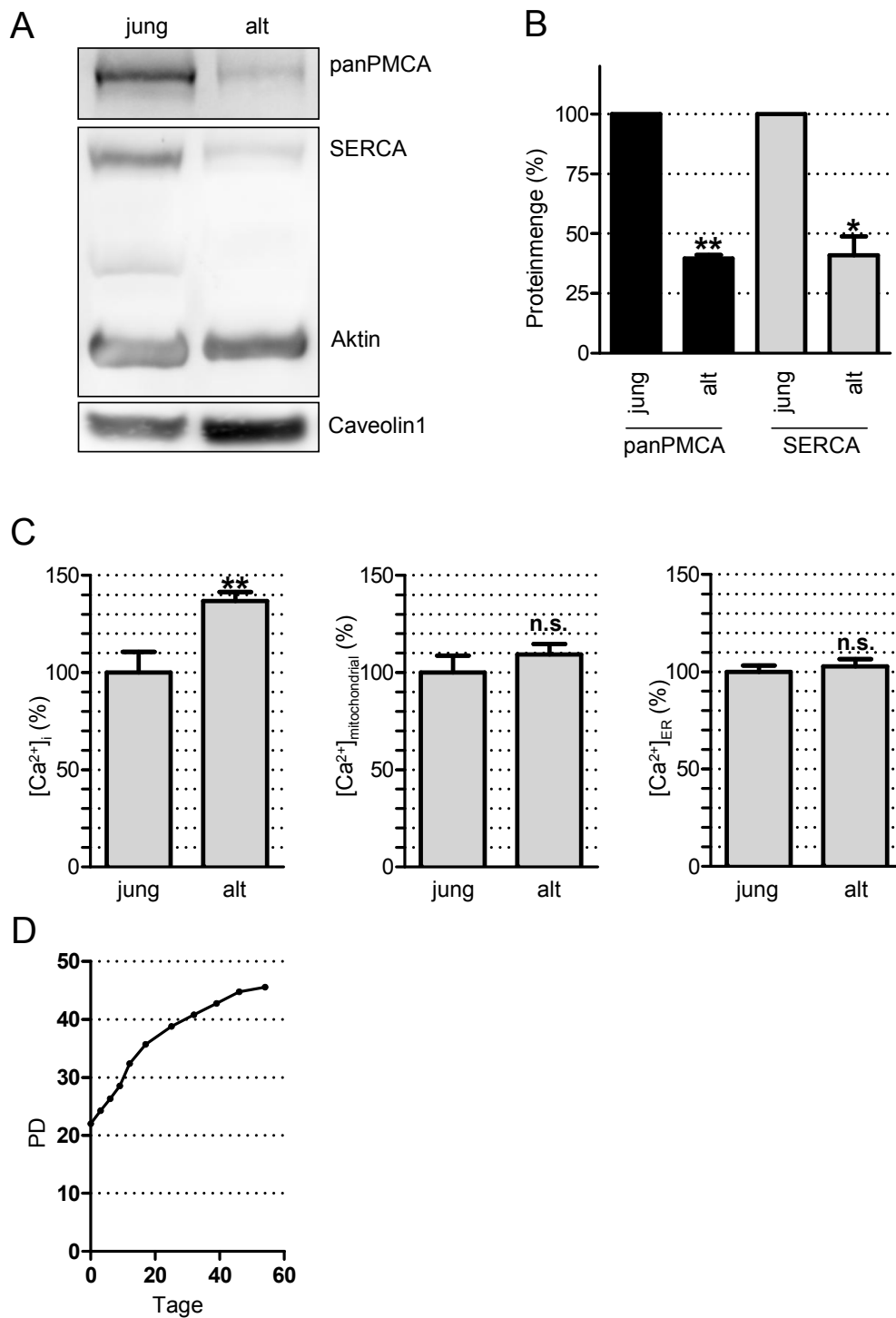


Abbildung 25: Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase in gealterten IMR90-Fibroblasten. (A)

Um das altersspezifische Caveolin und das Ca²⁺-Effluxsystem zu untersuchen, wurden 10 µg Gesamtproteinmenge von Fibroblasten über SDS-PAGE aufgetrennt. Mit einem spezifischen panPMCA-Antikörper, SERCA2-Antikörper bzw. Caveolin1-Antikörper wurden die entsprechenden Proteine detektiert. Aktin diente als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung. **(B)** Die panPMCA und die SERCA-Banden wurden densitometrisch quantifiziert und im Balkendiagramm dargestellt (* <math>p < 0,05</math>, ** <math>p < 0,01</math>, alt zu jung, $n = 3$). **(C)** Fibroblasten wurden bei PD 22 und PD 46 mit Ca²⁺-Sensor cpYC 3.6 (Zytosol), mitocameleon (Mitochondrium) oder D1ER-cameleon (ER) transfiziert. Die jeweiligen Ca²⁺-Messungen sind im Balkendiagramm dargestellt (** PD 46 zu PD 22, <math>p < 0,05</math>, $n = 3$). **(D)** Es wurden jeweils 1×10^5 Fibroblasten kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. Nach jeder Passage wurden die PD ermittelt und als Wachstumskurve mit $f = PD(\text{Zeit})$ dargestellt.

3.5.2 Die PMCA2-Expression ist im Mittelhirn von gealterten Mäusen reduziert

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Alterung auch *in vivo* in Neuronen zu Veränderungen der PMCA2-Expression führt, was eine wichtige Rolle für das neuronale Überleben spielt.

Dafür wurden Gewebelysate des Mittelhirns von 3 Monate jungen und 24 Monate alten C57BL/6- Mäusen biochemisch analysiert. Die Immunoblotuntersuchungen zeigten, dass es auch *in vivo* in Mittelhirnneuronen im Zuge der Alterung zu einer Reduktion der PMCA2-Expression kommt (s. Abb. 26)

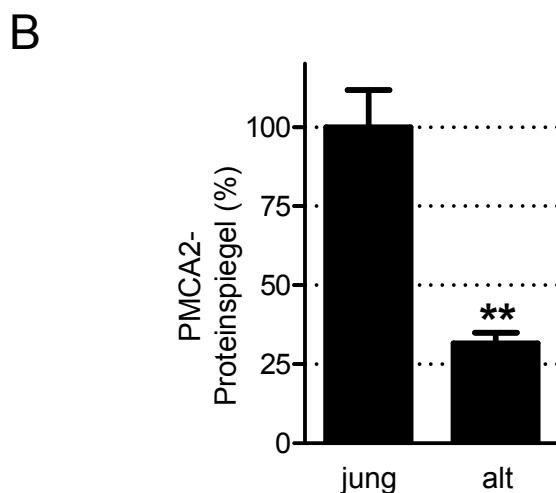
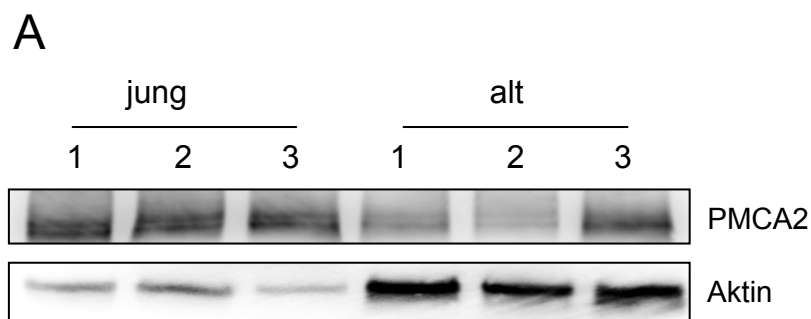


Abbildung 26: Abnahme der PMCA2-Expression während des Alterns in Mäusemittelhirnen.

Jeweils 10µg Gesamtproteinmenge aus den Mittelhirnen von jungen und alten Mäusen wurden in einem BIS-TRIS-gepufferten 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und PMCA2 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. **(B)** Densitometrische Auswertung der PMCA2-Banden (** alt zu jung, $p < 0,01$, $n=3$).

4 Diskussion

Alterationen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase können gravierende Folgen für die Vitalfunktionen der Zelle haben sowohl beim Alterungsprozess als auch bei neurodegenerativen Erkrankungen von Relevanz sein. In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase im Zell- und Primärkulturmodell der Parkinson-Erkrankung, so wie *in vivo* bei der Alterung untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es im *in vitro*-MPP⁺-Modell der Parkinson-Erkrankung zu einer PMCA2-Reduktion, vermittelt durch eine Proteinkinase A (PKA)-abhängige Abnahme der CREB-Phosphorylierung, kommt. Durch die Reduktion von PMCA2 wurde der zytosolische Ca^{2+} -Efflux beeinträchtigt, mit der Folge einer erhöhten zellulären Ca^{2+} -Konzentration und einem verminderten Überleben von primären Mittelhirnneuronen. Außerdem kam es zu einer verminderten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme korrelierend mit einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials. Auch während der Alterung wurden biochemische Veränderungen des Ca^{2+} -Effluxsystems und eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration konstatiert. Die Bedeutung dieser Ergebnisse sowie die möglichen Ursachen dieser Veränderungen sollen nun diskutiert werden.

4.1 Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase bei neurodegenerativen Prozessen

Für neurodegenerative Erkrankungen, die überwiegend altersassoziiert sind, wie etwa die Parkinson-Erkrankung oder die Alzheimer-Erkrankung sind Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase charakteristisch (Bezprozvanny, 2009) und können in vielfältigen Formen auftreten. So kann beispielsweise die Expression Ca^{2+} -bindender Proteine bei den betroffenen Neuronen verringert sein, während deren Expressionsspiegel bei intakten Neuronen relativ hoch sind. Des Weiteren kann auch die mitochondriale Ca^{2+} -Pufferungskapazität beeinträchtigt sein (Esteves et al., 2010). Darüber hinaus kann es zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom z.B. infolge gesteigerter Aktivierung von Glutamatrezeptoren (Glutamatexzitotoxizität) kommen (Hajieva et al., 2009a). Diese Prozesse können letztlich zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen und damit beispielsweise proteolytische Enzyme, wie z.B. Calpaine (Gamerdinger et al., 2006), aktivieren oder Veränderungen in der Genexpression hervorrufen (Ronkainen et al., 2011). Schon leichte Schwankungen des Ca^{2+} -Gleichgewichts können langfristig schwerwiegende Folgen für die vitalen Zellfunktionen haben.

Ca^{2+} -Dysfunktionen könnten bei der Pathobiochemie der Parkinson-Erkrankung von zentraler Bedeutung für den Verlust der dopaminergen Neuronen sein, die eine seltene

Isoform spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs, CaV 1.3, exprimieren und ein autonomes Schrittmacherpotential aufweisen (Surmeier, 2007; Surmeier et al., 2010b). Jedoch ist bislang größtenteils ungeklärt, zu welchen Veränderungen es bei diesen Erkrankungen im Detail kommt und welche Auswirkungen diese auf die Vulnerabilität von Neuronen haben könnten. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welchen Einfluss das experimentelle Parkinson-Toxin MPP^+ auf die Ca^{2+} -Homöostase hat und welche molekularen Mechanismen involviert sein könnten. Dazu wurden in primären Mittelhirnneuronen aus Rattenembryonen und humanen SH-SY5Y-Neuroblastomazellen, die mit MPP^+ behandelt wurden, mit dem GFP-basierten Ca^{2+} -Indikator „Cameleon cpYC 3.6“ Ca^{2+} -Messungen sowie biochemische und molekularbiologische Analysen durchgeführt. Die Funktionsweise dieser relativ neuen Generation von Ca^{2+} -Indikatoren beruht auf einem ratiometrischen Prinzip, womit „Cameleons“ unabhängig von der Expression sind. Des Weiteren wurden diese Ca^{2+} -Indikatoren dahingehend optimiert, dass diese möglichst pH-Wert-unabhängig sind und maximal große Ca^{2+} -Konzentrationsunterschiede detektieren können (Nagai et al., 2004). Zudem ist mit einer entsprechenden Zielsequenz eine organellespezifische Expression möglich (Palmer et al., 2004, 2006).

4.1.1 Der Einfluss von MPP^+ auf die Ca^{2+} -Homöostase

Es ist bekannt, dass die dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta, die bei der Parkinson-Erkrankung zum größten Teil degenerieren, Besonderheiten in der Ca^{2+} -Homöostase aufweisen (Surmeier, 2007). Die typischen Symptome der Erkrankung treten erst nach einem 60 - 70%igen Verlust dieser Neuronen auf, wobei man annimmt, dass dieser Neuronenverlust gleichzeitig die Ursache der Symptome ist (Riederer and Wuketich, 1976; Fearnley and Lees, 1991). Aufgrund des charakteristischen Phänotyps der betroffenen Neuronen, der sich durch die Expression des o.g. spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals CaV 1.3 (s. 1.2.2) auszeichnet, würde man annehmen, dass (1) die Ca^{2+} -Homöostase äußerst sensibel ist und, dass (2) in diesen Neuronen der permanente Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran schneller zu einer Ca^{2+} -Überbelastung führen könnte, was die Vulnerabilität deutlich erhöhen würde. Daher könnte es von entscheidender Bedeutung sein, Störungen der Ca^{2+} -Homöostase, deren Ursachen und deren Folgen aufzuklären, um neue potentielle therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Die Untersuchungen zu Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase bei der Parkinson Erkrankung bzw. in deren Modellen beschränken sich bisher jedoch nur auf wenige Fragestellungen. Zum einen zeigen Analysen, dass α -Synuklein, das ein Protein-Hauptbestandteil der charakteristischen Lewy-Körperchen ist und bei der familiären Form als mutiertes Allel vorliegen kann, in biologischen Membranen Poren formen kann, die Ca^{2+} -durchlässig sind (Danzer et al., 2007). Zum anderen wurde eine Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Protease Calpain beobachtet, was auf erhöhte basale Ca^{2+} -Level hinweist (Vosler et al., 2008). Interessanterweise gehört α -Synuklein zu den Substraten der Calpaine, was *in vitro* sowie in humanen Gewebeproben von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden konnte (Dufty et al., 2007). Darüber hinaus konnte in MPTP/MPP⁺-Mausmodellen der Parkinson-Erkrankung demonstriert werden, dass Isradipin, ein spezifischer Antagonist für spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs, eine neuroprotektive Wirkung hat (Ilijic et al., 2011), was impliziert, dass der permanente Ca^{2+} -Flux, der über solche Ca^{2+} -Kanäle generiert wird, auf der einen Seite einen Risikofaktor darstellt und zum anderen, dass eine Ca^{2+} -Dyshomöostase in der Parkinsonpathologie eine Rolle spielen könnte. Einen weiteren Aspekt der Ca^{2+} -Dyshomöostase beschreibt eine Studie, in der gezeigt werden konnte, dass MPP⁺ zu einer Depletion von ATP nach vier Stunden in Primärneuronen führt, gefolgt von Exzitotoxizität vermittelt über einen Glutamatrezeptor-gekoppelten Ca^{2+} -Influx (Leist et al., 1998).

Bislang ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt, wodurch das Ca^{2+} -Gleichgewicht in der Parkinson-Pathologie gestört wird und ob dies möglicherweise entscheidend zu dem Untergang der dopaminergen Neuronen beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Parkinson-assoziierten Neurotoxins MPP⁺ auf die Ca^{2+} -Homöostase untersucht. Dabei konnten frühere Studien (Lee et al., 2006; Sørensen et al., 2009) bestätigt werden, die zeigen dass es zu einem Anstieg des basalen zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels kommt (s. Abb. 4). Parallel zu den zytosolischen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase wurde in dieser Arbeit eine Abnahme der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration, sowie eine positive Korrelation der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration mit dem mitochondrialen Membranpotential nachgewiesen (s. Abb. 5). Von zentraler Bedeutung war in diesem Zusammenhang die Frage, ob dieser zytosolische Ca^{2+} -Anstieg durch eine Beeinträchtigung des Ca^{2+} -Efflux- oder des Ca^{2+} -Influxsystems hervorgerufen werden könnte. Eine Studie, die schon vor über 20 Jahren mit Hepatozyten

durchgeführt wurde, hat Hinweise darauf ergeben, dass die PMCA2-Aktivität und somit der Ca^{2+} -Efflux durch MPP^+ beeinträchtigt sein könnte (Kass et al., 1988). Eine verminderte Effluxleistung, hervorgerufen durch MPP^+ , konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden (s. Abb. 6). Darüber hinaus wurde bei der näheren Untersuchung des Ca^{2+} -Effluxsystems in neuronalen Zellen zum ersten Mal eine MPP^+ -induzierte Reduktion der Expression der neuronenspezifischen PMCA2 beobachtet, während SERCA und NCX, zwei weitere Bestandteile des Ca^{2+} -Effluxsystems, keine signifikanten Veränderungen in den Experimenten zeigten (s. Abb. 7 und 8).

Diese Befunde führten zu der Frage, ob durch einen Verlust von PMCA2 der permanente Ca^{2+} -Influx über die spannungsgesteuerten L-Typ-Kanäle in den dopaminergen Neuronen nicht mehr kompensiert werden könne und, ob diese dauerhafte Belastung möglicherweise eine erhöhte neuronale Vulnerabilität zur Folge hat. Weiterhin stellte sich die Frage, wodurch es zu einer PMCA2-Reduktion kommt und, ob dies relevant für das neuronale Überleben sein könnte. Diese Fragen sollen in den Abschnitten 4.1.2 bis 4.1.4 diskutiert werden.

Bei den vorangegangenen Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass Zellschädigungen durch die Effekte einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration verursacht werden. Es muss jedoch auch beachtet werden, dass Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase generell auch zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms und somit lokal zu einem Ca^{2+} -Mangel führen können, was sich ebenfalls negativ auf das Zellüberleben auswirken kann. So wurde in einer jüngeren Studie beschrieben, dass die Nikotin-abhängige Neuroprotektion in einem Parkinson-ähnlichen Modell nur bei leicht erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen erreicht werden konnte. Hierbei wurde ein Ca^{2+} -abhängiger Signalweg identifiziert, der vermittelt über Calmodulin und Phosphatidylinositol-3-Kinase protektive Effekte ausübt sollte und der durch die Aktivierung eines nikotinischen Acetylcholinrezeptors induziert wird (Toulorge et al., 2011). In einer weiteren Arbeit konnte die neuroprotektive Relevanz von TRPC1 (s. 1.1.1), durch das ein Ca^{2+} -Influx erfolgen kann, im Parkinson-Modell bestätigt werden (Selvaraj et al., 2009).

Somit wird aufgrund der vielseitigen und komplexen Effekte von Ca^{2+} deutlich, dass Ca^{2+} an sich sowohl schädigende als auch protektive Auswirkungen haben kann, was u.a. abhängig davon ist, über welchen Kanal und in welcher subzellulären Region ein Ca^{2+} -Influx erfolgt.

4.1.2 Regulation der PMCA2-Expression

Bisher sind wenige Mechanismen im Detail bekannt, die an der Regulation der Expression der PMCA-Isoformen beteiligt sind. Die Erkenntnisse beschränken sich im Wesentlichen lediglich auf die Identifikation einiger Induktoren der PMCA2-Expression und entwicklungsabhängige Veränderungen der Expression. So wurde beispielsweise beschrieben, dass das (Vitamin-)D-Hormon Calcitriol die Hochregulation der Expression von PMCA1b in Nierenzellen auf Transkriptions- und Translationsebene induziert (Glendenning et al., 2000). Dieser Effekt konnte auch für die Isoform PMCA4b in den klonalen MDCK-Zellen der distalen Nierentubuli nachgewiesen werden (Kip and Strehler, 2004). Des Weiteren wurde beobachtet, dass die neuronenspezifische Splicevariante der Isoform PMCA4CII, während der Differenzierung granulärer Neuronen des Kleinhirns, bei einem chronischen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, Calcineurin-abhängig herunterreguliert wird. Gleichzeitig wurde unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Expression der Isoformen PMCA1CII, 2 und 3 beobachtet (Guerini et al., 2000). Dass durch Ca^{2+} selbst die Expression von PMCA1, 2 und 3 induziert werden kann, wurde bereits ein Jahr zuvor in Abhängigkeit von der Entwicklung von Neuronen beobachtet (Guerini et al., 1999). Dabei stellte sich zudem heraus, dass die Expression auch während der Entwicklung von Kleinhirnneuronen hochreguliert wird, während die Expression in neonatalen cerebellären Neuronen aus Ratten kaum detektierbar war. Auch in Mäusen wurde eine ähnliche entwicklungsabhängige Regulation der Expression der verschiedenen PMCA-Isoformen beschrieben (Marcos et al., 2009). Die distinkten Signalwege bei der Ca^{2+} -abhängigen Regulation der Expression sind nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Effektoren, wie die Phosphatase Calcineurin und die CaM-Kinasen, involviert sind, was wiederum die Bedeutung des Phosphorylierungsstatus von Transkriptionsfaktoren impliziert (Carafoli et al., 1999). In einer früheren Studie wurde die hormonelle Stimulierung der Transkription von PMCA1 in verschiedenen Zelltypen demonstriert (Kuo et al., 1993). Diese Untersuchungen schließen die Beteiligung cAMP-, Ca^{2+} - und Proteinkinase C-abhängiger Signalwege mit ein.

Die sehr komplexe Regulation der Expression der verschiedenen PMCA-Isoformen kann somit verschiedene Mechanismen beinhalten. Diese Mechanismen können sich einerseits gewebeabhängig unterscheiden und andererseits entwicklungsabhängig verschiedener Signalwege bedienen, angepasst an die Anforderungen einer Zelle und die funktionellen Eigenschaften der diversen PMCA-Isoformen.

Bei genomweiten Promotorstudien wurde innerhalb des PMCA2-Promotors ein cAMP-response-Element (cre)-Halbpalindrom identifiziert (Zhang et al., 2005), weshalb in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors CREB an der Regulation der PMCA2-Expression bzw. an der MPP⁺-induzierten PMCA2-Abregulation untersucht wurde. In dieser Arbeit wurde nach MPP⁺-Behandlung sowohl eine Abnahme der PMCA2-Expression auf Transkriptions- und Proteinebene (s. Abb. 7 und 8), als auch eine Abnahme der Phospho-CREB-Spiegel nachgewiesen (s. Abb. 10). Aufgrund der erhobenen Daten (s. 3.2) wird folgender Mechanismus für eine mögliche Regulation der PMCA2-Expression vorgeschlagen (s. Abb. 27). Es ist anzunehmen, dass die Expression von PMCA2 in neuronalen Zellen über den Transkriptionsfaktor CREB reguliert werden kann, abhängig von der CREB-Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA).

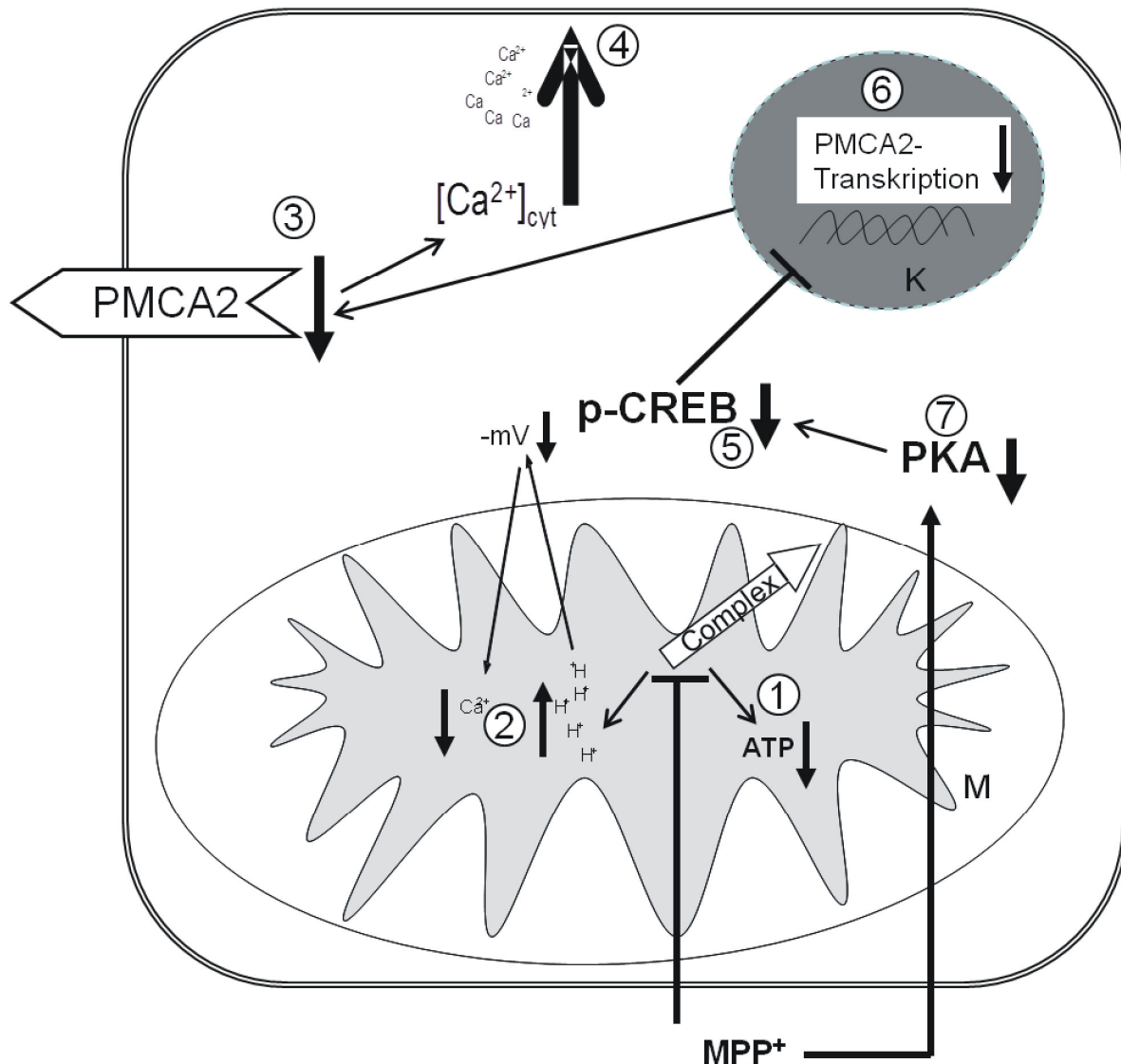


Abbildung 27: Hypothetisches Modell des Regulationsmechanismus der PMCA2-Expression und der Auswirkungen von MPP^+ auf die Ca^{2+} -Homöostase : Das Neurotoxin MPP^+ inhibiert den mitochondrialen Komplex-I der Atmungskette mit der Folge einer reduzierten ATP-Produktion (1), einer Depolarisation der mitochondrialen Membran und verringerten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme (2). Des Weiteren induziert MPP^+ eine Reduktion der PMCA2-Expression (3), wodurch der zytosolische Ca^{2+} -Efflux beeinträchtigt ist und $[Ca^{2+}]_i$ erhöht ist (4). Die Reduktion der PMCA2-Expression kann durch eine Abnahme des Transkriptionsfaktors Phospho-CREB (5) vermittelt werden. Die MPP^+ induzierte Abnahme der CREB-Phosphorylierung resultiert in einer Reduktion der PMCA2-mRNA-Transkription im Kern (6). Die CREB-Phosphorylierung und damit auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors erfolgt durch die Proteinkinase A (PKA) (7). (M: Mitochondrium, K: Kern, -mV: Membranpotential)

Die demonstrierten Veränderungen in der PMCA2-Expression (s. 3.2.2 bis 3.2.8), die sowohl nach experimenteller CREB-Herunterregulation (s. Abb. 11), als auch unter

Einfluss einer dominant-negativen CREB-Mutante (s. Abb. 14) und nach Modulation der PKA-Aktivität beobachtet wurden (s. Abb. 14 und 15), lassen den Schluss zu, dass der Transkriptionsfaktor Phospho-CREB in SH-SY5Y-Zellen und primären Mittelhirnzellen an der Regulation der PMCA2-Expression beteiligt ist. Außerdem wurde nach MPP⁺-Behandlung, einhergehend mit der PMCA2-Reduktion, eine Abnahme der Phospho-CREB-Spiegel festgestellt (s. Abb. 10), was auch konsistent mit den Resultaten einer Studie ist, bei welcher der Einfluss von MPP⁺ auf die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren analysiert wurde. Dabei wurde belegt, dass in klonalen PC-12-Zellen nach MPP⁺-Inkubation bis zu 40% weniger CREB-Protein an DNA gebunden war (Xu et al., 2005). Die Abhängigkeit von der PKA spiegelte sich zudem nach Modulation der PKA-Aktivität (s. Abb. 14C) in den entsprechenden Veränderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen wieder. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die MPP⁺-induzierte Abnahme der PMCA2-Expression und die damit verbundene Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration durch die PKA-Aktivierung verhindert werden konnte (s. Abb. 17 und 18). Die Rolle der PKA im MPP⁺-basierten Parkinson-Modell wurde auch in einer Untersuchung demonstriert, bei der vermittelt über PKA eine neuroprotektive Wirkung des Urocortins gegen MPP⁺-Toxizität beschrieben wurde (Kim et al., 2010). Auch durch die Inhibition der Phosphodiesterase mittels Rolipram konnte ein neuroprotektiver Effekt erzielt werden (Yang et al., 2008). Die Inhibition der Phosphodiesterase führt zu einem verminderten Abbau von cAMP, das als Aktivator von PKA fungiert.

Mögliche Ursachen, die zu Veränderungen der PMCA2-Expression durch diesen vorgeschlagenen Mechanismus im MPP⁺-basierten Zellkultur-Modell von PD führen, werden im Abschnitt 4.1.3 diskutiert bzw. mögliche Folgen der PMCA2-Reduktion im Abschnitt 4.1.4.

4.1.3 Mögliche Ursachen der MPP⁺-induzierten PMCA2-Reduktion

Bei der MPP⁺-induzierten Reduktion der PMCA2-Expression ist es von Interesse aufzuklären, welcher Mechanismus zu genau der gezeigten verminderten Phosphorylierung von CREB und damit zu einer geringeren Transkriptionsaktivierung durch CREB führt. Eine mögliche Ursache könnte in einer geringeren Aktivität der PKA, z.B. aufgrund von Schädigungen durch oxidativen Stress, liegen. Des Weiteren könnte MPP⁺ zu einer geringeren Expression der PKA führen. Andererseits könnte der Grund auch eine Abnahme des Substrats, ATP, sein, das die PKA für den Phosphatgruppentransfer auf CREB

benötigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die genannten Ansätze nicht in vollem Umfang bearbeitet werden. Die Analysen beschränkten sich darauf, den Einfluss eines möglichen Mangels an ATP auf die PMCA2-Expression zu untersuchen (s. 3.3) und sind somit präliminär. Die hier vorliegenden Befunde sollen durch zukünftige Untersuchungen unterstützt werden.

Dass MPP^+ die ATP-Synthese reduzieren kann, ist beschrieben (Nakai et al., 2003). Daher wurde in dieser Studie der Effekt einer ATP-Reduktion auf die PMCA2-Expression untersucht. Dazu wurden weitere Substanzen eingesetzt, von denen bekannt ist, dass diese unter anderem die ATP-Synthese inhibieren können. So konnte gezeigt werden, dass durch Rotenon, einen weiteren Komplex I-Inhibitor, Oligomycin, einen Inhibitor der ATP-Synthase und durch 2-desoxy-Glukose, einen Glykolyse-Inhibitor, eine Abnahme der PMCA2-Expression induziert werden konnte (s. Abb. 20 und 21). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein ATP-Mangel an einer verminderten PMCA2-Expression beteiligt sein könnte. Einhergehend mit der PMCA2-Abnahme konnten erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen festgestellt werden (s. Abb. 20). Durch den Versuch, mit Methyl-Succinat, einem zellpermeablen Substrat für den Komplex II der mitochondrialen Atmungskette, die ATP-Synthese bei gleichzeitiger MPP^+ -Inkubation zu stimulieren, konnte die PMCA2-Reduktion jedoch nicht verhindert werden.

Verschiedene Untersuchungen geben dennoch Hinweise auf eine metabolische Kontrolle der Ca^{2+} -Homöostase. So kann z.B. eine ATP-Depletion einen Effekt auf den zellulären Ca^{2+} -In- und Efflux haben (Barrow et al., 2007). Dabei wurde gezeigt, dass sich der Ca^{2+} -Einstrom nach ATP-Depletion in demselben Maß verringert wie der Ca^{2+} -Ausstrom. Die Autoren dieser Studie schlussfolgern daraus, dass aufgrund der reduzierten Verfügbarkeit von ATP für die ATP-abhängigen Ca^{2+} -Effluxpumpen der Ca^{2+} -Influx gedrosselt wird, um die Zelle vor Ca^{2+} -Toxizität zu schützen. Im Gegensatz dazu ist jedoch auch bekannt, dass sowohl extra- als auch intramitochondriales Ca^{2+} ein Aktivator des Citratzyklus und der ATP-Synthese ist (Hansford und Castro, 1981; Gellerich et al., 2009) und damit eine Schlüsselrolle bei der oxidativen Phosphorylierung inne hat (Griffiths und Rutter, 2009). Daher wäre es auch denkbar, dass der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, wie in dieser Arbeit gezeigt, nach ATP-Depletion einem Energiedefizit entgegen wirken könnte.

Die Wirkung von MPP^+ beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Reduktion der ATP-Synthese. Es muss hier auch erwähnt werden, dass oxidativer Stress, z.B. in Form von Proteincarbonylierung und Glutathiondepletion (Hajieva et al., 2009b), ein prominenter Effekt der MPP^+ -Toxizität ist und durch Antioxidantien, wie z.B. Bisarylimine (Mocko et al., 2010), aber auch phenolische Strukturen wie z.B. Östrogene (Moosmann and Behl, 1999) neuroprotektive Effekte ausgeübt werden können.

Einem weiteren interessanten Befund zu Folge, dem eine Untersuchung über die Auswirkung von oxidativem Stress, induziert durch Paraquat, u.a auf PMCA2 zu Grunde liegt, führt oxidativer Stress zu einer Inaktivierung von PMCA2 einhergehend mit einer proteolytischen Degradation (Zaidi et al., 2009). Paraquat ist eine Ammoniumverbindung, die sowohl als Pflanzenschutzmittel als auch in der experimentellen Medizin in Modellsystemen der Parkinson-Krankheit eingesetzt wird. Dies würde wiederum die Annahme stützen, dass oxidativer Stress als Ursache für Veränderungen in der transkriptionellen Regulation nur bedingt involviert ist.

4.1.4 Relevanz der PMCA2-Expression für das neuronale Überleben

Dass PMCA2 relevant für das neuronale Überleben ist, wurde im Zusammenhang mit dem Verlust von Rückenmarkneuronen im Tiermodell der Multiplen Sklerose demonstriert (Kurnellas et al., 2010). Es wurde dabei beschrieben, dass die Aktivierung des AMPA/Kainat-Rezeptors für die Reduktion der PMCA2-Expression in diesem Modell verantwortlich ist, wohingegen die Inhibition dieses Rezeptors die normale PMCA2-Expression wieder herstellt. Weiterhin wurde in dieser Studie postuliert, dass die experimentelle Abregulation von PMCA2 zu dem Verlust von Rückenmarkneuronen führt, was durch die Abnahme des „Collapsin Response Mediator Proteins 1“ (CRMP1) vermittelt werden soll. Weshalb die Abnahme von CRMP1 zu dem Verlust von Neuronen führte, wurde nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde jedoch der mögliche Zusammenhang von CRMP1 und einer beeinträchtigten Assemblierung von Mikrotubuli sowie daraus folgend einem gestörten axonalen Transport diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abregulation der PMCA2-Proteinmenge durch das Parkinson-Toxin MPP^+ induziert, was zu der Frage führte, ob durch diese Expressionsabnahme die Neurotoxizität von MPP^+ vermittelt werden könnte und, ob dies eine Auswirkung auf das Überleben von Mittelhirnneuronen, v.a. von dopaminergen

Neuronen, haben könnte. Die experimentelle Reduktion der Expression von PMCA2 mittels siRNA führte zu einem dramatischen Verlust von primären Mittelhirnneuronen (s. Abb. 22). Zudem wurde eine signifikant höhere Abnahme der Tyrosinhydroxylase-Proteinmenge im Vergleich zu MAP2, welcher ein allgemeiner neuronaler Marker ist, beobachtet (s. Abb. 23). Die Tyrosinhydroxylase wird für die Dopaminsynthese benötigt und wird daher von dopaminergen Neuronen exprimiert. Deswegen wird die Tyrosinhydroxylase als Marker für dopaminerge Neuronen verwendet (Moon et al., 2005). Die Analyse dieser Neuronen sind von Interesse, da es im Krankheitsverlauf der Parkinson-Erkrankung zu einem überwiegenden Verlust einer Population dopaminergere Neuronen im Mittelhirn, die als Substantia Nigra pars compacta bezeichnet wird, kommt. Der Verlust dieser Neuronenpopulation wird als Ursache der typischen Symptome der Parkinson-Erkrankung gesehen. Somit wurde hier einerseits die Relevanz von PMCA2 für das neuronale Überleben generell bestätigt, andererseits scheint der Verlust von PMCA2 in Mittelhirnneuronen möglicherweise eine Rolle für die Vulnerabilität von dopaminergen Neuronen spielen zu können.

Da die PMCA2-Reduktion von einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration begleitet wird, liegt die Vermutung nahe, dass dies die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Enzymen, wie beispielsweise den Calpainen, nach sich ziehen könnte. Dass Calpaine auch durch MPP^+ aktiviert werden können und möglicherweise eine zentrale Rolle als Mediator der Neurotoxizität von MPP^+ spielen, konnte durch Untersuchungen in primären Neuronen des Kleinhirns demonstriert werden (Harbison et al., 2011). Calpaine sind proteolytische Enzyme, zu deren zahlreichen Substraten auch α -Synuklein gehört. Es ist sowohl *in vitro* als auch in Gewebe von Parkinson-Patienten nachgewiesen worden, dass α -Synuklein durch Calpaine proteolytisch degradiert werden kann (Dufty et al., 2007). α -Synuklein-Aggregate sind ein Hauptbestandteil von Einschlusskörpern, den Lewy-Körpern, die ein Hauptmerkmal bei der Parkinson-Erkrankung darstellen (Spillantini et al., 1997). Die Degradation von α -Synuklein könnte eine entscheidende Rolle bei der Degeneration von dopaminergen Neuronen spielen. So wurde eine Beteiligung von α -Synuklein bei der Assemblierung des SNARE-Komplexes, der für die synaptische Transmitterfreisetzung essentiell ist, demonstriert (Burré et al., 2010). Die Bedeutung von α -Synuklein für die Bildung des SNARE-Komplexes und die Aufrechterhaltung synaptischer Funktionen wurde in weiteren Untersuchungen bestätigt (Garcia-Reitböck et al., 2010; Greten-Harrison et al., 2010), wobei das Fehlen von Synukleinen im Maus-Modell u.a. zu einer erhöhten

Sterblichkeit führte bzw. transgene Mäuse, die eine Deletionsmutante von α -Synuklein exprimierten, eine verminderte Dopaminfreisetzung aufwiesen. Interessanterweise wurde auch ein neurotoxischer Effekt von Dopamin bei erhöhten zytosolischen Dopaminkonzentrationen nachgewiesen, der durch die Applikation von Antagonisten für spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle verhindert werden konnte (Mosharov et al., 2009). Eine Reduktion von PMCA2 könnte in diesem Zusammenhang auch deswegen eine kritische Rolle spielen, da eine Interaktion von PMCA2 mit dem SNARE-Protein Syntaxin-1A beobachtet wurde (Garside et al., 2009).

Um die Bedeutung von PMCA2 für das neuronale Überleben in dieser Arbeit weiter zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Zellen transient mit einem PMCA2-Expressionsvektor transfiziert und Überlebensanalysen nach MPP^+ -Inkubation durchgeführt. Der hier erwartete protektive Effekt durch die PMCA2-Transfektion konnte jedoch nicht demonstriert werden. SH-SY5Y-Zellen, die mit PMCA2 transfiziert wurden, zeigten lediglich eine minimal erhöhte Überlebensrate nach MPP^+ -Inkubation (s. Abb. 24). Dies könnte einerseits auf eine Punktmutation, die während der Klonierung aufgetreten ist, zurückzuführen sein. Andererseits könnte ein möglicher protektiver Effekt aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz stark abgeschwächt worden sein. Ein potentiell protektiver Effekt durch die PCMA2- Überexpression auf im MPP^+ -Modell soll durch zukünftige Untersuchungen demonstriert werden. Dazu soll ein weiterer PMCA2-Expressionsvektor (VanHouten et al., 2010) verwendet werden, der im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand.

4.2 Altersabhängige Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase

Es gibt zahlreiche Studien, die eine Veränderung der neuronalen Ca^{2+} -Homöostase im Zuge der Alterung belegen (s. dazu auch 1.2.1). Beispielsweise wurde in eigenen Studien der Arbeitsgruppe eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in gealterten hippocampalen Neuronen gemessen, begleitet von einer erhöhten Aktivität von Calpainen und einem verminderten Überleben (Hajieva et al., 2009a). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden altersabhängige Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase festgestellt (s. 3.5). Ein altersassoziierter Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration konnte auch in gealterten primären Fibroblasten bestätigt werden, während keine Veränderungen sowohl des mitochondrialen Ca^{2+} -Spiegels als auch der Ca^{2+} -Konzentrationen im endoplasmatischen Retikulum detektiert werden konnten (s. Abb. 25). Interessant ist

ebenfalls, dass eine reduzierte PMCA2-Expression im Mittelhirn von 24 Monate alten Mäusen (s. Abb. 26) bzw. die altersabhängige Abnahme von PMCA und SERCA in Fibroblasten beobachtet werden konnte (s. Abb. 25).

Die Frage, ob erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen die Vulnerabilität erhöhen oder zum Alterungsprozess beitragen, stellt noch einen wichtigen Diskussionspunkt dar. Auch wenn die Hinweise darauf, dass altersabhängige Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase der Zellintegrität und den zellulären Vitalfunktionen eher schaden als nutzen (Toescu et al., 2004), überwiegen, ist der Schluss nicht eindeutig. Da es auch Hinweise auf protektive Effekte durch erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Spiegel gibt (Carafoli et al., 1999; Selvaraj et al., 2009), muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass altersabhängige Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase unter Umständen einen kompensatorischen Mechanismus darstellen könnten, um typischen altersabhängigen Verschleißerscheinungen entgegenzuwirken.

Es ist abschließend festzuhalten, dass durch die Ergebnisse dieser Arbeit, in Bezug auf die Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase während der altersassoziierten Neurodegeneration und während der physiologischen Alterung, neue Erkenntnisse über die Veränderungen des Ca^{2+} -Effluxsystems und im Speziellen über mögliche Regulationsmechanismen der PMCA2-Expression gewonnen wurden. Weiterhin liefern diese Ergebnisse neue Ansatzmöglichkeiten für weitere Forschungsprojekte, die im folgenden Abschnitt (4.3) diskutiert werden.

4.3 Perspektiven

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen zu den Veränderungen der neuronalen Ca^{2+} -Homöostase unter MPP^+ -Einfluss lassen die Hypothese zu, dass MPP^+ zu einer Abregulation von PMCA2 führt, welche PKA-abhängig über eine Abnahme des Transkriptionsfaktors Phospho-CREB vermittelt wird und nachfolgend zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, aufgrund eines beeinträchtigten Ca^{2+} -Efflux und einer verringerten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme, führt. Letztlich war mit diesen Veränderungen eine erhöhte neuronale Vulnerabilität verbunden (s. Abb. 28).

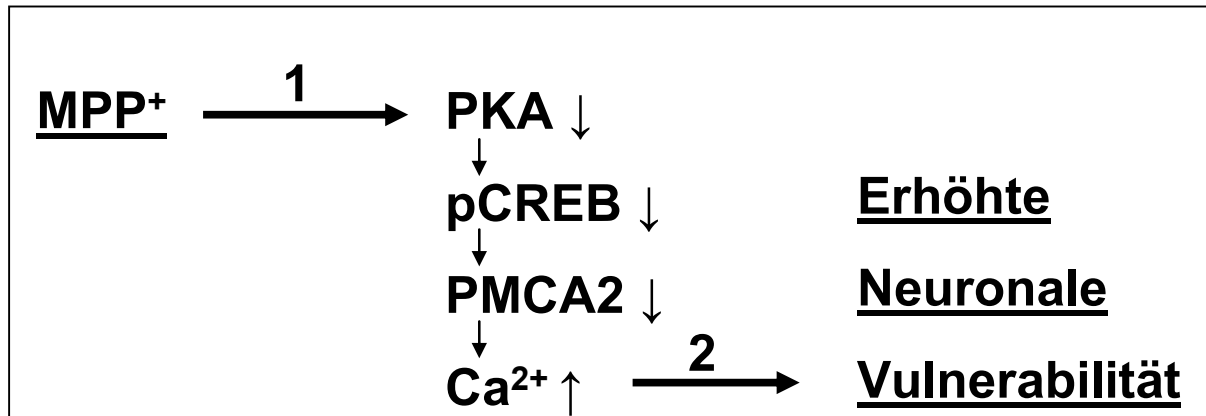


Abbildung 28: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse im Kontext mit den Perspektiven. Das Schema zeigt den Einfluss von MPP⁺ auf die PMCA2-Expression und damit verbunden auf das verminderte neuronale Überleben (s. auch Text). Die möglichen Ansatzpunkte, mit zukünftigen Forschungsprojekten anzuknüpfen, wären (1) die Identifizierung weiterer Ursachen der MPP⁺-induzierten PMCA2-Reduktion, sowie (2) die weitere Aufklärung des PMCA2-abhängigen neuronalen Überlebens.

Mögliche zukünftige Ansätze wären einerseits die Aufklärung weiterer Ursachen der MPP⁺-induzierten PMCA2-Herunterregulation, im Hinblick auf mögliche Veränderungen des Energiemetabolismus und den möglichen Einfluss von oxidativem Stress auf die PMCA2-Expression (s. auch 4.1.3). Andererseits ist es von Interesse, die exakten Folgen einer PMCA2-Reduktion, die letztlich zu einer erhöhten neuronalen Vulnerabilität führen, zu untersuchen. Hervorzuheben ist in diesem Kontext eine mögliche Beeinträchtigung synaptischer Funktionen als Ursache axonaler Degeneration von dopaminergen Neuronen. Weiterhin ist es erforderlich zu überprüfen, ob der Verlust von Neuronen als Folge einer PMCA2-Herunterregulation durch eine PMCA2-Überexpression verhindert werden kann. Zusätzlich ist es notwendig, die Relevanz dieser Ergebnisse *in vivo* zu überprüfen. Eine Möglichkeit, diesen Ansatz zu verfolgen, bietet ein transgenes *C. elegans*-Modell, das den in dieser Arbeit verwendeten Ca²⁺-Indikator „Cameleon“ spezifisch in den dopaminergen Neuronen exprimiert und in unseren Laboren entwickelt wurde. Bei diesem Modell handelt es sich um eine transgene Linie, die „Cameleon“ stabil in den dopaminergen Neuronen exprimiert (s. Abb. 29). Die unter Laborbedingungen überwiegend vertretende Zwitterform von *C. elegans* (Hermaphrodit) besitzt eine konstante Zellzahl, darunter 302 neuronale Zellen, wovon 8 dopaminerge Neuronen sind. Diese 8 dopaminergen Neuronen bestehen aus 4 cephalischen Neuronen (CEP) und jeweils 2 anterioren Deiriden (ADE) bzw. 2 posterioren Deiriden (PDE). Für die gewebespezifische Expression von „Cameleon“ wurde der Promotor für den Dopamintransporter *dat-1* verwendet. Dieses Konstrukt, bestehend

aus *dat-1*-Promotor und der „Cameleon“-Variante cpYC 3.6, wurde in den für *C. elegans* geeigneten Vektor pRL1899 kloniert.

Zurzeit werden in unserer Arbeitsgruppe bereits Untersuchungen zu altersabhängigen Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Level in diesem Modell durchgeführt.

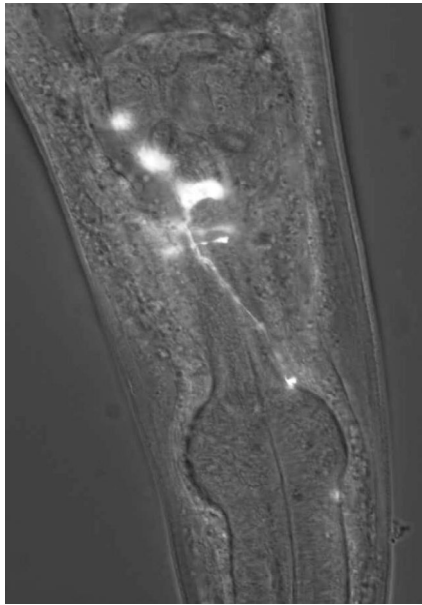


Abbildung 29: Anteriorer Bereich der stabilen *C. elegans*-Linie CB 079. Bei dieser fluoreszenzmikroskopischen Durchlichtaufnahme (DIC) dargestellt bei 60-facher Vergrößerung sind einige Soma und Teile der Neuronenfortsätze von CEP-Neuronen deutlich durch das CFP-Signal des Ca^{2+} -Indikators „Cameleon“ zu erkennen. Hierbei wurde CFP bei 440 nm angeregt und die Emission bei 485 nm Wellenlänge detektiert.

Des Weiteren müssen auch *in vivo*-Studien folgen, die (1) den Effekt von MPP^+ auf die PMCA2-Expression und (2) die Relevanz von PMCA2 für das neuronale Überleben in Säuger-Modellen untersuchen.

5 Zusammenfassung/Summary

Calcium (Ca^{2+}) ist ein ubiquitär vorkommendes Signalmolekül, das an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, von der Proliferation bis zum programmierten Zelltod, beteiligt ist. Daher müssen die intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel streng kontrolliert werden. Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase während der altersassoziierten Neurodegeneration können dazu beitragen, dass Neuronen vulnerabler sind. So wurden erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen in gealterten Neuronen, begleitet von einer erhöhten Vulnerabilität, beobachtet (Hajieva et al., 2009a). Weiterhin wird angenommen, dass der selektive Untergang von dopaminergen Neuronen bei der Parkinson Erkrankung auf eine erhöhte Ca^{2+} -Last zurückzuführen sein könnte, da diese Neuronen einem ständigen Ca^{2+} -Influx, aufgrund einer besonderen Isoform (CaV 1.3) spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ, ausgesetzt sind (Chan et al., 2007). Bislang wurden die molekularen Mechanismen, die einem Ca^{2+} -Anstieg zu Grunde liegen und dessen Auswirkung jedoch nicht vollständig aufgeklärt und daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Um Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase während der altersassoziierten Neurodegeneration zu analysieren wurden primäre Mittelhirnzellen aus Rattenembryonen und SH-SY5Y-Neuroblastomazellen mit dem Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridin (MPP^+), das bei der Etablierung von Modellen der Parkinson-Erkrankung breite Anwendung findet, behandelt. Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden mit einem auf dem grün fluoreszierenden Protein (GFP)-basierten Ca^{2+} -Indikator, „Cameleon cpYC 3.6“ (Nagai et al., 2004), ermittelt. Dabei wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass MPP^+ die Abregulation der neuronenspezifischen ATP-abhängigen Ca^{2+} -Pumpe der Plasmamembran (PMCA2) induziert, die mit der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums (SERCA) und dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) das zelluläre Ca^{2+} -Effluxsystem bildet, was zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt. Die PMCA2-Abnahme wurde sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinebene demonstriert, während keine signifikanten Veränderungen der SERCA- und NCX-Proteinmengen festgestellt wurden. Als Ursache der Reduktion der PMCA2-Expression wurde eine Abnahme des Transkriptionsfaktors Phospho-CREB ermittelt, dessen Phosphorylierungsstatus abhängig von der Proteinkinase A (PKA) war. Dieser Mechanismus wurde einerseits unter MPP^+ -Einfluss und andererseits vermittelt durch endogene molekulare Modulatoren gezeigt. Interessanterweise konnten die durch MPP^+ induzierte PMCA2-Abregulation und der zytosolische Ca^{2+} -Anstieg durch die Aktivierung der PKA verhindert werden. Parallel dazu wurde eine MPP^+ -abhängige verringerte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen, welche mit einer Abnahme des

mitochondrialen Membranpotentials korrelierte. Darüber hinaus kam es als Folge der PMCA2-Abnahme zu einem verminderten neuronalen Überleben.

Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase wurden auch während der normalen Alterung in primären Fibroblasten und bei Mäusen nachgewiesen. Dabei wurden verringerte PMCA- und SERCA-Proteinmengen in gealterten Fibroblasten, einhergehend mit einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration demonstriert. Weiterhin wurden verringerte PMCA2-Proteinmengen im Mittelhirn von gealterten Mäusen (C57B/6) detektiert.

Der zelluläre Ca^{2+} -Efflux ist somit sowohl im Zuge der physiologischen Alterung als auch in einem altersbezogenen Krankheitsmodell beeinträchtigt, was das neuronale Überleben beeinflussen kann. In zukünftige Studien soll aufgeklärt werden, welche Auswirkungen einer PMCA2-Reduktion genau zu dem Verlust von Neuronen führen bzw. ob durch eine PMCA2-Überexpression neurodegenerative Prozesse verhindert werden können.

Summary

Numerous physiological and molecular events are calcium (Ca^{2+})-dependent and age-associated alterations of Ca^{2+} -homeostasis impair neuronal survival. Thus, increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ accompanied by decreased survival in aged hippocampal neurons was described (Hajieva et al., 2009a). Moreover, it is assumed that Ca^{2+} -dependent pacemaking by L-Type voltage gated Ca^{2+} -channels could contribute to the selective degeneration of dopaminergic neurons occurring in Parkinson's Disease (Chan et al., 2007). Since the underlying molecular mechanisms are not fully elucidated we have explored alterations of Ca^{2+} -homeostasis during age-associated neurodegeneration.

Employing SH-SY5Y cells and primary mesencephalic neurons, we here demonstrate a significant increase in cytosolic calcium after inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP^+), which is a well-established *in vitro* model of Parkinson's disease. This increase in calcium concentration is correlated with a downregulation of the neuron-specific plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2 (PMCA2). Two other important mediators of calcium efflux, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), and Na^+ - Ca^{2+} -exchanger (NCX), remained unaltered, indicating a specific role of PMCA2 in maintaining calcium homeostasis in midbrain neurons. The observed PMCA2 downregulation was accompanied by reduced levels of CREB phosphorylation dependent on protein kinase A (PKA). Interestingly, MPP^+ induced PMCA2 downregulation and elevated cytosolic Ca^{2+} could be prevented by activating PKA.

In order to investigate the potential influence of PMCA2 on neuronal vulnerability, experimental downregulation of PMCA2 by means of siRNA was performed. The results demonstrate a significant impairment of cell survival under conditions of PMCA2 suppression. Hence, increased cytosolic calcium levels as a consequence of insufficient calcium efflux lead to an increased vulnerability of midbrain neurons.

In order to investigate the PMCA2 efflux system during normal brain aging we analyzed the brain tissue from young (3 months) and old (24 months) mice. Results show a significant decrease of PMCA2 in naturally aged animals. Furthermore, we have used an *in vitro* model of replicative senescence (IMR90 fibroblasts), where age dependent decrease in different PMCA isoforms could also be detected. Further studies will be needed to clarify the exact molecular mechanism between PMCA2 decrease, elevation of intracellular Ca^{2+} and neuronal vulnerability.

Our findings point towards a dysregulation of calcium homeostasis in Parkinson's disease related neurodegeneration and suggest a specific molecular mechanism.

6 Literatur

- Airaksinen MS, Thoenen H, Meyer M (1997) Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k-deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice. *Eur J Neurosci* 9:120–127.
- Antalffy G, Caride AJ, Pászty K, Hegedus L, Padanyi R, Strehler EE, Enyedi A (2011) Apical localization of PMCA2w/b is enhanced in terminally polarized MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 410:322–327.
- Barrow SL, Voronina SG, Silva Xavier G, Chvanov MA, Longbottom RE, Gerasimenko OV, Petersen OH, Rutter GA, Tepikin AV (2007) ATP depletion inhibits Ca^{2+} release, influx and extrusion in pancreatic acinar cells but not pathological Ca^{2+} responses induced by bile. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 455:1025–1039.
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325–334.
- Benecke R, Strümper P, Weiss H (1993) Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson's disease but normal in Parkinson-plus syndromes. *Brain* 116:1451–1463.
- Berridge MJ (2005) Unlocking the Secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol* 67:1–21.
- Berridge MJ (2009) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 459:441–449.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517–529.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21.
- Bezard E, Przedborski S (2011) A tale on animal models of Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 26:993–1002.
- Bezprozvanny I (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine* 15:89–100.
- Blin O, Desnuelle C, Rascol O, Borg M, Peyro Saint Paul H, Azulay JP, Billé F, Figarella D, Coulom F, Pellissier JF (1994) Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 125:95–101.
- Bootman M, Niggli E, Berridge M, Lipp P (1997) Imaging the hierarchical Ca^{2+} signalling system in HeLa cells. *J Physiol* 499:307–314.
- Brini M (2008) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase: from a housekeeping function to a versatile signaling role. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 457:657–664.

- Brini M, Coletto L, Pierobon N, Kraev N, Guerini D, Carafoli E (2003) A Comparative Functional Analysis of Plasma Membrane Ca^{2+} Pump Isoforms in Intact Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278:24500–24508.
- Burette A, Rockwood JM, Strehler EE, Weinberg RJ (2003) Isoform - specific distribution of the plasma membrane Ca^{2+} ATPase in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 467:464–476.
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC (2010) α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science* 329:1663 – 1667.
- Campisi J, Dimri GP, Nehlin JO, Testori A, Yoshimoto K (1996) Coming of age in culture. *Experimental Gerontology* 31:7–12.
- Carafoli E, Genazzani A, Guerini D (1999) Calcium Controls the Transcription of Its Own Transporters and Channels in Developing Neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266:624–632.
- Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36:107–260.
- Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M, Evans RM (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383:99–103.
- Chan CS, Gertler TS, Surmeier DJ (2010) A molecular basis for the increased vulnerability of substantia nigra dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. *Movement Disorders* 25:S63–S70.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447:1081–1086.
- Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB (1993) Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262:740–744.
- Chrivia JC, Kwok RPS, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855–859.
- Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH (2011) Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci* 12:359–366.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. *Brain* 122:1437–1448.
- Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M (2007) Different Species of α -Synuclein Oligomers Induce Calcium Influx and Seeding. *The Journal of Neuroscience* 27:9220–9232.

- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39:889–909.
- Dawson TM, Dawson VL (2003) Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Science* 302:819–822.
- Dufty BM, Warner LR, Hou ST, Jiang SX, Gomez-Isla T, Leenhouts KM, Oxford JT, Feany MB, Masliah E, Rohn TT (2007) Calpain-Cleavage of α -Synuclein: Connecting Proteolytic Processing to Disease-Linked Aggregation. *The American Journal of Pathology* 170:1725–1738.
- Enyedi A, Verma AK, Filoteo AG, Penniston JT (1996) Protein Kinase C Activates the Plasma Membrane Ca^{2+} Pump Isoform 4b by Phosphorylation of an Inhibitory Region Downstream of the Calmodulin-binding Domain. *Journal of Biological Chemistry* 271:32461–32467.
- Esteves AR, Arduíno DM, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM (2010) Dysfunctional mitochondria uphold calpain activation: Contribution to Parkinson's disease pathology. *Neurobiology of Disease* 37:723–730.
- Esteves ARF, Domingues AF, Ferreira IL, Januário C, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM (2008) Mitochondrial function in Parkinson's disease cybrids containing an nt2 neuron-like nuclear background. *Mitochondrion* 8:219–228.
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283–2301.
- Fernandes D, Zaidi A, Bean J, Hui D, Michaelis ML (2007) RNAi- induced silencing of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 2 in neuronal cells: effects on Ca^{2+} homeostasis and cell viability. *Journal of Neurochemistry* 102:454–465.
- Foster TC (2007) Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 6:319–325.
- Gomez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Viñals F, Barrachina M, Ambrosio S (2002) MPP^{+} increases α -synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Research* 935:32–39.
- Galione A, Churchill GC (November) Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* 32:343–354.
- Gamerding M, Manthey D, Behl C (2006) Oestrogen receptor subtype - specific repression of calpain expression and calpain enzymatic activity in neuronal cells – implications for neuroprotection against Ca^{2+} - mediated excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 97:57–68.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, DuChen MR, Abramov AY (2009) PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death. *Molecular Cell* 33:627–638.

- Gao C, Chen L, Tao Y, Chen J, Xu X, Zhang G, Chi Z (2004) Colocalization of phosphorylated CREB with calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in hippocampal neurons induced by ohmfentanyl stereoisomers. *Brain Research* 1024:25–33.
- Garcia-Reitböck P, Anichtchik O, Bellucci A, Iovino M, Ballini C, Fineberg E, Ghetti B, Della Corte L, Spano P, Tofaris GK, Goedert M, Spillantini MG (2010) SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Brain* 133:2032–2044.
- Garside ML, Turner PR, Austen B, Strehler EE, Beesley PW, Empson RM (2009) Molecular interactions of the plasma membrane calcium ATPase PMCA2 at pre- and post-synaptic sites in rat cerebellum. *Neuroscience* 162:383–395.
- Gellerich FN, Gizatullina Z, Arandarcikaite O, Jerzembek D, Vielhaber S, Seppet E, Striggow F (2009) Extramitochondrial Ca^{2+} in the Nanomolar Range Regulates Glutamate-Dependent Oxidative Phosphorylation on Demand. *PLoS ONE* 4:e8181.
- German DC, Manaye KF, White III CL, Woodward DJ, McIntire DD, Smith WK, Kalaria RN, Mann DMA (1992) Disease - specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Annals of Neurology* 32:667–676.
- Glendenning P, Ratajczak T, Dick IM, Prince RL (2000) Calcitriol Upregulates Expression and Activity of the 1b Isoform of the Plasma Membrane Calcium Pump in Immortalized Distal Kidney Tubular Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 380:126–132.
- Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59:675–680.
- Grace AA, Bunney BS (1983) Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience* 10:317–331.
- Greten-Harrison B, Polydoro M, Morimoto-Tomita M, Diao L, Williams AM, Nie EH, Makani S, Tian N, Castillo PE, Buchman VL, Chandra SS (2010) $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:19573–19578.
- Griffiths EJ, Rutter GA (2009) Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787:1324–1333.
- Guerini D, García-Martin E, Gerber A, Volbracht C, Leist M, Merino CG, Carafoli E (1999) The Expression of Plasma Membrane Ca^{2+} Pump Isoforms in Cerebellar Granule Neurons Is Modulated by Ca^{2+} . *Journal of Biological Chemistry* 274:1667–1676.
- Guerini D, Wang X, Li L, Genazzani A, Carafoli E (2000) Calcineurin Controls the Expression of Isoform 4CII of the Plasma Membrane Ca^{2+} Pump in Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 275:3706–3712.

- Guzman JN, Sánchez-Padilla J, Chan CS, Surmeier DJ (2009) Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience* 29:11011 – 11019.
- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468:696–700.
- Hajieva P, Kuhlmann C, Luhmann HJ, Behl C (2009a) Impaired calcium homeostasis in aged hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* 451:119–123.
- Hajieva P, Mocko JB, Moosmann B, Behl C (2009b) Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 110:118–132.
- Hansford RG, Castro F (1981) Effects of micromolar concentrations of free calcium ions on the reduction of heart mitochondrial NAD(P) by 2-oxoglutarate. *Biochem J* 198:525–533.
- Harbison R, Ryan K, Wilkins H, Schroeder E, Loucks F, Bouchard R, Linseman D (2011) Calpain Plays a Central Role in 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-Induced Neurotoxicity in Cerebellar Granule Neurons. *Neurotoxicity Research* 19:374–388.
- Hoppe UC (2010) Mitochondrial calcium channels. *FEBS Letters* 584:1975–1981.
- Ilijic E, Guzman JN, Surmeier DJ (2011) The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 43:364–371.
- James PH, Pruschy M, Vorherr TE, Penniston JT, Carafoli E (1989) Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry* 28:4253–4258.
- Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:13807 –13812.
- Kass GEN, Wright JM, Nicotera P, Orrenius S (1988) The mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity: Role of intracellular calcium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 260:789–797.
- Kern A, Roempp B, Prager K, Walter J, Behl C (2006) Down-regulation of Endogenous Amyloid Precursor Protein Processing due to Cellular Aging. *Journal of Biological Chemistry* 281:2405 –2413.
- Khachaturian ZS (1994) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci* 747:1–11.
- Khaliq ZM, Bean BP (2010) Pacemaking in Dopaminergic Ventral Tegmental Area Neurons: Depolarizing Drive from Background and Voltage-Dependent Sodium Conductances. *The Journal of Neuroscience* 30:7401 –7413.

- Kim Y, Park MK, Chung S (2010) Protective effect of urocortin on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced dopaminergic neuronal death. *Molecules and Cells* 30:427–433.
- Kip SN, Strehler EE (2004) Vitamin D3 upregulates plasma membrane Ca^{2+} -ATPase expression and potentiates apico-basal Ca^{2+} flux in MDCK cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 286:F363–F369.
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 318:876–880.
- Kuhn A et al. (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet* 16:1845–1861.
- Kuo TH, Liu BF, Diglio C, Tsang W (1993) Regulation of the Plasma Membrane Calcium Pump Gene Expression by Two Signal Transduction Pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 305:428–433.
- Kurnellas MP, Li H, Jain MR, Giraud SN, Nicot AB, Ratnayake A, Heary RF, Elkabes S (2010) Reduced expression of plasma membrane calcium ATPase 2 and collapsin response mediator protein 1 promotes death of spinal cord neurons. *Cell Death Differ* 17:1501–1510.
- Landfield PW, Pitler TA (1984) Prolonged Ca^{2+} -dependent afterhyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats. *Science* 226:1089–1092.
- Laude AJ, Simpson AWM (2009) Compartmentalized signalling: Ca^{2+} compartments, microdomains and the many facets of Ca^{2+} signalling. *FEBS Journal* 276:1800–1816.
- Lee DH, Han YS, Han ES, Bang H, Lee CS (2006) Differential Involvement of Intracellular Ca^{2+} in 1-Methyl-4-phenylpyridinium- or 6-Hydroxydopamine-Induced Cell Viability Loss in PC12 Cells. *Neurochemical Research* 31:851–860.
- Leist M, Volbracht C, Fava E, Nicotera P (1998) 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Induces Autocrine Excitotoxicity, Protease Activation, and Neuronal Apoptosis. *Molecular Pharmacology* 54:789–801.
- Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E (2008) The plasma membrane Ca^{2+} ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476:65–74.
- Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL, Birnbaumer L (2008) Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2895–2900.
- Linge A, Weinhold K, Bläse R, Kasper M, Barth K (2007) Downregulation of caveolin-1 affects bleomycin-induced growth arrest and cellular senescence in A549 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:1964–1974.

- Marcos D, Sepulveda MR, Berrocal M, Mata AM (2009) Ontogeny of ATP hydrolysis and isoform expression of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in mouse brain. *BMC Neurosci* 10:112.
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599–609.
- McCormack JG, Denton RM (1984) Role of Ca^{2+} ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of Ca^{2+} . *Biochem J* 218:235–247.
- Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ (2008) Modeling PD pathogenesis in mice: Advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism & Related Disorders* 14:S112–S115.
- Michaelis ML, Bigelow DJ, Schöneich C, Williams TD, Ramonda L, Yin D, Hühmer AF, Yao Y, Gao J, Squier TC (1996) Decreased plasma membrane calcium transport activity in aging brain. *Life Sci* 59:405–412.
- Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:2135–2140.
- Mocko JB, Kern A, Moosmann B, Behl C, Hajieva P (2010) Phenothiazines interfere with dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 40:120–129.
- Mohamed TMA, Baudoin-Stanley FM, Abou-Leisa R, Cartwright E, Neyses L, Oceandy D (2010) Measurement of Plasma Membrane Calcium–Calmodulin-Dependent ATPase (PMCA) Activity. In: *Membrane Transporters in Drug Discovery and Development* (Yan Q, ed), pp.333–342. Totowa, NJ: Humana Press. Available at: <http://www.springerlink.com/content/qp54334941q33656/#section=692493&page=2&locus=41> [Accessed December 19, 2011].
- Montminy MR, Bilezikjian LM (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328:175–178.
- Moon Y, Lee KH, Park J-H, Geum D, Kim K (2005) Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. *J Neurochem* 93:1199–1208.
- Moosmann B, Behl C (1999) The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:8867–8872.
- Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D (2009) Interplay Between Cytosolic Dopamine, Calcium and α -Synuclein Causes Selective Death of Substantia Nigra Neurons. *Neuron* 62:218–229.

- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10554–10559.
- Nakai M, Mori A, Watanabe A, Mitsumoto Y (2003) 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) Decreases Mitochondrial Oxidation-Reduction (REDOX) Activity and Membrane Potential ($[\Delta][\psi]_m$) in Rat Striatum. *Experimental Neurology* 179:103–110.
- Nemoto C, Hida T, Arai R (1999) Calretinin and calbindin-D28k in dopaminergic neurons of the rat midbrain: a triple-labeling immunohistochemical study. *Brain Research* 846:129–136.
- Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, Tsien RY (2006) Ca^{2+} indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol* 13:521–530.
- Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY (2004) Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca^{2+} analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17404–17409.
- Parker WD, Parks JK, Swerdlow RH (2008) Complex I Deficiency in Parkinson's Disease Frontal Cortex. *Brain Res* 1189:215–218.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30:e36.
- Polymeropoulos MH et al. (1997) Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276:2045–2047.
- Riederer P, Wuketich S (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transmission* 38:277–301.
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262:744–747.
- Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, Pozzan T (1992) Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 358:325–327.
- Robb-Gaspers LD, Burnett P, Rutter GA, Denton RM, Rizzuto R, Thomas AP (1998) Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *EMBO J* 17:4987–5000.
- Ronkainen JJ, Hänninen SL, Korhonen T, Koivumäki JT, Skoumal R, Rautio S, Ronkainen V-P, Tavi P (2011) Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II represses cardiac transcription of the L-type calcium channel $\alpha_1\text{C}$ -subunit gene (*Cacna1c*) by DREAM translocation. *The Journal of Physiology* 589:2669–2686.
- Rosenzweig ES, Barnes CA (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology* 69:143–179.

- Rottenberg H, Scarpa A (1974) Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. *Biochemistry* 13:4811–4817.
- Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *Journal of Neurochemistry* 116:1–9.
- Schapira AHV (2010) Complex I: Inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Experimental Neurology* 224:331–335.
- Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *The Lancet* 333:1269.
- Selvaraj S, Watt JA, Singh BB (2009) TRPC1 inhibits apoptotic cell degeneration induced by dopaminergic neurotoxin MPTP/MPP⁺. *Cell Calcium* 46:209–218.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT (2003) Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience* 23:10756–10764.
- Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, Andersen SL, Stephens RM, Benes FM, Sonntag KC (2009) Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain* 132:1795–1809.
- Sinnesger-Brauns MJ, Huber IG, Koschak A, Wild C, Obermair GJ, Einzinger U, Hoda J-C, Sartori SB, Striessnig J (2009) Expression and 1,4-Dihydropyridine-Binding Properties of Brain L-Type Calcium Channel Isoforms. *Molecular Pharmacology* 75:407–414.
- Sørensen IF, Purup S, Ehrich M (2009) Modulation of neurotoxicant - induced increases in intracellular calcium by phytoestrogens differ for amyloid beta peptide (A β) and 1 - methyl - 4 - phenyl - pyridine (MPP⁺). *Journal of Applied Toxicology* 29:84–89.
- Souayah N, Sharovetskaya A, Kurnellas MP, Myerson M, Deitch JS, Elkabes S (2008) Reductions in motor unit number estimates (MUNE) precede motor neuron loss in the plasma membrane calcium ATPase 2 (PMCA2)-heterozygous mice. *Experimental Neurology* 214:341–346.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) [alpha]-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839–840.
- Stauffer TP, Guerini D, Carafoli E (1995) Tissue Distribution of the Four Gene Products of the Plasma Membrane Ca Pump. *Journal of Biological Chemistry* 270:12184 – 12190.
- Stauffer TP, Guerini D, Celio MR, Carafoli E (1997) Immunolocalization of the plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in the rat brain. *Brain Research* 748:21–29.
- Strehler EE, Filoteo AG, Penniston JT, Caride AJ (2007) Plasma membrane Ca²⁺-pumps. *Biochem Soc Trans* 35:919–922.

- Surmeier DJ (2007) Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 6:933–938.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J (2010a) Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell Calcium* 47:175–182.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Goldberg JA (2010b) What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? In: *Recent Advances in Parkinson's Disease: Basic Research*, pp.59–77. Elsevier. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612310830043> [Accessed September 5, 2011].
- Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS (2000) Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F0/F1-ATPase. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 278:C423 –C435.
- Thibault O, Gant JC, Landfield PW (2007) Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell* 6:307–317.
- Toescu EC, Verkhratsky A, Landfield PW (2004) Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends in Neurosciences* 27:614–620.
- Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, Hidaka H (1990) KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 265:4315–4320.
- Tonkikh A, Janus C, El-Beheiry H, Pennefather PS, Samoiloa M, McDonald P, Ouanounou A, Carlen PL (2006) Calcium chelation improves spatial learning and synaptic plasticity in aged rats. *Experimental Neurology* 197:291–300.
- Tonkikh AA, Carlen PL (2009) Impaired presynaptic cytosolic and mitochondrial calcium dynamics in aged compared to young adult hippocampal CA1 synapses ameliorated by calcium chelation. *Neuroscience* 159:1300–1308.
- Toullorge D, Guerreiro S, Hild A, Maskos U, Hirsch EC, Michel PP (2011) Neuroprotection of midbrain dopamine neurons by nicotine is gated by cytoplasmic Ca²⁺. *FASEB J* 25:2563–2573.
- Truong K, Sawano A, Mizuno H, Hama H, Tong KI, Mal TK, Miyawaki A, Ikura M (2001) FRET-based in vivo Ca²⁺ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat Struct Mol Biol* 8:1069–1073.
- VanHouten J, Sullivan C, Bazinet C, Ryoo T, Camp R, Rimm DL, Chung G, Wysolmerski J (2010) PMCA2 Regulates Apoptosis During Mammary Gland Involution and Predicts Outcome in Breast Cancer. *PNAS* 107:11405–11410.
- Vosler PS, Brennan CS, Chen J (2008) Calpain-Mediated Signaling Mechanisms in Neuronal Injury and Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 38:78–100.
- Walsh C, Barrow S, Voronina S, Chvanov M, Petersen OH, Tepikin A (2009) Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787:1374–1382.

- Williams JT, North RA, Shefner SA, Nishi S, Egan TM (1984) Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience* 13:137–156.
- Wojda U, Salinska E, Kuznicki J (2008) Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 60:575–590.
- Xu Z, Cawthon D, McCastlain KA, Duhart HM, Newport GD, Fang H, Patterson TA, Slikker Jr. W, Ali SF (2005) Selective Alterations of Transcription Factors in MPP⁺-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. *NeuroToxicology* 26:729–737.
- Yang L, Calingasan NY, Lorenzo BJ, Beal MF (2008) Attenuation of MPTP neurotoxicity by rolipram, a specific inhibitor of phosphodiesterase IV. *Experimental Neurology* 211:311–314.
- Zacharias DA, Dalrymple SJ, Strehler EE (1995) Transcript distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms and splice variants in the human brain. *Molecular Brain Research* 28:263–272.
- Zaidi A, Fernandes D, Bean JL, Michaelis ML (2009) Effects of Paraquat-induced Oxidative Stress on the Neuronal Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase. *Free Radic Biol Med* 47:1507–1514.
- Zhang X, Odom DT, Koo S-H, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M (2005) Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4459–4464.

7 Anhang

7.1 Publikationen

Brendel A, Felzen V, Morawe T, Manthey D & Behl C (2012) Differential regulation of apoptosis-associated genes by estrogen receptor alpha in human neuroblastoma cells. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2012 Dec 27. [Epub ahead of print]

Brendel A, Behl C & Hajieva P (2013) Downregulation of PMCA2 increases the vulnerability of midbrain neurons to mitochondrial complex I inhibitor (Manuskript in Vorbereitung)

7.2 Kongresse

Brendel A, Behl C & Hajieva (2011), *Downregulation of PMCA2 increases the vulnerability of dopaminergic neurons to mitochondrial complex I inhibition*, Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2011

Brendel A, Behl C & Hajieva P (2010), *PMCA2 downregulation and impaired calcium efflux in in vitro models of Parkinson's disease* Warschau, 11th Symposium of the European Calcium Society, *Acta Biochimica Polonica*, Vol 57, Suppl 2, p 62

Brendel A, Behl C & Hajieva P (2010), *Decline of cellular calcium efflux in in vitro Models of Parkinson's disease*, 61. Mosbacher Kolloquium (Biology of Aging)

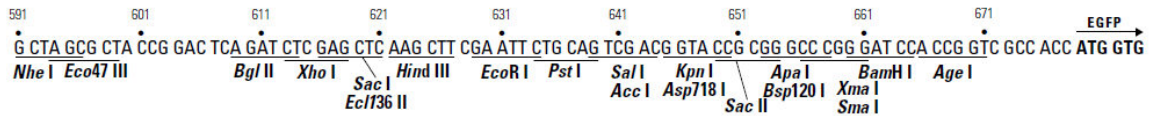
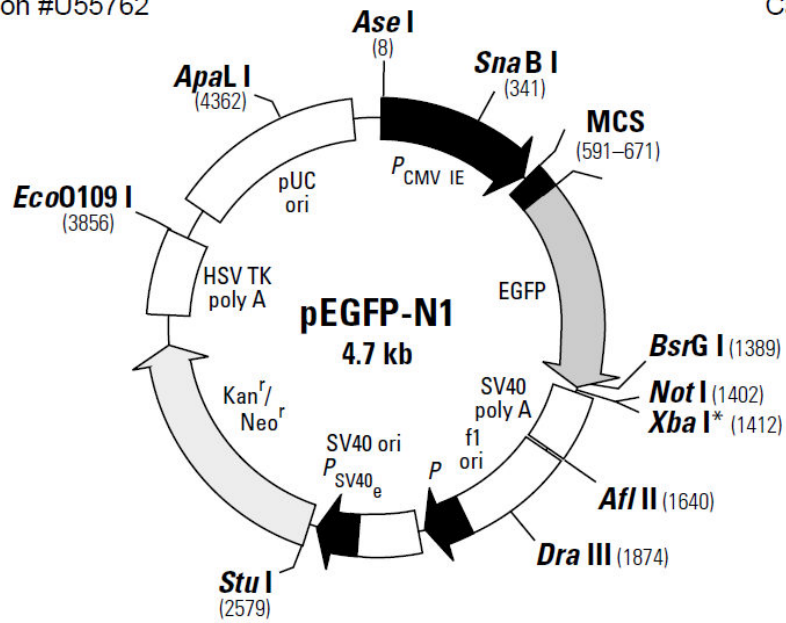
7.3 Vektorkarte

pEGFP-N1 Vector Information

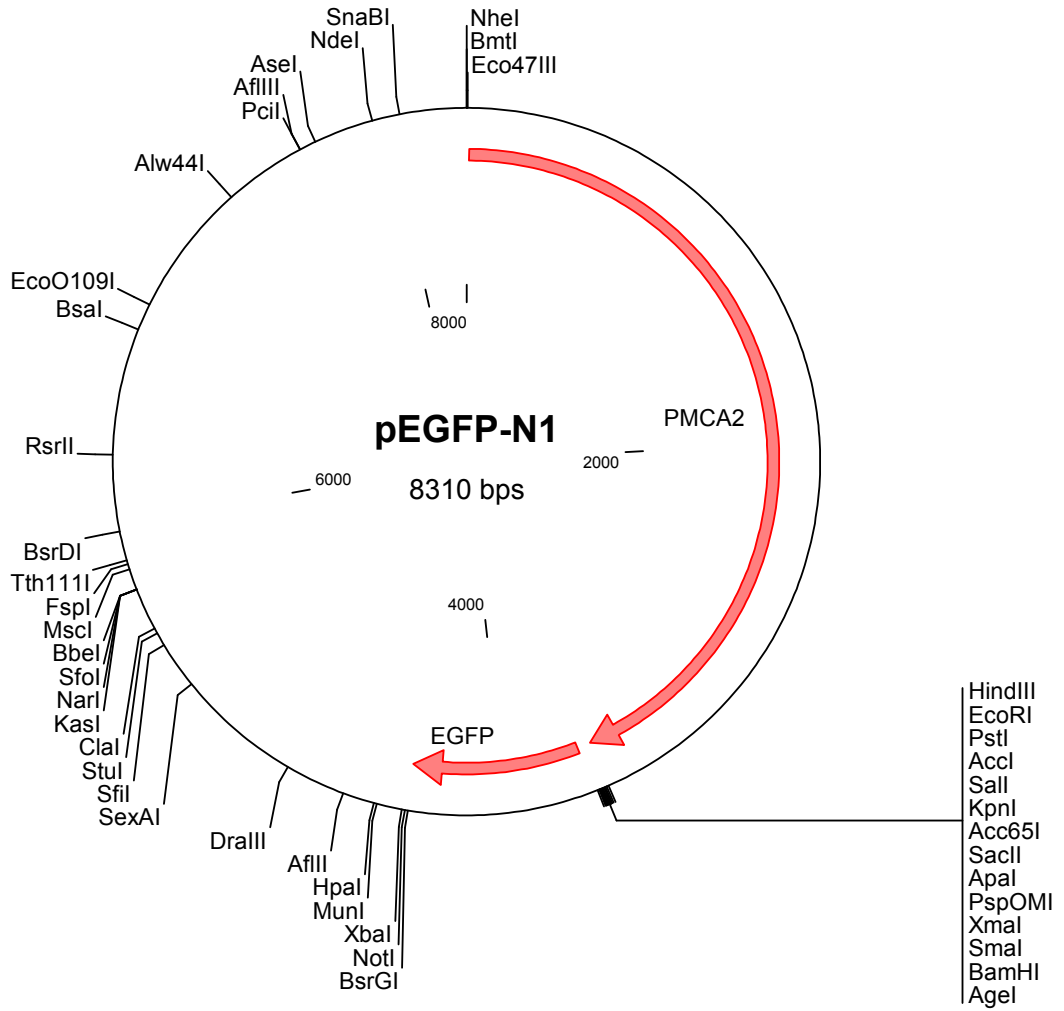
GenBank Accession #U55762

PT3027-

Catalog #6085-



Vektorkarte von pEGFP-N1-PMCA2



PMCA2-Sequenz

1 gctagegcta tatgggtgac atgaccaaca gcgacttta ctcaaaaac caaagaaatg agtcgagcca
 tgggggcgag ttcgggtgca caatggagga gctccgctcc ctcatggagc tgcggggcac
 131 tgaggctgtg gtcaagatca aggagactta tggggacacc gaagccatct gccggcgctt caaacctca
 cctgttgaag gttgcccggg caccgctcca gacctggaaa agagaaagca aattttggg
 261 caaaacttta tacctcaaaa gaaagcaaaa ccttcctgc agctcgtgtg ggaggcgtg caggacgtga
 ccctcatcat cctggagatt gccgcatca tctcctggg gctgtcctt taccaccgc
 391 ccggcgaggg caacgaagga tgtgcgacgg cccagggtgg ggcagaggat gaaggagagg cagaggcagg
 ttggatcgag ggggccgcca ttctctctc agttatctgt gtggtcctgg tcacggcctt
 521 caatgactgg agcaaagaga aacagtccg gggcctgcag agccgcatcg agcaggaaca gaaatttacc
 gtggtccggg ctggccaggt ggtgcagatc cctgtggctg agatcgtggt tggggacata
 651 gccaggtca aatattgtga cctctcct gccgacggcc tctcatcca gggcaatgac ctcaagattg
 atgaaagctc ctaactgga gactctgacc aggtgcgcaa gtccgtggac aaggaccca
 781 tgctgctgc aggaaccac gtgatggagg gctcaggacg gatgtgggtg actgctgtgg gtgtgaactc
 tcagactggc atcatcttta cctcctggg ggctgggtgt gaagaggaag agaagaaaga
 911 caaaaagcc aacagcagg acggggcagc cgccatggag atgcagcccc tcaagagtgc cgaggcgggc
 gacgtgacg acaggaagaa ggccagcatg cacaagaagg agaagtccgt gctgcagggc
 1041 aagctacca agctggctgt gcagatcggg aaggcgggct tggatgctc agccatcacg gtgatcatcc
 tgggtctcta ctactgtg gacacctcg tggtaacaa gaagccgtgg ctgcctgagt
 1171 gcacgcccgt ctactgcag tactttgca agttctcat cattggcgtg acggtgctgg tggcgcctg
 gcccgagggg ctccctctgg ccgtcaccat ctctgtggcc tatteggtga agaaatgat
 1301 gaaggacaac aatctggtac gccacctgga tgctgtgag accatgggca atgccacagc catctgctca
 gacaagacag gcacgtgac caccaatcgc atgacagtgg tacaggccta tctcgtgac
 1431 gtccactata aagatctcc cgacccagc tccatcaaca ccaagacat ggagctgctg atcaatgcca
 tcgcatcaa cagcgcctac accaccaaga ttctgcccc agagaaggag ggcgcctgc
 1561 ctggcgaggt gggcaacaag acggagtgcg gcctgctggg ctctgctg gacctgaagc aggactacga
 gccctgctgc agccagatgc cagaggagaa gttgtacaaa gtgtacacct tcaactcctg
 1691 gcgcaagtcc atgagcactg tcatcaagct gccgacgag agcttccgca tgtacagca gggggtctt
 gagatcgtgc tcaagaagtg ctgcaaaate ctcaatgggg cgggagagcc tctgtcttc
 1821 cggccccgcg accgggacga gatggtaaag aaggtgattg agccatggc ttgcgagtgg ctccgacta
 tctgctgctc ctaccgagc tccccagca gcccgagcc ggactgggac aatgagaatg
 1951 acatctcaa cgaactcacc tgcactcgc tgggtggcat cgaggaccg gtgcggccag aggtcccaga
 agccatccgc aagtccagc gggcaggcat cacggtccgc atggtcactg gcgacaatat
 2081 caacacggct cgggcatcg ccatcaagt tggcatcct catcctgggg aggacttct gtgcctcag
 ggcaaggagt tcaacaggag gatccgcaac gagaaggggg agattgagca ggagcgaatt
 2211 gacaagatct ggccaaagct gcgggtgctg gctcgtcct cccaacgga caagcattc ctggttaaag
 gcatcctga cagcacacac actgagcagc ggcaggtggt ggccgtgac ggggacggga
 2341 ccaacgacgg gctgcactc aagaagggc acgtgggctt cgccatgggc atcgcaggca ctgacgtggc
 caaggaggcc tcagacatca tctgacaga cgacaattc agcagcatcg tcaaggcagt
 2471 gatgtggggc cgcaactct atgacagcat ctcaaattc ttgcagtcc agtcaccct caactggtg
 gccgtgattg tggcctcag aggcgctgc atcagcagg actccctct gaaggccgtg
 2601 cagatgctct gggatgaact catcatggac acgtttgct cgtggcact ggccactgag ccgcccagc
 agaccctgt gctgaggaag ccgtacggc gcaacaagc gctcatctc aggaccatga
 2731 tgaagaacat cctgggcat gctgtctacc agcttgcct catctcacc ctgctcttg ttggcgagaa
 gatgtccag atcagacagc ggaggaacgc gccctgcat tcgccacct cagaacatta
 2861 caccatcctc tcaaacctc tctcatgat gcagctctc aacagatca acgcccgca gatccacggc
 gacgcaatg tctttgacgg catctccgg aacctatct tctgacatc cgtgctgggc
 2991 accttgcca tccagatagt gatcgtgacg tttggagga agccattcag ctgctctcca ctgcagctgg
 accagtggat gtggtgcata ttcattgggt taggagagct cgttggggc caggtcatcg

3121 ccaccatccc gaccagcaga ctcaagtcc tcaaggaggc aggcaggctc acacagaagg aggagatccc
 ggaggaggag ctcaacgagg acgtggagga gatcgaccac gcggagcggg agctgcccgg
 3251 gggccagatc ctgtggtcc gaggcctgaa tcggatccag acacagatcc gcgtcgtgaa ggcgttccgt
 agctctctct atgaaggttt agaaaagcct gaatctgaa cctccatca taacttcatg
 3381 gctcatctcg aattceggat cgaagattcc cagccccaca tccccctcat tgatgacacc gacctggaag
 aagatgccgc gctcaagcag aactcgagcc cgccgtcacc cctcaacaag aacaacagca
 3511 gcatcgacag tgggatcaac ctgacgaccg acacaagcaa atcagctacc tcttcaagcc caggagaccc
 catccacagc ctggagacgt cgcttgtaaa gcttcgaatt ctgcagtcga cggtagccgc
 3641 ggccccggat ccaccggctc ccaccatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccgggggt ggtgcccato
 ctggctgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagtca gcgtgtccgg cgagggcgag
 3771 ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgcctggc
 ccaccctcgt gaccaccctg acctacggcg tgcagtctt cagccgctac cccgaccaca
 3901 tgaagcagca cgacttctc aagtccgcca tgcgccgaagg ctacgtccag gagcgacca tcttctcaa
 ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccttggtgaa
 4031 ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac
 tacaacagcc acaacttca tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caaggtgaa
 4161 ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccacca ctaccagcag aacacccca
 tcggcgacgg cccctgtctg ctgccgaca accactacct gagcaccag tccgccctga
 4291 gcaagaccc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct ggagtctgt accgccgccg ggatcactct
 cggcatggac gagctgtaca agtaaagcgg ccgcgactct agatcataat cagccatacc
 4421 acattttag aggtttact tcttataaa aactcccac acctcccct gaacctgaaa cataaatga
 atgcaattgt tgtgttaac ttgtttatg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata
 4551 gcatcacaaa ttcacaaat aaagcatttt tttactgca ttctagtgt ggtttgcca aactcatca tgatctta
 ggcgtaaatt gtaagcgtta atatttgtt aaaattcgcg ttaaattttt
 4681 gttaatcag ctcatTTTTT aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatca aagaatagac
 cgagataggg ttgagtgtg ttccagtgtg gaacaagagt ccactattaa agaactgga
 4811 ctccaacgtc aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccac accctaata
 agtttttgg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaactcga accctaaagg gagccccga
 4941 tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaag ggagcggggc
 ctaggcgct ggcaagtga gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacacc gccgcgctta
 5071 atgcgccgt acagggcgcg tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttat
 tttctaaata cattcaata tttatccgt catgagaca taacctgat aaatgctca
 5201 ataatttga aaaaggaaga gtcctgaggc gaaagaacc agctgtggaa tgtgtgctag ttagggtgtg
 gaaagtccc aggtccca gcaggcagaa gtatgaaag catgcatctc aattagtcag
 5331 caaccagtg tggaaagtcc ccaggtccc cagcaggcag aagtatgaa agcatgcatc tcaattagtc
 agcaaccata gtcccggccc taactccgc catcccggc ctaactccgc ccagttccgc
 5461 ccattctccg cccatggct gactaatttt tttattat gcagaggccg aggccgcctc ggcctctgag
 ctattccaga agtagtgagg aggtttttt ggaggcctag gctttgcaa agatcgatca
 5591 agagacagga tgaggatcgt ttcgatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttg
 gtggagagge tttccgcta tgcctggca caacagaca tcggctgctc tgatgccgc
 5721 gtgtccggc tgcagcgca ggggcggccg gttcttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg
 aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacggcggt ccttgcgcag
 5851 ctgtgctcga cgtgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattggc gaagtgccgg ggcaggatct
 cctgtcatct cacttgcctc ctgccgagaa agtatccac atggctgatg caatgcggcg
 5981 gctgcatac cttgatccg ctacctgcc atcgaccac caagcgaac atcgatcga gcgagcacgt
 actcggatg aagccggtct ttcgatcag gatgatctg acgaagagca tcaggggctc
 6111 gcgccagccg aactgtcgc caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcga ggatctcgtc tgacctatg
 gcgatgctg cttgccgaat atcatggtg aaaatggccg cttttctgga ttcacgact
 6241 gtggccggct ggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct
 tggcggcgaa tgggctgacc gttctcctg gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca

6371 gcgcacgccc ttctatcgcc ttcttgacga gttctctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc
 aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt
 6501 tgggcttcgg aatcgtttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgcaggagt
 ctccgccac cctaggggga ggctaactga aacacggaag gagacaatac cggaaggaac
 6631 ccgcgctatg acggcaataa aaagacagaa taaaacgcac ggtgttgggt cgtttgtta taaacgcggg
 gttcggctcc agggctggca ctctgtcgat accccaccga gacccattg gggccaatac
 6761 gcccgcgttt ctctcttcc cccacccac cccccaagtt cgggtgaagg ccaggggctc gcagccaacg
 tcggggcgcc aggcctgcc atagcctcag gttactcata tatacttag attgattaa
 6891 aacttcatt ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagtt
 tcgtccact gagcgtcaga cccgtagaa aagatcaaag gatctctg
 7021 agatccttt ttctgcgcg taactgctg ctgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttg
 ttccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggctcag cagagcgcag
 7151 ataccataa ctgctctct agttagccg tagttagcc accactcaa gaactctga gcaccgcta
 catactcgc tctgtaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgc
 7281 ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctc ggctgaacgg ggggttcgtg
 cacacagccc agcttggagc gaacgacct caccgaactg agatactac agcgtgagct
 7411 atgagaaagc gccacgctc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaac
 ggagagcga cgaggagct tccaggggga aacgcctgg atctttatag tctgtcggg
 7541 ttccgccacc tctgactga gcgtcgatt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg
 ccagcaacgc ggcctttta cgttctctg cctttgctg gcctttgct cacatgtct
 7671 ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgccatgcat tagttataa tagtaatca ttacggggtc
 attagtcat agccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa
 7801 atggcccgcc tggctgacc cccaacgacc cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttccatagt
 aacgccaata gggacttcc attgacgca atgggtggag tatttacggt aaactgcca
 7931 cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc
 gcctggcatt atgccagta catgacctt tgggacttcc ctacttgca gtacatctac
 8061 gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggtttggc agtacctaa tgggcgtgga tagcggttg
 actcaggggg attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagttg tttggcacc
 8191 aaaatcaacg ggactttcca aaatgctga acaactccc cccattgacg caaatgggag gtaggcgtg
 acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc

7.4 Abkürzungen

AD	Alzheimer's disease
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	Ca ²⁺ -bindendes Protein
CFP	cyan fluorescent protein
CICR	Calcium induced calcium release
CO ₂	Kohlendioxid
CRE	cAMP-response element
CREB	cAMP-response element binding protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Peptids
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GFP	green fluorescent protein
HCl	Salzsäure
IP ₃	Inositoltriphosphat
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
LB-Medium	Lauria-Bertani-Medium
MAP2	Mikrotubulin assoziiertes Protein2
MPP ⁺	Methyl-Phenyl-Dihydropyridin
Na ⁺	Natrium
NAD	Nikotinamiddinukeotid
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Exchanger
nm	nanometer
nM	nanomolar
N-Terminus	Aminoende eines Peptids
PCR	polymerase chain reaction

PKA	Proteinkinase A
PD	Parkinson's disease
PKC	Proteinkinase C
PMCA	Plasmamembrane Ca^{2+} -ATPase
ROC	Receptor operated calcium channel
ROS	radikale Sauerstoffspezies
Rpm	rounds per minute
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamidgelelektrophorese
SERCA	Sarcoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase
siRNA	short interfering RNA
SPCA	Secretory pathway Ca^{2+} -ATPase
SOC	Store operated calcium channel
SOCE	Store operated calcium entry
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembransegmente
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC	Transient receptor potential calcium channel
U	Units
V	Volt
VGGC	Voltage gated calcium channel
VOC	Voltage operated calcium channel
YFP	yellow fluorescent protein
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.5 Curriculum Vitae

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den 18. Januar 2013

Alexander Brendel