

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Effekt von Punktmutationen in redoxsensitiven Aminosäuren auf die Funktion
des Kalziumsensorproteins Stromal interaction molecule 1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
vorgelegt von

Felix Sebastian Wunder
aus Marburg

Mainz, 2020

Tag der Promotion: 10.12.2020

Meiner Familie

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	2
2. Literaturdiskussion	4
2.1. Kalziumfunktion in eukaryotischen Zellen	4
2.2. Kalziumströme über Zellmembran und ER	5
2.3. CRAC-Kanal mit porenbildender Untereinheit ORAI1	7
2.4. Ist STIM1 ein Tumorsuppressorgen oder ein ER-ständiger Kalziumsensor?	9
2.5. STIM1-Aktivierung durch homotypische Proteininteraktion	11
2.6. Steuerung des SOCE durch STIM1	13
2.7. Einfluss von STIM2 auf den SOCE	15
2.8. Posttranslationale Modifikation von STIM1 in redoxsensitiven Aminosäuren	17
3. Material	19
3.1. Zelllinien	19
3.1.1. MEF- Zellen	19
3.2. Medien und Zusätze	20
3.3. Puffer und Chemikalien	20
3.4. Bakterien	21
3.5. Primer	21
3.6. Plasmide	22
3.7. Antikörper, Enzyme, Farbstoffe, Marker	23
3.8. Kits	25
3.9. Verbrauchsmaterial	26
3.10. Geräte	27
3.11. Programme	29
4. Methoden	30
4.1. Molekularbiologie	30
4.1.1. Klonierung	30
4.1.2. Zuschneiden von Plasmid-DNA: Probeverdau und <i>Fast-digest</i> -Probeverdau	30
4.1.3. Agarosegelherstellung, Agarosegel-Elektrophorese und DNA-Detektion	31
4.1.4. Gelaufreinigung	32
4.1.5. Ligation	32
4.1.6. Kompetente Bakterien herstellen	33
4.1.7. Hitzeschocktransformation	33

4.1.8.	Bakterienvermehrung durch Über-Nacht-Bakterienkulturen, und anschließende Isolierung der Plasmid-DNA	33
4.1.9.	DNA-Vervielfältigung	34
4.1.10.	Sanger-Sequenzierung.....	34
4.1.11.	Zielgerichtete Punktmutation	35
4.1.12.	Gewinnung von genomischer DNA	36
4.2.	<i>Zellbiologie</i>	37
4.2.1.	Splitting, Passagieren, Zellzahlbestimmung.....	37
4.2.2.	Kryokonservierung.....	37
4.2.3.	Inkulturnahme, Auftauungsprozess.....	38
4.2.4.	Zellfixierung durch Paraformaldehyd.....	38
4.2.5.	Zellzahlbestimmung automatisch	38
4.2.6.	Zellzahlbestimmung manuell	39
4.2.7.	Transiente und stabile Transfektion	39
4.2.8.	FACS-Zellensortierung (FACS-Sorting)	40
4.3.	<i>Mikroskopie</i>	41
4.3.1.	Interne Totalfluoreszenzmikroskopie.....	41
4.3.2.	Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie.....	41
4.4.	<i>Proteinbiochemie</i>	42
4.4.1.	Proteinisolation	42
4.4.2.	Proteinquantifizierung via BCA-Assay.....	42
4.4.3.	Proteinselektion via SDS-Page	43
4.4.4.	Proteindetektion via Western-Blot und Immunodetektion	44
4.5.	<i>SOCE Induktion und Fluoreszenzdetektion</i>	45
5.	Ergebnisse	47
5.1.	<i>Herstellung von STIM1 Plasmiden</i>	47
5.1.1.	Herstellung eines Doppelmутanten durch zielgerichtete Punktmutation	47
5.1.2.	Sanger-Sequenzierung des pENTR5b-C49M-C56M-mcherry Plasmids	48
5.1.3.	Klonierung des pENTR-Insert in DEST-Vektor.....	49
5.2.	<i>Herstellung stabil transfizierter MEF STIM1 -/- Zellreihen</i>	52
5.2.1.	Kontrolle der stabil transfizierten MEF STIM1 -/- Zellreihen	52
5.3.	<i>STIM1 bildet Punctae direkt unterhalb der Zellmembran</i>	55
5.4.	<i>STIM1-Punktmutationen an redoxsensitiven Aminosäuren führen zu eingeschränkter STIM1 Punctaebildung</i>	57
5.5.	<i>STIM1-Punktmutationen führen zu verringertem SOCE</i>	60
5.6.	<i>Herstellung stabil transfizierter MEF STIM2 -/- Zellreihen</i>	65
5.6.1.	Kontrolle der stabil transfizierten MEF STIM2 -/- Zellreihen	65
5.7.	<i>STIM1-Punctaebildung ist auch bei STIM2 Knockout in Mutanten eingeschränkt.</i>	66

5.8.	<i>STIM2 Knockout beeinflusst den SOCE nicht maßgeblich</i>	71
5.9.	<i>STIM2 -/- führt zu intrazellulär basal erhöhtem Kalziumniveau</i>	75
6.	Diskussion	78
6.1.	<i>STIM1 Punctae liegen unmittelbar unter der Zellmembran</i>	78
6.2.	<i>STIM1-Punktmutation vermindert Punctaebildung</i>	79
6.3.	<i>Punktmutationen führen zu verringertem SOCE</i>	80
6.4.	<i>Intra- oder Intermolekulare STIM1 Modulierung</i>	81
6.5.	<i>STIM2 Knockout hat Einfluss auf STIM1 Punctaebildung</i>	83
7.	Zusammenfassung	84
8.	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: KALZIUMKONZENTRATIONSUNTERSCHIEDE ENTLANG EUKARYONTISCHER ZELLMEMBRANEN.....	4
ABBILDUNG 2: KALZIUMSTRÖME ENTLANG VON EUKARYOTISCHEN ZELLMEMBRANEN.....	7
ABBILDUNG 3: PROTEINSTRUKTUR DER CRAC-KANAL UNTEREINHEIT ORAI1..	9
ABBILDUNG 4: PROTEINSTRUKTUR VON STIM1 UND STIM2.....	10
ABBILDUNG 5: MODELL DER STIM1 AKTIVIERUNG UND ANSCHLIEßENDER STIM1 PUNCTAEBILDUNG SOWIE ORAI1-KOLOKALISATION.....	12
ABBILDUNG 6: ER-KALZIUMDEPLETION FÜHRT ZU STIM1-PUNCTAE-BILDUNG AN DER PLASMAMEMBRAN.....	13
ABBILDUNG 7: MODELL EINES STIM2/STIM1/ORAI1 KOMPLEXES..	16
ABBILDUNG 8 PLASMIDKARTE EINES PPB CAG HA DEST PLASMIDS.....	22
ABBILDUNG 9: CHAMELEON DUO STANDARD VERWENDET FÜR WESTERN-BLOTS	25
ABBILDUNG 10 VERWENDETER 1KB PLUS DNA LADDER FÜR AGAROSEGELE	25
ABBILDUNG 11: PCR DER NEU EINGEFÜGTEN PUNKTMUTATION.	47
ABBILDUNG 12: PROBEVERDAU DES DOPPELMUTATIONSPLASMIDS.....	48
ABBILDUNG 13: ÜBERFÜHRUNG DER PENTR-PLASMIDE IN DEN DEST-VEKTOR (A).....	49
ABBILDUNG 14: ÜBERFÜHRUNG DES PENTR-INSERTS IN DEST-VEKTOR (B).....	50
ABBILDUNG 15: PROBEVERDAU DES EV IM DEST-VEKTOR (A).....	50
ABBILDUNG 16: PROBEVERDAU DES STIM1 WT / C49M / C56M IM DEST-VEKTOR (B).....	51
ABBILDUNG 17: PROBEVERDAU DES C49MC56M IM DEST-VEKTOR (C).	51
ABBILDUNG 18: AGAROSEGEL MIT GDNA DER STABIL TRANSFIZIERTEN ZELLREIHEN	52
ABBILDUNG 19: SANGER SEQUENZIERUNG DER PCR AMPLIFIZIERTEN GDNA.	53
ABBILDUNG 20 WESTERN-BLOT DER STABIL TRANFIZIERTEN MEF STIM1 -/- ZELLREIHEN. .	54
ABBILDUNG 21 STIM1 PUNCTAEBILDUNG WIRD DURCH TG UND H ₂ O ₂ INDUZIERT.....	56
ABBILDUNG 22: PUNCTAEBILDUNG IST IN STIM1 MUTANTEN REDUZIERT	59
ABBILDUNG 23: STIM1 C49M PUNKTMUTATION FÜHRT ZU SIGNIFIKANT VERRINGERTEM SOCE.....	61
ABBILDUNG 24 IN MEF STIM1 -/- ZELLREIHEN FÜHREN BEI TG UND H ₂ O ₂ INKUBATION ZU NICHT SIGNIFIKANT UNTERSCHIEDLICHEM SOCE.	63
ABBILDUNG 25: WESTERN-BLOT DER STABIL TRANFIZIERTEN MEF STIM2 -/- ZELLREIHEN. .	65
ABBILDUNG 26: PUNKTAEBILDUNG IST IN MUTANTEN BEI STIM2 -/- VERRINGERT.	67
ABBILDUNG 27 H ₂ O ₂ IST NUR FÜR STIM1 WT EIN POTENTER AKTIVATOR.	69
ABBILDUNG 28 STIM1 C49M PUNKTMUTATION FÜHRT AUCH BEI STIM2 -/- ZELLEN ZU SIGNIFIKANT VERRINGERTEM SOCE	71
ABBILDUNG 29 IN MEF STIM2 -/- ZELLREIHEN FÜHREN TG UND H ₂ O ₂ INKUBATION ZU NICHT SIGNIFIKANT UNTERSCHIEDLICHEM SOCE. ****.	73
ABBILDUNG 30 STIM2 -/- FÜHRT ZU BASAL ERHÖHTER KALZIUMKONZENTRATION UND HAT KEINEN EINFLUSS AUF DEN SOCE.	

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: MEDIEN UND ZUSÄTZE	20
TABELLE 2: PUFFER UND CHEMIKALIEN	20
TABELLE 4: PRIMER.....	22
TABELLE 5: PLASMIDE	23
TABELLE 6: ANTIKÖRPER, ENZYME, FARBSTOFFE, MARKER.....	23
TABELLE 7: KITS.....	25
TABELLE 8: VERBRAUCHSMATERIAL	26
TABELLE 9: GERÄTE	27
TABELLE 10: PROGRAMME.....	29
TABELLE 11 ANSATZ FÜR LR-REAKTION.....	30
TABELLE 12 TAE PUFFER	32
TABELLE 13 20µL LIGATIONSANSATZ.....	32
TABELLE 14 PCR-ANSATZ ZUR VERVIELFÄLTIGUNG DES PENTR5B STIM1 C49M C56M MCHERRY PLASMIDS	35
TABELLE 15 PCR-PROTOKOLL DER PENTR5B STIM1 C49M C56M MCHERRY VERVIELFÄLTIGUNG	35
TABELLE 16 LIGATIONSANSATZ DES PCR-PRODUKTS.....	36
TABELLE 17 50µL PCR-ANSATZ AUS GDNA DER STABIL TRANSFIZIERTEN MEF-ZELLINIEN	36
TABELLE 18 PCR PROTOKOLL DER GDNA AMPLIFIKATION	37
TABELLE 19 STABILE TRANSFEKTION MIT ATTRACTENE	40
TABELLE 21 PRIMÄRANTIKÖRPER	44
TABELLE 22 SEKUNDÄRANTIKÖRPER	45
TABELLE 23 PBS-T PUFFER.....	45

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
AOAA	Aminooxyacetatsäure
BCA-Test	Bicinchoninsäure-Test
BL	<i>Baseline</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bspw	Beispielsweise
Bzw.	Beziehungsweise
C49M	Punktmutation im STIM1-Protein, Austausch der Aminosäure Cystein für Methionin an Stelle 49
C56M	Punktmutation im STIM1-Protein, Austausch der Aminosäure Cystein für Methionin an Stelle 56
C49MC56M	Punktmutationen im STIM1-Protein, Austausch der Aminosäure Cystein für Methionin an Stelle 49 und 56. Im Verlauf auch DM genannt.
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CaV	spannungsabhängige Kalziumkanäle
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRAC	Ca ²⁺ -release-activated-Ca ²⁺ -current
CTB	<i>Celltiterblue</i>
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
D-Stim	Drosophila-Stim
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMF	Dimethylfumarat
DM	Doppelmutant (für STIM1 C49M C56M mcherry verwendet)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EF	EF-Hand
ER	endoplasmatisches Retikulum
EV	Leervektor, <i>emptyvektor</i> , für mcherry-Plasmid verwendet, das keine STIM1-Sequenz besaß
FCS	fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FD	<i>fast digest</i>
g	Zentrifugalbeschleunigung

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GOK	<i>god only knows</i>
IMB	Institut für molekulare Biologie
IP ₃	Inositoltriphosphat
kDA	Kilodalton
M	Molar
MEF	embryonale Mausfibroblasten
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	Nano-
N ⁺	Natrium-Ion
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NCKX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -K ⁺ -Austauscher
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
O ₂	Sauerstoff
ORAI1	<i>calcium release activated calcium-channel protein 1</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran-ATPase
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RyR	Ryanodinrezeptor
s/sek.	Sekunde
SAM	<i>sterile alpha motive</i>
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERCA	Sarko-Endoplasmatische Retikulum ATPase
SOC	<i>Store operated calcium</i>
SOCE	<i>store-operated Ca²⁺ entry</i>
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
Tween	Polyoxyethylenesorbitan
TIRF	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
α-	Anti- (bei Antikörpern)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1. Einleitung

Kalzium (Ca^{2+}) ist in eine Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden involviert. Beispielsweise hat ein postsynaptischer Kalziueinstrom Auswirkungen auf die neuronale Proteinbiosynthese und führt dazu, dass neue synaptische Verschaltungen entstehen, die das Langzeitgedächtnis beeinflussen (Weislogel et al. 2013). Gleichzeitig kann eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration den programmierten Zelltod einleiten (Hajnoczky, Davies, and Madesh 2003). Diese beiden Beispiele verdeutlichen, dass die Kalziumhomöostase auf zellulärer Ebene streng kontrolliert werden muss.

Die eukaryotische Zellmembran (Plasmamembran) ist lipophil und semipermeabel. Für geladene Ionen wie Ca^{2+} ist die Zellmembran undurchlässig. Ein kontrollierter Transmembran-Kalziumtransport wird durch Kanäle ermöglicht, die bei Öffnung für Kalzium durchlässig sind. *Calcium release-activated Calcium* (CRAC) Kanäle bilden eine Gruppe dieser membranständigen Kalziumkanäle. Die Kanalpore wird durch die funktionelle Untereinheit ORAI1 *calcium release activated calcium-channel protein 1* gebildet (Prakriya et al. 2006).

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist in jeder eukaryotischen Zelle, außer bei reifen Erythrozyten, vorhanden. Es durchzieht und verbindet als reich verzweigtes Netzwerk den Großteil des intrazellulären Raumes (Porter, Claude, and Fullam 1945). Zu den Aufgaben des ER zählen Faltung von Proteinen, Translation, posttranslationale Modifikation von Proteinen, Proteintransport von membranständigen und sekretorischen Proteinen, sowie Membranbildung bei der Mitose. Das ER-Lumen dient zusätzlich als intrazelluläres Kalziumdepot (Henkart, Reese, and Brinley 1978).

In dieser Arbeit wurde das ER-membranständige Protein *Stromal interaction molecule 1* (STIM1) untersucht. Es ist ein Sensorprotein für den ER-Kalziumvorrat und wandert bei Vorratsdepletion zu ER-Plasmamembran Schnittstellen. Dort bindet und öffnet STIM1 CRAC-Kanäle in der Zellmembran und es folgt ein Kalziueinstrom in die Zelle. (Luik et al. 2008)

STIM1 besitzt im ER-Lumen ein Helix-Loop-Helix-Motiv (EF-Hand *motif*) mit geladenen Aminosäuren, die in der Lage sind, konzentrationsabhängig Kalziumionen

zu binden. Sinkt die ER-Kalziumkonzentration, trennt sich das gebundene Kalziumion von der *EF-Hand*, die durch anschließende Konformationsänderung STIM1 oligomerisiert. STIM1 öffnet anschließend den CRAC-Kanal an der Zellmembran und es folgt ein Kalziumeinstrom nach intrazellulär. STIM1 besitzt in der Nähe der kanonischen *EF-Hand* zwei hochkonservierte Cysteine an Stelle 49 und 56.

Diese hochkonservierten Cysteine scheinen für die Konformationsänderung des STIM1 eine essentielle Rolle einzunehmen und dadurch einen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu haben (Hawkins et al. 2010; Prins et al. 2011). Hawkins et al. beschrieb, dass es durch C56A-Mutation, sowie der C49/C56A-Doppelmutation zu einer konstitutiven Aktivierung des STIM1 Proteins gekommen ist (Hawkins et al. 2010). Prins et al. hingegen postulierte ein Jahr später konträr, dass durch C49/C56A Mutation eine erniedrigter STIM1 Aktivierung resultierte (Prins et al. 2011). Ziel dieser Arbeit war es, die Diskrepanz zwischen Prins et. al sowie Hawkins et. al aufzulösen.

In dieser Arbeit wurden STIM1 Mutanten hergestellt, deren Cystein an Stelle 49 und 56 durch Methionin ersetzt wurde (C49M und C56M). Diese Mutanten wurden anschließend in Zellen transfiziert, die einen STIM1 *-/-* (*knockout*) oder STIM2 *-/-* besitzen. Durch ein *mcherry-Tag* sollten Unterschiede in der Proteinbewegung bei Store-Depletion und Oligomerisierung erforscht werden. Weiterhin sollte mithilfe eines fluoreszierenden Kalziumkomplexbildners die intrazelluläre Kalziumkonzentration erforscht werden.

2. Literaturdiskussion

2.1. Kalziumfunktion in eukaryotischen Zellen

Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) sind Kationen mit doppelt positiver Ladung. Bestimmte Proteine sind in der Lage, Ca^{2+} zu binden. Ebenso wie Kalzium ist Phosphat ein oft erwähnter Modulator von Proteinfunktionen (Westheimer 1987). Beiden Stoffen ist gemeinsam, dass durch lokale Ladungsverschiebung an den bindenden Proteinstrukturen die Proteinmorphologie und Funktion beeinflusst werden kann. So kann beispielsweise die Enzymaffinität zu Substraten gesteigert, oder gehemmt werden. Die ionische Bindung von Kalzium an sensitive Zielproteine ist ein universeller Mechanismus zur Signaltransduktion (Clapham 2007). Um sich den ständig wechselnden Umweltbedingungen anpassen zu können, sind Signalwege etabliert worden, die eine Kommunikation zwischen Extrazellularraum (EZ) und Intrazellularraum (IZ) erlauben. Intrazelluläre Kalziumdepots, wie das endoplasmatische Retikulum (ER), Mitochondrien, der Golgi-Apparat und Lysosomen sind mit einer Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden verschaltet. In diesen Kompartimenten liegt Kalzium in unterschiedlichen Konzentrationen vor (s. Abb. 1) (Vasington et al. 1972; Christensen, Myers, and Swanson 2002; Pedriali et al. 2017). Kalziumkonzentrationsänderungen

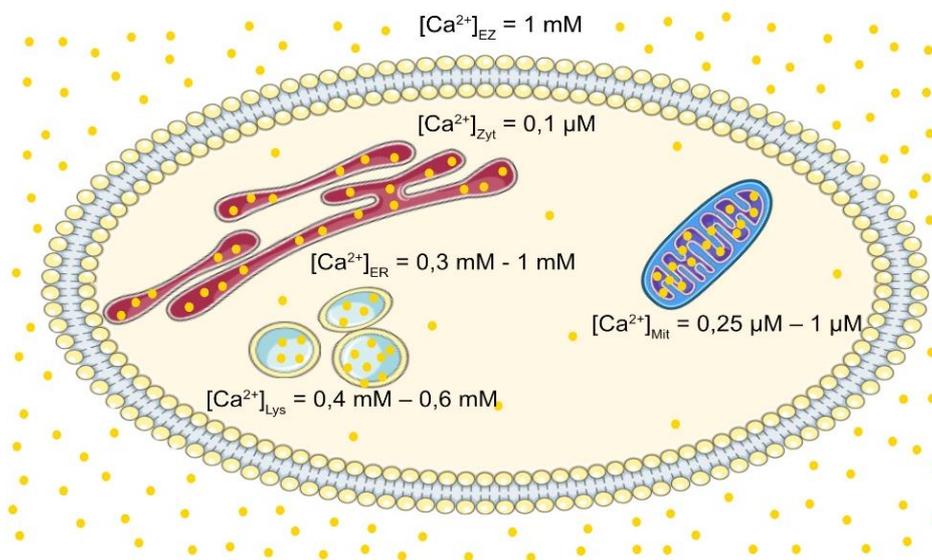


Abbildung 1: Kalziumkonzentrationsunterschiede entlang eukaryotischer Zellmembranen. Es bilden sich Konzentrationsgradienten aufgrund unterschiedlicher Kalziumkonzentrationen wie extrazellulär $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EZ}}$, der sehr niedrigen zytosolischen Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ und den intrazellulären Kalziumdepots wie bspw. das Endoplasmatische Retikulum $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$, die Lysosomen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Lys}}$, oder das Mitochondrium $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Mit}}$.

im Zytosol regulieren den Zellmetabolismus und starten physiologische Prozesse wie Enzymsekretion, Zellbewegung, Muskelkontraktion oder Transkription (Berridge, Lipp, and Bootman 2000). Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sind ein wichtiges Kommunikationsinstrument für extrazelluläre Vorgänge. Schnelle Ca^{2+} -Oszillationen mit hoher Amplitude, hervorgerufen durch das Öffnen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, führen zu einer schnellen Signalantwort, während basale Ca^{2+} Veränderungen eine langsamere und beständigere Antwort durch Veränderungen der Proteinbiosynthese ermöglichen (Berridge, Bootman, and Roderick 2003).

2.2. Kalziumströme über Zellmembran und ER

Konzentrationsunterschiede verschiedener Teilchen, die durch eine semipermeable Membran getrennt werden, führen aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsmöglichkeit zu einem Konzentrationsgradienten über der Membran. Wenn es sich um geladene Teilchen (Ionen) handelt, resultiert zusätzlich eine elektrische Spannung. Zusammengeführt ergibt sich hieraus ein elektrochemischer Gradient über den semipermeablen Zellmembranen eukaryotischer Zellen: das Membranpotential. Das Membranpotential ist die treibende Kraft für den Einstrom oder Ausstrom verschiedener Ionen wie Kalzium, Chlorid, Kalium oder Natrium (Lassen and Sten-Knudsen 1968). Durch die *Patch-Clamp*-Technik können Ionen Konzentrationsänderungen an Zellmembranen detektiert werden (Hamill et al. 1981). Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration können beispielsweise mithilfe eines fluoreszierenden Kalziumkomplexbildners sichtbar gemacht werden (Hagen et al. 2012).

Um den Kalziumtransport entlang der semipermeablen Membran zu ermöglichen, transportieren porenbildende transmembrane Proteinstrukturen Kalzium selektiv über die Zellmembran. Hierzu zählen die Plasmamembran-ATPase (PMCA), die durch aktiven Transport zwei Kalzium pro Adenosintriphosphat (ATP) in den EZ pumpt, sowie die Sarko-Endoplasmatische Retikulum ATPase (SERCA), die ein Kalzium pro ATP in das ER pumpt. Ein weiterer Mechanismus ist der sekundär aktive Transport, der ein Ion in Richtung seines elektrochemischen Gradienten befördert und die dabei entstehende kinetische Energie nutzt, um ein Ion entgegen seines elektrochemischen Gradienten auf die andere Membranseite zu transportieren. Hierzu zählen

beispielsweise der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), der drei Na^+ im Austausch gegen ein Kalzium befördert, oder der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - K^+ -Austauscher (NCKX), der vier Na^+ im Austausch für ein Kalzium und ein Kalium befördert (Clapham 2007). Während die ATPasen in erster Linie für das sehr niedrige intrazelluläre Kalziumniveau verantwortlich sind, sorgen NCX und NCKX für schnelle Potentialänderungen, wie sie beispielsweise bei Aktionspotentialen von Neuronen entstehen (Hilgemann et al. 2006). Ein Kalziumeinstrom in das Zytosol kann von extrazellulär und aus den intrazellulären Kalziumspeichern hervorgerufen werden. Auch hierfür sind Kalziumkanäle verantwortlich. Im Falle der Zellmembran gibt es beispielsweise spannungsabhängige Kalziumkanäle (CaV), ligandenaktivierte Kalziumkanäle (z.B. im ER) oder auch *Ca²⁺-release-activated-Ca²⁺-Kanäle* (CRAC-Kanal) mit der Untereinheit ORAI1.

Neben den oben genannten Kalziumkanälen gibt es noch weitere Kanäle, die einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase haben, wie der Kalziumaktivierte Kaliumkanal (BK-Kanal), der eine wichtige Rolle in der synaptischen Verschaltung, insbesondere der präsynaptischen Depolarisation hat (Vergara et al. 1998). Bis dato konnten viele verschiedene Subtypen dieser exemplarisch beschriebenen Kanäle differenziert werden.

Eine Aktivierung Gq-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert die Phospholipase C (PLC), die wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP_3 aktiviert den ER-ständigen IP_3 -Rezeptor und führt zu einem Kalziumeinstrom in das Zytosol. Die Vorratsentleerung des ER führt anschließend zu einem massiven Einstrom über Plasmamembranständige CRAC-Kanäle (Clapham 2007). Dieser initiale intrazelluläre Kalziumanstieg führt dann zu einem selbstverstärkenden Prozess, der hauptsächlich durch das ER über Ryanodinrezeptoren (RyR) getragen wird.

Mitochondrien puffern ER- Ca^{2+} Ströme in das Zytosol ab und sind in die CRAC-Kanal-Aktivierung involviert. Durch ihre engen Verknüpfungen mit dem ER (Rizzuto et al. 1998), kann die mitochondriale Kalziumpufferung zu einer verstärkten ER-Vorratsentleerung führen und so die CRAC-Aktivierung verstärken (Gilibert, Bakowski, and Parekh 2001). In Ergänzung dazu kann ein mitochondrialer Kalziumausstrom zu erhöhter Kalziumaufnahme in das endoplasmatische Retikulum führen und die CRAC-Aktivierung verringern (Parekh 2008). Mitochondriale Kalziumaufnahme erhöht die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS), die eine Kalziumaufnahme (Bootman, Taylor, and Berridge 1992; Huddleston et al. 2008) und

-abgabe durch das ER beeinflussen (Kaplan et al. 2003; Ihara, Kageyama, and Kondo 2005).

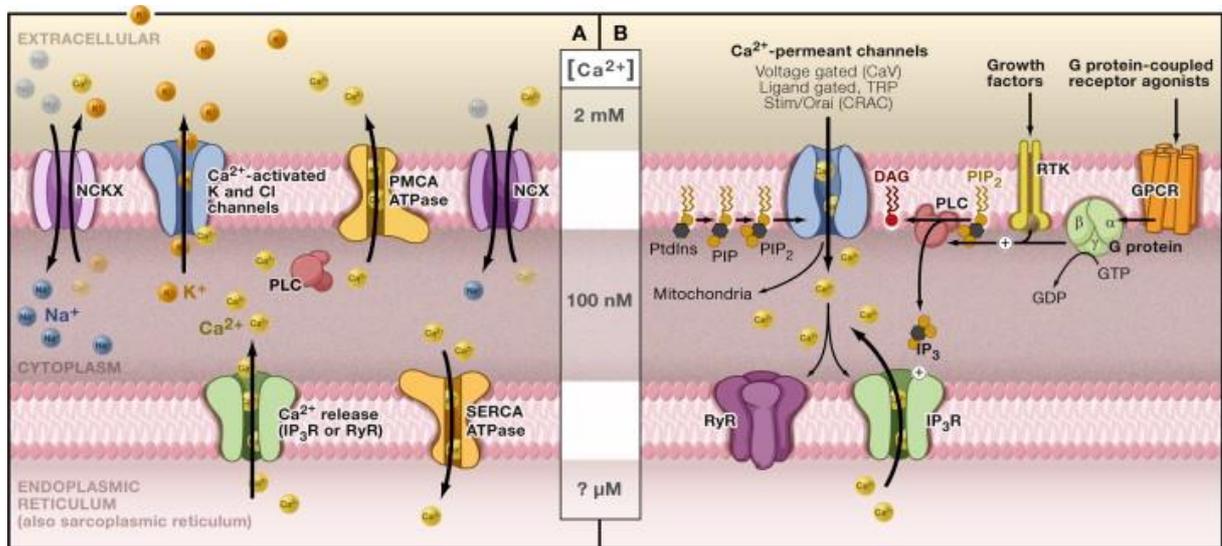


Abbildung 2: Kalziumströme entlang von eukaryotischen Zellmembranen. (A) Das niedrige zyttoplasmatische Kalziumniveau wird bei ca. 100 nM hauptsächlich durch aktiven Transport der PMCA und SERCA gehalten. Der NCX und NCKX sind weitere wichtige Regulatoren für die intrazelluläre $[Ca^{2+}]$. $[Ca^{2+}]$ -Anstieg hyperpolarisiert viele Zellen durch Öffnung von K⁺- oder Cl⁻-Kanälen. (B) In exzitatorischen Zellen führt eine Zellmembrandepolarisation oder eine extra- oder intrazelluläre Ligandenbindung zur Öffnung von spannungsabhängigen oder ligandenabhängigen Kalziumkanälen, aus (Clapham 2007).

2.3. CRAC-Kanal mit porenbildender Untereinheit ORAI1

Kalziumkanäle, die für den kapazitiven Kalziumeinstrom verantwortlich sind, werden durch intrazelluläre Kalziumdepletion aktiviert. Dies führt zur Namensgebung der *Ca²⁺-release-activated-Ca²⁺-Kanäle* (CRAC-Kanäle). Der Kalziumeinstrom durch CRAC-Kanäle wird *store-operated Ca²⁺ entry* (SOCE) und die elektrophysiologisch gemessene Potentialänderung *Ca²⁺ release-activated calcium current* (I_{CRAC}) genannt. Hauptsächlich zwei Zellorganellen, das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien, modulieren die Aktivität des SOCE (Parekh and Putney 2005). Ein wichtiger Bestandteil der T-Zell Aktivierung ist die durch den T-Zell-Rezeptor hervorgerufene Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels. Hierbei wird Ca²⁺ über IP₃ und Ryanodinrezeptoren aus den intrazellulären Speichern, wie beispielsweise dem ER, bereitgestellt. Die konsekutive Entleerung der ER-Ca²⁺-Speicher führt wiederum zu einem verlängerten Ca²⁺ Einstrom über membranständige CRAC-Kanäle. Zu damaliger Zeit wurde vermutet, dass es neben der bereits bekannten IP₃-

Kaskade weitere Rückkopplungen zwischen ER und Plasmamembran geben muss, die bis dato jedoch noch nicht näher beschrieben werden konnten (Lewis 2001; Putney et al. 2001).

CRAC-Kanäle spielen eine essentielle Rolle in T-Lymphozyten und Mastzellen, in denen sie bei Antigen- oder Allergiekontakt einen Kalziumeinstrom bewirken und zur T-Zell-Aktivierung und Mastzelldegranulation führen (Feske et al. 2001; Feske et al. 2005; Vig et al. 2008; Partiseti et al. 1994).

Den entscheidenden Hinweis zum weiteren Aufbau des CRAC-Kanals liefert eine Punktmutation in einem Protein, welches ORAI1 genannt wird. Eine homozygote Punktmutation von ORAI1 in Patienten mit schwerem kombinierten Immundefekt (SCID) führt zu verringertem I_{CRAC} . Dies führt zu geringerer Bildung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), was in einer geringeren Immunantwort resultiert (Feske et al. 2006). ORAI1 ist die porenbildende Untereinheit des CRAC-Kanals. Es ist ein Zellmembranprotein mit vier Transmembransegmenten (Zhou, Ramachandran, et al. 2010; Hogan and Rao 2007). ORAI1 ist auf zytoplasmatischer Seite spitz zulaufend geformt. Die intrazelluläre Domäne reicht 100 Å (10nm) in das Zytosol (Maruyama et al. 2009).

ORAI1 liegt in inaktiver Form auf der Zellmembran in Dimeren vor. Die Anzahl der ORAI1-Untereinheiten, die für einen vollständigen CRAC-Kanal benötigt werden, wurde kontrovers diskutiert. Penna et al. machte die Beobachtung, dass ein funktioneller CRAC-Kanal aus einem Tetramer an ORAI1 bestand, das aus zwei ORAI1-Dimeren gebildet wurde (Penna et al. 2008). Unterstützend postulierten Mignen, Thompson und Shuttleworth 2008, dass bei elektrophysiologischen Messungen via *Patch-Clamp* maximale CRAC-Kalziumströme bei ORAI1-Tetrameren gemessen wurden (Mignen, Thompson, and Shuttleworth 2008). Im Kontrast dazu stehen die stöchiometrischen Erkenntnisse von Yen, Lokteva und Lewis aus 2016, die eine hexamerische Form von ORAI1-gebildeten CRAC-Kanälen postulierten (Yen, Lokteva, and Lewis 2016).

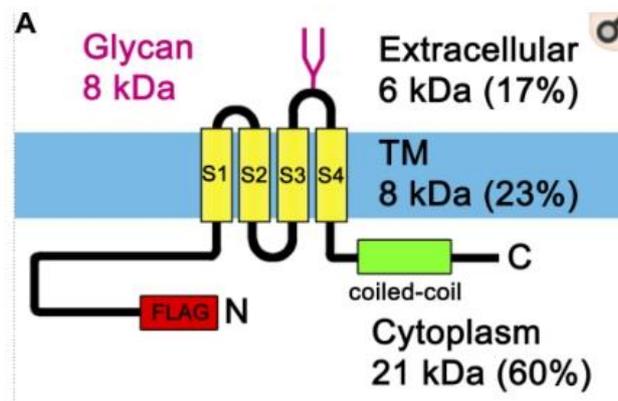


Abbildung 3: Proteinstruktur der CRAC-Kanal Untereinheit ORAI1. ORAI1 besitzt vier Transmembrandomänen (S1-S4). N-Terminus und C Terminus mit einer *coiled-coil* Sequenz befinden sich im Zytosol, aus (Maruyama et al. 2009).

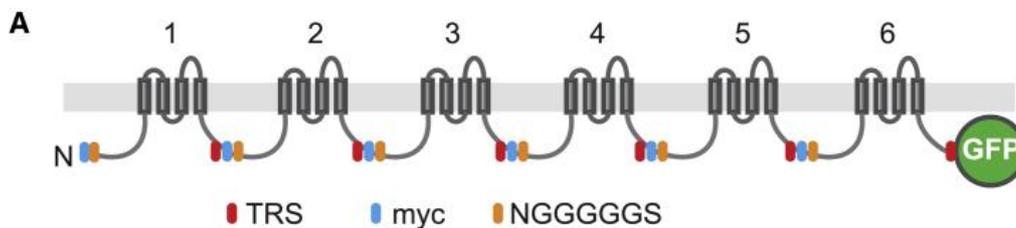


Abbildung 4: Funktioneller Aufbau eines CRAC-Kanals. Ein CRAC-Kanal wird nach Yen et al. durch 6 Untereinheiten ORAI1 generiert und bildet ein kontinuierliches hexametrisches Polypeptid an der Plasmamembran. Verbunden sind die ORAI1-Plasmide durch spezifische Aminosäuresequenzen (Yen, Lokteva, and Lewis 2016). Der Aufbau des CRAC-Kanals wurde sehr kontrovers diskutiert. Alternativ wurde ORAI1 in aktiver Form auch als Tetramer beschrieben, aus (Penna et al. 2008).

2.4. Ist STIM1 ein Tumorsuppressorgen oder ein ER-ständiger Kalizumsensor?

Das ER-ständige Protein *Stromal interaction molecule 1* (STIM1), wurde nach seiner Entdeckung anfänglich *God only knows* (GOK) genannt, da seine Funktion nicht erklärt werden konnte. Parker et. al entdeckte STIM1 auf dem humanen Chromosom 11p15.5 und brachte es mit verschiedenen pädiatrischen Tumorerkrankungen in Verbindung (Parker et al. 1996). Im selben Jahr wurde das homologe Maus-Stim1 als zelloberflächenbindendes Genprodukt bei hämatopoetischen Vorläuferzellen entdeckt. Oritani and Kincade et. al beobachteten eine Förderung der adaptiven Immunität durch klonale Expansion (Oritani and Kincade 1996). Sabbioni et al. beobachtete nach Transfektion von STIM1-cDNA bei vorheriger STIM1-Defizienz einen induzierten Zelltod, weshalb STIM1 eine Funktion als Tumorsuppressorgen

zugeschrieben wurde (Sabbioni et al. 1997). Verwandte Proteine von STIM1 sind das Schwesterprotein STIM2, welches ebenfalls ubiquitär in Vertebraten exprimiert wird und das Drosophila-Stim (D-Stim) in *Drosophila melanogaster* (Williams et al. 2001). Das ca. 90 kDa große humane STIM1-Molekül wird ubiquitär in verschiedenen Zellen exprimiert. STIM1 wird posttranslational vor allem an Serinresten phosphoryliert und N-glycosyliert, was eine STIM1-Modulation ermöglicht (Manji et al. 2000). STIM1 wird *in vivo* an Serinresten phosphoryliert (Manji et al. 2000).

Die Entschlüsselung der strukturellen Proteindomänen des STIM1 führte Schritt für Schritt zur heutzutage weitestgehend unbestrittenen These, dass STIM1 ein ER-ständiger Kalziumsensor ist und eine zentrale Rolle für die intrazelluläre Kalziumhomöostase einnimmt (siehe Kapitel 2.5).

STIM1 und STIM2 unterscheiden sich durch eine differenzierte kalziumbindende Domäne mit unterschiedlicher Kalziumaffinität (Stathopoulos, Zheng, and Ikura 2009; Brandman et al. 2007).

STIM2 reguliert die Funktion von STIM1 durch heterotypische Proteininteraktion, indem es den zytoplasmatischen C-Terminus von STIM1 moduliert und aktiviert (Subedi et al. 2018). STIM1 und STIM2 unterscheiden sich morphologisch durch eine unterschiedliche N-terminale intraluminal Domäne und eine C-terminale zytoplasmatische Domäne. Wenn man die N-terminale Domäne von STIM1 durch die N-terminale Domäne von STIM2 ersetzt, führt dies zu verringertem SOCE und verringerter ORAI1 Aktivierung. Tauscht man die N-terminale Domäne von STIM2 durch die von STIM1 aus, führt dies zu erhöhtem SOCE und vermehrter Aktivierung von ORAI1 (Zhou et al. 2009).

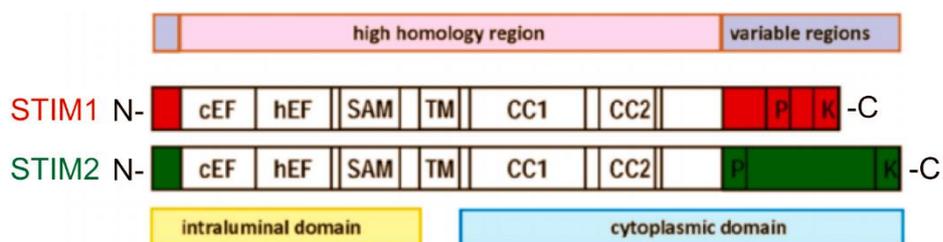


Abbildung 4: Proteinstruktur von STIM1 und STIM2. Die kalziumsensible EF-Hand von STIM1 und STIM2 kann unterschiedlich gefaltet sein. cEF steht für *canonical* EF-Hand, hEF für *hidden* EF-Hand. Anschließend folgt das *sterile alpha motif* (SAM), welches wichtig für die Oligomerisierung der STIM-Monomere ist. Diese Strukturen befinden sich im ER-Lumen. Nach der transmembranen Domäne folgen zwei *Coiled Coil*-Strukturen, die sich bei STIM1-Oligomerisierung ebenfalls zusammenlagern. Die Variablen Regionen der Proteine sind in rot und grün gehalten. Es kann hierbei zwischen einer Prolin-reichen (P) und einer Lysin-reichen Region (K) weiter differenziert werden. Im Bereich des rot gefärbten Abschnitts auf ER-Seite des STIM1 befinden sich die Cysteine C49 und C56, Variation einer Abbildung aus (Zhou et al. 2009).

2.5. STIM1-Aktivierung durch homotypische Proteininteraktion

Bei gefüllten Kalziumspeichern des ER bindet die kalziumbindende Domäne von STIM1, die EF-Hand, ein Kalziumion. Kommt es zu einer Vorratsdepletion im ER, dissoziiert das Kalziumion von der EF-Hand. Kalziumverlust der EF-Hand resultiert in einer Konformationsänderung von STIM1 und der Zusammenlagerung mit weiteren STIM1 Molekülen. Anschließend transloziert STIM1 zu Plasmamembran-ER Schnittstellen und bildet dort sogenannte Punctae (Zhang et al. 2005). STIM1 liegt während der inaktiven, kalziumgebundenen Form als Dimer vor (Covington, Wu, and Lewis 2010).

In mit Ca^{2+} gefüllten ER-Kalziumspeichern verbleibt STIM1 in seiner inaktiven Form, es unterdrückt homotypische STIM1-STIM1-Verbindungen durch eine kompakt tertiär gefaltete Ca^{2+} -gebundene EF-SAM-Domäne. Diese stabile Proteinfaltung wird durch innere „offene“ hydrophobe EF-Hand-SAM-Interaktionen gefördert. Eine Kalziumdepletion induziert eine „geschlossene“ EF-SAM-Konformation. Die hydrophoben Reste werden nach außen freigegeben. Die Oligomerisierung dieser unstabilen EF-SAM-Konformation ist energetisch begünstigt und geschieht auf der luminalen Seite von STIM1 (Stathopoulos et al. 2008). Die initiale EF-SAM-Oligomerisierung wird auf der luminalen Seite durch *Coiled-Coil*-Proteininteraktionen unterstützt (Baba et al. 2006). Durch initiale luminalen STIM1-Strukturveränderung durch EF-SAM-Oligomerisierung wird das polybasische C-terminale STIM1-Ende näher an die STIM1-Transmembrandomäne (STIM1-TM) herangeführt. Hierdurch wird eine Konformationsänderung der STIM1-TM und der kommunizierenden zytoplasmatischen *Coiled-Coil-Domäne* (CC1) getriggert. Durch anschließende homotypische STIM1-Proteininteraktion auf zytosolischer Seite wird die oligomerisierte STIM1-Konformation stabilisiert (Ma et al. 2015). STIM1-Oligomere wandern weiter zu Schnittstellen von Plasmamembran und ER (Liou et al. 2007) und bilden dort Punctae (Luik et al. 2006; Wu et al. 2006; Zhang et al. 2005).

STIM1-Punctae führen an der Plasmamembran durch Kreuzvernetzung mit ORAI1-Dimeren zur Bildung von ORAI1-Multimeren (ORAI1-Punctae) (Yang et al. 2012; Park et al. 2009).

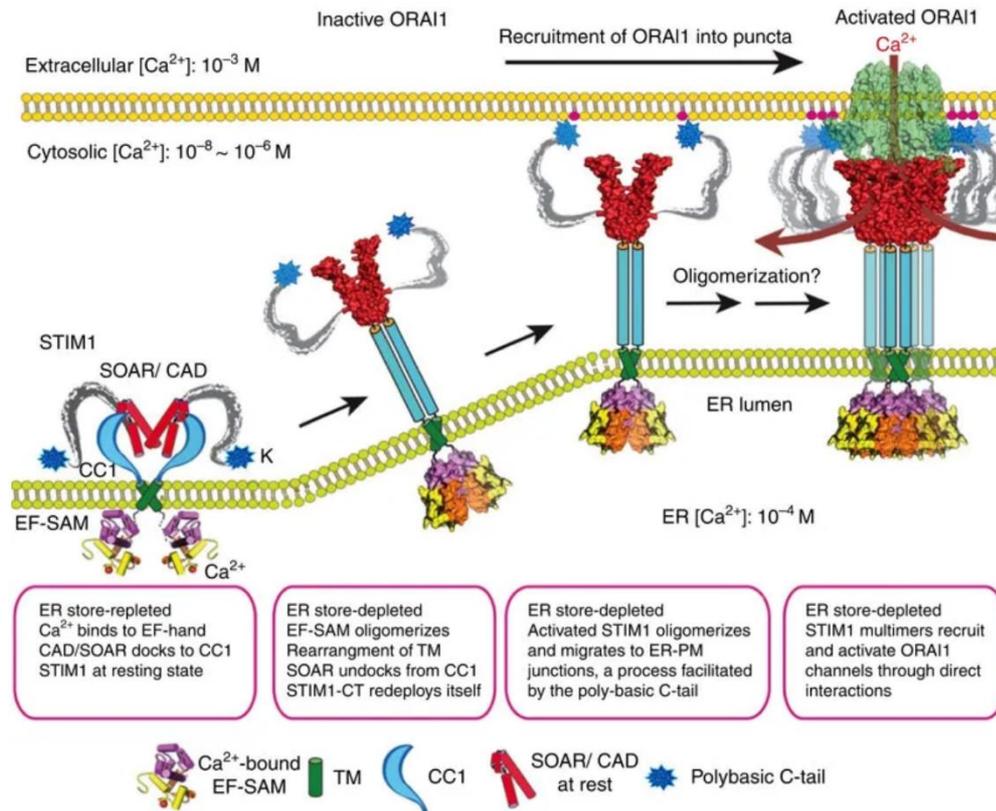


Abbildung 5: Modell der STIM1 Aktivierung und anschließender STIM1 Punctaebildung sowie Orai1-Kolokalisation. Während die ER-Kalziumspeicher gefüllt sind, verbleibt STIM1 in seiner inaktiven Konformation. Die luminale ER-SAM Domäne verbleibt zumeist als Monomer. Die zytoplasmatische STIM1 Domäne (STIM1-CT) besitzt eine *coiled coil 1* Domäne (CC1), eine kleine Orai1-Aktivierungsdomäne (SOAR bzw. CAD), sowie einen polybasischen C-terminalen Schwanz (K). Der zytoplasmatische Anteil von STIM1 befindet sich in einer zurückgefalteten Konformation durch physikalische Interaktion zwischen SOAR und CC1. Durch einen entleerten ER-Kalziumspeicher dissoziiert Ca^{2+} aus der EF-SAM Domäne. Hierdurch wird die EF-SAM Domäne strukturell verändert und es kommt auf luminaler Seite zu einer Aggregation der EF-SAM- Domänen. Hierdurch wird die STIM1-TM-Domäne näher an die C-terminale SOAR-Domäne geführt, was zu einer Trennung zwischen SOAR und CC1 führt. STIM1 befindet sich nun in einer „aufgerichteten“ Konformation. SOAR und das polybasische C-terminale Ende sind freigelegt. In dieser „aufgerichteten“ Konformation oligomerisiert STIM1 und wandert in Richtung der Zellmembran. An ER-Plasmamembran Schnittstellen wird das in der Plasmamembran befindliche Orai1 rekrutiert und durch direkte Proteininteraktion aktiviert. Diese Proteininteraktion wird vermutlich durch Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen polybasischem C-Schwanz und negativ geladenen zellmembranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonaten (rote Punkte) unterstützt, aus (Ma et al. 2015).

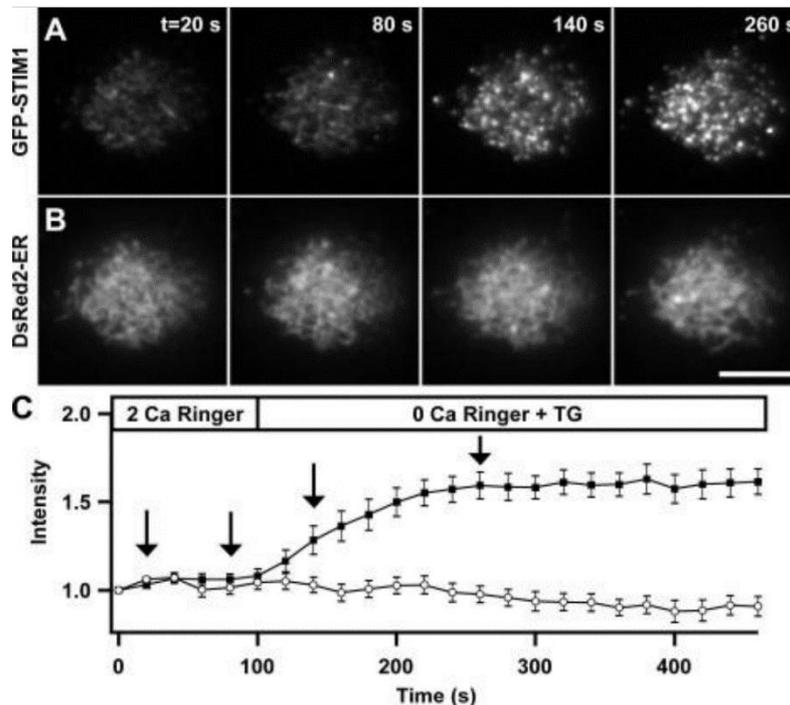


Abbildung 6: ER-Kalziumdepletion führt zu STIM1-Punctae-Bildung an der Plasmamembran. Echtzeit-TIRF-Mikroskopie und thapsigargininduzierte ER-Kalziumdepletion zeigte, dass sich in der Nähe der Plasmamembran (10 – 25 nm) GFP-STIM1-Punctae (schwarze Vierecke) bilden. Hervorgerufen wurde dies durch STIM1-Translokation und nicht durch ER-Translokation, da das DsRed2 gefärbte ER (runde Kreise) keinen signifikanten Fluoreszenzanstieg hatte, aus (Wu et al. 2006).

2.6. Steuerung des SOCE durch STIM1

Nach der STIM1-Punctaebildung und dem Öffnen der CRAC-Kanäle kommt es zu einem starken Kalziumeinstrom in die Zelle. ORAI1 wird durch STIM1 über direkte Proteininteraktion aktiviert. Sie sind beide essentielle Bestandteile des SOCE (Muik et al. 2008; Zhou, Meraner, et al. 2010; Navarro-Borelly et al. 2008).

Der wichtigste Mechanismus für den extrazellulären Kalziumeinstrom in Lymphozyten ist der SOCE. Maus-STIM1-Expression ist in T-Lymphozyten viermal höher als in B-Lymphozyten (Yarkoni and Cambier 2011). Das bedeutet, dass differenzierte STIM1-Expression zu unterschiedlich hoher intrazellulärer Kalziumamplitude führt (Yarkoni and Cambier 2011). *Dm-Stim*-Knockdown in *Drosophila* S2-Zellen führt zu kompletter Suppression des SOCE und Knockdown des humanen STIM1 in humanen Jurkat T Zellen zu signifikant erniedrigtem SOCE (Roos et al. 2005). Eine Überexpression von STIM1 und ORAI1 führt zu signifikanter Erhöhung des SOCE (Peinelt et al. 2006).

Der zytosolische STIM1-C-Terminus kann die Kanalfunktion des CRAC-Kanals in vivo und in vitro auch ohne vorherige STIM1-ORAI1-Kolokalisation beeinflussen (Muik et al. 2008). STIM1 besitzt eine im Zytosol gelegene C-terminale hochkonservierte

CRAC-Aktivierungsdomäne (CAD). STIM1-Mutanten ohne CAD konnten keine Interaktion mit ORAI1 herbeiführen. Die CAD bindet direkt an den N- und C-Terminus von ORAI1 (Park et al. 2009). Dies ermöglicht eine Kreuzvernetzung der CAD mit ORAI1 und damit eine ORAI1-STIM1-Punctaebildung, welche Voraussetzung für die Bildung einer Kanalpore ist. Die Gabe einer aufgereinigten CAD, kombiniert mit STIM1-Mutanten zeigte jedoch, dass eine alleinige Bindung der CAD an ORAI1 zwar zur Dimerisierung der ORAI1-Dimere führte, jedoch nicht einen vergleichbaren I_{CRAC} herbeiführen konnte, wie eine vollständige STIM1-ORAI1-Interaktion. Es muss also neben der ORAI1-bindenden Domäne weitere STIM1-Anteile geben, die den SOCE beeinflussen (Park et al. 2009).

Eine physikalische Interaktion zwischen STIM1 und ORAI1 geht mit einer Konformationsänderung des ORAI1 einher, was eine weitere STIM1-unabhängige ORAI1-Modulation erlaubt, die den anschließenden Ca^{2+} -Einstrom feinsteuert (Navarro-Borelly et al. 2008). Neuere Forschungsergebnisse konnten den kinetischen Mechanismus entschlüsseln, der zeigt, wie eine von STIM1 ausgelöste Konformationsänderung an ORAI1 den CRAC-Kanal durchlässig für Ca^{2+} -Ionen macht. Yamashita et al. beschrieb 2017 zwei sich in der durch ORAI1-gebildeten transmembranen Pore befindliche hydrophobe Aminosäurereste (Yamashita et al. 2017). Durch STIM1-Proteininteraktion mit ORAI1 wird die Helixstruktur der Pore gedreht, sodass die hydrophoben Aminosäurereste die Porenachse freigeben und diese für Kalzium durchlässig wird (Yamashita et al. 2017).

2.7. Einfluss von STIM2 auf den SOCE

Lange Zeit fand das verwandte Protein STIM2 weniger Beachtung als STIM1. In den letzten Jahren lässt sich jedoch ein gesteigertes Interesse an dem STIM2 beobachten. Der Einfluss von STIM2 auf den SOCE wurde kontrovers diskutiert: STIM2 wurde einerseits von Soboloff et al. 2006 ein hemmender Effekt auf den SOCE zugeschrieben (Soboloff et al. 2006), andererseits zeigten Roos et al. 2015, dass STIM2-Knockdown keinen signifikanten Effekt auf den SOCE hat (Roos et al. 2005). Im Kontrast dazu stehen die Erkenntnisse von Brandman et al., der STIM2 als zentrales Sensorprotein präsentierte, welches das zytosolische- und ER-Kalziumniveau engmaschig regulieren würde. Brandman beschrieb, dass in HeLa, Huvec und HEK293 T- Zellen eine STIM2 Überexpression, jedoch nicht eine STIM1 Überexpression, zu einer intrazellulär basal erhöhten Ca^{2+} -Konzentration führte. STIM2 Knockout führte zu einem intrazellulär basal erniedrigten Ca^{2+} -Spiegel (Brandman et al. 2007). Zhou et al. untersuchte die Proteininteraktion zwischen STIM2 und ORAI1. STIM2 beeinflusste die ORAI1-Punctaebildung, indem es mutmaßlich die Kreuzvernetzung zwischen STIM1 und ORAI1 hemmte. STIM2 verhinderte hierdurch eine intrazelluläre Kalziumüberladung durch übermäßigen SOCE (Zhou et al. 2018). Subedi et al. zeigten, dass STIM2 bei geringer ER-Kalziumdepletion ORAI1 aktivieren konnte, während STIM1 noch in inaktivem Zustand vorlag. Desweiteren konnte aktives STIM2 das noch inaktive STIM1 rekrutieren und in einen aktivierten Zustand überführen (Subedi et al. 2018). Durch SOCE hervorgerufenen Kalziumeinstrom nach intrazellulär werden die ER-Kalziumspeicher aufgefüllt. *SOCE-associated regulatory factor* (SARAF) beendet den CRAC-Kanal getragenen Kalziumeinstrom. Dieses wird in Säugetierzellen ubiquitär exprimiert und besitzt eine besonders hohe Expressionsrate in Immunzellen und Neuronen (Su et al. 2004). Es ist ein ER-stämmiges Membranprotein, welches mit STIM1 interagiert (Palty et al. 2012). Zusätzlich dazu interagiert SARAF in der Abwesenheit von STIM1 auch direkt mit ORAI1 und induziert paradoxerweise eine Kanalöffnung (Albarran et al. 2016).

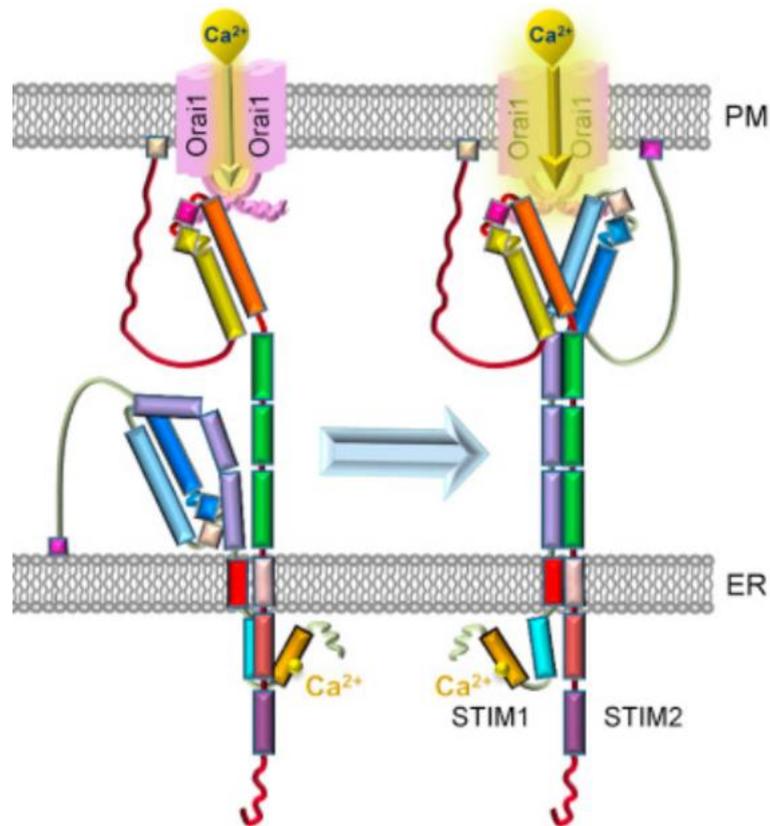


Abbildung 7: Modell eines STIM2/STIM1/ORAI1 Komplexes. STIM2 sammelt sich an ER-Plasmamembran-Schnittstellen ohne vorherige oder geringe ER- Ca^{2+} -Vorratsdepletion. Bereits in diesem Zustand liegt ein Teil von STIM2 in aktiver, kalziumbindender Konformation vor. STIM2 rekrutiert und aktiviert ORAI1. Durch eine geringe Affinität zu ORAI1 resultiert ein geringer Kalziumeinstrom. STIM2 rekrutiert STIM1 im inaktiven, kalziumgebundenen Zustand. STIM2 aktiviert bei sinkendem ER-Kalziumvorrat STIM1, auch ohne Verlust des gebundenen Kalziumions und ruft eine Konformationsänderung von STIM1 hervor. Durch höhere Affinität von STIM1 an ORAI1 resultiert ein erhöhter Kalziumeinstrom. Dieses Modell beschreibt eine Regulation des SOCE in ER-Kalziumvorratsbereichen, in denen der Kalziumvorrat leicht gesunken ist, jedoch noch nicht ausreichend geleert ist, um zu einer direkten STIM1-Aktivierung durch EF-Hand-Kalziumionenverlust zu führen. Zur Vereinfachung sind nur Dimere abgebildet, aus (Subedi et al. 2018).

2.8. Posttranslationale Modifikation von STIM1 in redoxsensitiven Aminosäuren

Ein Mechanismus für posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die Oxidation bzw. Reduktion von Cystein-Resten. Reversibel entstehen Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten, oder auch Sulfensäureresten (RSOH). Irreversible Veränderungen werden durch Bildung von Sulfinsäureresten (RSO₂H) oder Sulfonsäureresten (RSO₂OH) herbeigeführt (Veal, Day, and Morgan 2007). Ein weiterer Mechanismus zur posttranslationalen Modifikation von Schwefelresten an Proteinen besteht in der S-Glutathionylierung, die reversible Reaktion zwischen Cysteinresten und Glutathion (GSH) (Anathy et al. 2009; Dalle-Donne et al. 2009; Hawkins et al. 2010).

Die ER-membranständige Oxidoreduktase ERp57 gehört zur Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI). Sie ist in die Qualitätskontrolle neu synthetisierter Glycoproteine involviert, an dem Zusammenbau des Histokompatibilitätskomplex (MHC Klasse 1) und hat Einfluss auf die Genexpression (Coe and Michalak 2010). Prins et al. beschrieb, dass ERp57-*Knockout* zu einem erhöhten SOCE führte. Er postulierte, dass ERp57 an den luminalen Anteil von STIM1 bindet. Diese Bindung wurde von den Cystinresten C49 und C56 beeinflusst. Diese redoxsensitiven Aminosäuren bildeten unter nicht reduzierten Bedingungen eine intramolekulare Disulfidbrücke.

Durch Mutationen an C49 und C56 kam es bei Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Messungen zu geringerer Proteininteraktion mit ERp57. STIM1 C49A und C56A Mutation hemmten die Punctaeildung und verminderten den SOCE (Prins et al. 2011). Im Kontrast dazu beschrieb Hawkins et al. eine physiologisch unter oxidativem Stress verursachte S-Glutathionylierung an C56 mit gefolgter konstitutioneller STIM1 Punctaeildung (Hawkins et al. 2010). Der verursachte oxidative Stress konnte in vitro durch den GSH-Inhibitor Buthioninsulfoximin (BSO) sowie durch H₂O₂ hervorgerufen werden. Unter oxidativem Stress kam es zur Aktivierung von STIM1 und konsekutiv erhöhtem SOCE: Desweiteren wurde durch Mutation an C56 eine konstitutive Punctaeildung des mutierten STIM1 beobachtet. Hierdurch kam es zur dauerhaften Öffnung des CRAC-Kanals. Diese Öffnung blieb unabhängig von der ER-Kalziumkonzentration erhalten (Hawkins et al. 2010).

Der Widerspruch, ob eine Punktmutation an C49 und C56 zu einer vermehrten Punctaeildung und erhöhtem SOCE (Hawkins et al.) oder zu einer verringerten

Punctaebildung und erniedrigtem SOCE (Prins et al.) führt, ist die zentrale Fragestellung, die in dieser Doktorarbeit beantwortet werden sollte.

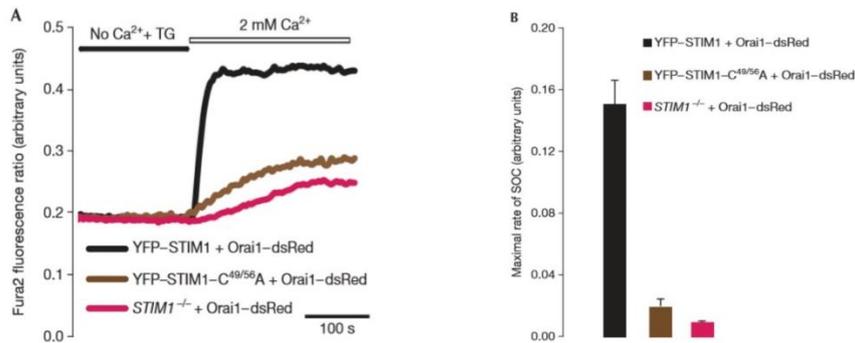


Abbildung 8: SOCE mit Vorratsentleerung von STIM1 WT höher als in STIM1-Mutanten. Nach Thapsigargin-induzierter ER-Vorratsdepletion kommt es bei STIM1^{-/-} und anschließender STIM1-WT-Transfektion in MEF Zellen zum *größten* SOCE-Einstrom. Bei anschließender C49A/C56A Transfektion zu einem verringerten SOCE und ohne STIM1-Transfektion zu dem *geringsten* SOCE (Prins et al. 2011).

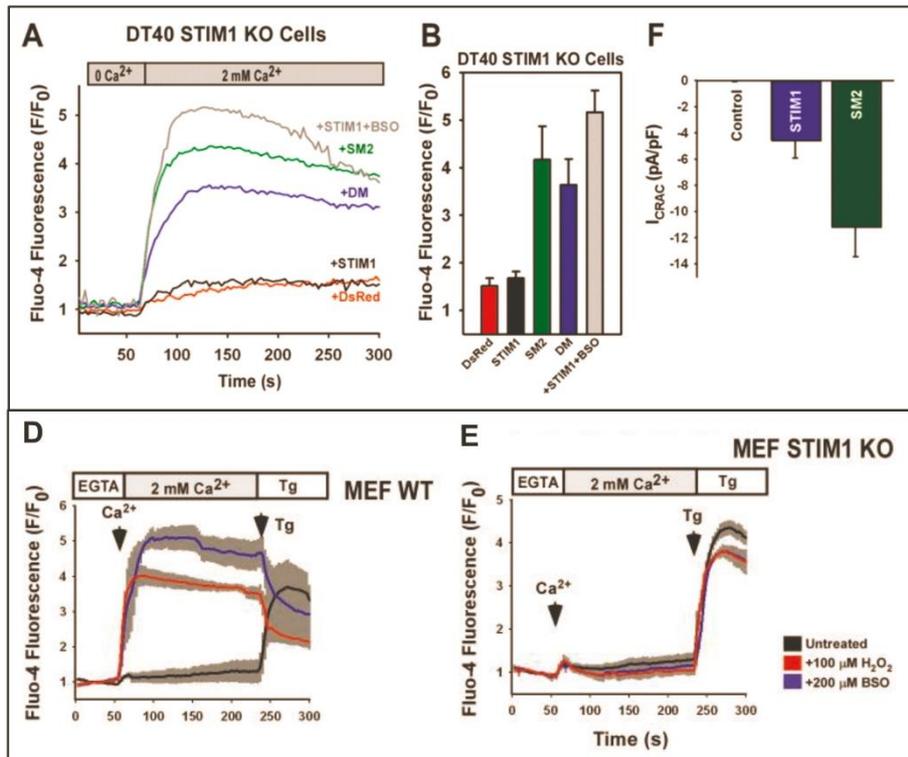


Abbildung 9: SOCE ohne Vorratsentleerung bei STIM1-C56M und DM höher als in STIM1 WT. (A, B, F) In DT40 Zellen kommt es nach Zugabe von Kalzium ohne vorherige ER-Vorratsdepletion bei STIM1 KO Zellen mit transfiziertem STIM1 C56 und des STIM1 C49/C56 Doppelmутanten zu einem höheren SOCE als beim transfizierten STIM1 WT. Dies spricht für eine konsekutive Aktivierung von STIM1 durch Punktmutation an C56. STIM1 WT erreicht nach 24-stündiger Inkubation mit dem GSH-Syntheseinhibitors BSO den im Vergleich stärksten SOCE (D, E) In MEF Zellen kommt es bei vorheriger Inkubation für 20 min mit 100 μ M H₂O₂ sowie für 24 h in 200 μ M BSO im Falle des MEF WT zu einem gegenüber unbehandelten Zellen erhöhten Kalziumeinstrom. Im Falle von MEF STIM1 KO Zellen ist kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu sehen, Abbildungen aus (Hawkins et al. 2010).

3. Material

3.1. Zelllinien

3.1.1. MEF- Zellen

MEF (*Mouse Embryo Fibroblast*) -Zellen wurden aus embryonalen Mausfibroblasten gewonnen. Es wurden MEF WT Zelllinien, MEF STIM1 -/- (*knockout*) und MEF STIM2 -/- Zelllinien (Ursprung: Masatsugu Oh-Hora, Harvard University) verwendet. In diese wurden folgende Plasmide stabil transfiziert:

Zelllinie	Plasmid
MEF STIM1 -/-	pPB CAG HA DEST STIM1 WT mcherry
MEF STIM1 -/-	pPB CAG HA DEST STIM1 C49M mcherry
MEF STIM1 -/-	pPB CAG HA DEST STIM1 C56M mcherry
MEF STIM1 -/-	pPB CAG HA DEST STIM1 C49MC56M mcherry
MEF STIM1 -/-	pPB CAG HA DEST mcherry
MEF STIM2 -/-	pPB CAG HA DEST STIM1 WT mcherry
MEF STIM2 -/-	pPB CAG HA DEST STIM1 C49M mcherry
MEF STIM2 -/-	pPB CAG HA DEST STIM1 C56M mcherry
MEF STIM2 -/-	pPB CAG HA DEST STIM1 C49MC56M mcherry
MEF STIM2 -/-	pPB CAG HA DEST mcherry

Die embryonalen Mausfibroblasten wurden in einem Medium mit hohem Zuckergehalt kultiviert, welches speziell für die MEF-Zellhaltung geeignet ist: DMEM High Glucose, mit 4,5 g Glucose, L-Glutamin und Pyruvat (in dieser Arbeit vereinfacht DMEM genannt). Diesem Medium wurde 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS (fetales Kalbserum) zugesetzt. Die Zellen inkubierten bei 37° und 5% CO₂. Für die Zellanzucht wurden 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90% passagiert.

3.2. Medien und Zusätze

Tabelle 1: Medien und Zusätze

Medium	Firma
DMEM High Glucose, mit 4,5 g Glucose, L-Glutamin und Pyruvat	ThermoFisher Scientific
Opti-Mem® (1x)	ThermoFisher Scientific
HyClone™ Fetal Bovine Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific
LB-Medium	life technologies by ThermoFisher Scientific
LB-Agarplatten	life technologies by ThermoFisher Scientific
S.O.C-Medium	Invitrogen by ThermoFisher Scientific

3.3. Puffer und Chemikalien

Tabelle 2: Puffer und Chemikalien

Puffer	Firma
PBS	Sigma Aldrich
HBSS	ThermoFisher Scientific
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich
Attractene	Qiagen
Turbofectin	Origene
Poly-L-Lysine solution	Sigma Aldrich
RIPA-Puffer	ThermoFisher Scientific
complete Mini Protease Inhibitor	Roche Diagnostics
SDS Puffer 10X	life technologies by ThermoFisher Scientific
TAE Puffer 50X	Eigenherstellung
TE Puffer	Qiagen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Ethanol Rotipuran 99,8%	Roth
Milchpulver	Roth
Tween® 20	Roth

Nuclease-Free Water 50 ml	Ambion
1,4-Dithiothretio (DTT)	Roth
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
dNTP Mix 100mM	ThermoFisher Scientific
5x Herculase II Reaction Buffer	Agilent Technologies
T4 Ligase Puffer	New England Biolabs
SmartCut	New England Biolabs
FD Buffer	New England Biolabs
Bromphenolblau	Roth
Kaliumchlorid (KCL)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Roth
Thapsigargin	Life-Technologies
Penicillin	Sigma-Aldrich
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Nitrozellulose	ThermoFisher Scientific™

3.4. Bakterien

Es wurden kompetente DH5- α Bakterien des Stammes *Escherichia coli* (E. coli) für die Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet. Genotyp: F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) PhoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1.

3.5. Primer

Die verwendeten Primer wurden durch das Unternehmen GATC Biotech hergestellt.

Tabelle 3: Primer

Primer	Sequenz
STIM1 Sequenzierungsprimer	CGC CTA CAA CGT CAA CAT C
gDNA Forward Primer	GGC GAG TTC ATC TAC AAG G
gDNA Backward Primer	ATC AGC CAC TGT ACC ACC
STIM1 C49M Forward Primer	GCA GAG TTT ATG CGA ATT GAC AAG CCC C
STIM1 C49M Backward Primer	TGC AGT GGA CTC CTC A

Primer Zeile 1 diene zur STIM1 Kontrollsequenzierung, Zeile 2 und 3 zur STIM1-gDNA-PCR, Zeile 4 und 5 zur Punktmutation innerhalb der STIM1 Basensequenz.

3.6. Plasmide

Während meiner Doktorarbeit klonierte ich die verschiedenen Varianten des STIM1 mcherry *Insert* aus einem pENTR Plasmid in den Übertragungsvektor pPB CAG HA Dest.

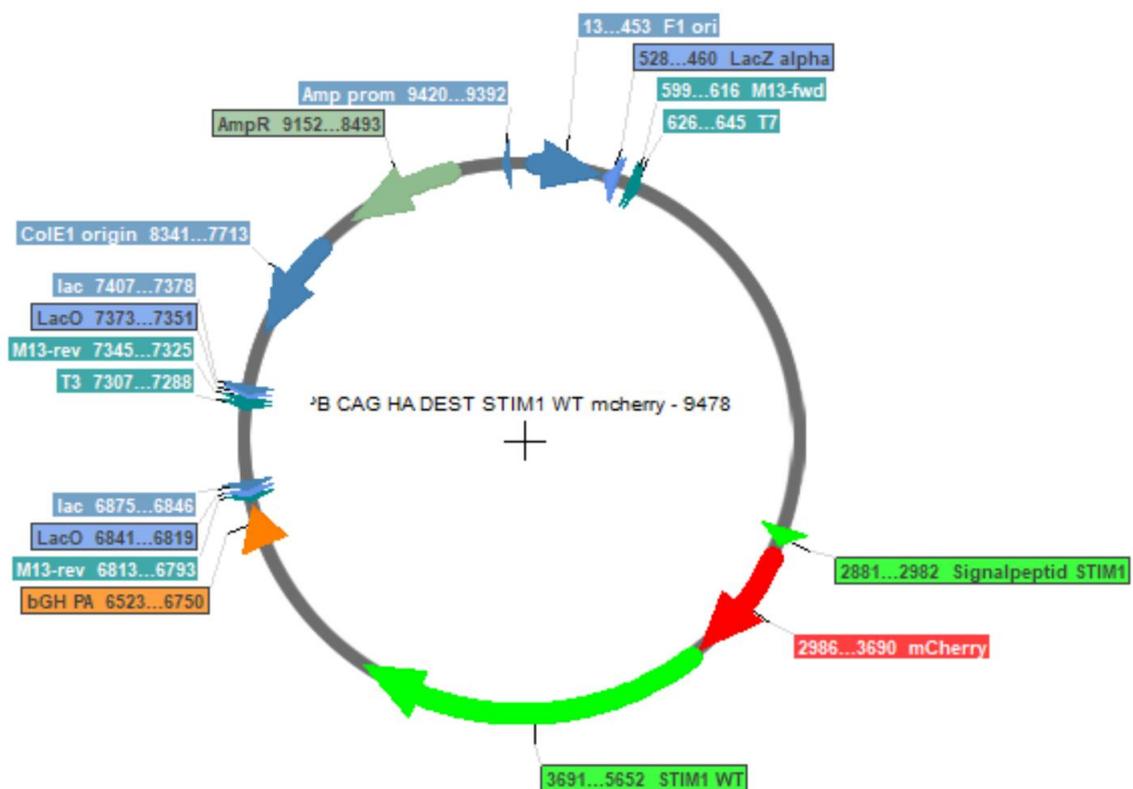


Abbildung 8 Plasmidkarte eines pPB CAG HA DEST Plasmids. In dieses wurde das *Insert* STIM1 WT mcherry eingefügt. Die Abbildung wurde in SerialCloner erstellt.

Tabelle 4: Plasmide

Konstrukt	Rückrat	Vektor	Hersteller
STIM1 WT mcherry human	pPB CAG HA DEST	pPB CAG HA DEST STIM1 WT mcherry	Felix Wunder AG Methner
STIM1 C49M mcherry human	pPB CAG HA DEST	pPB CAG HA DEST STIM1 C49M mcherry	Felix Wunder AG Methner
STIM1 C56M mcherry human	pPB CAG HA DEST	pPB CAG HA DEST STIM1 C56M mcherry	Felix Wunder AG Methner
STIM1 C49M C56M mcherry human	pPB CAG HA DEST	pPB CAG HA DEST STIM1 C49M C56M mcherry	Felix Wunder AG Methner
mcherry human	pPB CAG HA DEST	pPB CAG HA DEST mcherry	Felix Wunder AG Methner
Stim1 C49M C56M mcherry	pENTR5b	pENTR5b Stim1 C49M C56M mcherry	Felix Wunder AG Methner
Stim1 C49M mcherry	pENTR5b	pENTR5b Stim1 C49M mcherry	AG Methner
Stim1 C56M mcherry	pENTR5b	pENTR5b-Stim1 C56M mcherry	AG Methner
mcherry	pENTR3c	pENTR3c mcherry	AG Methner
pE-YFP Orai1	pEYFP	pE YFP Orai1	Geschenk Romanin, Univ. Linz
Stim1WT mcherry	pENTR5b	pENTR5b Stim1WT mcherry	Geschenk von Muniswamy Madesh, Philadelphia
pEX-CMV-SP-YFP-STIM2	pEX	YFP-STIM2	Gekauft von addgene.org

3.7. Antikörper, Enzyme, Farbstoffe, Marker

Tabelle 5: Antikörper, Enzyme, Farbstoffe, Marker

Name	Firma
Herculase II Fusion	Agilent Technologies
Anti-mouse IgG (H+L) (DyLight 800 Conjugate), Ziege, Best. Nr. 5257p, Verdünnung 1:10000	New England Biolabs

Anti-mouse IgG (H+L) (DyLight 680 Conjugate), Ziege, Best. Nr. 5470p, Verdünnung 1:10000	New England Biolabs
Anti-Rabbit IgG (H+L) DyLight 800 Conjugate, Ziege, Best. Nr. 5151P, Verdünnung 1:10000	New England Biolabs
Anti-rabbit IgG (H+L) (DyLight 680 Conjugate), Ziege, Best. Nr. 5366P, Verdünnung 1:10000	New England Biolabs
MG Midori Green Advance	Biozym Scientific
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder	LI-COR®
Trypan Blue Stain 0,4%	Logos Biosystems
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega
Anti-Actin, Klon C4, IgG 1k, monoclonal, Maus, Best. Nr. MAB1501, Verdünnung 1:4000	Merch Chemicals
Anti GAPDH, Best. Nr. 2118S, Verdünnung 1:3000	New England Biolabs
Anti-STIM1/GOK, Klon 5A2, Maus, Best. Nr. H00006786-M01, Verdünnung 1:1000	Abnova
Anti STIM2, GatNo 4123, Best. Nr. 4123, Verdünnung 1:750	Prosci-inc.com
CalciFluor™ Fluo-8 (fluo-2MA)	Santa Cruz Biotechnology
Sall FD FD	ThermoFisher Scientific
AvrII	New England Biolabs
XhoI	ThermoFisher Scientific
EcoR₁ FD	ThermoFisher Scientific
Mun₁ FD	LifeTechnologies
KpnI FD	ThermoFisher Scientific
LR clonase II	Life Technologies
Ponceau-Rot S Lösung	Sigma-Aldrich
Trypanblau, 0,4 %	Biozym
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
pBase	ThermoFisher Scientific
Gateway LR-Clonase II Enzyme Mix	ThermoFisher Scientific
Hot Start High Fidelity 2x Master Mix	ThermoFisher Scientific
2x KLD Reaction Buffer	ThermoFisher Scientific

10x KLD Enzyme Mix	ThermoFisher Scientific
Hoechst	Sigma-Aldrich
DAPI	Life-Technologies

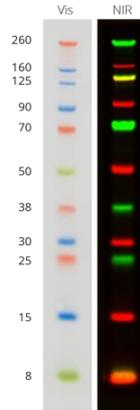
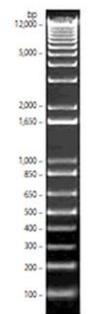


Abbildung 9: Chameleon Duo Protein Standard verwendet für Western-Blots



1 Kb Plus DNA Ladder
 0.9 µg/lane,
 0.9% agarose gel
 stained with
 ethidium bromide

Abbildung 10 verwendeter 1Kb Plus DNA Ladder für Agarosegele

3.8. Kits

Tabelle 6: Kits

Kit	Firma
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs
Quick-gDNA™ MiniPrep Kits	Zymo Research
MiniPrep Kits	Zymo Research
Gel DNA Recovery Kit	Zymoclean
Nucleobond Xtra Midi	Macherey-Nagel

Nucleobond Xtra Maxi	Macherey-Nagel
BC Assay Protein Quantification Kit	interchim®

3.9. Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsgegenstand	Firma
XCEED Handschuhe Powder-free	Microflex
Neubauerkammer	Precicolor HBG
LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific
Surgical Disposable Scalpels	Braun
Serological Pipette (5; 10; 25; 50 ml)	Greiner Bio-One
u-Slide 8 Lochnapfschale IbiTreat	Ibidi
CoolCell	Biocision
Kryoröhrchen 20	TPP
Biopur Multipette (0,5; 2,5; 5 ml)	Eppendorf
Cell Scraper	Greiner Bio-One
Lochnapfschalen (6; 12; 24; 48; 96)	Greiner Bio-One
Polypropylen Reaktionsgefäß	Sarstedt
Polypropylen Reaktionsgefäß 15 ml UV geschützt	Greiner Bio-One
Glasflasche (250; 500; 1000 ml)	Schott
Reaktionsgefäß (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf
Pipetierspitzen (10; 100; 1000µL)	Greiner Bio-One
Pipetierspitzen gestopft (10; 100; 1000µL)	Greiner Bio-One
Greiner Bio-One™ CELLSTAR™ TC Treated Lo-Profile Cell Culture Flasks	Thermo Fisher Scientific
Spritze 5 ml	Braun
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (midi 0,2µm)	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast (4-15%)	Bio-Rad
Zellkulturschale 10cm	Sarstedt

Abfallbeutel	Roth
Erlenmyerkolben (100; 250; 500 ml)	Schott Duran
8-Strip PCR Caps, flat, optically clear	Starlab
Safe Lock Tubes 2 ml, amber	Eppendorf
0,2 ml 8 Twin Strip StarPCR Tube	Starlab
Mikropipette	Hamilton

3.10. Geräte

Tabelle 8: Geräte

Gerät	Firma
Incusafe MCO-20AIC	Panasonic
Heratherm Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Vortex Mixer	neoLab
Vortex Genie 2	Thermo Fisher Scientific
Mini-Zentrifuge	Labnet
Centrifuge 5430	Eppendorf
Multifuge X1	Thermo Fisher Scientific
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific
Megafuge 1.0R	Heraeus
Megafuge 8R	Thermo Fisher Scientific
Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific
Biofuge fresco Zentrifuge	Heraeus
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Pipette (10; 20; 100; 200; 1000µL)	Eppendorf
MSC-Advantage Bench	Thermo Fisher Scientific
AE20 Series Lichtmikroskop	Motic
Veasy Scope Lichtmikroskop	VWR
Counter (manuell)	UPGREEN
Tischkühlschrank (4C; -20C)	Liebherr Comfort
Abzugshaube	Infralab

Ice maker	Hoshizaki
Kühlraum 4C	Viessmann
Beheizbarer Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph
Beheizbarer Magnetrührer MR Hei-End	Heidolph
Feinwaage	Acculab
Grobwaage	Ohaus
Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Pegstar PCR Cycler	Peqlab by VWR
Thermocycler	VWR
NanoDrop™ 2000c	Thermo Fisher Scientific
Infinite® 200 PRO	TECAN
Fusion FX7 Geldetektion	Peqlab by VWR
N90K UV Strahler	Konrad Bender
Probenschüttler 2011	GFL
Probenschüttler 2019	GFL
Vibrax®-VXR	IKA
Rotierender Mixer	Starlab
IX51 Fluoreszenzmikroskop	Olympus
TL4 Fluoreszenzverstärker	Olympus
U-RFL-T	Olympus
Odyssey FC	LI-COR
Milli-Q® Plus Filter	Millipore
MikroLochnapfschalee	Sharp
Moufle	Versilio
JB Aqua 5 Plus	Grant
Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad
Milli-Q® Behälter 5L	Nalgene
Powerpack Basic	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad

Schweißgerät	Severin
Multipette	Eppendorf
41-2025R Agarosegellaufplatte	Peqlab by VWR
40-0708 Agarosegellaufplatte	Peqlab by VWR
Reaktionsgefäß Ständer	TPP
Leica TCS SP5	Leica Microsystems
Opera Phoenix	PerkinElmer
TECAN-Reader Infinite Pro 2000	Tecan Trading AG
Tecan 2019	Tecan Trading AG

3.11. Programme

Tabelle 9: Programme

Programm	Firma
Excel 2010	Microsoft Corporation
Powerpoint 2010	Microsoft Corporation
Graph Pad Prism 6	Graph Pad Prism
Illustrator CS6	Adobe
Photoshop CS6	Adobe
ODYSSEY 5a	Li-Cor
Image Studio Lite Version 4.0	LI-CO
Snapgene®	GSL Biotech
Serial Cloner	Serial Basics
Harmony 4.8	Perkin Elmer
ImageJ	OpenSource
Smart.servier	OpenSource
Columbus	IMB Mainz

4. Methoden

4.1. Molekularbiologie

4.1.1. Klonierung

Um den Leervektor (*empty vector*) mcherry von einem pENTRY-Klon in den pDEST Vektor (Zielvektor) zu klonieren, wurde die *Gateway*-Methode der Firma Invitrogen verwendet. Diese Methode nutzt ein sequenzspezifisches Rekombinationssystem, durch das mit Hilfe von Enzymen DNA in das Genom eines anderen Plasmids überführt werden kann. Über spezifische Sequenzabschnitte, die in Ausgangs- und Ziel-DNA eingebaut sind, kann die DNA eingefügt werden. Der ENTRY-Klon enthielt die attL-Sequenzen, mit denen ich im nächsten Schritt den gewünschten DNA-Abschnitt in den Zielvektor pPB CAG HA DEST ligierte. Der Zielvektor konnte am 5' oder 3'-Ende mit attR-Seiten den gewünschten Genabschnitt tragen. In der *reverse reaction* (LR)-Reaktion werden zwischen den attL1 und attR1, sowie attL2 und attR2 des Zielvektors die attB-Seiten generiert. Um pDEST-Vektor und pENTRY-Klon in der nachfolgenden Transformationsreaktion voneinander zu selektieren, tragen beide eine unterschiedliche Antibiotikaresistenz. Die durchgeführte LR-Reaktion wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

Tabelle 10 Ansatz für LR-Reaktion

Menge	Material
150ng/µl	pENTR3C-mcherry
150ng/µl	pPB CAG HA DEST
2µl	TE-Puffer
2µl	LR-Clonase II

4.1.2. Zuschneiden von Plasmid-DNA: Probeverdau und *Fast-digest*-Probeverdau

Um zirkuläre Plasmide auf ihre Bestandteile überprüfen zu können, linearisierte ich sie enzymatisch. Anhand einer durch das Programm *Serial Cloner* erstellten Enzym- und Plasmidkarte, wählte ich Enzyme aus, die das *Insert* passend aus dem Plasmid ausschnitten. Anschließend wurde eine Mischung bestehend aus nuklease-freiem Wasser, geeignetem Puffer, Enzym (bei zwei Enzymen wurde das Volumen pro

Enzym halbiert) und Plasmid-DNA angesetzt. Dieser Ansatz wurde anschließend bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Die Zeit verdoppelte sich, wenn ich Enzyme ohne *fast digest* FD-Kennung verwendete. Nach erfolgter Inkubation wurde der *Loading dye / Blue Juice* hinzugegeben und ich pipettierte den Ansatz in eine Tasche eines gegossenen Agarosegels.

Material	Volumen in µl
(Fast digest) Buffer	1
(Fast digest) Enzym	1 bzw. 0,5/0,5
Plasmid-DNA (300 µg)	X
Nukleasefreies H₂O	10-X

4.1.3. Agarosegelherstellung, Agarosegel-Elektrophorese und DNA-Detektion

Je nach Plasmid bzw. Bruchstückgröße wurde ein individuell konzentriertes Agarosegel gegossen. Für ein 1 %iges Gel wurden 1 g Agarose / 100 ml TAE-Puffer verwendet. Zum Schluss pipettierte ich die DNA-interkalierende Substanz Midori Green hinzu (je 1 µl pro 50 ml TAE-Puffer). Diese Substanz sorgt dafür, dass die aufgetragene DNA unter UV-Licht Bestrahlung sichtbar wird. Anschließend goss ich das Gel in die Gelelektrophoresekammer, die mit 1x TAE Laufpuffer aufgefüllt wurde. Bei einem kleinen Gel von 40 ml legte ich eine Spannung von 120 V für 30 min an, bei einem größeren Gel von 150 ml betrug die Spannung 160 V für 30 min. Zur Laufkontrolle gab ich 5 µl einer 1 kb Plus DNA *ladder* in eine Geltasche neben die Proben. Da in der Gelmatrix größere DNA-Ketten langsamer voranschreiten als kürzere DNA-Ketten, ist es möglich, eine Größentrennung dieser Fragmente mithilfe des Agarosegels durchzuführen. In einem UV-kompatiblen Gerät wurde das gelaufene Agarosegel ausgelesen. Hierbei wurden die Laufbanden des Probeverdaus mit der 1 kb DNA *ladder* verglichen. Die gewünschte Bruchstückgröße konnte vorher mit dem Programm *Serial Cloner* und einer zugehörigen Plasmidkarte errechnet werden. Unter UV-Bestrahlung erregte ich das DNA-interkalierende *Midori-Green*. Nun wurde mithilfe des *Fusion* (Peqlab by VWR®) ein Bild des Agarosegels aufgezeichnet.

Tabelle 11 TAE Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer 50x	2M Tris-Base
	1M Essigsäure
	0,05M EDTA
	pH = 8

4.1.4. Gelaufreinigung

Nachdem linearisierte DNA-Plasmide oder deren geschnittene Anteile in einem Agarosegel aufgetrennt worden sind, versuchte ich diese so präzise wie möglich mithilfe eines Skalpell unter UV-Licht auszuschneiden. Die DNA wurde anschließend mit dem *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* Gelaufreinigungskit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die isolierte DNA wurde in Nuklease-freiem Wasser gelöst und die DNA-Menge an dem Nanodrop-Gerät ausgemessen.

4.1.5. Ligation

Bei der DNA-Ligation werden zwei DNA-Segmente an ihren Enden verknüpft. Die Reaktion wird über das Enzym Ligase katalysiert. Hierbei entsteht aus dem 3'Hydroxy-Ende mit dem 5'Phosphat-Ende eine Phosphodiesterbindung. Ein 20 µl Ligationsansatz bestand aus Ligase Puffer, T4 Ligase, linearisierter Vektor-DNA (c=50 µg / µl) und Nuklease-freiem Wasser. Dieser Ansatz inkubierte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, erhitze ich den Ansatz nach 60-minütiger Inkubationszeit für 10 Minuten auf 65 °C. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Eis abgekühlt war, wurden jeweils 5 µl in kompetente Bakterien transformiert.

Tabelle 12 20µl Ligationsansatz

Reagenz	Menge in µl
T4 Ligase	1
Ligase Puffer	2
Linearisierte Vektor DNA 300µg	X
Nukleasefreies H₂O	17-X

Total	20
--------------	----

4.1.6. Kompetente Bakterien herstellen

Kompetente Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind, Plasmide durch Transformation aufzunehmen. Es wurden kompetente DH5- α Bakterien des Stammes *Escherichia coli* (E. coli) verwendet.

4.1.7. Hitzeschocktransformation

Um Plasmide in ein kompetentes Bakterium zu transformieren, führte ich eine Hitzeschocktransformation durch. Hierfür wurde als Wirtszelle ein kompetenter E. coli-Bakterienstamm verwendet. Zuerst wurden 100 μ l der DH5 α -E. coli Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 μ l der Plasmidsuspension hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte für eine Minute der Hitzeschock bei 42 °C. Im Anschluss wurden 250 μ l *Salt-optimized broth* (SOC)-Medium hinzugegeben. Dieser Ansatz inkubierte eine Stunde bei 37°C und 300 rpm. Zuletzt wurde die Suspension auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen, die je nach Versuch mit Ampicillin (100 μ g / ml) oder Kanamycin (100 μ g / ml) versetzt war. Das Antibiotikum diente zur Bakterienselektion. Nur die Bakterien, die das Zielplasmid aufnehmen, waren gegen das jeweilig verwendete Antibiotikum resistent und konnten sich in der folgenden 24-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C vermehren.

4.1.8. Bakterienvermehrung durch Über-Nacht-Bakterienkulturen, und anschließende Isolierung der Plasmid-DNA

Am Tag nach der Hitzeschocktransformation wurden gewachsene Bakterienkolonien von der Agarplatte gepickt und in 3 ml (Mini-Variante) oder 200 ml (Maxi-Variante) LB-Amp-Medium (Ampicillinkonzentration 50 μ g / ml) oder LB-Kan-Medium (Kanamycinkonzentration 50 μ g / ml) bei 37°C und 220 rpm über Nacht vermehrt. Danach erfolgte die Plasmid-DNA-Isolierung mit dem *Nucleobond-XTRA Midi/Maxi Plasmid Purification System-Kit* nach Protokoll des Herstellers. Für den Probeverdaulichkeit noch unsequenzierter Plasmid-DNA nach Transformation wurde das *Mini-Kit* verwendet. Um größere Mengen DNA herzustellen, verwendete ich nach erfolgreicher und validierter Sequenzierung die *Maxi-Variante* des Kits. Zur Elution wurde Nuklease-freies Wasser verwendet. Anschließend wurde die isolierte DNA-Konzentration mithilfe des Nanodrop 2000c photometrisch bestimmt.

4.1.9. DNA-Vervielfältigung

Kary Banks Mullis erhielt 1993 zusammen mit Michael Smith den Nobelpreis der Chemie für die Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)(Shampo and Kyle 2002). Hierbei nutzt man eine anfänglich kaum quantifizierbare Menge an DNA, um diese mit Hilfe einiger Reagenzien zu vervielfältigen. Für eine PCR wurden folgende Reagenzien benötigt: Hitzestabile DNA-Polymerase, dNTP der Basen Adenosin, Guanin, Cytosin und Thymin, Dimethylsulfoxid (DMSO), PCR-Puffer, nuklease-freies Wasser, die zu vervielfältigende DNA, forward- und reverse *Primer*. Eine PCR verläuft in Zyklen. Jeder Zyklus entsprach einem bestimmten Ablauf, den ich vorher am PCR-Cycler programmierte. Für die PCR wurde ein *Thermocycler* gewählt, bei dem initial 30 Sekunden (in den folgenden Zyklen 10 Sekunden) auf 98°C erhitzt wurde, um die DNA Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen zu trennen. Diese Denaturierungsphase stellte sicher, dass die beiden DNA-Stränge getrennt voneinander vorlagen. Anschließend folgte die Primärhybridisierung. Dafür wurde für 30 Sekunden eine Temperatur gewählt, bei der die hergestellten Primer am besten an ihre komplementären Basen auf dem DNA-Strang binden konnten. Je nach Basenzusammensetzung der Primer wurde eine individuell angepasste Temperatur gewählt. Im nächsten Schritt folgte die Elongationsphase, in der die thermostabilen DNA-Polymerasen bei 72°C für 30 Sekunden vom 3'-Ende zum 5'-Endekomplementäre Nukleoside verknüpften und damit einen komplementären DNA-Strang synthetisierten. Diese drei Phasen eines Zyklus wurden 25 Mal wiederholt, um eine ausreichende Menge DNA herzustellen. Das fertige PCR-Produkt wurde anschließend bei 4°C gelagert.

4.1.10. Sanger-Sequenzierung

Um die DNA auf korrekte Basenabfolge innerhalb der Plasmid-DNA zu überprüfen, wurden die Plasmide zu der Firma *GATC Biotech AG* geschickt und via Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Die verschiedenen Proben wurden mit 30 µl Volumen und einer Konzentration von 30-100 ng / µl eingereicht. Um Plasmide im pENTR-Klon oder pPB CAG HA DEST auf korrekte Basenfolge überprüfen zu lassen, wurde zur Sequenzierung der GATC-mcherrySTIM1Primer-1385105 mit der Basensequenz CGCCTACAACGTCAACATC benutzt.

4.1.11. Zielgerichtete Punktmutation

Um eine STIM1-Doppelmutante herzustellen, deren Cystin (C) an Stelle 49 und 56 durch ein Methionin (M) ersetzt werden sollte, benutzte ich das Q5R Site-Directed Mutagenesis Kit Protocol (E0554);. Als Vorlage diente das pENTR5c-STIM1 C56M mcherry Plasmid. Mithilfe zweier Primer wurde die C49M Punktmutation eingeführt. Dabei wurde die Aminosäure Cystin an Stelle 49 durch ein Methionin, das in einen Primer eingebaut war, ersetzt. Anschließend wurde nach dem Q5 Mutagenesis Protokoll eine PCR durchgeführt. Darauf folgte ein Agarosegel mit Bandendetektion und anschließender Gelaufreinigung mithilfe des *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit*. Die nun isolierte und linearisierte DNA wurde nach Vorlage des Q5 Mutagenesis Kit Protokoll zirkularisiert. Dafür wurde 1 µl PCR-Produkt, 5 µl 2x KLD Reaction buffer, 1 µl 10x KLD Enzyme Mix und 3 µl nuklease-freies Wasser miteinander resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde im Folgenden durch ein Hitzeschockprotokoll in kompetente Bakterien überführt.

Tabelle 13 PCR-Ansatz zur Vervielfältigung des pENTR5b STIM1 C49M C56M mcherry Plasmids

Reagenzien	Volumen in µl
Hot Start High Fidelity 2x Master Mix	25
10µM STIM1 C49M Forward Primer	2,5
10µM STIM1 C49M Backward Primer	2,5
50ng pPB CAG HA DEST STIM1 C56M mcherry	X
Nukleasefreies Wasser	50-X

Tabelle 14 PCR-Protokoll der pENTR5b STIM1 C49M C56M mcherry Vervielfältigung

Arbeitsschritt	Zeit in sek	Temperatur in C°
Initiale Denaturierung	30	98
Zyklische Denaturierung (25x)	10	98
Primer-DNA-Bindung (annealing; 25x)	30	50
Verlängerung entlang des komplementären	195	72

Basenstrangs (Primer-Extension; 25x)		
Finale Extension	120	72
Lagerung	∞	4

Tabelle 15 Ligationsansatz des PCR-Produkts

Reagenz	Volumen in μl
PCR-Produkt	1 μ l
2x KLD Reaction Buffer	5
10x KLD Enzyme Mix	1
Nukleasefreies Wasser	3

4.1.12. Gewinnung von genomischer DNA

Genomische DNA (gDNA) ist die Zell-DNA, die im Zellkern integriert ist. Um zu überprüfen, ob die transfizierte Plasmid-DNA auch wirklich in das Genom integriert worden ist und nicht nur im Zytosol vorliegt, verwendete ich das *Quick-gDNA™ MiniPrep Kit*. Zuerst wurden pro Zelllinie 2.000.000 Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur für 5min bei 500x G nach Vorgaben des Kits zentrifugiert. Anschließend wurde nach Protokoll des *Gel DNA Recovery Kit* die gDNA aufgereinigt und die darin enthaltene DNA isoliert. Zuletzt wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Tabelle 16 50 μ l PCR-Ansatz aus GDNA der stabil transfizierten MEF-Zelllinien

Reagenzien	Volumen in μl
5x Herculase II Reaction Buffer	10
dNTP Mix 100 mM	0,5
Primer forward	2
Primer reverse	2
Herculase II Fusion	0,5
DMSO	2
GDNA 300 ng	X
Nukleasefreies Wasser	33 – X

Tabelle 17 PCR Protokoll der gDNA Amplifikation

Arbeitsschritt	Zeit in sek	Temperatur in C°
Initiale Denaturierung	120	98
Zyklische Denaturierung (25x)	20	98
Primer-DNA-Bindung (annealing; 25x)	20	51
Verlängerung entlang des komplementären Basenstrangs (Primer-Extension; 25x)	30	72
Finale Extension	180	72
Lagerung	∞	4

4.2. Zellbiologie

4.2.1. Splitting, Passagieren, Zellzahlbestimmung

Das Medium in den Zellkulturschalen mit adhärennten MEF-Zellen wurde vorsichtig abgesaugt. Für den Waschschrift wurden 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in die Zellkulturschalen pipettiert und anschließend wieder abgesaugt. Durch diesen Spülvorgang wurde der Großteil des verbliebenen Mediums mit dem fötalen Kälberserum (FCS) aus den Zellschalen entfernt. Anschließend wurde jeweils 1 ml 0,05 %- Trypsin-EDTA hinzugegeben, welches die adhärennten MEF-Zellen von der Platte löste. Nun wurden 9 ml DMEM-Medium hinzugegeben, um die Trypsinreaktion abzustoppen. Um eine gewisse Anzahl an Zellen auszusäen, wurden diese im Luna *Cellcounter* ausgezählt. Das berechnete Volumen Zellsuspension und frisches DMEM Medium wurde in eine neue Zellkulturschale gegeben, sodass es ein Gesamtvolumen von 10 ml ergab. Die Zellen wurden weiter inkubiert.

4.2.2. Kryokonservierung

Um Zellen längerfristig zu lagern, fror ich diese bei -80 °C ein. Dies nennt man Kryokonservierung. Hierbei wurden die Zellen zunächst vermehrt, bevor das Medium der Zellen abgesaugt wurde, die Zellen mit PBS gewaschen, 1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA hinzugegeben und mit DMEM-Medium ergänzt wurde. Die Zellsuspensionen

mehrerer Platten der gleichen Zelllinie wurden nun in einem 50 ml Falcon *gepoolt* und in einer Zentrifuge 3 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen in Kryomedium (90 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Das DMSO verhindert hierbei eine schnelle Kristallisation der Lösung während des Abkühlungsprozesses. Jeweils 1 ml der Suspensionslösung wurde nun in beschriftete Kryoröhrchen pipettiert. Zuletzt wurden die Röhrchen in einer Einfrierbox aus Styropor verpackt, damit der Abkühlungsvorgang auf 1 °C pro Minute entschleunigt wurde. Die Box wurde nun in einer -80 °C Tiefkühltruhe verstaut. Am nächsten Tag konnten die Röhrchen aus der kälteisolierenden Box herausgeholt und bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff längerfristig gelagert werden.

4.2.3. Inkulturnahme, Auftauungsprozess

DMEM-Medium wurde auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen aus dem -80 °C Gefrierschrank geholt und in einem auf 37 °C erwärmten Wasserbad bis zum Auftauen geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen zu 20 ml erwärmten DMEM-Medium gegeben und inkubiert. Dies war wichtig, damit das zelltoxische DMSO der Zellsuspension ausreichend verdünnt wurde.

4.2.4. Zellfixierung durch Paraformaldehyd

Um eine Momentaufnahme der Zellen nach Behandlung zu generieren, wurden die Zellreihen bei einigen Versuchen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Hierfür wurden 1×10^5 Zellen pro Lochnapf in einer *6-Lochnapfschale* auf einem 10 mm Deckglas ausplattiert. Nach einem Tag Inkubationszeit waren die MEF -Zellen adhärent und es wurde eine Transfektion durchgeführt. Am nächsten Tag entfernte ich das Medium und wusch 3 Mal mit 5 ml PBS. Im nächsten Schritt wurde vorsichtig 2 ml 4 %-iges Paraformaldehyd hinzugegeben. Anschließend inkubierten die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit spülte ich die 6-Lochnapfschalen noch 3 Mal mit 5 ml PBS, um das PFA zu entfernen und lagerte die fixierten Zellen zuletzt in PBS. Dort wurden die fixierten Zellen auf Deckgläschen des Glas-Objektträgers gewendet, die für die TIRF-Mikroskopie benutzt wurden.

4.2.5. Zellzahlbestimmung automatisch

Die Zellzahl der MEF-Zellen wurde unter Zuhilfenahme des *LUNA™ Automated Cell Counter* (Logos) errechnet. Hierfür wurden die dafür bereitgestellten LUNA-

Zellobjektträger und Trypanblau verwendet. Da die lebenden Zellen eine intakte Zellmembran besitzen, konnte der Farbstoff nicht penetrieren und sie blieben ungefärbt. 10 µl einer Suspension aus 10 µl Zellgemisch und 10 µl Trypanblau wurde in die LUNA Zellobjektträger pipettiert und im Logos gemessen.

4.2.6. Zellzahlbestimmung manuell

Die Zellzahl wurde manuell in der Neubauerkammer bestimmt. Die Neubauerkammer besitzt ein Kreuz mit neun Großquadranten. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die vier zentralen Eckquadrate verwendet. Damit die Zellzahl von lebenden Zellen bestimmt werden konnte, musste ein kleiner Teil der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau verdünnt werden. 10 µl der Trypanblau-Mixtur wurden in die Neubauerkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop mithilfe eines Zellzahlklickers gezählt. Zuletzt konnte die Menge der Zellen in Suspension hochgerechnet werden:

$c \text{ (Zellen/ ml)} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times 10.000 = \text{Kammerformel} / (\text{Anzahl der Quadrate} \times \text{Verdünnung})$

4.2.7. Transiente und stabile Transfektion

Um fremde DNA in eukaryotische Zellen einzubringen und dort zu verankern, wurde ein Transfektionsprotokoll mit dem Reagenz *Attractene* (Qiagen) angewendet. In einer weiteren stabilen Transfektion verwendete ich das Reagenz Turbofectin (Origene). *Attractene* sind ein nicht liposomales, positiv geladenes Peptid, welches in Lösung an die negativ geladene DNA bindet und einen Komplex bildet. Diesem Komplex ist es möglich, durch Mizellenbildung in das Zytosol zu gelangen. Als Protokollvorlage diente das mitgelieferte Protokoll der Firma Qiagen. Einen Tag vor der Transfektion wurden auf einer 6-Lochnapfschale je 200.000 MEF STIM1-/- Zellen pro Lochnapf ausplattiert. Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Am Tag der Transfektion wurden zur Herstellung stabiler Zelllinien 100 µl Opti-Mem® (1x)-Medium mit jeweils 1 µg Plasmid-DNA der Plasmide versetzt:

Im nächsten Schritt wurde für eine stabile Transfektion 1 µl hy-pBase-Vektor hinzugegeben, um die Plasmid-DNA dauerhaft im Genom der Zelllinien zu verankern. Dann wurde der Ansatz durch Zugabe von 4,8 µl *Attractene* ergänzt, erneut für ein paar Sekunden vermischt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das MEF-Zellmedium erneuert. Im letzten Schritt

wurde der Ansatz auf den jeweiligen Lochnapf getropft, anschließend geschwenkt und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Im Falle einiger Experimente wurde auf die bereits erfolgreich stabil transfizierten Zelllinien transient noch pE hOrai1 YFP (N-Terminal) transfiziert. Bei transienter Transfektion wurde auf hy-pBASE-verzichtet.

Tabelle 18 stabile Transfektion mit Attractene

Material	Volumen in µl
Opti-Mem® (1x) Medium	100
Plasmid-DNA 1 µg/µl	2
pBase 1 µg/µl	1
Attractene	4,8

Material	Volumen in µl
Opti-Mem® (1x) Medium	100
Plasmid-DNA 1 µg/µl	3
pBase 1 µg/µl	1,5
Turbofectin	9

4.2.8. FACS-Zellensortierung (FACS-Sorting)

Nach erfolgreicher Transfektion wurden die Zellen am Institut für molekulare Biologie (IMB) in Mainz sortiert, um die transfizierten Zellen anzureichern. Dabei wurden die Zellen vor dem Sorting mit 0,05 % Trypsin EDTA in Lösung gebracht, anschließend für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte das Sortieren der Zellen mit der *FACS-Sorting*-Maschine gegeben. Durch eine Saugkapillare wurden die Zellen hochfrequent von einem Laser photometrisch sortiert. Anschließend wurden die mcherry-positiven Tropfen in ein neues Falcon überführt. Danach wurden die sortierten Zellen ein zweites Mal für 3 min bei 1300 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes DMEM Medium in einer Zellkulturschale inkubiert. Dieses Protokoll wurde, nachdem sich eine ausreichende Zellpopulation gebildet hatte, wiederholt. Nachdem eine ausreichende mcherry-positive Populationsdichte von >85 % erreicht wurde, wurde die transfizierte Zelllinie für alle weiteren Experimente verwendet. Für die Einstellung der Laser wurde bei dem transfizierten

Fluoreszenzprotein mcherry der FACS-Laser PE-TexasRed mit einer Wellenlänge von 561 nm und im Falle von transfiziertem YFP-Fluoreszenzprotein der SSC Laser mit einer Fluoreszenz von 488 nm verwendet.

4.3. Mikroskopie

4.3.1. Interne Totalfluoreszenzmikroskopie

Der Vorteil eines Totalfluoreszenzmikroskops (TIRF)-Lichtmikroskops liegt darin, dass ein anregender Laserstrahl die fokussierte Zelle nicht vollständig durchdringt, sondern an einem Prisma totalreflektiert wird. Dadurch wird ermöglicht, dass nur die sehr basalen Anteile der Zelle durch Fluoreszenz angeregt werden und die unerwünschte Eigenfluoreszenz weiter höher gelegener Zellebenen nicht erfasst wird. Die Eindringtiefe kann mechanisch verändert werden, indem ich, zum Beispiel für eine geringere Eindringtiefe, den Einstrahlwinkel des Lasers abflacht. Befinden sich also in einem Abstand von 50-200 nm unter dem Glas fluoreszierende Moleküle, können diese erfasst werden. Dadurch wird es ermöglicht, die Fluoreszenz zu detektieren, die auf oder knapp unter der Zellmembran liegt, während in der Z-Achse unerwünschte tiefer liegende Fluoreszenzen ausgeblendet werden.

Die MEF-Zellen wurden für 10 Minuten mit 2 μM Thapsigargin und 20 Minuten mit 100 μM H_2O_2 inkubiert. Anschließend wurden sie mit Formaldehyd fixiert.

Das Fluoreszenzprotein mcherry mit einer Exzitation von 587 nm und einer Emission von 610 nm wurde durch einen mcherry-Laser angeregt. Der Winkel des TIRF-Mikroskops wurde so eingestellt, dass nur innerhalb von 50 nm unterhalb der Glasplatte Fluoreszenz detektiert werden konnte. Ein aufgenommenes Bild ist mit 51 μm in Breite und Höhe und 512 x 512 Voxel aufgenommen.

4.3.2. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden alle MEF-Zellreihen zu je 2000 Zellen/Well in einer schwarzen 96 Wellplatte mit transparentem Boden ausplattiert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit dem Farbstoff Hoechst (1:1000) in Nähmedium für 10 Minuten inkubiert. Das Opera Phoenix™ Mikroskop wurde auf 37 °C erwärmt und mit 5 % CO_2 inkubiert. Es wurde ein mcherry-sensitiver Laser (Exzitation 561 nm, Emission 599 nm) ausgewählt. Die durch Hoechst angefärbten Zellkerne wurden mit dem DAPI-Laser (Exzitation 405 nm, Emission 456 nm) angeregt. Vor der Messung wurden die Zellen in einem

modifiziertem HBSS Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten in 2 μM Thapsigargin und für 20 Minuten in 100 μM H_2O_2 inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Zur Auswertung wurde das *Columbus* Programm verwendet. Mithilfe des Programmes konnten die Zellen in ein unterschiedliches mcherry-Verteilungsmuster unterteilt werden. Es wurden mcherry-Punctae ein retikuläres mcherry-Verteilungsmuster und ein flächig-gleichmäßiges Verteilungsmuster unterschieden.

4.4. Proteinbiochemie

4.4.1. Proteinisolation

Um die Proteinkonzentration der behandelten Zelllinien für den nachfolgenden Westernblot zu bestimmen, mussten die Zellproteine im ersten Schritt von den übrigen Zellbestandteilen wie Zellmembran, DNA etc. isoliert werden. Dafür wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 120 μl – max. 300 μl *Radioimmunoprecipitation assay* (RIPA) – Puffer in die Zellkulturschale gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die adhärenenten Zellen von der Platte gelöst. Die RIPA-Zellen-Lösung überführte ich in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Im nächsten Schritt zentrifugierte ich bei 21100x g für 30 min bei 4 °C. Der proteinreiche Überstand wurde in neu beschriftetes Reaktionsgefäß überführt.

4.4.2. Proteinquantifizierung via BCA-Assay

Um den Proteingehalt in der RIPA-Zell-Lösung zu quantifizieren, verwendete ich den Bicinchoninsäure (BC)-Test des *BC Assay Protein Quantification Kits* (Interchim) nach Herstellerangaben. Hierbei bilden Cu^{2+} -Ionen mit den Proteinen der Lösung einen Komplex, der photometrisch detektiert werden kann. Um die Proteinkonzentration zu quantifizieren, wurden verschiedene Konzentrationen einer Rinderserumalbumin (BSA)-Messreihe (0; 6, 25; 12,5; 25; 50; 100 und 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$) mit 15 μl pro Lochnapfschale in eine 96-Lochnapfschalenplatte als Triplet angesetzt. Anschließend verdünnte ich die Zelllysate 1:10 und gab 15 μl in dreifacher Ausführung in neue Lochnäpfe hinzu. Im nächsten Schritt gab ich 200 μl einer BC-Reagenz-Mixtur, bestehend aus Reagenz A und B im Verhältnis 1:50 in die vorher behandelten Lochnapfschalen hinzu. Anschließend folgte eine 30 Minütige Inkubation bei 37 °C. Zuletzt wurde der Assay photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm im Infinite®

200 PRO (Tecan) gemessen. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen via Excel (Microsoft) ausgewertet.

4.4.3. Proteineselektion via SDS-Page

Die von Ulrich K. Laemmli entwickelte Methode eines diskontinuierlichen elektrophoretischen Systems ermöglichte es erstmalig, Proteine zwischen 5 und 250 kDa gut zu trennen (Cleveland et al. 1977). Um die nun quantifizierte Proteinkonzentration nach ihrer Größe aufzutrennen, verwendete ich die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei macht man sich die elektrische Ladung der Proteine zu nutze. Da kleinere Proteine aufgrund der geringeren Eigenladung und dadurch geringerer Bindung an das hinzugegebene SDS die Gelmatrix schneller als größere Proteine durchlaufen können, ist es möglich, die Proteine anhand ihres Gewichtes/ihrer Größe) auf einer *SDS-Page* aufzutrennen. Nachdem die Proteinproben in RIPA-Puffer für 30 min bei 21100 g zentrifugiert wurden, wurde der Überstand in ein neu beschriftetes Reaktionsgefäß überführt und das Pallet verworfen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit Überstand bei 95 °C für 5 Minuten inkubiert. Den durch das BC-Assay vorbereiteten Zelllysaten wurde ein 5-facher Probenpuffer hinzugegeben und nach Hitzedenaturierung überführte ich selbige Lysate in die vertikale Gelelektrophoresekammer, in die vorher das Gradientengel eingespannt worden ist und mit 1x SDS-Ladepuffer aufgefüllt wurde. Für das Gradientengel wurde ein 4-15 % oder ein 4-20 % *Mini PROTEAN Membran Stain Free Gel* (Bio-Rad) benutzt. Um die Größe der Proteine zu bestimmen, befüllte ich eine Tasche des Gradientengels mit 5 µl eines Molekulargewichtsstandards (Chameleon Duo). Anschließend ließ ich für 16 min eine Spannung von 300 V durch die Gelelektrophoresekammer laufen.

Name	Zusammensetzung
5x Probenpuffer	20 mg Bromphenolblau
	10 ml mit Milli-Q-H ₂ O
	20 mg Bromphenolblau
	0,77 g DTT
	1 g SDS
	20 ml Glycerol

4.4.4. Proteindetektion via Western-Blot und Immunodetektion

Um die nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, müssen diese in einem ersten Schritt auf eine neue Membran übertragen werden. In einem zweiten Schritt folgt die Detektion der Proteine über einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym gekoppelten Sekundärantikörper. Dieser bindet an einen Primärantikörper, der wiederum spezifisch an das Zielprotein binden konnte. Während des *Western Blots* wurden die im Gel gebundenen Proteine in einer Kammer des Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 3%-iger Milchpulverlösung in PBS-T inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit Primärantikörpern, die an ihr Antigen (STIM1, STIM2, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder Aktin) spezifisch gebunden haben über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % PBS-T der Sekundärantikörper (Anti-Mouse 680/800 nm, Rabbit 680/800 nm) hinzugegeben. Dieser inkubierte für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurde mittels ODYSSEYs die Emission der verwendeten Sekundärantikörper detektiert und mit der zugehörigen Software ausgewertet.

Tabelle 19 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung
Anti-Actin	Maus	1:4000
Anti GAPDH	Kaninchen	1:3000
Anti-STIM1/GOK	Maus	1:1000
Anti STIM2	Kaninchen	1:750

Tabelle 20 Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung
Anti-Mouse IgG 800	Ziege	1:10000
Anti-Mouse IgG 680	Ziege	1:10000
Anti-Rabbit IgG 800	Ziege	1:10000
Anti-Rabbit IgG 680	Ziege	1:10000

Tabelle 21 PBS-T Puffer

Puffer	Bestandteile
10x PBS-T, pH=7,4	2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
	2 g Kaliumchlorid (KCl)
	11,5 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)
	80 g Natriumchlorid (NaCl)
	5 ml Tween 20
	ad 1 L mit Milli-Q-H ₂ O

4.5. SOCE Induktion und Fluoreszenzdetektion

Um intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderungen in den MEF-Zellen mit den STIM1-mcherry Varianten zu detektieren, verwendete ich einen fluoreszierenden Kalziumkomplexbildner und bestimmte die Fluoreszenz photometrisch. Hierfür benutzte ich den Farbstoff *CalciFluor*[™]-(Fluo-2MA; Fluo-8). Zwei Tage vor der Messung wurden auf einer 96 Lochnapfschalenplatte (Greiner 96Black Flat) 2000 Zellen ausgesät. Die Zellen inkubierten für zwei Tage in 100 µl DMEM Medium im Inkubator. Am Tag der Messung wurde das DMEM Medium durch 100 µl Extrazellulärmedium (EZ-Medium mit 1 mM Kalzium, Zusammensetzung s.u.) und 5 µM Fluo8 ersetzt. Dieses inkubierte anschließend für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Dieses wurde anschließend abgesaugt und durch EZ-Medium (mit 1 mM Kalzium ersetzt), welches mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und je nach Versuchsansatz mit 100µM H₂O₂ versetzt wurde. Anschließend wurde das Medium angesetzt, mit EZ-Medium (mit 1 mM Kalzium) gespült und anschließend mit 100 µl EZ-Medium (mit 1 mM EGTA) ersetzt. Die Platte wurde anschließend in dem Infinite200Pro (Tecan)

ausgemessen. Es wurde ein Fluo-8 sensitiver Laser (Exzitation 490 nm, Emission 520 nm) und ein sensitiver DAPI Laser (Exzitation 340 nm, Emission 450 nm) verwendet. Während der Messung wurden nach 2 Minuten 50 µl Extrazellularpuffer (mit 1 mM EGTA) und 6µM Thapsigargin (die Endkonzentration in der Lösung betrug somit 2 µM), sowie zur Kontrolle 50 µl Extrazellularpuffer (mit 1 mM EGTA) ohne Thapsigargin injiziert. Nach weiteren 8 Minuten wurden 50 µl Extrazellularpuffer (mit 8 mM Ca²⁺) injiziert. Die Endkonzentration des Kalziums in der Lösung betrug 2 mM. Die Ergebnisse wurden anschließend mithilfe der Programme Excel 2010 und Graph Pad Prism 6 ausgewertet. Das Vorbild für diesen Versuchsaufbau waren die Kalziumversuche aus (Prins et al. 2011).

Puffer	Zusammensetzung
EZ-Medium mit Kalzium	130 mM NaCl
	4,6 mM KCl
	2 mM MgCl ₂
	10 mM Hepes pH 7.4
	5 mM D-Glucose
	1 mM CaCl ₂ / 8 mM CaCl ₂

Puffer	Zusammensetzung
EZ-Medium mit EGTA	130 mM NaCl
	4,6 mM KCl
	2 mM MgCl ₂
	10 mM Hepes pH 7.4
	5 mM D-Glucose
	1 mM EGTA

5. Ergebnisse

5.1. Herstellung von STIM1 Plasmiden

Um meine Experimente durchzuführen, stellte ich stabil transfizierte Zellreihen her. Dazu klonierte und mutierte ich das Plasmid wie in den folgenden Kapiteln beschrieben.

5.1.1. Herstellung eines Doppelmutanten durch zielgerichtete Punktmutation

Zur Einführung der Punktmutation am Cystein 49 von STIM1 wurde das *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* Protokoll verwendet. Mit den beiden Primern STIM C49M *forward* und *backward* führte ich eine PCR am *Template*, dem pENTR5b STIM1 C56M mcherry Plasmid mit einer Länge von 6352 bp, nach Herstellerangaben durch. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese ausgeführt.

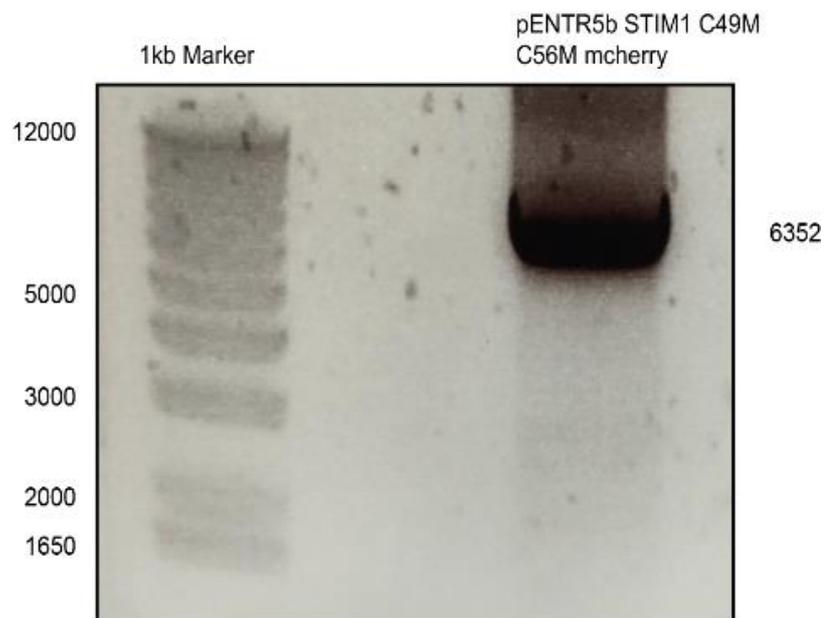


Abbildung 11: PCR der neu eingefügten Punktmutation. Agarosegel nach PCR mit einer deutlichen Bandenbildung, die der Länge des pENTR5b mit 6352 Bp entspricht.

Anschließend reinigte ich die DNA auf und isolierte die neu synthetisierte DNA. Als nächstes ligierte ich das Plasmid und transformierte es in kompetente Bakterien. Erfolgreich transformierte Bakterien wuchsen im Brutschrank zu Kolonien an. Einzelne Kolonien wurden von mir isoliert und in einem Inkubator vermehrt. Im nächsten Schritt reinigte ich die pENTR5b C49M C56M mcherry Plasmide auf. Ein von mir im

Anschluss durchgeführter Probeverdau und Gellauf zeigte, dass das Plasmid erfolgreich vermehrt wurde. Die verwendeten Schneideenzyme sowie die dabei resultierenden Plasmidlängen wählte ich mithilfe des Programms Serial Cloner aus.

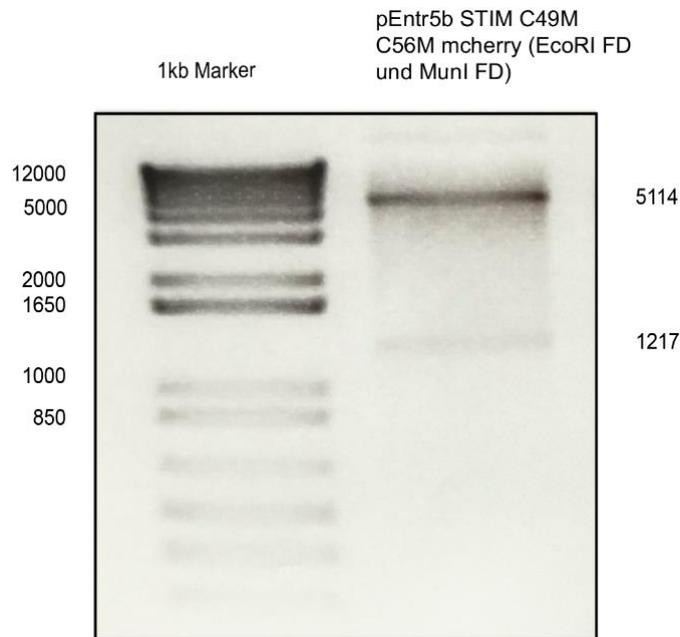


Abbildung 12: Probeverdau des Doppelmutationsplasmids. Mithilfe der Enzyme EcoR₁ und Mun₁ wurde das aufgereinigte pENTR5b C49M C56M mcherry Plasmid verdaut. Es resultierten zwei deutliche Banden in passender Höhe bei 5114 Bp sowie 1217 Bp. Zum Größenvergleich diente die 1 Kb Plus DNA Ladder.

5.1.2. Sanger-Sequenzierung des pENTR5b-C49M-C56M-mcherry Plasmids

Zuletzt war es erforderlich, dass ich die nun vorliegenden Plasmide validierte, indem ich ihre Basensequenz kontrollierte. Dies geschah mithilfe der durch GATC-Biotech angebotenen Sanger-Sequenzierung. Ich wählte einen Primer aus, der in der mcherry-Sequenz komplementär gebunden hat, ca. 200 Basenpaare vor der eingefügten Mutation im STIM1 befindlich. Hierfür verwendete ich den STIM1 Sequenzierungsprimer.

Nach erfolgreicher Überprüfung des Ergebnisses der Sanger-Sequenzierung rekombinierte ich das Insert mittels Gateway in einen geeigneten Zielvektor.

5.1.3. Klonierung des pENTR-Insert in DEST-Vektor

Zusätzlich zur Klonierung des von mir erfolgreich amplifizierten pENTR5b STIM1 C49M C56M mcherry klonierte ich auch die Plasmide pENTR5b STIM1 WT mcherry, pENTR5b STIM1 C49M mcherry, pENTR5b STIM1 C56M mcherry und pENTR3c mcherry („Emptyvektor“) in den Zielvektor pPB CAG HA DEST.

Mithilfe des Programmes Serial Cloner wählte ich geeignete Enzyme aus, die aus dem pENTR-Klon das Insert herausschnitten. Für den Zuschnitt der pENTR5b STIM1 WT / C49M / C56M / DM Plasmide verwendete ich die Restriktionsenzyme Sall FD und AvrII. Für den Zuschnitt des pPB CAG HA DEST wurden die Enzyme AvrII und XhoI verwendet. Den Probeverlauf trug ich auf ein Agarosegel auf und führte anschließend eine Gelelektrophorese durch.

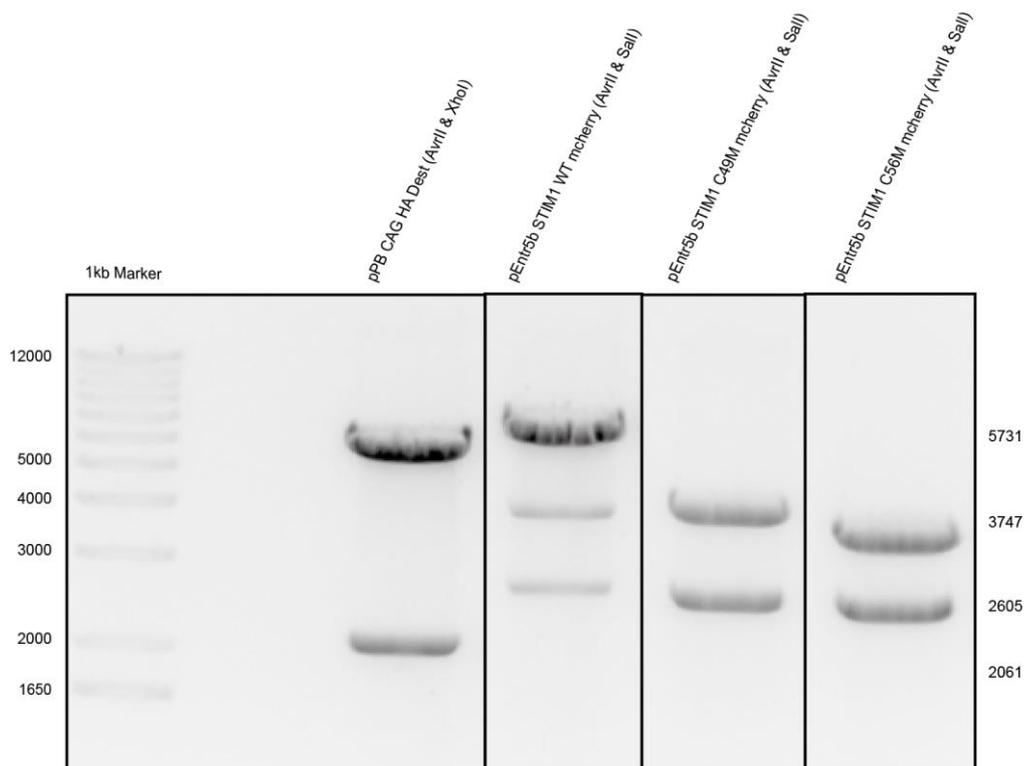


Abbildung 13: Überführung der pENTR-Plasmide in den DEST-Vektor (A). Der Zielvektor pPB CAG HA DEST wurde mit den Enzymen AvrII und XhoI geschnitten. Die resultierenden Bandengrößen sind auf Höhe von 5731 Bp und 2061 Bp. Die pENTR5b STIM1 WT mcherry / STIM1 C49M mcherry / STIM1 C56M mcherry-Plasmide wurden mit Sall FD und AvrII geschnitten. Die resultierenden Bandengrößen liegen bei 3747 Bp und 2605 Bp. Es wurde ein 1 kB DNA-ladder verwendet.

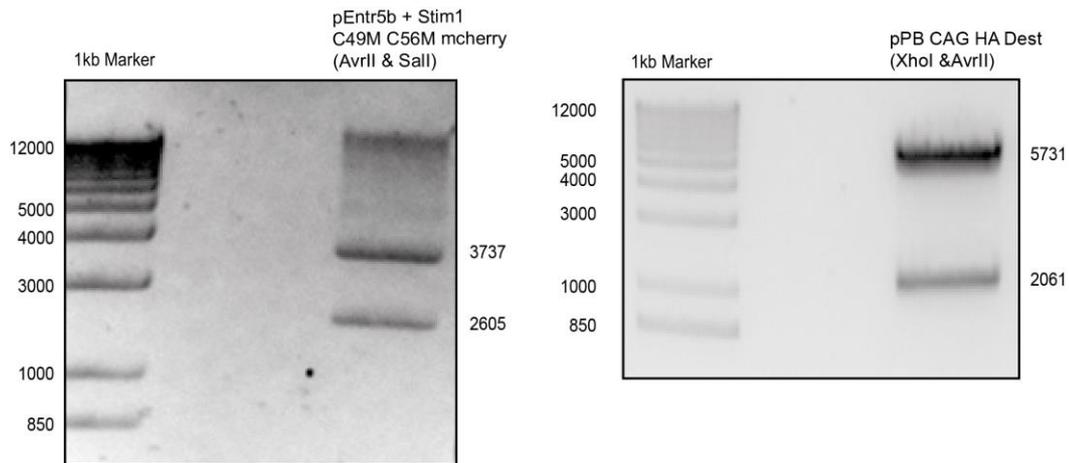


Abbildung 14: Überführung des pENTR-Inserts in DEST-Vektor (B). Der Zielvektor pPB CAG HA DEST wurde mit den Enzymen AvrII und XhoI geschnitten. Die resultierenden Bandengrößen sind auf Höhe von 5731 Bp und 2061Bp. Das pENTR5b STIM1 C49M C56M mcherry Plasmid wurde mit Sall FD und AvrII geschnitten. Die resultierenden Bandengrößen liegen bei 3737 Bp und 2605 Bp. Es wurde 1kB DNA ladder verwendet.

Als Nächstes reinigte ich die benötigten Plasmidanteile auf Bandenhöhe 5747 Bp und 3747 Bp auf. Anschließend ligierte ich den geschnittenen pPB CAG HA DEST-Zielvektor mit den STIM1-Plasmidvarianten. Parallel hierzu klonierte ich den pENTR3c mcherry-Leervektor in den Zielvektor pPB CAG HA Dest. Im nächsten Schritt transformierte ich die rekombinierten Zielvektoren in kompetente Bakterien. Danach isolierte ich die erfolgreich transformierten Bakterien und vermehrte sie in Übernachtskulturen. Anschließend isolierte ich die Bakterien-DNA und überprüfte mit einem Probeverdau, ob die rekombinierten Zielvektoren vermehrt wurden:

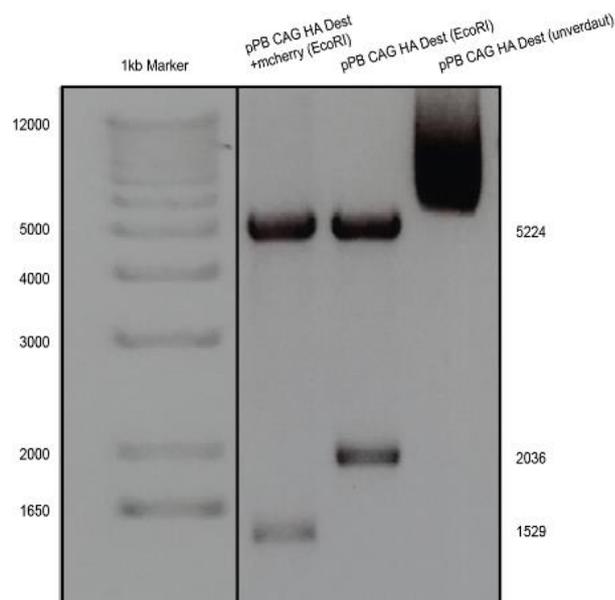


Abbildung 15: Probeverdau des EV im DEST-Vektor (A). Der Leervektor mcherry wurde erfolgreich in den Zielvektor pPB CAG HA DEST kloniert. pPB CAG HA DEST mcherry zeigt bei EcoRI Verdau passende Banden in Höhe von 5224 Bp und 1529 Bp. Im Kontrast dazu zeigt der unklonierte Zielvektor pPB CAG HA DEST ohne mcherry bei EcoRI Verdau Banden in Höhe von 5224 Bp und 2036 Bp. Zur Kontrolle wurde ein unverdauter Zielvektor hinzugegeben, der keine weitere Bande aufzeigt.

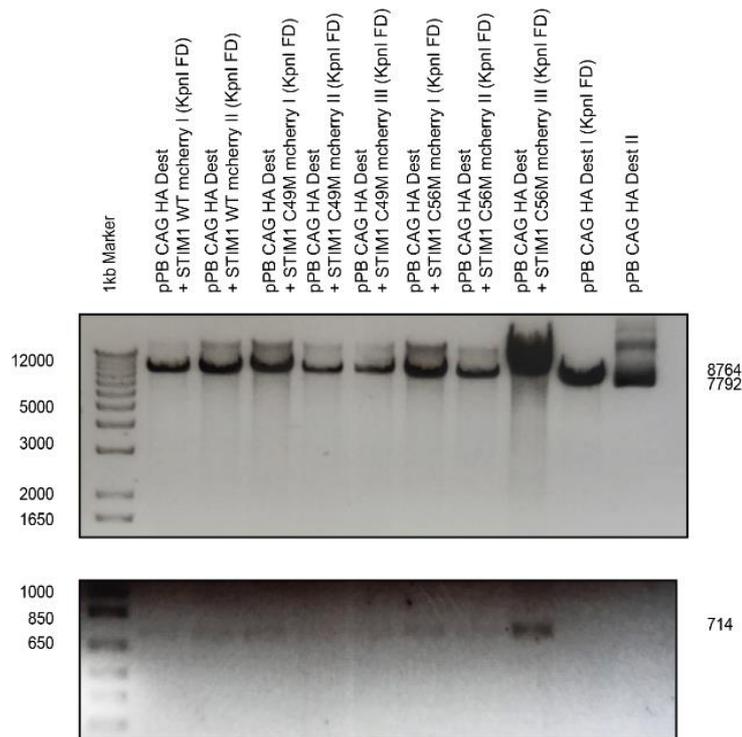


Abbildung 16: Probeverdau des STIM1 WT / C49M / C56M im DEST-Vektor (B). STIM1 WT mcherry, STIM1 C49M mcherry und Stim1 C56M mcherry; wurden erfolgreich in den Zielvektor pPB CAG HA DEST ligiert. Es zeigt sich nach KpnI FD Verdau eine Bande in zu erwartender Höhe von 714 Bp. Zur Positivkontrolle wurde pPB CAG HA DEST ohne *Insert* verdaut. Zur Negativkontrolle wurde pPB CAG HA DEST ohne Enzymverdau aufgetragen.

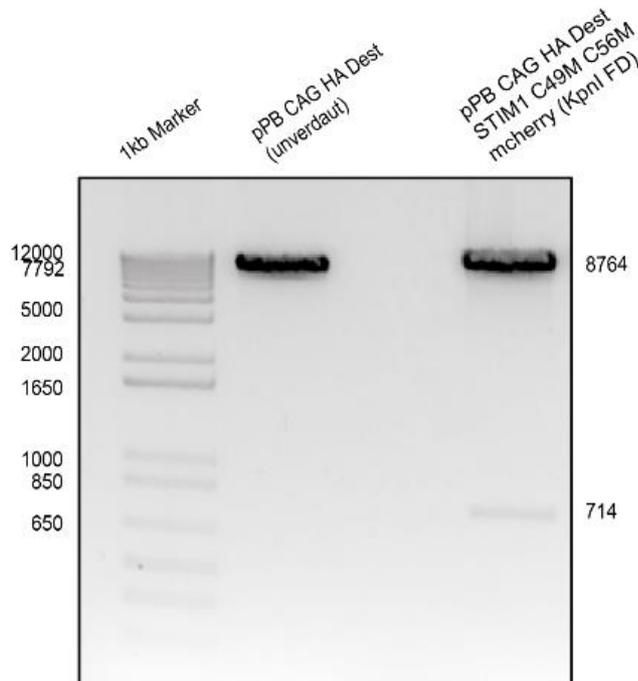


Abbildung 17: Probeverdau des C49MC56M im DEST-Vektor (C). Das *Insert* Stim1 WT mcherry C49M C56M wurde erfolgreich in den Zielvektor pPB CAG HA DEST ligiert. Es zeigt sich nach KpnI FD Verdau eine Bande in zu erwartender Höhe von 714 Bp. Zur Negativkontrolle wurde pPB CAG HA DEST ohne Verdau aufgetragen.

5.2. Herstellung stabil transfizierter MEF STIM1 -/- Zellreihen

Nachdem ich meine hergestellten Plasmide in ihrer Basensequenz via Sanger-Sequenzierung kontrolliert hatte, transfizierte ich diese in embryonale Mausfibroblasten. Hierfür verwendete ich MEF STIM1 -/- Zellen. Damit ich eine ausreichende Zahl an transfizierten Zellen für eine stabile Zellkultur bekam, sortierte ich die Zellen an wöchentlich aufeinanderfolgenden Terminen am FACS-Gerät (FACS-*Sorting*). Nachdem meine Zellreihen mit einer mcherry-positiven Transfektionsdichte von > 85 % sortiert wurden, verwendete ich einen Teil der Zellen für meine Experimente und lagerte einen Teil der Zellen bei -80 °C ein.

5.2.1. Kontrolle der stabil transfizierten MEF STIM1 -/- Zellreihen

Um zu kontrollieren, ob die STIM1-Konstrukte stabil in die DNA der Zellreihen integriert worden sind, führte ich eine genomische DNA (gDNA)-Isolierung durch. Danach kontrollierte ich den genomischen Einbau des Inserts mit einer PCR. Als nächstes trug ich die PCR auf ein Gel auf und führte eine Gelelektrophorese durch. Nachdem ich eine Bande auf passender Höhe vorgefunden hatte, ließ ich das aufgereinigte PCR-Produkt auf die korrekte Basenabfolge, insbesondere im Bereich der Punktmutationen über die Sanger-Sequenzierung kontrollieren. Um zu überprüfen, ob die eingefügten Plasmidvarianten exprimiert werden, fertigte ich einen Western-Blot an.

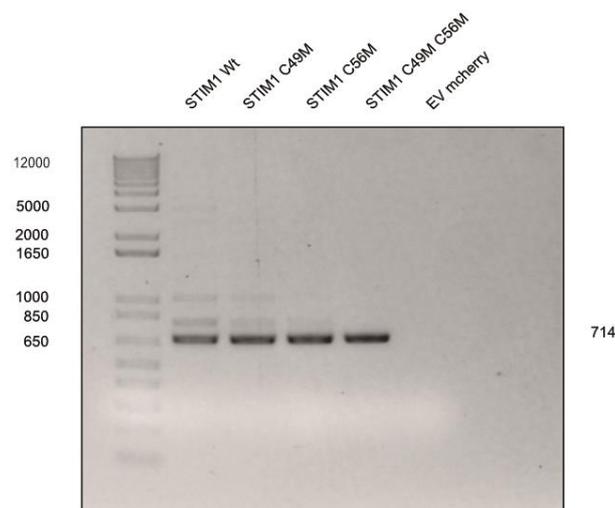


Abbildung 18: Agarosegel mit gDNA der stabil transfizierten Zellreihen. Die GDNA von MEF STIM1 -/- +Stim1 WT mcherry; MEF Stim1 -/- +Stim1 C49M mcherry; MEF Stim1 -/- +Stim1 C56M mcherry; MEF Stim1 -/- +Stim1 C49M C56M mcherry; MEF Stim1 -/- + mcherry GDNA wurde isoliert. Anschließend wurde die PCR durchgeführt. Die Primer wurden ca. 300 Bp vor und nach der Mutationen im Stim1protein gesetzt. Hieraus ergibt sich eine Basenlänge des PCR-Produkts von 677 Bp. In der DNA-Detektion via Agarosegel zeigen alle Zellreihen eine Bande in passender Höhe. Da im Falle des EV kein STIM1 vorhanden ist, zeigt sich keine Bande.

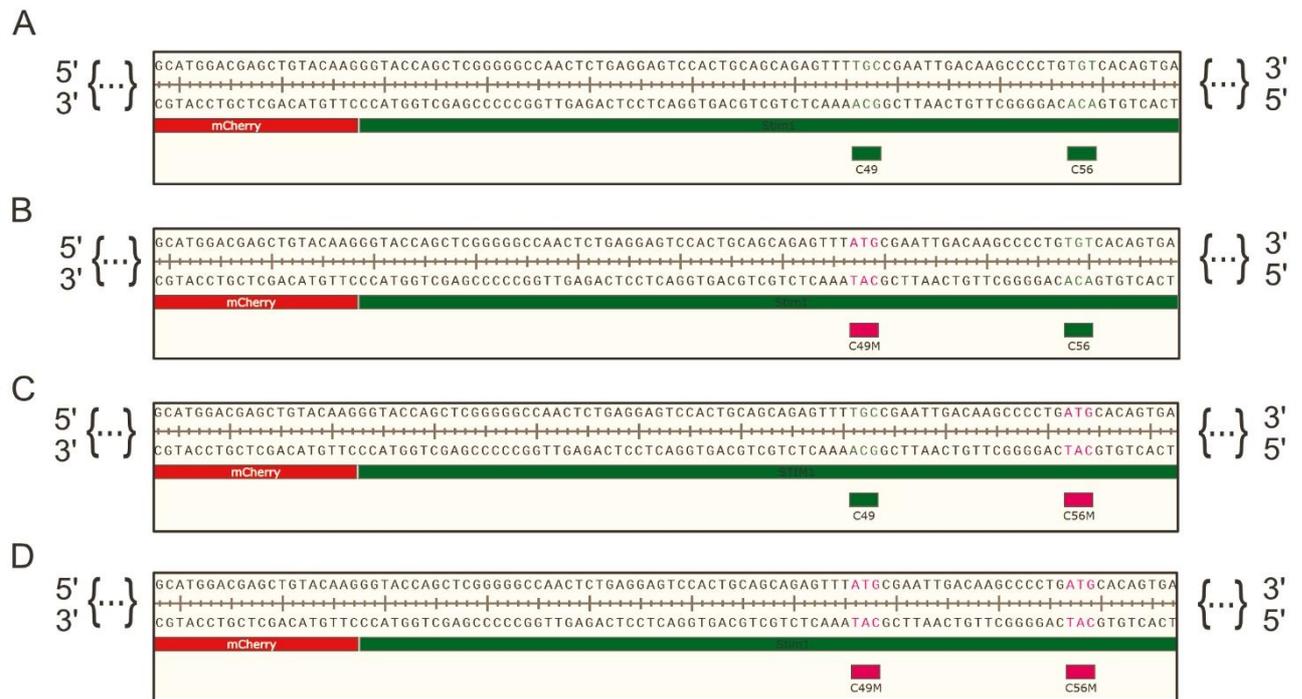


Abbildung 19: Sanger Sequenzierung der PCR amplifizierten gDNA. Der Sequenzierungsprimer wurde im PCR-Produkt so gesetzt, dass er im Bereich des mCherry komplementär gebunden hat. In den schwarz umrandeten Kästchen ist ein Ausschnitt des Sanger-Sequenzierungsergebnisses zu sehen. Die sequenzierte Basenabfolge ist jeweils der obere 5'3' Strang. Hierzu wurde durch das Programm Snapgene der jeweils komplementäre 3'5' gebildet. Der rote unterlegte DNA-Abschnitt ist ein Teil der mCherry Sequenz. Der grün unterlegte DNA-Basenstrang ist ein Ausschnitt der STIM1 Sequenz. **Abbildung A:** Abgebildet ist die sequenzierte gDNA aus Mef STIM1 $-/-$ + STIM1 WT mcherry. An Stelle 49 findet sich das Basentriplet TGC, welches für die Aminosäure Cystein kodiert. An Stelle 56 findet sich das Basentriplet TGT, welches ebenfalls für Cystein kodiert. **Abbildung B:** Abgebildet ist die sequenzierte gDNA aus Mef STIM1 $-/-$ + STIM1 C49M mcherry. An Stelle 49 befindet sich das Basentriplet ATG, welche für die Aminosäure Methionin kodiert. An Stelle 56 befindet sich das Basentriplet TGT, welches für Cystein kodiert. **Abbildung C:** Abgebildet ist die sequenzierte gDNA aus Mef STIM1 $-/-$ + STIM1 C56M mcherry. An Stelle 49 befindet sich das Basentriplet TGC, welches für Cystein kodiert. An Stelle 56 befindet sich das Basentriplet ATG, welches für Methionin kodiert. **Abbildung D:** Abgebildet ist die sequenzierte gDNA aus Mef STIM1 $-/-$ + STIM1 C49M C56M mcherry. An Stelle 49 und 56 zeigt sich jeweils das Basentriplet ATG, welches für Methionin kodiert.

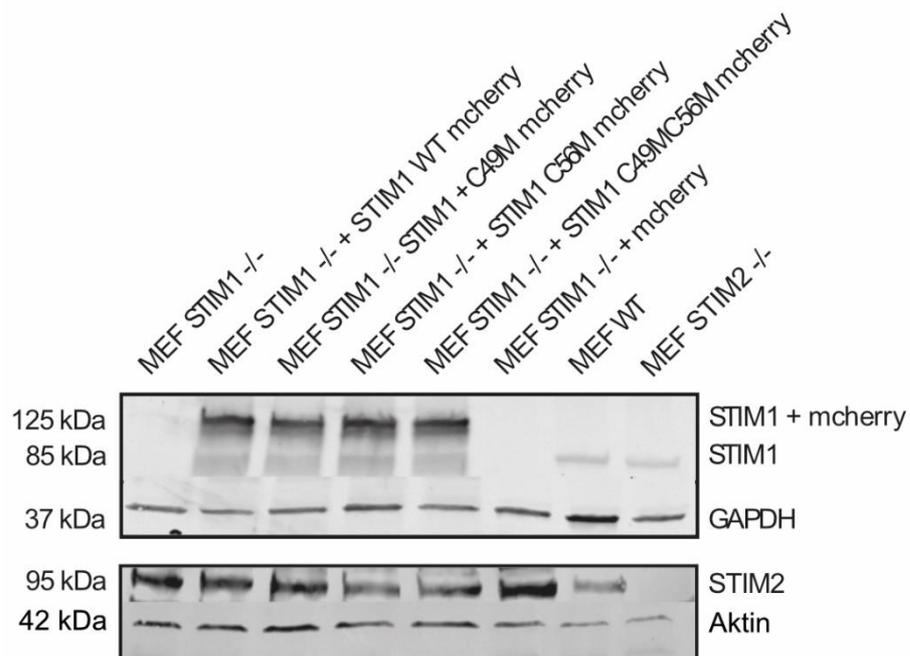


Abbildung 20 Western-Blot der stabil tranfizierten MEF STIM1 -/- Zellreihen. Der Western-Blot zeigt die erfolgreiche Überexpression von STIM1 WT mcherry, STIM1 C49M mcherry, STIM1 C56M mcherry und EV mcherry. In STIM1 -/- MEFs. Als Positivkontrolle wurde ein MEF WT Zellysat mitgeführt, als Negativkontrollen wurden MEF STIM1 -/- sowie MEF STIM2 -/- Zellysate mitgeführt.

5.3. STIM1 bildet Punctae direkt unterhalb der Zellmembran

Zhang et al. berichtete 2005 von einer Punctae-Bildung des STIM1 Proteins in der Nähe der Zelloberfläche, nachdem durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin der Kalziumspeicher des ER geleert worden ist (Zhang et al. 2005). Wu et al. bestätigte ein Jahr später durch parallele Färbung von ER und STIM1 an einem TIRF-Mikroskop, dass es STIM1 und nicht das ER ist, welches sich in die Nähe von ER-Plasmamembran-Schnittstellen bewegt (Wu et al. 2006). Hawkins et al. zeigte 2010, dass STIM1 ein Sensor für oxidativen Stress ist und durch S-Glutathionylierung an Cysteinresten in ihre aktivierte, punctaebildende Form überführt wird (Hawkins et al. 2010).

Dieses Experiment führte ich an einem TIRF Mikroskop durch, um zu überprüfen, ob STIM1 Punctae in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran liegen. Desweiteren untersuchte ich, ob die Punctaebildung durch thapsigargininduzierte ER-Kalziumvorratsentleerung sowie H₂O₂ befördert wird. Dies tat ich, um zu überprüfen, ob STIM1 durch ER-Kalziumdepletion sowie durch H₂O₂ zur vermehrten Punctaebildung gebracht wird.

Für meine Experimente mit dem TIRF-Mikroskop fixierte ich MEF STIM1 ^{-/-} + STIM1 WT mcherry Zellen. Nach 10-minütiger Inkubation in 2 µM Thapsigargin und nach 20 Minuten Inkubation in 100 µM H₂O₂. Zur Kontrolle fixierte ich Zellen, die vorher nicht behandelt wurden. Ich verwendete MEF STIM1 ^{-/-} Zellen, in die ich stabil STIM1 WT mcherry transfiziert hatte. Da STIM1 WT und das Fluoreszenzprotein mcherry gemeinsam exprimiert werden, entspricht das mcherry-Verteilungsmuster dem STIM1-Verteilungsmuster innerhalb der verwendeten Zelllinie.

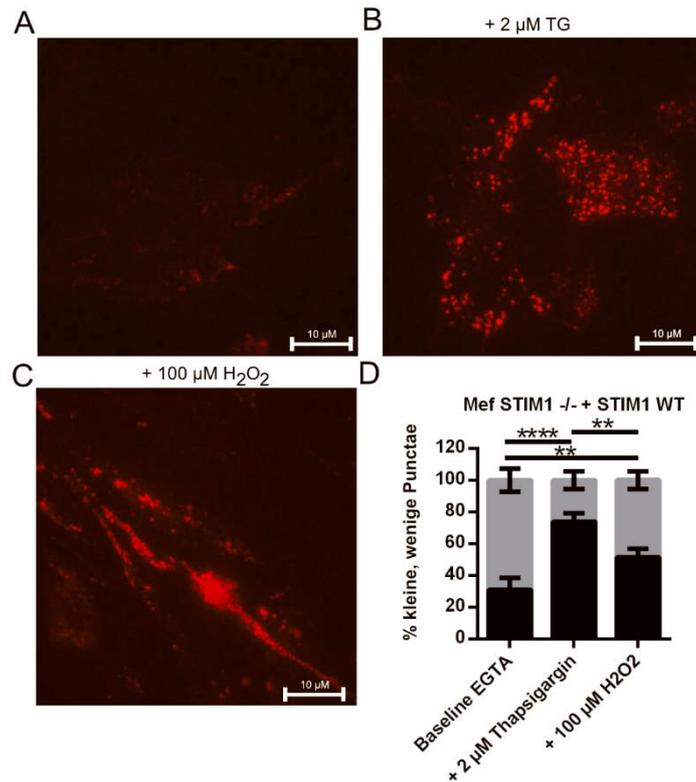


Abbildung 21 STIM1 Punctaebildung wird durch TG und H₂O₂ induziert. Die STIM1^{-/-} + STIM1 WT mcherry Zellen wurden entweder unbehandelt, für 10 min mit 2 µM Thapsigargin oder für 20 min mit 100 µM H₂O₂ inkubiert und fixiert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde mit einem mcherry-anregenden Laser detektiert. Abbildung **A** stellt ein typisches Fluoreszenzmuster von STIM1^{-/-} + STIM1 WT Zellen dar, die vor der Fixation keiner Behandlung unterzogen wurden. Es sind wenige, vereinzelt punktförmige Fluoreszenzen, sowie diffus retikuläre Fluoreszenz zu erkennen. Abbildung **B** zeigt eine typisch Punctaebildende STIM1^{-/-} + STIM1 WT Zelle, die mit 2 µM Thapsigargin inkubiert wurde. Es heben sich stark leuchtende punktförmige Fluoreszenzen vom Hintergrund ab. In Abbildung **C** zeigte sich eine typisch Punctaebildende STIM1^{-/-} + STIM1 WT Zelle, die mit 100 µM H₂O₂ inkubiert wurde. Abbildung **D** zeigt im Falle von 2 µM Thapsigargin gegenüber der unbehandelten *Baseline* (BL) und H₂O₂ ein signifikant erhöhter Anteil der Kategorie viele, große Punctae (schwarz gefärbter Säulenanteil). Im Falle von H₂O₂ zeigte sich gegenüber der BL ein signifikant erhöhter Punctaeanteil in der Kategorie viele, große Punctae. Statistik: Die Bilder (n=28) wurden von verschiedenen Personen (n=3) geblindet in die Kategorien kleine, wenige Punctae und viele, große Punctae eingeteilt. Die Säulen zeigen den Mittelwert mit der Standardabweichung an. Statistische Signifikanz wurde über den 2way ANOVA Varianztest berechnet. signifikant = p < 0,05 = *, p < 0,01 = **, p < 0,001 = ***, p < 0,0001 = ****. Scalebar der Bilder 10 µM.

In diesem Versuch wird durch eingebaute Spiegel des TIRF-Mikroskops nur die Fluoreszenz detektiert, die max. 50 nm unterhalb des Objektträgers liegt. Dies bedeutet, dass sich die STIM1 Punctae unmittelbar unterhalb der Zellmembran befinden müssen (Abb. A-C). In diesem Experiment zeigt sich, dass STIM1 nach 2 µM Thapsigarginbehandlung und nach H₂O₂-Behandlung signifikant öfter viele, große Punctae, gegenüber keiner Inkubation bildet (Abb. D). Dies bedeutet, dass STIM1-WT Proteine durch ER-Kalziumabfall sowie durch H₂O₂ oligomerisieren und in Richtung der Zellmembran wandern.

Im nächsten Schritt wird der Einfluss der redoxsensitiven Aminosäuren C49 und C56 auf die Punctaebildung untersucht.

5.4. STIM1-Punktmutationen an redoxsensitiven Aminosäuren führen zu eingeschränkter STIM1 Punctaebildung

Ein prominentes Angriffsziel von reaktiven Oxidantien (H_2O_2) ist der reaktive Schwefelrest der Aminosäure Cystein. Dieser wird unter oxidativem Stress zu einem Sulfensäurerest oder einer Disulfidbrücke oxidiert. Glutathion (GSH) ist ein Redox-Puffer und kann reaktive Sauerstoffspezies (ROS) unschädlich machen, indem es selbst oxidiert wird. Hierdurch entstehen aus zwei oxidierten GSH ein Molekül mit einer Disulfidbrücke (GSSG). Ein weiterer Wirkmechanismus des GSH ist die S-Glutathionylierung von reaktiven Schwefelgruppen an Proteinen, welches einen Einfluss auf die Proteinfunktion hat. Schon seit längerem ist bekannt, dass oxidativer Stress zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumniveau führt, was unter Umständen bis zum induzierten Zelltod führen kann (Ermak and Davies 2002). STIM1 besitzt in unmittelbarer Nähe der Kalziumbindenden EF-Hand (10 AS) zwei hochkonservierte Cysteine an Stelle C49 und C56.

2010 stellt Hawkins et al, einen neuen Wirkmechanismus von STIM1 vor. Neben der bereits bekannten durch ER-Kalziumvorratsdepletion-abhängigen STIM1-Aktivierung kann STIM1 ebenfalls Kalziumvorratsdepletions-unabhängig durch oxidativen Stress via S-Glutathionylierung in seine aktivierte, punctaebildende Form überführt werden (Hawkins et al. 2010). Vermutet wurde, dass STIM1 nach H_2O_2 Inkubation an Stelle C56 S-glutathionyliert wird. Hierdurch ergibt sich eine verringerte Kalziumaffinität der EF-Hand zum Kalzium. Dieses kann durch S-Glutathionylierung an C56 leichter aus der kalziumbindenden Domäne entweichen. Durch die veränderte Struktur der EF-Hand wird eine Oligomerisierung (Punctaebildung) des STIM1-Proteins getriggert. Das geschieht durch homotypische STIM1-STIM1 Proteininteraktionen auf ER- sowie auf zytosolischer Seite (Stathopoulos et al. 2008).

Interessanterweise postuliert Hawkins et al. 2010, dass es bei Punktmutation des C56A und DM (C49A/C56A), jedoch nicht beim C49A, zu einer dauerhaften, also konstitutiven Aktivierung (Punctaebildung) von STIM1 kommt.

Um den Einfluss dieser Punktmutationen auf die STIM1 Punctaebildung zu überprüfen, verwendete meine Betreuerin aus meiner Arbeitsgruppe meine hergestellten Mef STIM1 $-/-$ + STIM1 Plasmidvarianten (WT, C49M, C56M, DM, EV) und untersuchte sie mit meiner Hilfe auf ihre STIM1-Verteilungsmuster. Sie verwendete das High Content Screening System Opera Phoenix™ von Perkin Elmer. Hierfür behandelte sie die Zellen in kalziumfreien Extrazellulärmedium mit 1 mM EGTA

für 10 Minuten mit 2 μM Thapsigargin, sowie in kalziumfreien Extrazellularmedium mit 1 mM EGTA für 20 Minuten mit 100 μM H_2O_2 . Zur Kontrolle nahm sie eine *Baseline* (BL) ohne Behandlung in demselben EZ-Medium auf. Der Datensatz wurde anschließend mit der Columbus Bildbearbeitungssoftware ausgewertet. Hierfür trainierte sie dem Programm STIM1-Verteilungsmuster an, die ein typisch retikuläres mcherry-Verteilungsmuster (inaktives STIM1-Verteilungsmuster), ein typisch punctaeförmiges-Verteilungsmuster (aktiviertes STIM1-Verteilungsmuster), oder ein typisch glattes/gleichmäßiges-Verteilungsmuster aufwiesen (mcherry EV Verteilungsmuster ohne STIM1). Die Einteilung der aufgenommenen Zellen in die oben genannten Kategorien wurde anschließend automatisch durch die Bildbearbeitungssoftware ausgewertet: Das folgende Experiment dieses Unterkapitels wurde von meiner Betreuerin durchgeführt. Die folgende Abbildung wurde von meiner Betreuerin erstellt und ihre Schlussfolgerungen wurden in diese Arbeit integriert, um meine Ergebnisse zu ergänzen:

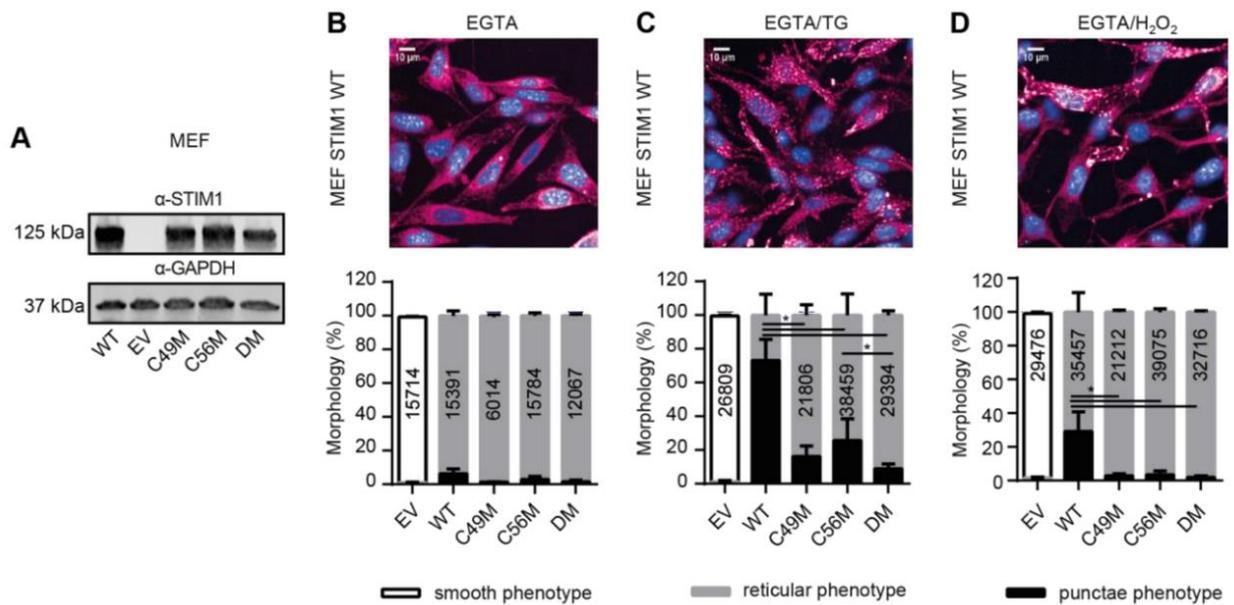


Abbildung 22: Punctaebildung ist in STIM1 Mutanten reduziert. Für diese Experimente wurden MEF STIM1 $-/-$ Zelllinien + EV / STIM1 $-/-$ + STIM1 WT mcherry / Stim1 $-/-$ + STIM1 C49M mcherry / STIM1 $-/-$ + STIM1 C56M mcherry / STIM1 $-/-$ + STIM1 DM mcherry Zelllinien verwendet. **Abbildung A:** STIM1 wird in allen Zellreihen, außer der EV Zellreihe, exprimiert. Als Negativkontrolle dient ebenfalls der EV. **Abbildung B:** 100 μ M EGTA als Negativkontrolle zeigte als Negativkontrolle keine STIM1 Oligomerisierung. **Abbildung C:** Nach Inkubation in 1 μ M Thapsigargin für 10 Minuten und dabei induzierter ER-Kalziumdepletion zeigte sich eine im Bezug zum STIM1 WT signifikant verringerte Punctaebildung in allen Mutanten. Punctaebildung im STIM1 DM ist hierbei zum STIM1 C56M nochmals signifikant erniedrigt. **Abbildung D:** Nach 20 minütiger Inkubation in 100 μ M H₂O₂ zeigte sich eine signifikant erhöhte Punctaebildung im STIM1 WT, jedoch nicht bei den Mutanten. Ein exemplarischer Immunoblot ist dargestellt, die Bandengröße wurde beschriftet. Die Punctaebildung wurde an lebenden Zellen mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Zur Analyse wurden ihre DAPI gefärbten Zellkerne und eine software-basierte Texturanalyse verwendet. Die mcherry Fluoreszenzstruktur wurde in die Kategorien weicher Phänotyp (*smooth phenotype*), retikulärer Phänotyp (*reticular phenotype*) und Punctae Phänotyp (*punctae phenotype*) eingeteilt. Die Daten sind als gestapelte Graphen mit SD dargestellt. Statistische Signifikanz wurde über den Kruskal Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison test* (B und D) oder dem *one-way ANOVA variance test* mit Tukey's *multiple comparison test* (C) durchgeführt. * $p < 0,05$, $n =$ Anzahl der gemessenen Zellen. **Abbildung und Abbildungsbeschreibung** aus „Dimethyl fumarate alters intracellular calcium handling by redox-mediated pleiotropic effects“, Dissertation von meiner Betreuerin, 2019.

TG-Inkubation und eine einhergehende ER-Kalziumvorratsdepletion führen bei STIM1 WT zu einem stark erhöhten Punctaeanteil. Dieser Anteil ist bei den Punktmutanten im Vergleich zum STIM1 WT signifikant erniedrigt (Abb. B). Innerhalb der Punktmutanten zeigt sich bei STIM1 DM im Vergleich zu STIM1 C56M eine nochmals signifikant verringerte Punctaebildung (Abb. B) Durch H₂O₂ zeigt sich beim STIM1 WT ein gegenüber den Punktmutanten signifikant erhöhter Punctaeanteil (Abb. C).

Diese Ergebnisse von Frau Dr. Herrmann bestätigen meine Ergebnisse aus dem vorherigen Versuch. STIM1 WT oligomerisiert nach ER-Vorratsdepletion sowie H₂O₂ Inkubation. Die Punktmutationen führen zu einer eingeschränkten Oligomerisierung des STIM1. Im nächsten Schritt werden die Auswirkungen dieser Punktmutationen auf den SOCE untersucht.

5.5. STIM1-Punktmutationen führen zu verringertem SOCE

Nach STIM1-Punctaebildung wird ORAI1 durch STIM1 über direkte Proteininteraktion aktiviert. Sie sind beide essentielle Bestandteile des durch Öffnung des ORAI1-Kalziumkanal getragenen Kalziueinstroms (SOCE) (Muik et al. 2008; Zhou, Meraner, et al. 2010; Navarro-Borelly et al. 2008).

Prins et al. postulierte einen gegenüber des STIM1 WT deutlich geringeren SOCE nach TG-induzierter ER-Kalziumvorratsentleerung bei C49/C56A Doppelmutation (Prins et al. 2011). Hawkins et al. beobachtete kontrastär einen deutlich erhöhten SOCE von STIM1 C56A und STIM1 C49/C56A gegenüber des STIM1 WT ohne vorherige TG-induzierte ER-Kalziumvorratsentleerung. Hieraus leitete er eine konstitutive Proteinaktivierung von ORAI1 durch dauerhafte STIM1-Punctaebildung dieser Mutanten ab. Interessanterweise führte STIM1 WT + BSO zu einem höheren SOCE als die konstitutiv aktivierten Mutanten.

Um diese beiden aufgestellten Beobachtungen zu überprüfen, wurden 5000 Zellen meiner hergestellten Zelllinien MEF STIM1 -/- + STIM1 WT; C56M; C49M; DM; EV sowie der MEF STIM2 -/- + STIM1 WT; C56M; C49M; DM; EV Zelllinien in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Jede Zelllinie wurde mit vier unterschiedlichen Ansätzen behandelt. Um den Versuchsansatz von Prins et al. nachzuvollziehen inkubierten ein Teil der Wells in 2 μ M Thapsigargin. Um den Versuchsansatz von Hawkins et al. nachzuvollziehen, inkubierte ein anderer Teil der Zellen vor Experimentbeginn in 100 μ M H₂O₂, ein weiterer Teil der Zellen wurde ohne Behandlung gemessen. Für den vierten Versuchsansatz inkubierten die Zellen vor Experimentbeginn in 100 μ M H₂O₂ und während des Experiments zusätzlich in 2 μ M Thapsigargin.

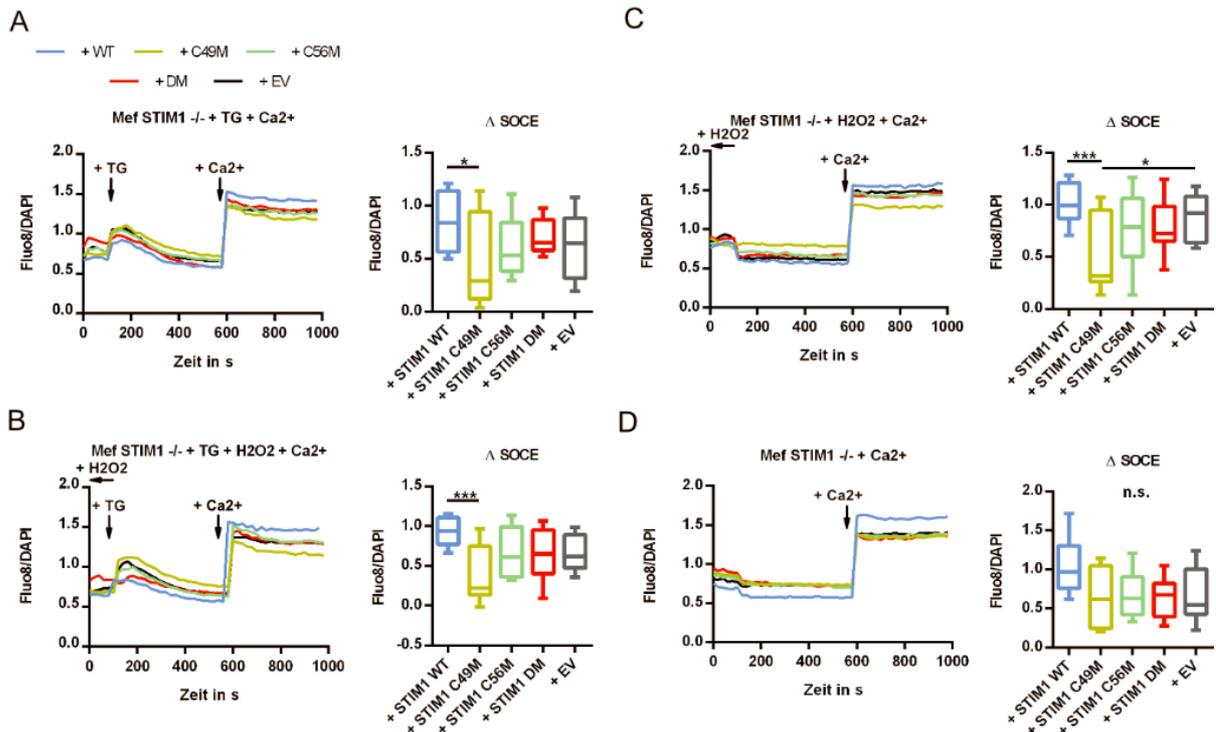


Abbildung 23: STIM1 C49M Punktmutation führt zu signifikant verringertem SOCE. Für diese Experimente wurden MEF STIM1 $-/-$ + EV / STIM1 $-/-$ + STIM1 WT mcherry / Stim1 $-/-$ + STIM1 C49M mcherry / STIM1 $-/-$ + STIM1 C56M mcherry / STIM1 $-/-$ + STIM1 DM mcherry Zelllinien verwendet. Die Messungen wurden an einem Fluoreszenzmessgerät (Tecan Reader) durchgeführt. **Abbildung A:** nach Inkubation in 2 μ M TG und anschließender Injektion von 2 mM Ca^{2+} zeigten MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT Zellen signifikant höhere Ca^{2+} -Fluoreszenz als STIM1 $-/-$ + STIM1 C49M Zellen. **Abbildung B:** Vor Messbeginn inkubierten die Zellreihen für 20 Minuten in 100 μ M H_2O_2 . Während der Fluoreszenzmessungen Inkubation in 2 μ M TG. Nach Injektion von 2 mM Ca^{2+} zeigten MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT Zellen signifikant erhöhte Ca^{2+} -Fluoreszenz als STIM1 $-/-$ + STIM1 C49M. **Abbildung C:** alleinige Inkubation für 20 min mit 100 μ M H_2O_2 , ohne TG Inkubation und anschließender Injektion von 2 mM Ca^{2+} . MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT, sowie EV Zellen zeigen signifikant erhöhte Ca^{2+} -Fluoreszenz als STIM1 $-/-$ + STIM1 C49M. **Abbildung D:** alleinige Injektion von 2 mM Ca^{2+} , ohne vorherige Inkubation mit H_2O_2 oder TG. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Statistik: Fluo-8 Intensität wurde durch DAPI-Intensität geteilt. Für die Berechnung des SOCE wurde die Differenz des letzten Fluoreszenzwertes vor Ca^{2+} Inkubation und des letzten gemessenen Fluoreszenzwertes des Experiments berechnet. Statistische Varianz wurde als Tukey-Boxplots dargestellt. Ausreißer wurden aus der Wertung genommen. Normalverteilung der gemessenen Werte wurde über den *D'agostino pearson omnibus* Normalitätstest überprüft. Im Falle von normalverteilten Werten (B, D) wurde das Signifikanzniveau über den *Ordinary One Way Anova*-Test bestimmt. Bei nicht normalverteilten Werten (C, E) wurde das Signifikanzniveau über den *Kruskal-Wallis*-Test berechnet. Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$, $p < 0,0001 = ****$.

In kalziumfreien Extrazellulärmedium mit 1mM EGTA zeigen MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT gegenüber STIM1 C49M einen signifikant erhöhten SOCE und gegenüber STIM1 C56M, DM und EV einen erhöhten SOCE nach Inkubation mit 2 μ M TG und anschließender Injektion von 2 mM Ca^{2+} (Abb. A). Nach Inkubation mit 100 μ M H_2O_2 und zusätzlicher Inkubation mit 2 μ M TG besitzt STIM1 WT gegenüber STIM1 C49M einen signifikant erhöhten SOCE und gegenüber STIM1 C56M, DM und EV einen in der Tendenz erhöhten SOCE (Abb. B). Alleinige Inkubation mit 100 μ M H_2O_2 führt bei

STIM1 WT ebenfalls zu signifikant erhöhtem SOCE gegenüber STIM1 C49M. Auch hier liegt der SOCE von STIM1 WT tendenziell über STIM1 C56M, DM und EV (Abb. C):. Alleinige 2 mM Ca^{2+} Injektion ohne vorherige Inkubation zeigt keinen signifikanten Ca^{2+} -Fluoreszenzunterschied innerhalb der getesteten Zellreihen. Bei STIM1 WT ist jedoch wieder ein erhöhter SOCE gegenüber STIM1 C49M, C56M, DM und EV zu beobachten (Abb. D).

Diese Ergebnisse bedeuten, dass im Falle von STIM1 WT gegenüber der Punktmutation an STIM1 C49M durch ER-Kalziumvorratsdepletion, H_2O_2 sowie durch die Kombination aus beiden ein signifikant erhöhter Kalziumeinstrom nach intrazellulär erfolgt. Es besteht ebenfalls die Tendenz, dass STIM1 WT gegenüber STIM1 C56M, DM und EV intrazellulär erhöhte Kalziumkonzentrationen besitzt.

Wenn ich die Ergebnisse meiner STIM1 – Punctaebildung, sowie die Experimente von meiner Betreuerin hinzunehme, komme ich zu der Schlussfolgerung, dass durch ER-Kalziumvorratsdepletion und H_2O_2 im Falle des STIM1 WT quantitativ am meisten STIM1 Punctae an die Zellmembran wandern, wodurch möglicherweise mehr ORAI1 Proteine rekrutiert werden und funktionelle Kalziumkanäle bilden. Durch eine signifikant verringerte Oligomerisierung im Falle des STIM1 C49M ist der SOCE auch signifikant beeinträchtigt.

Im nächsten Schritt untersuche ich den Einfluss der Inkubationsvarianten auf die einzelnen Zellreihen.

MEF STIM1 ^{-/-} + Plasmidkonstrukte

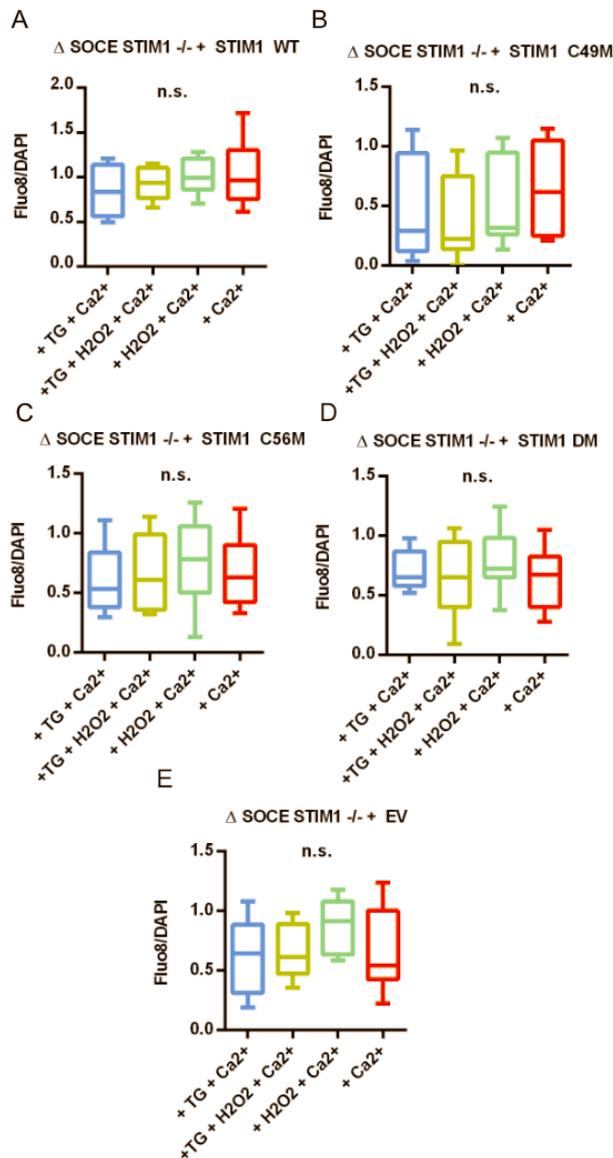


Abbildung 24 In MEF STIM1 ^{-/-} Zellreihen führen bei TG und H₂O₂ Inkubation zu nicht signifikant unterschiedlichem SOCE. Die Fluoreszenzexperimente wurden mit meinen hergestellten MEF STIM1 ^{-/-} + STIM1 Plasmidvarianten und MEF STIM2 ^{-/-} + STIM1 Plasmidvarianten durchgeführt. 5000 Zellen pro Well wurden in einer 96 Well Platte 24 Stunden vor Experimentbeginn ausplattiert. Zur Quantifizierung des Kalziums inkubierten die Zellen vor Experimentbeginn mit einem fluoreszierenden Kalziumkomplexbildner (Fluo8), und zur Quantifizierung der Zellzahl in DAPI. Die Fluoreszenz wurde an einem Fluoreszenzmessgerät ausgemessen (s. Methode 4.5).Abbildung **A-E**: Die einzelnen MEF STIM1 ^{-/-} Zellreihen zeigen bei Inkubation mit 2 μM Thapsigargin; und 100 μM H₂O₂; 100 μM H₂O₂; ohne Inkubation keine signifikanten Ca²⁺-Fluoreszenzunterschiede. Statistik: Fluo-8 Intensität wurde durch DAPI-Intensität geteilt. Für die Berechnung des SOCE wurde die Differenz des letzten Fluoreszenzwertes vor Ca²⁺ Inkubation und des letzten gemessenen Fluoreszenzwertes des Experiments berechnet. Statistische Varianz wurde als Tukey-Boxplots dargestellt. Ausreißer wurden aus der Wertung genommen. Normalverteilung der gemessenen Werte wurde über den *D'agostino pearson omnibus* Normalitätstest überprüft. Im Falle von normalverteilten Werten (A, B, E) wurde das Signifikanzniveau über den *Ordinary One Way Anova*-Test bestimmt. Bei nicht normalverteilten Werten (C, D) wurde das Signifikanzniveau über den Kruskal-Wallis-Test berechnet. Irrtumswahrscheinlichkeit p < 0,05 = *, p < 0,01 = **, p < 0,001 = ***, p < 0,0001 = ****.

In Abbildung 25 sind die einzelnen Zellreihen gegen ihre unterschiedlichen Behandlungen aufgetragen worden. Um zu sehen, ob die unterschiedlichen Behandlungen zu einem Unterschied in der Ca^{2+} Fluoreszenz derselben Zellreihe führen, wurden die Daten aus den Experimenten verwendet.: Es zeigen sich keine signifikanten Ca^{2+} Konzentrationsunterschiede innerhalb der einzelnen MEF STIM1 -/- + Proteinvarianten bei unterschiedlicher Inkubation (Abb. A-E).

Inkubation mit TG, H_2O_2 sowie TG und H_2O_2 führt bei STIM1 WT zu keiner signifikant erhöhten Fluoreszenz gegenüber der Negativkontrolle. Dies bedeutet entweder, dass die Inkubation keinen positiven Effekt auf den SOCE hatte, oder dass die Negativkontrolle ebenfalls einen erhöhten SOCE besitzt.

Für die Punktmutanten und dem EV ergibt sich dieselbe Fragestellung. Da, wie im vorherigen Versuch beschrieben ist, das Fluoreszenzniveau jedoch teils signifikant unterhalb dessen des STIM1 WT liegt, stellt sich die Frage, ob die Inkubation keinen positiven Effekt hatte auf den SOCE hatte und deswegen auf demselben niedrigen Niveau wie der Negativkontrolle liegt.

Im nächsten Abschnitt meines Ergebnisteils führte ich die vorherigen Experimente mit MEF STIM2 -/- Zellen durch, um den Einfluss von STIM2 auf die STIM1 Proteinvarianten zu untersuchen.

5.6. Herstellung stabil transfizierter MEF STIM2 -/- Zellreihen

Um den Einfluss von STIM2 auf die STIM1-Punctaebildung und den SOCE zu überprüfen, transfizierte ich meine STIM1-Plasmidvarianten in MEF STIM2 -/- Zellen. Damit ich eine ausreichende Zahl an transfizierten Zellen für eine stabile Zellkultur erreichte, führte ich an wöchentlich aufeinanderfolgenden Terminen ein Zellensortieren am FACS-Gerät (FACS-*Sorting*) durch. Nachdem meine Zellreihen mit einer mcherry-positiven Transfektionsdichte von > 85 % sortiert wurden, verwendete ich einen Teil der Zellen für meine Experimente und lagerte einen Teil der Zellen bei -80 °C ein.

5.6.1. Kontrolle der stabil transfizierten MEF STIM2 -/- Zellreihen

Um zu überprüfen, ob die stabil transfizierten Zellen einen STIM2 -/- besitzen und STIM1 im Falle der erfolgreichen Transfektion wie bei den MEF STIM1 -/- Zellreihen überexprimiert wird, fertigte ich einen Western-Blot an.

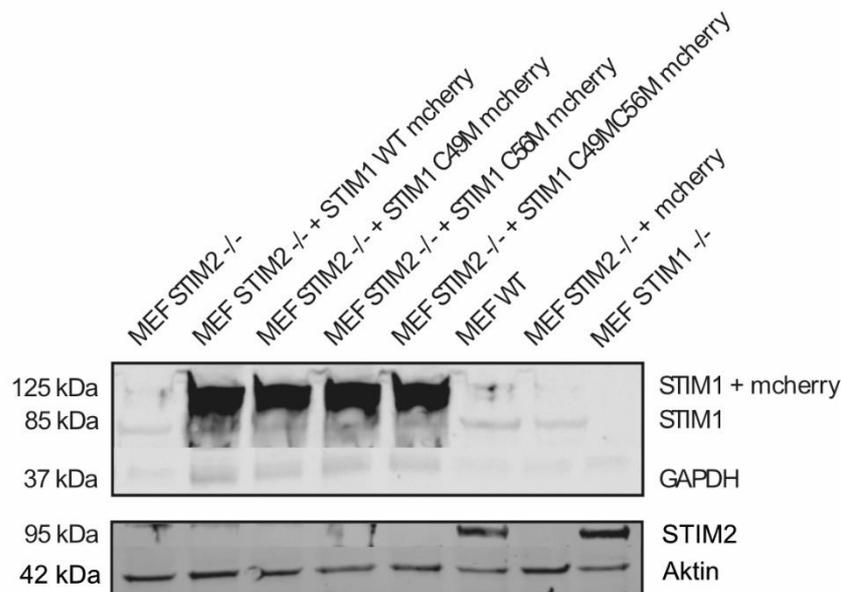


Abbildung 25: Western-Blot der stabil transfizierten MEF STIM2 -/- Zellreihen. Der Western-Blot zeigt in MEF STIM2 -/- Zellreihen die erfolgreiche Überexpression von STIM1 WT mcherry, STIM1 C49M mcherry, STIM1 C56M mcherry und STIM1 C49MC56M mcherry. MEF STIM2 -/-, sowie MEF STIM2 -/- + EV und MEF WT zeigen eine normale, endogene STIM1 Expression. in. Als Positivkontrolle wurde das MEF WT Zelllysate mitgeführt, als Negativkontrollen wurden MEF STIM1 -/- sowie MEF STIM2 -/- Zelllysate mitgeführt.

5.7. STIM1-Punctaebildung ist auch bei STIM2 Knockout in Mutanten eingeschränkt

Um den Einfluss von STIM2 auf die STIM1 Punctaebildung Abwesenheit von STIM2 zu überprüfen, verwendete ich meine hergestellten MEF STIM2 -/- + STIM1 Plasmidvarianten (WT, C49M, C56M, DM, EV) und untersuchte sie auf ihre STIM1-Verteilungsmuster. Ich verwendete das High Content Screening System Opera Phoenix™ von Perkin Elmer. Hierfür behandelte ich die Zellen in kalziumfreien Extrazellulärmedium mit 1 mM EGTA für 10 Minuten mit 2 µM Thapsigargin, außerdem in kalziumfreien Extrazellulärmedium mit 1 mM EGTA für 20 Minuten mit 100 µM H₂O₂. Zur Kontrolle nahm ich eine *Baseline* (BL) ohne Behandlung in demselben EZ-Medium auf. Der Datensatz wurde anschließend mit der Columbus Bildbearbeitungssoftware ausgewertet. Hierfür benutzte ich dieselben trainierten mcherry-Verteilungsmuster, die von meiner Betreuerin verwendet wurden und ein typisch retikuläres mcherry-Verteilungsmuster (inaktives STIM1-Verteilungsmuster) ein typisch punctaeförmiges-Verteilungsmuster (aktiviertes STIM1-Verteilungsmuster), oder ein typisch glattes/gleichmäßiges-Verteilungsmuster aufwiesen (mcherry EV Verteilungsmuster ohne STIM1). Die Einteilung der aufgenommenen Zellen in die oben genannten Kategorien wurde anschließend automatisch durch die Bildbearbeitungssoftware ausgewertet:

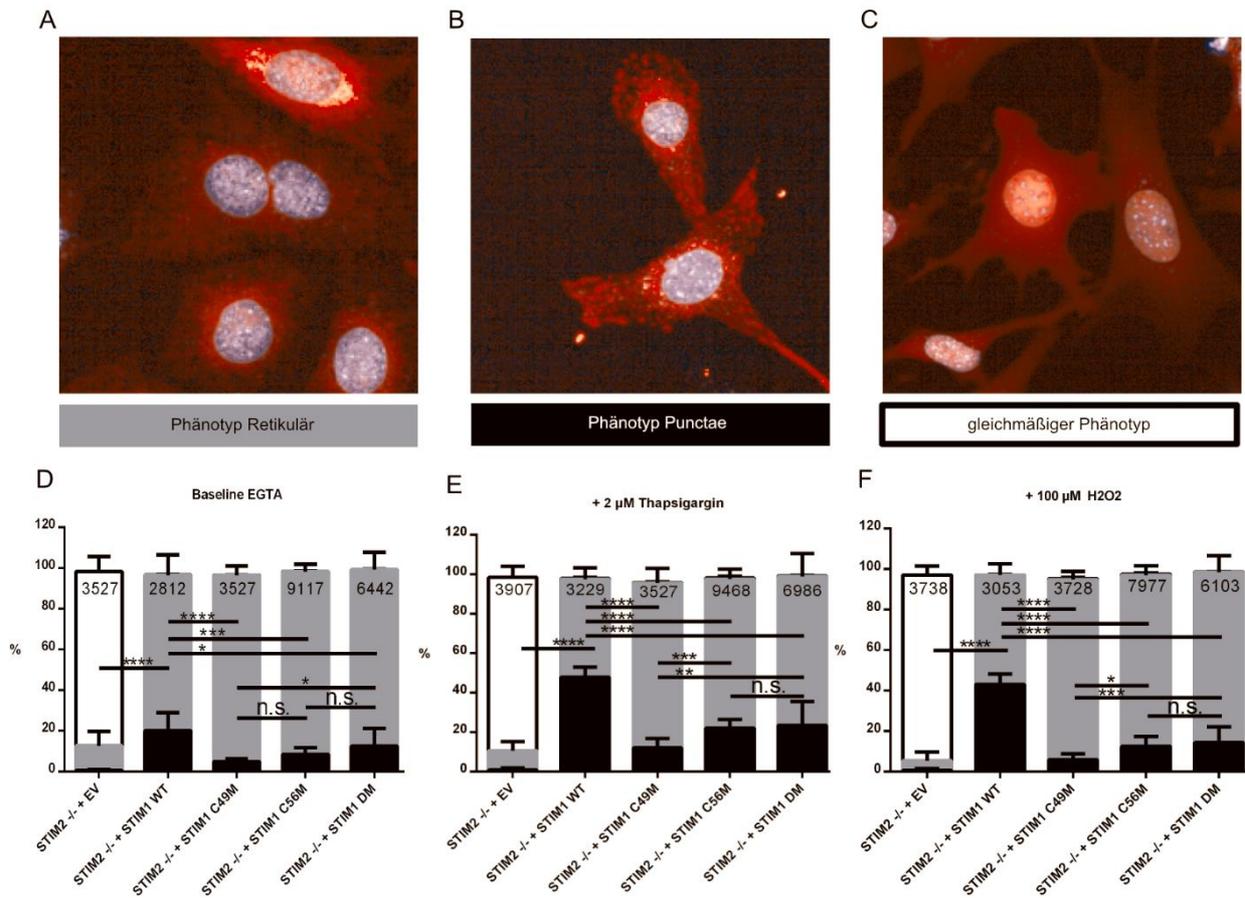


Abbildung 26: Punktaebildung ist in Mutanten bei STIM2^{-/-} verringert. Es wurden von MEF STIM2^{-/-} + STIM1 Plasmidvarianten Lebendbildaufnahmen angefertigt. Mit der Columbus Bildauswertungssoftware wurden typische Fluoreszenzmuster für einen Punctae- einen Retikulären- und einen gleichmäßigen Phänotyp beigebracht. Die Auswertung der Zellen wurde anschließend automatisch durch die Bildauswertungssoftware durchgeführt. Abbildung **A** stellt ein typisch retikuläres mcherry Verteilungsmuster aus STIM1-WT-Zellen dar, bei denen keine Behandlung durchgeführt worden ist (BL). Abbildung **B** zeigt typisch Punctaebildende Zellen des STIM1 WT nach 20-minütiger Inkubation mit TG. Abbildung **C** zeigt ein gleichmäßiges mcherry-Verteilungsmuster, welches typisch für die EV-Zellreihe war, in der mcherry ohne STIM1 transfiziert wurde. Abbildung **D** zeigt einen Signifikant erhöhten Punctaeanteil des STIM1 WT in der BL gegenüber den Mutanten. STIM1 DM zeigt signifikant erhöhte Punctaebildung gegenüber der alleinigen STIM1 C49M Mutation. In **E** sieht man nach Zugabe von 2 μM TG einen Punctaezuwachs in allen Zellreihen. STIM1 WT zeigt gegenüber allen Zellreihen einen deutlich signifikant erhöhte Punctaezuwachs. STIM1 C56M und STIM1 DM zeigen gegenüber STIM1 C49M signifikant erhöhte Punctaebildung. Abbildung **F** zeigt nach Zugabe von 100 μM H₂O₂ bei STIM1 WT erneut eine deutlich signifikant erhöhte Punctaebildung im Vergleich zu allen anderen Zellreihen. STIM1 C56M und STIM1 DM zeigen erneut signifikant erhöhte Punctaebildung als STIM1 C49M. Statistik: Die Säulen zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung an. Statistische Signifikanz wurde über den 2way ANOVA Varianztest berechnet. Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$, $p < 0,0001 = ****$. Die Bilder sind quadratisch mit einer skalierten Seitenlänge von ursprünglich 22 μM.

MEF STIM2 ^{-/-} + STIM1-WT-mcherry Verteilungsmuster von Zellen, die nicht behandelt wurden, präsentieren sich typischerweise als kontinuierliches, netzartiges Fluoreszenzmuster mit Aussparung des Zellkerns, welches als *retikulärer Phänotyp* bezeichnet wurde (Abb. A). Lebendbildaufnahmen von MEF STIM2 ^{-/-} + STIM1 WT Zellen nach H₂O₂ Inkubation, die typischerweise ein diskontinuierliches mcherry Verteilungsmuster mit diskontinuierlichem, punktförmigem Fluoreszenzmuster. Dies wurde *Phänotyp Punctae* genannt (Abb. B). MEF STIM2 ^{-/-} + EV Zellen präsentierten sich mit einem mcherry-Verteilungsmuster, welches phänotypisch hauptsächlich im Zellkern fluoreszierte und intrazellulär sehr gleichmäßig verteilt vorlag. Dieses Verteilungsmuster wurde *gleichmäßiger Phänotyp* genannt (Abb. C). Ohne Behandlung zeigt STIM1 WT gegenüber den STIM1 Mutanten einen deutlich signifikant erhöhten Punctaeanteil. C49M Mutation besitzt den geringsten Punctaeanteil, während der Punctaeanteil von C56M in der Tendenz höher liegt. STIM1 DM besitzt einen signifikant erhöhten Punctaeanteil als STIM1 C49M (Abb. D). Nach Zugabe von 2 µM Thapsigargin bildet STIM1 WT gegenüber allen drei STIM1 Mutanten einen hochsignifikant erhöhten Punctaeanteil. Innerhalb der Punktmutationen haben STIM1 C56M und DM einen signifikant erhöhten Punctaeanteil gegenüber dem C49M-Mutanten (Abb. E). Durch 20-minütige Inkubation mit 100 µM H₂O₂ zeigt STIM1 WT nach H₂O₂ Inkubation erneut einen gegenüber den Mutanten deutlich signifikant erhöhten Punctaeanteil. Innerhalb der Punktmutationen besitzen C56M und DM einen signifikant erhöhten Punctaeanteil gegenüber C49M (Abb. F)

Diese Ergebnisse bedeuten, dass es durch die Punktmutationen C49M, C56M und DM auch in MEF STIM2 ^{-/-} Zellen zu einer signifikant eingeschränkten Punctaebildung kommt. Hierdurch werden die vorherigen Ergebnisse der STIM1 Punctaebildung in MEF STIM1 ^{-/-} Zellen bestätigt.

Im nächsten Schritt wird der Einfluss von TG und H₂O₂ auf die einzelnen Zellreihen untersucht.

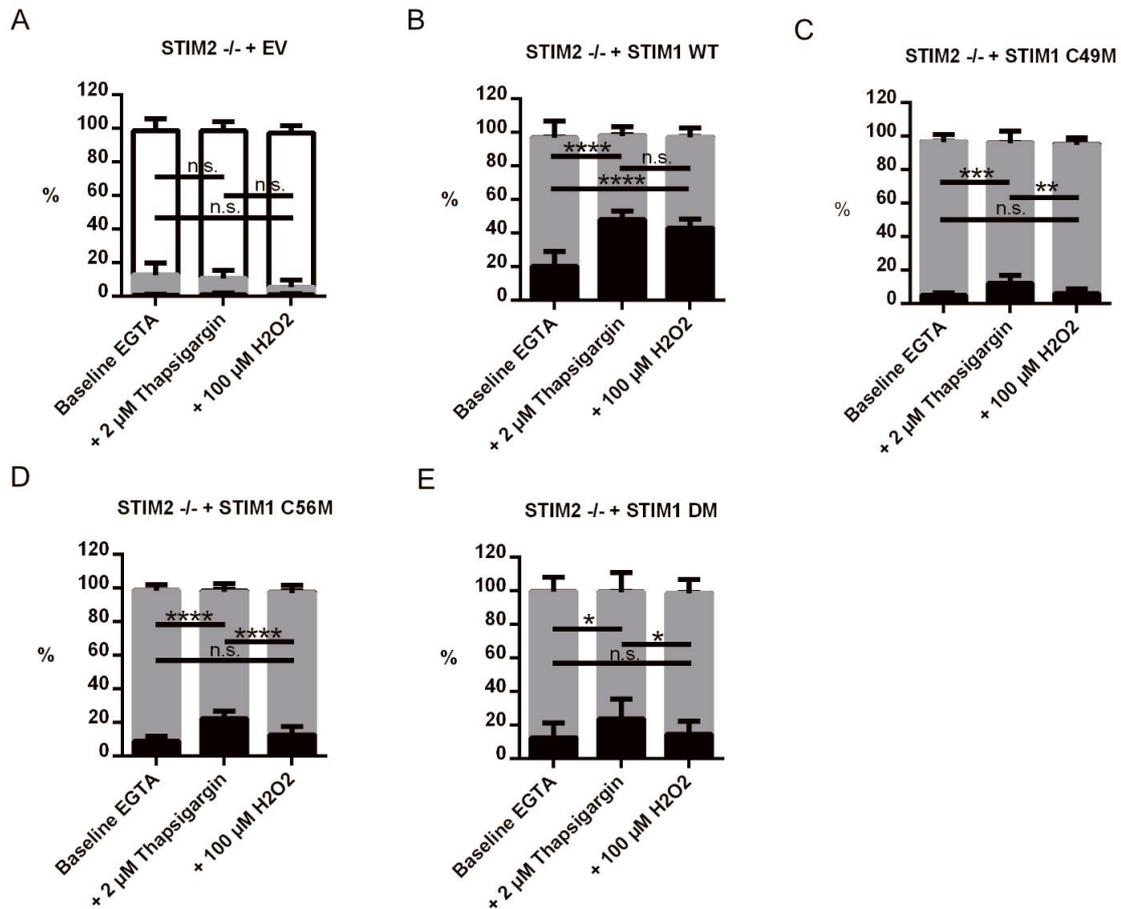


Abbildung 27 H₂O₂ ist nur für STIM1 WT ein potenter Aktivator. Es wurden von MEF STIM2^{-/-} + STIM1 Plasmidvarianten Lebendbildaufnahmen angefertigt. Mit der Columbus Bildauswertungssoftware wurden typische Fluoreszenzmuster für einen Punctae- einen Retikulären- und einen gleichmäßigen Phänotyp trainiert. Die Auswertung der Zellen wurde anschließend automatisch durch die Bildauswertungssoftware durchgeführt. Für diese Abbildungen wurden dieselben Daten wie in der vorherigen Abbildung verwendet. **Abbildung A** zeigt keine Signifikante Punctaebildung bei alleiniger mcherry EV Transfektion. **Abbildung B** stellt bei STIM2^{-/-} + STIM1 WT-Zellen gegenüber der Baseline eine deutlich signifikant erhöhte Punctaebildung bei TG oder H₂O₂ Inkubation dar. **Abbildung C:** Bei STIM1 C49M Mutation führt alleinig TG führt zu erhöhter Signifikanz gegenüber BL und H₂O₂ Inkubation. **Abbildung D:** Eine STIM1 C56M Mutation führt alleinig bei TG Inkubation zu erhöhter Signifikanz gegenüber BL und H₂O₂ Inkubation. **Abbildung E:** Bei STIM1 Doppelmutation, zeigt sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Punctaebildung bei TG Inkubation gegenüber der BL und H₂O₂ Inkubation. Statistik: Die Säulen zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung an. Statistische Signifikanz wurde über den 2way ANOVA Varianztest berechnet. Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$, $p < 0,0001 = ****$.

In der Baseline sowie nach TG und H₂O₂ Inkubation zeigen STIM2 -/+ EV kaum bis gar keine Punctaebildung. Der prozentual sehr geringe Anteil hat sich zwischen den unterschiedlichen Versuchsansätzen nicht signifikant unterschieden (Abb. A). STIM1 WT bildet nach TG-Inkubation sowie H₂O₂-Inkubation einen gegenüber der BL hochsignifikant erhöhten Punctaeanteil. Innerhalb der beiden Inkubationen zeigt sich interessanterweise auf beidseits hohem Punctaeniveau kein signifikant nachzuweisender Punctaeunterschied (Abb. B). TG-Inkubation führt bei C49M, C56M und DM Mutation zu einem erhöhten Punctaeanteil gegenüber BL und H₂O₂. Ein Punctaeunterschied in der H₂O₂- Behandlung gegenüber der unbehandelten BL ist bei allen drei STIM1 Punktmutanten nicht signifikant (Abb. C, D, E)

Diese Ergebnisse bedeuten, dass STIM1 WT sensitiv auf die H₂O₂ Behandlung reagiert, während die oxidative Sensorfunktion des STIM1 bei den Punktmutanten nicht mehr vorhanden ist. Es zeigte sich in der Auswertung meiner Versuche eindeutig eine starke Punctaevermehrung des STIM1 WT nach TG-induzierter Kalziumvorratsdepletion. STIM1 WT konnte ebenfalls durch oxidativen Stress aktiviert werden.

Dieses Ergebnis unterstützt die von Hawkins et al. 2010 postulierte These, dass STIM1 neben der Funktion als ER-Kalziumsensor ein Sensorprotein für den intrazellulären oxidativen Stress ist. Im Falle der Punktmutationen C49M, C56M und DM ist die ER-Kalziumsensorfunktion in allen drei Fällen teilweise eingeschränkt worden. Die oxidative Sensorfunktion ist durch alle drei Punktmutationsvarianten nicht mehr vorhanden.

Im nächsten Schritt wird der Einfluss von STIM2 Knockout auf den SOCE beschrieben.

5.8. STIM2 Knockout beeinflusst den SOCE nicht maßgeblich

Um einen möglichen Einfluss von STIM2 auf die STIM1 Punktmutationen zu erforschen, wurden das SOCE Experiment aus (5.5) mit MEF STIM2 $-/-$ Zellen + STIM1 WT / C49M / C56M / DM / EV wiederholt.

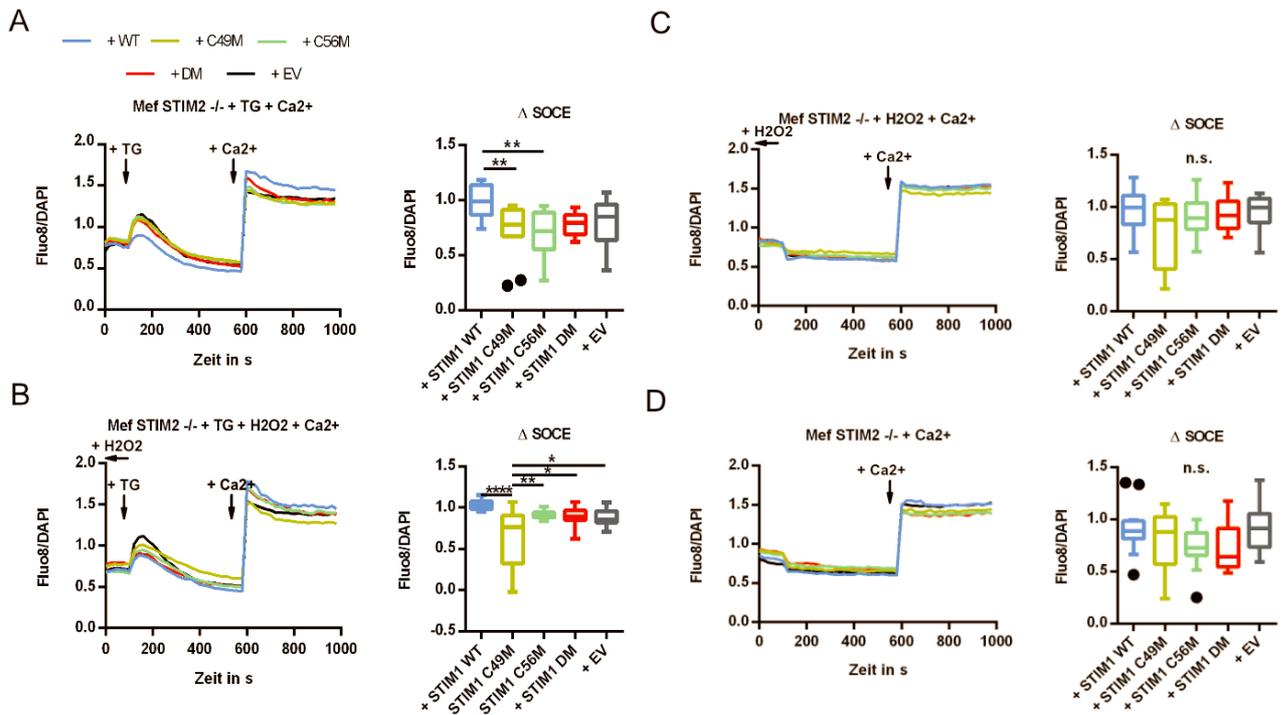


Abbildung 28 STIM1 C49M Punktmutation führt auch bei STIM2 $-/-$ Zellen zu signifikant verringertem SOCE Für diese Experimente wurden MEF STIM2 $-/-$ + EV / STIM2 $-/-$ + STIM1 WT mcherry, STIM2 $-/-$ + STIM1 C49M mcherry, STIM2 $-/-$ + STIM1 C56M mcherry und STIM2 $-/-$ + STIM1 DM mcherry Zelllinien verwendet. Die Messungen wurden an einem Fluoreszenzmessgerät (Tecan Reader) durchgeführt. **Abbildung A:** nach Inkubation in 2 μ M TG und anschließender Injektion von 2 mM Ca²⁺ zeigten MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT Zellen signifikant erhöhte Ca²⁺-Fluoreszenz gegenüber MEF STIM2 $-/-$ + C49M und MEF STIM2 $-/-$ + C56M Zellen. **Abbildung B:** Vor Messbeginn inkubierten die Zellreihen für 20 Minuten in 100 μ M H₂O₂. Während der Fluoreszenzmessungen Inkubation in 2 μ M TG. Nach Injektion von 2 mM Ca²⁺ zeigten STIM2 $-/-$ + STIM1 WT, sowie + STIM1 C56M, + STIM1 DM, + EV signifikant erhöhte Ca²⁺-Fluoreszenz als STIM2 $-/-$ + STIM1 C49M. **Abbildung C:** alleinige Inkubation für 20 min mit 100 μ M H₂O₂, ohne TG Inkubation und anschließender Injektion von 2 mM Ca²⁺. Hierbei zeigte sich keine signifikanten Ca²⁺ Fluoreszenzunterschiede. **Abbildung D:** alleinige Injektion von 2 mM Ca²⁺, ohne vorherige Inkubation mit H₂O₂ oder TG. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Statistik: Fluo-8 Intensität wurde durch DAPI-Intensität geteilt. Für die Berechnung des SOCE wurde die Differenz des letzten Fluoreszenzwertes vor Ca²⁺ Inkubation und des letzten gemessenen Fluoreszenzwertes des Experiments berechnet. Statistische Varianz wurde als Tukey-Boxplots dargestellt. Ausreißer wurden aus der Wertung genommen. Normalverteilung der gemessenen Werte wurde über den *D'agostino pearson omnibus* Normalitätstest überprüft. Im Falle von normalverteilten Werten (B-E) wurde das Signifikanzniveau über den *Ordinary One Way Anova*-Test bestimmt. Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$, $p < 0,0001 = ****$.

Überexpression von STIM1 + WT führt auch bei STIM2 -/- zu einem signifikant erhöhten SOCE nach 2 mM Ca²⁺ gegenüber Überexpression von STIM1 C49M nach 2 µM TG induzierter ER-Kalziumvorratsentleerung (Abb. A). Bei Inkubation mit 100 µM H₂O₂ und zusätzlicher Inkubation mit 2 µM TG ist der SOCE von STIM1 + WT; C56M; DM und EV gegenüber STIM1 C49M signifikant erhöht (Abb. B). Alleinige Inkubation mit H₂O₂ führt zu keinem signifikanten Kalziumfluoreszenzunterschied innerhalb der gemessenen Zellreihen (Abb. C). Eine reine 2 mM Ca²⁺ Injektion ohne vorherige Inkubation zeigt keinen signifikanten Ca²⁺ Fluoreszenzunterschied innerhalb der getesteten Zellreihen (Abb. D). Diese Ergebnisse ähneln den Ergebnissen aus den SOCE Messungen der MEF STIM1 -/- Zellreihen. STIM1 C49M Überexpression scheint auch hier nach durch ER-Kalziumdepletion zu einem, im Vergleich zu STIM1 WT, C56M, DM und EV, geringeren SOCE zu kommen.

Da sich diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der MEF STIM1 -/- Zellreihen sehr ähneln, kann ein großer Einfluss von STIM2 auf den SOCE unter diesen Bedingungen als unwahrscheinlich angesehen werden.

Im nächsten Schritt untersuche ich den Einfluss der unterschiedlichen Behandlungen auf die einzelnen STIM2 -/- Zellreihen.

MEF STIM2 ^{-/-} + Plasmidkonstrukte

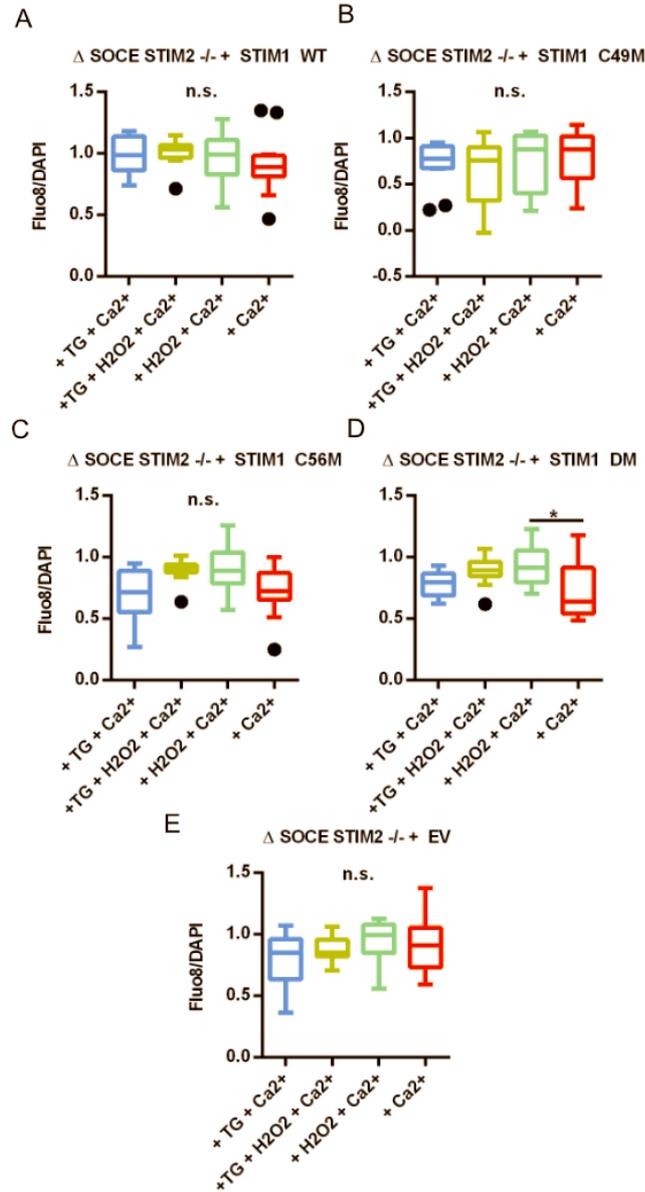


Abbildung 29 In MEF STIM2 ^{-/-} Zellreihen führen TG und H₂O₂ Inkubation zu nicht signifikant unterschiedlichem SOCE. Die Fluoreszenzexperimente wurden mit meinen hergestellten MEF STIM1 ^{-/-} + STIM1 Plasmidvarianten und MEF STIM2 ^{-/-} + STIM1 Plasmidvarianten durchgeführt. 5000 Zellen pro Well wurden in einer 96 Well Platte 24 Stunden vor Experimentbeginn ausplattiert. Zur Quantifizierung des Kalziums inkubierten die Zellen vor Experimentbeginn mit einem fluoreszierenden Kalziumkomplexbildner (Fluo8), und zur Quantifizierung der Zellzahl in DAPI. Die Fluoreszenz wurde an einem Fluoreszenzmessgerät ausgemessen (s. Methode 4.5). Abbildung **A-E**: MEF STIM2 ^{-/-} Zellen + STIM1 DM Zellen zeigen einen signifikanten Ca²⁺-Fluoreszenzunterschied zwischen + H₂O₂ + Ca²⁺ und alleiniger Ca²⁺ Behandlung (D). Ansonsten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Statistik: Fluo-8 Intensität wurde durch DAPI-Intensität geteilt. Für die Berechnung des SOCE wurde die Differenz des letzten Fluoreszenzwertes vor Ca²⁺ Inkubation und des letzten gemessenen Fluoreszenzwertes des Experiments berechnet. Statistische Varianz wurde als Tukey-Boxplots dargestellt. Ausreißer wurden aus der Wertung genommen. Normalverteilung der gemessenen Werte wurde über den *D'agostino pearson omnibus* Normalitätstest überprüft. Das Signifikanzniveau wurde über den *Ordinary One Way Anova*-Test bestimmt. Irrtumswahrscheinlichkeit p < 0,05 = *, p < 0,01 = **, p < 0,001 = ***, p < 0,0001 = ****.

Es zeigt sich ein erhöhter SOCE bei STIM1 DM und H₂O₂ Inkubation gegenüber STIM1 DM und keiner Inkubation (Abb. D). Ansonsten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. A, B, C, E).

Diese Ergebnisse ähneln den Ergebnissen der gemessenen MEF STIM1 -/- + STIM1-Plasmidvarianten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es in meinem Versuch innerhalb der gleichen Zelllinie zu einer gleichmäßig starken bzw. gleichmäßig schwachen STIM1-Aktivierung bei TG-induzierter ER-Vorratsentleerung, bei induziertem oxidativen Stress durch H₂O₂, der Kombination aus beidem, oder keiner Inkubation kommt.

Als Nächstes vergleiche ich das basale Kalziumniveau (Baseline) der MEF STIM1 -/- Zellen mit dem basalen Kalziumniveau der MEF STIM2 -/- Zellen.

5.9. STIM2 $-/-$ führt zu intrazellulär basal erhöhtem Kalziumniveau

STIM1 und STIM2 besitzen eine sehr ähnliche Aminosäurestruktur. Hauptsächliche Unterschiede liegen in einer veränderten C-terminalen Domäne in der Nähe der EF-Hand, sowie einer veränderten zytosolischen N-terminalen Domäne (Zhou et al. 2009). Die unterschiedliche C-terminale Domäne hat Einfluss auf die Kalziumaffinität der EF-Hand. STIM1 bindet Ca^{2+} -Ionen mit einer höheren Affinität als STIM2. Hieraus resultiert eine STIM2-Aktivierung bei geringeren ER-Kalziumausschlägen im Vergleich zu STIM1 (Stathopoulos, Zheng, and Ikura 2009; Brandman et al. 2007). STIM2 wird die Rolle eines zentralen Sensorproteins zugeschrieben. Es ist in der Lage, das zytosolische und ER- Ca^{2+} Niveau engmaschig zu regulieren (Stathopoulos, Zheng, and Ikura 2009; Brandman et al. 2007).

Der Einfluss von STIM2 auf den SOCE wurde kontrovers diskutiert. STIM2 wurde einerseits einen hemmenden Einfluss auf den SOCE zugeschrieben (Soboloff et al. 2006). Andererseits wurde beschrieben, dass STIM2 $-/-$ keinen signifikanten Effekt auf den SOCE hat (Roos et al. 2005).

Um den Zusammenhang zwischen STIM2 $-/-$ und der basalen Kalziumkonzentration zu überprüfen, verglich ich das basale Ca^{2+} Niveau von MEF STIM1 $-/-$ Zellen + STIM1 WT mit denen von MEF STIM2 $-/-$ Zellen + STIM1 WT.

Um den Einfluss von STIM2 $-/-$ auf den SOCE zu untersuchen, stellte ich den SOCE derselben Zellreihen meinen verschiedenen Behandlungen gegenüber.

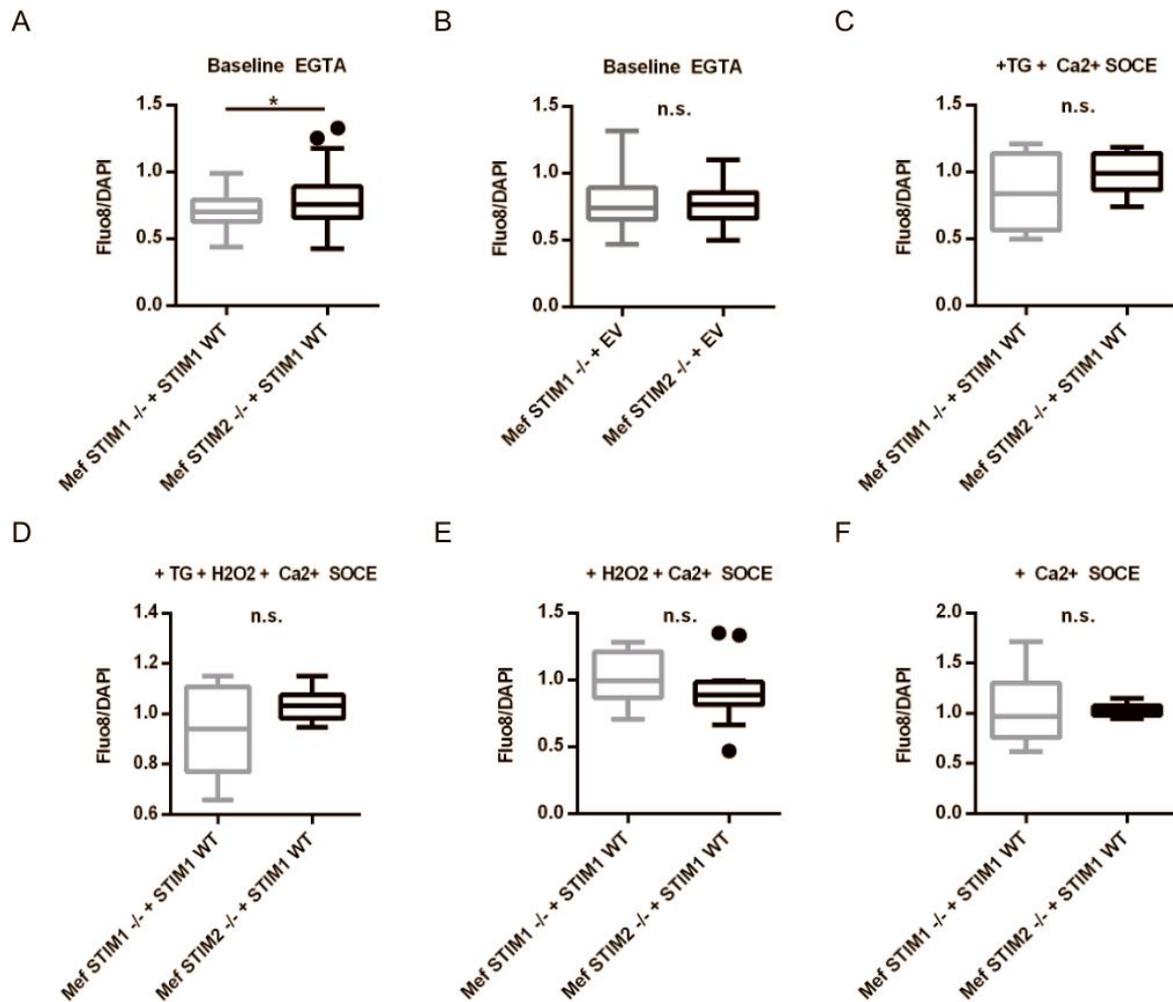


Abbildung 30 STIM2 $-/-$ führt zu basal erhöhter Kalziumkonzentration und hat keinen Einfluss auf den SOCE. Es wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten von allen MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT und MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT *Baselines* analysiert. Der Beginn des Experiments entspricht dem ersten Fluoreszenzwert der *Baseline*, der letzte Fluoreszenzwert vor der 1. Injektion dem letzten Fluoreszenzwert der *Baseline*. **Abbildung A:** MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT Zellen zeigen gegenüber MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT ein signifikant verringertes basales Fluoreszenzniveau. **Abbildung B:** MEF STIM1 $-/-$ + EV Zellen zeigen gegenüber MEF STIM2 $-/-$ + EV kein signifikant unterschiedliches Ergebnis. **Abbildung C:** TG-Inkubation führt zu keinem signifikanten Unterschied zwischen MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT und MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT Zellreihen SOCE. **Abbildung D:** TG- und H₂O₂-Inkubation führt zu keinem signifikanten Unterschied zwischen MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT und MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT Zellreihen SOCE. **Abbildung E:** H₂O₂-Inkubation führt zu keinem signifikanten Unterschied zwischen MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT und MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT Zellreihen SOCE. **Abbildung F:** alleinige Ca²⁺- Injektion führt zu keinem signifikanten Unterschied zwischen MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT und MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT Zellreihen. Statistik: Eventuelle Ausreißer wurden aus der Wertung genommen. Normalverteilung der gemessenen Werte wurde über den *D'agostino pearson omnibus* Normalitätstest geprüft. Alle gemessenen Werte waren normalverteilt. Das Signifikanzniveau wurde über den *unpaired t test with Welch's correction* bestimmt. Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05 = *$.

Abbildung 23 **A** zeigt eine signifikant erhöhte Ca^{2+} -Fluoreszenz des basalen Kalziumniveaus bei STIM2 $-/-$. Abbildung **B**: Aus den gemessenen Einzelwerten der MEF STIM1 $-/-$ + STIM1 WT Zelllinie wurde der Mittelwert gebildet. Dieser wurde als 100% gesetzt. Anschließend wurde aus den Einzelmessungen der MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT Zellen der Mittelwert gebildet. Dieser lag um 9,95% höher. Ein STIM2 $-/-$ scheint die basale Kalziumkonzentration um rund ein Zehntel zu erhöhen. **C-F** Die beiden Zellreihen wurden auf ihren SOCE bei unterschiedlicher Behandlung verglichen. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. STIM2 $-/-$ hat unter diesen Experimentbedingungen keinen signifikanten Einfluss auf einen erhöhten oder verringerten SOCE.

6. Diskussion

6.1. STIM1 Punctae liegen unmittelbar unter der Zellmembran

Durch die Ergebnisse meiner TIRF Mikroskopie zeige ich, dass sich in MEF STIM1 -/- + STIM1 WT Zellen ein signifikant erhöhter STIM1-Punctaeanteil nach Thapsigargin-induzierter Vorratsdepletion, sowie ebenfalls nach induziertem oxidativen Stress durch 100 μM H_2O_2 direkt unterhalb der Zellmembran befindet. Durch die TIRF-Mikroskopie, dass nur der Anteil an Fluoreszenz sichtbar sein würde, der sich direkt (50 nm) unterhalb des Objektträgers befindet. Diese Ergebnisse unterstützen die von Wu et al. gemachten Beobachtungen. Er beschrieb eine STIM1 Punctaebildung direkt unterhalb der Zellmembran nach TG-induzierter Depletion des Kalziumvorrats im ER. Durch TIRF-Mikroskopie wurde bewiesen, dass die Zellen unmittelbar unter der Plasmamembran liegen (Wu et al. 2006). Hawkins et al. beschrieb, dass STIM1 ebenfalls über oxidativen Stress in seine aktive, punctaebildende Form überführt werden kann (Hawkins et al. 2010). Meine Ergebnisse unterstützen diese These. STIM1 kann durch H_2O_2 in seine aktive Form überführt werden.

Es bleibt letztlich offen, ob H_2O_2 durch direkten oxidativen Stress oder indirekt über eine Senkung des ER-Kalziumvorrats zur Punctaebildung geführt hat.

Weiterführende Experimente mit Gabe von H_2O_2 sowie paralleler Messung des ER-Kalziums mit bspw. mag-fura-2, einem ER-Kalziumkomplexbildner, können hier Klarheit schaffen.

6.2. STIM1-Punktmutation vermindert Punctaebildung

In meinen Experimenten zeigten die MEF STIM2 -/- + STIM1 WT Zellen einen signifikant erhöhten Punctaeanteil gegenüber der BL nach TG-Injektion sowie nach Zugabe von H₂O₂. Hawkins et al. postulierte, dass es durch C56A-Mutation sowie der C49/C56A-Doppelmutation zu einer konstitutiven Punctaebildung des STIM1 Proteins kommt (Hawkins et al. 2010). Prins et al. postulierte ein Jahr später kontrastär, dass es bei C49/C56A Mutation zu einer geringeren Punctaebildung kommt. Grund hierfür sei die nicht mehr vorhandene Bindung zu ERp57 durch STIM1 Punktmutation der Cysteine C49 und C56 (Prins et al. 2011).

Bis dato blieb es fraglich, ob diese Mutationen eine Proteinaktivierung oder eine Proteindeaktivierung herbeiführen. STIM1 zeigte im Falle der BL ohne provozierte STIM1 Aktivierung einen signifikant erhöhten Punctaeanteil gegenüber der STIM1-Punktmutanten. Mein Ergebnisse sprechen gegen die von Hawkins et al. 2010 postulierten Ergebnisse, dass STIM1 durch C56M-Mutation und DM konstitutiv aktiviert werden. Nach provozierte STIM1 Aktivierung, ER-kalziumspeicherabhängig durch TG Injektion, sowie ER-kalziumspeicherunabhängig durch H₂O₂ Inkubation zeigte STIM1 WT ebenfalls einen signifikant erhöhten Punctaeanteil im Vergleich zu allen drei Mutanten. Diese Ergebnisse unterstützen die postulierten Ergebnisse von Prins et al. 2011, der eine Proteindeaktivierung durch Punktmutation an STIM1 C49, C56 und C49/56 Mutation beschrieb.

Unterschiede zwischen Hawkins et al. und mir sind, dass er die fluoreszierende Kolokalisation zwischen mcherry-STIM1 und YFP-ORAI1 auswertete. Ich arbeitete nur mit mcherry-STIM1 und wertete keine Kolokalisation aus.

Weiterführende Fluoreszenzexperimente könnten durch ein unterschiedliches TAG an STIM1, STIM2 und ORAI1 die Kolokalisation dieser Proteine darstellen.

6.3. Punktmutationen führen zu verringertem SOCE

Eine Mutation von STIM1 C49M führt in MEF STIM1 $-/-$ und MEF STIM2 $-/-$ zu einem signifikant eingeschränktem SOCE gegenüber dem STIM1 WT. Die Punktmutationen an C56M und der DM sowie des EV führen in der Tendenz ebenfalls zu einem verringerten SOCE. Diese war am deutlichsten bei doppelter STIM1-Aktivierung durch TG und H₂O₂ zu beobachten. Eine Inkubation mit TG führte ebenfalls zu den oben genannten Beobachtungen. Eine alleinige Inkubation mit H₂O₂ führte nur im Falle der MEF STIM1 $-/-$ Zellen zu diesem Ergebnis.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass TG und H₂O₂ beides voneinander unabhängige Aktivatoren von STIM1 WT sind, deren Effekt auf den SOCE sich bei gemeinsamer Inkubation potenziert. Prins et al. beschrieb einen teilweisen Wirkungsverlust im Falle einer C49A/C56A Doppelmutation mit verringertem SOCE (Prins et al. 2011). Hawkins et al. beschrieb eine konstitutive STIM1 Aktivierung (Hawkins et al. 2010). Meine Ergebnisse deuten in Richtung Prins et al. (2011)

Die STIM1-Mutationen besaßen in der Tendenz einen ähnlichen SOCE wie die STIM1 Knockout Zellen mit EV-Transfektion. Das heißt, dass in meinem Experiment entweder kein SOCE ausgelöst worden war, oder die EV Kontrolle einen ähnlich starken SOCE wie die STIM1-Plasmidvarianten besaß. Ein signifikanter Unterschied im SOCE zwischen STIM1 WT und EV wäre zu erwarten gewesen. Ein signifikanter Unterschied in STIM1 WT-Zellen bei TG- oder H₂O₂-Inkubation wäre gegenüber der Baseline ohne Inkubation ebenfalls zu erwarten gewesen (Roos et al. 2005, Peinelt et al. 2006, Muik et al. 2008, Hawkins et al. 2010; Prins et al. 2011).

Dies bedeutet, dass meine SOCE Messungen nur teilweise erfolgreich funktionierten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass ich ein Fluoreszenzmessgerät verwendete, welches nicht gleichzeitig injizieren und messen konnte. Die Experimente sollten an einem anderen Messgerät wiederholt werden.

Unterschiede zwischen den Ergebnissen zwischen Prins et al. und mir könnten sein, dass er als fluoreszierenden Kalziumkomplexbildner Fura-2 benutzte, während ich Fluo-8 verwendete. Hawkins et al. arbeitete ebenfalls mit anderen Geräten sowie mit Fluo-4. Desweiteren arbeitete Hawkins et al. mit transfizierten STIM1-Plasmidvarianten in DT40 Zellen, während Prins et al. und ich mit MEF-Zellen arbeiteten

6.4. Intra- oder Intermolekulare STIM1 Modulierung

Die genauen molekularen Mechanismen der Modulation an C49 und C56 sind weiterhin unklar. Prins et al. beschrieb, dass STIM1 zwischen C49 und C56 eine intramolekulare Disulphidbrücke bildete. Durch Punktmutation einer der beiden Aminosäuren kann diese Brücke nicht mehr gebildet werden. Die Redoxsensitivität des STIM1 Proteins wurde durch Bindung oder Entkopplung der Oxidoreduktase ERp57 ermöglicht (Prins et al. 2011). Hawkins et al. beschrieb hingegen eine Redoxsensitivität des STIM1 Proteins durch S-Glutathionylierung an C56 nach oxidativem Stress (Hawkins et al. 2010).

In meinen Ergebnissen zeigt C56M Punktmutation einen signifikant erhöhten Punctaeanteil gegenüber C49M nach TG Injektion und H₂O₂ Inkubation. STIM1 DM führt zu einem signifikant erhöhtem Punctaeanteil gegenüber C49M im Falle von BL, TG und H₂O₂.

Da in meinen Ergebnissen vor allem C49 Punktmutation zu einer eingeschränkten Oligomerisierung geführt hat, bedeutet dies, dass eine intermolekulare STIM1-STIM1 Brücke zwischen C49 und C56 unwahrscheinlich ist. Des Weiteren ist eine von Prins et al. postulierte intramolekulare STIM1 Brücke zwischen C49 und C56 eher unwahrscheinlich. Dies macht es ebenfalls unwahrscheinlich, dass ERp57 allein für die Redoxsensitivität des STIM1 verantwortlich ist (Prins et al. 2011).

Meine Ergebnisse sprechen ebenfalls gegen die von Hawkins et al. beschriebene S-Glutathionylierung von C56, da in den Experimenten von meiner Betreuerin und mir eine Redoxsensitivität im Falle der C49M, der C56M und der Doppelmutation verloren gegangen ist.

Meine Ergebnisse sprechen dafür, dass es im bei STIM1 WT im Falle von ER-Kalziumdepletion und H₂O₂ entweder zu einer kombinierten intermolekularen STIM1-STIM1 C49-C49 und C56-C56 Doppelbindung kommt (hierbei stabilisiert C49-C49 den größeren Anteil in oligomerisierter STIM1-Konformation), oder eine kombinierte S-Glutathionylierung von STIM1 C49-Glutathion und C56-Glutathion entsteht. Prinzipiell wäre auch eine Kombination aus C49-C49 Bindung mit C56-Glutathion, sowie C56-C56 Bindung mit C49-Glutathion funktionsfähig.

Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen Hawkins et al. 2010 und mir könnten sein, dass Hawkins für seine Mutanten DT40 Zellen verwendete, während ich mit MEF-Zellen arbeitete. Seine beschriebenen Ergebnisse, dass es in MEF STIM1 *knockout* Zellen gegenüber STIM1 WT zu einem Wirkungsverlust der oxidativen

Sensorfunktion kam, können meine Ergebnisse bestätigen. Des Weiteren verwendete er für die Punktmutationen an C49 und C56 die Aminosäure Alanin, während ich Methionin verwendete.

Weiterführende Experimente können zu einem besseren Verständnis führen, durch welche weitere Kofaktoren C49 und C56 moduliert werden können. Die bisher beschriebene STIM1 Proteinaktivierung durch S-Glutathionylierung an C56 und Proteindeaktivierung durch ERp57 an C49 und C56 zeigen, dass es vielfältige Möglichkeiten gibt, die STIM1 Aktivierung zu steuern und zu modulieren. Diese Modulationen können letztlich zu einer gesteigerten oder einer abgeschwächten EF-Hand-Kalziumaffinität führen (Stathopoulos, Zheng, and Ikura 2009; Brandman et al. 2007).

6.5. STIM2 Knockout hat Einfluss auf STIM1 Punctaebildung

STIM2 reguliert als ER-membranständiges Protein den zytosolischen und ER-Kalziumspiegel engmaschig. Durch seine geringe Ca^{2+} Affinität zur EF-Hand können bereits geringe ER-Kalziumkonzentrationsänderungen registriert und ausgeglichen werden. (Stathopoulos, Zheng, and Ikura 2009; Brandman et al. 2007) Ein STIM2-Knockout scheint diese Feinregulierung der intrazellulären Kalziumhomöostase signifikant zu verändern. Meine Ergebnisse sprechen dafür, dass durch STIM2 Knockout ein um ca. 10% erhöhte Kalziumniveau erreicht wird.

STIM2 hat keinen signifikanten Einfluss auf den SOCE (Roos et al. 2005). Meine Ergebnisse bekräftigen diese Postulierung. STIM2 Wegfall führte bei STIM1 WT Überexpression weder durch induzierte ER-Kalziumspeicherdepletion noch (ER-kalziumspeicherunabhängig) durch oxidativen Stress zu einem signifikant veränderten SOCE.

Die Ergebnisse meiner Fluoreszenzmikroskopie zeigen ohne vorherige Behandlung einen Punctaeanteil von ca. 40 % in der MEF STIM2 $-/-$ + STIM1 WT Zellreihe. Die Punctaeauswertung von meiner Betreuerin zeigen einen Punctaeanteil von nur ca. 10%. Ursächlich hierfür könnte der Wegfall von STIM2 sein. Hierdurch könnte die sensible Kalziumsensorfunktion von STIM2 entfallen sein, die geringe ER-Kalziumausschläge puffern kann. Der Wegfall von STIM2 könnte anschließend zu größeren ER-Kalziumkonzentrationsänderungen führen. Dadurch könnte STIM1 in seine aktive, Punctaebildende Form überführt worden sein. Um diese Theorie zu überprüfen, sollte in weiteren Experimenten mithilfe eines ER-Kalziumkomplexbildners die ER-Kalziumkonzentration bei STIM2 An- und Abwesenheit gemessen werden.

Interessanterweise zeigen MEF STIM1 WT STIM2 $-/-$ Zellen in meinen Fluoreszenzversuchen eine gleichstarke Reaktion auf Thapsigargin und H_2O_2 . Dies steht im Kontrast zu den Fluoreszenzversuchen von meiner Betreuerin. Hier zeigte Thapsigargin eine deutlich erhöhte Reaktion als H_2O_2 .

Dies bedeutet, dass endogenes STIM2 in Eukaryoten die STIM1 Punctaebildung abschwächt. Demzufolge könnte STIM2 eine Pufferfunktion für H_2O_2 zugeschrieben werden. Voraussetzung hierfür wäre eine direkte oder indirekte Interaktion von H_2O_2 mit STIM2. Diese Theorie sollte in weiteren Experimenten mit kombinierten MEF STIM1 $-/-$ STIM2 $-/-$ + STIM2 Zellen mithilfe von Kalziumfluoreszenzversuchen überprüft werden.

7. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und der Kalziumfluoreszenzmessungen können anhand von bereits publizierten Artikeln das gemeinsame Modell der STIM1-Punctaebildung, der anschließenden Aktivierung von ORAI1 und dem folgenden SOCE ergänzen:

Oxidativer Stress moduliert an C49, C56 oder an beiden Cysteinresten die Kalziumaffinität der STIM1 EF-Hand. Hierdurch wird die Kalziumaffinität des gebundenen Ca^{2+} -Ions in der EF-Hand gesenkt. STIM1 wird aktiviert und bildet Punctae, ebenso wie beim ER-Kalziumabfall. Der Effekt von oxidativem Stress auf die STIM1-Punctaebildung ist in STIM1 WT genauso stark wie durch ER-Kalziumabfall. STIM1 Punctae aktivieren ORAI1. Hieraus resultiert ein Kalziumeinstrom, die ER-Kalziumvorräte steigen wieder. Dadurch wird Kalzium erneut in die EF-Hand zurückgedrängt. Aktiviertes STIM1 wird hierdurch zu inaktivem STIM1. Durch die vorherige oxidative Modulation der EF-Hand an C49, C56 oder an beiden wurde die Kalziumaffinität der EF-Hand gesenkt. Des Weiteren werden die Speicher des ERs durch TG langsamer aufgefüllt, weshalb auch hier STIM1 nur verzögert in seine inaktive Form zurückkehrt: Der Effekt von H_2O_2 und TG potenziert sich, es resultiert eine stärkere und längere Aktivierung von ORAI1, was letztlich zu einem erhöhten SOCE führt.

Punktmutationen an C49M, C56M und DM scheinen das fein abgestimmte System der STIM1-Punctaebildung durch ein gehemmtes Aktivierungsmuster des STIM1 Proteins entscheidend zu beeinflussen. C49M-Mutation zeigte in der Fluoreszenzmikroskopie und den Kalziumfluoreszenzmessungen den größten Funktionsverlust. Meine Ergebnisse sprechen dafür, dass durch die geringere STIM1-Punctaebildung ein geringerer SOCE resultiert.

STIM2 $-/-$ besitzt in meinen Experimenten keinen relevanten Einfluss auf den SOCE. Wegfall von STIM2 scheint jedoch zu einem basal erhöhten Kalziumniveau zu führen. H_2O_2 Behandlung führt bei STIM2 Knockout zu einer erhöhten STIM1 Punctaebildung. Dies bedeutet, dass STIM2 durch H_2O_2 die STIM1 Punctaefunktion beeinflusst. Ursächlich hierfür könnte eine direkte oder indirekte STIM2 Modulation durch H_2O_2 sein. STIM2 könnte somit eine Pufferfunktion für reaktive Sauerstoffspezies einnehmen.

8. Literaturverzeichnis

- Albarran, L., J. J. Lopez, N. B. Amor, F. E. Martin-Cano, A. Berna-Erro, T. Smani, G. M. Salido, and J. A. Rosado. 2016. 'Dynamic interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to modulate store-operated calcium entry', *Sci Rep*, 6: 24452.
- Anathy, V., S. W. Aesif, A. S. Guala, M. Havermans, N. L. Reynaert, Y. S. Ho, R. C. Budd, and Y. M. Janssen-Heininger. 2009. 'Redox amplification of apoptosis by caspase-dependent cleavage of glutaredoxin 1 and S-glutathionylation of Fas', *J Cell Biol*, 184: 241-52.
- Baba, Y., K. Hayashi, Y. Fujii, A. Mizushima, H. Watarai, M. Wakamori, T. Numaga, Y. Mori, M. Iino, M. Hikida, and T. Kurosaki. 2006. 'Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 16704-9.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, and H. L. Roderick. 2003. 'Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 517-29.
- Berridge, M. J., P. Lipp, and M. D. Bootman. 2000. 'The versatility and universality of calcium signalling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 11-21.
- Bootman, M. D., C. W. Taylor, and M. J. Berridge. 1992. 'The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca²⁺ spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor', *J Biol Chem*, 267: 25113-9.
- Brandman, O., J. Liou, W. S. Park, and T. Meyer. 2007. 'STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels', *Cell*, 131: 1327-39.
- Christensen, K. A., J. T. Myers, and J. A. Swanson. 2002. 'pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages', *J Cell Sci*, 115: 599-607.
- Clapham, D. E. 2007. 'Calcium signaling', *Cell*, 131: 1047-58.
- Cleveland, D. W., S. G. Fischer, M. W. Kirschner, and U. K. Laemmli. 1977. 'Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis', *J Biol Chem*, 252: 1102-6.
- Coe, H., and M. Michalak. 2010. 'ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase', *Int J Biochem Cell Biol*, 42: 796-9.
- Covington, E. D., M. M. Wu, and R. S. Lewis. 2010. 'Essential role for the CRAC activation domain in store-dependent oligomerization of STIM1', *Mol Biol Cell*, 21: 1897-907.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, G. Colombo, D. Giustarini, and A. Milzani. 2009. 'Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans', *Trends Biochem Sci*, 34: 85-96.
- Ermak, G., and K. J. Davies. 2002. 'Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death', *Mol Immunol*, 38: 713-21.
- Feske, S., J. Giltner, R. Dolmetsch, L. M. Staudt, and A. Rao. 2001. 'Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes', *Nat Immunol*, 2: 316-24.
- Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S. H. Puppel, B. Tanasa, P. G. Hogan, R. S. Lewis, M. Daly, and A. Rao. 2006. 'A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function', *Nature*, 441: 179-85.
- Feske, S., M. Prakriya, A. Rao, and R. S. Lewis. 2005. 'A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients', *J Exp Med*, 202: 651-62.
- Gilibert, J. A., D. Bakowski, and A. B. Parekh. 2001. 'Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx', *EMBO J*, 20: 2672-9.

- Hagen, B. M., L. Boyman, J. P. Kao, and W. J. Lederer. 2012. 'A comparative assessment of fluo Ca²⁺ indicators in rat ventricular myocytes', *Cell Calcium*, 52: 170-81.
- Hajnoczky, G., E. Davies, and M. Madesh. 2003. 'Calcium signaling and apoptosis', *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 445-54.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. 'Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches', *Pflugers Arch*, 391: 85-100.
- Hawkins, B. J., K. M. Irrinki, K. Mallilankaraman, Y. C. Lien, Y. Wang, C. D. Bhanumathy, R. Subbiah, M. F. Ritchie, J. Soboloff, Y. Baba, T. Kurosaki, S. K. Joseph, D. L. Gill, and M. Madesh. 2010. 'S-glutathionylation activates STIM1 and alters mitochondrial homeostasis', *J Cell Biol*, 190: 391-405.
- Henkart, M. P., T. S. Reese, and F. J. Brinley, Jr. 1978. 'Endoplasmic reticulum sequesters calcium in the squid giant axon', *Science*, 202: 1300-3.
- Hilgemann, D. W., A. Yaradanakul, Y. Wang, and D. Fuster. 2006. 'Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease', *J Cardiovasc Electrophysiol*, 17 Suppl 1: S47-S56.
- Hogan, P. G., and A. Rao. 2007. 'Dissecting ICRCAC, a store-operated calcium current', *Trends Biochem Sci*, 32: 235-45.
- Huddleston, A. T., W. Tang, H. Takeshima, S. L. Hamilton, and E. Klann. 2008. 'Superoxide-induced potentiation in the hippocampus requires activation of ryanodine receptor type 3 and ERK', *J Neurophysiol*, 99: 1565-71.
- Ihara, Y., K. Kageyama, and T. Kondo. 2005. 'Overexpression of calreticulin sensitizes SERCA2a to oxidative stress', *Biochem Biophys Res Commun*, 329: 1343-9.
- Kaplan, P., E. Babusikova, J. Lehotsky, and D. Dobrota. 2003. 'Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum', *Mol Cell Biochem*, 248: 41-7.
- Lassen, U. V., and O. Sten-Knudsen. 1968. 'Direct measurements of membrane potential and membrane resistance of human red cells', *J Physiol*, 195: 681-96.
- Lewis, R. S. 2001. 'Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes', *Annu Rev Immunol*, 19: 497-521.
- Liou, J., M. Fivaz, T. Inoue, and T. Meyer. 2007. 'Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 9301-6.
- Luik, R. M., B. Wang, M. Prakriya, M. M. Wu, and R. S. Lewis. 2008. 'Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation', *Nature*, 454: 538-42.
- Luik, R. M., M. M. Wu, J. Buchanan, and R. S. Lewis. 2006. 'The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions', *J Cell Biol*, 174: 815-25.
- Ma, G., M. Wei, L. He, C. Liu, B. Wu, S. L. Zhang, J. Jing, X. Liang, A. Senes, P. Tan, S. Li, A. Sun, Y. Bi, L. Zhong, H. Si, Y. Shen, M. Li, M. S. Lee, W. Zhou, J. Wang, Y. Wang, and Y. Zhou. 2015. 'Inside-out Ca(2+) signalling prompted by STIM1 conformational switch', *Nat Commun*, 6: 7826.
- Manji, S. S. M., N. J. Parker, R. T. Williams, L. van Stekelenburg, R. B. Pearson, M. Dziadek, and P. J. Smith. 2000. 'STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface', *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1481: 147-55.

- Maruyama, Y., T. Ogura, K. Mio, K. Kato, T. Kaneko, S. Kiyonaka, Y. Mori, and C. Sato. 2009. 'Tetrameric Orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain', *J Biol Chem*, 284: 13676-85.
- Mignen, O., J. L. Thompson, and T. J. Shuttleworth. 2008. 'Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore', *J Physiol*, 586: 419-25.
- Muik, M., I. Frischauf, I. Derler, M. Fahrner, J. Bergsmann, P. Eder, R. Schindl, C. Hesch, B. Polzinger, R. Fritsch, H. Kahr, J. Madl, H. Gruber, K. Groschner, and C. Romanin. 2008. 'Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation', *J Biol Chem*, 283: 8014-22.
- Navarro-Borelly, L., A. Somasundaram, M. Yamashita, D. Ren, R. J. Miller, and M. Prakriya. 2008. 'STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy', *J Physiol*, 586: 5383-401.
- Oritani, K., and P. W. Kincade. 1996. 'Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells', *Journal of Cell Biology*, 134: 771-82.
- Palty, R., A. Raveh, I. Kaminsky, R. Meller, and E. Reuveny. 2012. 'SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling', *Cell*, 149: 425-38.
- Parekh, A. B. 2008. 'Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels', *Cell Calcium*, 44: 6-13.
- Parekh, A. B., and J. W. Putney, Jr. 2005. 'Store-operated calcium channels', *Physiol Rev*, 85: 757-810.
- Park, C. Y., P. J. Hoover, F. M. Mullins, P. Bachhawat, E. D. Covington, S. Raunser, T. Walz, K. C. Garcia, R. E. Dolmetsch, and R. S. Lewis. 2009. 'STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1', *Cell*, 136: 876-90.
- Parker, N. J., C. G. Begley, P. J. Smith, and R. M. Fox. 1996. 'Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5', *Genomics*, 37: 253-6.
- Partiseti, M., F. Le Deist, C. Hivroz, A. Fischer, H. Korn, and D. Choquet. 1994. 'The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency', *J Biol Chem*, 269: 32327-35.
- Pedriali, G., A. Rimessi, L. Sbano, C. Giorgi, M. R. Wieckowski, M. Previati, and P. Pinton. 2017. 'Regulation of Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Ca(2+) Transfer and Its Importance for Anti-Cancer Therapies', *Front Oncol*, 7: 180.
- Peinelt, C., M. Vig, D. L. Koomoa, A. Beck, M. J. Nadler, M. Koblan-Huberson, A. Lis, A. Fleig, R. Penner, and J. P. Kinet. 2006. 'Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)', *Nat Cell Biol*, 8: 771-3.
- Penna, A., A. Demuro, A. V. Yeromin, S. L. Zhang, O. Safrina, I. Parker, and M. D. Cahalan. 2008. 'The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers', *Nature*, 456: 116-20.
- Porter, K. R., A. Claude, and E. F. Fullam. 1945. 'A Study of Tissue Culture Cells by Electron Microscopy : Methods and Preliminary Observations', *J Exp Med*, 81: 233-46.
- Prakriya, M., S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao, and P. G. Hogan. 2006. 'Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel', *Nature*, 443: 230-3.
- Prins, D., J. Groenendyk, N. Touret, and M. Michalak. 2011. 'Modulation of STIM1 and capacitative Ca²⁺ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57', *EMBO Rep*, 12: 1182-8.
- Putney, J. W., Jr., L. M. Broad, F. J. Braun, J. P. Lievremont, and G. S. Bird. 2001. 'Mechanisms of capacitative calcium entry', *J Cell Sci*, 114: 2223-9.

- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft, and T. Pozzan. 1998. 'Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses', *Science*, 280: 1763-6.
- Roos, J., P. J. DiGregorio, A. V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J. A. Kozak, S. L. Wagner, M. D. Cahalan, G. Velicelebi, and K. A. Stauderman. 2005. 'STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function', *J Cell Biol*, 169: 435-45.
- Sabbioni, S., G. BarbantiBrodano, C. M. Croce, and M. Negrini. 1997. 'GOK: A gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development', *Cancer Research*, 57: 4493-97.
- Shampo, M. A., and R. A. Kyle. 2002. 'Kary B. Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA', *Mayo Clin Proc*, 77: 606.
- Soboloff, J., M. A. Spassova, T. Hewavitharana, L. P. He, W. Xu, L. S. Johnstone, M. A. Dziadek, and D. L. Gill. 2006. 'STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry', *Curr Biol*, 16: 1465-70.
- Stathopoulos, P. B., L. Zheng, and M. Ikura. 2009. 'Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics', *J Biol Chem*, 284: 728-32.
- Stathopoulos, P. B., L. Zheng, G. Y. Li, M. J. Plevin, and M. Ikura. 2008. 'Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry', *Cell*, 135: 110-22.
- Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker, and J. B. Hogenesch. 2004. 'A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 6062-7.
- Subedi, K. P., H. L. Ong, G. Y. Son, X. Liu, and I. S. Ambudkar. 2018. 'STIM2 Induces Activated Conformation of STIM1 to Control Orai1 Function in ER-PM Junctions', *Cell Rep*, 23: 522-34.
- Vasington, F. D., P. Gazzotti, R. Tiozzo, and E. Carafoli. 1972. 'The effect of ruthenium red on Ca²⁺ transport and respiration in rat liver mitochondria', *Biochim Biophys Acta*, 256: 43-54.
- Veal, E. A., A. M. Day, and B. A. Morgan. 2007. 'Hydrogen peroxide sensing and signaling', *Mol Cell*, 26: 1-14.
- Vergara, C., R. Latorre, N. V. Marrion, and J. P. Adelman. 1998. 'Calcium-activated potassium channels', *Curr Opin Neurobiol*, 8: 321-9.
- Vig, M., W. I. DeHaven, G. S. Bird, J. M. Billingsley, H. Wang, P. E. Rao, A. B. Hutchings, M. H. Jouvin, J. W. Putney, and J. P. Kinet. 2008. 'Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels', *Nat Immunol*, 9: 89-96.
- Weislogel, J. M., C. P. Bengtson, M. K. Muller, J. N. Hortsch, M. Bujard, C. M. Schuster, and H. Bading. 2013. 'Requirement for nuclear calcium signaling in *Drosophila* long-term memory', *Sci Signal*, 6: ra33.
- Westheimer, F. H. 1987. 'Why nature chose phosphates', *Science*, 235: 1173-8.
- Williams, R. T., S. S. M. Manji, N. J. Parker, M. S. Hancock, L. Van Stekelenburg, J. P. Eid, P. V. Senior, J. S. Kazenwadel, T. Shandala, R. Saint, P. J. Smith, and M. A. Dziadek. 2001. 'Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins', *Biochemical Journal*, 357: 673-85.
- Wu, M. M., J. Buchanan, R. M. Luik, and R. S. Lewis. 2006. 'Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane', *J Cell Biol*, 174: 803-13.

- Yang, X., H. Jin, X. Cai, S. Li, and Y. Shen. 2012. 'Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 5657-62.
- Yarkoni, Y., and J. C. Cambier. 2011. 'Differential STIM1 expression in T and B cell subsets suggests a role in determining antigen receptor signal amplitude', *Mol Immunol*, 48: 1851-8.
- Yen, M., L. A. Lokteva, and R. S. Lewis. 2016. 'Functional Analysis of Orai1 Concatemers Supports a Hexameric Stoichiometry for the CRAC Channel', *Biophys J*, 111: 1897-907.
- Yeromin, A. V., J. Roos, K. A. Stauderman, and M. D. Cahalan. 2004. 'A store-operated calcium channel in *Drosophila* S2 cells', *J Gen Physiol*, 123: 167-82.
- Zhang, S. L., Y. Yu, J. Roos, J. A. Kozak, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, K. A. Stauderman, and M. D. Cahalan. 2005. 'STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane', *Nature*, 437: 902-5.
- Zhou, Y., S. Mancarella, Y. Wang, C. Yue, M. Ritchie, D. L. Gill, and J. Soboloff. 2009. 'The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels', *J Biol Chem*, 284: 19164-8.
- Zhou, Y., P. Meraner, H. T. Kwon, D. Machnes, M. Oh-hora, J. Zimmer, Y. Huang, A. Stura, A. Rao, and P. G. Hogan. 2010. 'STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro', *Nat Struct Mol Biol*, 17: 112-6.
- Zhou, Y., R. M. Nwokonko, X. Cai, N. A. Loktionova, R. Abdulqadir, P. Xin, B. A. Niemeyer, Y. Wang, M. Trebak, and D. L. Gill. 2018. 'Cross-linking of Orai1 channels by STIM proteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E3398-E407.
- Zhou, Y., S. Ramachandran, M. Oh-Hora, A. Rao, and P. G. Hogan. 2010. 'Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 4896-901.

Lebenslauf

Felix Sebastian Wunder

[*19.09.1992 in Hessen, Marburg]

Ausbildung

November 2019

3. Staatsexamen Medizin, mündlich Note 2

Oktober 2018

2. Staatsexamen Medizin, schriftlich Note 2

Januar 2017 – Mai 2017

Auslandssemester

Universidad del Norte, Barranquilla, Kolumbien

März 2015

1. Staatsexamen Medizin, schriftlich: Note 2

Seit April 2013

Studium der Humanmedizin

Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Juni 2011

Abitur

Martin-Luther-Schule Marburg, Note: 1,8

Wissenschaftliches Engagement

Oktober 2015 – April 2016

Experimentelle Doktorarbeit:

Effekt von Punktmutationen in redoxsensitiven Aminosäuren auf die Funktion des Kalziumsensorproteins Stromal interaction molecule 1

Institut für molekulare Medizin

Oktober 2014 – Dezember 2017

Hilfswissenschaftler:

Institut für funkt. und klin. Anatomie, Mainz

Berufliche Erfahrung

Famulaturen:

2018: Orthopädie und Unfallchirurgie, Univ. Mainz

2017: Allgemeinmedizin, Marburg

2016: Gefäßchirurgie, Lahr

2015: Anästhesie, Marburg

Soziales Engagement

2013 – 2019

Gewähltes Mitglied der Fachschaft Medizin

Stipendien

Auslandsstipendium der Universität Mainz

Studium an der Partneruniversität Universidad del Norte in Kolumbien

Sprachkenntnisse

Deutsch: Muttersprache

Englisch: fließend

Spanisch: flüssig