

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

Eine neue STIM1-Spleißvariante modifiziert den
speichergesteuerten Calciumeinstrom

A new STIM1 splice variant alters store operated calcium entry

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2021

vorgelegt von
MONA LUISE KNAPP
geb. SCHÖPPE am 20/07/1992 in Bad Bergzabern

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
EINLEITUNG	1
1.1 Calciumhomöostase der Zelle	1
1.2 Der speichergesteuerte Calciumeinstrom	4
1.3 STIM1-Spleißvarianten	8
1.3.1 C-terminales Spleißen	8
1.3.2 N-terminales Spleißen	10
1.3. Testis, Calcium und STIM	11
1.3.1 Allgemeiner anatomischer Aufbau der Testes	11
1.3.2 Die Relevanz von Calcium für das männliche Reproduktionssystem	13
1.3.3 STIM1 in Testis	14
1.3.4 Das hochkomplexe ER der Sertoli-Zellen	14
1.4 Zielsetzung	17
MATERIALIEN	19
2.1 Verwendete Zelllinien und Primärzellen	19
2.2 Medien	19
2.3 Enzyme	19
2.4 siRNA	19
2.5 Primer	20
2.6 Verwendete Konstrukte	21
2.7 Antikörper	22
2.8 Kits	22
2.9 Reagenzien	23
2.10 Lösungen	24
2.10.1 Imaging Lösungen	24
2.10.2 SDS-Page (Polyacrylamid Gel Elektrophorese) & Western Blot-Lösungen	24
2.10.3 Weitere Lösungen	26
2.11 Bakterienstämme	27
2.12 Größenstandards	27
2.13 Laborgeräte	27
2.14 Verbrauchsmaterialien	29
2.15 Software	29
METHODEN	30
3.1 Zellkultur und Zellisolation	30
3.1.1 Zelllinien	30
3.1.2 Isolierung und Kultivierung hippocampaler Astrozyten	30
3.2 Transfektionstechniken	30
3.2.1 Elektroporation	30
3.2.2. jetPrime	31
3.2.3 jetOptimus	31
3.2.4 Interferin	31
3.3 Rekombinante DNA- und molekularbiologische Techniken	32
3.3.1 Restriktion	32

3.3.2 Dephosphorylierung	32
3.3.3 Phosphorylierung	33
3.3.4 Ligation	33
3.3.3 Gelelektrophorese und Gelextraktion	33
3.3.4 Gateway Klonierung	34
3.3.5 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Bakterien	35
3.3.6 Plasmidaufreinigung	35
3.3.7 RNA Isolation	35
3.3.8 cDNA Synthese	35
3.3.9 PCR	35
3.3.10 qRT-PCR	37
3.4 Proteinbiochemie	37
3.4.1 Lysatgenerierung	37
3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	38
3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	38
3.5 Interaktionsanalysen	39
3.5.1 Ko-Immunpräzipitation	39
3.5.2 BiFC mittels durchflusszytometrische Bestimmung	40
3.6 Immunzyto- und Immunhistochemie	42
3.6.1 Immunzytochemie	42
3.6.2 Immunhistochemie	42
3.7 Mikroskopie von Lebendzellen	43
3.7.1 Fluoreszenzbasiertes Calciumimaging	43
3.7.2 TIRF-Mikroskopie zur FRET Analyse	45
3.7.3 Kollokalisierung	46
3.7.4 NFAT-Translokation	46
3.8 Statistik	47
ERGEBNISSE	48
4.1 Alternatives Spleißen und Expression von STIM1A	48
4.1.1 STIM1A ist eine neue evolutionär konservierte STIM1-Spleißvariante	48
4.1.2 <i>Stim1A</i> wird ubiquitär exprimiert	49
4.2 Funktionelle Analyse von STIM1A	55
4.2.1 STIM1A führt zu einem geringeren Calcium Einstrom im Vergleich zu STIM1.	55
4.2.2 Ein Knock-down & -out von Stim1A erhöht den SOCE	57
4.2.3 STIM2 hat keinen Einfluss auf den STIM1A-induzierten SOCE	58
4.2.4 Spleißen von STIM1A hat keine Auswirkungen auf zelluläre Calciumspeicher	61
4.2.5 STIM1A kann alle ORAI-Homologe aktivieren	62
4.2.6 <i>Domäne A</i> beeinflusst die prinzipielle Interaktion mit ORAI1 nicht	66
4.2.7 Clustergröße	67
4.2.8 Zwei spezifische Aminosäuren vermitteln den reduzierten Phänotyp von STIM1A	68
4.2.9 STIM1A beeinflusst das N-terminale Gating von ORAI1	75
4.3 STIM1A Lokalisierung <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i>	78
4.3.1 STIM1A Lokalisierung <i>in vitro</i> nach heterologer Expression	78
4.3.2 STIM1A Lokalisierung <i>ex vivo</i>	81
4.4 Interaktionspartner von STIM1A	88
4.4.1 Immunpräzipitation via HA-tag	89
4.4.2 Massenspektrometrische Analyse und Kandidatenauswahl	91
4.4.3 Bimolekularer Fluoreszenzkomplementations-Assay	96
4.4.4 Immunpräzipitation von STIM1(A) und der PDE8B	97
4.5. Regulation der NFAT-Translokation	99
4.5.1 STIM1A steigert die Translokation NFAT in den Nucleus	100
4.5.2 Inhibition der PDE8B erhöht die STIM1-induzierte NFAT-Translokation	101
4.5.3 PF-0495732 hat keine Auswirkung auf den SOCE	104

DISKUSSION	106
5.1 Expression	106
5.2 Funktionelle Charakterisierung	108
5.3 Lokalisierung	116
5.4 Interaktionspartner	121
5.5 Physiologische Funktion: NFAT-Translokation	126
LITERATURVERZEICHNIS	131
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	143
TABELLENVERZEICHNIS	145
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	146
PUBLIKATIONEN	148
KONFERENZEN UND PREISE	149
DANKSAGUNG	150
CURRICULUM VITAE	151

Zusammenfassung

Der sekundäre Botenstoff Calcium (Ca^{2+}) ist für die Regulation einer Vielfalt von intrazellulären Prozessen essenziell. Die strikte Regulation der Calciumhomöostase ist deshalb für die Vitalität von Zellen unabdingbar. Ein wichtiger Regulationsmechanismus ist der Speicher-gesteuerte Calciumstrom (SOCE), bei dem in Abhängigkeit der freien $[\text{Ca}^{2+}]$ im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) Calciumkanäle der ORAI Proteinfamilie in der Plasmamembran aktiviert werden können, um intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationsveränderungen auszugleichen. Die Proteinfamilie, die den Füllstand des ERs detektiert und dessen Zustand an die Calciumkanäle in der PM vermittelt, sind die STIM (*engl. Stromal interaction molecule*) Proteine.

In dieser Arbeit wird die hoch konservierte STIM1-Spleißvariante STIM1A charakterisiert. Die Insertion des zusätzlichen *Exons (A)* zwischen *Exon 10* und *11*, resultiert auf Proteinebene in einer Verlängerung des C-Terms um 31 Aminosäuren, ohne dabei das Leseraster der Translation zu verändern. *Exon A* ist in der Maus mit variierender Expressionsstärke ubiquitär exprimiert. Besonders abundant ist Exon A cDNA in Testis, Herz und Astrozyten. Funktionell konnte mittels Überexpressions- und Knock-down-Experimenten via Ca^{2+} -Imaging gezeigt werden, dass es sich bei Stim1A um eine Spleißvariante handelt, die in der Lage ist, alle murinen und humanen ORAI-Homologe zu aktivieren. Allerdings werden alle Homologe weniger stark aktiviert als von der wildtypischen Variante STIM1. Der daraus resultierende reduzierte SOCE hat weder Auswirkungen auf die Menge des intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} , noch wird er durch das STIM1-Homolog STIM2 beeinflusst. STIM1A ist in der Lage, alle murinen und humanen ORAI-Homologe zu aktivieren. Innerhalb von Domäne A konnten zwei Aminosäuren identifiziert werden, die für den reduzierten SOCE verantwortlich sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Spleißen von *Exon A* das N-terminale Gating von ORAI1 beeinflusst. *In vitro* kolokalisiert STIM1A mit STIM1 in HEK293-Zellen. Mit Hilfe eines für diese Arbeit produzierten Antikörpers, der spezifisch für ein Aminosäuremotiv in Domäne A ist, wurde mittels immunhistologischen Untersuchungen gezeigt, dass die Abwesenheit von Stim1A die Lokalisierung von Stim1 in murinen testikulären Sertoli-Zellen verändert. Physiologisch ist STIM1A neben der Hauptaufgabe als Regulator des SOCE ebenfalls an der Translokation des

Transkriptionsfaktors NFAT beteiligt. Überexpression von STIM1A führt zu einer verstärkten Translokation von NFAT in den Nukleus. Via Massenspektrometrie wurden Kandidaten potentieller neuer Interaktionspartner von STIM1 und STIM1A identifiziert und eine Auswahl der Kandidaten mittels bimolekularem Fluoreszenz-komplementationsassay bestätigt. Hierbei wurde zunächst die Interaktion mit der Phosphodiesterase 8B (PDE8B) funktionell untersucht, da das Zusammenspiel der sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und cAMP von physiologischer Bedeutung ist. Hierzu wurde die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT nach Expression von STIM1 bzw. STIM1A und die Auswirkungen einer Inhibition der PDE8B analysiert. In der Tat resultierte die Verwendung eines PDE8B-Blockers in einer verstärkten NFAT Translokation, die nach Expression von STIM1 gegenüber STIM1A-induzierter NFAT Translokation erhöht war. Dieser Effekt war unabhängig vom intrazellulären Ca^{2+} . Obwohl eine erhöhte Interaktion von STIM1 und der PDE8B nicht mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden konnte, sprechen die Daten des funktionellen Assays stark dafür.

Daten dieser Arbeit verdeutlichen den molekularen Mechanismus des alternativen Spleißens als einen potenten Mechanismus, um die Feinregulation von Proteinfunktion und -Lokalisierung Zelltyp-spezifisch anzupassen

Summary

The second messenger calcium (Ca^{2+}) is essential for the regulation of a variety of intracellular processes and signaling cascades. Stringent regulation of the Ca^{2+} homeostasis is crucial for cell vitality and viability. One of the numerous regulation mechanisms is encoded by store-operated calcium entry (SOCE) in which calcium channels in the plasma membrane are activated in response to $[\text{Ca}^{2+}]$ depletion from the lumen of the endoplasmic reticulum (ER). The protein family, able to detect the concentration of ER $[\text{Ca}^{2+}]$ and to activate calcium channels in the PM, are the stromal interaction molecules (STIM) proteins.

This thesis describes the characterization of a highly conserved STIM1 splice variant STIM1A. Insertion of an additional *Exon A* between Exon 10 and 11, leads to an elongation of the C-term by 31 amino acids, without causing a translational frameshift. Stim1A is expressed ubiquitously, while the amount varies among cell types and tissues. Stim1A is highly abundant in testes, heart and astrocytes. Utilizing Ca^{2+} imaging, over expression as well as knock down of STIM1A show that STIM1A reduces SOCE. The reduced Ca^{2+} phenotype is neither influenced by STIM1 homolog STIM2 nor does STIM1A alter the amount of Ca^{2+} in the Ca^{2+} stores. STIM1A is able to activate all murine and human ORAI-homologs. Within domain A, two amino acids could be identified to be responsible for reduction in SOCE. It could also be shown, that splicing of *exon A* alters the N-terminal gating of ORAI1. *In vitro*, STIM1A colocalizes with STIM1 in HEK293 cells. *Ex vivo*, absence of Stim1A did alter Stim1 localization in testicular Sertoli cells, which could be shown via immunohistochemistry using an antibody which detects an amino acid motive within domain A. Besides regulation of the SOCE, STIM1A also serves as a regulator of transcription factor NFAT translocation. Overexpression of STIM1A leads to enhanced NFAT translocation into the nucleus, compared to STIM1. Using mass spectrometry, several new interactions partners of STIM1 and STIM1A could be identified and confirmed by bimolecular fluorescence complementation. The interaction of STIM1 and phosphodiesterase 8B (PDE8B) was further analyzed, concerning the relevance of the Ca^{2+} /cAMP interplay. Therefore impact of STIM1 and STIM1A on NFAT translocation was analyzed using a PDE8B specific inhibitor. Indeed blocking PDE8B lead to increased NFAT translocation after STIM1 expression, compared to STIM1A. This finding was independent of

the intracellular Ca^{2+} concentration. Although increased interaction of STIM1 and PDE8B could not be confirmed using immunoprecipitation, data from functional NFAT assay reinforce the assumption.

This work elucidates alternative splicing as a potent mechanism to evolve fine tuning of protein function as well as protein localization.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Calciumhomöostase der Zelle

“Nothing is so dangerous to the progress of the human mind than to assume that our views of science are ultimate, that there are no mysteries in nature, that our triumphs are complete and that there are no new worlds to conquer.”

- Sir Humphry Davy

Dem englischen Chemiker Sir Humphry Davy gelang es 1808 zum ersten Mal, eines der wichtigsten Elemente des menschlichen Körpers aufzureinigen – Calcium. Mittels Elektrolyse reduzierte er eine Mischung aus Kalk und Quecksilber-Oxid. Daraus resultierte ein Gemisch aus Calcium und Quecksilber, woraus er erfolgreich Calcium isolierte. Die Bezeichnung Calcium stammt von dem lateinischen Wort *calx* ab, das sich mit Kalk übersetzen lässt. Heute ist bekannt, dass Calcium mit 4,1% das fünft-häufigste Metall der Erdkruste ist. Der menschliche Körper besteht im Durchschnitt zu einem Kilo aus reinem Calcium. Davon liegen 99 % des Mengenelements als Phosphatsalz gespeichert in Knochen und Zähnen vor. Die verbleibenden 1 % stehen dem Organismus als freie Calciumionen (Ca^{2+}) zur Verfügung. In dieser Form ist Calcium als sekundärer Botenstoff essentiell für intra- und interzelluläre Kommunikation (Leybaert & Sanderson, 2012; Yeh & Parekh, 2018). Im Zuge der Anpassung an ihr Umfeld müssen Zellen in der Lage sein, miteinander zu kommunizieren und intrazelluläre Signalwege zu kontrollieren. Dies geschieht dabei strikt kontrolliert in raumzeitlich getrennten Signalmustern, unter anderem durch Calcium als Botenstoff. Durch lokale oder globale Konzentrationsänderungen von Calcium können Ladung und Konformation von Proteinen beeinflusst werden (Berridge et al., 2000; Clapham, 2007). Im Laufe der Evolution sind hunderte Proteine hervorgegangen, die Calcium in Konzentrationsbereichen von nano- bis millimolar binden können. Eine Bindung von Calcium kann sowohl durch Aktivierung, als auch mittels Deaktivierung der Bindungspartner

Veränderungen intrazellulärer Prozesse hervorrufen. Weiterhin existieren Proteine, die $[Ca^{2+}]$ puffern und/oder verringern, wie z. B. das EF-Hand Motiv (Clapham, 2007).

Die Calcium-Homöostase der Zelle ist ein fein abgestimmtes, hochkomplexes Zusammenspiel von Calcium-Speichern, -Pumpen und -Kanälen, die in ihrer Gesamtheit distinkte Muster von Calciumsignalen generieren. Sie sind von physiologischer, pathophysiologischer und pathologischer Relevanz für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie die Reorganisation des Zytoskeletts, Sekretion, Proliferation, vesikulärer Transport, Muskelkontraktion, Zellstoffwechsel und Zellsterblichkeit (Bagur & Hajnóczky, 2017; Berna-Erro et al., 2009; Clapham, 2007; Machaca, 2010; Parys & Guse, 2019). Außerdem triggern Ca^{2+} -induzierte Signalkaskaden die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z. B. NFAT (Vilborg et al., 2016). Zusätzlich kann Calcium Organell-spezifische Funktionen wie den oxidativen Metabolismus der mitochondrialen Matrix (Griffiths & Rutter, 2009) beeinflussen. Welche Prozesse getriggert werden, ist von der jeweiligen Lokalisierung, Dauer, Frequenz und Amplitude der Calciumsignale abhängig (Berridge et al., 2003).

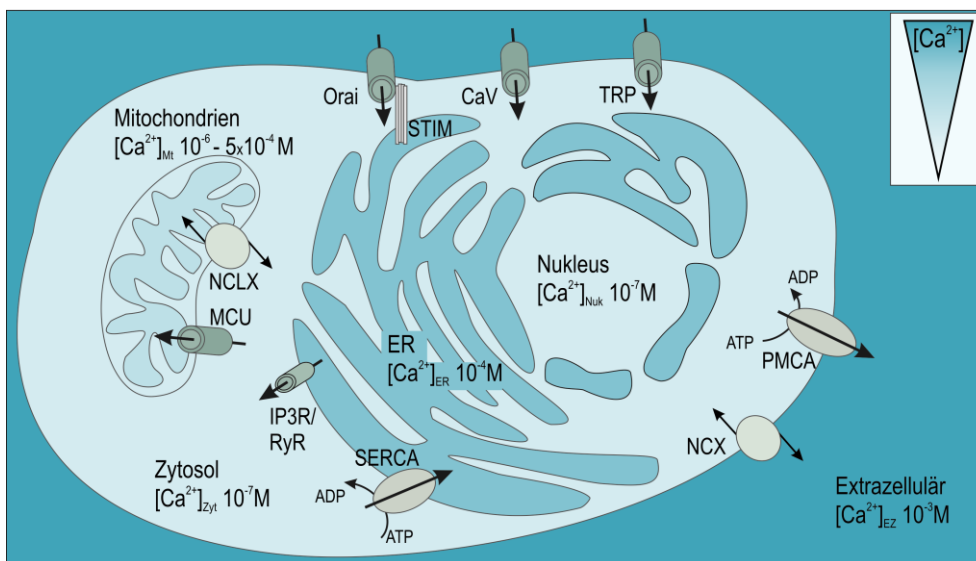


Abbildung 1 - Calciumhomöostase der Zelle (ausgewählte Aspekte)

Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, SERCA = Sarko/Endoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} ATPase, IP_3R = Inositoltrisphosphat-Rezeptor, RyR = Ryanodin-Rezeptor, STIM = engl. *stromal interaction molecule*, CaV = engl. *voltage-gated calcium channel*, TRP = engl. *transient receptor potential channel*, PMCA = Plasmamembran Calcium ATPase, NCX = Natrium-Calcium-Austauscher, ATP = Adenosin-triphosphat, ADP = Adenosin-diphosphat, MCU = mitochondrialer Calcium Uniporter NCLX = mitochondrialer Natrium Calcium Lithium Austauscher. Die Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]$ ist als Farbverlauf von dunkel (viel) zu hell (wenig) dargestellt, sowie Konzentrationsbereiche der jeweiligen Organellen angegeben.

Das Hauptspeicherorganell von Calcium ist das endoplasmatische Retikulum (ER), bzw. im Fall von Muskelzellen das sarkoplasmatische Retikulum. Vorherrschende $[Ca^{2+}]_{ER}$ können zwischen $1-8 \times 10^{-4} M$ schwanken (Bagur & Hajnóczky, 2017) (Abb.1). Außerdem können

ebenfalls Mitochondrien oder Lysosomen kleinere Mengen des zweiwertigen Ions speichern. Jedes Organell weist Organell-spezifische Calcium-Kanäle auf (Parys & Guse, 2019). Um den Calciumfüllstand des ER aufrechtzuerhalten, ist die sarkoplasmatisches/endoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) unabdingbar. Sie pumpt zwei Ca^{2+} -Protonen pro Molekül ATP gegen den Konzentrationsgradienten vom Zytosol ins ER (Lomax et al., 2002). Des Weiteren befinden sich in der ER-Membran ubiquitär exprimierte Inositoltrisphosphat-Rezeptoren (IP_3) sowie Ryanodin-Rezeptoren, welche spezifisch für erregbare Zellen, wie Muskelzellen und Neuronen sind. Durch beide nicht-selektiven Kationen-Kanäle strömt nach Aktivierung Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol. Der IP_3 -Rezeptor wird durch das Binden seines Liganden IP_3 aktiviert. In Mitochondrien wird Calciumeinstrom und -Ausstrom über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (*engl. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^{2+}$ exchanger*, NCLX) geregelt. Der MCU ist die kanalformende Komponente des MCU-Komplexes, der außerdem aus den Regulatorproteinen MICU1, MICU2, MCUB, EMRE, MCUR1 und miR-25 gebildet wird. Trotz seiner niedrigen Affinität kann durch ihn Calcium in die mitochondriale Matrix transportiert werden. Da ER und Mitochondrien oft in enger räumlicher Nähe in der Zelle liegen, wird in die Mitochondrien hauptsächlich Calcium aufgenommen, welches zuvor aus dem ER ausgetreten ist (Marchi et al., 2018; Marchi & Pinton, 2014). Der NCLX tauscht im Kotransport Ca^{2+} der Mitochondrien gegen Na^+ Protonen aus dem Zytosol (Boyman et al., 2013; Palty et al., 2004, Hilgemann et al., 2006). Auch der Austausch von zytosolischen Ca^{2+} -Ionen mit dem extrazellulären Raum wird durch mehrere Proteine streng reguliert. Im Ruhezustand ist die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zytosol}}$ mit 10^{-7} M 100-fach geringer als extrazellulär ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EZ}}$: 10^{-3} M) (Bagur & Hajnóczky, 2017). Überschüssiges Ca^{2+} wird mittels Plasmamembran-Calcium-ATPasen (PMCA) aktiv aus der Zelle transportiert. Dabei wird stöchiometrisch pro Ion Ca^{2+} ein Molekül ATP hydrolysiert. Die PMCA weist eine starke Affinität für Calcium auf. Allerdings ist ihre Pumprate mit 30 Hz gering. Deswegen und auf Grund des hohen ATP-Verbrauchs kann die PMCA, ähnlich wie die SERCA, nur geringe $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderungen ausgleichen (Bagur & Hajnóczky, 2017). Ein weiteres Protein, das Calcium aus der Zelle transportieren kann, ist der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger NCX), der ein Calciumion im Austausch mit drei Ionen Natrium aus der Zelle transportiert (Hilgemann et al., 2006). Bei zu hohen zytosolischen Na^+ -Konzentration kann sich die Transportrichtung allerdings auch umkehren (Reeves, 1985). Der NCX hat im Gegensatz zur PMCA eine geringere Affinität für Calcium, allerdings die zehnfache Transportrate (150-300 Hz) und kann so größere $[\text{Ca}^{2+}]$ -Schwankungen ausgleichen

(Boyman et al., 2009). Extrazelluläres Calcium kann aufgrund von drei verschiedenen Stimuli in die Zelle transportiert werden: Zum einen die spannungsgesteuerten Calciumkanäle erregbarer Zellen (*engl. Voltage-gated Ca^{2+} channels*, CaV), die nach Depolarisierung der Plasmamembran (PM) aktiviert werden. Zum anderen kann mittels Ligandenbindung z.B. die Familie der TRP-Kanäle (*engl. transient receptor potential*) aktiviert werden (Clapham, 2007). Die Aktivierung des dritten Mechanismus von Calcium-Kanälen der Plasmamembran ist abhängig von $[Ca^{2+}]_{ER}$ und wird deshalb als speicherabhängigen Calciumeinstrom (*engl. Store Operated Calcium Entry*, SOCE) bezeichnet. Die wichtigste Klasse der Kanalproteine wird durch die Familie der Orais gebildet. Auch TRPC1 wird eine speicherabhängige Funktion diskutiert (Ambudkar, 2007). Beim SOCE detektieren die ER-transmembranösen Calcium-Sensorproteine STIM (*engl. stromal interaction molecule*) den Ca^{2+} -Füllstand des ERs. Fällt die $[Ca^{2+}]_{ER}$, wird eine molekulare Kaskade in Gang gesetzt, welche letztendlich zur Aktivierung der Orai-Kanäle in der Plasmamembran durch die zytosolische Domäne von STIM führt und so Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum in das Zytosol einströmen kann.

1.2 Der speichergesteuerte Calciumeinstrom

Bei dem speichergesteuerten Calciumeinstrom (*engl. Store Operated Calcium Entry*, SOCE) handelt es sich um einen ubiquitär beschriebenen Calcium-regulierenden Signalweg. In elektrisch nicht erregbaren Zellen ist SOCE der Hauptcalciumeinstrom-Mechanismus. Außerdem wurde SOCE ebenfalls als relevant für die Calciumhomöostase von Nervenzellen, sowie von Skelett- und Herzmuskelzellen beschrieben und gewinnt in diversen Geweben an immer größerer Bedeutung (Collins et al., 2014; Prakriya & Lewis, 2015). Der SOCE als Einstrom-Mechanismus von Ca^{2+} -Ionen wurde erst im frühen 21. Jahrhundert detailliert beschrieben. Allerdings postulierte bereits 1986 der amerikanische Wissenschaftler James Putney, unter Berücksichtigung des vormals aktuellen Forschungsstandes, ein mögliches Modell für einen IP3 Rezeptor-regulierten Calciumeinstrom, bei dem der Füllstand der Calciumspeicher für die Aktivierung plasmamembranständiger Ca^{2+} -Kanäle verantwortlich sei (Putney, 1986). In 1992 konnten Hoth und Penner zum ersten Mal in Ganzzell-Patch-Clamp-Experimenten in Mastzellen Ströme messen, die durch die Entleerung von Calciumspeichern induziert wurden. Dieser Strom wurde daraufhin als I_{CRAC} (*engl. calcium-release-activated Ca^{2+} current*) bezeichnet (Hoth & Penner, 1992). Ein ganzes Jahrzehnt konnte allerdings nicht geklärt werden, welche Proteine für diesen

speicherabhängigen Calciumstrom verantwortlich waren. 2005 brach mit der Identifikation der ER-ständigen Calciumsensor-Proteine STIM in der SOCE-Forschung ein neues Zeitalter an, welche fast zeitgleich von zwei Gruppen beschrieben wurden (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Nur wenige Monate später konnten auch die kanalformenden Ca^{2+} -selektiven Orai-Proteine identifiziert werden (Feske et al., 2006; M Vig et al., 2006; M Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Bis Dato wurden drei humane Orai-Homologe ORAI1, ORAI2 und ORAI3 beschrieben. In der Maus wurde zusätzlich zu Orai1-3 eine Spleißvariante von Orai2 entdeckt, die aufgrund eines alternativen Start-ATG verkürzt ist und deshalb als Orai2short bezeichnet wird (Gross et al., 2007). Jedes Homolog weist vier Transmembrandomänen auf. Obwohl lange angenommen wurde, dass die Proteine sind im Ruhezustand als Dimere in der Plasmamembran gleichmäßig verteilt vorliegen (Rosado et al., 2016) und erst nach Stimulus zum funktionelle CRAC-Kanal oligomerisieren (Li et al., 2007; Luik et al., 2006; Xu et al., 2006), deuten neue Daten darauf hin, dass die Proteine schon im Ruhezustand als Hexamer in der Plasmamembran formiert vorliegen (Alansary et al., 2020). Dabei können sowohl funktionelle Homo-, als auch Heteromultimere entstehen (Gwack et al., 2007; A Lis et al., 2007). Die Anzahl von Orai-Proteinen pro funktionellem Kanal wird bisweilen noch immer diskutiert (reviewed in (Amcheslavsky et al., 2015)). Mignen et al konnten an Hand von Orai1-Konkatameren zeigen, dass der Kanal auch als Tetramer funktionell ist (Mignen et al., 2008). Dem gegenüber stehen die Kristallstruktur aus *Drosophila melanogaster* und neuere funktionelle Studien, welche eine Anordnung als Hexamer beschreiben (Cai et al., 2016; Hou et al., 2012; Peckys et al., 2020; Yen et al., 2016).

Auch die Proteinfamilie der STIMs wird von zwei Homologen, STIM1 und STIM2, sowie deren Spleißvarianten gebildet. Obwohl die chromosomale Region des humanen STIM1 bereits 1996 bei 11p15.5 lokalisiert werden konnte (Parker et al., 1996), konnte dem Protein erst 2005 die Funktion als Calciumsensor des ERs und Schlüsselkomponente des speicherabhängigen Calciumstroms zugeordnet werden (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Die Sequenzen beider Homologe stimmen nur zu 65 % überein, allerdings sind die meisten funktionellen Motive hochkonserviert (Moccia et al., 2015). Die STIMs sind Singlepass-Transmembranproteine, lokalisiert in der ER-Membran (Abb. 2b). Im Ruhezustand bewegen sie sich konstitutiv entlang des Mikrotubuli-Netzwerks (Groschner, Grainer & Romanin, 2017). Bei STIM unterscheidet man aufgrund der ER-Transmembrandomäne in einen luminalen und zytosolischen Teil. Innerhalb von STIM lassen

sich mehrere hochkonservierte Motive identifizieren, die für dessen Funktion unabdingbar sind.

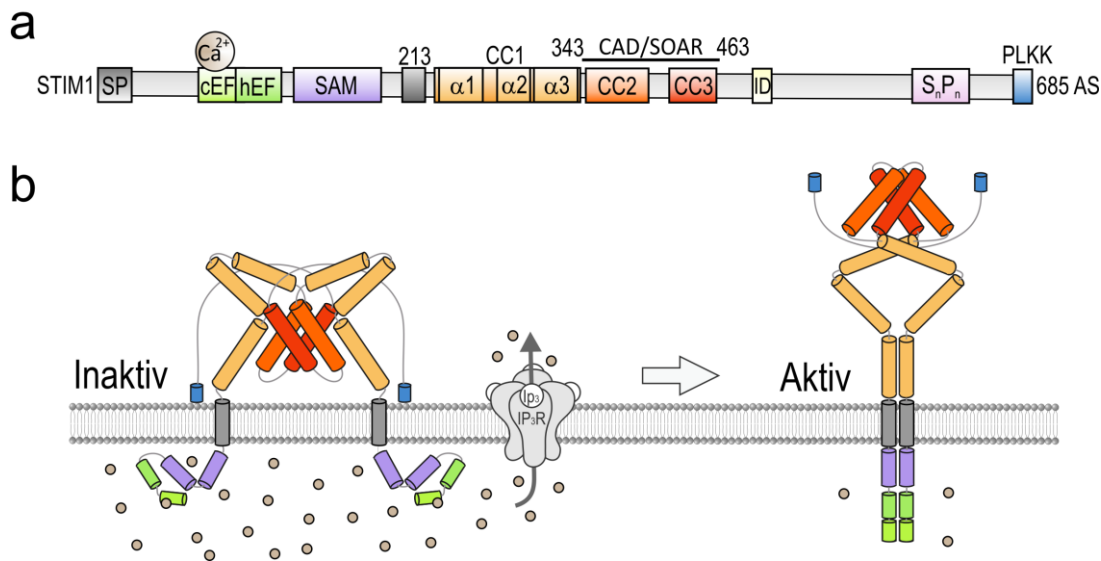


Abbildung 2 - Schematische Darstellung der Proteinmotive von STIM1 sowie dessen Faltung in inaktivem und aktivem Zustand

(a) funktionelle Proteinmotive von STIM1. (b) Faltung von STIM1 im inaktiven Zustand bei hoher $[Ca^{2+}]_{ER}$ (links), bei Speicherentleerung durch Bindung des Liganden IP₃ an den IP₃ Rezeptor diffundiert Calcium von der EF Hand von STIM1 (grün) und STIM1 ändert seine Konformation hin zur aktiven Form (rechts). Abkürzungen: SP = Signalpeptid, cEF = *engl. canonical EF hand*, hEF = *engl. hidden EF hand*, SAM = *engl. Sterile alpha motif*, CC = coiled coil, ID = inhibitorische Domäne, S_nP_n = Serin- und Prolin-reiche Region, AS = Aminosäure, IP₃ = Inositoltrisphosphat, IP₃R = Inositoltrisphosphat-Rezeptor. Quelle: modifiziert nach B. Niemeyer und Lunz et al., 2019.

Entscheidend für die Lokalisierung von STIM1 ist das 22 Aminosäuren lange N-terminale Signalpeptid (SP, Abb. 2a grau). Mit einem weiteren Motiv des luminalen Proteinabschnitts sind die STIMs in der Lage, Ca^{2+} Konzentrationsschwankungen des ERs zu detektieren. Dazu dienen zwei direkt hintereinander gereihete EF-Hände (Abb. 2, grün), von denen nur die Erste für Calcium zugänglich ist. Die versteckte, nicht Ca^{2+} -bindende EF-Hand (*engl. hidden EF* = hEF) sowie das darauffolgende sterile α -Motiv (SAM, Abb. 2, lila) dienen zu Protein-Stabilisierung und verhindern eine Oligomerisierung der STIM im Ruhezustand (Stathopoulos et al., 2006, 2008). Das Helix-Loop-Helix Motiv der EF-Hand enthält die negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat, über welche es Calcium bindet. Die EF-Hände von STIM1 und STIM2 unterscheiden sich lediglich um drei Aminosäuren. Dieser kleine Unterschied hat allerdings Auswirkungen auf die Calcium-Sensitivität der Proteine: Die EF-Hand von STIM2 ($K_d \sim 0.5$ mM) weist gegenüber STIM1 ($K_d \sim 0.6$ mM) eine geringere Affinität für Calcium auf und fungiert deshalb als Regulator des basalen Calciums (Brandman et al., 2007; Carrasco & Meyer, 2014; Feske et al., 2015; L. Zheng et al., 2011).

Fällt die $[Ca^{2+}]_{ER}$ nach der Aktivierung des IP3-Rezeptors (Abb. 2b, grau) unter einen kritischen Schwellenwert, dissoziiert Ca^{2+} von den EF-Händen. Dadurch wird der SOCE ausgelöst, um Schwankungen der $[Ca^{2+}]$ in der Zelle durch den Einstrom von extrazellulärem Calcium auszugleichen.

Die Dissoziation von Ca^{2+} von der EF-Hand destabilisiert die EF-Hand-SAM-Domäne und führt zu einer Oligomerisierung der STIMs. Dies hat eine Umstrukturierung der Transmembrandomänen zur Folge, was wiederum eine parallele Ausrichtung von Coiled Coil 1-Domänen (CC1) innerhalb der STIM-Dimere nach sich zieht (Abb. 2, orange). In dieser Domäne sind mehrere Helices miteinander in eine Mehrfachhelix verwunden (Campbell & Reece, 2009). Die CC1 reguliert den Wechsel von STIM im Ruhezustand zur aktivierten Form: Im Ruhezustand interagiert die CC1 mit der rückgefalteten CC3-Domäne von STIM und wirkt als eine Art intramolekulare Klammer. Nach Aktivierung und Umstrukturierung der Transmembrandomänen wird diese Klammer gelöst, CC3 wird nicht mehr festgehalten und der C-Term von STIM kann sich ausstrecken (Fahrner et al., 2014; Ma et al., 2015; Yubin Zhou et al., 2013). Neben der CC3 wird auch die CC2 frei zugänglich. Diese Entfaltung ist für die Funktionalität unabdingbar, da so die CAD/SOAR-Domäne (*engl. CRAC-activation domain Aminosäuren 342-488/ STIM1 Orai activating region Aminosäuren 344-442*), die Binde- und Aktivierungsdomäne von STIM an Orai frei wird (Prakriya & Lewis, 2015) (Abb. 2b). Die Reorganisation des zytosolischen Teils von STIM führt zur Clusterbildung und Translokation in ER-Plasmamembran-Knotenpunkte (Baba et al., 2006; Potier & Trebak, 2008; Soboloff et al., 2012). Über ein Poly-Lysin Motiv am C-Term mit positiver Nettoladung von (Abb. 2, blau STIM1: PLKK; STIM2: KKKSK) können die STIM-Cluster mit negativ geladenen Lipiden der Plasmamembran elektrostatisch interagieren und die STIMs temporär an die PM binden (Graham et al., 2011; Hooper et al., 2013).

In unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran rekrutiert STIM plasmamembran lokalisierte Orai-Untereinheiten in die ER-PM-Knotenpunkte und führen zu der Aktivierung eines selektiven Ca^{2+} -Kanalkomplexes. Die primäre Interaktion und Aktivierung von STIM mit Orai erfolgt über die CAD/SOAR Domäne der STIM Proteine. Dabei bindet STIM an den C-Term von Orai. Mittels Mutagenescreens wurden im Laufe der Jahre mehrere Aminosäuren identifiziert, die kritisch für die Interaktion von STIM und Orai sind. Dazu gehörten L273, L276, R281, L286, R289, aber auch die sogenannte Nexus-Sequenz (Aminosäure 261-265) von Orai (Tiffner et al., 2021; Zhou et al., 2016). Durch die Interaktion wird eine Signalkaskade ausgelöst, die primär zur konformationellen Änderung von Transmembrandomäne (TM) 4

von Orai führt und sich weiter über TM3 bis hin zu TM1 ausbreitet. Durch die Konformationsänderung der letzten Helix öffnet sich der Kanal (Zhou et al., 2015, 2017). Die Rolle der Interaktion mit dem N-Term von Orai wird z.T. kontrovers diskutiert. Veröffentlichte Daten deuten auf eine stabilisierende Funktion der sogenannten ETON-Region hin (*engl. Extended Transmembrane Orai1 N-terminal*) (Derler et al., 2013; Annette Lis et al., 2010; McNally et al., 2013). Die N-terminale ETON Region ist für alle 3 humanen Orai-Homologe identisch. Durch diese zweite Interaktionsstelle der CAD Domäne von STIM1 und Orai würde durch STIM1 eine intermolekulare Verbindung zwischen den zytosolischen C- und N-Termini des Kanals entstehen, was zu einer Stabilisierung der Öffnung von Orai1 führen könnte. Außerdem ist ETON an der schnellen Ca^{2+} -abhängigen Inaktivierung von Orai beteiligt.

Nach Aktivierung, Assemblierung und Öffnung der Orai-Kanäle strömt aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen Extrazellularraum und Zytosol Calcium in die Zelle. Über die inhibitorische Domäne (ID) von STIM (Abb. 2a, gelb) kann der Kanal schnell Ca^{2+} -abhängig inaktiviert werden (*engl. fast Ca^{2+} dependent inactivation = FCDI*). Es wurde postuliert, dass die ID mit den hochkonservierten Aminosäuren W76, R77 und K78 der ETON Region interagiert und so die FCDI vermittelt (Mullins & Lewis, 2016; Park et al., 2009). *Loss of function*-Mutationen in STIM1 oder Orai1 führen sowohl im Menschen als auch im Mausmodell zu erheblichen Immunpathologien, Myopathien, Anhidrose und Defekte der Zahnschmelzbildung (Feske, 2019; Lacruz & Feske, 2015; Michelucci et al., 2018).

1.3 STIM1-Spleißvarianten

1.3.1 C-terminales Spleißen

Neben der dominant negativen STIM2-Spleißvariante STIM2.1 (Miederer et al., 2015) ist auch für STIM1 eine Variante mit alternativ gespleißten C-Terms publiziert. Das sogenannte STIM1Long (STIM1L) wurde zum ersten Mal von Darbellay et al. 2011 beschrieben (Darbellay et al., 2011). Bei dieser Variante führt alternatives Spleißen hinter Exon 10 zur Insertion eines zusätzlichen 318 Basenpaar langen Exons. Da das daraus resultierende alternative STIM1 103 Aminosäuren länger als das wildtypische STIM1, wurde es als STIM1Long bezeichnet und das zugehörige Exon „L“ genannt. STIM1L formt konstitutiv Cluster mit Orai1, was eine unmittelbare Aktivierung des SOCE ermöglicht. Mittlerweile ist

bekannt, dass das Expressionslevel von STIM1L die Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben beeinflusst (Antigny et al., 2017).

Neben STIM1L finden sich in den NCBI Datenbanken (*engl. National Center for Biotechnology Information*) Hinweise darauf, dass diverse weitere Spleißvarianten von STIM1 existieren, wie die murinen Varianten XM_006507533.4, XM_036152855.1, XM_036152856.1, XM_006507536.4, als auch humane EST Klone (BQ068737.1, BU553936.1). Die möglichen Spleißevents um den Spleißhotspot zwischen Exon 10 und 12 und die resultierenden Proteindomänen sind in Abbildung 3 dargestellt.

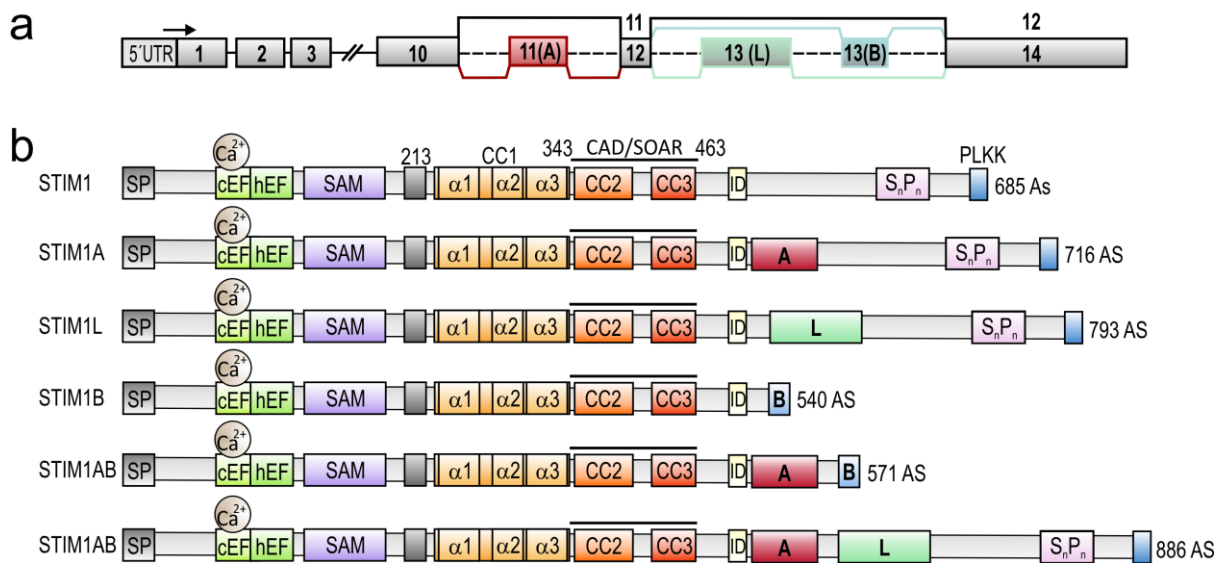


Abbildung 3 - Schematische Darstellung der Exonstruktur und Proteinmotive von STIM1

(a) Exonstruktur und Spleißseiten von STIM1 mit Spleißhotspot zwischen Exon 10 und 12 des wildtypischen *STIM1*. (b) funktionelle Proteinmotive resultierenden Spleißvarianten. Abkürzungen: UTR = untranslatierte Region, SP = Signalpeptid, cEF = *engl. canonical EF hand*, hEF = *engl. hidden EF hand*, SAM = *engl. Sterile alpha motif*, CC = coiled coil, ID = inhibitorische Domäne, S_nP_n = Serin- und Prolin-reiche Region, AS = Aminosäure, modifiziert nach B. Niemeyer

In dieser Arbeit werden alternative Spleißvorgänge an der Grenze von Exon10/11 untersucht. Das alternative *Exon A* ist 93 Basenpaare lang. Eine Insertion führt nicht zu einer Verschiebung des Leserasters der Translation und somit bleiben alle nachfolgenden Motive von STIM1 intakt. Die zweite Spleißseite befindet sich vor dem letzten Exon von STIM1. An der gleichen Position, in welche Exon L gespleißt wird, kann alternierend Exon B inseriert werden. Die Insertion von 36 Basenpaaren von Exon B führt zu einer Verschiebung des Leserasters, was zu einem vorzeitigen Translationsstop von STIM1B führt. Diese Variante ist C-terminal um 145 Aminosäuren verkürzt und besitzt weder die Serin-Prolin-reiche Region noch die Poly-Lysin-Domäne. Zusätzlich ist ebenfalls eine Kombination beider Spleißseiten

möglich, sodass die Spleißvarianten STIM1AB oder STIM1AL entstehen könnten. Die ersten Expressionsanalysen wurden in der Bachelorarbeit von Alina Gilson (Gilson, 2016) durchgeführt. Mittels analytischer PCR mit muriner cDNA verschiedener Gewebe als Template konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein Spleißen von *Exon A* nahezu ubiquitär stattfindet, nur nicht in CD8⁺ T-Zellen. Die Expression von Exon B wurde in verschiedene Hirnregionen wie Cortex, Cerebellum, Bulbus olfactorius und Hippocampus bestätigt. Eine Kombination von *Exon A* und B konnte nur im Bulbus olfactorius detektiert werden. Stim1AL wurde in den initialen Experimenten nicht gefunden.

Über die physiologische Relevanz der Spleißvariante STIM1A *in vitro* und *in vivo* ist bis auf die Publikation, deren Daten in dieser Arbeit zusammengefasst sind (Knapp et al., 2020 Preprint) sowie der vorangegangenen Masterarbeit (Schöppe, 2017) nichts bekannt.

1.3.2 N-terminales Spleißen

Neben dem teilweise publizierten alternativen Spleißen von STIM1 am C-Term wurden ebenfalls mehrere N-terminale Spleißevents vorhergesagt (mögliches Transkript: XM_006507535.4, siehe Abb. 4). Laut den Datenbanken wäre es möglich, dass zwei mRNA-Transkripte mit alternierender 5'UTR (*engl. untranslated region*, nicht translatierte Region)

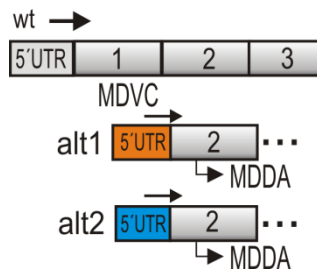


Abbildung 4 - N-terminales Spleißen von STIM1

Durch mögliches Spleißen von alternativen 5'UTR verschiebt sich der Translationsstart zu M75 (mögliches Transkript: XM_006507535.4).

fehlenden Signalpeptids vermutlich zytosolisch lokalisiert wäre und wegen des fehlenden EF-Motivs nicht als Calcium-Sensor fungieren würde, kann zum jetzigen Stand der Forschung nur spekuliert werden. Ebenfalls ist unklar, ob N-terminales Spleißen unabhängig von oder in Kombination mit C-terminalen Spleißevents auftreten kann. Die Komplexität der C- und N-terminalen Spleißereignissen erfordert deren distinkte Untersuchung, um jeder Variante ihre spezifische Rolle innerhalb des speicherabhängigen Calciumeinstroms zuzuordnen.

existieren. Das Spleißen hätte die Deletion von Exon 1 zu Folge. Als Translationsstart würde in diesem Fall ein alternatives ATG in Exon 2 dienen und das Protein mit M75 beginnen. Beiden Varianten mit alternierender 5'UTR würde zum einen das Signalpeptid fehlen, das für

die Insertion von STIM in der ER Membran essentiell ist, zum anderen auch Teile der ersten EF-Hand, ohne welche das Protein nicht mehr in der Lage wäre, Ca²⁺-Konzentrationen zu detektieren. Über die physiologische Funktion einer solchen Variante, die aufgrund des

1.3. Testis, Calcium und STIM

Im Rahmen dieser Arbeit konnte Stim1A in hoher Abundanz im murinen Hoden lokalisiert werden, daher soll im Folgenden die Relevanz von Calcium im Allgemeinen und Stim1 für das männliche Reproduktionssystem erläutert werden.

1.3.1 Allgemeiner anatomischer Aufbau der Testes

Die inneren Geschlechtsorgane des Mannes werden von Hoden und dem Hoden aufliegenden Nebenhoden gebildet. Sie sind paarweise im Skrotum (Hodensack) angeordnet. Den Hoden umgibt eine Kapsel aus collagenhaltigem Bindegewebe, die *Tunica albuginea*. Die mit glatter Muskultur durchzogene straffe Hülle ist notwendig, um die fragilen Hodenkanälchen zu schützen. Das gleiche collagenhaltige Bindegewebe bildet Septen und teilt das Hodenparenchym in etwa 200-300 makroskopisch gleichartige Hodenläppchen, die *Lobuli testis*, in welchen die Keimzellen zu Spermien differenzieren. Die Lobuli laufen radiär zum *Mediastinum testis* zusammen, der zentralen Bindegewebszone des Hodens. Von hier aus durchziehen Venen und Arterien das Hodenparenchym. In dieser Zone laufen außerdem alle Hodenkanälchen in der sogenannten *Rete testis* zusammen. In der *Rete testis* werden Spermien gesammelt und konzentriert. Durch den *Ductus efferentes* werden sie zum *Ductus epididymidis* transportiert, der Samenweg des Nebenhodens, in die Spermien final reifen.

1.3.1.1 Lobuli Testis

Die durch die Septen der *Tunica albuginea* gebildeten *Lobuli testis* beinhalten die gewundenen *Tubuli seminiferi contorti*, die Samenkanälchen. Sie sind von einer Basalmembran (*Lamina propria*) aus Collagen und Myofibroblasten umgeben, welche durch Kontraktion den Transport der Spermien zu den *Rete testis* gewährleisten. Außerdem befinden sich darin intramurale Gefäße. Der Durchmesser der *Tubuli seminiferi* variiert zwischen 150 bis 300 µm. Entfaltet ist jeder der 200-300 Tubuli zwischen 50 und 60 cm lang. In einem Hoden befinden sich demnach mehr als 10km an Samenkanälchen, in denen Keimzellen differenzieren. Das Keimepithel der *Tubuli seminiferi* wird durch nur zwei Zelltypen gebildet: Keimzellen verschiedener Reifegrade und den Sertoli-Zellen. Benannt nach ihrem Entdecker, dem italienischen Physiologen Enrico Sertoli (1842–1910) wurden diese Zellen zum ersten Mal 1865 beschrieben. Die auch als Stützzellen bezeichneten Zellen sitzen radiär entlang der gesamten Basalmembran. Sie sind 70-80 µm lang reichen bis in das Lumen der *Tubuli seminiferi*. Mit ihren umfangreichen Zellfortsätzen umgeben sie die Keimzellen

Sertoli-Zellen von der Basalmembran bis hin zum Lumen, in das sie zur finalen Reifung im Nebenhoden freigesetzt werden.

Die Zwischenräume der zirkulären *Tubuli seminiferi* werden von lockerem Bindegewebe ausgefüllt. Außerdem ist in diesem Zellverband der dritte Testis-spezifische Zelltyp lokalisiert: Die Leydig-Zellen. Nach Stimulation durch das luteinisierende Hormon produzieren diese Testosteron, welches wiederum über einen negativen Feedbackloop die LH-Freisetzung im Hypophysen-Vorderlappen hemmt. In diesem Zwischenraum findet auch ein Großteil der Blutversorgung durch arterielle und venöse Inter-Leydig-Zell-Kapillaren statt.

1.3.2 Die Relevanz von Calcium für das männliche Reproduktionssystem

Calcium ist für die Funktionalität des Hodens und der damit einhergehenden Fertilität von hoher Relevanz. Eine Dysregulation der Calciumhomöostase konnte direkt mit männlicher Unfruchtbarkeit in Verbindung gebracht werden. Schon während der Hodenentwicklung spielt Calcium eine elementare Rolle: Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Calcium-Blockern bei präpubertären Mäusen eine signifikante Verkleinerung des Lumen der *Tubuli seminiferi* zur Folge hatte (Lee et al., 2006). Calcium ist außerdem sowohl an Wachstum als auch an der Differenzierung der Keimzellen beteiligt: Dabei variieren die $[Ca^{2+}]$ in den Keimzellen zwischen den verschiedenen Stufen ihrer Differenzierung stark (Golpour et al., 2016). Das Blocken von L-Typ bzw. T-Typ spannungsgesteuerter Calciumkanäle wirkt sich direkt auf die Spermiogenese aus. In histologischen Untersuchungen konnten nach Verwendung der Blocker Nifedipin bzw. Ethosuximid keine Spermien mit gestreckter Geißel nachgewiesen werden (Lee et al., 2006). Homozygote Punktmutationen im selektiven Calcium-Kanal TRPV6 [*engl. transient receptor potential vanilloid 6*], welche dessen Inaktivität zur Folge hatten, wirkten sich negativ auf die Fertilität der Versuchsmäuse aus. Obwohl die Entwicklung der Spermien normal war, waren ihre Mortalität und Befruchtungskapazität stark reduziert. Dies war darauf zurückzuführen, dass eine Expression des Kanals im Nebenhoden nachgewiesen werden konnte, nicht aber im Keimepithel des Hodens (Weissgerber et al., 2011). Selbst nach der Ejakulation ist Calcium für das Reproduktionssystem relevant: In reifen Spermien sind nach der Ejakulation Änderungen der $[Ca^{2+}]$ für die Kapazitation und Akrosomenreaktion notwendig, zwei Mechanismen, die für die Befruchtung einer Eizelle unabdingbar sind (Breitbart, 2002; Lucchesi et al., 2016).

1.3.3 STIM1 in Testis

Die Calcium-Konzentration der Flüssigkeit im Lumen der *Tubuli seminiferi* liegen im millimolaren Bereich, wohingegen Messungen der zytosolischen $[Ca^{2+}]$ von Sertoli-Zellen nur nanomolare Konzentrationen ergaben (D'Agostino et al., 1992; Gorczynska & Handelsman, 1991; Rossato et al., 1996). Konzentrationsschwankungen innerhalb der 70 μm langen Zellen müssen deshalb stark kontrolliert werden. Innerhalb des testikulären Gewebes sind Sertoli-Zellen der einzige Zelltyp in welchem STIM1 exprimiert wird (Lyon et al., 2017; Shen et al., 2018; B. Zheng et al., 2015). Quantitative Proteom-Analysen zeigten, das STIM1 in testikulärem Gewebe je nach Zeitpunkt der Gonadenentwicklung differenziell exprimiert wird. Dazu wurden Gonaden-Proben von murinen Embryos zu kritischen Zeitpunkten der Hodenentwicklung (11,5; 12,5 und 13,5 Tage *post coitum* = *engl. days post coitum*, dpc) analysiert. Im Laufe der Entwicklung erhöhte sich die Proteinmenge von STIM1, obwohl das mRNA-Level reduziert war (B. Zheng et al., 2014, 2015). Ein durch Morpholino induzierter Knock-down von STIM1 in isolierten Testes aus murinen Embryos (12 dpc) führte zu einer Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies (*engl. reactive oxygen species* = ROS) und verminderter Angiogenese des Gewebes. Außerdem wurden keine interstitiellen Zellen zwischen den *Tubuli seminiferi* gebildet. Auch der Samenleiter (*Ductus deferens*) konnte nicht vollständig ausgebildet werden (B. Zheng et al., 2015). In neonatalen Testes-Kulturen führte ein Knock-down von STIM1 mittels Morpholinos zu einer Fehl-Lokalisierung von Sertoli- und Keimzellen. Die radiäre Struktur der *Tubuli seminiferi* konnte nicht aufrechterhalten werden. Gleichzeitig wurden erhöhte ROS Level gemessen. Durch Reduktion der ROS Level mittels Coenzym Q10, konnte der durch den STIM1-Knock-down verursachte Phänotyp teilweise revertiert werden (Shen et al., 2018).

1.3.4 Das hochkomplexe ER der Sertoli-Zellen

Sertoli-Zellen sind nicht nur in ihrer Funktion einzigartig, sondern sie weisen außerdem ein hochkomplexes ER mit diversen spezialisierten Kontaktzonen auf. Das ER der Sertoli-Zelle lässt sich in fünf verschiedene Bereiche unterteilen (Abb. 6):

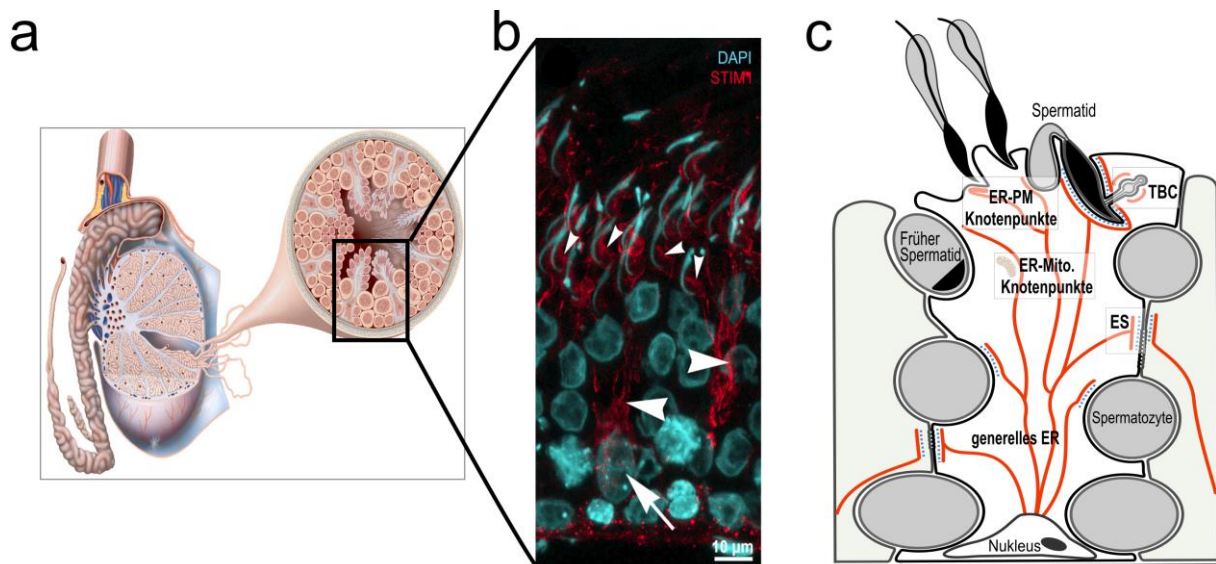


Abbildung 6 - STIM und das ER in Sertoli-Zellen.

(a) Übersicht eines rechten Hodens mit Nebenhoden im Querschnitt und Detailansicht eines Tubulus seminiferus. (b) Immunhistochemische Färbung der ER-ständigen STIM1 einer Sertoli-Zelle (rot), sowie DAPI Färbung der Zellkerne (cyan), Größer Pfeil = Nucleus der Sertoli-Zelle, mittlerer Pfeilköpfe = basale filamentöse Ausläufer der Sertoli-Zelle, kleine Pfeilköpfe = apikale Ausläufer der Sertoli-Zelle. (c) Schematische Darstellung des hochkomplexen ERs (rot) einer Sertoli-Zelle. Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, PM = Plasmamembran, ES = Ektoplasmatische Spezialisierung, TBC = Tubulobulbäre Komplexe. Quellen: (a) MediDesign Frank Geisler, (b) aus Lyon et al., 2017, (c) modifiziert nach Vogl et al., 2018.

1. Das generelle ER

Als das generelle ER der Sertoli-Zelle werden Bereiche bezeichnet, die nicht mit Membranen anderer Zellkompartimente assoziiert sind. Ferner zählen dazu basale ER-Regionen rund um den Zellkern. Das generelle ER zeichnet sich durch die Anwesenheit von Ribosomen und die damit verbunden Proteinbiosynthese aus.

2. Plasmamembran-Kontaktseiten

Ebenso existieren neben den generellen ER-Kontaktseiten von ER und Plasmamembran, die z. B. für den SOCE notwendig sind.

3. ER und Mitochondrien

Neben dem ER als Hauptspeicher des intrazellulären Calciums können ebenfalls Mitochondrien größere Mengen Calcium speichern und einströmendes Calcium puffern. Sie sind an der Modulierung von Calcium-Mikrodomänen im Zytosol beteiligt (Alonso et al., 2006). Änderungen der mitochondrialen $[Ca^{2+}]$ beeinflussen außerdem deren ATP-Produktion (Bravo et al., 2011). Die Kontaktstellen von Mitochondrien und dem ER dienen zum Austausch von Calcium und Lipiden (Giacomello & Pellegrini, 2016; Prinz, 2014).

4. Das ER der ektoplasmatischen Spezialisierungen

Einzigartig für Sertoli-Zellen sind die sogenannten ektoplasmatische Spezialisierung (*engl. ectoplasmic specializations*, = ES). Sie sind definiert als Bereiche der Zelle, in denen das ER der Sertoli-Zelle in Assoziation mit Aktin-Filamenten steht, welche wiederum mit der Plasmamembran verbunden sind. Sie wurden schon 1980 zum ersten Mal beschrieben (Means et al., 1980). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Hypothese aufgestellt, dass in diesem Teil des ERs Calcium gespeichert wird, um bei Freisetzung gezielt die Kontraktion von Aktin zu induzieren. Fünf Jahre später konnte gezeigt werden, dass Konzentrationsänderungen von Calcium in den ES in der Tat strukturelle Veränderungen der Aktinbündel nach sich ziehen, allerdings keine Kontraktion dieser (Vogl & Soucy, 1985). Es ist bekannt, dass im ER der ES eine geringere $[Ca^{2+}]$ vorherrscht. Diese Mikrodomänen könnten sich möglicherweise stabilisierend auf die Aktinbündel der ES auswirken. Welche konkreten Folgen dies auf die Sertoli-Zelle hat, konnte bis dato noch nicht geklärt werden. Bei ES unterscheidet man zwischen basalen und apikalen Spezialisierungen. Basale ES befinden sich an Zell-Zell-Grenzen zweier Sertoli-Zellen, auch in Nähe von *tight junctions*. ES im apikalen Teil der Sertoli-Zelle befinden sich in räumlicher Nähe zu Spermatiden und Spermienköpfen.

5. Das ER der tubulobulären Komplexe

Das ER der Sertoli-Zelle ist außerdem mit Bereichen der Zelle assoziiert, welche als tubulobulbäre Komplexe (*engl. tubulobulbar complex*, = TBC) bezeichnet werden. TBCs sind genau wie ES *in vivo* einzigartig für Sertoli-Zellen. Beschrieben wurden sie zum ersten Mal in 1976 (Russell & Clermont, 1976). Sie entstehen durch Einstülpungen der Plasmamembran der Sertoli-Zelle und der gleichzeitigen Ausstülpung der Plasmamembran des Kopfes eines Spermiums. Dadurch entsteht ein Tubulus mit einer Doppelmembran von etwa 1-4 μm Länge. Der Tubulus kann in vier Teile eingeteilt werden: einen mit Aktinbündeln assoziierten proximalen Teil, den darauf folgenden Bulbus, einen distalen Tubulus, der ebenfalls mit Aktinbündeln assoziiert ist und eine Clathrin-überzogene Spitze. Der etwa 1 μm im Durchmesser große Bulbus ist rundum von ER umgeben. Die Anordnung der TBC ist stark abhängig von der Form des Spermienkopfes. Bei gebogenen Köpfen, wie ihn Mäuse und Ratten zeigen, sind TBCs in zwei parallelen Reihen in der konkaven Seite angelegt. Bei Spermien ohne gebogenen Kopf, wie die des Menschen, verteilen sich die TBC zufällig entlang des Kopfteils, der noch am tiefsten in der Sertoli-Zelle verankert ist. Die Anzahl der TBC pro Spermienkopf variiert, je nach Spezies, zwischen 4 beim Hasen und Hamster, 6-10 in der Maus und bis zu 24 in der Ratte (L. D. Russell & Malone, 1979). Unmittelbar bevor die

Spermien freigesetzt werden, fusionieren mehrere TBC zu großen Vesikeln. Sie werden nach anschließend in Lysosomen der Sertoli-Zellen abgebaut und teilweise recycelt. Es konnte gezeigt werden, dass ohne die Ausbildung von TBC, z. B. induziert durch einen Knock-down von Amphiphysin (Kusumi et al., 2007) oder Cortaktin (Young et al., 2012), keine Spermien mehr ins Lumen der *Tubuli seminiferi* freigesetzt werden können. Neben den apikalen sind ebenfalls TCBs in basalen Regionen der Sertoli-Zelle zu finden (L. D. Russell & Malone, 1979; Lonnie Russell, 1977b). Die genaue Funktion der TBC konnte bis dato noch nicht eindeutig geklärt werden.

Obwohl für die Fertilität von männlichen Individuen die Calciumhomöostase des Hodens unabdingbar ist, wurden bis dato keine Spleißevents der Calcium-Regulatorproteine für deren Relevanz in Betracht gezogen. Diese Arbeit soll eine neue Perspektive zur Wichtigkeit der Feinregulation der Calciumhomöostase durch die Expression von Spleißvarianten aufzeigen.

1.4 Zielsetzung

Die seit dem letzten Jahrzehnt stetig wachsende Proteinfamilie der STIMs ist unabdingbar für die Calciumhomöostase der Zelle und somit für mannigfaltige Funktionen derselben von großer Bedeutung. Neben dem konventionellen STIM1 und dessen Homolog STIM2 wurden bereits Spleißvarianten STIM1L (Darbellay et al., 2011) und STIM2.1 (Miederer et al., 2015) beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es die neu identifizierte STIM1-Spleißvariante STIM1A in ihrer Gänze zu charakterisieren. Dazu sollten sechs grundlegende Fragen beantwortet werden:

- *Wo* wird Stim1A exprimiert? Um diese Frage zu beantworten, sollten murine Gewebe und Zelltypen auf cDNA Ebene via quantitativer und analytischer PCR untersucht werden sowie die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert werden.
- *Wie* wirkt sich die Insertion von Domäne A aus? Mittels Calcium-Imaging nach Überexpression, Knock-Down und Knock-Out von Stim1A sollte geklärt werden, wie sich die Insertion von *Exon A* auf den speichergesteuerten Calciumeinstrom (SOCE) auswirkt.

- *Woraus* resultiert Ca^{2+} -Phänotyp von STIM1A? Hier sollten die Frage geklärt werden, ob STIM1A in der Lage ist, alle Orai-Homologe zu aktivieren und ob das Spleißevent die Interaktion von STIM1A mit dem kanalbildenden Protein beeinflusst. Außerdem solle mittels ortsgerichteter Mutagenese von Aminosäuren in Domäne A und anschließendem Calcium-Imaging überprüft werden, ob die Insertion des Exons per se oder einzelne distinkte Aminosäuren für den SOCE von STIM1A verantwortlich sind.
- *Wohin* lokalisiert STIM1A *in vitro* und *ex vivo*? Durch heterologe Überexpression von STIM1A in Zelllinien sollte die Lokalisierung *in vitro* untersucht werden. Außerdem sollte mittels immunhistologischen Färbungen analysiert werden, wo STIM1A im Gewebeverband *ex vivo* lokalisiert ist und ob sich dies von der Lokalisierung von STIM1 unterscheidet.
- *Woran* bindet STIM1A bzw. mit welchen Interaktionspartnern interagiert STIM1A und unterscheiden sich diese spleißspezifisch von den Interaktionspartnern von STIM1? Mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen sollten, falls existent, spleißspezifische Interaktionspartner von STIM1A identifiziert werden. Die Analyse sollte weiter dazu dienen, ebenfalls neue Interaktionspartner von STIM1 zu erfassen.
- *Weshalb* wird STIM1A exprimiert, welche physiologische Funktion erfüllt es? Als letzte und schwierigste Fragestellung sollte über funktionelle *in vitro*-Assays geklärt werden, welche physiologische Funktion STIM1A möglicherweise neben der Regulierung des SOCE einnimmt.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Verwendete Zelllinien und Primärzellen

Tabelle 1 - Liste verwendeter Zelllinien und Primärzellen

Zelllinien	Primärzellen
MEF <i>STIM1/STIM2</i> ^{-/-}	Hippocampale Astrozyten
HEK293 wt	
HEK <i>STIM1/STIM2</i> ^{-/-}	
HEK <i>ORAI1/ORAI2/ORAI3</i> ^{-/-}	
HEK <i>ORAI1</i>	
SH-SY5Y <i>STIM1</i> ^{-/-}	
SH-SY5Y <i>STIM1/STIM2</i> ^{-/-}	

2.2 Medien

Tabelle 2 - Verwendete Medien

Medium	Hersteller
Gibco™ DMEM	Thermo Fisher Scientific
Gibco™ MEM	Thermo Fisher Scientific

2.3 Enzyme

Tabelle 3 - Liste verwendeter Enzyme

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
Antarctic Phosphatase	NEB	M0289S
DreamTaq Green PCR Master Mix	Thermo Fischer Scientific	K1081
Phusion Polymerase	Finnzymes	F-530S
T4 DNA-Ligase	Finnzymes	M0289S
SuperScript II RT	Life Technologies	18064

2.4 siRNA

Tabelle 4 - Liste verwendeter siRNAs und deren Sequenz

Name	Sequenz
Kontroll siRNA	5' UUCUCCGAACGUGUCACGU dTdT 3'
STIM1A #1	5' AUC AGU CCC UCU GGA AAU A - dTdT 3'
STIM1A #2	5' UGA UCA GUC CCU CUG GAA A - dTdT 3'

2.5 Primer

Tabelle 5 - Liste verwendeter Primer und deren Sequenz

Primername	Sequenz
Non A for	TCCATGCAGTCCCCCAGC
Non A for	CACTCATGTGGAGGGAGGAC
Non A rev	TTGGTGGCTGCTCTCAACAT
Non A rev	GCTGGGGGACTGCATGGA
A for	GTGACCGCTCTCTGCTCT
A for	TTGGTGGCTGCTCTCAACAT
A rev	CACTCATGTGGAGGGAGGAC
A rev	AGAGCGGTCACTGAACCTAC
Stim1 for	TTGGTGGCTGCTCTCAACAT
Stim1 rev	CACTCATGTGGAGGGAGGAC
Orai1 Qiagen	QT00285775
Orai2 Qiagen	QT01533441
Orai3 Qiagen	QT00255598
Hprt1 Qiagen	PPM03559F-200
Tbp1 Qiagen	PPM03560F-200
RRFSD to AAAAA	TGCTGCCTGGCTGATGGGGGCCGCCGCCGCCGCCGCTCTCTCT GCTCTACATCC
RRFSD to AAAAA rev	GGATGTAGAGCAGAGAGAGCGGGCGGCGGGCGGGCCCCATCA GCCAGGCAGCC
DDQS to AAAA for	CTGCATCCGCCGGCTCGGCCGCCGCCGCCCTCTGGAAATACCCG GCCC
DDQS to AAAA rev	GGGCCGGGTATTTCCAGAGGGCGGGCGGGCCGAGCCGGCGGAT GCAG
RR to QQ for	TGCTGCCTGGCTGATGGGGCAACAATTCAGTGACCGCTCTCTCT GCTCTACATCC
RR to QQ rev	GGATGTAGAGCAGAGAGAGCGGTCACTGAATTGTTGCCCCATCA GCCAGGCAGCA
FSD to AAA for	TGCTGCCTGGCTGATGGGGCGTAGGGGCCGCCGCCGCCGCTCTCTCT GCTCTACATCC
FSD to AAA rev	GGATGTAGAGCAGAGAGAGCGGGCGGCGGGCCCTACGCCCCATCA GCCAGGCAGCA
D503A for	CTGATGGGGCGTAGGTTTCAGTGCCCGCTCTCTCTGCTCT
D503A rev	AGAGCAGAGAGAGCGGGCACTGAACCTACGCCCCATCAG
S502A for	CTGATGGGGCGTAGGTTTCGCCGACCGCTCTCTCTGCTCT
S502A rev	AGAGCAGAGAGAGCGGTCGCGAACCTACGCCCCATCAG
S502D for	CTGATGGGGCGTAGGTTTCGACGACCGCTCTCTCTGCTCT
S502D rev	AGAGCAGAGAGAGCGGTCGTCGAACCTACGCCCCATCAG
Fl_for	GGCTGCTCTCAACATCGAC
Fl_rev	ATTGGAAGGCATGGCATTG
5'UTR wt for	TCTGGGATTTGCTTCTGGGA
5'UTR alt1 for	TGCCACAGTGAGGATGAGAA
5'UTR alt2 for	GGCCCCTAGACAACATTTCA
5'UTR alt2 for II	TCCTCCACGCTGATAAGCTT
Exon2 rev I	TCACTGTGACTATGGCTGAGA
Exon2 rev II	TCCTCCACGCTGATAAGCTT

Primername	Sequenz
Exon2 rev III	CTTCCACATCCACATCACCA
B for	CTCTAAAGGCAAACAGGCTC
B rev	ATTGGAAGGCATGGCATTG

2.6 Verwendete Konstrukte

Alle Konstrukte wurden für diese Arbeit bzw. in der vorausgegangenen Bachelorarbeit kloniert

Tabelle 6 - Liste aller verwendeten DNA-Vektoren

Konstruktname	GOI	Tag	Vektor
Lonza GFP transfection vector	GFP		pmax
mStim1_pmax_IRES_mcherry	Stim1	IRES-mcherry	pmax
mStim1A_pmax_IRES_mcherry	Stim1A	IRES-mcherry	pmax
mStim1_pCAGGS-IRES_GFP	Stim1	IRES-GFP	pCAGGS
mStim1A_pCAGGS-IRES_GFP	Stim1A	IRES-GFP	pCAGGS
mOrai1_pmax_IRES_GFP	Orai1	IRES-GFP	pmax
mOrai2_pmax_IRES_GFP	Orai2	IRES-GFP	pmax
mOrai3_pmax_IRES_GFP	Orai3	IRES-GFP	pmax
STIM1_C-term_mCherry	STIM1	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
STIM1A_C-term_mCherry	STIM1A	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
STIM1A D503A_C-term_mCherry	STIM1A	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
STIM1A S502A_C-term_mCherry	STIM1A	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
STIM1A S502D_C-term_mCherry	STIM1A	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
STIM1A RRFDS to AAAAA_C-term_mCherry	STIM1A	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
STIM1A DDQS to AAAA_C-term_mCherry	STIM1A	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
STIM1A FSD to AAA_C-term_mCherry	STIM1A	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
STIM1A RR to QQ_C-term_mCherr	STIM1A	N-Term_HA, C-Term_mCherry	pmax
pEX-YFP-hSTIM1	STIM1	N-Term YFP	pEX
HA_CRACM1_pCAGGSM2-IRES_GFP	ORAI1	IRES GFP	pCAGGSM2
HA_CRACM1_R77E/pCAGGSM2-IRES_GFP	ORAI1 R77E	IRES GFP	pCAGGSM2
NFAT-GFP	NFAT1	GFP	pCAGGS
STIM1 YFPc	STIM1	YFPc	pmax
STIM1A YFPc	STIM1A	YFPc	pmax
pBabe-CMV-YFPn-DEST-neo		YFPc	pBabe
LOXHD1-YFPn	LOXHD1	YFPc	pBabe

Konstruktname	GOI	Tag	Vektor
FBLN1-YFPn	FBLN1	YFPn	pBabe
EFEMP1-YFPn	EFEMP1	YFPn	pBabe
SHROOM3-YFPn	SHROOM3	YFPn	pBabe
FLOT1-YFPn	FLOT1	YFPn	pBabe
CLGN-YFPn	CLGN	YFPn	pBabe
CYB5R3-YFPn	CYB5R3	YFPc	pBabe
PDB8B-YFPn	PDB8B	YFPc	pBabe
SOD1-YFPn	SOD1	YFPn	pBabe
SYT2-YFPn	SYT2	YFPn	pBabe
POLB-YFPn	POLB	YFPn	pBabe
LRP1-YFPn	LRP1	YFPc	pBabe
SPAST-YFPn	SPAST	YFPc	pBabe
RAB5A-YFPn	RAB5A	YFPn	pBabe
AKAP5-YFPn	AKAP5	YFPn	pBabe
PALM-YFPn	PALM	YFPn	pBabe
STIM2.2-YFPn	STIM2.2	YFPn	pBabe

2.7 Antikörper

Tabelle 7 - Liste der verwendeten primärer und sekundärer Western Blot Antikörper, sowie immunzyto- und immunhistologischer Antikörper

Protein	Firma	Catalog Nr.	Erkannte Region	Klonarität
Stim1	Santa Cruz	sc-68897	AA 441-620	monoclonal
Stim1	Proteintech	11565-1-AP	AA 2-350	polyclonal
Stim1A	AG Prof. Dr. Martin Jung		CSASAGSDDQSLWKYPA	polyclonal
Orail	Santa Cruz	sc-377281	AA 256-301	monoclonal
β -Aktin	Sigma-Aldrich	A1978	β -zytoplasmatisches Aktin N-terminales Peptid	monoclonal
α -Hase-HRP	GE Healthcare Amersham	NA9340	Hase	
α -Maus-HRP	Amersham Bioscience	NA931	Maus	
Alexa Fluor 568	Thermo Fischer Scientific	A-11004	Ziege anti-Maus IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed	
Alexa Fluor 488	Thermo Fischer Scientific	A32731	Ziege anti-Hase IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed	

2.8 Kits

Tabelle 8 - Liste verwendeter Kits

Kit	Hersteller	Bestellnummer
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
Clarity Western ECL Solution	Bio-Rad	1705060
Gateway BP Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific	10348102
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific	11791020

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Genejet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific	10242490
HiSpeed Plasmid Maxiprep Kit	Quiagen	12663
Interferin®	Polyplus-transfection®	409-10
jetPRIME® Transfektions Reagenz	Polyplus-transfection®	114-07
jetOPTIMUS® Transfektions Reagenz	Polyplus-transfection®	117-07
QIAquick Gel extraction Kit	Quiagen	28706
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen	204145
Zombie NIR Fixable Viability Kit	Biologend	423105

2.9 Reagenzien

Tabelle 9 – Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
2-Mercaptoethanol	Acros Organics	125472500
2-Propanol	Sigma Aldrich	19516
Acrylamid-Bisacrylamid	Sigma Aldrich	A7168
Agar Select	Sigma Aldrich	A5054
Agarose broad range	Roth	T846.3
Agarose GTQ	Roth	6352.4
Albumin, Bovine Serum	Sigma Aldrich	A6003
Ampicillin	Sigma Aldrich	A9393
APS	Sigma Aldrich	248614-56
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich	A9418-100G
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth	A512.1
Calciumchlorid	Merck	102382
cOmplete Proteinaseinhibitor	Roche	5892791001
DDM	Sigma Aldrich	850520P
DMSO	Sigma Aldrich	D8418
dNTP Mix	VWR	733-1363
EDTA	Sigma Aldrich	ED2SS
EGTA	Sigma Aldrich	E4378.2506
FACSClean Solution	BD Biosciences	340345
Fluorescence Mounting Medium, 15 mL	Agilent	S302380-2
Fura-2-AM	Invitrogen	F1221
GelRed	Biotium	41003
Glutaminsäure	Sigma Aldrich	G1626
Glycin	Applichem	R030
Hefeextrakt	Difco	212750
HEPES	Sigma Aldrich	H7523
Hoechst 3342	Thermo Fisher Scientific	62249
Ionomycin	Calbiochem	407950
Kaliumchlorid	AnalaR	407950
Kanamycin Solution (50mg/ml)	Sigma Aldrich	K0254-20ML
Magermilchpulver	Sucofin	DM
Magnesiumchlorid	Merck	105833025
Methanol	Fisher Chemicals	M3950

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
Natriumazid	Sigma Aldrich	S8032
Natriumchlorid	Sigma Aldrich	S9888
OptiMEM	Thermo Fisher Scientific	31985088
Paraformaldehyd	Polysciences	00380-250
Polyornithin	Sigma Aldrich	P3655
ROTI®ImmunoBlock	Roth	T144.1
SDS	Acrosorganics	327315000
TEMED	Sigma Aldrich	T9281
Thapsigargin	Invitrogen	T7458
Triton X-100	Eurobio	18774
Trizma	Sigma Aldrich	T1503
TRIzol	Life Technologies	15596018
Trypsin	Thermo Fisher Scientific	25300-062
Trypton	Sigma Aldrich	T9410
Tween20	Sigma Aldrich	P1379

2.10 Lösungen

2.10.1 Imaging Lösungen

Ringerlösung mit 0, 1 bzw 2 mM Kalziumchlorid (CaCl ₂)	
0, 1, 2 mM	CaCl ₂
145 mM	NaCl
4 mM	KCl
10 mM	Glukose
10 mM	HEPES
2 mM	MgCl ₂
1 mM bei 0 mM CaCl ₂ ; 0 mM bei 1 bzw. 2 mM CaCl ₂	EGTA

310 mosm; pH 7,4 (Titration mit NaOH)

2.10.2 SDS-Page (Polyacrylamid Gel Elektrophorese) & Western Blot-Lösungen

Blottingpuffer	pH 8,3
20 %	Methanol
1 %	SDS
250 mM	Tris-HCl
1,92 M	Glycin

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

Primärantikörperlösung	
Antikörper in entsprechender Verdünnung	
1 %	BSA
0,02 %	Natriumazid
in PBS	
RIPA-Lysepuffer	
	pH 7,4
10 mM	Tris pH 7.4
1 %	Triton X-100
0,5 %	NP40
150 mM	NaCl
in PBS	
Sammelgelpuffer	
	pH 6,8
0,5 M	Tris-HCL
0,4 %	SDS
in H ₂ Od	
SDS-Elektrophoresepuffer, 10 x	
	pH 8,3
250 mM	Tris-Base
1 %	SDS
1,92 M	Glycin
Primärantikörperlösung	
Antikörper in entsprechender Verdünnung	
5 %	Magermilch
in TBST	
TBS, 10 x	
	pH 7,5
500 mM	Tris-Base
1,5 M	NaCl
TBST	
	pH 7,5
10 %	TBS, 10x
0,1 %	Tween
Trenngelpuffer	
	pH 8,8
1,6 M	Tris-HCl
0,4 %	SDS
In H ₂ Od	

IP-Waschpuffer	pH 7,4
20 mM	Tris
100 mM	KCl
10 %	Glycerol
0,05 %	DDM

IP-Lysepuffer	pH 7,2
20 mM	Tris
100 mM	KCl
10 %	Glycerol
0,1 %	DDM

2.10.3 Weitere Lösungen

FACS Puffer	pH 8,3
5 %	FCS
0,5 %	BSA
0,07 %	NaN ₃
In PBS	

LB-Medium	pH 7,5
1%	Select Pepton oder Trypton
1%	Select Pepton oder NaCl
0,5%	Select Yeast Extract
100 µg/ml /	Ampicillin /
60 µg/ml	Kanamycin

LB-Agarplatten	LB-Medium
1,5%	Agar
100 µg/ml /	Ampicillin /
60 µg/ml	Kanamycin

TBE, 10x	pH 8,3
10 mM	EDTA
89 mM	Tris-Base
89 mM	Borsäure

2.11 Bakterienstämme

Tabelle 10 - Liste verwendeter Bakterien

Bakterienstamm	Hersteller	Bestellnummer
XL-1 Blue Subcloning Grade	Agilent Technologies	200249
ccdB Survival™ 2 T1R Competent Cells	Thermo Fisher Scientific	A10460

2.12 Größenstandards

Tabelle 11 - Liste verwendeter Größenstandards

Größenstandard	Hersteller	Bestellnummer
100bp DNA Ladder	NEB	N3231S
DNA Ladder 1 kb	Thermo Fisher Scientific	10787-018
Precision Plus Protein Dualcolor Standard	BioRad	1610394

2.13 Laborgeräte

Tabelle 12 - Liste verwendeter Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Amaxa® Nucleofector II®	Lonza
Bio-Photometer	Eppendorf
Back-Ups 1400 Akku	APC
ChemiDoc™ XRS	Biorad
FACSVerse	BD Biosciences
Gelelektrophorese Mini-Protean Tetra Cell	Biorad
Heizblock	Bioer
Hoefer™ MiniVE Mini Vertical Electrophoresis Unit	Hoefer™
Inkubationsschüttler Minitron CH-4103	Infors HT
Inkubationsschüttler Unimax 1010	Heidolph
Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific
Inkubator Heraeus	Thermo Fisher Scientific
Mastercycler Personal 5332	Eppendorf
Mikroskop Ax10	Zeiss
NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Platereader GENios Pro	Tecan
Pressure Regulator PR-10	ALA
SE260/SE250 MiniVertical Electrophoresis System Plates	Cytiva (ehem. GE Healthcare)
Sterilbank KS12	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank HERAsafeKS	Thermo Fisher Scientific
Stromquelle Power Pac HC	Biorad
Sub-cell Agarose Gel Elektrophorese Systems	Biorad
Thermocycler, peqSTAR	VWR Peqlab
Visi Chrome High Speed Polychromatic System	Visitron
Vortex Thriller	Peqlab
Wasserbad A100	Lauda
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge Mikro 220R	Hettich

Gerät	Hersteller
Zentrifuge Mini Spin 5452	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

Calcium-Imaging Setup

Komponenten	Hersteller
Observer.A1 Mikroskop	Zeiss
SPOT Pursuit CCD-Kamera	SPOT
VisiChrome Polychromator	Visitron
Fura2 HC Filtersatz	Semrock
Filter Set 31	Zeiss
GFP Filter	Zeiss

TIRF Setup

Komponenten	Hersteller
Leica AM TIRF MC System	Leica
HCX Plan Apo Öl-Objektiv 100x	Leica
Bandbreit Suppressionsfilter: 525/50	Leica
Bandbreit Suppressionsfilter: 600/40	Leica

AXIOobserver

Komponenten	Hersteller
Axio Observer A1	Zeiss
Lichtquelle: HXP 120V	Leistungselektronik JENA
Filtersatz 21 HE	Zeiss
Filtersatz 38 HE	Zeiss
Filtersatz 46 HE	Zeiss
Prime 95B sCMOS-Kamera	Photometrics

Cellobserver

Komponenten	Hersteller
Cell Observer	Zeiss
Lichtquelle: Colibri	Zeiss
Filtersatz 54 HE	Zeiss
Evolve 512 CCD-Kamera	Photometrics

2.14 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13 - Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Arbeitsmaterialien	Hersteller	Bestellnummer
6 × Loading Dye	Thermo Fischer Scientific	R0619
Anti-HA Agarose	Thermo Fischer Scientific	26181
Deckgläschen 12 mm; 25 mm	ORSATec/Kindler	02R1215-D
Elektroporationsküvetten	BioBudget	75-02-SE
Gel blotting paper	GE Healthcare	10426981
my-Budget Einmalpipetten	BioBudget	75-50-PP
Protran Supported Nitrocellulose Membran	Amersham	10600016
Silikonpaste KORASILON® hochviskos	Roth	0857.1

2.15 Software

Tabelle 14 - Liste der verwendeten Softwares

Komponenten	Hersteller
Application Suite Advanced Fluorescence	Leica
Axio Vision	Zeiss
CorelDraw X4	Corel Corporation
Excel	Microsoft
FACSSuite	BD Biosciences
FIJI	Schindelin et al., 2012
FlowJo	BD Biosciences
Geneious Geneious	Geneious
GraphPad Prism 9	GraphPad Software
Image Lab	Bio-Rad
Mendeley	Elsevier
PowerPoint	Microsoft
VisiView	Visitron
Word	Microsoft
ZEN	Zeiss

Kapitel 3

Methoden

3.1 Zellkultur und Zellisolation

3.1.1 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator bei etwa 80% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei wurden HEK293 und HEK *ORAI1* überexprimierende Zellen in Minimum Essential Medium, HEK *STIM1*^{-/-}, MEF *Stim1*^{-/-}, SH-SY5Y *STIM1*^{-/-} und SH-SY5Y *STIM1*^{-/-} in *dulbecco's modified eagle's* Medium mit jeweils 10% FCS kultiviert. Das Medium der SH-SY5Y Zelllinien, wurde zusätzlich mit 1% NEAA versetzt. Zur Ablösung der Zellen für Versuchszwecke oder Passagierung wurden die Zellen zuerst mit DPBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin + 1x EDTA (Gibco) unter der Sterilbank (Biological safety cabinet, HERAsafe) abgelöst.

3.1.2 Isolierung und Kultivierung hippocampaler Astrozyten

Hippocampale Astrozyten wurden aus C57BL/6 (10A) Mäusen im Alter von P0 bis P1 isoliert. Nach Präparation des Hippocampus wurde das Gewebe in DMEM durch ein Zellsieb gedrückt und so der Zellverband primär aufgelöst. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 1900 rpm wurden die Zellen resuspendiert und in kollagenbeschichtete (0,5 mg/ml; Bioscience) Zellkulturflaschen in DMEM mit 10% FCS, 0,1% Penicillin-Streptomycin und 0,1% Mito Serum Extender ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 8% CO₂ bis zu einer Konfluität von 90-95 % für 5-7 Tage kultiviert und danach verwendet.

3.2 Transfektionstechniken

3.2.1 Elektroporation

Um eine hohe Zellzahl gleichzeitig und identisch zu transfizieren wurde die Methode der Elektroporation gewählt. Dabei werden die Zellen durch einen kurzen Stromimpuls kurzzeitig permeabilisiert und ermöglicht so den Transfer von DNA durch die Plasmamembran. Dafür

wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz bei 200 rcf für 5 min schonend abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 100 μ l Opti-MEM[®] resuspendiert und 1,5 μ g DNA hinzugegeben. Der Transfektionsansatz wurde in einer Küvette mittels Amaxa[®] Nucleofector II[®] (Lonza) bei dem Programm Q-001 elektroporiert. Nach vorsichtiger Zugabe von 400 μ l Medium mit Serum wurden die Zellen in Zellkulturschalen ausgetropft. Dabei wurde das Medium mit 0,1 % β -Mercaptoethanol versetzt um freie Radikale abzufuffern. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion verwendet.

Mittels Elektroporation wurden HEK-Zellen zur Transfektion vor Calciumimaging- und Patch-Clamp Experimente, sowie für FRET Messungen verwendet.

3.2.2. jetPrime

Zur Transfektion von DNA wurde das jetPrime[®] DNA Transfektionsreagenz von Polyplus-transfection[®] nach Herstellerangaben verwendet. Bei dieser Methode interagiert die zu transfizierende, negativ geladene DNA mit kationischen Bestandteilen des Transfektionsreagenz. Es bilden sich Transfektionskomplexe aus Reagenz und DNA mit positiver Nettoladung aus. Diese ermöglicht eine Interaktion der Transfektionskomplexe mit den negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) der Zellmembran. Es kommt zur Endozytose des Transfektionskomplexes (www.polyplus-transfection.com). Das Transfektionsreagenz jetPrime[®] wurde bei MEF Zellen zur Transfektion vor Calciumimaging Experimente verwendet, sowie bei HEK-Zellen vor Immunpräzipitationen.

3.2.3 jetOptimus

Ebenfalls zur Transfektion von DNA wurde das jetOPTIMUS[®] DNA Transfektionsreagenz von Polyplus-transfection[®] nach Herstellerangaben verwendet. JetOPTIMUS[®] basiert auf dem gleichen Prinzip wie jetPrime[®] (siehe 3.2.2), resultiert bei adhärennten Zellen laut Hersteller in einer höheren Transfektionseffizienz. JetOPTIMUS[®] wurde sowohl bei HEK, als auch SH-SY5Y Zellen zur Transfektion vor Lebendzell-Mikroskopie verwendet.

3.2.4 Interferin

Zur Transfektion von siRNA wurde Interferin[®] siRNA Transfektionsreagenz von Polyplus-transfection[®] nach Herstellerangaben verwendet. Das Einbringen von siRNA erfolgt bei Interferin[®] basierend auf dem gleichen Prinzip wie jetPrime[®] und JetOPTIMUS[®] (siehe 3.2.2). Interferin[®] wurde zum RNAi-induzierten Knock-down in primären Astrozyten verwendet.

3.3 Rekombinante DNA- und molekularbiologische Techniken

3.3.1 Restriktion

Durch die Verwendung von sequenzspezifischen Restriktionsenzymen und der enthaltenen Endonukleasen ist es möglich, Phosphodiesterbrücken des DNA-Rückgrats aufzuspalten. Dabei entstehen, je nach Enzym, glatte Enden (blunt ends), oder sogenannte sticky ends, Enden mit kurzem einzelsträngigem Überhang. Die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind meist palindromisch und 4-8 Basenpaare lang. Das Pipettierschema einer typischen Restriktion ist in Tabelle 15 aufgelistet

Tabelle 15 - Pipettierschema einer Restriktion

Volumen [μ l]	
X	DNA (1-2 μ g)
1	Restriktionsenzym 1
1	Restriktionsenzym 2
2	10x Puffer
A d 20	
ddH ₂ O	

1-3 h; 37 °C

anschließende Hitzeinaktivierung 15 min; 60 °C

3.3.2 Dephosphorylierung

Tabelle 16 - Pipettierschema einer Dephosphorylierungsreaktion

Volumen [μ l]	
20	Restriktionsverdau
2	Antarktische Phosphatase
4	10x Puffer Antarktische Phosphatase
A d 40	
ddH ₂ O	

1 h; 37 °C

anschließende Hitzeinaktivierung 15 min; 60 °C

Bei der Verwendung von Restriktionsenzymen entsteht lineare DNA, welche immer noch Phosphatgruppen am 5'-Ende aufweisen. Diese sind für eine erfolgreiche Ligation von DNA unabdingbar. Allerdings ist eine 5'-Phosphorylierung gerade bei Klonierungen mit glatten Enden hinderlich, da diese vermehrt zu Religationen des Vektors mit sich selbst ohne eine Integration eines Inserts führt. Deshalb wurden alle blunt geschnittenen Vektoren mittels antarktischer Phosphatase (NEB) wie in Tabelle 16 abgebildet dephosphoyliert.

3.3.3 Phosphorylierung

Synthetisierte DNA-Fragmente weisen keine 5'-Phosphorylierung auf. Für eine erfolgreiche Ligation muss diese entweder während der Synthese über phosphorylierte Primer eingebracht oder nach der Synthese mittels Polynukleotidkinase katalysiert werden. Die aus dem Bakteriophagen T4 stammende T4-Polynukleotidkinase überträgt unter ATP-Verbrauch eine Phosphatgruppe auf die 5'-Hydroxygruppen von endständigen Nucleotiden. Nach erfolgreicher Phosphorylierungsreaktion, wie in Tabelle 17 dargestellt, wurde das Insert zur Ligation eingesetzt.

Tabelle 17 - Pipettierschema einer Phosphorylierungsreaktion

Volumen [μ l]	
x	PCR Produkt/Insert
1	T4-Polynukleotidkinase
1	10x T4 Ligase Puffer
<hr/>	
Ad 10	ddH ₂ O
<hr/>	
30 min; 37 °C	
anschließende Hitzeinaktivierung 15 min; 65 °C	

3.3.4 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die kovalente Verknüpfung von 3'-Hydroxy-Ende und 5'-Phosphat-Ende von DNA mittels des Enzyms Ligase. Diese Reaktion ermöglicht es DNA-Fragmente wie Vektor-Rückgrat und Insert miteinander zu kombinieren. Im Optimalfall beträgt das Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3. Die Ligrationsreaktion ist in Tabelle 18 abgebildet.

Tabelle 18 - Pipettierschema einer Ligation

Volumen [μ l]	
X	Vektor-Rückgrat
X	Insert
1	T4 Ligase
1	10x T4 Ligase Puffer
<hr/>	
Ad 10	ddH ₂ O
<hr/>	
Über Nacht; 16 °C	

3.3.3 Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Methodik der Gelelektrophorese ermöglicht es, DNA gemäß ihres Molekulargewichts innerhalb einer Gelmatrix aufzutrennen. DNA ist ein Polyanion, dessen negative Ladung proportional zu dessen Molekulargewicht ist. Deshalb wandert sie in einem elektrischen Feld

zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit wird dabei von der Konzentration der Gelmatrix bzw. der daraus resultierenden Porengröße des Gels bestimmt. Kleine Fragmente wandern schneller, größere langsamer. Ein Größenstandard ermöglicht Rückschlüsse auf die Größe der jeweiligen DNA-Fragmente. Für analytische Zwecke wurde eine Standard Agarose als Gelmatrix gewählt. Wurde die DNA zu Klonierungszwecken aufgetrennt, z. B. nach Restriktion eines Vektors, wurde GTQ-Agarose (= Gentechnologie Qualität) verwendet. Diese ist sowohl DNAsen, als auch RNAsen frei und weist einen besonders niedrigen Schmelzpunkt auf. Diese Eigenschaften ermöglichen es, DNA nach Auftrennung erneut aus dem Gel zu isolieren. Dafür wurde das QIAquick Gel Extraktions Kit von QUIAGEN nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.4 Gateway Klonierung

Die Gateway Klonierung ermöglicht den Austausch von langen DNA-Abschnitten mittels homologer Rekombination. Die Klonierung ist dabei in zwei Schritte unterteilt. Im ersten Schritt werden mittels PCR sogenannte attB Seiten, den DNA-Abschnitten flankierend, angebracht. Mittels des Enzyms BP Klonase können attB und attP Seiten homolog ausgetauscht werden. Dabei setzt man in die Rekombinationsreaktion das PCR-Produkt mit attB Seiten und einen Donorvektor mit attP Seiten ein. Zwischen den attP Seiten befindet sich ein Gen, codierend für toxisches Protein (*ccdB*). Nur bei einer erfolgreichen Rekombination von attB mit attP sind die anschließend transformierten Bakterien überlebensfähig. Nach der ersten Rekombination werden die neuen Homologie-Seiten des Donorvektors als attL Seiten bezeichnet. In einem zweiten Schritt wird mittels LR Klonase ein Austausch des PCR Produkts im Donorvektor, flankiert von attL Seiten mit den attR Seiten im Zielvektor induziert. Auch zwischen den attR Seiten befindet sich eine toxische Genkassette. Nur nach erfolgreicher Rekombination sind die anschließend transformierten Bakterien überlebensfähig. Zur Klonierung wurde zum einen der Clonase™ Gateway™ BP Clonase I Enzym-Mix von Invitrogen™ nach Herstellerangaben. Vom Donorvektor pDONOR221 wurden 200 ng in die Reaktion eingesetzt, sowie 270 ng des PCR Produktes. Für den zweiten Schritt wurde der Clonase™ Gateway™ LR Clonase II Enzym-Mix ebenfalls von Invitrogen™ nach Herstellerangaben verwendet. Vom Zielvektor wurden 200 ng, vom Donorvektor 270 ng in die Reaktion eingesetzt. Gateway wurde angewendet, um mögliche Interaktionspartner von STIM1 und STIM1A im bimolekularen Fluoreszenzkomplementations-Assay zu generieren.

3.3.5 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Bakterien

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterien. Für diese Arbeit wurden die chemisch kompetenten *Escherichia coli* Stämme XL-1-Blue und *ccdB Survival™ 2 T1R* verwendet. Dafür wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe vom Fremd DNA für 30 min ebenfalls auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 37 °C. Nachdem die Zellen für weitere 90 s auf Eis abgekühlt wurden, wurde 1 ml kaltes LB Medium hinzugeben und die Bakterien unter Schütteln für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien für eine Minute bei 5000 rcf abzentrifugiert, das Pellet resuspendiert und auf LB Platten ausgestrichen. Je nach transformiertem Vektor enthielten die LB Platten Ampicillin oder Kanamycin.

3.3.6 Plasmidaufreinigung

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde je nach Menge der gewünschten DNA entweder das GeneJET™ Plasmid-Miniprep-Kit von Thermo Scientific™ oder das QIAprep Spin Maxiprep Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.7 RNA Isolation

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden >1.000.000 Zellen geerntet, gewaschen und das Pellet in 800µl TRIzol™ Reagent (Invitrogen™). Anschließend wurde die RNA Konzentration mit Hilfe des NanoDrop™ One/OneC von Thermo Scientific™ bestimmt und die Qualität der RNA mittels eines 1%igen Agarose Gels überprüft und bis zur cDNA Synthese bei -80 °C gelagert.

3.3.8 cDNA Synthese

Da die einzelsträngige RNA äußerst anfällig für Abbau durch RNAsen ist, wurde zu weiteren Versuchszwecken die RNA revers in viel stabilere, doppelsträngige komplementär-DNA (cDNA) transkribiert. Dafür wurde die SuperScript™ II Reverse Transkriptase von Invitrogen™ verwendet. Pro Synthese wurden 0,8 µg RNA eingesetzt. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.9 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es, einzelne genetische Bereiche von gnomischer DNA oder cDNA zu amplifizieren. Dabei flankieren Primer, 18-30 Nukleotide lange, einzelsträngige DNA-Fragmente, welche komplementär zu einem der DNA-Stränge sind, den

zu vervielfältigenden Bereich. Nach Denaturierung, bei welcher die DNA-Stränge voneinander gelöst werden, können sich in der Annealing-Phase die Primer an die einzelsträngige DNA anlagern. Nach Erhöhen der Temperatur synthetisiert eine DNA-Polymerase komplementär zur Template-DNA die fehlenden Nukleotide zu einem DNA-Doppelstrang. Bei jedem Zyklus wird die DNA-Menge exponentiell vermehrt. Für analytische Zwecke wurde der DreamTaq Green DNA-Polymerase Mastermix von Thermo Scientific™ verwendet. Für Klonierungen wurden die präzisere Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase von NEB eingesetzt. In Tabelle 19-21 sind die verwendeten Pipettierschemata und Zyklusprotokoll einer PCR dargestellt.

Tabelle 19 - Pipettierschema einer PCR mit Phusion DNA-Polymerase

Volumen [µl]	
X	DNA (20 ng)
1	Primer1 (10pmol)
1	Primer2 (10pmol)
1	dNTPs
10	10x HF/GC Puffer
0,25	Phusion-Polymerase
Ad 50	ddH ₂ O

Tabelle 20 - Pipettierschema einer PCR mit DreamTaq DNA-Polymerase

Volumen [µl]	
X	DNA (20 ng)
1	Primer1 (10pmol)
1	Primer2 (10pmol)
12,5	Dreamtaq-Mix
Ad 25	ddH ₂ O

Tabelle 21 - Schema einer PCR Reaktion.

X = Synthesegeschwindigkeit: Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase 15-30s/kB, DreamTaq Green DNA-Polymerase 1min/2kB

Temp. [°C]	Dauer (sec)	Zyklen
98	60	1
98	30	35
58	20	
72	X	
72	600	1
4	∞	∞

3.3.10 qRTPCR

Eine besondere Form der PCR ist die quantitative Echtzeit-PCR (*engl. quantitative real time PCR, qRTPCR*). Sie ermöglicht einen Rückschluss auf das Transkriptionslevel von Genen. Als zusätzliche Komponente wird der PCR-Reaktion ein Fluoreszenzfarbstoff zugefügt, welcher DS-DNA interkalierend ist. Für diese Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBRgreen verwendet. In einem qRT-PCR-Cycler kann nach Anregung des Farbstoffes mit $\lambda_{\max} = 494$ nm die resultierende Emission bei $\lambda_{\max} = 521$ nm detektiert werden. Proportional zu amplifizierter DNA-Menge nimmt so auch das Fluoreszenzsignal zu. Dabei resultiert je nach Expressionslevel eine abundantere cDNA in einem früheren exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Ein mitamplifiziertes Haushaltsgen, dessen Expression auf einem konstanten Level gehalten wird, dient als Kontrolle und Normierung zwischen mehreren Proben. Zur qRT-PCR wurde das QuantiTect SYBRgreen Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Pro Reaktion wurden 0,5 μ l cDNA und 300 nM Primer eingesetzt. Als Haushaltsgene wurden das TATA-Box Binde-Protein (TBP), sowie die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) analysiert. In dieser Arbeit sind nur die aus TBP normierten Werte gezeigt, da sich die Tendenzen der Messungen nicht unterscheiden.

3.4 Proteinbiochemie

3.4.1 Lysatgenerierung

Adhärente Zellen wurden zur Lysatgenerierung mit gekühltem PBS gewaschen. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurde gekühlter RIPA Puffer mit cComplete™ Proteasen Inhibitor Cocktail von Roche auf die Zellen gegeben. Je nach Dichte wurde das Volumen des Puffers angepasst. Konfluente Zellen einer 10 cm Petrischale wurden in 600 ml Puffer aufgenommen. Nach Zugabe des Puffers inklusive Proteasen Inhibitor wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei -80 °C schockgefroren. Anschließend wurden die Zellen auf Eis für 20 min inkubiert und alle 5 min für 10 sec gevortext. Murines Gewebe wurde direkt nach der Entnahme in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Daraufhin wurde 800 μ l RIPA Puffer mit cComplete™ Proteasen Inhibitor Cocktail hinzugegeben und der Zellverband mittels rotierendem Homogenisator gelöst. Sowohl Zellen als auch homogenisierte Gewebe wurden bei 18000 g für 30 min bei 4° C zentrifugiert. Die sich im

Überstand befindlichen Proteine wurden abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mittels Pierce™ BCA™ Protein-Assay von Thermo Scientific™ nach Herstellerangaben bestimmt. Bei Lysaten aus kultivierten Zellen wurden die Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:200 vermessen, bei Geweben 1:100, 1:200 und 1:300. Es wurde pro Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (*engl. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) ermöglicht es, Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dabei bedient man sich der Tatsache, dass SDS mit Proteinen negativ geladene Komplexe bildet. Diese weisen ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis auf. Innerhalb einer Gelmatrix wandern die Proteine nach Anlegen einer Spannung in Richtung der Anode. Bei der SDS PAGE verwendet man ein diskontinuierliches Gel, bestehend aus einem großporigen Sammelgel, um die Proteine zu fokussieren und einem kleinporigen Trenngel, um die Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

In einer vertikalen Gelkammer wurde zuerst das Trenngel und nach vollständigem Auspolymerisieren das Sammelgel gegossen. Für diese Arbeit wurden 7%ige Trenngele, sowie 4%ige Sammelgele verwendet. Dafür wurden zuerst 2,5 ml 4xTrenngel- bzw. 1,25 ml 4xSammelgelpuffer mit 5,66/3,21 ml dH₂O gemischt. Anschließend wurden 1,75/0,5 ml Bisacylamid sowie 75/37,5 µl des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 15/7,5 µl des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine mit 5x Lämmli-puffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert, um die Faltung der Proteine aufzulösen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenstandard aufgetragen, um im weiteren Versuchsverlauf das Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine (*protein(s) of interest*, POI) bestimmen zu können. Die Proben wurden bei 80 V bis zur Gelfront einlaufen gelassen. Anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine wurden diese im nächsten Schritt auf eine Membran transferiert. Der Transfer erfolgte elektrophoretisch in der Mini Trans-Blot® Cell Blotting Kammer von BioRad. Dafür wurde eine Nitrozellulosemembran luftblasenfrei auf die Gelmatrix gelegt. Eingespannt zwischen Whatman® Blotting Papers und Schwämmen erfolgte in einer Kammer mit Blotting Puffer der Proteintransfer. Durch Anlegen einer Spannung (350 mA für 1,5h) wurden die Proteine im negativen Komplex aus dem Gel auf die Membran übertragen. Nach dem Blotten wurden freie Bindungsstellen der Membran mit 5% Magermilch in TBS geblockt. Danach wurde die Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem Primär-Antikörper (AK) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot zuerst drei Mal für 10 min in TBS mit 0,1% Tween gewaschen. Anschließend wurde der Sekundär-Antikörper in 5% Magermilch in TBS für 1h bei Raumtemperatur (RT) auf die Membran gegeben. Nach erneutem zweimaligem Waschen für 10 min in TBS mit 0,1% Tween, sowie einem 10 min Waschschrift in TBS wurde der Blot in der ChemiDoc™ XRS-System mittels Chemilumineszenz entwickelt. Dazu wurde die Clarity Western ECL Substrate von BioRad verwendet. Der farbige Größenstandard ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichts der zu analysierenden Proteine

3.5 Interaktionsanalysen

3.5.1 Ko-Immunpräzipitation

Bei einer Immunpräzipitation wird mittels eines Antikörpers das Antigen eines zu untersuchenden Proteins angereichert. Ziel einer Ko-Immunpräzipitation ist es, zusätzlich gebundene Interaktionspartner der POI ebenfalls aufzukonzentrieren, um eine Interaktion bestätigen zu können. Dafür können die möglichen Interaktionspartner zusammen überexprimiert werden, oder endogene Proteine analysiert werden, wie es z. B. bei einer massenspektrometrischen Analyse der Fall ist. In dieser Arbeit wurde ein STIM1(A) Konstrukt mit HA-Tag überexprimiert und mittels Pierce™ Anti-HA Agarose von Thermo Scientific™ aus dem Gesamtzellysat aufkonzentriert. Dafür wurden Zellen in IP-Puffer lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 3.4.1 und 3.4.2). Die Konzentration wurde anschließend auf 5 µg/µl eingestellt. 30 µl der Anti-HA Agarose wurden in ein LoBind® Reaktionsgefäß überführt und drei Mal mit IP-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden min. 2 mg des Zellysats zur Agarose gegeben und für 90 min bei 4 °C auf einem Rollschüttler

inkubiert, um das HA-Epitop an die Agarose zu binden. Danach wurde die Agarose bei 300 g für 30 sec abzentrifugiert und der Überstand abgenommen und 25µl aufgehoben (= ungebundene Fraktion). Darauf folgend wurde die Agarose 10 Mal mit IP-Waschpuffer gewaschen, um unspezifische gebundene Proteine zu entfernen. Für Analyse im Western Blot wurden die Proteine mittels 35 µl Glycin-Puffer (p.H 2.8) eluiert. Für anschließende massenspektrometrische Analysen wurde mit einem Puffer bestehend aus 2% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 6.8 zur Elution verwendet. Dazu wurden die Proben in Puffer für 5 min bei 90 °C geschüttelt.

3.5.2 BiFC mittels durchflusszytometrische Bestimmung

Der bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsassay ist eine molekularbiologische Methode um die direkte Interaktion zweier Proteine nachweisen zu können. Er basiert auf einem einfachen Prinzip, das in Abbildung 7 dargestellt ist.

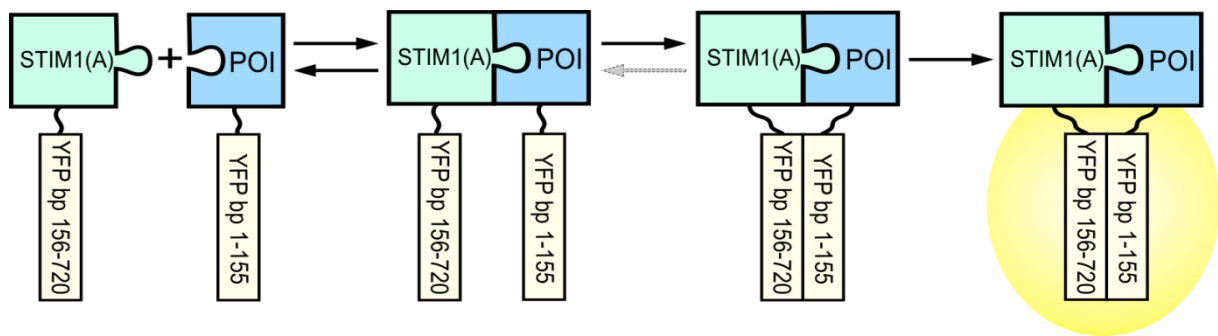


Abbildung 7 - Schematische Darstellung des Prinzips des bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsassays

Die DNA-Sequenz zweier Kandidaten, deren Interaktion überprüft werden soll, werden mit einer Linkersequenz und jeweils der Hälfte eines YFPs (geteilt zwischen bp 155 und 156) fusioniert. Nach Überexpression können sich die YFP Hälften im Falle einer direkten Interaktion oder ausreichenden räumlichen Nähe assemblieren und die ausgehende Fluoreszenz kann detektiert werden. Abkürzungen: POI = *engl. Protein of interest*, YFP = *engl. Yellow fluorescent protein*.

Die zu testenden Proteine werden über eine Linkersequenz direkt an ein Fluoreszenzprotein gebunden. Der Linker soll gewährleisten, dass die Quartärstruktur des POI die Interaktion nicht beeinflusst. Allerdings werden die Kandidatensequenzen jeweils nur mit der Hälfte des Fluorophors fusioniert. Kommen beide Proteine nach Überexpression innerhalb der gleichen Zelle in räumliche Nähe zueinander, kann das Fluorophor komplementiert und die resultierende Fluoreszenz gemessen werden. In diesem Fall wurde YFP verwendet, was nach AS155 geteilt war. Das Fluoreszenzsignal kann mittels Durchflusszytometrie (*engl. fluorescence activated cell scanning*, FACS) bestimmt werden. Bei dieser Methode können verschiedene optische Eigenschaften von Zellen in Suspension gleichzeitig analysiert werden.

Dabei werden die Zellen einzeln durch eine sogenannte Flusszelle geführt und durchlaufen dabei mehrere Laserstrahlen, was in charakteristische Streulicht- bzw. Fluoreszenz-Signalen resultiert. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) erlaubt Rückschlüsse über die Größe, bzw. das Volumen von Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. Außerdem ist es möglich, Fluoreszenz der Zellen zu detektieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle durchflusszytometrischen Messungen am FACS Verse der Firma Becton Dickinson mit der Software BD BD *FACSuite*[™] durchgeführt.

Für diesen Assay wurden die Jägerkonstrukte STIM1(A)-YFP_C in pMax kloniert. Die Beutekonstrukte POI-YFP_N befanden sich in pBabe. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Konstrukte wurden die Vektoren equimolar eingesetzt. An Tag 0 wurden HEK S1/2^{-/-} an im 6 Well Maßstab ausgesät. Die Transfektion erfolgte an Tag 1, mit 2 µg Gesamt-DNA pro Well (siehe 3.2.3). An Tag 2 wurden zu den Zellen 1µM des SERCA-Inhibitors Thapsigargin (TG) zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Danach wurden 500 µl PBS mit 1µM TG zugegeben und für 10 min inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen durch Klopfen abgelöst und in FACS Röhren überführt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 320g bei 4 °C wurden die Zellen in 400 µl kaltem FACS Puffer mit Reagenzien des Zombie Aqua[™] Fixable Viability Kit (BioLegend, nach Herstellerprotokoll) zur Vitalitätsanalyse resuspendiert und im Kühlschrank für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die FACS Messung. Die Zellen wurden in 4 verschiedene Gates eingeteilt und analysiert:

1. Aus Gesamtpopulation: Zellen und kein Zelldebris
2. Aus 1: Einzelzellen und keine Dubletten
3. Aus 2: Viabilität der Zellen. Diese wurde mittels Zombie Aqua[™] Fixable Viability Kit (BioLegend) bestimmt.
4. Aus 3: YFP positive Zellen (YFP⁺), ergibt Histogramm

Daraus ergab sich ein Prozentwert für YFP⁺, vitale Einzelzellen und somit ein Maß für tatsächliche Interaktion, wobei die Werte der potentiellen Interaktionspartner immer in Relation zur Positivkontrolle (STIM1(A)-YFP_C + STIM1-YFP_N) und Negativkontrolle (STIM1(A)-YFP_C + noPOI-YFP_N) betrachtet wurden. Die Daten wurden mittels der FloJo Software 10.0.7 analysiert.

3.6 Immunzyto- und Immunhistochemie

Die Immunzyto- bzw. Immunhistochemie dient dazu, intrazelluläre Proteine mittels Antikörpern sichtbar zu machen und deren Lokalisierung zu bestimmen. Dafür wird eine Kombination aus zwei Antikörpern benötigt: ein primärer Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop des POI, welcher wiederum von einem sekundären und fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert werden kann. Das Fluoreszenzsignal lässt sich mikroskopisch untersuchen und quantifizieren.

3.6.1 Immunzytochemie

Auf 12mm Glasplättchen ausgesäte Zellen wurden im ersten Schritt der Immunzytochemie zwei Mal mit kaltem 2mM Calcium Ringer gewaschen. Danach wurden die Zellen fixiert. Die Auswahl der Reagenzien wurde für jeden Antikörper separat getroffen und etabliert. Dabei wurde zwischen 2 mM Calcium Ringer mit 2-4% PFA für 10-20 min bei RT, eiskaltem Methanol oder Ethanol mit 5% Essigsäure für 10 min bei -20 °C sowie eiskaltem Aceton 5-10 min bei -20°C unterschieden. Nach der Fixierung wurden die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS und einmal mit 0,1% Rinderalbumin (*engl. bovine serum albumin*, BSA) in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels 0,1 % Triton in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach Fixierung mittels Alkoholen war keine Permeabilisierung notwendig. Im darauf folgenden Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen mittels 4 % BSA in PBS für 30 min bei RT geblockt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem primären Antikörper. Dieser wurde in 2 % BSA in PBS und 0,05 % Tween in einem Konzentrationsverhältnis von 1:50 bei Seren und 1:500 bei einem optimal funktionierenden Antikörper angesetzt. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgt über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Zellen drei Mal gründlich mit 0,1 % BSA in PBS gewaschen. Anschließend wurde mit dem Sekundärantikörper 1:1000 in 2 % BSA in PBS und 0,05 % Tween für 1 h bei RT inkubiert. In einem letzten Schritt wurden die Zellen zweimal mit 0,1 % BSA in PBS sowie einmal mit ddH₂O gewaschen und anschließend in 6µl ProLong™ Gold Antifade Mountant mit DAPI (Invitrogen™) auf einem Objektträger eingedeckt.

3.6.2 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Färbungen wurden in Paraffin eingebettetes Gewebe in 4 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden für 1 h bei 55 °C im Wärmeschrank getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Gewebe drei Mal für je 7 min in Xylol entparaffiniert.

Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (100% - 65%) für je 3 min rehydriert. Darauffolgend wurden die Schnitte für 1 h bei 95 °C in Citratpuffer (pH6) gekocht, um Epitope zu demaskieren. Nach einer 20 minütigen Abkühlphase wurden unspezifische Bindungsstellen in 200µl ROTI® ImmunoBlock für 1 h bei RT geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:50 bei Seren und 1:500 bei einem optimal funktionierenden Antikörper) erfolgte ebenfalls in ROTI®ImmunoBlock über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei Mal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dieser wurde 1:1000 in ROTI®ImmunoBlock angesetzt und die Gewebe für 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Gewebe drei Mal in PBS gewaschen. Final wurden die Schnitte in 75µl ProLong™ Gold Antifade Mountant mit DAPI (Invitrogen™) eingedeckt.

Zur Analyse wurde das konfokale Mikroskop LSM 710 (Zeiss) sowie der Axioobserver (Zeiss) verwendet. Die Bilder wurden als Z-Stacks mit einer optischen Schnittdicke von 0,32 µm (LSM) aufgenommen und sind in dieser Arbeit als maximale Intensitäts Projektion (MIP) gezeigt.

3.7 Mikroskopie von Lebendzellen

3.7.1 Fluoreszenzbasiertes Calciumimaging

Zur Messung von intrazellulärem Calcium gibt es verschiedene Farbstoffe, welche Kompartiment-spezifisch Aussagen über die vorherrschende Calciumkonzentration liefern können. Die am besten etablierte und am häufigsten verwendete Methode ist die Messung der globalen zytosolischen Calciumkonzentration. In dieser Arbeit wurde dafür der ratiometrische Fluoreszenzfarbstoff Fura2-AM verwendet. Acetoxymethylgruppen ermöglichen es, dem Farbstoff über die Zellmembran zu diffundieren. Nach deren Abspaltung durch zytosolische Esterasen verbleibt der Farbstoff impermeabel im Zytosol. Der Ca^{2+} -Chelator Fura-2 kann freies Calcium über seine vier negativ geladenen Carboxylgruppen binden, wodurch sich die spektralen Eigenschaften des Fluorophors ändern: In der calciumfreien Form liegt das Excitationsmaximum bei 380 nm. Nach Bindung von Calcium liegt es bei 340 nm, wobei das Emissionsmaximum bei 510 nm konstant bleibt. Über Zu- oder Abnahme dieses Ratios lassen sich Anstiege bzw. Abfälle des zytosolischen Calciums visualisieren. Zum Imaging wurden die Zellen auf 25 mm Glassplättchen ausgesät je nach Experiment zusätzlich transfiziert (Siehe 3.2). Am Messtag wurden die Zelllinien mit 1 µM Fura2-AM beladen. Bei

primären Astrozyten wurde eine Konzentration von 2 μM Fura2-AM gewählt. Die Beladung der Zellen wurde bei RT für 30 min auf einem Wippschüttler durchgeführt. Zur Perfusion wurde ein vollautomatisiertes Perfusionsystem (ALA Scientific Instruments) verwendet. Die Zellen wurden alle 5 s belichtet. Alle Messungen wurden bei RT durchgeführt und mit der Software VisiView® analysiert. Zur Determinierung der SOCE-Parameter wurde die Software IgorPro verwendet. Der Flächeninhalt der Kurve wurde mittels GraphPad PRISM 8 bestimmt. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich das sogenannte Readditionsprotokoll verwendet. Dieses Protokoll ermöglicht es, zwischen intrazellulär gespeichertem Calcium und durch den SOCE in die Zelle eintretendes Calcium zu differenzieren. Dafür wurden die Zellen nach Bestimmung des basalen Calciums in calciumhaltigem Ringer (0,5-2 mM Ca^{2+}) mit calciumfreiem Ringer überspült, welcher 1 μM TG enthielt. Der SERCA-Inhibitor verhindert irreversibel, dass Calcium zurück in der Zelle gepumpt werden kann. Über Leckströme der Proteinbiosynthese tritt endoplasmatisches Calcium ins Zytosol aus. Die Differenz zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor TG Zugabe und der die maximale in Zytosol vorherrschende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach TG Applikation wurde als Δ TG bezeichnet. Durch diese Entleerung wird der SOCE induziert. Da sich die Zellen noch in calciumfreier Umgebung befinden, kann von außen durch die Orais zu diesem Zeitpunkt noch kein Calcium in die Zelle gelangen. Nachdem der zytosolische Calciumüberschuss durch Plasmamembran Ca^{2+} ATPase (PMCA) aus der Zelle gepumpt oder in TG-insensitive Organellen aufgenommen wurde, wurde erneut calciumhaltiger Ringer (0,5-2 mM Ca^{2+}) appliziert und so ein SOCE indizierter Calciumeinstrom gemessen. Für den SOCE wurden drei Parameter bestimmt: die Calciumeinstromrate, welche der Steigung der Kurve entspricht; den Δ Ca^{2+} -Peak, dem maximal Wert des einströmenden Calciums abzüglich der in 0 Ca^{2+} vorherrschenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und das Δ Ca^{2+} -Plateau, die Differenz von in die Zelle einströmendem und herausgepumpten Calcium abzüglich der in 0 Ca^{2+} vorherrschenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Zur Terminierung des Ca^{2+} -Einstroms wurde am Ende der Messung calciumfreier Ringer appliziert. Zusätzlich zum Readditionsprotokoll wurde für die in Abbildung 39 dargestellt Messung ein Protokoll verwendet, in welchem TG in calciumhaltigem Ringer appliziert wurde. Dadurch wurde gleichzeitig ein Calciumausstrom aus dem ER als auch der SOCE induziert. Eine Unterscheidung, wie im Readditionsprotokoll war dabei nicht möglich, weshalb dieses Protokoll die globale intrazelluläre Calciumkonzentration abbildete.

3.7.2 TIRF-Mikroskopie zur FRET Analyse

Um die Interaktion der STIM1 Varianten mit Orai1 zu untersuchen, wurde die Methode des Förster-Resonanzenergietransfers verwendet. Dabei kann Energie von einem von außen angeregten Donorfluorophor auf ein Akzeptorfluorophor übertragen werden, wenn sich beide Moleküle in räumlicher Nähe <10 nm zueinander befinden. Die Energieübertragung ist demnach abstandsabhängigen und geschieht ohne Entstehung von Emissionsstrahlung des Elektronendonors. Die Messungen wurden unter Verwendung eines Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskops durchgeführt. Bei der internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) wird die Lichtquelle so eingestellt, dass das Licht in möglichst flachem Winkel auf die Glas-Wasser-Grenzfläche der Probe trifft. Der Lichtstrahl wird an der Glasoberfläche total reflektiert, was eine Ausbreitung der Lichtwellen verhindert. Dadurch entsteht in der hinter dem Glas liegenden wässrigen Schicht ein evaneszentes Feld, in welchem die Lichtintensität exponentiell abfallend 100–200 nm in die Probe eindringen kann. Liegen Fluorophore in diesem Bereich, können diese angeregt und deren Emission gemessen werden. Durch die geringe Eindringtiefe kann eine bessere Auflösung erzeugt werden als bei regulärer Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskopie mit einer Lichttiefe von über 500nm. Zur Messung wurden HEK293-Zellen mittels Elektroporation mit 3 mg *STIM1-mCherry-pmax* (mCherry nach L599) oder *STIM1A-mCherry-pmax* als Elektronenakzeptor sowie 1 µg *ORAI1-GFP-pmax* als Elektronendonor transfiziert. Außerdem wurden Zellen mit entweder Akzeptor- oder Donorvektor transfiziert um die Messung zu kalibrieren. Die STIM1-Orai1 Interaktion wurde durch ER-Speicherentleerung mittels 1 µm TG in 1 [Ca²⁺]_o Ringer getriggert. Nach 10 min Inkubationszeit wurden die Bilder am Leica AM TIRF MC System mittels 100×1.47 oil HCX PlanApo Objektiv aufgenommen. Dafür wurde das FRET Modul der Software Leica Applikation Suite verwendet. Da Orai1 in der Plasmamembran lokalisiert ist, wurde die das GFP-Donor Signal verwendet, um die TIRF-Ebene der Probe festzulegen. Für jede Zelle wurden drei Aufnahmen mit verschiedenen Excitations- und Emissionswellenlängen gemacht: 1. GFP (angeregt mit 488nm, Suppressionsfilter BP 525/50); 2. mCherry (angeregt mit 561nm, Suppressionsfilter BP 600/40) und 3. FRET (angeregt bei 488 nm, Suppressionsfilter BP 600/40).

3.7.2.1 FRET Auswertung

Die FRET Effizienz wurde auf der Grundlage auf einem Paper von Van Rheenen berechnet (Van Rheenen et al., 2004). Bei allen Aufnahmen wurden eine Hintergrundkorrektur sowie die Korrektur von Crosstalk von Signalen in benachbarte Farbkanäle vorgenommen.

3.7.2.2 Clustergrößenanalyse

Anhand der im TIRF generierten Daten wurde zusätzlich eine Clustergrößenanalyse der STIM1 bzw. STIM1A Cluster vorgenommen. Dazu wurden in Fiji zu erster der Hintergrund die Aufnahmen mit einem Rolling Ball Radius von 5 Pixel korrigiert. Anschließend wurde der Threshold mit 17/255 festgelegt. Die Aufnahmen wurden schließend binär konvertiert und Cluster mittels des Watershed-Tools voneinander abgegrenzt und die in Pixel exportierte TIF Datei in die korrespondierenden μm konvertiert. Die Cluster wurden final mit dem Extended Particle Analyzer Tool von BioVoxxl (Brocher, 2015) ausgewertet. Dabei wurden als Area (μm^2) mit 0,23-infinity und die Zirkularität mit 0,1-1,0 festgelegt. Die sich daraus ergebenden Clustergrößen wurden geordnet und aufsteigend mit GraphPad PRISM 8 dargestellt.

3.7.3 Kolokalisation

Mittels Kolokalisation wurde überprüft, ob STIM1A mit STIM1 in die gleichen Cluster transloziert, oder ob meine Varianten unabhängig voneinander clustern. Dafür wurden HEK *STIM1/g^{-/-}* mit *SP-YFP-STIM1-pmax* und *STIM1-mCherry-pmax* oder *STIM1A-mCherry-pmax* transient transfiziert. Die Zellen wurden zum einen im Ruhezustand in 1 mM Calcium fotografiert, als auch 10 min nach Zugabe von 1 μM TG. Das Fluoreszenzsignal wurde mittels des Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskops Cell Observer A1 (Zeiss) detektiert. Dafür wurde das Fluor 40x/1.3M27 Ölobjectiv verwendet. Die YFP Fluoreszenz wurde mit dem Filterwürfel 54HE in Kombination mit der LED 470 (470/40) gemessen. MCherry Signale wurde mittels Filterwürfel 56HE und LED N-White + Ex (556/20) detektiert. Die Zellen wurden als Z-Stacks aufgenommen und zur verbesserten Visualisierung als MIP dargestellt. Die Daten wurden mittels Kolokalisationsanalyse-Plugin JACoP in Fiji als Einzelebene ausgewertet und die Manders-Koeffizienten bestimmt.

3.7.4 NFAT-Translokation

Die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT wurde mittels des Zeiss AxioObserver untersucht. Dafür wurden Zellen mit *NFAT1-GFP-pCAGGS* sowie *STIM1-mCherry-pmax* oder *STIM1A-mCherry-pmax* mittels jetOptimus auf einem 25 mM Glasplättchen transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Pierce™ Hoechst 3342 für 5 min bei 37°C in 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium gefärbt. Anschließend wurden sie in 1 mM Ca^{2+} -Ringer gewaschen und ebenfalls in 500 μl 1 mM Ca^{2+} -Ringer in die Messkammer eingespannt. Die Nukleusebene wurde mittels Hoechst 3342 Fluoreszenz festgelegt. Anschließend wurden mittels mCherry-

Signal STIM1(A) transfizierte Zellen ausgewählt und das NFAT-GFP-Signal detektiert. Nach Aufnahme des Ausgangszustandes wurden 500 µl 1 mM Ca²⁺-Ringer mit 2 µM TG zugegeben. Nach Zugabe wurde die Translokation von NFAT nach 2, 5, 20, 25, 20, 25 und 30 min detektiert. Zur Auswertung wurde Fiji verwendet. Dafür wurden von jeder kotransfizierten, nicht präaktivierten Zelle die Lokalisierung des Nukleus und Zytosol mit dem *polygon selection tool* festgelegt, im ROI Manager gespeichert und die Durchschnittsintensität des grünen Kanals bestimmt. ROIs der jeweiligen Zelle wurden für jeden Zeitpunkt auf eventuelle morphologische Änderungen der Zelle angepasst. Um die Translokation besser vergleichen können, wurden die Zellen jeweils auf den ersten Messpunkt normiert.

3.8 Statistik

Die Daten wurden nach folgendem Fließschema (Abb. 8) mittels GraphPad PRISM 8 analysiert. Die Daten wurden daraufhin unterteilt in nicht signifikant (ns) mit $p > 0,05$, signifikant (*) mit $p < 0,05$, hoch signifikant (**) mit $p < 0,01$ und höchst signifikant (***) mit $p < 0,001$.

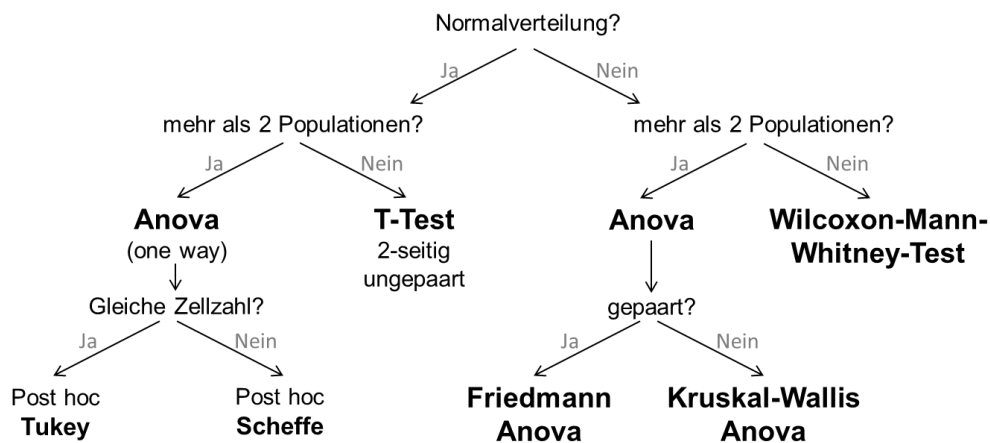


Abbildung 8 - Fließschema zur angewendeten statistischen Analyse

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Alternatives Spleißen und Expression von STIM1A

Die Existenz der STIM1-Spleißvariante STIM1A konnte von unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal 2016 bewiesen werden (Bachelorarbeit Alina Gilson, 2016). Die Verifizierung ihrer Existenz wurde aufgrund von Informationen aus der Datenbank des NCBI vorgenommen, wonach vier murine Spleißvarianten (XM_006507533.4, XM_036152855.1, XM_036152856.1, XM_006507536.4) sowie zwei humane EST-Klone (*engl. Expressed Sequence Tag*) vorhergesagt wurden. Nach der Klonierung der Variante STIM1A wurden 2017 erste grundlegende Experimente zur deren Charakterisierung durchgeführt (Masterarbeit Mona Schöppe, 2017). Diese Arbeit soll die bisherigen Erkenntnisse, um eine komplexe *in vitro* und *in/ex vivo* Analyse der neuen STIM1-Spleißvariante erweitern.

4.1.1 STIM1A ist eine neue evolutionär konservierte STIM1-Spleißvariante

Die NCBI Datenbanken prognostizieren für STIM1 einen Spleiß-Hotspot zwischen Exon 10 und 12 auf (Abb. 9a). Dabei wird *Exon A* zwischen *Exon 10* und *11* des wildtypischen *STIM1* eingespleißt (Abb. 9a,b). Das Spleißevent von *Exon A* verlängert die C-terminale, zytosolische Domäne von *STIM1* um 93 Basenpaare. Nach Translation ergibt sich so eine Insertion von 31 Aminosäuren (AS) bei AS 491, unmittelbar hinter der negativ geladenen inhibitorischen Domäne (ID), ohne dass dabei das Leseraster verändert wird. Alle folgenden C-terminalen Motive von STIM1, wie die S_nP_n- oder Poly K-Domäne bleiben intakt. 74 % der 31 Aminosäuren von *Exon A* sind stark konserviert (<70 % Übereinstimmung). Das AS-Motiv findet sich den in Taxen Fische, Amphibien, Reptilien und Vögel, bis hin zu den Säugetieren (Abb. 9c). Während der Evolution der Säugetiere hin zu lebendgebärenden Säugern wurden weitere 5 Aminosäuren in der Mitte von *Exon A* inseriert. So weist aus der Ordnung der Theria z. B. der Koala (*Phascolarctos cinereus*) dieses Motiv auf. Säuger der evolutionär

älteren Ordnung der Monotrematen wie z. B das eierlegende Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*) jedoch nicht, was möglicherweise einen Hinweis auf die Relevanz von STIM1A in lebendgebärenden Säugern liefert.

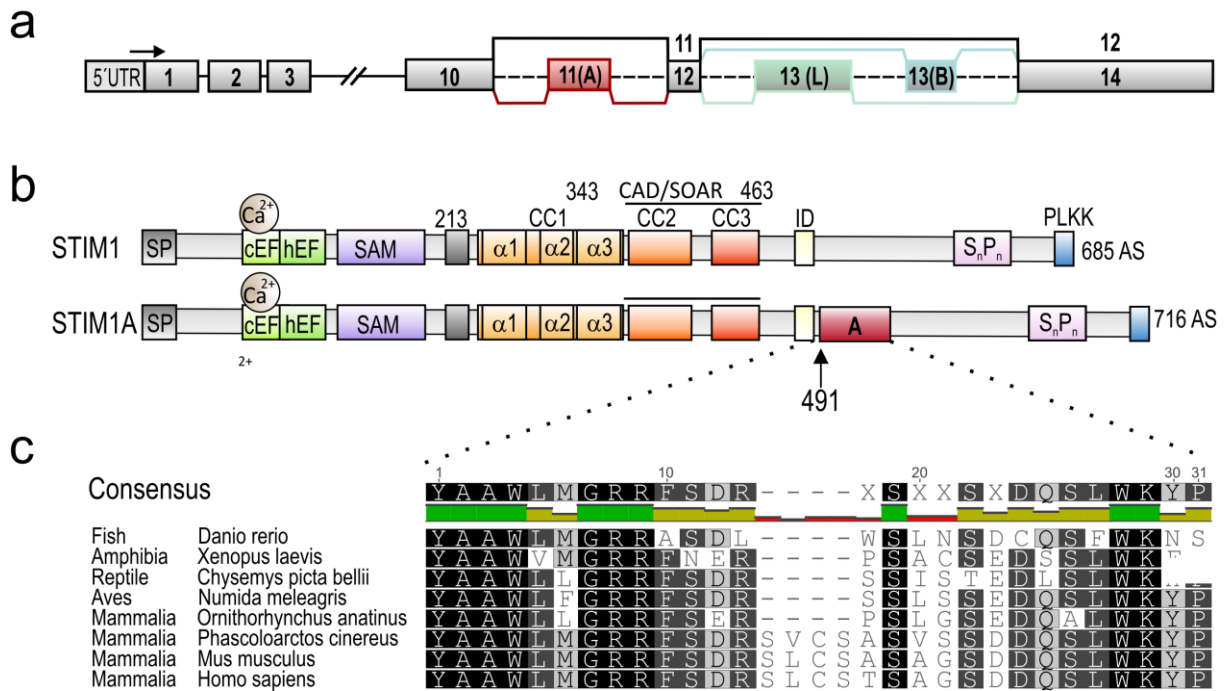


Abbildung 9 - Exon- und Proteinstruktur von STIM1A und dessen evolutionäre Konservierung

(a) Exonstruktur und Spleißseiten von STIM1 mit Spleißhotspot zwischen Exon 10 und 12 des wildtypischen *STIM1*. (b) Funktionelle Proteinmotive der Spleißvarianten STIM1 bzw. STIM1A mit Insertion der Domäne A (rot) bei AS 491. (c) Aminosäuresequenz von Domäne A im Einbuchstabencode ausgewählter Arten verschiedener Taxien. Die Graustufe der einzelnen AS repräsentiert den Grad der Konservierung (Schwarz = 100%, Dunkelgrau = 90-100%, Hellgrau = 70-90%)

4.1.2 *Stim1A* wird ubiquitär exprimiert

4.1.2.1 Genexpressionsanalysen auf cDNA-Level

Um die Expression von Exon A auf cDNA-Ebene zu verifizieren, wurde in Anlehnung an vorangegangene Experimente (Bachelorarbeit Alina Gilson, 2016) eine analytische PCR durchgeführt, bei der verschiedene Gewebe- und Zelltypen als Template eingesetzt wurden. Die Primer wurden so gewählt, dass sie den Spleißhotspot flankieren (Vorwärtsprimer in *Exon 10*, Rückwärtsprimer in *Exon 14*) und so multiple Spleißvarianten gleichzeitig amplifiziert werden konnten (Abb. 10a). Die sich daraus rechnerisch ergebenden Größen der Produkte waren 310 bp für *Stim1 wildtyp (wt)*, 402 bp für *Exon A*, 438 bp für die Kombination von *Exon AB*, 613 bp für *Exon L*, sowie 346 bp für das Spleißevent von *Exon B*. Für alle getesteten Gewebe und Zelltypen konnte das 310 bp große Stim1 wt Produkt ermittelt werden (Abb. 10b). Wie erwartet und bereits publiziert (Darbellay et al.,

2011; Saüc et al., 2015), konnte in der Skelettmuskel-cDNA zusätzliche ein 613 bp großes Produkt (*Exon L*) amplifiziert werden. Ein prominentes Amplikon für *Exon A* (402 bp) wurde nur in hippocampalen Astrozyten und Testes detektiert. Dabei war es in Testes irrelevant, ob sich das Spendertier vor oder nach Geschlechtsreife befand, oder es sich mit 46 Wochen um ein älteres Tier, nach vielen Verpaarungen handelte.

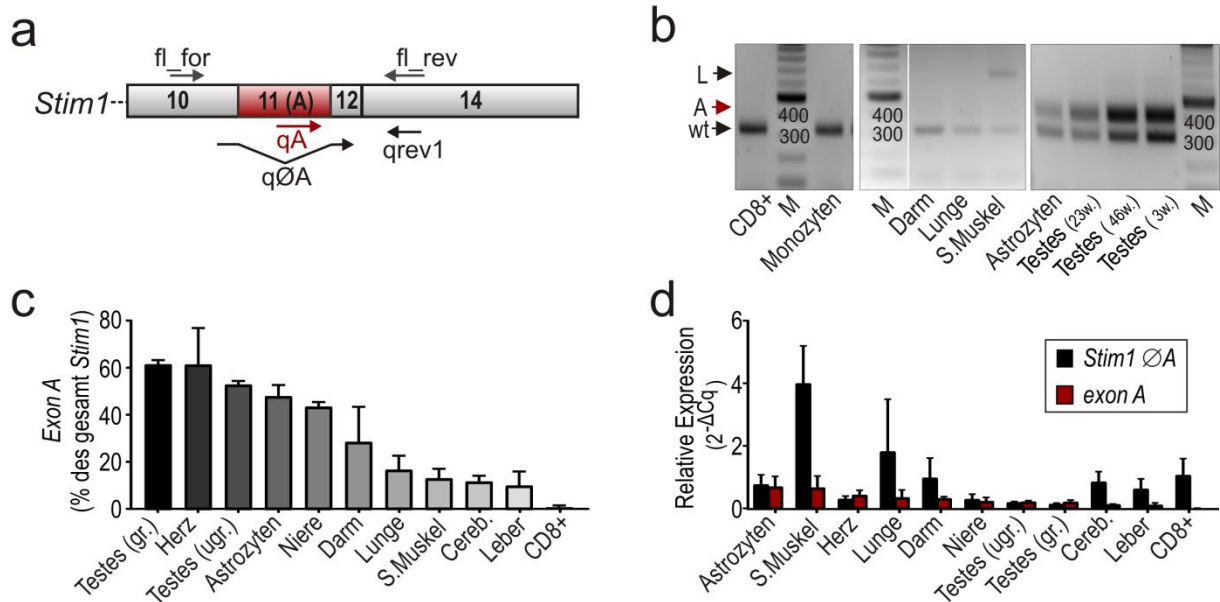


Abbildung 10 - mRNA Expression von Stim1A in murinen Geweben und Zelltypen (a) Primerbindestellen um die Spleißseite von Domäne A zur analytischen und quantitativen Bestimmung der mRNA Expression von *Stim1A*. (b) Analytische PCR muriner Gewebe und Zelltypen mit Primer die die Spleißseite von *Exon A* flankieren. (c) Relative Expression von *Exon A* des gesamt *Stim1*. (d). Relative Expression von Stim1 mit und ohne *Exon A* (A und ØA). Für die pRT-PCR Experimente wurde cDNA aus 3-4 Mäusen getestet und ist als Mittelwert (\pm SD) dargestellt. Zur Normierung und Berechnung des $2^{-\Delta C_q}$ Wertes wurde gegen TBP normiert. qRT-PCR Experimente durchgeführt von Kathrin Förderer.

Um die Expression von *Exon A* direkt mit der der wildtypischen Variante vergleichen zu können, wurde zusätzlich zur analytischen PCR eine quantitative RT-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Dafür wurden entweder ein für *Exon A* spezifischer oder ein für nicht-A (ØA) spezifischer Vorwärtsprimer verwendet. Als Rückwärtsprimer wurde derselbe Primer wie in der analytischen PCR verwendet (Abb. 10a). Abbildung 10c zeigt die Abundanz von *Exon A* enthaltendem Stim1 als prozentualen Wert, normiert auf das Gesamt-*Stim1*. Für Testes konnte gezeigt werden, dass in 61,3 % der Gesamt-*Stim1*-cDNA ein Spleißen von *Exon A* stattgefunden hat. Abgesehen von Testes konnte in Herz (61,2%), Astrozyten (47,8 %) und Niere (43,3 %) die größten relativen Mengen an *Exon A* enthaltendem *Stim1* detektiert werden. Lediglich in $CD8^+$ konnte mit 0,68 % ein nur verschwindend geringer Anteil an *Exon A* enthaltendem *Stim1* festgestellt werden. *Stim1A* wird demnach ubiquitär exprimiert.

Absolut gesehen weisen Astrozyten, Skelettmuskel, Herz und Lunge die höchsten $2^{-\Delta C_q}$ Werte, also die höchste Expression auf (Abb. 10d). Auffallend bei den absoluten Werten der getesteten Geweben und Zellen ist, dass die Expression von *Exon A* enthaltendem *Stim1* deutlich weniger variabel ist, als die der Expression von *Stim1 Δ A*, bei der deutliche gewebsspezifische Schwankungen sichtbar waren. Bei diesem Experiment ist zu beachten, dass bei dieser Primerkombination ebenfalls zusätzliche C-terminale Spleißvarianten wie STIM1B bzw. STIM1L oder STIM1AB bzw. STIM1AL amplifiziert werden könnten. Es lässt sich also lediglich die Aussage über die Abundanz von *Exon A*, nicht aber über Expression des Vollängen-*Stim1A* treffen. Trotzdem kann aufgrund der flankierenden PCR (Abb. 10), in welcher kein Amplifikat mit der berechneten Größe für STIM1AB oder STIM1A detektiert wurde, davon ausgegangen werden, dass *Exon B* in vernachlässigbarem Umfang in den getesteten Geweben exprimiert wird.

4.1.2.2 Konsequenzen der Spleißevents auf translaterter Proteinebene

Nachdem die Insertion von *Exon A* in murinem *Stim1* nachgewiesen werden konnte, wurde der gesamte offene Leserahmen des murinen Vollängen-*Stim1A* sowohl in bicistronische als auch direkt fluoreszenzmarkiert in Expressionsvektoren kloniert. Zusätzlich wurde das murine *Exon A*, dessen Sequenz sich nur um eine AS (A509T) von der humanen unterscheidet, in das humane *STIM1* kloniert (Masterarbeit Mona Schöppe, 2017). A509T liegt dabei innerhalb der Region, die sich evolutionär erst bei der Abspaltung der lebendgebärenden Monotrematen entwickelt hat. Durch die Insertion von Domäne *A* ist diese Spleißvariante 31 AS länger als das wildtypische Stim1. Daraus resultiert in ihren molekularen Massen ein Unterschied von 3.55 kDa, eine sehr kleine Differenz, die nur bei optimalen Bedingungen der SDS-PAGE visualisiert werden kann. Abbildung 11a zeigt einen exemplarischen Western Blot nach heterologer Überexpression des murinen *Stim1* im Größenvergleich mit *Stim1A*, das in einem niedrig konzentriertem Trenngel (7 %) minimal höher läuft als die wildtypische Variante. Mittels Normierung auf das Haushaltsgen beta-Aktin wurde geklärt, ob die Insertion von Domäne *A*, trotz identischer transfizierter DNA Menge, einen Einfluss auf die Expressionslevel der Stim-Proteine nach sich zieht. Nach Analyse von Lysaten aus 4 unabhängigen Transfektionen wurden keine signifikant unterschiedlichen Proteinlevel gemessen (Abb. 11a rechts).

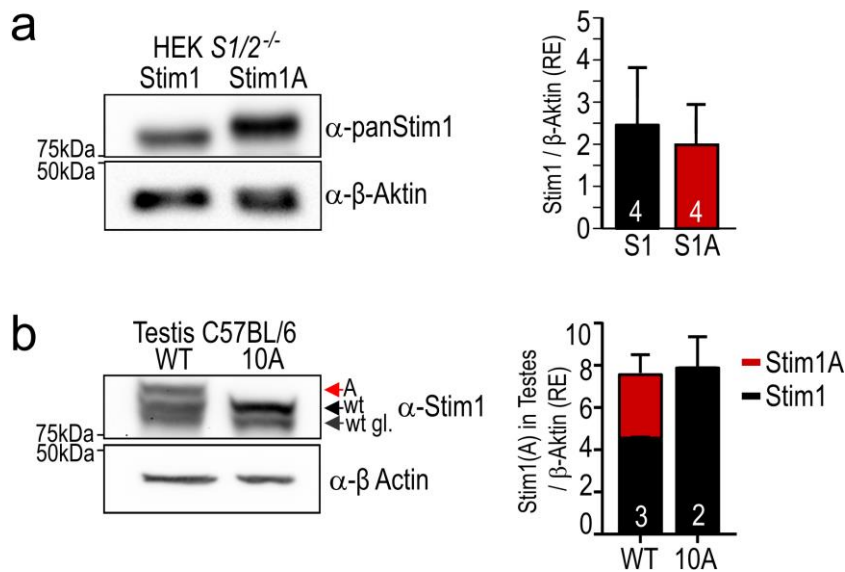


Abbildung 11 - Stim1A Expression auf Proteinebene

(a) Repräsentativer Western Blot nach heterologer Überexpression von *Stim1* bzw. *Stim1A-IRES-mcherry* in HEK293-Zellen als (rechts), sowie deren relative Expression normiert mittels β -Aktin als Mittelwert (\pm SD). (b) Expression von Stim1 und Stim1A in Testes aus C57BL/6 wt und spleißdefizienten 10A Mäusen (rechts), sowie der relative Expressionsanteil von Stim1(A) normiert mittels β -Aktin als Mittelwert (\pm SD). Für die Western Blots wurde ein N-terminaler Stim1-Antikörper verwendet, der alle C-terminalen Spleißvarianten gleichermaßen erkennt.

Im nächsten Schritt wurden Lysate der in Abbildung 10c in der qRT-PCR getesteten Gewebe auf Proteinebene analysiert. In allen getesteten Geweben, bis auf Testes und Herz, war die Proteinmenge von Stim1A im Vergleich zur Gesamt-Stim1 Proteinmenge zu gering, um mittels Western Blot die neue Spleißvariante zu detektieren. Im Herzen war das Proteinlevel von Stim1A allerdings so gering, dass eine deutlich längere Belichtungszeit benötigt wurde. Lediglich in Testes war es nach kurzer Belichtungszeit mit einem Antikörper, der am N-Term von Stim1 bindet und somit alle C-terminalen Spleißvarianten erkennt möglich eine klare differenzielle obere Proteinspezies mit dem erwarteten Molekulargewicht für Stim1A zu detektieren (Abb. 11b). Nach Quantifizierung ergab sich ein Verhältnis von exprimiertem Stim1 zu Stim1A von 60,3 % zu 39,7 %. Im Vergleich zur Abundanz der cDNA wird demnach weniger mRNA von *Stim1A* translatiert als mRNA von *Stim1*. Dank einer Kooperation mit und großzügigen Spende von Professor Dr. Khaled Machaca (Abteilung Physiologie und Biophysik, Weill Cornell Medicine, Qatar) war es der Arbeitsgruppe möglich, mit einem Stim1-spleißdefizienten Mausmodell zu arbeiten. Bei dieser Maus mit genetischem C57BL/6J Hintergrund wurden ubiquitär die Exongrenzen von *Exon 10*, *11* und *12* des wildtypischen *Stim1* fusioniert, sodass keine C-terminalen Spleißvarianten gebildet werden können. Die Maus wird im Folgenden als 10A-Maus bezeichnet. Bei der Analyse von Testes der wildtypischen C57BL/6 sind die Banden von Stim1 und des längeren Stim1A deutlich

voneinander abgegrenzt (Abb. 11b). Demgegenüber befindet sich im Testes-Lysat der 10A-Maus lediglich die leichtere Proteinspezies. Auffallend ist, dass die Gesamtmenge an STIM1 in murinen Testes unabhängig von den exprimierten Spleißvarianten unverändert war (Abb. 11b). Dies ist ein Hinweis auf eine kompensatorische erhöhte Translation der wildtypischen Variante bei fehlendem Vorliegen der Spleiß-Varianten mRNA.

4.1.2.3 Nachweis einer N-terminalen Spleißvariante von STIM1(A)

Zusätzlich zum alternativen Spleißen am C-Term von STIM1 findet man in den Datenbanken Hinweise, dass *STIM1* sowie *STIM1A* ebenfalls mit zwei alternativen *5'UTR* mit Translationsstart in *Exon 2* existieren könnten (mögliches Transkript XM_006507535.4). Ob diese Varianten ohne Signalpeptid funktionell sind und wo sie lokalisiert sind, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Um die Existenz von *Stim1* und *Stim1A* mit variabler *5'UTR* zu überprüfen, wurden Primer designt, die in Vorwärtsrichtung entweder in der wiltypischen oder einer der beiden alternativen (*alt1/alt2*) *5'UTRs* liegen. Der N-terminale Rückwärtsprimer wurde so gewählt, dass er entweder in *Exon A* lag oder das *Exon* überspannte, was als $\emptyset A$ -Kontrolle diente (Abb. 12a). Zusätzlich wurde ein Rückwärtsprimer verwendet, der nur cDNA mit gespleißtem *Exon B* amplifizieren kann, um mögliches Ko-Spleißen von A und B zu detektieren. Mit cDNA von murinen Testes, die eine hohe Expression von *Stim1A* aufzeigen (siehe Expressionsdaten Abb. 10), wurde eine analytische PCR durchgeführt und das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Intensität der Banden wurde mittels ImageLab quantifiziert. In Abbildung 12b ist deutlich zu erkennen, dass der Großteil von *Stim1A* (74%) in Testes mit wildtypischer *5'UTR* vorliegt. 26% der A-enthaltenden Produkte wurden mit dem Primer in *alt1*. Für *alt2* konnte kein Produkt amplifiziert werden. Ein ähnliches Bild ergab sich für Produkte, bei denen der $\emptyset A$ -Rückwärtsprimer verwendet wurde. Hier waren ebenfalls keine PCR-Produkte für *alt2* zu verzeichnen und nur 5% aller *STIM1* $\emptyset A$ Produkte waren positiv für die *alt1-5'UTR*. Der Hauptanteil der Amplifikate wurde bei Verwendung des wt-*5'UTR* Primers erzielt. Für den Rückwärtsprimer in B konnte nur für die wiltypische *5'UTR* ein schwaches Produkt detektiert werden. Vermutlich handelt es sich hierbei allerdings nicht um die Variante *wt5'UTR-AB*, da ein solches Produkt 93bp größer wäre. Um eine eindeutige Aussage darüber treffen zu können, bedarf es jedoch einer besser Auftrennung der PCR-Produkte, um auch kleine Größenunterschiede zu visualisieren.

Zu beachten ist bei diesem Experiment, dass es sich hierbei lediglich um eine analytische PCR handelte, bei der keine quantitative Kontrolle mittels Haushaltgen durchgeführt wurde.

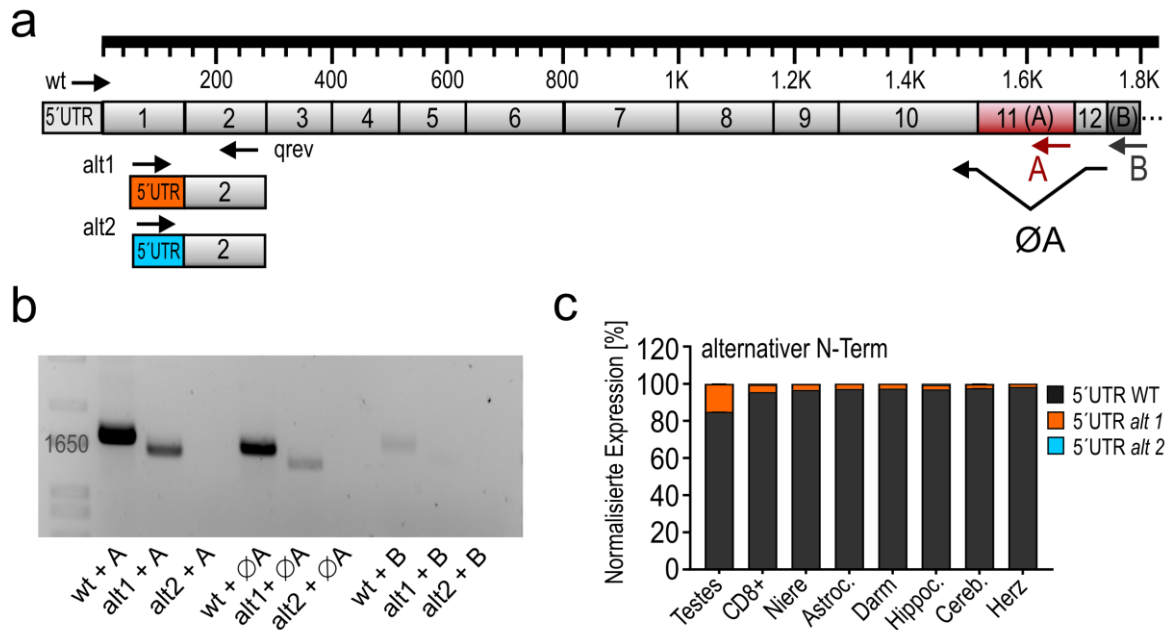


Abbildung 12 – PCR Analyse alternativer 5' UTRs von Stim1, Stim1A und Stim1B
 (a) Schematische Exonstruktur von Stim1. Konventionelle Exons sind in grau dargestellt. In rot ist *Exon 11 (A)* hervorgehoben, *Exon 13 (B)* ist in dunkelgrau dargestellt. Potentielle alternative 5' UTR sind als alt1 und alt2 gekennzeichnet. Annealingseiten der Primer sind als Pfeile eingezeichnet. (b) Identifikation N-terminaler Spleißevents und daraus resultierender alternativer 5' UTRs via analytischer PCR mit cDNA muriner Testes. Die verwendeten Vorwärtsprimer waren spezifisch für die 5' UTRs wt, alt1 oder alt2. Die Rückwärtsprimer wurden so gewählt, dass sie *Exon A* flankieren ($\emptyset A$), in *Exon A* oder in *Exon B* liegen (siehe (a)). (c) Quantifizierung von alternativem N-Termspleißen in murinen Geweben und Zelltypen via qRT-PCR. Als Vorwärtsprimer wurden die gleichen Primer wie in (b) verwendet. Für den Rückwärtsprimer wurde eine Annealingseite am Ende von *Exon 2* gewählt. Abkürzungen: UTR = untranslatierter Region, alt = alternativ. n = 2. qRT-PCR durchgeführt von Kathrin Förderer.

Um das Ausmaß des N-terminalen Spleißens zu quantifizieren, wurde eine qRT-PCR mit den gleichen Vorwärtsprimern in wt, alt1 oder alt2 5' UTR durchgeführt. Da bei dieser Methode die Größe des zu amplifizierenden Bereichs stark limitiert ist, war es nicht möglich, eine Kombination von N- und C-terminalem Spleißen zu kombinieren. Somit vereint das Ergebnis alle C-terminalen Spleißvarianten, einschließlich der wildtypischen cDNA. Der Rückwärtsprimer wurde innerhalb von Exon 2 gewählt. Abbildung 12c zeigt das Ergebnis der qRT-PCR für verschiedene murine Gewebe und Zelltypen. Auffallend bei allen Proben war, dass der Hauptanteil der Produkte die wildtypische 5' UTR aufwies. Für Testes lag dieser Wert bei 86%, was in etwa mit dem Ergebnissen der analytischen PCR übereinstimmt. Der größte Anteil der alt1-5' UTR konnte mit 8,6 % in Testes und 3,9 % in CD8+ T-Zellen gefunden werden.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass STIM1A eine hoch konservierte und ubiquitär exprimierte STIM1-Spleißvariante ist. In der Maus findet sich in Testes, Herz und Astrozyten die höchste Abundanz von Stim1A auf cDNA Ebene. Auch auf Proteinebene konnte Stim1A in murinen Testis nachgewiesen werden. Neben dem Spleißevent am STIM1-C-Term werden sowohl Stim1A als auch das konventionelle Stim1 zu einem geringen Anteil auch mit einem verkürzten N-Term exprimiert.

4.2 Funktionelle Analyse von STIM1A

4.2.1 STIM1A führt zu einem geringeren Calcium Einstrom im Vergleich zu STIM1

Um die Auswirkungen der Insertion von Domäne A funktionell zu untersuchen, wurden Fura-2-basierte Ca^{2+} -Imaging-Experimente durchgeführt. Dafür wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) aus *Stim1*^{-/-};*Stim2*^{-/-} Mäusen (MEF *Stim1/2*^{-/-}) (Oh-Hora 2008) transient mit *Stim1*, *Stim1A* oder einer Kombination beider Varianten transfiziert und die Zellen nach 24 h vermessen (Masterarbeit Mona Schöppe, 2017). Die Daten wurden im Zuge dieser Arbeit reanalysiert, differenziell dargestellt und können auf Grund von weiteren Ergebnissen ebenfalls neu interpretiert werden (Abb. 13). In dieser Abbildung wurden neben dem basalen Calcium, also das intrazelluläre Calcium im Ruhezustand der Zelle, ebenfalls die drei SOCE-Parameter analysiert: die Calciumeinstromrate, welche der Steigung der Kurve entspricht und beschreibt, wie schnell Calcium durch die Orai-Kanäle in die Zelle strömen kann; den ΔCa^{2+} -Peak, den maximalen Messwert des einströmenden Calciums abzüglich der in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor Readdition des Calciums; und das ΔCa^{2+} -Plateau, welches die Differenz von in die Zelle einströmendem und herausgepumptem Calcium abzüglich der in 0 Ca^{2+} vorherrschenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anzeigt. Die Werte sind als Ratio des Calciumindikators Fura-2 dargestellt, welche die zytosolische Calciumkonzentration abbildet (siehe Methoden 3.7.1). Sowohl für das basale Calcium als auch für die durch TG induzierte Speicherentleerung (Daten nicht gezeigt) wurden keine signifikanten Unterschiede nach Expression von Stim1, Stim1A oder deren Koexpression detektiert. Ebenfalls konnte unter allen Bedingungen der SOCE wiederhergestellt werden, allerdings in unterschiedlicher Höhe: Auffallend war, dass die Menge des einströmenden Ca^{2+} des SOCEs, getriggert durch Stim1A verglichen mit dem wildtypischen Stim1, signifikant geringer in Peak und Plateau war, als auch signifikant verlangsamt (verringerte Influxrate). Die Koexpression von Stim1 und Stim1A (wobei die

gleiche Gesamtmenge an DNA transfiziert wurde wie bei den Einzeltransfektionen) zeigte einen intermediären Calciumphänotyp. Während der Wert des Plateaus ein ähnliches Level wie nach Expression von Stim1 erreichte, führe die Expression von *Stim1A* trotz der Anwesenheit des wildtypischen Proteins zu einer signifikant reduzierten Influxrate. Der Ca^{2+} -Peak lag mit einer 340/380 nm Ratio von 1,01 \pm 0,05 RE zwischen dem Stim1 (1,38 \pm 0,04 RE) und Stim1A (0,84 \pm 0,04 RE) induzierten Peak.

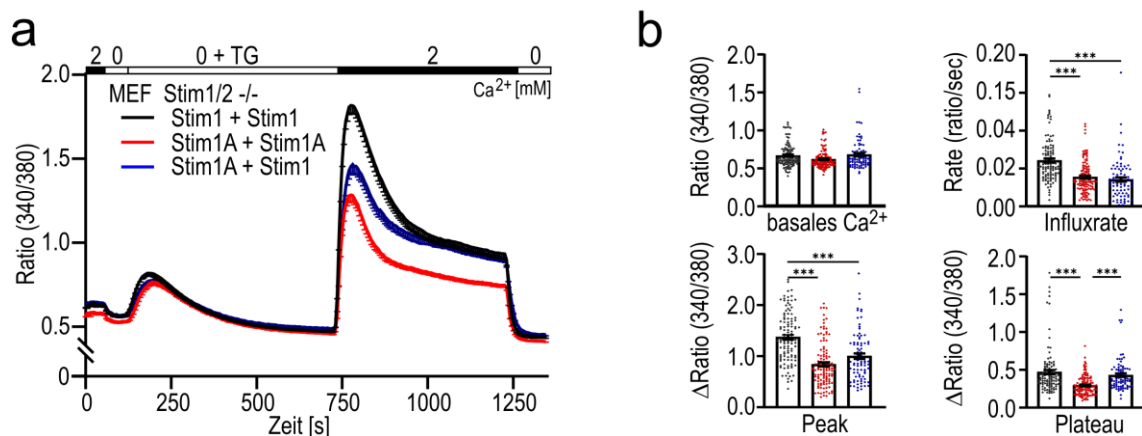


Abbildung 13 - Stim1A reduziert SOCE in MEF Zellen

(a) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert (\pm SEM). Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EZ}}$ perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μM Thapsigargin induziert. Dazu wurden MEF *Stim1/2^{-/-}*-Zellen 24h vor der Messung mit Stim1 (schwarz, n = 111), Stim1A (rot, n = 116) oder mit der Kombination Stim1 und Stim1A (blau, n = 86) als IRES mCherry Konstrukte transfiziert. (b) Quantifizierung der in (a) gemessenen Änderungen der Fura2-Ratio des basalen Ca^{2+} , der Influxrate (Δ Ratio/Zeit), des Δ Peak und des Δ Plateau. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM und Einzelzell-Datenpunkte dargestellt. Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen. Modifiziert aus Schöppe, 2017

In diesem Experiment wurde ein Expressionsvektor mit *IRES-mCherry* Sequenz verwendet. Unter der Kontrolle desselben Promotors erfolgt die Translation sowohl von Stim1(A), als auch die Expression von mCherry. Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ermöglicht es, den Ribosomen nach Transkriptionstermination von Stim1(A) an das gleiche mRNA-Molekül erneut zu binden und anschließend das Fluoreszenztag zu translatieren. Dies hat den Vorteil, dass das untersuchte Protein nicht zusätzlich an C- oder N-Term mit einem direkten Fluoreszenztag versehen wird, was dessen Funktionalität oder Lokalisierung beeinflussen könnte. Der Nachteil besteht darin, dass aufgrund der nur bedingt abhängigen Translation von Fluorophor und POI, nicht von der Fluoreszenzintensität auf die absolute Menge des exprimierten Stimus geschlossen werden kann. Versuche mit direkt-fluoreszenzmarkiertem *Stim1* und *Stim1A* (siehe Abb. 25c) bestätigten den hier detektierten SOCE-Phänotyp.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei STIM1A um einen negativen Regulator des SOCE handelt.

4.2.2 Ein Knock-down & -out von Stim1A erhöht den SOCE

Um den SOCE-reduzierenden Effekt von Stim1A auf den SOCE zu bestätigen, wurden siRNA-basierte Knock-down (KD) Experimente in primären murinen hippocampalen Astrozyten durchgeführt. In den Expressionsanalysen konnte bereits gezeigt werden, dass Stim1A mit 47,8 % die Hälfte des Gesamtmenge an Stim1-mRNA dieses Zelltyps ausmacht (Abb. 10c).

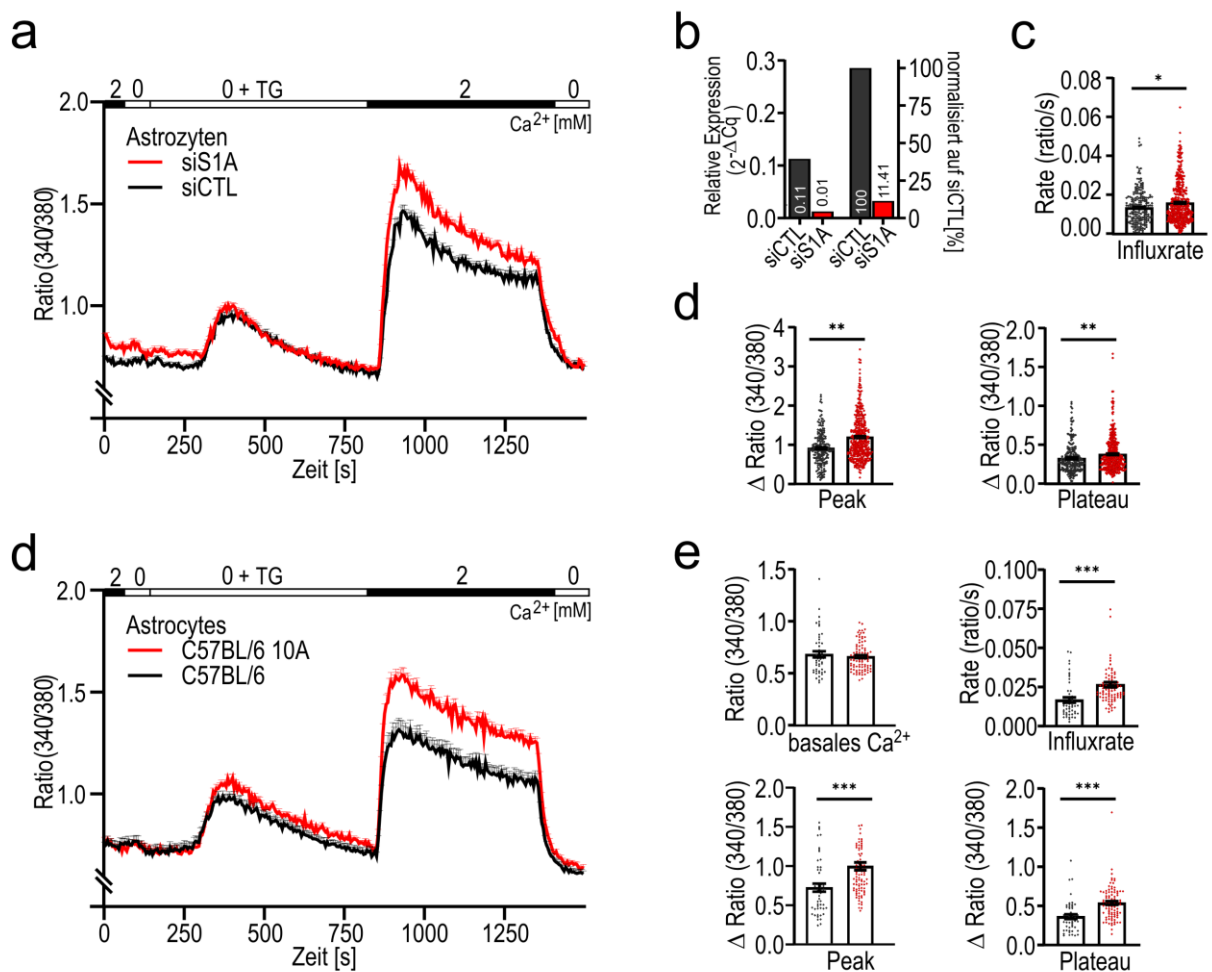


Abbildung 14 - Der Knock-down von Stim1A erhöht SOCE in hippocampalen Astrozyten

(a) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert (\pm SEM). Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener $[Ca^{2+}]_{EZ}$ perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μ M Thapsigargin induziert. Dazu wurden murine primäre hippocampale Astrozyten 24h vor der Messung mit siRNA gegen Stim1A (siS1A, rot, n = 263) und Kontroll-siRNA (siCTL, schwarz, n = 216) transfiziert. (b) Quantifizierung der Knock-down-Effizienz mittels qRT-PCR. (c) Quantifizierung der in (a) gemessenen Änderungen der Fura2-Ratio der Influxrate (Δ Ratio/Zeit). (d) Quantifizierung der in (a) gemessenen Änderungen der Δ Fura2-Ratio des Peak und des

Plateau (d) Calciumkurven zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2 Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert (\pm SEM) von murine primäre hippocampale Astrozyten aus C57BL/6 wt (schwarz, n = 49) und spleißdefizienten C57BL/6 10A (rot, n = 82) P1-Mäusen. Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener $[Ca^{2+}]_{EZ}$ perfundiert. (e) Quantifizierung der in (d) gemessenen Änderungen der Fura2-Ratio des basalen Ca^{2+} , der Influxrate (Δ Ratio/Zeit), des Δ Peak und des Δ Plateau. Die Werte aus (c),(d) und (e) sind als Mittelwert \pm SEM und Einzelzell-Datenpunkte dargestellt. Statistik: Mann-Whitney Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen.

Die kultivierten Zellen wurden entweder mit einer Kontroll-siRNA (siCTL) oder einer Kombination aus zwei siRNAs gegen Stim1A (siS1A) transfiziert und nach 24 h vermessen. Die Effektivität der siRNA wurde mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 14b). Nach Normalisierung auf siCTL als 100 % ergab sich für siS1A eine Knock-down-Effizienz von 88,59 %. Funktionell führte der Knock-down von Stim1A zu einem erhöhten SOCE. Im Vergleich zur siCTL zeigte die KD-Bedingung eine signifikant schnellerer Influxrate sowie signifikant höheren Ca^{2+} -Peak und Ca^{2+} -Plateau (Abb. 14a,c). Unter Verwendung hippocampaler Astrozyten der spleißdefizienten C57BL/6 10A-Mäuse wurden außerdem die Auswirkungen des vollständigen Knock-outs (KO) von Stim1A auf den SOCE untersucht. Auch der vollständige Verlust von Stim1A führt zu einer signifikanten Erhöhung aller SOCE-Parameter (Abb. 14d,e). Im basalen Ca^{2+} wurden keine Unterschiede gemessen. Die Messergebnisse der primären Astrozyten bestätigten nicht nur die Ergebnisse der Überexpression in Zellkulturlinien, sondern verdeutlichen die physiologische Relevanz der neuen Spleißvariante deutlich, dessen Anwesenheit zu einem verringerten SOCE führt.

4.2.3 STIM2 hat keinen Einfluss auf den STIM1A-induzierten SOCE

Da STIM1 Heteromultimere mit seinem Homolog STIM2 bilden kann (Subedi et al., 2018, Rana et al., 2015, Darbellay et al., 2010), war es von großer Relevanz, einen möglichen Einfluss des zweiten STIM-Homologs auf die neu beschriebenen Spleißvariante zu untersuchen. Dazu wurde eine humane Neuroblastom-Zelllinie verwendet, die 1973 aus dem Knochenmark einer vierjährigen Patientin isoliert und seitdem weiterkultiviert wurde (Biedler et al., 1973). Die sogenannten SH-SY5Y-Zellen lagen der Arbeitsgruppe als zwei verschiedene STIM-Knock-out-Linien vor (Ramesh et al., 2021): Bei der ersten Zelllinie waren beide STIM Homologe durch die Anwendung der CRISPR-Cas9-Methode deletiert (SH-SY5Y *STIM1/STIM2*^{-/-}; Doppel-Knock-Out = DKO), bei der zweiten wurde nur *STIM1* deletiert, *STIM2* aber weiterhin endogen exprimiert (SH-SY5Y *STIM1*^{-/-} Einzel-Knock-Out = EKO). Um den

Einfluss von STIM2 auf den Ca^{2+} -Phänotyp der neuen STIM1-Spleißvariante zu überprüfen wurden beide Zelllinien jeweils mit dem humanen *STIM1* oder *STIM1A* transient transfiziert und mittels Ca^{2+} -Imaging analysiert (Abb.15). DKO-Zellen zeigten unabhängig von den exprimierten STIM-Variante nach Stimulation mit TG eine größere Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER als die EKO-Zellen (Abb. 15a). Dies ist vermutlich auf einen kompensatorischen Effekt zurückzuführen, bei dem Zellen ohne endogenes STIM möglichst viel intrazelluläres Ca^{2+} speichern, um besser auf Konzentrationsschwankungen reagieren zu können. Nach Readdition von extrazellulärem Ca^{2+} führte die Expression von STIM1A im Vergleich zum wildtypischen STIM1 sowohl in SH-SY5Y *STIM1/STIM2*^{-/-}, als auch in SH-SY5Y *STIM1*^{-/-}, wie schon in den Experimenten zuvor, zu einer signifikanten Verringerung aller SOCE-Parameter (Abb. 15b). Um Unterschiede des Calciumhaushalts zwischen der Doppel- und Einzel-Knock-out-Zelllinie zu analysieren, wurde die Messwerte nach STIM1A-Expression auf die Mittelwerte des STIM1 induzierten SOCE normiert und so die prozentuale STIM1A induzierte Änderung berechnet (Abb. 15c). Daraus ergaben sich für keine der analysierten SOCE-Parameter signifikante Änderungen. Die Expression von STIM1A führte in EKO Zellen zu einer Reduktion der Influxrate um 36,2 %, in DKO um 33,1 %. Der Ca^{2+} -Peak war in EKO Zellen um 35,5 % reduziert und in DKO Zellen um 37,7%. Auch für das Plateau unterschieden sich die Werte mit 54,2 % (EKO) und 55,9 % (DKO) nicht signifikant. In einem weiteren Assay wurde untersucht, ob STIM1A und STIM1 unterschiedlich stark mit STIM2 interagieren. Dafür wurde bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (*engl. bimolecular fluorescence complementation*, BiFC) verwendet (siehe Methoden 3.5.2). STIM1(A)-YFP_C wurde mit STIM1-YFP_N, STIM2-YFP_N und QSTIM-YFP_N als Negativkontrolle in HEK STIM1/2 DKO ko-überexprimiert. Befinden sich die zu testenden Proteinen in räumlicher Nähe oder interagieren, können beide YFP Hälften zu einem funktionellen YFP assemblieren. Die Anteile der fluoreszierenden Zellen wurde mittels FACS analysiert (Abb. 15d). Daraus ergaben sich für die Interaktion mit STIM1 für STIM1 60,35 +/- 7,8 % und für STIM1A 56,6 +/- 4,5 %, ohne signifikante Unterschiede.

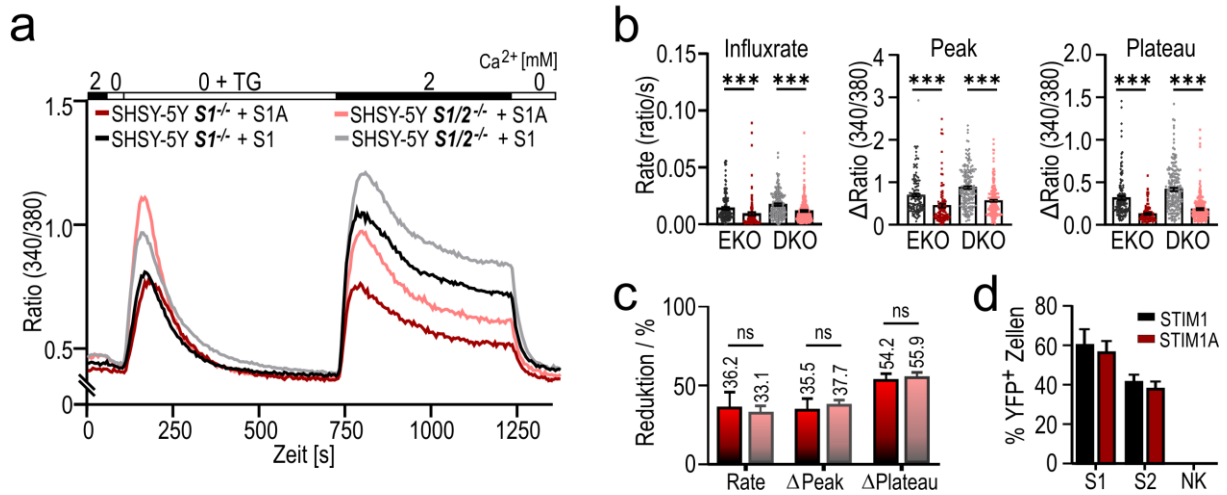


Abbildung 15 - STIM2 hat keinen Einfluss auf den STIM1A-induzierten SOCE

(a) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert. Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener $[Ca^{2+}]_{EZ}$ perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μ M Thapsigargin induziert. Dazu wurden SH-SY5Y $S1^{-/-}$ -Zellen mit *STIM1* (schwarz, n = 136), *STIM1A* (rot, n = 107) *IRE5 mCherry* 24h vor der Messung transfiziert. SH-SY5Y $S1/2^{-/-}$ -Zellen wurden mit *STIM1* (grau, n = 187), *STIM1A* (rosa, n = 217) *IRE5 mCherry* ebenfalls 24h vor der Messung transfiziert (b) Quantifizierung der in (a) gemessenen Änderungen der Δ Fura2-Ratio der Influxrate (Δ Ratio/Zeit), des Peak und des Plateau. Die Werte sind als Mittelwert, Einzelzell-Datenpunkte und \pm SEM dargestellt. (c) STIM1A-induzierte Reduktion der SOCE-Parameter in %. (d) Prozent YFP-positiver Zellen im BiFC-Assay. *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen wurden 24h vor der Analyse mit einer Kombination aus STIM1(A)-YFP_c mit STIM1-YFP_N, STIM2-YFP_N und als Negativkontrolle \emptyset STIM-YFP_N transfiziert. Die Werte aus (c) und (d) sind als Mittelwert \pm SEM und Einzelzell-Datenpunkte dargestellt. Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen.

Für die Interaktion von STIM1-YFP_c mit STIM1-YFP_N wären in der Theorie eine 100 %ige Interaktion vermutet worden. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die transfizierten Vektoren mit einer Größe von ~ 10 kB sehr groß sind und vermutlich nicht alle Zellen beide Konstrukte gleichzeitig aufgenommen haben, weshalb sich nur eine Komplementation in 60,35% der Zellen ergab. Bei der Interaktion mit STIM2 konnten zwischen STIM1 und STIM1A keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Demnach waren nach Kotransfektion mit STIM1 41,63 \pm 3,4 % und mit STIM1A 38,14 \pm 2,8 % der Zellen YFP⁺. Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Ergebnisse eine differentielle Beeinflussung von STIM2 auf die neue Spleißvariante STIM1A ausschließen.

4.2.4 Spleißen von STIM1A hat keine Auswirkungen auf zelluläre Calciumspeicher

Wie in 4.2.3 beschrieben können endogen oder heterolog exprimierte STIMs die Menge des intrakompartimentär gespeicherten Ca^{2+} beeinflussen. Um zu analysieren, ob zelluläre Calciumspeicher durch die Anwesenheit von Stim1A beeinflusst werden, wurden *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen transient mit *STIM1*- oder *STIM1A-IRES-mCherry* transfiziert und die Menge des gespeicherten Ca^{2+} mittels Calciumimaging gemessen. Dafür wurde in Calcium-freier Umgebung das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin appliziert. Anders als TG, welches selektiv die Speicherentleerung des ERs nach sich zieht, induziert die Präsenz von Ionomycin die Ca^{2+} -Entleerung aller Kompartimente. Anhand der Messwerte wurden zwei Parameter berechnet: der maximale Ca^{2+} -Peak (Abb. 16a) und Gesamtmenge des ins Zytosol strömende Calciums über eine Berechnung der Fläche unter der Kurve (Abb. 16b).

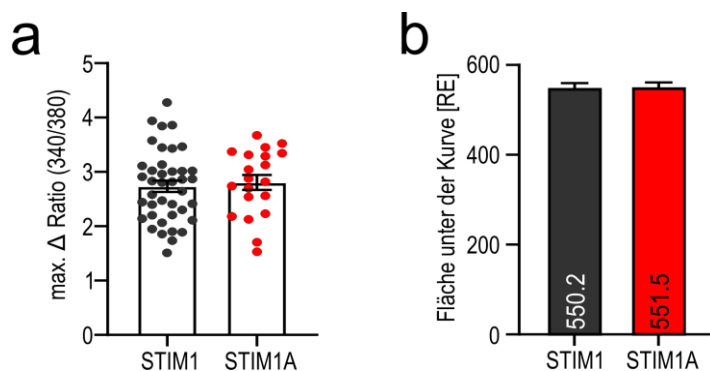


Abbildung 16 - Die globale Ionomycin induzierte Ca^{2+} Speicherentleerung unterscheidet sich nicht zwischen STIM1 und STIM1A.

(a) Maximale zytosolische Δ Fura2-Ratio nach induzierter Speicherentleerung mittels Ionomycin (1 μm) in *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen. Die Zellen wurden 24h vor der Messung mit *STIM1* (schwarz, n = 40) und *STIM1A* (rot, n = 20) *IRES mCherry* transfiziert. (b) Gesamtmenge des gespeicherten Calciums aus (a) als Fläche unter der Kurve. Die Werte aus sind als Mittelwert, \pm SEM und in (a) zusätzlich als Einzelzell-Datenpunkte dargestellt. Statistik: Mann-Whitney Test.

Nach Expression von STIM1 und STIM1A konnten mit einer durchschnittlichen maximalen Ratio von 2.73 ± 0.66 bzw. 2.80 ± 0.61 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch für die Gesamtmenge an ausströmenden Calcium (Abb. 16b) konnten zwischen STIM1 ($550,2 \pm 12,31$ RE) und STIM1A ($551,5 \pm 512,87$ RE) keine nennenswerten Differenzen nachgewiesen werden. Demnach wirkt sich die zusätzliche Domäne nicht auf die zytosolischen Calciumspeicher aus.

4.2.5 STIM1A kann alle ORAI-Homologe aktivieren

Da für die humane Spleißvariante STIM2.1 bekannt ist, dass diese nicht in der Lage ist, ORAI1 (Miederer et al., 2015), ORAI2 oder ORAI3 zu aktivieren (Rana et al., 2015), war der nächste Schritt der funktionellen Charakterisierung zu überprüfen, ob Stim1A/STIMA alle der bekannten Orai/ORAI Homologe aktivieren kann und ob der reduzierte Calciumphänotyp möglicherweise differenziell bzw. Homolog-spezifisch ist.

4.2.5.1 Stim1A kann alle murinen Orai-Homologe aktivieren

Wie in Schöppe, 2017 im zellulären Hintergrund von HEK 293 Zellen mit endogener Expression gezeigt werden konnte, ist das murine Stim1A in der Lage, sowohl Orai1 als auch Orai2 zu aktivieren. Die analysierten SOCE Parameter sind in Abbildung 17b zur Vervollständigung erneut aufgeführt. In Anwesenheit von Orai1 und Orai2 führte die heterologe Überexpression von Stim1A zu signifikant geringen SOCE.

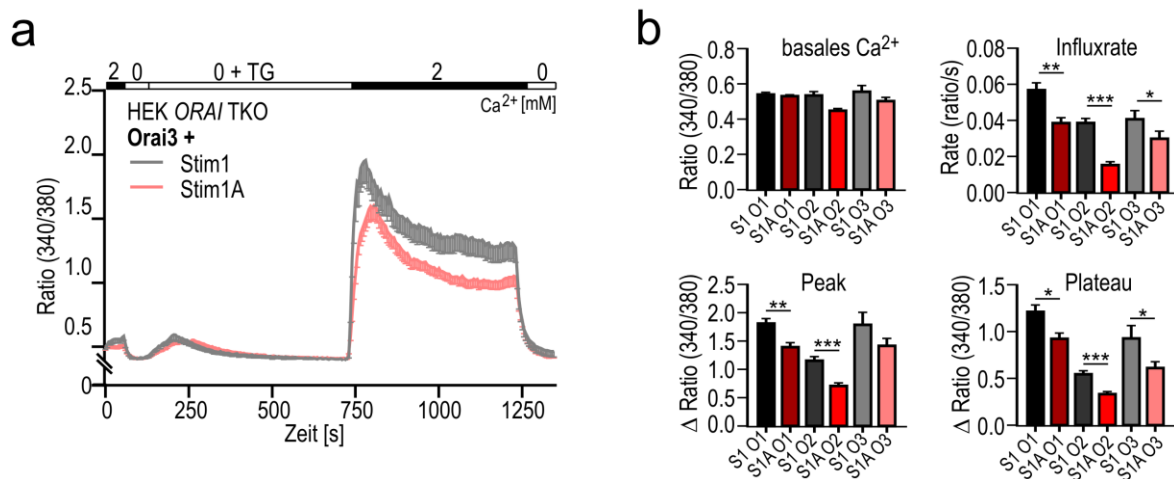


Abbildung 17 - Stim1A kann alle Orai Homologe aktivieren

(a) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert (\pm SEM). Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener $[Ca^{2+}]_{EZ}$ perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μ M Thapsigargin induziert. Dazu wurden HEK ORAI *ORAI1/ORAI2/ORAI3*^{-/-} Zellen 24h vor der Messung mit *Stim1* (schwarz, n = 53), *Stim1A* (rot, n = 57) *IRE5 mCherry* in Kombination mit den murinen *Orai*-Homologen als *IRE5 GFP* Konstrukt transfiziert. (b) Quantifizierung der in (a bzw. Schöppe, 2017) gemessenen Änderungen der Fura2-Ratio des basalen Ca²⁺, der Influxrate (Δ Ratio/Zeit), des Δ Peak und des Δ Plateau. Die Werte sind als Mittelwert, \pm SEM dargestellt. Statistik: Mann-Whitney Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen. Teilweise modifiziert aus Schöppe, 2017.

Um den Effekt von Stim1A im zellulären Hintergrund ohne endogen exprimiertem Orai zu untersuchen, wurden HEK *ORAI1/ORAI2/ORAI3*^{-/-}-Zellen in einer Ratio von 1:3 mit *Orai3* und zusätzlich *Stim1* oder *Stim1A* kotransfiziert. Nach Koexpression mit der neuen Spleißvariante Stim1A war auch für Orai3 nach Stimulierung mit TG eine Aktivierung des

SOCE zu beobachten (Abb. 17a). Der durch Stim1A induzierte SOCE war in Influxrate und Δ Plateau signifikant reduziert. Für die Größe des Δ Peaks und das basale Calcium konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 17b). Stim1A ist demnach in der Lage, alle Orai-Homologe zu aktivieren. Ebenfalls konnte für alle Orai-Homologen beobachtet werden, dass Stim1A zu einem reduzierten SOCE führt. Die Analyse des SOCEs mittels Ca^{2+} -Imaging spiegelt die globale Veränderung der zytosolischen Calcium-Konzentration wieder, die sowohl durch die Expression der überexprimierten als auch die der endogenen Proteine beeinflusst wird. Eine weitere Technik, durch welche sich der SOCE darstellen lässt, ist der Ganzzell-Patch-Clamp. Dabei lassen sich Ca^{2+} -Ströme auf Einzelzellebene messen und quantifizieren. Sie komplementieren so die Daten der Imaging-Experimente. Die in diesem Abschnitt gezeigten Patch-Clamp-Daten wurden bereits im Anhang von Schöppe, 2017 gezeigt; diese wurden im Zuge dieser Arbeit jedoch reanalysiert und differenziell dargestellt. Wie in den vorangegangenen Imaging-Experimenten wurden HEK293-Zellen in einer Ratio von 1:3 mit je einem *Orai*-Homolog und zusätzlich *Stim1* oder *Stim1A* kotransfiziert. Die Expression von Stim1A führte für die beiden vermessenen Orai-Homologe, Orai1 und Orai2 zu einer verringerten Stromdichte, gemessen bei -80 mV, also ein geringeres Einströmen von Calciumionen in die Zelle (Abb. 18a,d). Für Orai1 ergab sich mit Stim1A im Vergleich zum wildtypischen Stim1 eine Abnahme der maximalen Stromdichte von -15,53 pA/pF auf 6,0 pA/pF (Abb. 18b). Für Orai2 unterschied sich die Differenz der Reduktion der Stromdichte mit -4,01 pA/pF (Stim1) zu -0,58 pA/pF (Stim1A) signifikant (Abb. 18e). Ein zusätzlicher Parameter, der Aussage über die Ionenselektivität der vermessenen Kanäle zulässt, ist die Beziehung von Strom zur vorherrschenden Spannung (IV-Beziehung). Die gemessenen Kurven entsprechen denen der für Orai typischen einwärtsgerichteten IV-Beziehung (*engl. inward rectification*), was dafür spricht, dass Stim1A die Selektivität von Orai nicht beeinflusst (Abb. 18 c,f). Dabei muss beachtet werden, dass in diesen Experimenten murine Proteine in humanem zellulärem Hintergrund exprimiert wurden, was möglicherweise einen Einfluss auf deren Funktion haben könnte.

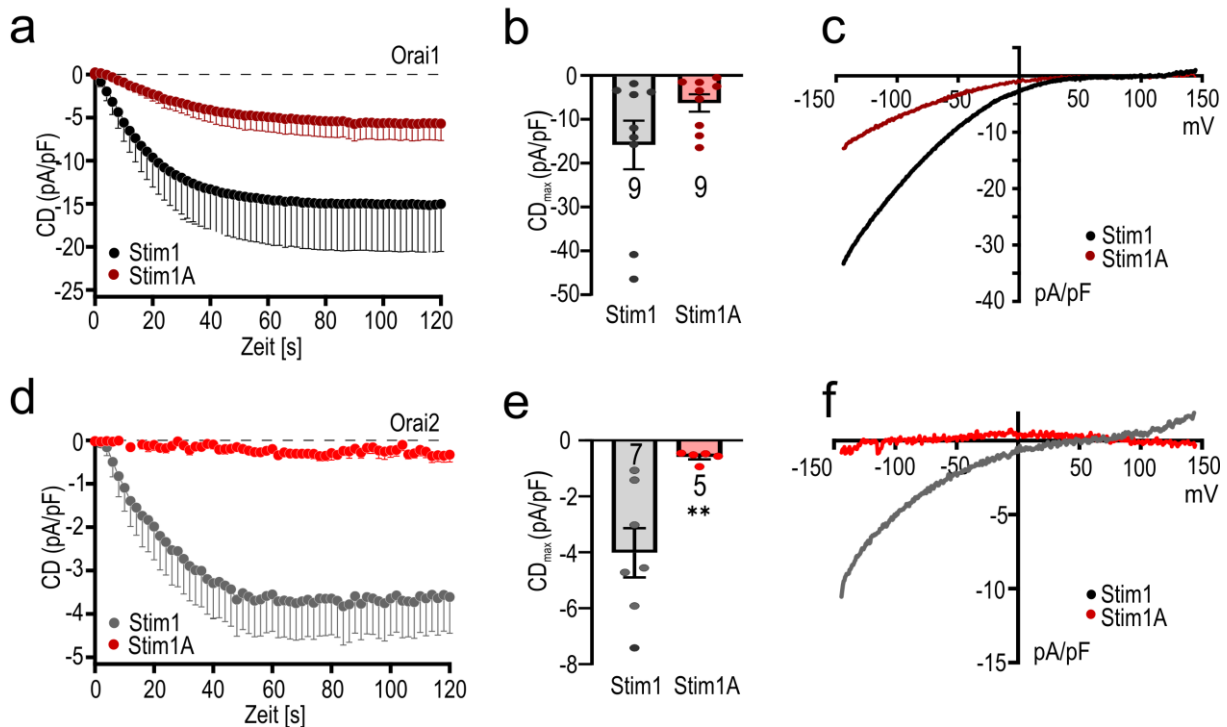


Abbildung 18 - Insertion von Domäne A reduziert den I_{CRAC}

(a,d) Kurven zeigen die Ganzzell-Stromdichte (CD) bei -80 mV von HEK293-Zellen 24h nach Transfektion mit *Stim1* (schwarz, $n = 9/7$) oder *Stim1A* (rot, $n = 9/5$) *IRES mCherry* in Kombination mit *Orai1* (a) und *Orai2* (d) *IRES GFP* bei -80 mV. (b,e) Durchschnitt der maximalen Stromdichte aus (a) bzw. (d). (c,f) Strom-Spannungs-(I-V) Beziehung der in (a) bzw. (d) vermessenen Zellen. Statistik: ungepaarter Student T-Test. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Modifiziert aus Schöppe, 2017. Messungen durchgeführt von Annette Lis.

4.2.5.2 STIM1A kann alle humanen ORAI-Homologe aktivieren

Neben den murinen Proteinen wurden ebenfalls getestet, ob die durch Stim1A induzierte Reduktion des SOCE Spezies-spezifisch auftritt, oder ob sich der Effekt auch mit humanen Konstrukten reproduziert werden kann. Dafür wurden HEK *ORAI1/ORAI2/ORAI3*^{-/-}-Zellen mit jeweils einem der drei humanen *ORAI*-Homologen und in Kombination mit *STIM1* oder *STIM1A* in einer Ratio von 1:3 kotransfiziert und im Ca^{2+} -Imaging analysiert. Für alle humanen *ORAI* ergab sich das gleiche Bild, wie bereits im murinen Hintergrund detektiert: Im Vergleich zu *STIM1* führte die Expression der Spleißvariante *STIM1A* in Kombination mit allen *ORAI* zu einer Reduktion des SOCE (Abb. 19a-c). Um den Vergleich der Dimension der Reduktion zu erleichtern, wurde die Stim-induzierte prozentuale Veränderung des SOCE quantifiziert. Dafür wurden die Einzelwerte der Messungen mit *STIM1A* auf den Mittelwert Messdaten nach *STIM1* Expression normiert. Daraus ergibt sich pro *ORAI*-Homolog nur ein Wert (Abb. 19d). Die geringste Auswirkung von *STIM1A* ergab sich für das basale Calcium. Hier unterschieden sich *ORAI1* und *ORAI3* signifikant in der *STIM1A*-induzierten prozentualen Änderung. Hierbei ist zu beachten, dass die Rohdaten nur marginale

Unterschiede aufwies, weshalb diesem Parameter keine weitere Aufmerksamkeit geschenkt wurde. In Bezug auf die Influxrate wirkte sich die Präsenz der neuen Spleißvariante am stärksten auf ORAI2 aus, am schwächsten auf ORAI3. Dieser Unterschied war signifikant. Allerdings reduzierte STIM1A die Influxrate des SOCE durch ORAI3 signifikant um 34,1 +/- 4,8 %. Für die Parameter Δ Peak sowie Δ Plateau sind die STIM1A-induzierten Reduktionen zwischen den ORAI Homologen nicht signifikant unterschiedlich. Aufgrund der Ca^{2+} -Imaging und Patch-Clamp Daten kann davon ausgegangen werden, dass der zugrundeliegende Mechanismus, welcher dazu führt, dass STIM1A den SOCE reprimiert, für alle ORAI-Homologe und Spezies ähnlich ist.

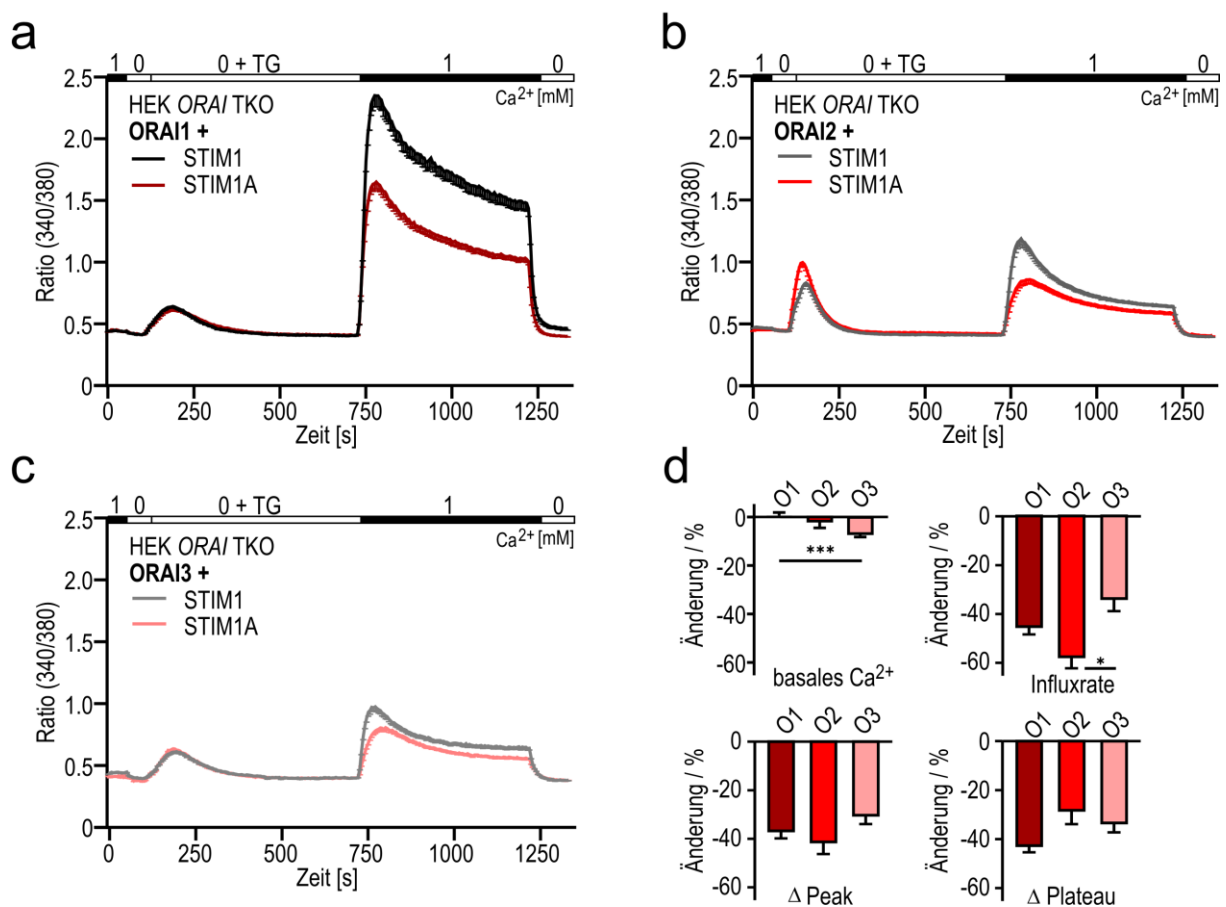


Abbildung 19 - STIM1A kann alle ORAI Homologe aktivieren

(a-c) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert (\pm SEM). Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EZ}}$ perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μM Thapsigargin induziert. Dazu wurden HEK *ORAI1/ORAI2/ORAI3*^{-/-}-Zellen 24h vor der Messung mit *STIM1* (schwarz, n = 60-98), *STIM1A* (rot, n = 51-78) *IRES mCherry* in Kombination mit den humanen *ORAI*-Homologen als *IRES-GFP* Konstrukte transfiziert. (d) Relative Änderung der SOCE-Parameter nach Expression von *STIM1A*, normiert auf den Durchschnitt der *STIM1* Werte. Alle Werte sind als Mittelwert, \pm SEM dargestellt. Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 2 technischen Replikaten gewonnen.

4.2.6 Domäne A beeinflusst die prinzipielle Interaktion mit ORAI1 nicht

Nachdem gezeigt werden konnte, dass STIM1A zwar in der Lage ist den Calciumkanal ORAI1 zu aktivieren, allerdings nicht im gleichen Maße wie das wildtypische STIM1, wurde im nächsten Schritt die Hypothese überprüft, ob die Spleißvariante weniger gut an den C-Term von ORAI1 binden kann als STIM1. Es ist bekannt, dass STIM1 durch Interaktion der CAD/SOAR mit dem C-Term von ORAI interagiert und den Kanal so aktivieren kann (siehe Kapitel 1.2). Eine verringerte Interaktion und die damit einhergehende verringerte Aktivierung von ORAI, induziert durch die Anwesenheit der zusätzlichen Domäne, könnten demnach den reduzierten SOCE erklären. Diese Hypothese wurde mit der Methode des Förster-Resonanz-Elektronen-Transfers (FRET) überprüft. Sie basiert auf dem Prinzip, dass Fluoreszenzproteine in der Lage sind, Elektronen bei enger räumlicher Nähe zu übertragen und so weitere Fluoreszenzproteine anzuregen. Dabei ist die Anregungswellenlänge des sogenannten Elektronendonors ausreichend, um sowohl die Fluoreszenz des Donor-, als auch des Akzeptor-Proteins anzuregen. Für das Experiment wurden HEK293-Zellen transfiziert: Als Elektronendonator wurde ORAI1 verwendet, das C-terminal mit GFP fluoreszenzmarkiert war. STIM1 bzw. STIM1A mit C-terminalem mCherry nach Position L599 diente als Elektronenakzeptor. 24 h nach Transfektion wurde die Zellen mit TG für 10 Minuten inkubiert, um eine Clusterbildung zu induzieren. Da zelluläre Vorgänge in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran in ER/PM Grenzzonen untersucht wurden, wurden die Aufnahmen mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*engl. total internal reflection fluorescence microscopy* = TIRFM) generiert, welche nur die Grenzzone bis 10 μm um die PM beleuchtet. Neben einer direkten Interaktion von STIM1(A) und ORAI1 wurde ebenfalls deren Kolokalisierung untersucht. Dafür wurden die Fluoreszenzproteine mit der für das jeweilige Fluorophor spezifischen Absorptionswellenlänge angeregt und die zugehörige Emission gemessen. Anhand der Aufnahmen wurden mit dem Fiji Plugin JACoP die Manders-Koeffizienten (M1 und M2) berechnet. Sie geben ein Maß der Kolokalisierung der detektierten Pixel an, wobei ein Wert von 1 eine perfekte Kolokalisierung widerspiegelt und ein Wert von 0,5 für eine zufällige Verteilung der Pixel steht. Dabei unterscheidet man in M1, die Überlappung von roten mit grünen Pixeln und M2, die Überlappung von grünen Pixeln mit roten.

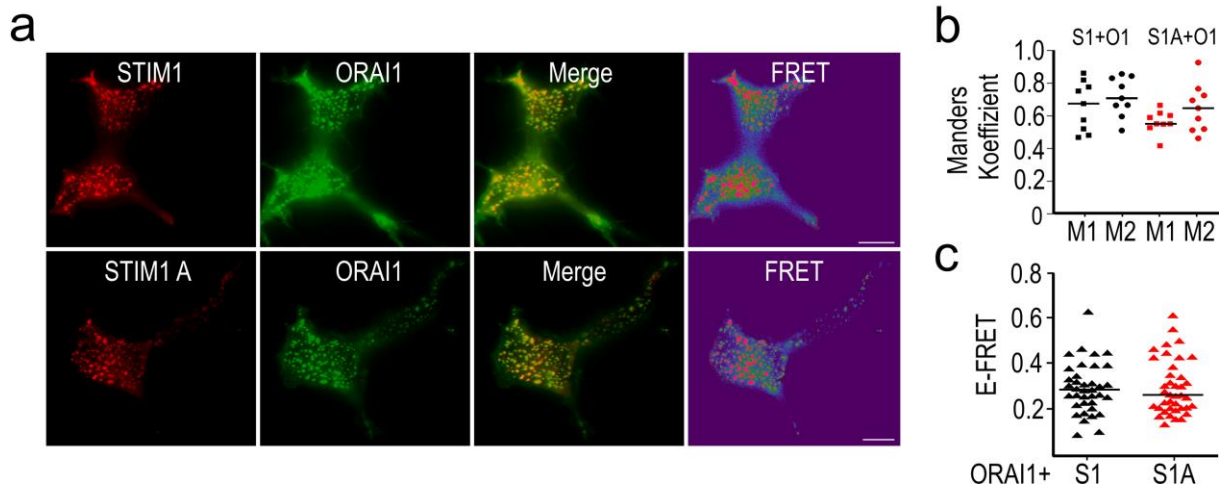


Abbildung 20 - Domäne A hat keinen Einfluss auf die Interaktion mit ORAI1
 (a) Aufnahmen zeigen repräsentative HEK293-Zellen nach Überexpression von *ORAI1-GFP* (Donor-Protein) und *STIM1(A)-mCherry* (Akzeptor-Protein) nach Stimulierung mittels Thapsigargin als Einzelkanalaufnahmen, den überlappenden Kanälen sowie das resultierende FRET-Signal. (b) Kolokalisierung von STIM1(A) und Orail. Die Daten aus (a) wurden verwendet um Mittels Fiji Plug-In die Manders-Koeffizienten (M1 und M2) zu berechnen (n=9). (c) Quantifizierung des FRET Signals aus (a) (STIM1 schwarz n = 37, STIM1A rot, n = 39). Statistik: Mann-Whitney-Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten gewonnen und sind als Einzel-Datenpunkte und daraus resultierenden Median dargestellt. Messbalken 10 μm

Abbildung 20a zeigt repräsentative Zellen nach Anregung als Einzelkanalaufnahmen mit den spezifischen Wellenlängen, als Überlagerung der Kanäle (Merge) sowie nach FRET. Die auf Grund der Einzelkanalaufnahmen berechneten Manders-Koeffizienten zeigten, dass sich sowohl M1, als auch M2 im Vergleich von STIM1(A) mit ORAI1 nicht signifikant unterschieden (Abb. 20b). Das bedeutet, dass Cluster der beiden STIM1 Varianten in gleicher Art und Weise mit ORAI1-Clustern kolokalisieren. Im nächsten Schritt wurde die direkte Interaktion von Ca^{2+} -Sensor und Kanal mittels FRET untersucht (Abb. 20c). Nach Quantifizierung der FRET Effizienz ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,9$) zwischen dem FRET Signal von ORAI1 mit STIM1 (0,291 Relative Einheit (RE)) oder der Spleißvariante STIM1A (0,294 RE). Dieses Ergebnis lässt, entgegen der aufgestellten Hypothese, die Schlussfolgerung zu, dass die primäre Interaktion von STIM mit dem C-Term von ORAI1 nicht negativ durch die Anwesenheit von Domäne A beeinflusst wird.

4.2.7 Clustergröße

Ein weiterer Parameter, der die Menge des einströmenden Ca^{2+} beeinflussen kann, ist die Größe der STIM-Cluster an der Plasmamembran. Denn je mehr STIM clustern und zur Plasmamembran translozieren, desto mehr Kanalproteine können aktiviert werden und

erhöhen folglich den Calciumeinstrom. Deshalb wurden von den Zellen aus 4.2.6. die Clustergrößen bestimmt. Abbildung 21a zeigt die Verteilung der Clustergrößen in μm^2 .

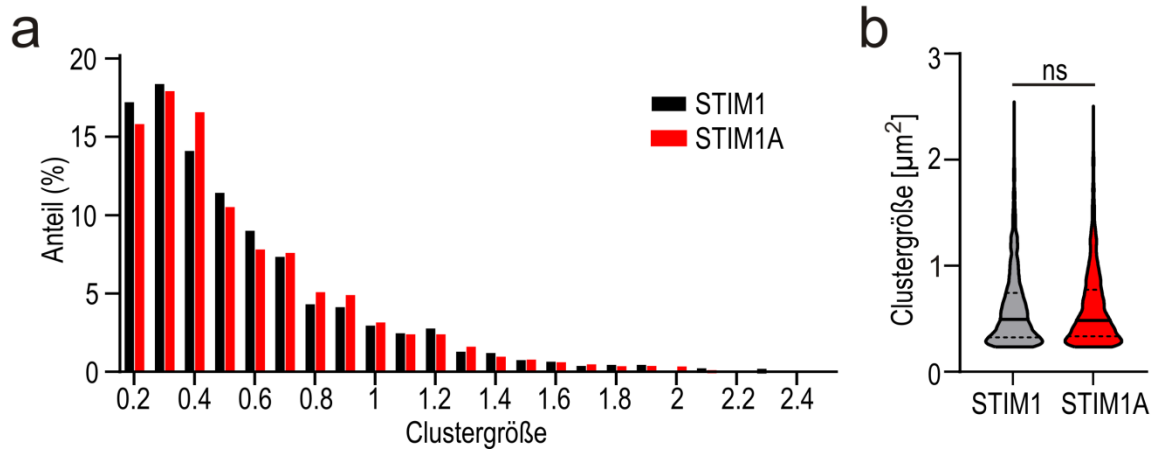


Abbildung 21 - Domäne A hat keine Auswirkung auf die Clustergröße

(a) Verteilung der STIM1-Clustergrößen von HEK293-Zellen nach Transfektion mit *STIM1-mCherry* (schwarz, $n = 2644$) oder *STIM1A-mCherry* (rot, $n = 4754$) in $0,2 \mu\text{m}^2$ Intervallen anteilig in %. (b) Geigenplot der STIM1(A) Cluster aus (a), mit eingezeichnetem Median, erster und dritter Quatrile. Statistik: Mann-Whitney-Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten gewonnen.

Auffallend war, dass nur wenige Cluster einen größeren Flächeninhalt als $1 \mu\text{m}^2$ aufwiesen. Der Geigenplot in Abbildung 21b verdeutlicht, dass der Median aller STIM1 Cluster bei $0,50 \mu\text{m}^2$ und STIM1A Cluster bei $0,49 \mu\text{m}^2$ liegen. Die mehr als 4000 analysierten Cluster unterschieden sich trotz der großen Stichprobenzahl weder in Median, noch in den ersten oder dritten Quartilen nicht signifikant. Demnach kann der reduzierte Calciumeinstrom von STIM1A auch nicht auf eine verringerte durchschnittliche Clustergröße zurückgeführt werden.

4.2.8 Zwei spezifische Aminosäuren vermitteln den reduzierten Phänotyp von STIM1A

Da sowohl die Interaktion von STIM1A mit dem Kanal, als auch die Clustergröße als Erklärung für den reduzierten SOCE ausgeschlossen werden konnte, war im nächsten Schritt zu klären, ob das Spleißevent kurz hinter der ID generell oder einzelne konservierte Aminosäuren innerhalb von Domäne A für den reduzierten Ca^{2+} -Phänotyp ausschlaggebend sind. Dafür wurden mittels PCR Mehrfach- sowie Punktmutationen in den Konstrukten, welche bereits im FRET-Experiment verwendeten wurden, vorgenommen. Wie in Abbildung 9c gezeigt, enthält Domäne A mehrere hochkonservierte und ebenfalls geladene Aminosäuremotive.

4.2.8.1 Initiale Mutationsanalysen

Um im initialen Versuch mögliche relevante Aminosäuren von Domäne A zu detektieren, wurden größere Proteinabschnitte mutiert. Zum einen wurden die Aminosäuren 498-503 RRFSD in fünf Alanine mutiert (RRFSD/AAAA). Dieser Abschnitt wurde aufgrund der positiven Ladung der Arginine, der negativen Ladung des Aspartats sowie des Serins als potentielle Phosphorylierungsseite gewählt. Zum anderen wurde das Motiv DDQS (AS 513-516) zu vier Alaninen verändert (DDQS/AAAA). Dieser Abschnitt wurde ebenfalls aufgrund der negativen Ladung der beiden Aspartate sowie des Serins als potentielle Phosphorylierungsseite gewählt. Die Mutanten wurden mittels Ca^{2+} -Imaging in HEK $\text{STIM1}/2^{-/-}$ -Zellen analysiert. Dabei diente STIM1A als Referenzkonstrukt, da untersucht wurde, ob Mutationen innerhalb von Domäne A, ähnlich wie wildtypisches STIM1, zu einer Erhöhung des SOCE führen und so den reduzierten SOCE-Phänotyp revertieren könnte. DKO-Zellen zeigten unabhängig von den exprimierten STIM-Variante nach Stimulation mit TG eine größere Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER als die EKO-Zellen (Abb. 15a). Dies ist vermutlich auf einen kompensatorischen Effekt zurückzuführen, bei dem Zellen ohne endogenes STIM möglichst viel intrazelluläres Ca^{2+} speichern, um besser auf Konzentrationsschwankungen reagieren zu können. Nach Readdition von extrazellulärem Ca^{2+} führte die Expression von STIM1A im Vergleich zum wildtypischen STIM1 sowohl in SH-SY5Y $\text{STIM1}/\text{STIM2}^{-/-}$, als auch in SH-SY5Y $\text{STIM1}^{-/-}$, wie schon in den Experimenten zuvor, zu einer signifikanten Verringerung aller SOCE-Parameter (Abb. 15b). Um dies möglicherweise einer einzigen AS zuschreiben zu können, wurden weitere Mutanten kloniert (Abb. 22a). Zum einen wurden die positiv geladenen Arginine (R498, R499) zu neutralen Glutaminen (QQ) mutiert (RR/QQ). Glutamin wurde an Stelle des bei Mutationsanalysen üblichen Alanins gewählt, da es aufgrund seiner Länge und der Carboxy-Gruppe Arginin am meisten ähnelt. Überexpression dieses Konstruktes (Abb. 22b,e lila) führte zwar zu einem leicht verstärkten SOCE, jedoch unterschied sich dieser Effekt nicht signifikant vom STIM1A-Phänotypen. Außerdem führte das Einbringen dieser Mutation zu einem erhöhten basalen Ca^{2+} . In einer weiteren Mutante wurde das auf die Arginine folgende Motiv FSD (AS 501-503) in drei Alanine geändert (FSD/AAA). Diese Veränderung (Abb. 22b,e blau) führte zu einem drastischen und signifikanten Anstieg des SOCE in Δ Peak und den Δ Plateaus. Jedoch führte auch die Expression dieses Konstrukts gegenüber dem unmutierten STIM1A zu einem leichten Anstieg des basalen Calciums. Im nächsten Schritt wurde eine D503A Punktmutante kloniert und getestet. Die Mutation führte zu einem signifikanten

Anstieg des SOCE im Vergleich zu STIM1A (Abb. 22d,f blau). Es kann also davon ausgegangen werden, dass D503 essentiell für den SOCE-Phänotyp von STIM1A ist. Die Mutation des Motivs DDQS hatte Auswirkung auf den STIM1A-induzierten SOCE (Abb 22c,e)

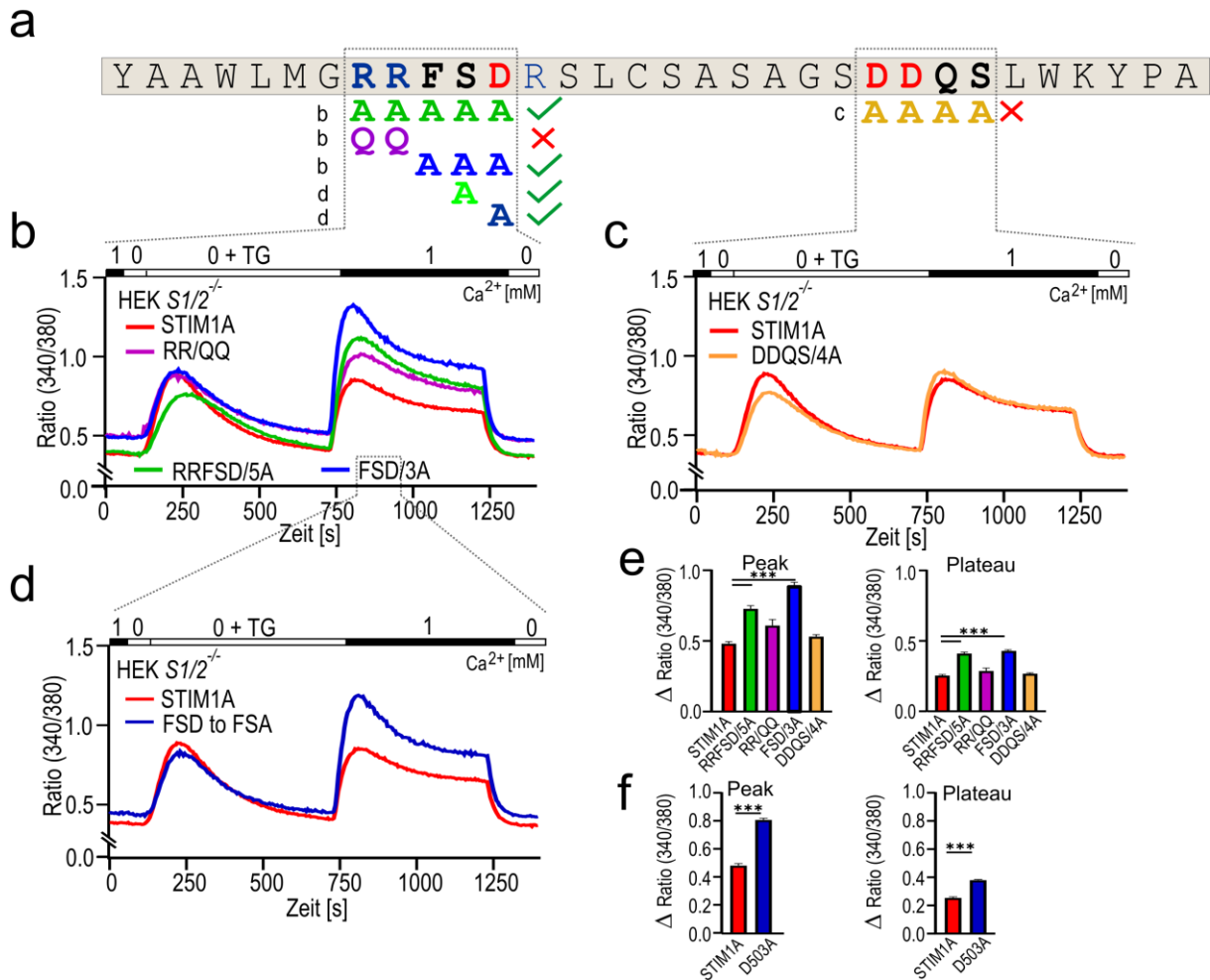


Abbildung 22 - Mutagenesescree von Domäne A

(a) Aminosäuren von Domäne A. Positiv geladene Aminosäuren sind blau markiert, negative geladene rot. Mutierte Aminosäuren sind unter der Sequenz in den Farben ihrer Darstellung in (b-f) abgebildet. Ein grüner Haken zeigt eine Wiederherstellung des Ca²⁺-Phänotyps an, ein Kreuz bedeutet keine Veränderung. (b-d) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert. Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener [Ca²⁺]_{EZ} perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μM Thapsigargin induziert. Dazu wurden HEK S1/2^{-/-}-Zellen 24h vor der Messung mit den verschiedenen Mutantenkonstrukten (*IRE5 mCherry*) transfiziert (n>116). (e) Quantifizierung der in (b+c) gemessenen Änderungen der Δ Fura2-Ratio des basalen Ca²⁺, der Influxrate (Δ Ratio/Zeit), des Peak und des Plateau. (f) Quantifizierung der in (d) gemessenen Änderungen der Δ Fura2-Ratio des basalen Ca²⁺, der Influxrate (Δ Ratio/Zeit), des Peak und des Plateau. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test (e) bzw. Mann-Whitney-Test (f). Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen.

4.2.8.2. Die Rolle von S502 als mögliche Phosphorylierungsstelle in Domäne A
 Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation an Seitenketten von Aminosäuren führen häufig zu strukturellen Konformationsänderungen von Proteinen, welche dadurch (de)aktiviert werden können oder deren Funktion ändern kann (Cohen, 2002).

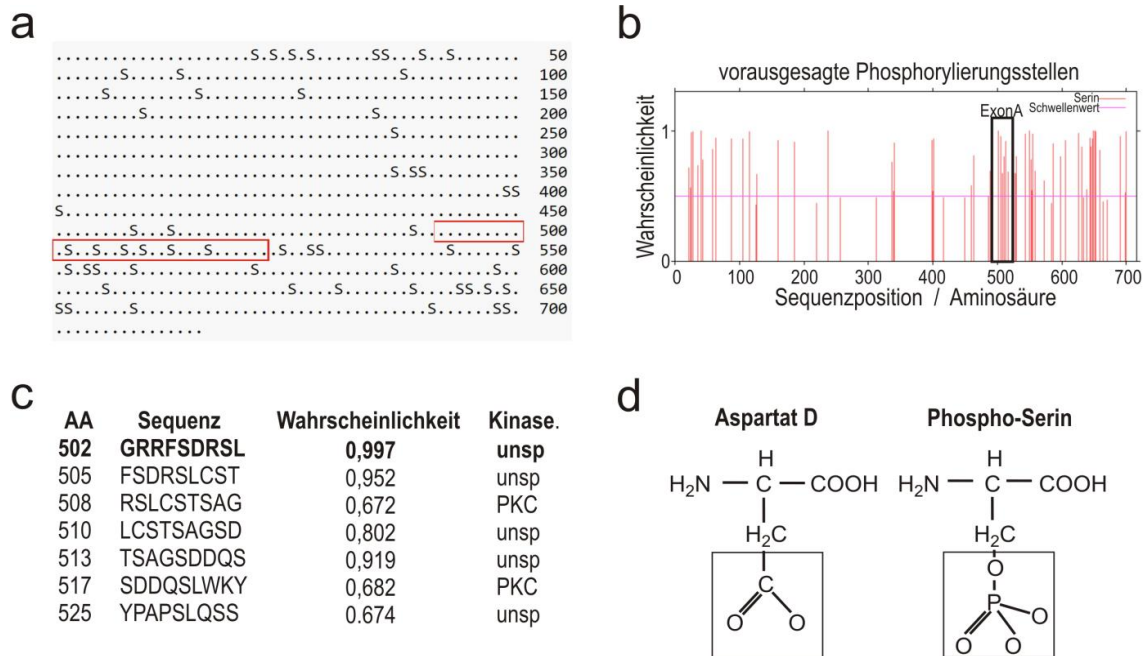


Abbildung 23 - Potentielle Phosphorylierungsstellen in STIM1A
 (a) Position aller Serine in STIM1A. Die Aminosäuren von Domäne A sind mittels roten Kastens markiert. (b) Voraussagesagte Phosphorylierungsstellen in STIM1A und deren Phosphorylierungswahrscheinlichkeit. (c) Potentielle Phosphorylierungsstelle in Domäne A inklusive Phosphorylierungswahrscheinlichkeit und ausführende Kinase. (d) Chemischer Aufbau von Aspartat und Phospho-Serin. (a)-(c) auf Basis von Berechnungen von NetPhos3.1a.

Eine besonders häufig phosphorylierte Aminosäure ist Serin. Mittels der Datenbank NetPhos3.1a (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) wurde für STIM1A, mit besonderem Augenmerk auf Domäne A, ein Phosphorylierungsprofil für alle Serine erstellt. Der Algorithmus der Datenbank ist in der Lage Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten zu berechnen, und trifft zusätzlich eine Prognose über die ausführenden Kinasen (Abb. 23a,b). Innerhalb der Domäne A wurde für Serin 502 mit 99,7 % die höchste Wahrscheinlichkeit eines Phosphorylierungsereignisses berechnet, allerdings keine Aussage über eine spezifische Kinase getroffen (Abb. 23c).

Um zu testen, ob möglicherweise die Phosphorylierung von Serin 502 für den durch STIM1A reduzierten SOCE verantwortlich ist, wurde eine phosphomimetische Mutante generiert. Aspartat ähnelt chemisch sehr stark Phospho-Serin. Lediglich am Aminoterminus von Aspartat kann das vierwertige Kohlenstoffatom nur zwei endständige Sauerstoffatome binden, das fünfwertige Phosphat jedoch drei, was in einer doppelt negativen Ladung der

Aminosäure resultiert (Abb. 23d). Durch Austausch von S502D wurde so die vorhergesagte und mögliche Phosphorylierung des Serins initiiert. Falls also die Phosphorylierung für die reduzierte Funktion der Spleißvariante verantwortlich ist, wäre zu erwarten gewesen, dass STIM1A und STIM1A^{S502D} einen ähnlichen SOCE-Phänotyp aufweisen. Als Kontrolle wurde außerdem eine Punktmutante kloniert, in der das Serin zu einem neutralen und sterisch kleinem Alanin mutiert wurde (S502A). Wie schon im zuvor beschriebenen Experiment wurden HEK S1/S2^{-/-} entweder mit *STIM1A*, *STIM1AS502D* oder *STIM1AS502A* transient transfiziert und mittels Ca²⁺-Imaging analysiert (Abb. 24). Dabei induzierten beide Punktmutanten einen signifikant größeren SOCE als das unmutierte STIM1A (Abb. 24 b,c FAD hellgrün, FDD hellblau). Zwischen den beiden Punktmutanten ließen sich keine signifikanten Unterschiede detektieren, wobei Δ Peak und Δ Plateau der phosphomimetischen Mutante minimal größer waren. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Phosphorylierung von Serin 502 nicht für den reduzierten SOCE verantwortlich ist. Allerdings sind sowohl S502 als auch D503 relevant für den SOCE Phänotyp von STIM1A.

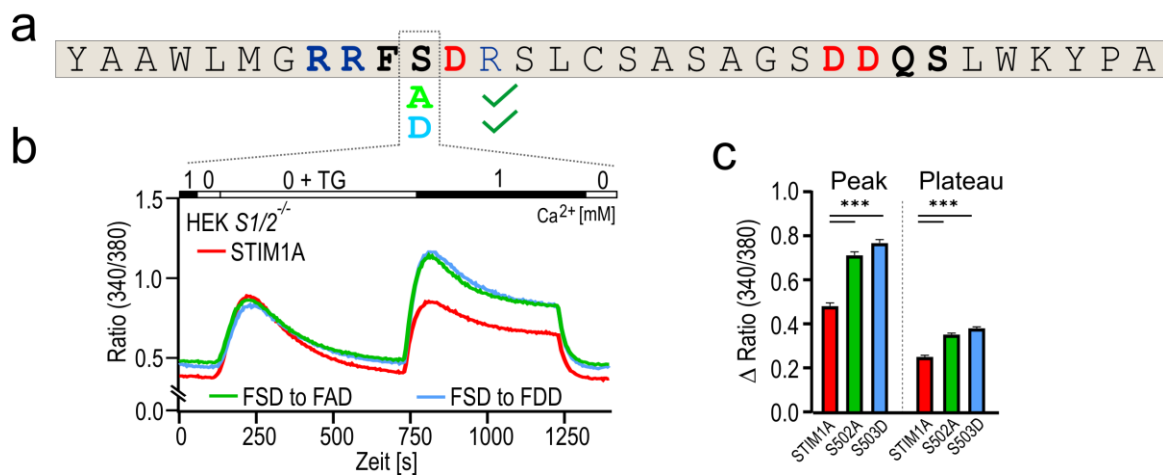


Abbildung 24 - Die Mutation von S502 revertiert den STIM1A-induzierten SOCE-Phänotyp

(a) Aminosäuren von Domäne A. Positiv geladene Aminosäuren sind blau markiert, negative geladene rot. Serin 502 wurde in Alanin und Aspartat mutiert und in den Farben ihrer Darstellung in (b-c) abgebildet. Ein grüner Haken zeigt eine Wiederherstellung des Ca²⁺-Phänotyps ans, ein Kreuz bedeutet keine Veränderung (b) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert. Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener [Ca²⁺]_{EZ} perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μ M Thapsigargin induziert. Dazu wurden HEK S1/S2^{-/-} Zellen 24h vor der Messung mit den verschiedenen Mutantenkonstrukten (*IRE5 mCherry*) transfiziert (n>216). (c) Quantifizierung der in (b) gemessenen Änderungen der Δ Fura2-Ratio des Peak und des Plateaus. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen.

4.2.8.3 S502 und D503 sind verantwortlich für den SOCE Phänotyp von STIM1A
 Das zuvor beschriebene Screening wurde in HEK S1/S2^{-/-} durchgeführt. Dabei ist allerdings zu beachten, dass nur endogener ORAI vermittelter Ca²⁺-Einstrom gemessen wurde, was zu einem sehr kleinen SOCE führt. Deshalb wurden die Effekte der Punktmutation D503A ebenfalls in HEK293-Zellen verifiziert, die stabil ORAI1 überexprimieren (HEKO1) und so die Unterschiede der getesteten Bedingungen deutlicher abbilden könnten (Kilch et al 2013).

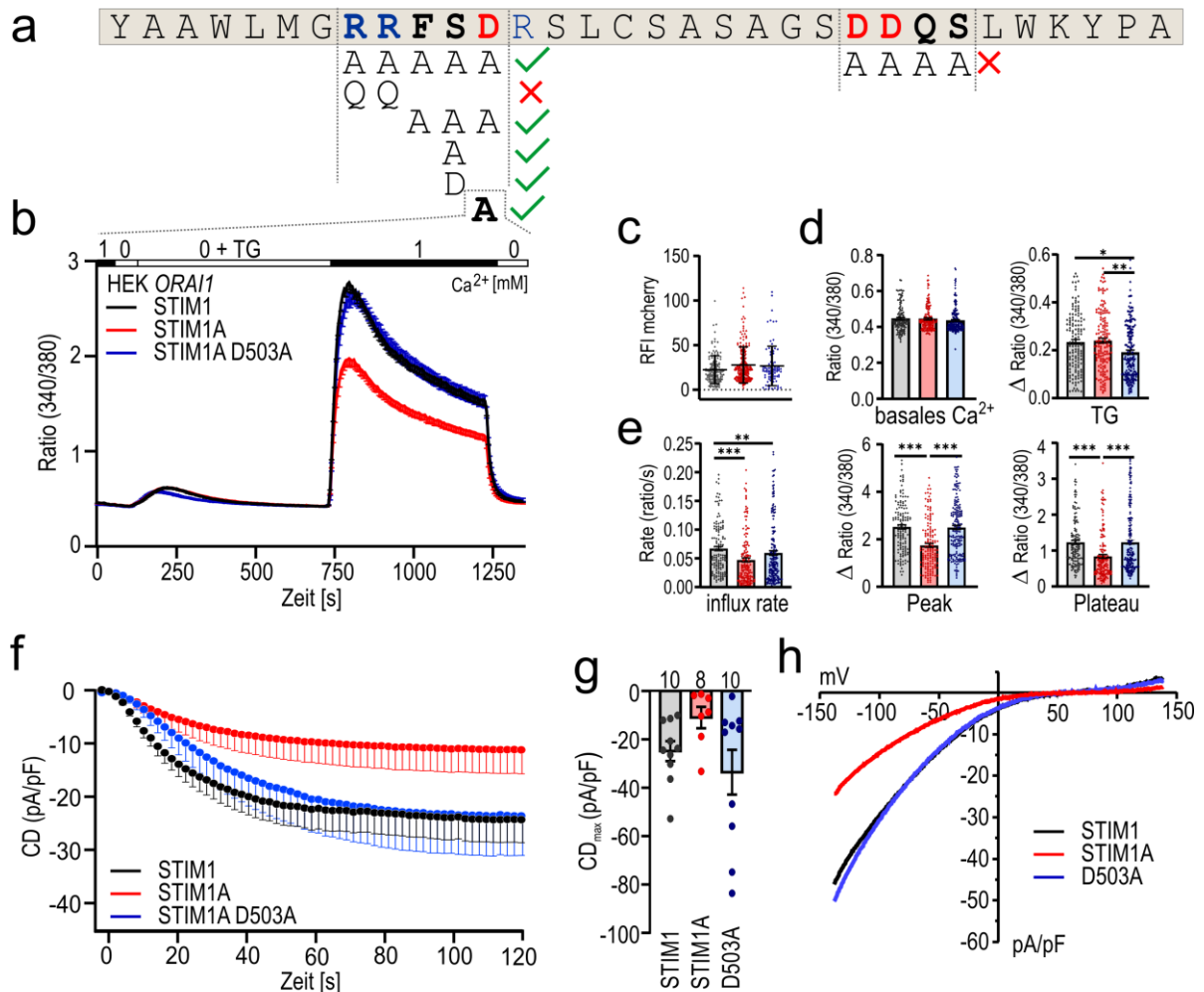


Abbildung 25 - Die Mutation von D5032 revertiert den STIM1A-induzierten SOCE-Phänotyp

(a) Aminosäuren von Domäne A. Positiv geladene Aminosäuren sind blau markiert, negative geladene rot. Aspartat 503 wurde in Alanin mutiert. Ein grüner Haken zeigt eine Wiederherstellung des Ca²⁺-Phänotyps an, ein Kreuz bedeutet keine Veränderung. (b) Calciumkurven zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2 Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert (± SEM). Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener [Ca²⁺]_{EZ} perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μM Thapsigargin induziert. Dazu wurden HEK *ORAI1*-Zellen 24h vor der Messung mit *STIM1-mCherry* (schwarz, n=145), *STIM1A-mCherry* (rot, n=157) und *STIM1A D503A-mCherry* (blau, n=185) transfiziert. (c) Relative Fluoreszenzintensitäten der in (b) vermessenen direkt mit mCherry getagten Konstrukten. (d) Quantifizierung der in (b) gemessenen Änderungen der Fura2-Ratio des basalen Calciums und Δ TG Peaks. (e) Quantifizierung der in (b) gemessenen Änderungen der Δ Fura2-Ratio des Peak und des Plateaus, sowie der Influxrate (Δ Ratio/Zeit).

(f) Ganzzell-Stromdichte (CD) bei -80 mV. (g) Durchschnitt der maximalen Stromdichte aus (f). (h) Strom-Spannungs-(I-V) Beziehung der in (f) vermessenen Zellen. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM und Einzelzell-Datenpunkte dargestellt. Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen. Patch-clamp Experimente durchgeführt von Annette Lis.

Durch Verwendung von C-terminal direkt fluoreszenzmarkierten Konstrukten konnte anhand der relativen Fluoreszenzintensität (RFI) von mCherry gezeigt werden, dass die RFI-Werte und somit die Menge der exprimierten STIM nicht signifikant zwischen den Bedingungen variierten (Abb. 25c). Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass eine unterschiedliche starke Expression der verschiedenen STIM-Konstrukte für die Unterschiede im SOCE verantwortlich gemacht werden kann. Auch unter diesen Bedingungen führt eine TG-induzierte Aktivierung des unmutierten STIM1A zu einem signifikant geringeren SOCE im Vergleich zu wildtypischem STIM1 (Abb. 25b,e). Das basale Ca^{2+} , sowie die Speicherfreisetzung unterschieden sich zwischen den Bedingungen nicht (Abb. 25d). Durch das Einführen einer Punktmutation innerhalb von Domäne A (D503A) veränderte sich der SOCE-Phänotyp der Spleißvariante drastisch: Ca^{2+} Δ Peak und Δ Plateau wurden durch die Mutation signifikant erhöht und glichen den ermittelten Werten des Wildtyps. Auch die Influxrate war erhöht und signifikant schneller als die des unmutierten STIM1A, allerdings immer noch signifikant langsamer als die des wildtypischen STIM1 (Abb. 25b,e). Die Speicherfreisetzung nach STIM1AD503A Expression war im Vergleich zu den beiden anderen Bedingungen signifikant reduziert (Abb. 25d). Die Messungen in HEKO1 bestätigten die in HEK S1/S2^{-/-} durchgeführten Versuche.

Neben Ca^{2+} -Imaging Experimenten wurde der Effekt der Punktmutante D503A ebenfalls mittels Patch-Clamp analysiert. Dafür wurden, wie schon für das Ca^{2+} -Imaging, HEK *ORAI1* Zellen mit *STIM1*, *STIM1A* oder *STIM1AD503A* transfiziert. 24h nach Expression wurden die Ganz-Zell-Stromdichten bei -80mV gemessen, welche die Ergebnisse der Fura2-basierten Messungen bestätigten (Abb. 25f): Auch hier konnte die Mutation einer einzigen Aminosäure innerhalb Domäne A den wildtypischen Phänotyp wieder herstellen. Allerdings muss hier erwähnt werden, dass sich diese Aussagen lediglich auf eine Tendenz der Daten stützt, da keine signifikanten Unterschiede berechnet werden konnten. Betrachtet man den Durchschnitt der maximalen Stromdichte aller Zellen (Abbildung 25g), ist deutlich sichtbar, dass der durch STIM1A induzierte Strom mit -10.95 pA/pF verglichen mit 24,8 pA/pF bei STIM1 deutlich geringer ist. Anhand dieser Darstellung lässt sich ebenfalls ablesen, dass die Punktmutation von D503 zur deutlichen Erhöhung der maximalen Stromdichte führte

(-33,56 pA/pF). Die in Abbildung 25h gemessenen Kurven entsprechen denen der für Orai1 typischen einwärts gleichgerichteten IV-Beziehung.

Durch die Punktmutation D503A konnte der SOCE-Phänotyp des wildtypischen STIM1 wiederhergestellt werden, was mittels zwei verschiedener Methoden nachgewiesen werden konnte. Es ist demnach ausreichend, lediglich eine Aminosäure (S502 oder D503) innerhalb der neuen beschriebenen Domäne A zu mutieren, um den reduzierten SOCE-Phänotyp der neuen Spleißvariante auf den SOCE zu revertieren.

4.2.9 STIM1A beeinflusst das N-terminale Gating von ORAI1

Die Steuerung, also Aktivierung bzw. Deaktivierung und das daraus resultierende Öffnen, Offenhalten und Schließen von Ionenkanälen wird in der Elektrophysiologie als *Gating* bezeichnet. Die Aktivierung und Öffnung des selektiven Ca^{2+} -Kanals Orai1 wird durch die primäre Interaktion der CAD/SOAR-Domäne von STIM1 mit dem C-Term von Orai1 induziert. Mittels FRET-Experimenten konnte bereits ausgeschlossen werden, dass diese Interaktion durch das Spleißen von Domäne A beeinflusst wird (siehe 4.2.6). Zusätzlich zur C-terminalen Interaktion gibt es Hinweise auf eine zweite Interaktionsstelle der CAD mit Orai: Die N-terminale ETON-Region (=Extended Transmembrane Orai1 N-terminal, AS 73-90) soll eine wichtige Rolle innerhalb des Öffnungsmechanismus von Orai1 spielen (Derler et al., 2013; Lis et al., 2010; McNally et al., 2013). Diese Domäne ist hoch konserviert und bis auf eine Aminosäure in ORAI3 unter den Homologen komplett identisch. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die hoch konservierten Aminosäuren W76, R77 und K78 der ETON-Region (AS-Nummern beziehen sich auf ORAI1) an der schnellen Ca^{2+} abhängigen Inaktivierung von Orai durch die ID beteiligt sind (Mullins and Lewis, 2016, Derler et al., 2018; Derler et al., 2013). Domäne A wird nur 8 Aminosäuren hinter der stark negativ geladenen inhibitorischen Domäne eingespleißt.

Deshalb galt es als Nächstes die Frage zu klären, ob das Spleißen von Domäne A sich negativ auf die Interaktion mit der ETON Region und somit auf die Stabilisierung der Öffnung und Offenhalten des Kanals auswirkt, was den verringerten SOCE erklären könnte. Deshalb wurde ein Orai1-Konstrukt verwendet, bei welchem das Argin77 der ETON-Region zu Glutamat mutiert worden war. Lis et al 2010 konnten zeigen, dass diese Mutation zu einer Verringerung des I_{CRAC} führt. Falls STIM1A sich negativ auf das N-terminale Gating von Orai auswirkt, sollte der SOCE-Phänotyp von der Punktmutation der ETON-Region nicht beeinflusst werden, sondern dieses maskieren. Für das Ca^{2+} -Imaging wurden in HEK S1/S2^{-/-}

STIM1, *STIM1A* und die Phänotyp revertierende Punktmutante *STIM1AD503A* jeweils entweder zusammen mit einem *ORAI1*-Konstrukt mit wildtypischer ETON-Region koexprimiert, oder in Kombination mit der ETON-Punktmutante *R77E*. Der SOCE wurde mittels Calcium-Imaging (Abb. 26a-d) und Patch-Clamp (Abb. 26e-g) gemessen.

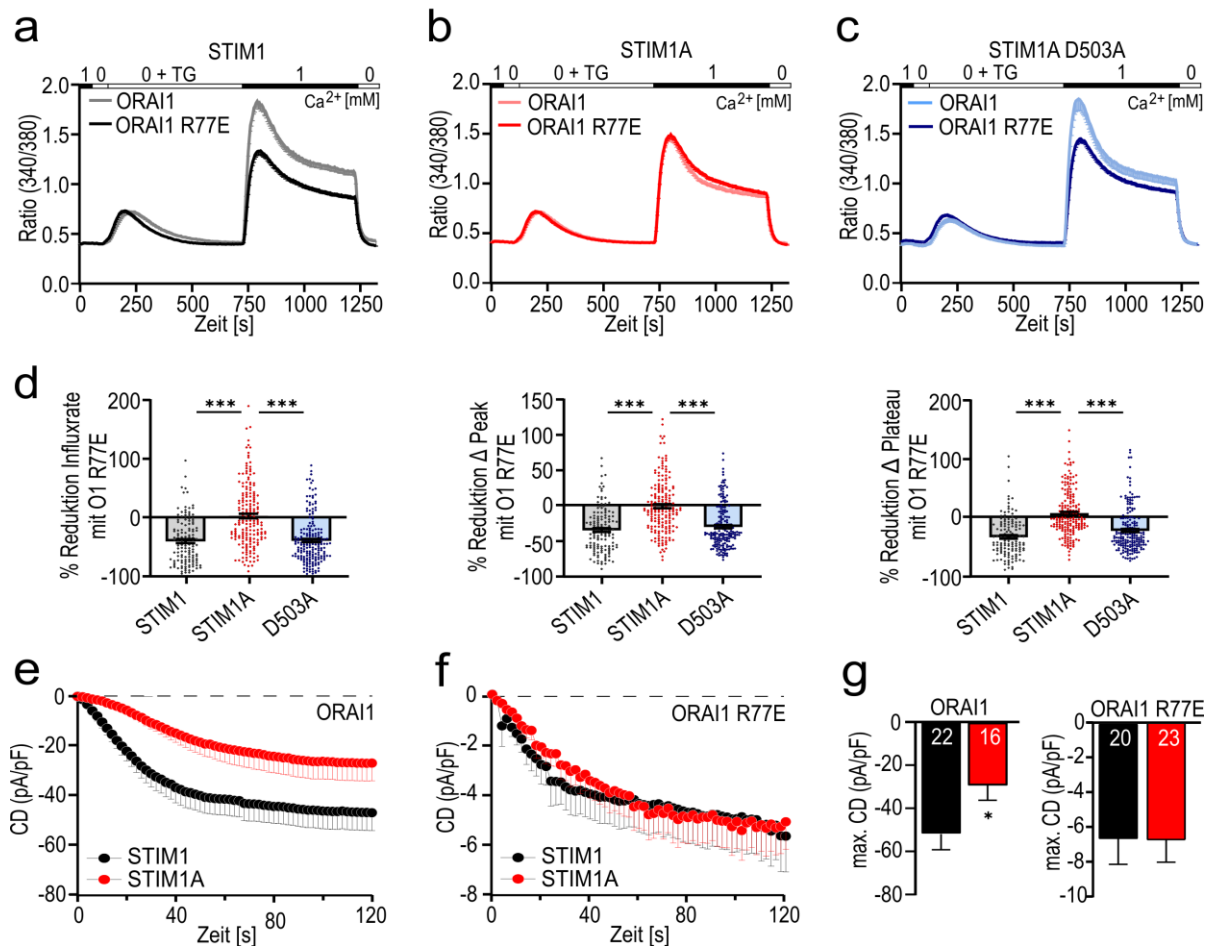


Abbildung 26 - Mutationen in der ORAI1 ETON Region maskieren den STIM1 SOCE Phänotyp

(a-c) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert (\pm SEM). Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener $[Ca^{2+}]_{EZ}$ perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μ M Thapsigargin induziert. Dazu wurden HEK *Stim1/2^{-/-}*-Zellen 24h vor der Messung mit *STIM1-mCherry* (schwarz), *STIM1A-mCherry* (rot) oder *STIM1 D503A-mCherry* (blau) in Kombination mit *ORAI1* oder *ORAI1 R77E* als *IRES GFP* Konstrukte transfiziert (n>135). (d) Quantifizierung der durch *ORAI1R77E*-induzierten relativen Reduktion der SOCE-Parameter aus (a). (e+f) Durchschnittliche Ganzzell-Stromdichte (CD) bei -80 mV in HEK *Stim1/2^{-/-}*-Zellen 24h nach Transfektion mit *STIM1* (schwarz) oder *STIM1A* (rot) *IRES mCherry* in Kombination mit *ORAI1* (e) und *ORAI1 R77E* (f) *IRES GFP*. (g) Durchschnitt der maximalen Stromdichte der in (e+f) vermessenen Zellen. Statistik: in (d) Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparison Test, in (g): ungepaarter Student-T-Test mit Welch's Korrektur. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen. Patch-clamp Experimente durchgeführt von Dalia Alansary.

Betrachtet man die Calcium-Imaging Kurven nach Transfektion mit *STIM1* ist klar zu erkennen, dass die Expression von *ORAI1 R77E* zu einer Reduktion des SOCE führt (Abb. 26a). Die gleiche Tendenz, jedoch in einer etwas schwächeren Form lässt sich auch für die Transfektion mit der Punktmutante *STIM1A D503A* feststellen (Abb. 26c). Diese Differenz zwischen der wildtypischen und mutierten ETON Region bleibt aus, wenn *STIM1A* koexprimiert wird (Abb. 26b). Um den Vergleich der verschiedenen Bedingungen zu erleichtern, wurden die Werte der einzelnen SOCE-Parameter der Messung von *ORAI1 R77E* für jede *STIM* Variante jeweils auf die Vergleichsbedingungen mit *ORAI1* normiert. Daraus ergab sich die prozentuale Reduktion von Influxrate, Peak und Plateau, induziert durch die ETON-Punktmutation. Bei einer Transfektion mit dem wildtypischen *STIM1* führte die Mutation *R77E* dazu, dass die Influxrate um $39,5 \pm 3,3\%$ reduziert war. Gleiches war für den Calcium-Peak ($-34,2 \pm 2,7\%$) und das Plateau ($-32,9 \pm 2,9\%$) zu verzeichnen (Abb. 26d, schwarzer Scatterplot). Die Ergebnisse bestätigen und komplementieren die Daten von Lis et al., 2010 und zeigen die Wichtigkeit von *R77* beim vollständigen Gating von *Orai1*. Bei der Phänotyp revertierende Punktmutante *STIM1AD503A* war die gleiche Tendenz zu beobachten, die Effekte waren jedoch weniger stark ausgeprägt (Influxrate $-38,37 \pm 2,8 \%$, Peak $-29,6 \pm 2,2 \%$, Plateau $-22,0 \pm 2,6 \%$, Abb. 26d, Scatterplot). Für die Transfektion mit der neuen Spleißvariante *STIM1A* konnte zwischen der Koexpression von *ORAI1* und *ORAI1R77E* keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 26d, Scatterplot). Die Influxrate war um $3,3 \pm 3,9 \%$ gesteigert, der Calcium-Peak um $0,6 \pm 2,7 \%$ reduziert und das Plateau um $6,7 \pm 2,9 \%$ erhöht. Neben Ca^{2+} -Imaging wurden die gleichen Bedingungen ebenfalls mittels Ganzzell-Patch-Clamp analysiert. Abbildung 26e,f zeigen den Mittelwert der Stromdichten bei -80mV während der Messungen. Auch die Patch-Clamp-Messungen bestätigen die Daten von Lis et al 2010 und zeigen die Reduktion des *STIM1* induzierten I_{CRAC} nach Mutation von *R77*. Ebenfalls konnte hier in HEK *S1/S2*^{-/-} reproduziert werden, dass *STIM1A* die maximale Stromdichte des I_{CRAC} signifikant verringert (Abb. 26g links), was bislang nur in HEK293 (Abb. 18) und HEK01 (Abb. 25) gezeigt werden konnte. Vergleicht man die Expression von *STIM1* bzw. *STIM1A* in Kombination mit *ORAI1 R77E* lassen sich keine signifikanten Unterschiede der maximalen Stromdichte detektieren. Der durch *STIM1A* induzierte I_{CRAC} unter diesen Bedingungen nur tendenziell minimal langsamer, aber nicht signifikant abweichend. Allerdings ist Vergleich mit dem wildtypischen *Orai1* der I_{CRAC} weiter reduziert, was für eine Dominanz von *R77E* gegenüber dem Spleißen von *STIM1A* spricht.

Die Expression der neuen Spleißvariante STIM1A führt verglichen mit dem wildtypischen STIM1 im zellulären Hintergrund von ORAI1 R77E weder im Ca^{2+} -Imaging noch im Patch-Clamp zu einer weiteren Reduktion des SOCE oder des I_{CRAC} . Diese Daten sprechen dafür, dass die Insertion von Domäne A die Interaktion der CAD von STIM mit dem N-term von ORAI1, genauer R77 der ETON Region beeinflusst, was sich reduzierend auf das vollständige Gating von Orail auswirkt. Dabei ist anhand der Daten nicht ersichtlich, ob der Kanal a) deshalb nicht vollständig geöffnet werden kann oder b) nicht offen gehalten wird, weshalb in beiden Fällen weniger Calcium in die Zelle einströmen kann.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass STIM1A den SOCE negativ beeinflusst. Die Spleißvariante ist in der Lage, ORAI unabhängig von Spezies und Homolog zu aktivieren und interagiert in gleichem Maße mit dem C-Term von ORAI1 wie STIM1wt. Die Anwesenheit von Domäne A hat weder Auswirkung auf die Größe der Cluster noch auf den Füllstand der Calcium-Speichers. Für den reduzierenden Ca^{2+} -Phänotypen von STIM1A ist die Expression von STIM2 irrelevant. Innerhalb von Domäne A konnten die Aminosäuren S502 und D503 als verantwortlich für den reduzierten SOCE identifiziert werden.

4.3 STIM1A Lokalisierung *in vitro* und *ex vivo*

Die Lokalisierung eines Proteins ist ausschlaggebend für seine physiologische Funktion. Deshalb wurde untersucht, ob die Insertion von Domäne A die Lokalisierung von STIM1 *in vitro*, als auch *in vivo* beeinflusst.

4.3.1 STIM1A Lokalisierung *in vitro* nach heterologer Expression

4.3.1.1. STIM1A kolokalisiert mit STIM1 in HEK293-Zellen

Im inaktiven Zustand verteilen sich die ER-residenten STIMs über die gesamte ER-Membran. Erst nach Aktivierung translozieren sie zu ER-PM Knotenpunkten und bilden Cluster. *In vitro* wurde im inaktiven, als auch durch den Einsatz von Thapsigargin (TG) im aktiven Zustand untersucht, ob die neue Spleißvariante differenziell zum wildtypischen STIM1 lokalisiert, oder ob STIM1A und STIM1 in der Zelle kolokalisiert vorliegen. Dafür wurden HEK $S1/S2^{-/-}$ mit direkt YFP- fluoreszenzmarkierten *STIM1* Konstrukten in Kombination mit *STIM1*-mCherry oder *STIM1A*-mCherry transfiziert, die jeweilige Fluoreszenz gemessen und die Manders-Koeffizienten M1 und M2 rechnerisch bestimmt. M1 beschreibt die Überlappung von roten mit grünen Pixeln, M2 die Überlappung von grünen

Pixeln mit roten. Für die Kontrollbedingung der beiden STIM1-Konstrukte, wäre theoretisch eine perfekte Kolo­kalisierung mit einem M1 und M2 von 1 zu erwarten. Allerdings wird ein solcher Wert experimentell nie erreicht (Aaron et al., 2018). Abbildung 27 zeigt die aus Z-Stack Aufnahmen berechnete maximale Intensitäts-Projektion einer Zelle und die zugehörigen Manders-Koeffizienten.

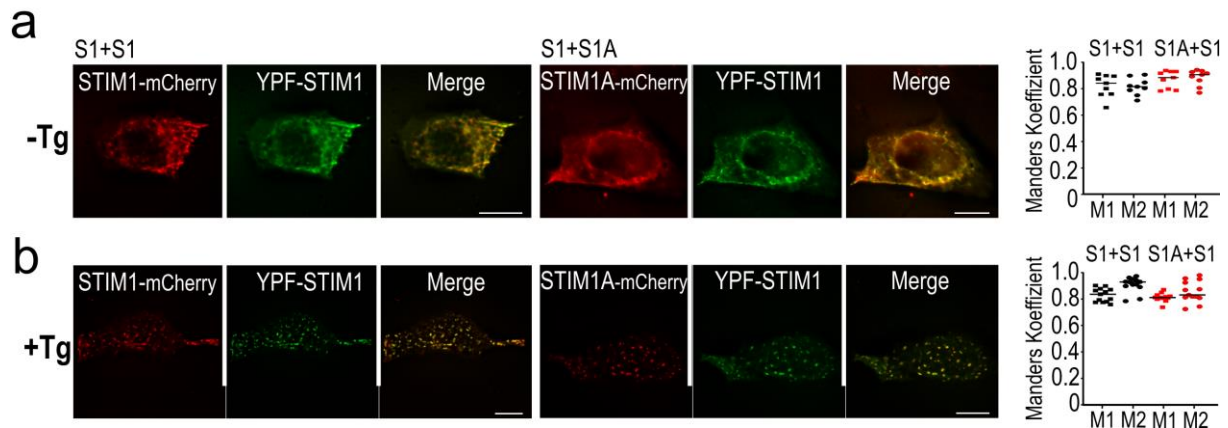


Abbildung 27 - STIM1 und STIM1A kolo­kalisieren in *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen

Die repräsentativen Bilder zeigen die Lokalisierung von STIM1(A)-mCherry und YFP-STIM1 vor (a) und nach (b) Stimulation mit Thapsigargin (TG) in *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen 24h nach Transfektion. Ganz rechts sind die Manders-Koeffizienten (M1 und M2) von je 9 Zellen als Einzelzell-Datenpunkte und resultierendem Median gezeigt. Die Manders-Koeffizienten wurden mit dem Fiji Plug-In JACoP berechnet. Die Daten wurden aus 3 biologischen Replikaten. Statistik: ungepaarter Student T-Test. Messbalken 10 μm .

Vor der Speicherentleerung ließ sich für alle Expressionskonstrukte die typische netzförmige ER-Maserung erkennen. Die Proteine unterschieden sich nicht im Status ihrer Präaktivierung und befanden sich nicht vorab geclustert in Nähe der Plasmamembran der Zelle. Für die Kontrolle konnte ein M1 von 0,83 und M2 von 0,87 berechnet werden. Die Mediane der Kolo­kalisierungskoeffizienten von STIM1 und STIM1A unterschieden sich mit M1 von 0,83 zu 0,87 und M2 von 0,80 zu 0,89 nicht signifikant von der Kontrollbedingung. Nach der Zugabe von 1 μM TG konnte für alle Bedingungen aufgrund der induzierten Speicherentleerung und Aktivierung der STIMs eine deutliche Clusterbildung beobachtet werden. Für die Kontrollgruppe ergaben sich nach Aktivierung ein M1 von 0,84 zu 0,81 und M2 von 0,93 zu 0,83. Für die Kotransfektion von *YFP-STIM1* mit *STIM1A-mCherry* keine differenzielle Lokalisierung der beiden Proteine festgestellt werden (M1=0,81 M2=0,83). Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass STIM1 und STIM1A in HEK293 Zellen in Überexpression in der ER-Membran kolo­kalisieren und in die gleichen ER-PM Knotenpunkte translozieren. Über eine direkte Interaktion der Varianten kann auf Grund der geringen Auflösung dieser Methode keine Aussage getroffen werden.

4.3.1.2 Domäne A zeigt zytosolische und nukleare Lokalisierung

Als nächstes wurde untersucht, ob Domäne A differenziell zum Gesamtprotein lokalisiert, wenn sie unabhängig vom ER-membranständigen STIM1 in der Zelle vorliegt, oder ob Domäne A in diesem Fall innerhalb der Zelle in oder an ein spezifisches Kompartiment transloziert. Dafür wurde ein Konstrukt kloniert, welches ein Fusionsprotein aus GFP, Linker und der Domäne A herstellt. Das Konstrukt wurde zum einen in HEK $S1/S2^{-/-}$ überexprimiert, um zu verhindern, dass Domäne A durch mögliche Bindung an STIM1 und STIM2 abgefangen wird und am ER anreichert. Außerdem wurden HEKO1 mit *Exon A-GFP* transfiziert, um Hinweise auf eine mögliche direkte Interaktion von Domäne A und Orai1 auf fluoreszenzmikroskopischer Ebene zu erhalten. Als Kontrolle wurde pMax-GFP von Lonza[®] verwendet, dessen Produkt zytosolisch exprimiert wird. Abbildung 28 zeigt Mikroskopieaufnahmen repräsentativer Zellen aller Bedingungen.

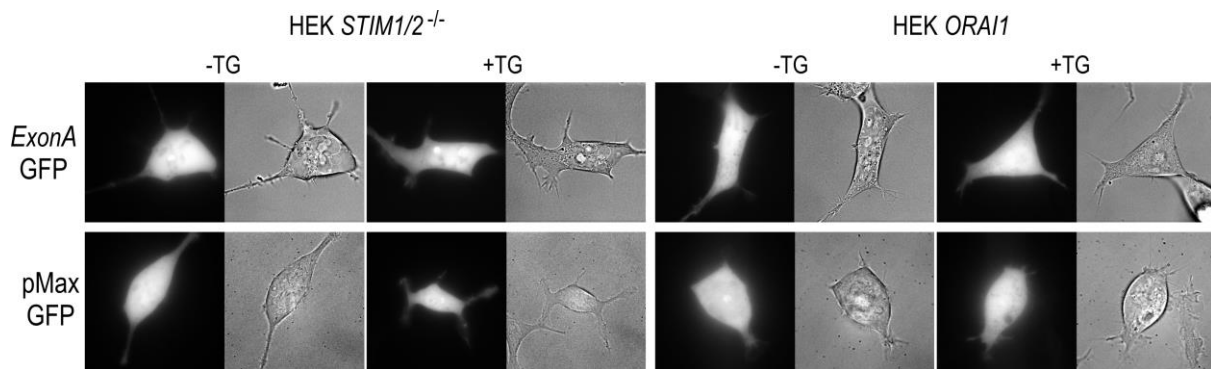


Abbildung 28 - Domäne A zeigt zytosolische und nukleare Lokalisierung

Die repräsentativen Bilder zeigen die Lokalisierung von *Exon A-GFP* und GFP vor (a) und nach (b) Stimulation mit Thapsigargin (TG) in HEK $S1/S2^{-/-}$ -Zellen, sowie HEK *ORAI1*-Zellen 24h nach Transfektion. Messbalken 10 μ m

In HEK $S1/S2^{-/-}$ -Zellen war das Fluoreszenzsignal von *Exon A-GFP* im Ruhezustand über die gesamte Zelle verteilt und war sowohl im Zytosol, als auch in Nucleus und Vesikeln zu finden. Die Lokalisierung von *Exon A-GFP* unterschied sich nicht von der des Kontrollvektors. Nach Aktivierung der Clusterbildung mit 1 μ M TG zeichnete sich kein differenzielles Bild ab. Auch in HEKO1 konnte Domäne A sowohl vor als auch nach Aktivierung des SOCE keinem bestimmten Organell zugeordnet werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Domäne A nicht spezifisch und persistent an einen Interaktionspartner bindet, der dessen Translokation verursacht.

4.3.2 STIM1A Lokalisierung *ex vivo*

In HEK-Zellen konnte keine differenzielle Lokalisierung der neuen Spleißvariante STIM1A im Vergleich zum wildtypischen Protein gefunden werden. Da HEK-Zellen unter Zellkulturbedingungen *in vitro* keine komplexen Netzwerke ausbilden, wie sie *in vivo* in z. B. in Astrozyten oder Sertoli-Zellen zu finden sind, sollte geklärt werden, ob die Anwesenheit von komplexen, spezialisierten und zelltyp-spezifischen ER Domänen Einfluss auf die Lokalisierung von STIM1A *ex vivo* hat.

4.3.2.1. Spleißvarianten-spezifische Antikörper

Um Proteine *ex vivo* nachweisen zu können, müssen entweder transgene Tiere verwendet werden, bei denen das zu untersuchende Protein mit einem Fluorophor fusioniert wurde oder es werden Epitop-spezifische Antikörper verwendet. Dabei ist extrem wichtig, dass der AK nur das Epitop eines einzigen Proteins erkennt und sequenzspezifisch bindet. Bei Proteinen wie STIM, deren gesamte Tertiär- und Quaträrstruktur noch nicht vollständig strukturbioologisch aufgeklärt werden konnte, kann ein Antikörper nur basierend auf der primären Proteinsequenz entworfen werden. Etwaige Maskierung oder Präsentation von Epitopen, bedingt durch Faltung, können dabei nicht in Betracht gezogen werden. Mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Jung (medizinische Biochemie, UdS) wurde im Hasen ein Antikörper produziert, der gerichtet gegen die Aminosäuren 507-523 in Domäne A spezifisch nur das neu entdeckte Aminosäurenmotiv erkennen sollte. Nach Immunisierung mit an ein Trägerprotein gekoppeltem Peptid und nach der siebten Blutentnahme und Affinitätsreinigung des Serums des immunisierten Hasen zeigte der Antikörper eine spezifische Antigen-Antikörper Reaktion für Lysate aus *HEK S1/S2^{-/-}*-Zellen nach Überexpression von STIM1A. Der gegen Domäne A gerichtete Antikörper war hingegen nicht in der Lage das wildtypische STIM zu detektieren (Abb. 29a, oberster Blot, Tabelle 22). Der gleiche Antikörper wurde ebenfalls mittels Immunzytochemie getestet. Dazu wurde in *HEK S1/S2^{-/-}*-Zellen *Stim1* oder *Stim1A*, jeweils direkt mit GFP markiert, überexprimiert, mit dem Antikörper gefärbt (2° AK Alexa Fluorophor 568) und die Koloalysierung der Konstrukte mit der Antikörperfärbung verglichen (Abb. 29b, Tabelle 22). Es war deutlich zu erkennen, dass der Domäne A-spezifische Antikörper nur in der Lage war *Stim1A* zu detektieren, allerdings nicht an das wildtypische *Stim1* band.

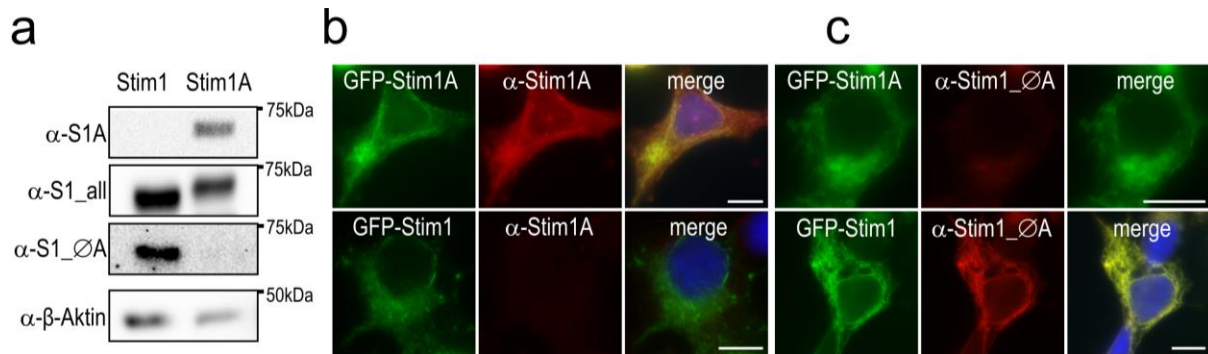


Abbildung 29 - Test des Domäne A-spezifischen und ØA-Antikörpers.

(a) Western Blot nach heterologer Überexpression von *Stim1* und *Stim1A* in HEK293-Zellen. Der Blot wurde mit dem für Domäne A-spezifischen Antikörper, dem ØA-Antikörpers, einem N-terminalen pan-STIM1 Antikörper und einem β -Aktin-Antikörper zur Ladekontrolle inkubiert. (b) Immunzytochemie von *HEK S1/2^{-/-}* Zellen nach Transfektion mit *GFP-Stim1(A)* und anschließender Färbung mit dem A-spezifischen Antikörper. (c) Immunzytochemie von *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen nach Transfektion mit *GFP-Stim1(A)* und anschließender Färbung mit dem ØA Antikörper. Messbalken 10 μ m.

Neben dem A-spezifischen Antikörper konnte ein kommerziell erwerblicher Antikörper identifiziert werden, der nicht in der Lage ist, die Spleißvariante *Stim1A*, weder im Western Blot noch in der Immunzytochemie, zu detektieren. Sein Epitop ist gegen AS 441-620 gerichtet, in welchem Bereich auch die Domäne A eingespleißt wird. Dieser Antikörper wird im Folgenden als ØA bezeichnet werden (Abb. 29a dritter Blot von oben, sowie 29c und Tabelle 22). Der A-spezifische Antikörper wurde im Hasen produziert, ØA in der Maus. Deshalb konnten beide Antikörper parallel verwendet werden und sowohl Spleißvarianten mit bzw. ohne Domäne A in der gleichen Probe nachgewiesen werden. Unter der Verwendung dieser beiden Antikörper war es nicht möglich, zwischen N-terminalen Spleißevents zu unterscheiden. Neben den zytosolischen, N-terminalen STIM-Antikörpern gibt es auf dem Markt einen STIM1-Antikörper, der Aminosäure 2-350 erkennt. Dieser polyklonale Antikörper ist in der Lage, sowohl Proteine mit und ohne Domäne A zu erkennen (Abbildung 29a zweiter Blot von oben), die *STIM1* Varianten mit alternierender 5'UTR (*alt1* und *alt2*, siehe 4.1.2.3) allerdings nicht (Tabelle 22).

Tabelle 22 – Durch die immunhistologischen Primärantikörper erkannte Spleißvarianten

	Stim1A	alt1-Stim1A	Stim1	alt1-Stim1
α -STIM1A	+	+		
α -STIM1ØA			+	+
α -pan STIM1	+		+	

4.3.2.2 Test des sekundären Antikörpers in Testis

Neben der Spezifität des bei der Immunzyto- oder Immunhistochemie verwendeten primären Antikörpers ist es ebenfalls notwendig, das Bindeverhalten des fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpers zu kennen, um zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen unterscheiden zu können. Dieses ist von Zelltyp, Gewebe und Färbeprotokoll abhängig. Zur Bestimmung in murinen Testis wurden Gewebeproben (siehe Methoden 3.6.2) mit den sekundären Antikörpern α -Hase, gekoppelt an das Fluorophor Alexa488 (Abb. 30 grün) und α -Maus, an welchen das Fluorophor Alexa568 gebunden war (Abb. 30 rot) gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Zellkerne wurden zusätzlich mittels DAPI angefärbt.



Abbildung 30 - Unspezifische Färbung des sekundären Antikörpers

Murine Testis wurden nur mit dem sekundären fluoreszenzgelabelten Antikörper aus Ziege gefärbt (α -Hase AF488, α -Maus AF568) sowie mit DAPI zur Visualisierung der DNA. Einzelebene, Messbalken: 10 μ m

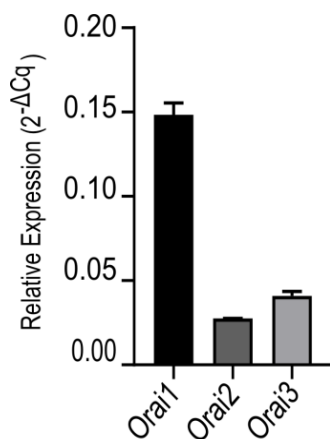
Abbildung 30 zeigt den Querschnitt durch einen *tubulus seminiferus* mit angrenzenden Leydig-Zellen in 20-facher Vergrößerung. In der Durchlichtaufnahme ließ sich deutlich das zellfreie Lumen erkennen, in welches Spermien im Reifungsprozess freigesetzt werden. Nach Inkubation mit dem gegen Hasen gerichteten sekundären Antikörper war eine leichte Färbung des Zytosols der Leydig-Zellen zu beobachten sowie eine noch schwächere unspezifische Fluoreszenz von Zellkern und Zytosol der Sertoli-Zellen sowie der Keimzellen, unabhängig von deren Reifegrad. Der α -Maus Antikörper zeigte lediglich ein geringes, nicht spezifisches Hintergrundsignal.

4.3.2.3 Die Abwesenheit von Stim1A verändert die Stim1-Lokalisierung in Sertoli-Zellen

Die Expressionsanalysen in 4.1.1 haben gezeigt, dass die neu entdeckte Spleißvariante Stim1A im Vergleich mit der wildtypischen Variante am stärksten in murinen Testes exprimiert wird. Es ist bekannt, dass Stim im testikulären Gewebe nur in Sertoli-Zellen exprimiert wird (Bogdarina et al., 2004; Zheng et al., 2015 Shen 2019, Lyon 2017). Das gesamte Stim1(A), welches in der qRT-PCR detektiert wurde, stammt demnach vermutlich aus diesem Zelltyp.

Sertoli-Zellen versorgen die Keimzellen während ihrer Reifung vom Spermatogonium bis hin zum Spermium mit Nährstoffen. Sie erstrecken sich von der Basalmembran, die die *Tubuli seminiferi* umgibt, bis hin zum Lumen, in das die Spermien freigesetzt werden. Außerdem weisen Sertoli-Zellen ein extrem komplexes ER mit diversen spezialisierten Kontaktseiten auf (Mullins et al., 2016) siehe Einleitung 1.4). Deshalb sollte in diesem komplexen System die Lokalisierung von Stim1A mittels Immunhistochemie untersucht werden.

Dazu wurden immunhistochemische Färbungen von murinen Testes angefertigt, um die Verteilung von Stim1A und Stim1ØA entlang des komplexen ER der Sertoli-Zellen zu untersuchen. Ebenfalls sollte die Lokalisierung von Ora1 in Betracht gezogen werden. Ora1 ist in Testes das dominante Homolog (Abb. 31). Dafür wurden wie in den



Expressionsanalysen wildtypische C57BL/6 Mäuse verwendet. Als Kontrolle dienten C57BL/6 10A Mäuse, welche nicht in der Lage sind, C-terminale Spleißvarianten von STIM1 zu exprimieren.

Mit dem pan-STIM1 Antikörper, welcher alle C-terminalen Spleißvarianten erkennt, konnte die von Lyon et al 2017 beschriebene Verteilung des gesamt-Stims in wildtypischen C57BL/6 reproduziert werden (Abb. 32g, siehe 1.3.3 Abb. 6b). Die N-Terminale Spleißvariante alt1-Stim1(A) wird von diesem

Abbildung 31 - Expressionsanalyse der murinen Ora-Homologe in murinen Testes mittels qRT-PCR, n=3. Durchgeführt von Kathrin Förderer.

Antikörper nicht erkannt. Aufgrund der Expressionsanalysen mittels flankierender PCR (Abb. 10b) ist davon auszugehen, dass in diesem Zelltyp Stim1 und Stim1A als einzige C-terminale Spleißvariante exprimiert werden. Für das ER-lokalisierte Stim war im basalen Zellabschnitt und um den Nukleus der Sertoli-

Zelle eine starke Immunreaktivität erkennbar. Ebenfalls band der Antikörper Proteine, die sich über den mittleren Bereich der Zelle bis in apikale Zellausläufer ranken. Dabei war auffallend, dass eine intensivere bzw. lokal zentrierte Immunreaktivität immer in Nähe der Keimzellen auftrat, wo diese das ER umspannt. Die Arbeitsgruppe um Wayne Vogl beschrieb diese Bereiche als sogenannte ektoplasmatische Spezialisierungen (ES), einen Bereich der Zelle, in der das ER über Aktin-Filamente direkt mit der Plasmamembran verbunden ist. Besonders häufig treten sie an Zellgrenzen zu Keimzellen auf, aber auch zwischen zwei Sertoli-Zellen. Ebenfalls konnte eine starke Immunreaktivität in direkter Nähe zu den Spermienköpfen mit bereits stark kondensiertem Chromatin beobachtet werden. In diesem Bereich konnten Lyon et al mittels Elektronenmikroskopie Sertoli-Zell-spezifische

tubulobulbäre Komplexe (TBC) identifizieren. Dabei handelt es sich um die Ausstülpung der PM des Spermiums und parallele Einstülpungen der Plasmamembran der Sertoli-Zelle. Der ausgebildete Bulbus dieser Strukturen ist vom ER der Sertoli-Zelle ummantelt. Ihre Abschnürung, Internalisierung und Degradierung in der Sertoli-Zelle leitet die Spermination ein. Abbildung 32a zeigt die Übersichtsaufnahmen eines *Tubuli seminiferi* einer WT Maus nach Färbung mit dem polyklonalen Stim1A- und dem monoklonalen Stim1ØA-Antikörpers. Bereits in 20-facher Vergrößerung ließen sich die Sertoli-Zellen erkennen, welche baumartig von der Basalmembran ins Lumen des Tubulus reichen. Im apikalen Bereich der Sertoli-Zellen ließ sich mit Stim1A-AK (Grün) eine punktförmige Immunreaktivität nachweisen. Detailaufnahmen dieser Region (Abb. 32b) machten sichtbar, dass die punktförmigen Strukturen je nach Schnittebene ein weniger gefärbtes Lumen aufwiesen. Diese Strukturen wurden im Gegensatz dazu nicht vom ØA-AK (rot) erkannt. Färbungen mit diesem Antikörper zeigten leichte clusterförmige Immunreaktivitäten im basalen und mittleren Teil der Zelle. Im apikalen Bereich, rund um die Köpfe der Spermien, bei welchen es sich möglicherweise um apikale ES und TCB handeln könnte, ließ sich ein prominentes Signal detektieren. Beide Antikörper erkannten außerdem Proteinspezies des generellen ERs der baumartigen Sertoli-Zellen, die im Mergebild überlagern. Die Immunreaktivität war für beide Antikörper in diesem Bereich der Zelle sowohl punktuell, als auch streifenförmig. Basale ES um Spermatogonien und Spermatozyten, wie von Lyon et al. 2017 beschrieben, konnten nicht identifiziert werden. Vergleicht man die immunhistochemischen Färbungen der WT-Maus mit denen der spleißdefizienten 10A-Maus (Abb. 32c) fällt auf, dass mit dem STIM1A-spezifischen Antikörper keine Färbung des generellen ERs der Sertoli-Zellen detektiert werden konnte. Allerdings entspricht die punktförmige apikale Immunreaktivität dem Phänotyp der WT-Maus. Da mittels Western Blot ausgeschlossen werden konnte, dass die 10A Mäuse in der Lage sind Stim1A zu exprimieren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der punktförmigen Immunreaktivität um ein unspezifisches Artefakt handelt. Auch für die Färbung mit dem ØA-AK in den spleiß-defizienten Mäusen zeigte sich ein differenzielles Bild im Vergleich zu den wildtypischen Tieren. Apikal war keine Immunreaktivität um die Spermienköpfe erkennbar. Allerdings bindet der Antikörper Stim1ØA, das als Cluster gleichmäßig über das gesamte ER verteilt vorliegt. Auch in der 10A-Maus konnten keine eindeutigen ES lokalisiert werden. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Identifikation von sowohl ES als auch TBC stark von der Schnittebene des Präparats abhängt.

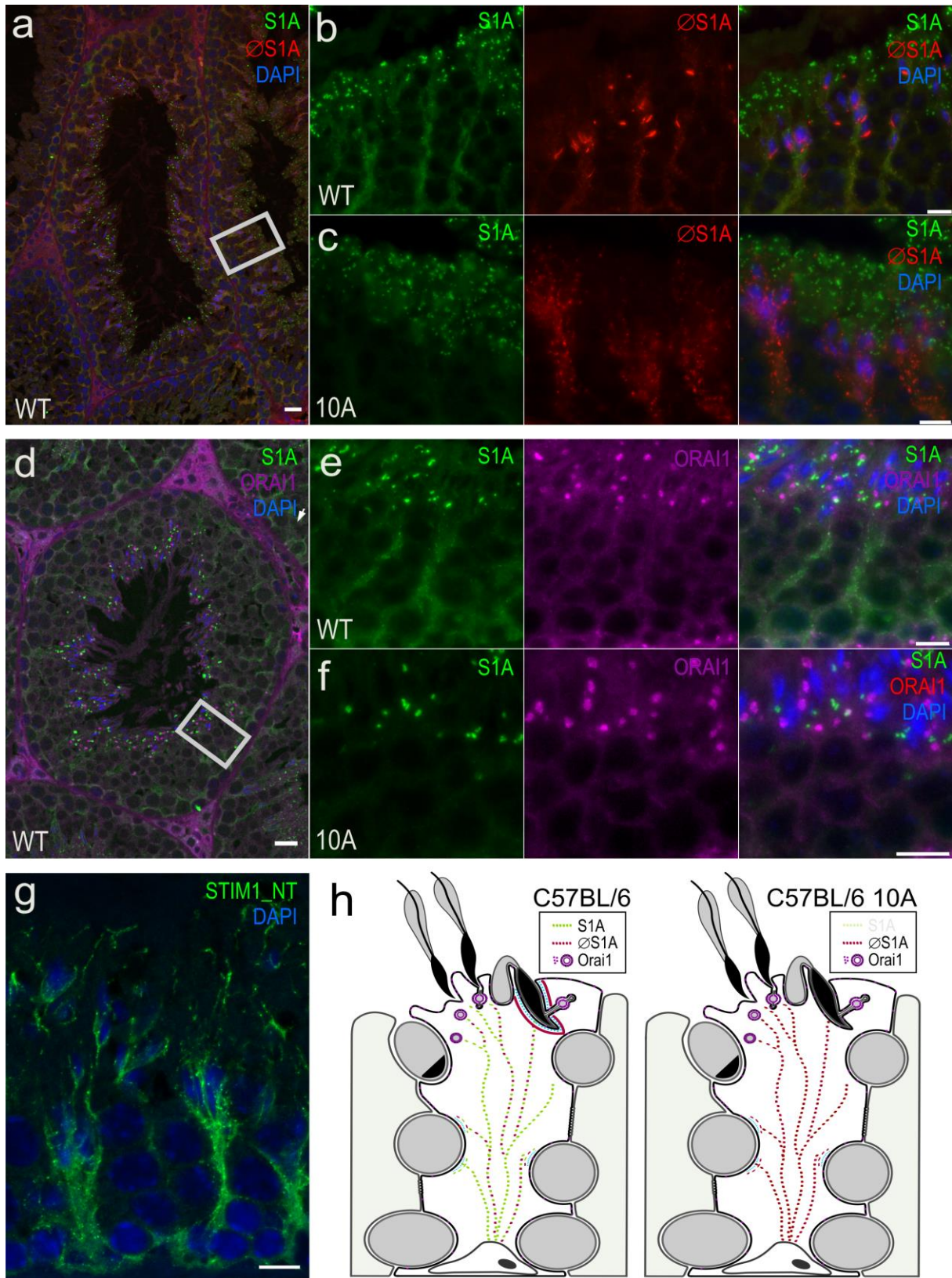


Abbildung 32 - Lokalisierung von Stim1A, ØA und Orail in murinen Sertoli-Zellen
 (a + d) Übersicht eines Querschnitts durch einen *Tubulus seminiferus* einer C57BL/6 WT Maus nach Färbung mit DAPI (blau), α -Stim1A(S1A, grün), α -ØStim1A (ØS1A, rot, (a)), α -Orail (magenta, d).
 (b) Detail Aufnahmen Sertoli-Zellen einer C57BL/6 WT Maus nach Färbung mit α -Stim1A(S1A, grün), α -ØStim1A (ØS1A, rot) und DAPI (blau). (c) Detail Aufnahmen Sertoli-Zellen einer C57BL/6 10A-Maus nach Färbung mit α -Stim1A(S1A, grün), α -ØStim1A (ØS1A, rot) und DAPI (blau). (e) Detail Aufnahmen Sertoli-Zellen einer C57BL/6 WT Maus nach Färbung mit α -Stim1A(S1A, grün), α -

Orai1 (magenta) und DAPI (blau). (f) Detail Aufnahmen Sertoli-Zellen einer C57BL/6 10A Maus nach Färbung mit α -Stim1A(S1A, grün), α -Orai1 (magenta) und DAPI (blau). (g) Detail Aufnahmen Sertoli-Zellen einer C57BL/6 WT Maus nach Färbung mit α -STIM1-N-Term, der alle C-terminalen Spleißvarianten detektiert (grün) und DAPI (blau). (h) Schematische Darstellung der Verteilung von Stim1A, \emptyset A und Orai1 in murinen Sertoli-Zellen, erstellt anhand der Daten und Farbwahl aus (a-f). Abkürzungen: S1A = STIM1A, \emptyset S1A= nicht Stim1A, WT = C57BL/6 Wildtyp, 10A = spleißdefiziente C57BL/6 10A Maus. MIP, Messbalken. Präparation der Schnitte durchgeführt von Kathrin Förderer.

Für die Lokalisierung von Stim1A konnte kein spezifischer Bereich der Sertoli-Zellen identifiziert werden, was direkte Rückschlüsse über dessen physiologische Funktion zulassen könnte. Allerdings konnte beobachtet werden, dass sich die Lokalisierung von Stim1 bei Abwesenheit von Stim1A verändert. Möglicherweise fungiert Stim1A in Sertoli-Zellen als Regulator der Calciumhomöostase in basalen Zellbereichen und wirkt als eine Art Platzhalter, um dem wildtypischen Stim1 die Regulation im apikalen Bereich während der Spermiation zu ermöglichen.

Im nächsten Schritt sollte die Lokalisierung von Orai1 in murinen Testes untersucht werden. Die Doppelfärbung eines Testis einer WT C57BL/6 Maus mit dem polyklonalen Anti-A und monoklonalen Orai1 Antikörpern ist in Abbildung 32d als Übersicht und in 32e als Detailaufnahme gezeigt. Auch in dieser Kombination zeigte sich nach Anwendung des Anti-A Antikörpers eine unspezifische punktförmige Immunreaktivität mit weniger stark reaktivem Lumen im apikalen Bereich der Sertoli-Zellen, sowie eine Färbung im generellen ER. In der Übersichtsaufnahme war auch für die Färbung mit α -Orai1 eine intensive punktförmige Fluoreszenz im apikalen Bereich des Tubulus erkennbar. In der Detailansicht wird deutlich, dass es sich hierbei um ringförmige Strukturen mit weniger intensivem Lumen handelte. Hierbei waren die Signale nach Färbung von Orai1 und Domäne A immer in räumlicher Nähe zueinander, teilweise sogar überlappend. Auffallend war, dass Orai1 nicht entlang der luminalen Plasmamembran der Sertoli-Zelle verteilt war, sondern nur abundant in einer ringförmigen Struktur vorlag. Dies spricht für eine Internalisierung der Membran als Orai1 enthaltende Vesikel. Dafür spricht ebenfalls, dass in dieser Region die Spermien sehr stark verdichtetes Chromatin aufwiesen. Dies lässt Rückschlüsse auf eine bevorstehende Freisetzung und die damit einhergehende Internalisierung der TBCs in der Sertoli-Zelle zu. Für den verwendeten Orai1-Antikörper zeigte sich außerdem eine starke Immunreaktivität der interstitiellen Leydig-Zellen, die zusammen mit Kapillaren den Raum zwischen den *Tubuli seminiferi* ausfüllen (Abb. 32d). Da in diesem Zelltyp laut der Fachliteratur kein Stim exprimiert wird (Bogdarina et al., 2004; Zheng et al., 2015 Shen 2019, Lyon 2017), bleibt die Frage nach der biologischen Relevanz der Expression nur einer SOCE-Komponente bislang

unbeantwortet. In 10A Mäusen wurde die gleiche Verteilung von Orai1, auch in der Abwesenheit von Stim1A, detektiert (Abb. 32f). Abbildung 32h fasst die immunhistochemischen Ergebnisse als schematische Darstellung der Verteilung der Stim1-Varianten, sowie Orai1 innerhalb einer Sertoli-Zelle zusammen. Abgesehen von Testes konnte in anderen Geweben mit dem STIM1A-Antikörper keine eindeutigen Färbungen von ER-Strukturen angefertigt werden.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass STIM1A *in vivo* mit STIM1 kolokalisiert. Mittels einem für Domäne A spezifischen Antikörper konnte die Lokalisierung von STIM1A in murinen Testes untersucht werden. Die Anwesenheit von STIM1A in Sertoli-Zellen bewirkt, dass STIM1 im apikalen Zellbereich um die Spermienköpfe lokalisiert vorliegt. STIM1A verteilt sich dabei gleichmäßig über der ER der gesamten Zelle. Unter STIM1A-Knock-Out-Bedingungen verändert STIM1 seine Lokalisierung und verteilt sich gleichmäßig entlang des ERs der Sertoli-Zelle.

4.4 Interaktionspartner von STIM1A

Um weitere Hinweise auf eine mögliche physiologische Funktion zu erhalten, sollte mittels Massenspektrometrie untersucht werden, ob STIM1A mit einem spezifischen Partner interagiert, oder ob durch das Einspleißen von Domäne A möglicherweise die Interaktion von STIM1 mit einem Interaktionspartner eingeschränkt, unterbunden oder gesteigert wird. Dafür wurde wie in Abbildung 33 dargestellt vorgegangen: HEK $S1/S2^{-/-}$ wurden mit *STIM*-Konstrukten mit N-terminalem HA-Tag, direkt hinter dem Signal Peptid transfiziert. Dabei handelte es sich um die 4.2.7.3 Expressionskonstrukte, die zusätzlich ein C-terminales mCherry-Tag trugen. Zusätzlich zu STIM1 und STIM1A wurde auch die Punktmutante STIM1A_D503A in die Analyse eingeschlossen, die den SOCE-Phänotyp des Wildtyps widerherstellen konnte. Falls die Calcium-Regulation abhängig von einem Interaktionspartner ist, wäre es zu erwarten, ein Protein zu finden, das entweder nur mit STIM1A, nicht aber mit STIM1 oder STIM1A_D503A interagiert oder umgekehrt. Als Negativkontrolle ohne die Anwesenheit von STIM diente pmax-*GFP*. Nach 24-stündiger Expression der Konstrukte wurden die Zellen mit 1 μ M TG stimuliert, geerntet und Lysate generiert. Die HA-getagten STIM1 Varianten wurden mittels anti-HA-Agarose aus der Probe isoliert und aufkonzentriert. Nach Elution wurden die Proben von Dr. Frederik Sommer und David Zimmer (TU Kaiserslautern, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Schroda) massenspektrometrisch

gemessen. Außerdem erfolgte extern die Zuordnung der Proteinfragmente zu einem jeweiligen Protein, sowie die statistische Auswertung.

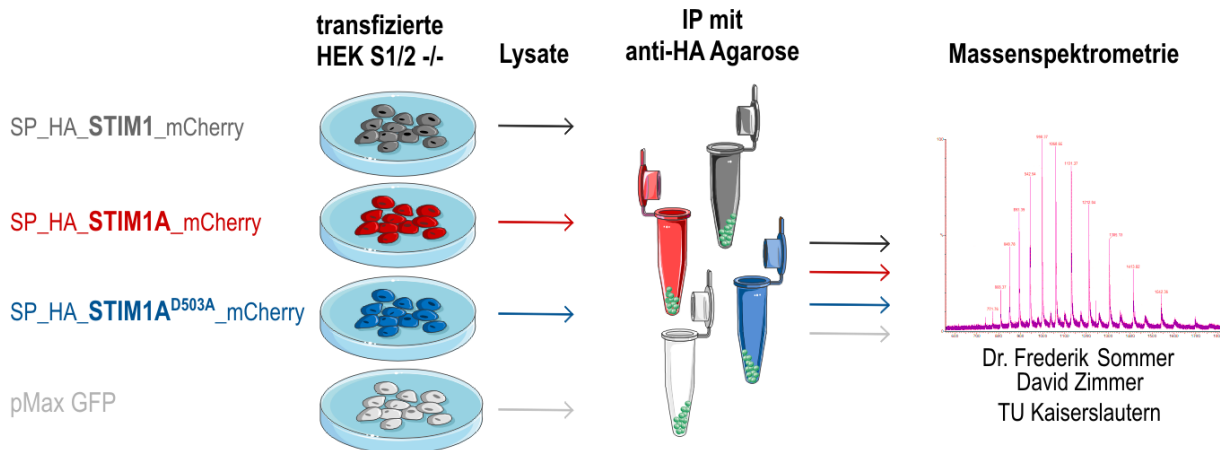


Abbildung 33 - Ablaufplan der Probenbehandlung und -gewinnung zur massenspektrometrischen Analyse

Vorlage Zellkultur und Reaktionsgefäße: adaptiert von <https://smart.servier.com>

4.4.1 Immunpräzipitation via HA-tag

Zur Immunpräzipitation von STIM1, STIM1A und STIM1A_D503A wurde eine mit monoklonalem anti-HA Antikörper gekoppelte Agarosematrix verwendet. So war es mittels Positivisolation möglich, die HA-getaggten STIMs und alle direkt an STIM gebundenen Proteine aus dem Gesamtzelllysate zu isolieren. Um den Erfolg der Immunpräzipitation überprüfen zu können, wurden bei allen wichtigen Zwischenschritten Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert. Abbildung 34 zeigt den Western Blot der Proteinlysate für einen Experimenttag vor, während und nach der Immunpräzipitation aller Bedingungen exemplarisch für eines der drei Replikate. Im Input des Experiments, also im eingesetzten Gesamtzelllysate, ließ sich mit dem STIM1 Antikörper kein Protein in der GFP transfizierten Negativkontrolle nachweisen. Dies ist ein Beleg dafür, dass die verwendete Zelllinie kein endogenes STIM1 exprimiert. Für die mit den *STIM1*-Konstrukten transfizierten Zellen ließen sich mehrere Banden unterschiedlicher Größe feststellen. Für das Konstrukt bestehend aus STIM1(A) (75,3 kDa + 3,55 kDa), C-terminalem mCherry (28.8 kDa) und N-terminalem HA-Tag (1,1 kDa) ergab sich rein rechnerisch ein Molekulargewicht von 106,9 kDa, das der Größe der schwachen obersten Bande entsprach. Vermutlich befanden sich im oberen Blotbereich Luftblasen zwischen SDS-Page und der Membran, weshalb die großen Proteine nicht vollständig auf die Membran geblottet werden konnten. Bei einem Molekulargewicht von ~75 kDa war in allen Proben eine weitere Bande zu erkennen. Bei dieser Proteinspezies

handelte es sich vermutlich um STIM1 nach Abspaltung des direkten mCherry-Tags. Bei den prominenten Banden, die kleiner als 75 kDa waren, handelte es sich ebenfalls um Degradationsprodukte aufgrund von STIM1-interner Caspase und Calpain-Schnittstellen.

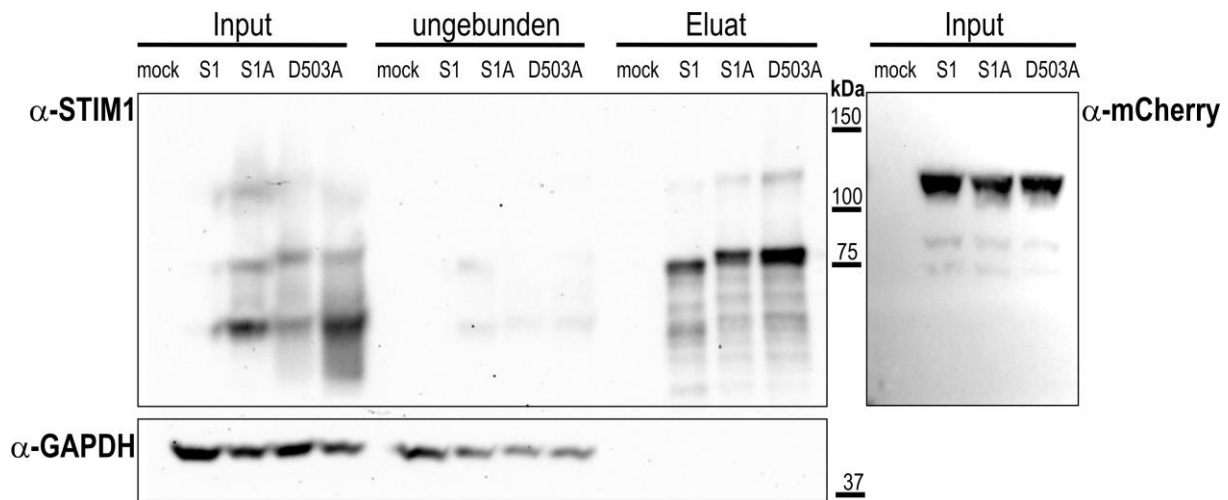


Abbildung 34 - Fraktionen der Immunpräzipitation von STIM1, STIM1A und STIM1A D503A zur anschließenden massenspektrometrischen Analyse
 Western Blot nach Immunpräzipitation von STIM1((A)D503A) mittels HA-Agarose. Zur Probengewinnung wurden *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen mit *STIM1*, *STIM1A* und *STIM1A D503A* mit *HA-Tag* hinter dem Signalpeptid transfiziert. Nach 24h wurden Lysate generiert und mittels HA-Agarose präzipitiert. Aufgetragen sind die Fraktionen Input, nicht an die HA-Agarose gebundenes Protein (ungebunden) sowie das Eluat nach Aufreinigung. Abkürzungen: S1 = STIM1, S1A = STIM1A, D503A = STIM1A D503A. Der Blot wurde mit den Antikörpern gegen STIM1 (pan-STIM N-Term), mCherry und GAPDH inkubiert. n=3

Als Inputkontrolle wurde der Blot gestrippt und erneut mit einem Antikörper gegen mCherry inkubiert. Hiernach ergab sich eine dominante Bande mit einer Größe von den erwarteten ~107 kDa. Als Ladekontrolle wurde das Haushaltsgen GAPDH gewählt. Bei einem Molekulargewicht von 36 kDa ließ sich für alle Proben die Anwesenheit von GAPDH feststellen. Anhand der Ladekontrolle ließ sich erkennen, dass gleiche Mengen an Protein für Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Eine weitere im Western Blot analysierte Fraktion war der Durchfluss. Hier ist die Proteinmenge abgebildet, die nicht an die HA-Agarose gebunden wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass nur wenig vom STIM1 Antikörper detektiertes Protein visualisiert werden konnte. Der Hauptteil des überexprimierten Proteins wurde demnach an die HA-Agarose gebunden. Sichtbar sind auf diesem Blotabschnitt für alle Bedingungen schwache Banden mit dem molekularen Gewicht von ~60 kDa sowie noch schwächere Banden bei ~75 kDa. Außerdem befindet sich die Gesamtmenge des Haushaltproteins GAPDH in dieser Fraktion, da es ohne HA-Tag nicht durch die HA-Agarose gebunden werden konnte. Die letzte Probenfraktion, die mittels Western Blot überprüft wurde, war das Eluat. Dabei wurden die Proteine mittels pH Sprung unter Kochen

von der HA-Agarose gelöst. In dieser Fraktion befanden sich demnach nur STIM1(A(D503A)) sowie STIM1(A(D503A))-assoziierte Proteine. Deshalb konnte auf diesem Blotabschnitt kein GAPDH nachgewiesen werden. Hier ließ sich eine prominente Proteinspezies bei 75 kDa erkennen, was der Größe von STIM1(A(D503A)) ohne mCherry-Tag entsprach. Es ist möglich, dass die Größe des mCherry-Tags sich störend auf die Interaktion von HA-Tag und Antikörper auswirkte und deshalb nur STIM1(A(D503A)) binden konnte, bei welchem das mCherry-Tag zuvor abgespalten wurde. Bei diesen Proteinfractionen waren deutlich mehr Degradationsprodukte zu erkennen. Das ist vermutlich auf die experimentelle Durchführung zurückzuführen, da nicht alle Schritte auf Eis oder bei 4°C durchgeführt werden konnten.

4.4.2 Massenspektrometrische Analyse und Kandidatenauswahl

Nachdem die Proben massenspektrometrisch gemessen und analysiert wurden, ergaben sich 213 potentielle Kandidaten (=Hits). Aus diesen Kandidaten wurden 25 aufgrund folgender Kriterien ausgewählt (Tabelle 23 und 24).

- CRAPome

Die Datenbank CRAPome (www.crapome.org) ermöglicht es, mutmaßliche Hits von Hintergrund-kontaminationen zu unterscheiden, also von Proteinen, die nicht spezifisch interagieren, aber trotzdem sehr häufig in der Analyse von massenspektrometrischen Daten zu finden sind. Dazu zählen zum Beispiel Proteine, die mit dem Affinitätsreagenz oder dem Epitop-Tag interagieren. In der Datenbank sind 411 unabhängige Analysen hinterlegt, die so erlauben, als ergänzendes Tool zur experimentellen Negativkontrolle die Abundanz von Proteinen und Proteinfragmenten einzuschätzen. Hits mit einem Wert über 40/411, die also häufiger als in 10% der in der Datenbank hinterlegten Proteine vorliegen, wurden für die weitere Auswahl als potentieller Interaktionspartner ausgeschlossen. So konnte die Zahl der Hits auf 58 reduziert werden.

- Wurde das Protein auch in der Negativkontrolle gefunden?

Als Negativkontrolle diente die Transfektion mit einem GFP-Expressionsvektor. Diese Kontrolle wurde gewählt, um alle unspezifisch an die HA-Agarose gebundenen Proteine sowie etwaige Verunreinigungen (z. B. der Reagenzien) aus der Analyse zu eliminieren. Die Daten wurden aus 3 technischen Replikaten generiert (Tabelle 23, Spalte in NK). Je weniger häufig ein Hit auch in der Negativkontrolle gefunden wurde (in Tabelle = 1), desto eher kommt er als Interaktionspartner in Frage. Allerdings reichte die Aussagekraft

dieses Kriteriums nicht aus, um Kandidaten absolut von der weiteren Analyse auszuschließen. Das wurde durch die Tatsache begründet, dass wir von unserem Kooperationspartner nur die Information erhielten, dass ein Hit ebenfalls in der NK vorlag, nicht aber den zugehörigen LFQ Wert (*engl. label free quantification*, siehe nächster Abschnitt). Deshalb sind in Tabelle 23 auch potentielle Kandidaten gelistet, die zwei oder drei Mal ebenfalls in der Negativkontrolle gefunden wurden.

- LFQ-Mittelwert

Der LFQ Wert ist eine einheitslose Maßzahl für die im Massenspektrometer gemessenen Proteinsignale. Je höher dieser Wert ist, desto häufiger wurden Proteinformen in der Massenspektrometrie ermittelt, die einem spezifischen Protein zugeordnet werden konnten. Tabelle 23 zeigt für die 25 final ausgewählten Kandidaten den Mittelwert der drei technischen Replikate der analysierten Bedingungen STIM1, STIM1A und STIM1AD503A. Die LFQ-Werte der unterschiedlichen Bedingungen sind pro Hit mit einer Farbkodierung hinterlegt. Dabei steht eine intensive Grünfärbung für einen hohen LFQ-Wert, um Unterschiede besser zu differenzieren können. Auf der Suche nach einem spleißspezifischen Interaktionspartner der entweder nur mit STIM1A aber nicht mit STIM1 oder STIM1A D503A interagiert oder umgekehrt, wurde bei den ausgewählten Kandidaten darauf geachtet, dass sich die LFQ Werte vor allem zwischen STIM1 und STIM1A unterscheiden.

- P-Wert

Aus den Anforderungen an die LFQ-Werte ergab sich ein weiteres Kriterium. Um zu klären, ob sich die LFQ Werte STIM1, STIM1A und STIM1A D503A signifikant unterscheiden, wurde eine Varianzanalyse in Form eines ANOVA-Tests mit den jeweiligen Post-Hoc Tests durchgeführt. Nur 8 der 25 ausgewählten potentiellen Kandidaten erfüllten das Kriterium von signifikant unterschiedlichen LFQ-Werten. Auch der P-Wert stellte kein absolutes Auswahlkriterium dar, wenn die anderen Parameter erfüllt waren.

- BioGPS

Neben den mathematischen Parametern wurden zusätzlich Informationen über die gewebsspezifische Expressionsprofile der potentiellen Kandidaten mittels der Datenbank BioGPS analysiert. Dazu wurde zum einen Gene Atlas U133A verwendet, der die mRNA Expression von 176 humanen Proben beinhaltet (pubmed 15075390). Zum anderen wurden die unter NCI60 zusammengefassten mRNA Expressionsprofile von 93 humanen Krebszelllinien auf die Abundanz der potentiellen Interaktionspartner analysiert. Relevant

waren dabei vor allem Gewebe und sowie Zelllinien aus Geweben, für die in 4.1.2 eine hohe Expression der Spleißvariante STIM1A gezeigt werden konnte. Dafür wurde kein Schwellenwert festgelegt, sondern vergleichend die Gewebe und Zelllinien mit besonders hohen Werten notiert (Tabelle 24, exemplarisch)

- Lokalisierung in der Zelle

Neben der Expression wurden Informationen über die Lokalisierung des potentiellen Interaktionspartner in der Zelle gesammelt, falls bekannt, und in der Datenbank UniProt (*engl. Universal Protein Resource*) hinterlegt. Um die Analyse besser vergleichen zu können, wurden den Zellkompartimenten Werte von 1-5 zugeordnet, wobei 5 bedeutet, dass die Lokalisierung in diesem Kompartiment sehr wahrscheinlich ist (Tabelle 24, exemplarisch).

- Bekannte Funktion

Zusätzlich zur Lokalisierung wurden die Hits bezüglich bekannter Funktionen untersucht. Dazu wurde ebenfalls auf die Datenbank UniProt zurückgegriffen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf gewebsspezifische oder Ca^{2+} -assoziierte Funktionen. Dieses Kriterium floss allerdings am wenigsten stark in die Bewertung ein, da bekannt ist, dass STIM neben seiner Funktion als Calciumsensor ebenfalls in andere Stoffwechselwege involviert ist, wie z. B. den SOcAMPS Signalweg, durch welchen STIM1 die Aktivierung von Adenylatcyclasen triggert (Poth & Knapp et al., 2020).

Die erhaltenen 213 potentiellen Interaktionspartner konnten nach der durchgeführten CRAPome Analyse auf 58 Kandidaten reduziert werden. Anschließend wurden sie anhand aller genannten Kriterien analysiert. Wie stark welches Kriterium gewichtet wurde, wurde von Hit zu Hit individuell entschieden, um keinen Kandidaten voreilig auszuschließen. Nach der Auswertung aller Parameter ergab sich eine Liste von 25 erfolgsversprechenden potentiellen spleißspezifischen Interaktionspartner (Tabelle 23 und 24), mit welchen weiterführende Analysen durchgeführt werden sollten.

Tabelle 23 - Potentielle Interaktionspartner, identifiziert via Massenspektrometrie

Protein Name	Gen Name	CRAPome X/411	in NK 1 = in allen Proben	Anova P-Wert	LFQ MUT	LFQ S1A	LFQ S1
Uncharakterisiertes Protein KIAA2026	KIAA2026	0	0,3	0,000	362	937	62328
Lipoxygenase homology domain-containing Protein 1	LOXHD1	1	1	0,000	391	451	5982
NADH-Zytochrome b5 Reduktase 3	CYB5R3	25	0,6	0,002	569	421	167
Fibulin-1	FBLN1	3	0,6	0,012	1959	1392	19285
cAMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase 8B	PDE8B	0	0,3	0,024	6418	7064	37627
Transmembranprotein 263	TMEM263	12	0	0,034	1832	1945	5373
Superoxiddismutase [Cu-Zn]	SOD1	31	1	0,038	272	458	2047
Synaptotagmin-2	SYT2	0	1	0,046	4240	5028	18037
EGF-containing fibulin-like extrazelluläres Matrixprotein 1	EFEMP1	2	1	0,061	229	273	855
GTPase IMAP Familienmitglied 2	GIMAP2	0	1	0,095	2163	1550	1803
Protein-Glutamine Gamma-Glutamyltransferase K	TGM1	34	1	0,153	362	510	288
Interferon-induziertes Guanylat-Bindeprotein 1	GBP1	0	0,6	0,193	332	16827	28910
F-box-only Protein 6	FBXO6	0	0,6	0,244	554	498	770
Shroom3	SHROOM3	15	0,6	0,384	6554	11571	29256
DNA-Polymerase beta	POLB	0	0,6	0,474	14053	59842	221687
Pro low-density Lipoproteinrezeptor-related Protein 1	LRP1	6	1	0,529	303	465	1855
Low-density Lipoproteinrezeptor	LDLR	4	1	0,623	391	362	481
Serpin B7	SERPINB7	2	0,6	0,635	175	259	199
Aryl-Hydrocarbon Rezeptorrepressor	AHRR	2	1	0,660	406	288	273
Flotillin-1	FLOT1	16	0	0,714	10310	19822	8089
BAG Familie molekularer Chaperonregulator 3	BAG3	27	0,6	0,714	421	288	377
Sorting nexin-1	SNX1	31	0,6	0,778	324	408	406
Plakophilin-1	PKP1	34	0,6	0,812	362	436	347
Rab-ähnliches Protein 3	RABL3	5	0,6	0,909	447	421	436
Calmegin	CLGN	0	1	0,926	405	347	391

Tabelle 24 - Bekannte Expression und Lokalisierung potentieller Interaktionspartner nach Analyse der massenspektrometrischen Daten

Gen Name	Expression	Lokalisierung (inklusive Rating 1-5)
KIAA2026	Nicht bekannt	Nicht bekannt
LOXHD1	Testis, Gametozyten, Spermatozyten	Zytosol 3, Nukleus 1
CYB5R3	Adipozyten, Lunge, Herz, U138 (Astrozytoma), GM2493,	ER 5, Mitochondrien 5, Extrazellulär 4, Zytosol 4,
FBLN1	Osteroblasten, SNB19 (Astrozytoma), Plazenta, Hs578T (Brust)	Extrazellulär 5, Zytosol 2
PDE8B	Oozyten, HeLa, Speicheldrüse	Zytosol 5
TMEM263	Astrozyten, Endometriales Epithel, Mesenchymale Stammzellen, Chorion villi	-
SOD1	Leber, Hepatozyten,	Extrazellulär 5, Mitochondrien 5, Zytosol 5, Nukleus 5
SYT2	Pedunculi cerebri, LNCAP (Prostatakarzinom), Gametozyten, Oozyten	PM 4, Zytosol 3
EFEMP1	Herzmuskelzellen, SNB19 (Astrozytoma), SN12C (Nierenkarzinom), NCI H226 (Epithelmesotheliom)	Extrazellulär 5, ER 1
GIMAP2	Immunzellen, Blutplättchen, Lymphknoten	ER 3, PM 3
TGM1	Zunge, Mandel, CCRF CEM (Leukämie), Kerationozyten, Mukosa, Epithel	PM 5, Zytosol 5, Nukleus 3
GBP1	Blut, Makrophagen, GM2313, GM97 (Fibroblasten)	Extracell5, Zytosol 5, Golgi5, Pm3, Er1
FBXO6	Monozyten, Aveloare Makrophagen, kultivierte endotheliale Vorläuferzellen, bronchiale Epithelzellen	Zytosol 4, ER 3, Nukleus 2
SHROOM3	Astrozyten, Epithel, Brust, Darm, Esophagus	Zytoskelett 4, Nukleus 4, PM3, Zytosol 3
POLB	Testis, Gametozyten, Spermatozyten, Leydig-Zellen, Cerebellum, SKMEL28	Zytoskelett 5, Nukleus 5, Zytosol 4, PM3,
LRP1	Adipozyten, Retina, U118(Astrozytoma), U138(Astrozytoma), SNB75, Astrozyten	PM5, Nukleus 5, Endosome4, Extracell3, ER2
LDLR	CCRT CEM(Leukämie), GM97(Fibroblasten), Speichel, Gyrus	PM5, Endosom5, Lysosom5, Golgi-Apparat 5
SERPINB7	Pankreas, Bronchiales Epithel, SF268 (Astrozytoma), Haut, Keratinozyten	Extra3, Zytosol 2, ER1
AHRR	Astrozyten, Endometriepithelzellen	Nukleus 4, Zytosol 4
FLOT1	Leber, Neurophilzellen	PM5, Endosom5, Zytoskelett 4,
BAG3	Herz, Bronchiales Epithel, Skelettmuskel, MCF7(Brustkrebs)	PM5, Nukleus 5, Zytosol 5, Zytoskelett 3,
SNX1	Rückenmark, Schilddrüse, CD ⁴⁺ , HT1080(Fibrosarcom), LN18(Glioblastom)	Endosom 5, Zytosol 4, Lysosom 4, Golgi-Apparat 4,
PKP1	Keratinozyten	Nukleus 5, PM4, Zytoskelett 4,
RABL3	HCT15 (Darmkrebs), U87(Astrozytom),	Nukleus 3, Zytosol 2
CLGN	LN18 (Glioblastom), U118 + U87(Astrozytom), Astrozyten, Testis, Prostata, Herz, Eileiter	ER 5, Nukleus 2

4.4.3 Bimolekularer Fluoreszenzkomplementations-Assay

Bei der Protein-Interaktionsanalyse mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation werden sowohl das Protein von Interesse (*protein of interest*, POI) als auch der potentielle Interaktionspartner mit je einer Hälfte eines Fluoreszenzproteins fusioniert. Befinden sich nach Ko-Überexpression das POI und der Interaktionspartner und somit auch die beiden Fluorophorhälften in räumlicher Nähe, kommt es zur Assemblierung eines funktionellen Fluoreszenzproteins. Dieser Assay sollte im Zuge dieser Arbeit genutzt werden, um die durch Massenspektrometrie identifizierten potentiellen Interaktionspartner auf eine tatsächliche direkte Interaktion mit STIM1 oder STIM1A hin zu überprüfen, ohne eine aufwendige und kostenintensive Ko-Immunopräzipitation aller Kandidaten durchführen zu müssen. Außerdem sollte so ebenfalls eine mögliche differenzielle Interaktion eines spleißspezifischen Interaktionspartners überprüft werden. Eine Auswahl der Kandidaten wurde bei der Plasmid-Datenbank DNASU (<https://dnasu.org/>) käuflich erworben und mittels Gateway-Klonierung in Expressionsvektoren eingebracht, um die Methode im Labor zu etablieren. Jeder Kandidat (im Folgenden als Beute bezeichnet; $POI\text{-}YFP_N$) wurde in Kombination mit $STIM1$ oder $STIM1A$ (im Folgenden als Jäger bezeichnet; $STIM1(A)\text{-}YFP_C$) in $HEK\ S1/2^{-/-}$ koexprimiert. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion und nach TG-induzierter Aktivierung des SOCE mittels Durchflusszytometrie auf YFP-positive Zellen (YFP^+) untersucht. Abbildung 35a zeigt die FACS-Daten, geordnet nach absteigender Interaktion mit STIM1. Als Negativkontrolle diente der Jäger, je in Kombination mit einem Beute-Konstrukt ohne POI ($STIM1(A)\text{-}YFP_C + noPOI\text{-}YFP_N$). Als Positivkontrolle wurden die Jäger in Kombination mit STIM1 als Beute exprimiert ($STIM1(A)\text{-}YFP_C + STIM1\text{-}YFP_N$). Demnach lag die maximale Interaktionsrate von $60,35 \pm 6,4\%$ (STIM1) bzw. $56,6 \pm 4,5\%$ (STIM1A). EFEMP1, Fibulin1 und LRP1 konnten als STIM1-Interaktionspartner ausgeschlossen werden. Die stärkste Interaktion mit sowohl STIM1, als auch STIM1A zeigten Synaptotagmin 2 ($53,4 \pm 8,9\%$ STIM1, $50,0 \pm 8,8\%$ STIM1A) und STIM2 ($41,6 \pm 2,8\%$ STIM1, $38,1 \pm 2,8\%$ STIM1A). Die zweite Gruppe mit moderater Interaktion von 35-25% YFP^+ Zellen bildeten Flotilin und Shroom3 und Spastin. Die Gruppe mit geringer Interaktion mit 20-15% YFP^+ Zellen wurde durch PDE8B und SOD1 gebildet. Konstrukte deren Werte $<25\%$ der maximalen Interaktion lagen ($=15,08\%$), wurden für weitere Interaktionsanalysen nicht in Betracht gezogen. Die Festlegung dieses Schwellenwerts erfolgte subjektiv. Unter allen

getesteten Kandidaten wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der neuen Spleißvariante STIM1A und des wildtypischen Proteins gefunden.

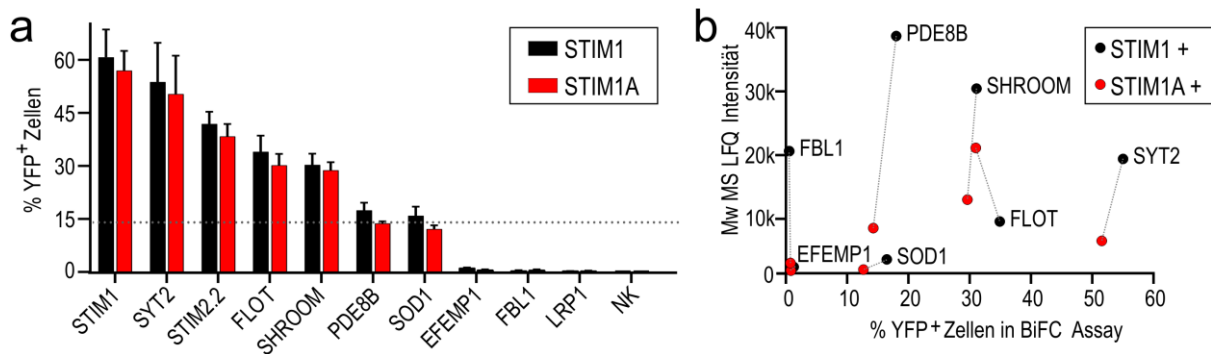


Abbildung 235 – Verifizierung neuer Interaktionspartner von STIM1 und STIM1A via BiFC-Assay

(a) Durchflusszytometrisch bestimmte YFP-positive *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen (YFP⁺) 24h nach Transfektion mit BiFC-Konstrukte. Als Jägerkonstrukte wurden *STIM1-YFP_C* (schwarz) oder *STIM1A-YFP_C* (rot) in Kombination mit den Beutekonstrukten *POI-YFP_N* eingesetzt. (n = 3-4). Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung abgebildet. (b) Prozentsatz der YFP-positiven Zellen nach Transfektion mit STIM1 (schwarz) bzw STIM1A (rot) aus (a) dargestellt in Relation zur mittleren LQF-Intensität aus der massenspektrometrischen Analyse (Tabelle 8).

In einem weiteren Analyseschritt wurden die Korrelation der BiFC- und massenspektrometrischen Daten überprüft (Abb. 35b). Dafür wurden der Prozentsatz YFP⁺ gegen die logarithmische mittlere LFQ Intensität graphisch aufgetragen (Abb. 35b). Je weiter die Kandidaten in Richtung der rechten oberen Ecke liegen, desto stärker ist die Interaktion mit STIM1(A). Anhand dieser Grafik ließen sich Synaptotagmin 2, Flotilin 1 und Shroom als vielversprechende Kandidaten bestätigen. Außerdem konnte mit der cAMP-spezifischen 3,5-cyclischen Phosphodiesterase 8B (PDE8B) ein Protein identifiziert werden, welches sowohl in der Massenspektrometrie, als auch im BiFC Assay eine deutlich geringere Interaktion mit der neuen Spleißvariante zeigte. Generell wird durch diese Darstellung deutlich, dass differenzielle Interaktion der getesteten Kandidaten mit STIM1 und STIM1A mittels MS besser detektiert werden kann, da die Werte stärker auf der Y-Achse abweichen, als auf der X-Achse.

4.4.4 Immunpräzipitation von STIM1(A) und der PDE8B

Die Proteinfamilie der Phosphodiesterasen (PDE) katalysieren den enzymatischen Abbau der sekundären Botenstoffen cAMP zu AMP sowie cGMP zu GMP. Da die Regulation von cAMP für die in 4.5 untersuchten SOCE-induzierte NFAT-Translokation von Relevanz sein könnte, sollte die direkte Interaktion von STIM1(A) und der cAMP-spezifischen PDE8B, zusätzlich zur massenspektrometrischen Analyse und zum BiFC Assay, mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Dabei sollte ebenfalls eine spleißspezifisch

diskrepante Interaktion mit der PDE8B untersucht werden. Dafür wurden sowohl die gleichen Zellen wie auch die gleichen STIM1-Konstrukte, wie schon für die Massenspektrometrie eingesetzt: *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen wurden mit STIM1(A) mit N-terminalem HA Tag sowie mCherry am C-Terminus transfiziert. Gleichzeitig wurde das im BiFC verwendete PDE8B-YFP_N kotransfiziert. Mittels anti-HA Agarose wurden STIM1(A) und deren Interaktionspartner aus dem Gesamtzelllysat präzipitiert. Wie in 4.4.1 wurden Input, ungebundenes Protein sowie Eluat mittels Western Blot analysiert (Abb. 36).

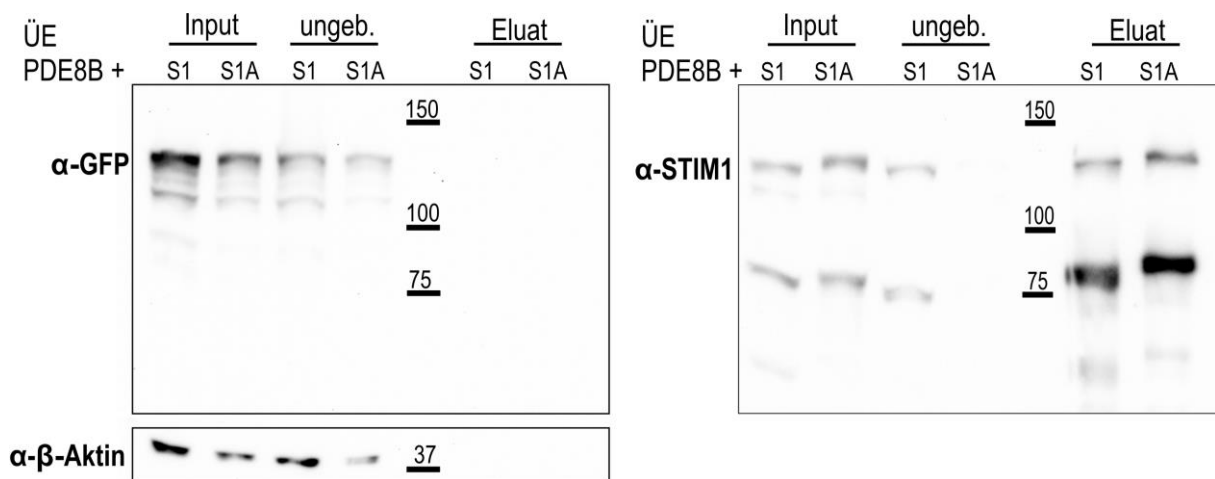


Abbildung 246 - Immunpräzipitation der PDE8B durch STIM1 und STIM1A
 Western Blot nach Immunpräzipitation von STIM1(A) und gebundener PDE8B mittels HA-Agarose. Zur Probengewinnung wurden *HEK S1/2^{-/-}*-Zellen mit *STIM1* oder *STIM1A* mit *HA-Tag* hinter dem Signalpeptid in Kombination mit der PDE8B- YFP_N transfiziert. Nach 24h wurden Lysate generiert und STIM1(A) mittels HA-Agarose präzipitiert. Aufgetragen sind die Fraktionen Input, nicht an die HA-Agarose gebundenes Protein sowie das Eluat nach Aufreinigung. Abkürzungen: S1 = STIM1, S1A = STIM1A. Der Blot wurde mit den Antikörpern gegen STIM1 (pan-STIM, N-Term) und β -Aktin inkubiert. Es wurde ein α -GFP Antikörper verwendet, der den N-terminalen Teil von YFP erkennt. Abkürzungen: ÜE = Überexpression, ungeb. = ungebunden n = 2

Im ersten Schritt wurde der Blot mit einem YFP-Antikörper inkubiert, welcher den N-terminalen Teil von YFP bindet und somit das 113,8 kDa schwere Fusionsprotein PDE8B-YFP_N erkennen kann. Im Input ließ sich das Fusionsprotein in beiden Koexpressionsbedingungen erkennen. Allerdings befand sich die Bande leicht höher als die errechneten 113,8 kDa. Die Bandenintensität des Inputs bestätigt die Funktionalität des verwendeten Antikörpers zur Detektion von YFP_N. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Anhand der Bandenintensität der STIM1A Fraktion ist davon auszugehen, dass weniger Gesamtprotein für den Blot eingesetzt wurde. In der ungebundenen Fraktion konnte PDE8B-YFP_N ebenfalls detektiert werden. Auch hier war die Bande der Ladekontrolle für STIM1A weniger stark, was dafür spricht, dass auch in die Immunpräzipitation weniger

Gesamtprotein eingesetzt wurde. Im Eluat wurde allerdings kein GFP-Signal (PDE8B) detektiert. Im zweiten Schritt sollte geklärt werden, ob eine fehlgeschlagene Elution Grund für das fehlende Signal war. Dafür wurde der Blot gestrippt und mit einem pan-STIM1 Antikörper reinkubiert. Das doppeltgetaggte STIM1-Konstrukt hat ein Molekulargewicht von 106,8 kDa. STIM1A-mCherry ist 3,5 kDa schwerer. Sowohl im Input, der ungebundenen Fraktion als auch für das Eluat ließen sich STIM1 bzw. STIM1A nachweisen. Auffallend im Eluat war, dass die dominante Proteinspezies STIM1(A) nach Abspaltung von mCherry ist (etwa 77 bzw. 80 kDa), was schon bei der IP auftrat (siehe 4.4.1). Ebenfalls interessant ist, dass STIM1A im Eluat stärker abundant ist als STIM1. Dies würde bedeuten, dass HA-STIM1A-mCherry besser von der HA-Agarose gebunden wird. Dafür spricht auch, dass in der ungebundenen Fraktion STIM1A nur schwach erkennbar ist. Dieser Befund könnte allerdings auch auf die Expressionsstärke von STIM1A zurückgeführt werden, da sich in der Inputfraktion eine größere Proteinmenge von STIM1A als von STIM1 befindet.

Der Versuch wurde zweimal wiederholt. Allerdings konnte in keinem der Co-IP Experimente im Eluat PDE8B-YFP_N nachgewiesen werden im Gegensatz zu den starken Signalen aus der Massenspektroskopie. Eine mögliche Erklärung könnte eine transiente und nicht stabile Interaktion von STIM1(A) und der PDE8B sein, oder die Möglichkeit, dass der C-terminale halbe EYFP Tag von PDE8B die Interaktion reduziert. Außerdem kann es sein, dass die verwendeten Detergenzien in IP-Lyse- und Waschpuffer zu harsch waren und möglicherweise eine Interaktion gelöst haben (siehe Diskussion, Kapitel 5.4).

Mittels massenspektrometischen Analyse konnten mehrere potentielle Interaktionspartner von STIM1A und STIM1 identifiziert werden. Trotz kleinerer Abweichungen der LFQ-Werte des Massenspektrometrie und der Interaktion im BiFC Assay von STIM1A und STIM1 mit den Kandidaten, wurde kein eindeutiger Spleißvarianten-spezifischer Interaktionspartner gefunden. Die PDE8B konnte in einer Ko-IP weder in Kombination mit STIM1A noch mit STIM1 angereicherter werden.

4.5. Regulation der NFAT-Translokation

Calcium ist für die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT von großer Relevanz: Ausschlaggebend ist der Proteinkomplex um das Ankerprotein AKAP79. Das

Plasmamembran-assoziierte Protein Ankerprotein AKAP79 (*engl. A-kinase-anchoring protein*) ist in der Lage, multiple Protein-Protein Interaktionen zu bilden. Im Komplex um AKAP79 befinden sich die Phosphatase Calcineurin (CaN) und das Calcium-Sensorprotein Calmodulin (CaM) (Patel et al., 2017). Nach Aktivierung von CaM durch die Bindung von Ca^{2+} bindet CaM an die regulatorische Domäne von CaN. Die dadurch induzierte Konformationsänderung verdrängt die autoinhibitorische Domäne aus dem aktiven Zentrum von CaN und induziert die Aktivierung der Phosphatase, woraufhin NFAT durch CaN dephosphoryliert werden kann (Rumi-Masante et al., 2012). Außerdem dient AKAP79 als Anker-Protein für die Proteinkinase A (PKA). Im Komplex mit CaM, CaN und der PKA kann AKAP79 selektiv die Phosphorylierungsreaktion der PKA beeinflussen (Wong & Scott, 2004). PKA- und CaN-Aktivität sind demnach gegensätzliche Mechanismen, welche den Phosphorylierungsgrad von NFAT beeinflussen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass AKAP79 mit dem N-Term von Orail interagiert, was den lokalen Calciumeinstrom direkt an die Signalkaskade der Dephosphorylierung von NFAT koppelt (Kar et al., 2014). Des Weiteren verwendeten sie ein verkürztes STIM1 Konstrukt ohne C-terminale polybasische Domäne (ohne Aminosäuren 672 bis 685), welche weniger NFAT-Translokation in den Nukleus triggerte. Es sollte untersucht werden, ob sich die zusätzliche Domäne A auf die Translokation von NFAT auswirkt.

4.5.1 STIM1A steigert die Translokation NFAT in den Nukleus

Zur Untersuchung der Auswirkung der beiden Proteinvarianten auf die NFAT-Translokation wurden SH-SY5Y $\text{S1}^{-/-}$ -Zellen mit endogener STIM2-Expression transient transfiziert. Die parallel exprimierten Konstrukte waren *NFAT* mit direktem *GFP* Tag sowie die humanen *STIM1(A/D503A)* als *IRE5 mCherry* Konstrukte. Der SOCE und die damit verbundene NFAT-Translokation wurden mittels TG induziert. Daraufhin wurden alle 5 Minuten die Floreszenzen bei 60x-Vergrößerung aufgenommen. Die Auswertung erfolgte als GFP-Durchschnittsintensität im Nukleus, geteilt durch die GFP-Durchschnittsintensität im Zytosol. Um die Translokation der unterschiedlichen Bedingungen besser vergleichen können, wurden die Zellen auf den jeweiligen ersten Messpunkt normiert. Abbildung 37 zeigt die NFAT-Translokation sowohl als Kurve, welche die einzelnen Messpunkte abbildet (Abb. 37a), als auch den Endpunkt der Messung nach 30 min (Abb. 37b).

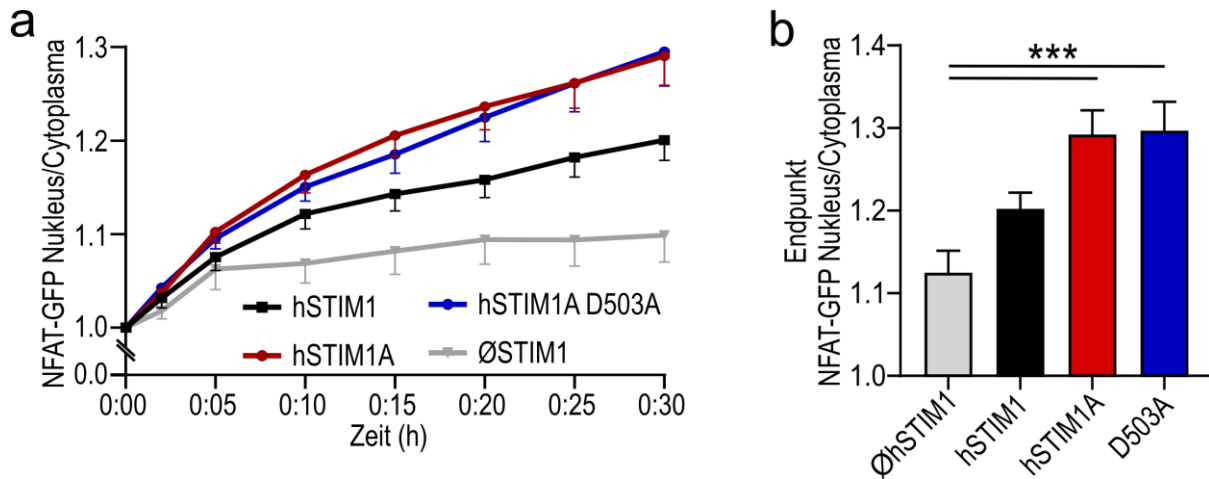


Abbildung 37 - STIM1A steigert die Translokation NFAT in den Nucleus
 (a) NFAT-GFP Signal im Nucleus vs. NFAT-GFP Signal im Zytosol während einer Messung über 30 Minuten. Dafür wurden SH-SY5Y $S1^{-/-}$ -Zellen 24h vor der Messung mit *STIM1* (n = 42), *STIM1A* (n = 82), *STIM1A D503A* (n = 49) als *IRE5 mCherry* Konstrukte oder einem Levektor (n = 15) in Kombination mit *NFAT-GFP* transfiziert und zur Induktion des SOCE mit 1 μ M Thapsigargin zum Start der Messung (t = 0:00) stimuliert. (b) Endpunktsignal aus (a) als Mittelwert \pm SD. Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen.

In der Kontrollbedingung (grau) stieg das GFP-Signal im Kern bis zu Minute 5 an und stagnierte dort. Dass auch ohne Expression von STIM1 NFAT in den Kern translozierte lässt sich darauf zurückführen, dass in SH-SY5Y $S1^{-/-}$ -Zellen SOCE weiterhin über endogenes STIM2 vermittelt werden kann. Durch die Expression von STIM1 (schwarz) war die Translokation von 1,12 \pm 0,02 RE (no STIM Kontrolle) auf 1,2 \pm 0,02 RE erhöht. Überraschenderweise war dieser Effekt sogar noch deutlicher bei STIM1A (rot) vermitteltem SOCE (1,29 \pm 0,03 RE). Die Punktmutante von STIM1A (blau), welche sich im Calciumprofil wie STIM1 verhält, zeigte im NFAT Assay den gleichen Phänotyp, wie STIM1A ohne Mutation (1,29 \pm 0,04 RE). Die Werte dieser Messungen unterschieden sich trotz deutlicher Tendenz nicht signifikant. Es kann dennoch geschlossen werden, dass STIM1A die Translokation von NFAT begünstigt und dadurch beschleunigt.

4.5.2 Inhibition der PDE8B erhöht die STIM1-induzierte NFAT-Translokation

Da die Proteomanalyse eine differentielle Interaktion mit PDE8B vorhersagt, sollte als erste Hypothese überprüft werden, ob die Inhibition der PDE8B die SOCE-vermittelte NFAT-Translokation reprimiert. In den Interaktionsanalysen zeigte die PDE8B eine stärkere Interaktion mit dem wildtypischen STIM1 als mit der neuen Spleißvariante STIM1A. Daher war die zweite Hypothese, dass die Inhibition der PDE8B sich stärker auf die NFAT-

Translokation nach STIM1-Expression auswirken würde als auf die Translokation nach Expression von STIM1A. Wie in 4.5.1 wurden SH-SY5Y $S1^{-/-}$ mit *NFAT-GFP* und *STIM1(A(D503A))-IRES-mCherry* kotransfiziert. Die Zellen wurden 2 h vor Beginn der jeweiligen Messung mit 1 μ M PF-04957325 vorinkubiert (Vang et al., 2016). Auch während der Messung befand sich der Inhibitor im Messpuffer. Abbildung 38a und b zeigen die Daten aus 4.5.1, ergänzt mit den Messungen mit PF-04957325.

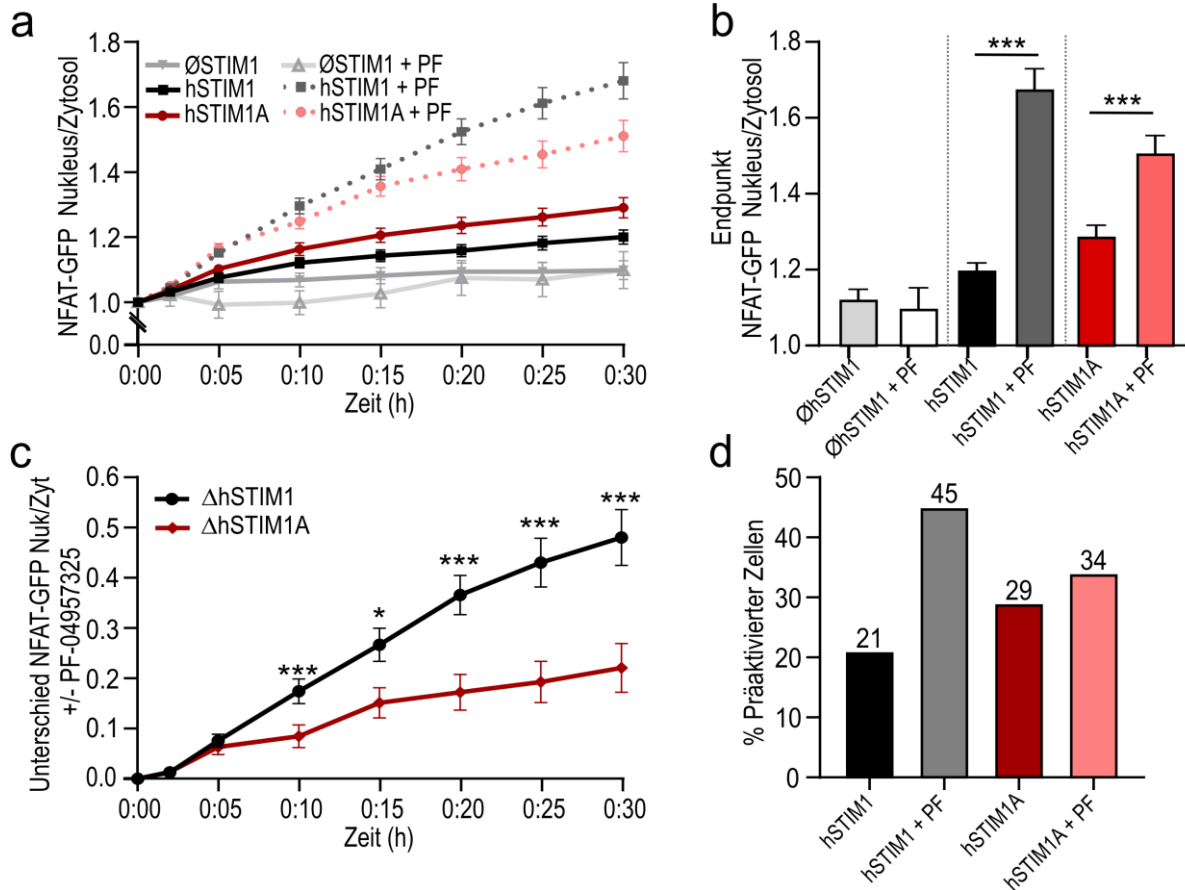


Abbildung 38 – STIM1A steigert die Translokation NFAT in den Nukleus

(a) NFAT-GFP Signal im Nukleus vs. NFAT-GFP Signal im Zytosol während einer Messung über 30 Minuten. Dafür wurden SH-SY5Y $S1^{-/-}$ Zellen 24h vor der Messung mit *STIM1* (n = 42), *STIM1A* (n = 82) oder einem Leevektor (n = 15) als *IRES mCherry* Konstrukte in Kombination mit *NFAT-GFP* transfiziert. Zur Analyse des Effekts von PF-04957325 wurden die Zellen 2h vor der Messung mit 1 μ M PF-04957325 vorinkubiert (STIM1 + PF n = 75, STIM1A + PF n = 50, ØSTIM + PF n = 9) Zur Induktion des SOCE mit 1 μ M Thapsigargin zum Start der Messung (t = 0:00) stimuliert. (b) Endpunktsignal aus (a) als Mittelwert \pm SD. (c) PF-04957325 induzierte Differenz von NFAT-GFP Signal im Nukleus vs. NFAT-GFP Signal im Zytosol nach Expression von STIM1 (schwarz) und Stim1A (rot), normiert auf die Kontrollbehandlung ohne PF-04957325 (d) Prozentsatz der präaktivierten Zellen mit NFAT-GFP Signal im Nukleus > NFAT-GFP Signal im Zytosol aus (a) bei t = 0:00 (n < 51). Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen.

Um zu verifizieren, dass die Effekte der PDE8B auf die NFAT-Translokation abhängig von STIM1 sind, wurde auch eine Kontrollbedingung ohne STIM-Transfektion mit PF-04957325

behandelt (hellgrau). Im Vergleich zur Kontrolle ohne PF-04957325-Behandlung transloziert NFAT nach PF-04957325-Inkubation minimal langsamer und minimal weniger in den Nukleus. Die beiden Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant. Entgegen der Erwartungen steigerten die Zugabe des Blockers die Translokation von NFAT nach Überexpression von STIM1 drastisch und signifikant (Abb. 38a dunkelgrau gepunktet vs. schwarz). Im Endpunkt der Messung steigerte die Inkubation mit PF-04957325 die NFAT-Translokation von $1,20 \pm 0,02$ auf $1,68 \pm 0,06$ (Abb. 38b dunkelgrau gepunktet vs. schwarz). Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Bedingung mit STIM1A. Auch hier führte der Einsatz des PDE8-Inhibitors zu einer signifikant schnelleren und verstärkten Translokation von NFAT in den Nukleus (Abb. 38a,b rosa gepunktet vs. rot). Nach 30 Minuten konnte nach Behandlung mit PF-04957325 $1,51 \pm 0,05$ RE NFAT im Kern gemessen werden, ohne PF-04957325 nur $1,29 \pm 0,03$ (Abb. 38a,b rosa vs. rot).

Um den netto-Effekt von PF-04957325 auf die NFAT-Translokation nach STIM1- bzw. STIM1A-Expression wurden die Zellen nach PF-04957325 Inkubation auf den Mittelwert der jeweilige Bedingung ohne Blocker normiert (Abb. 38c). In den ersten 5 Minuten der Messung translozierte identisch viel NFAT in den Nukleus. Nach 10 min zeichnet sich ein differenzielles Bild für STIM1 und STIM1A ab. Ab diesem Zeitpunkt translozierte nach Transfektion mit STIM1 signifikant mehr NFAT aus dem Zytosol. Betrachtet man die Fläche unter der Kurve fällt auf, dass der steigernde Effekt von PF-04957325 mit $7,72 \pm 2,62$ RE/ $3,84 \pm 1,9$ RE STIM1/STIM1A doppelt so stark bei STIM1-ÜE war als bei STIM1A-ÜE. Ein weiterer Hinweis, dass PF-04957325 den Zellmetabolismus von STIM1 mehr beeinflusst als den von STIM1A, war die Menge an präaktivierten Zellen. Diese wurden definiert als Zellen, bei denen schon im ersten Messwert die GFP-Durchschnittsintensität im Nukleus höher war als im Zytosol, also mehr NFAT im Nukleus als im Zytosol vorlag. Nach Expression von STIM1 waren rund 21% aller dokumentierten Zellen präaktiviert. Nach Inkubation mit PF-04957325 verdoppelte sich der Wert auf 45%. Für STIM1A erhöhte PF-04957325 die Anzahl der präaktivierten Zellen von 29% auf 34% (Abb. 38d).

Die erste Hypothese, dass die Inhibition der PDE8B die SOCE vermittelte NFAT-Translokation reprimiert, konnte gänzlich widerlegt werden. Es war sogar ein reverser Effekt zu verzeichnen. Die zweite Hypothese, dass eine Inhibition der PDE8B sich stärker auf die NFAT-Translokation nach STIM1-Expression auswirken würde als auf die Translokation nach STIM1A-Expression, wurde bestätigt.

4.5.3 PF-0495732 hat keine Auswirkung auf den SOCE

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob sich die verstärkte Translokation nach Verwendung von PF-04957325 auf eine Verstärkung des SOCE durch den PDE8 Inhibitor zurückführen lässt. Eine höhere $[Ca^{2+}]_{zyt}$ würde den Ca^{2+} -abhängigen CaM/CaN-Signalweg verstärken, was eine Dephosphorylierung und Translokation von NFAT zur Folge hätte. Deshalb wurden SH-SY5Y $S1^{-/-}$ mit *STIM1(A(D503A))-IRES-mCherry* transfiziert und die Zellen 2 h vor Beginn der jeweiligen Messung mit 1 μ M PF-04957325 bzw. dessen Lösemittel DMSO vorinkubiert.

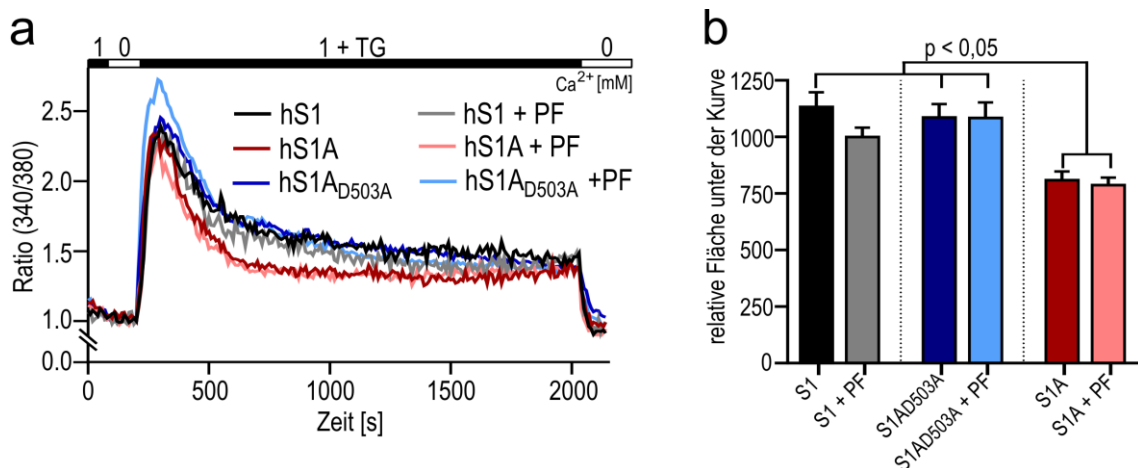


Abbildung 259 - PF-0495732 hat keine Auswirkung auf den SOCE

(a) Die Graphen zeigen den Verlauf der zytosolischen Calciumsignale der Fura2-Ratio bei 340nm/380nm als Mittelwert. Die Zellen wurden, wie über dem Graphen angegeben, mit Calciumringer-Lösungen verschiedener $[Ca^{2+}]_{EZ}$ perfundiert. Der SOCE wurde mittels 1 μ M Thapsigargin induziert. SH-SY5Y $S1^{-/-}$ -Zellen wurden 24h vor der Messung mit *Stim1* (schwarz, n = 134), *Stim1A* (rot, n = 86) oder *Stim1A D503A* (blau, n = 104) als IRES mCherry Konstrukte transfiziert. Zur Analyse des Effekts von PF-04957325 wurden die Zellen 2h vor der Messung mit 1 μ M PF-04957325 vorinkubiert (STIM1 + PF n = 82, STIM1A + PF n = 134, STIM1A D503A + PF n = 102). (b) Gesamtmenge des gespeicherten Calciums aus (a) als Fläche unter der Kurve. Die Werte aus sind als Mittelwert, \pm SEM dargestellt. Statistik: Kruskal-Wallis Anova mit Dunn's multiple comparisons Test. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten mit jeweils min. 3 technischen Replikaten gewonnen.

Das Calcium-Imaging-Protokoll entsprach den genauen Bedingungen der NFAT-Assays. Nach Zugabe von TG in 1mM Ca^{2+} -Ringer-Messlösung wurden die Zellen für 30 Minuten in Calcium vermessen. Zur Terminierung des Ca^{2+} -Einstroms wurde am Ende der Messung calciumfreie Ringer-Lösung appliziert. Statt der sonst berechneten SOCE-Parameter wurde für dieses Experiment die Fläche unter der Kurve, also das gesamt einströmende Calcium, berechnet. Wie schon in den vorausgegangenen Ca^{2+} -Imaging Überexpressions-Experimenten zeigten die Zellen auch im globalen Calcium Protokoll, bei welchem eine Unterscheidung in Speicherentleerung und SOCE nicht möglich ist, nach Überexpression von STIM1A einen

signifikant erniedrigten Calciumeinstrom (Abb. 39a,b dunkelrot) im Vergleich zur wildtypischen Variante (Abb. 39a,b schwarz). Die STIM1A Punktmutante D503A zeigte wie schon in 4.2.8 den gleichen Calcium-Phänotyp wie STIM1 (Abb. 39a,b dunkelblau).

Nach Inkubation mit PF-04957325 war für die Versuchsbedingung mit STIM1 im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor eine minimale Verringerung des einströmenden Calciums zu verzeichnen (Abb. 39a,b grau). Die Differenz der Fläche unter der Kurve war allerdings nicht signifikant. Weder auf STIM1A (Abb. 39a,b rosa) noch auch auf die STIM1A-Punktmutante (Abb. 39a,b hellblau) hatte PDE8B Inhibitor einen Effekt. Auch nach Inkubation mit PF-04957325 zeigte STIM1A einen signifikant erniedrigten Calciumeinstrom.

Ein besonderes Augenmerk muss bei diesen Daten auf die Beobachtung gelegt werden, dass die Punktmutante den Calciumphänotyp von STIM1A verändert und die Höhe des STIM1-induzierten Calciumeinstroms wiederherstellt. Dem gegenüber wirkte sich diese Mutation nicht auf die Menge und Geschwindigkeit der NFAT-Translokation aus, sondern verhielt sich wie das nichtmutierte STIM1A (Abb. 37).

In diesem funktionellen Assay konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von STIM1A sich positiv auf die NFAT Translokation in den Kern auswirkt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression des PDE8B Blockers PF-04957325 nicht wie erwartet die NFAT Translokation hemmt, sondern sie signifikant steigert. Dabei weist PF-04957325 einen stärkeren Effekt bei Überexpressionsbedingungen von STIM1 auf, als auf STIM1A.

Kapitel 5

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die neue STIM1-Spleißvariante STIM1A funktionell charakterisiert. Dabei wurden eine Vielzahl von Aspekten beleuchtet: Das Expressionsmuster von Stim1A wurde in verschiedenen murinen Geweben untersucht. Des Weiteren wurde geklärt, welche Auswirkung die Expression einer zusätzlichen Domäne im STIM1 C-Term auf den speichergesteuerten Calciumeinstrom hat. Daneben wurde untersucht, ob sich das Spleißevent auf die Lokalisierung der Variante auswirkt und ob STIM1A mit einem spezifischen Partner interagiert. Das letzte Ziel war es die physiologische Relevanz von STIM1A aufzuklären. Diese Arbeit soll ein weiteres Puzzleteil zum Verständnis der komplexen Feinregulierung der intrazellulären Calciumhomöostase und der Relevanz von Spleißvarianten liefern.

5.1 Expression

Wo wird Stim1A endogen exprimiert?

Bei STIM1A handelt es sich um eine Spleißvariante von STIM1, bei der 93 zwischen dem konventionellen Exon 10 und 11 eingespleißt werden. Auf Proteinebene führt dieses Spleißevent zu einer Verlängerung um 31 Aminosäuren in cytosolischen Bereich des Proteins, in direkter Nähe hinter der stark negativ geladenen inhibitorischen Domäne. Anhand von Proteindatenbanken wurde die Konservierung der Aminosäureabfolge der durch das neue Exon kodierten Residuen untersucht. Die Insertion von *Domäne A* in STIM1 konnte in allen biologischen Tierklassen, von Fischen bis hin zu Säugetieren sowie in Vögeln gefunden werden. 74 % der 31 Domäne A Aminosäuren sind stark konserviert. Während der Entwicklung hin zu lebendgebärenden Säugetieren wurden fünfzehn weitere Basen in das Exon inseriert, vermutlich durch ein intra-exonic pre-mRNA Spleißevent welches zu einer weiteren Insertion von fünf Aminosäuren führt (Abb. 9). Stim1A wird neben seiner evolutionären Konservierung relativ ubiquitär exprimiert, was mittels zwei verschiedenen PCR-basierten Methoden gezeigt werden konnte (Abb. 10). Die relative Expression von Stim1A im Vergleich zum wildtypischen Stim1 variiert zwischen Geweben und Zelltypen. Die

stärkste Expression wurde in Testes, Herz, Astrozyten und der Niere gefunden, die schwächste in CD8⁺ T-Zellen und Monozyten. Auch auf Proteinebene konnte die 3,55 kDa schwere Spleißvariante in murinen Testes nachgewiesen werden (Abb. 11). Bei den Daten der qRT-PCR ist zu beachten, dass zwei Primerpaare miteinander verglichen wurden deren Effizienz nicht quantifiziert wurde und deshalb nur bedingt in Relation zueinander gesetzt werden können.

Im Vergleich zu STIM1 und dessen Spleißvarianten treten Spleißvarianten von STIM2 ausschließlich in Säugetieren auf. Die erste beschriebene STIM2 Spleißvariante STIM2.1 (Miederer et al., 2015; Niemeyer, 2016) wurde bis dato ausschließlich in Säugetieren nachgewiesen (Rana et al., 2015). Am stärksten wird STIM2.1 in naiven T-Zellen sowie in der Myoblasten-Zelllinie C2C12 exprimiert (Miederer et al., 2015; Rana et al., 2015). Rana et al. detektierten ebenfalls Expression in Thymus und Cerebellum (Rana et al., 2015). Ebenfalls Säuger-spezifisch im Cerebellum wird eine weitere STIM1-Spleißvariante, STIM1B exprimiert. Sie tritt in geringerer Expression ebenfalls in anderen Hirnregionen auf (Ramesh et al. 2021). *Exon B* wird ein Exon hinter der Spleißseite von *Exon A* eingespleißt (zwischen Exon 11 und 12 des wildtypischen STIMs). An der gleichen Position kann alternierend auch das sogenannte *Exon L* eingespleißt werden. Die daraus resultierende STIM1-Spleißvariante STIM1L wird ebenfalls nur in Säugern exprimiert. Ihre Expression beschränkt sich des Weiteren nur auf Myotuben und Muskelfasern (Darbellay et al., 2011). STIM1A stellt demnach unter allen bekannten STIM1 die einzige Spleißvariante dar, die relativ ubiquitär exprimiert wird und auch in niederen Tierklassen konserviert ist. Überraschenderweise wurde die geringste Stim1A Expression in Zellen des Immunsystems (CD8⁺T-Zellen und Monozyten) gemessen. In diesem Zelltyp ist der SOCE als Haupteinstrommechanismus für Ca²⁺ sowohl am besten erforscht, als auch die Expression von STIM1 im Vergleich zu andere Zelltypen und Geweben überdurchschnittlich hoch (BioGPS, Dataset: GeneAtlas U133A, gcrma Probeset: 202764_at). Möglicherweise benötigen diese Zellen, um ihre Funktion zu erfüllen, einen konstant höheren Calciumeinstrom und sind nicht auf die Feinregulierung durch andere Spleißvarianten angewiesen.

Neben dem Spleißhotspot zwischen *Exon 10-12* von STIM1 wurde in verschiedenen murinen Gewebe und Zellen ebenfalls ein N-terminales Spleißevent identifiziert. Die mRNA von Stim1 mit einer alternativen *5'UTR* wurde nur in verschwindend geringem Maße (durchschnittlich 3,0 %) gespleißt. In allen getesteten Geweben und Zellen dominierte die mRNA mit der wildtypische *5'UTR*. Des Weiteren wurde gezeigt, dass in Testes als Gewebe mit der

stärksten *alt1-5'UTR* Expression ebenfalls eine Kombination von C- und N-terminalen Spleißevents möglich ist. 26% der mRNA lag als *alt1-5'UTR-STIM1A* vor. Eine Stim1-Variante ohne *Exon 1* wurde bis dato in der Literatur nicht beschrieben. Bei einer solchen Variante würde es sich vermutlich um ein zytosolisches STIM1 handeln, da es ohne Signalsequenz nicht in der ER-Membran inseriert würde. STIM1 könnte außerhalb des ERs bzw. ohne cEF-Hand nicht die Funktion eines ER-Calciumsensors erfüllen. Eine weitere Möglichkeit wäre es, dass diese Varianten über ihr C-Terminales Poly-Lysin Motiv direkt an die Plasmamembran binden. 2012 wurde zum ersten Mal eine Gruppe von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran beschrieben, die unabhängig vom Füllstand des ERs von plasmamembranständigen STIM1 aktiviert werden. Die Arachidonsäure-regulierten Ca^{2+} -Kanäle (*engl. arachidonic acid-regulated calcium-selective = ARC*) sind hoch selektiv für Ca^{2+} und benötigen neben der Bindung von STIM1 ebenfalls die Anwesenheit von Arachidonsäure (Shuttleworth, 2012; Thompson et al., 2013; Thompson & Shuttleworth, 2013). Sie werden aus einem Orai-Hexamer gebildet, das durch vier Orai1 und zwei Orai3 Untereinheiten zusammengesetzt wird. Möglicherweise sind die N-terminal verkürzten STIMs an der Regulation der ARC-Kanäle beteiligt. Um dies zu klären könnten Patch-Clamp Experimente durchgeführt werden: Um den I_{CRAC} zu induzieren, wird standardmäßig IP3 in der Patch Pipette verwendet, welches die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER triggert und so den speicherabhängigen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} triggert. Die Initiation des I_{ARC} der ARC-Kanäle erfolgt nur nach Anwesenheit von Arachidonsäure, wie in Thompson et al., 2010 beschrieben. So könnte geklärt werden, ob eine Überexpression von *alt1-Stim1* und *alt1-Stim1A* die Aktivierung der ARC-Kanäle zur Folge hätte.

5.2 Funktionelle Charakterisierung

Wie wirkt sich die Insertion von Domäne A aus?

Nachdem das Expressionsmuster von STIM1A geklärt werden konnte, wurde die Auswirkung des eingespleißten Exons auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom untersucht. Die Überexpression von STIM1A führte zu einem signifikant verringerten Calciumeinstrom nach Speicherentleerung (Abb. 13,15,17,18,19,25). Neben der Menge an einströmendem Calcium war ebenfalls die Einstromgeschwindigkeit signifikant verringert. Calcium-Imaging Daten nach Knock-down/-out von Stim1A in hippocampalen Astrozyten, in welchen Stim1A mit 47,8% fast die Hälfte des Gesamt-Stim1 ausmacht, bestätigten den reprimierenden

Phänotypen. In Abwesenheit von Stim1A bzw. nach Reduktion dessen war der SOCE signifikant erhöht. Die Effekte waren wie erwartet bei den Zellen des totalen Knockouts minimal größer als bei einem Restprotein von 11,41 % (Abb. 14). Der für STIM1A beobachtete Calciumphänotyp stimmt mit der Tendenz der STIM1-Spleißvariante STIM1B überein (Ramesh et al. 2021). Im Gegensatz zu STIM1A und STIM1B zeigt STIM1L einen signifikant größeren SOCE als das wildtypische STIM1. Diese Variante kann in Folge der Speicherentleerung innerhalb von Sekunden auf Calciumkonzentrationsänderungen reagieren, da sie mit Aktin interagiert und so permanent Cluster bildet. Dieser Phänotyp ist eine Anpassung in elektrisch erregbaren Zellen, um repetitive Ca^{2+} -Signale generieren zu können (Darbellay et al., 2011; Saüc et al., 2015). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das Spleißen von STIM1 ein wirkungsvolles Werkzeug zur Feinregulation des SOCE ist. Es konnte des Weiteren ausgeschlossen werden, dass sich die Expression von STIM1A auf die Füllstände der zellulären Calciumspeicher wie ER und Mitochondrien auswirkt. (Abb. 16). Demnach hat STIM1A zwar Auswirkungen auf die Menge und Geschwindigkeit des im SOCE einströmenden Calciums, allerdings keine Bedeutung für die Menge des intrakompartimentär gespeicherten Ca^{2+} . Da STIM1 in der Zelle auch als Heteromultimere mit seinem Homolog STIM2 vorliegt (Subedi et al., 2018, Rana et al., 2015, Darbellay et al., 2010), wurde der Einfluss von STIM2 auf STIM1A untersucht. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von STIM2 erniedrigte STIM1A den speichergesteuerten Calciumeinstrom signifikant. Das Ausmaß der STIM1A-vermittelten Reduktion der SOCE-Parameter unterschied sich zwischen Einzel-Knockout-Zellen (ohne endogenes STIM1) und Doppel-Knockout-Zellen (ohne endogenes STIM1 und STIM2) nicht signifikant. Mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation konnte des Weiteren gezeigt werden, dass STIM1A in gleichem Maße mit STIM2 interagiert wie STIM1. Auch für den Ca^{2+} -Phänotyp von STIM1B wurde eine Beeinflussung von STIM2 ausgeschlossen (Ramesh et al. 2021). Weder die Expression von Domäne A, noch der verkürzte C-Term von STIM1B beeinflusst demnach die Interaktion mit STIM2.

Für die STIM2-Spleißvariante STIM2.1 wurde beschrieben, dass diese nicht in der Lage ist, ORAI1, ORAI2 und ORAI3 zu aktivieren (Miederer et al., 2015; Rana et al., 2015). Deshalb wurde geklärt, ob STIM1A in der Lage ist, alle ORAI-Homologe zu aktivieren, oder ob die neue Spleißvariante eine Homologselektivität aufweist. Nach Ko-Überexpression von STIM1A konnten sowohl alle murinen als auch alle humanen Orai Homologe aktiviert und SOCE bzw. I_{CRAC} gemessen werden (Abb. 17-19). Der stärkste Effekt auf den SOCE, also der größte

Unterschied zwischen STIM1 und STIM1A, wurde in Maus und Mensch in Kombination mit ORAI2 gefunden. Dabei waren der Calcium-Peak und die Influxrate besonders stark beeinflusst. Eine Erklärung, dass STIM1A zwar in der Lage ist ORAI1 zu aktivieren, aber nicht im gleichen Maße wie STIM1, wäre, dass die Interaktion von STIM1A und ORAI1 durch den erweiterten C-Term von STIM1A eingeschränkt sein könnte. Bei einer verringerten Interaktion würde aufgrund dessen weniger Calcium durch ORAI1 in die Zelle einströmen können. Für STIM2.1 konnte mittels FRET-Messungen gezeigt werden, dass eine beeinträchtigte Interaktion für das Unvermögen den Kanal zu aktivieren verantwortlich ist, obwohl STIM2.1 und ORAI1 kolokalisierten (M1, Miederer et al., 2015). Das Experiment wurde unter identischen Bedingungen mit STIM1A durchgeführt. STIM1 und STIM1A zeigten keine signifikant unterschiedliche Kolokalisation mit Orai1. Ebenfalls beeinflusste Domäne A die direkte Interaktion mit dem kanalbildenden Protein nicht signifikant. Demnach ist die Interaktion von STIM1A mit ORAI1 nicht verantwortlich für den STIM1A-vermittelten, reduzierten speicherabhängigen Calciumeinstrom.

Ein weiterer Parameter, der sich auf die Stärke des SOCE auswirken könnte, ist die Clustergröße der STIMs. Größere Cluster könnten simultan größere Mengen Orai in ER-PM Knotenpunkte rekrutieren und aktivieren. Für STIM1B konnte gezeigt werden, dass es signifikant kleinere Cluster bildet als STIM1 (Ramesh et al. 2021). Zur Analyse der Cluster wurden TIRF-Aufnahmen der vorgegangen FRET-Experimenten verwendet. Zu beachten ist, dass kein PM-Marker verwendet wurde und die Ebene der Plasmamembran nicht mit Sicherheit bestimmt werden konnte. Allerdings ermöglicht TIRF-Mikroskopie eine fünffach geringere Eindringtiefe als gewöhnliche Fluoreszenzmikroskopie. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass scharf abgegrenzte Signale die Lokalisierung des fluoreszenzmarkierten STIMs an der PM abbildet. Die Größen der mehr als 4000 analysierten Clustern für STIM1A und STIM1 unterschieden sich weder im Median noch erste oder dritte Quartile signifikant (Abb.21) Es kann demnach auch ausgeschlossen werden, dass sich die Größe der STIM-Cluster für die Reduktion des einströmenden Calciums durch STIM1A verantwortlich ist. Allerdings können aufgrund dieser Analyse keine Rückschlüsse auf die Influx Rate gezogen werden. Dafür wäre es nötig gewesen, die Clustergeschwindigkeit hin zur Plasmamembran wie in Ramesh et al. 2021 zu ermitteln. Möglicherweise könnte eine verlangsamte Clusterbildung die reduzierte Influx Geschwindigkeit des STIM1A-induzierten SOCE erklären. Da STIM1 im Ruhezustand nicht an der PM lokalisiert ist, wäre es bei einem solchen Experiment unabdingbar, einen fluoreszenzmarkierten Plasmamembranmarker, wie

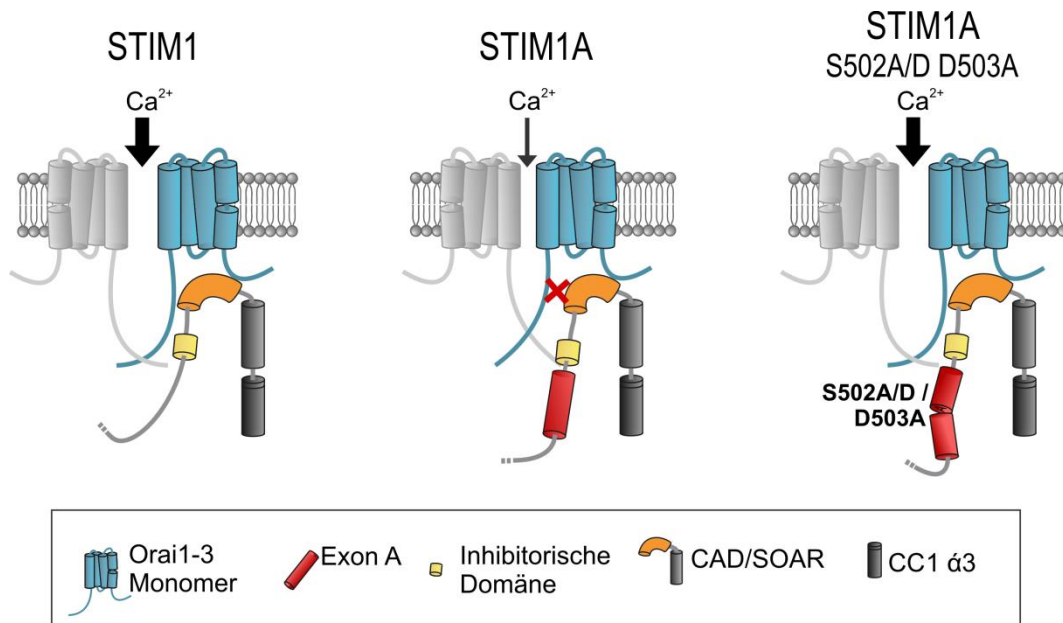
z. B. den PIP₂-Sensor PLCΔ-PH zu verwenden. Für STIM1B konnte gezeigt werden, dass die Clusterrate signifikant verringert ist, was mit der verringerten Ca²⁺-Influxrate der Calciumimaging-Daten übereinstimmt (Ramesh et al. 2021).

Woraus resultiert Ca²⁺-Phänotyp von STIM1A?

Weder die Interaktion mit den kanalbildenden Proteinen, noch eine Selektivität für ein Orai-Homolog noch eine reduzierte Clustergröße konnte den Calciumphänotyp von STIM1A erklären. Daher wurde untersucht, ob dieser auf den verlängerten C-Term zurückzuführen ist, oder ob die Reduktion des SOCEs aus einer spezifischen Aminosäure/Aminosäurenabfolge resultiert. Dafür wurden zuerst verschiedene längere Aminosäuremotive mutiert, bis schließlich zwei der 31 AS identifiziert wurden konnten, durch dessen Mutation der reduzierte SOCE-Phänotyp von STIM1A revertiert werden konnte: S502 und/oder D503. Nach Mutation einer dieser beiden AS in Domäne A konnte der Ca²⁺-Phänotyp von STIM1 in Calcium-Imaging und Patch-Clamp wiederhergestellt werden (Abb. 22, 24, 25). Da es sich bei Serin502 um eine potentielle Phosphorylierungsstelle handelt, wurde mittels einer phosphomimetischen Mutation von S502 ausgeschlossen, dass die Reduktion des SOCE auf die zusätzliche Phosphorylierung in Domäne A zurückzuführen ist (Abb. 24). Für Domäne A wurden fünf weitere potentielle Phosphorylierungsseiten prognostiziert (Abb. 23), welche in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

Über die Bedeutung von S502 und D503 für den Mechanismus des SOCE kann nur spekuliert werden. Interessant ist, dass S502 und D503 nur zwei bzw. drei Aminosäuren vor der Insertionsstelle des Aminosäuremotivs SLCST liegen, welches sich erst mit der Evolution hin zu lebendgebärenden Säugetieren entwickelt hat. Die Anwesenheit dieser beiden AS könnte sich sterisch auf die Faltung des Gesamtproteins A auswirken, eventuell über Wasserstoffbrücken der OH-Gruppe des Serins und/oder der negativen Ladung des Glutamats mit anderen Bereichen des Proteins. Diese Konformationsänderung könnte sich dann indirekt negativ auf die Öffnung bzw. das Offenhalten des Kanals auswirken und so den reduzierten Ca²⁺-Einstrom erklären. Das Gating, also das Öffnen und Offenhalten von Orai erfolgt vermutlich über zwei oder mehrere Interaktionen von STIM1 mit dem Kanalprotein. Primär zur Öffnung der Orai-Kanäle wird die Interaktion der CAD/SOAR Domäne mit der C-terminales CC-Helix von Orai1 und eventuell mit der Nexus-Sequenz (Aminosäure 261-265) am C-Term von Orai (Groschner, Grainer & Romanin, 2017) beschrieben. Über mehrere aufeinander folgende Interaktionen, die sich von Orai1 TM4 bis hin zu TM1 ausbreiten,

findet eine geringfügige Rotation der TM Domänen statt, welche letztendlich durch die konformationellen Änderung der Helix von TM1 zur Öffnung des Kanals führt (Zhou et al. 2017). Die sekundäre Interaktionsstelle von STIM1 mit Orai ist die N-terminale ETON-Region (Derler et al., 2013; Annette Lis et al., 2010; McNally et al., 2013). Ob die ETON-Region tatsächlich für das vollständige Gating unabdingbar ist, wird in der Literatur weiterhin kritisch diskutiert. In der Theorie würde durch die zweite Interaktionsstelle eine Art Brücke zwischen C- und N-Terminus des Kanals entstehen. Möglicherweise könnte dadurch zusätzliche Stabilität der Drehung der TM1 bewirkt werden und so die Öffnung des Kanals stabilisiert werden. Es ist nicht bekannt, welche Aminosäuren von STIM1 mit der ETON Region interagieren. Unveröffentlichte Modellierungsdaten und veröffentlichte Kristallstrukturen des Orai Proteins (REF) legen allerdings die Vermutung nahe, dass mögliche Interaktions-Grenzflächen räumlich so limitiert sind, dass die zweite Interaktionsstelle ebenfalls mit einem weiteren Sequenzabschnitt der CAD/SOAR und nicht mit nachfolgenden Proteindomänen erfolgen müsste (Modeling: Dr. Achim Kless Eli Lilly and Company, Nicholas Künzel & Prof. Dr. Volkhard Helms, Bioinformatik, UdS). Zusammen mit den in 4.2. dargestellten Daten lässt sich zusammenfassend das in Modell 1 dargestellte Modell aufstellen.



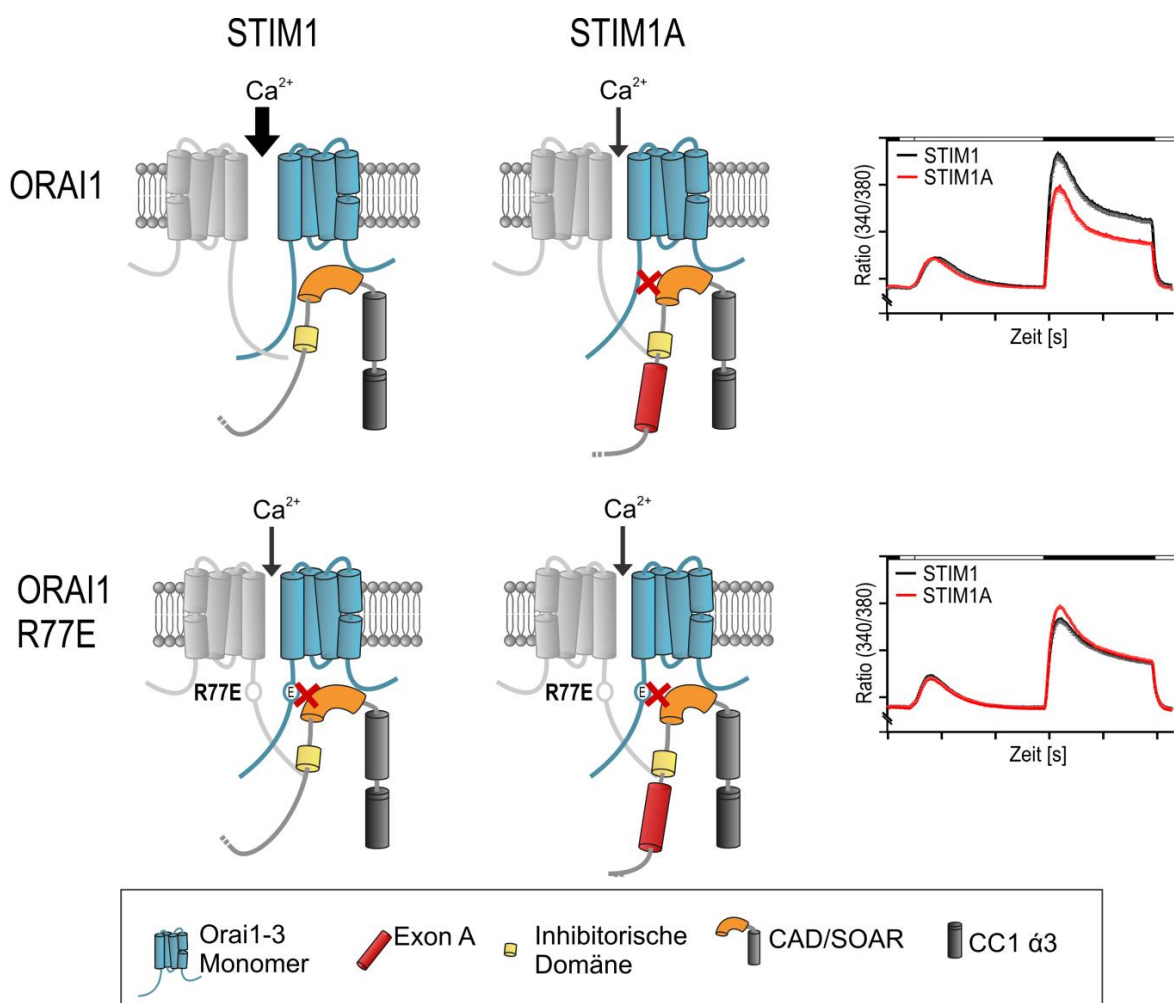
Modell 1 – Modell eines potentiellen Gating-Mechanismus von STIM1A

Der N-terminale Teil von STIM1, STIM1A und STIM1AD503A ab der CC1α3 Domäne ist als Zylinder dargestellt (CAD orange/grau, ID gelb, Domäne A A rot). Die Punktmutationen S502A und D503A sind als Knick in Domäne A gezeigt. Die Orai-Monomere sind in hellblau bzw. hellgrau abgebildet. Die Menge des einströmenden Calciums wird über die Dicke des nach innen gerichteten Pfeils repräsentiert.

Demnach könnte das Spleißevent von *Exon A* auf Proteinebene die Konformation des C-Terms des aktivierten STIM1 so verändern, sodass die Kanal stabilisierende Interaktion von CAD/SOAR mit der ETON-Region von Orai möglicherweise unterbunden wird (Modell 1, Mitte). Aufgrund dessen könnten keine stabilisierenden Wasserstoffbrücken zwischen der STIM1 CAD Domäne und dem N-Terminus von Orai1 ausgebildet werden und der Kanal entweder nicht vollständig geöffnet oder stabilisiert werden kann und es zu einem geringeren Calcium Einstrom in die Zelle kommt. Die Punktmutationen in Domäne A S502A bzw. D503A würden diese Konformationsänderung revertieren und so die Stabilisierung der Kanalöffnung wieder ermöglichen (Modell 1, Rechts). Für dieses Modell und der Relevanz des N-Terminus bzw. der ETON-Region für das vollständige Gating von Orai spricht ebenfalls, dass ORAI1 nicht funktionell ist, sobald die N-terminalen Aminosäuren 73-84 deletiert werden (Prakriya & Lewis, 2015). Lis et al. publizierten 2010 Experimente, in denen sie den N-Term von Orai1 durch den N Term von Orai3 ersetzten und umgekehrt (Annette Lis et al., 2010). Dieser Austausch hatte eine Veränderung von Größe und Kinetik des I_{CRAC} zur Folge. Weiter konnte jeweils ein Lysin (K85 ORAI1, K60 ORAI3) identifiziert werden, das für die Aktivierung der CRAC-Kanäle unabdingbar ist. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass die initiale Bindung von STIM an den ORAI-C-Term die Interaktion von STIM und dem ORAI-N-Term triggert (Annette Lis et al., 2010). In der gleichen Publikation konnte gezeigt werden, dass die Mutation von Argine 77 in Glutamat (R77E) den IP_3 induzierten I_{CRAC} von Orai1 in stabil STIM1 überexprimierenden HEK293-Zellen drastisch reduziert. Warum das positiv geladene Arginin in der ETON-Region in ein negativ geladenes Glutamat mutiert wurde, geht aus dieser Publikation nicht hervor. Mittels dieser Punktmutante wurde untersucht, ob das Spleißen von Domäne A sich gemäß dem aufgestellten Gating-Modells (Modell 1) negativ auf die Interaktion mit der ETON Region auswirkt. In Kombination mit STIM1 konnte mittels Calcium-Imaging reproduziert werden, dass nach Mutation von ORAI1 R77E signifikant weniger Calcium in die Zelle strömen kann (Abb. 26). Gleiches wurde auch für die STIM1A-Punktmutante D503A gemessen. In Einklang mit der aufgestellten Hypothese, dass Domäne A eine stabilisierende Bindung an die ETON Region verhindert, hatte es im Falle der Überexpression von STIM1A keine Auswirkung, ob SOCE durch ORAI1wt oder R77E gemessen wurde. In Patch-Clamp-Experimenten zeigte STIM1A in Kombination mit ORAI1 (wie in Patch-Clamp-Experimenten, Abb. 18, 25) im Vergleich zu STIM1 einen signifikanten reduzierten I_{CRAC} (CD_{max}). Allerdings waren diese Unterschiede in Kombination mit ORAI1 R77E

verschwunden. Hierbei ist zu beachten, dass der durch STIM1A induzierte I_{CRAC} in Anwesenheit von ORAI1 R77E weiter reduziert wurde, verglichen mit der Koexpression mit ORAI1wt. Demnach ist die Mutation im ORAI1 N-Term dominant gegenüber dem Spleißevent und reicht nicht als alleinige Erklärung aus. Weitere Experimente mit weniger starken Mutationen des R77 Restes in ORAI1 können hier die molekularen Mechanismen weiter aufklären.

Aufgrund unserer Ergebnisse konnte das Modell 1 erweitert werden (Modell 2). Demzufolge interagiert die CAD/SOAR von STIM1 mit R77 der ETON-Region von ORAI1. Diese Interaktion wird durch die Insertion von Domäne A verhindert, weshalb das Gating negativ beeinflusst und der SOCE verringert wird (Modell 2 oberes Panel).



Modell 2 – Modell der potentiellen Rolle von ORAI1R77 für den Gating-Mechanismus von STIM1 und STIM1A

Der N-terminale Teil von STIM1 und STIM1A ab der CC1 α 3 Domäne ist als Zylinder dargestellt (CAD orange/grau, ID gelb, Domäne A rot). Die Orai-Monomere sind in hellblau bzw. hellgrau abgebildet. Die Punktmutation R77E am Orai1 N-Term ist als Kreis eingezeichnet. Die Menge des einströmenden Calciums wird über die Dicke des nach innen gerichteten Pfeils repräsentiert. Der rechte Abbildungsteil greift die Daten aus 4.2.9 auf, um die Hypothese auf die sich das Modell stützt zu verdeutlichen.

Durch die Mutation von ORAI1 R77 wird die sekundäre N-terminale Interaktion der CAD/SOAR unterbunden. Deshalb ist es für den Calciumeinstrom durch ORAI1 irrelevant, ob die primäre Öffnung durch die Bindung von STIM1 oder STIM1A induziert wird (Modell 2 unteres Panel). Ob der Kanal demnach nicht vollständig geöffnet oder offengehalten würde, lässt sich anhand der Daten nicht vollständig klären. Dieses Modell unterstützen ebenfalls die jüngst veröffentlichten Daten von Niu et al., 2020. Sie konnten zeigen, dass die Affinität von STIM1 für den C-Term von Orai reduziert ist, wenn der N-Term vorhanden ist. Dies unterstützt die Theorie der schrittweisen Öffnung. Mittels Peptid-Pulldown Assay konnten sie die direkte Interaktion von R77/K78 von Orai1 bzw. dem Orai3 Äquivalent R52/R53 mit STIM1 nachweisen. Diese Interaktion wurde durch die Mutation dieser Aminosäuren deutlich reduziert. Sie konnten des Weiteren zeigen, dass die Mutation von ORAI1 R77/K78 sich direkt negativ auf das Öffnen des Kanals auswirkt, was zu einem reduzierten SOCE führt (Niu et al., 2020). Ungeklärt bleibt weiterhin, welche Aminosäuresequenz von STIM1 mit der ETON-Region interagiert. Ebenfalls möglich wäre eine Interaktion von R77 mit der stark negativ geladenen ID (Nettoladung von -7.328 bei pH 7.4, www.protpi.ch) von STIM1, da die ETON Region mit einer Nettoladung von +4.587 bei pH 7.4 deutlich positiv geladen ist (<https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool>). Da Domäne A unmittelbar hinter der ID befindet, wäre es nicht verwunderlich, wenn das Spleißevent erhebliche konformationelle Auswirkungen auf diese Domäne hätte. Wider dieser möglichen Erklärung sprechen unveröffentlichte Modellierungsdaten, wonach zwischen ORAI C- und N-Term nicht genug Platz für eine weitere Domäne als die CAD/SOAR wäre (Modeling: Dr. Achim Kless, Eli Lilly and Company; Nicholas Künzel & Prof. Dr. Volkhard Helms Bioinformatik, UDS). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Domäne A mit Aminosäuren vor ORAI1 R77 oder vor der CAD/SOAR interagieren und so die Faltung der CAD/SOAR beeinflussen, wodurch das Gating des Kanals verändert wird. Dafür würde die Tatsache sprechen, dass die Mutation von STIM1A D503 den Ca^{2+} -Phänotyp von STIM1A revertiert. Möglicherweise interagiert das negativ geladene Aspartat mit positivgeladenen Aminosäuren, wie sie z. B. konserviert am N-Term von ORAI1/2/3 zu finden sind.

Eine Möglichkeit, die direkte Interaktion von R77/K78 mit der CAD/SOAR oder ID von STIM1 oder eine Interaktion von Domäne A mit weiteren Aminosäuren von STIM1 oder ORAI1 zu testen wäre mittels BiFC-Assay (siehe 3.5.2). Obwohl R77 Mutagenese nur in Kombination mit der ETON-Region von ORAI1 durchgeführt wurden, lassen sich die Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit auf weitere ORAI-Homologe übertragen, da die

ETON für alle Homologe identisch ist. Diese Tatsache könnte erklären, warum der negative Effekt von STIM1A bei allen ORAIs greift und zu einer Reduktion des SOCE führt. Zusammenfassend lassen die Daten die Annahme zu, dass Domäne A die Interaktion der ETON-Region mit der CAD/SOAR-Domäne verhindert, die für die komplette Öffnung und die Stabilisierung der Öffnung von ORAI1 notwendig ist. Eine alternative Erklärung für den Ca^{2+} -Phänotyp von STIM1A wäre neben dem Gating von Orail ein spezifischer Interaktionspartner von STIM1A. Die Mutationen S502A oder D503A könnten diese Interaktion unterbinden. Allerdings spricht gegen diese Hypothese die Tatsache, dass der SOCE-Phänotyp durch die Koexpression mit ORAI1 R77E maskiert wird. Diese Fragestellung und ihre Ergebnisse werden in 5.4 ausführlich diskutiert.

5.3 Lokalisierung

Wohin lokalisiert STIM1A *in vitro* und *in vivo*?

Nach heterologer Überexpression der neuen Spleißvariante *in vitro* konnte die Lokalisierung von STIM1A im ER von HEK S1/2^{-/-}-Zellen bestätigt werden. Im Vergleich zu STIM1 zeigte die Spleißvariante weder vor noch nach Aktivierung mittels des SERCA-Inhibitors TG eine differenzielle Lokalisierung (Abb. 27). Über eine direkte Interaktion von STIM1A und STIM1 geben die berechneten Manders-Koeffizienten bei der zu geringen Auflösung des verwendeten Fluoreszenzmikroskops keine Auskunft. Nach Expression von *Exon A*-GFP ließ sich sowohl in HEK *STIM1/2*^{-/-}, als auch in HEK *ORAI1* das Fluoreszenzsignal keinem spezifischen Organell zuordnen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass Domäne A nicht spezifisch und persistent an einen Interaktionspartner bindet, der dessen Translokation veranlasst. Die Ergebnisse sprechen ebenfalls dafür, dass Domäne A nicht direkt an ORAI in der PM bindet (Abb. 28). Allerdings ist hierbei zu beachten, dass das Fluorophor GFP mit 720 Basenpaaren 7,74-fach größer als die zu untersuchende Domäne, was dessen Lokalisierung stark beeinflussen und/oder maskieren könnte. Bei *in vitro*-Untersuchungen der Proteinlokalisierung ergeben sich zwei nicht zu unterschätzende Problematiken: Zum einen kann ein Fluoreszenztag die Lokalisierung eines Proteins beeinflussen (Konrad, 2016). Zum anderen, und noch wichtiger, bilden Zellen unter Zellkulturbedingungen keine komplexen Netzwerke aus, wie sie *in vivo* in z. B. Astrozyten oder Sertoli-Zellen zu finden sind.

Um endogene Expression von STIM1A *ex vivo* nachzuweisen wurde Immunhistochemie verwendet. Bei dieser Methode ist die Spezifität von Antikörper für das Epitop innerhalb des

zu untersuchenden Proteins von höchster Relevanz. Nach Überexpression konnte die Spezifität des von Dr. Martin Jung (Medizinische Biochemie, UdS) hergestellten Antikörpers für Domäne A bestätigt werden. Ebenfalls wurde ein kommerzieller STIM1 Antikörper getestet, welcher die AS441-620 von STIM1 erkennt und deshalb nicht in der Lage ist, C-Terminale STIM1-Spleißvarianten zu binden. Ähnlich wie in der qRT-PCR ist es nicht möglich, mit einem Antikörper alle N- und C-terminale Spleißevents gleichzeitig zu detektieren. Für STIM1 macht die Komplexität der Spleißereignissen an C- und/oder N-Term deutlich, wie kritisch und schwierig die Identifizierung und Charakterisierung einer einzelnen Spleißvariante ist. Für optimale immunhistochemische Färbungen muss das Färbeprotokoll für jede Kombination von Antikörpern angepasst werden. Dabei müssen Parameter wie Antikörperkonzentration, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur, Epitop-demaskierung und Blocklösung für unspezifische Bindungen bedacht werden. Im Vergleich zu Immunzytochemie können bei der Immunhistochemie ebenfalls Parameter wie Schnittdicke und Abundanz des Proteins das Färbeergebnis beeinflussen. Nur eine passende Negativkontrolle, ohne Expression des POI, kann die Zuverlässigkeit eines Antikörpers bestätigen.

Für den Nachweis von Stim1A *ex vivo* wurden verschiedene murine Gewebe immunhistologisch untersucht. Obwohl absolut gesehen die nachgewiesene *Stim1A*-cDNA Mengen in Astrozyten, Skelet und Herzmuskel, Lunge, Darm und Niere deutlich höher waren als in Testes (Abb. 10), konnte nur in testikulären Sertoli-Zellen eine eindeutig ER lokalisierte Proteinspezies nachgewiesen werden (Abb. 32). Sertoli-Zellen lassen sich in einen apikalen und basalen Teil einteilen. In C57BL/6 Mäusen konnte im basalen Teil der Sertoli-Zelle für Stim1A und ØStim1A eine Färbung des entlang des ERs der Sertoli-Zellen mit kleinen sich teilweise überlappenden Clustern festgestellt werden. Intensivere Immunreaktion zwischen Zellgrenzen von zwei Sertoli-Zellen oder Keimzellen könnte auf basale ektoplasmathe Spezialisierungen (ES) hindeuten, Bereiche der Zellen, in denen das ER über Aktinfilamente mit der PM assoziiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass im ER der ES eine geringere $[Ca^{2+}]$ vorherrscht (Vogl et al., 2018). Die gezielte Lokalisierung von STIM1A in diesem Bereich könnte eine solche Erniedrigung nach sich ziehen. Die Auflösung der Aufnahmen lässt allerdings keine Rückschlüsse über eine möglich differenzielle Verteilung von Stim1A und ØStim1A in den ES zu. Im apikalen Sertoli-Zellteil zeigten Färbungen mit dem ØStimA-Antikörper ein bananenförmiges Signal, direkt in räumlicher Nähe zum basalen Abschnitt der reifen Spermienköpfe mit bereits verdichtetem Chromatin. Da die $[Ca^{2+}]$ in den

Keimzellen zwischen den verschiedenen Stufen ihrer Differenzierung stark variiert (Golpour et al., 2016) wäre es denkbar, dass eine ER-Assoziation mit dem Spermienköpfen zur Aufnahme oder Abgabe von Calcium-Ionen aus dem ER und über lokal begrenzten Stim1-vermittelten SOCE notwendig sind, um Spermien-spezifische Calcium-Mikrodomänen zu bilden. Wie es schon für Aktinfilamente der ES beschrieben wurde, können Änderungen der $[Ca^{2+}]_{ER}$ und $[Ca^{2+}]$ in Mikrodomänen Veränderungen des Zytoskeletts triggern. Möglicherweise gewährleisten Stim1-kontrollierte $[Ca^{2+}]$ in Mikrodomänen um die Spermienköpfe die optimalen Bedingungen zur Freisetzung der Spermien. Da in diesem Bereich eine verstärkte Expression von Stim1 gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass in diesen Mikrodomänen große Mengen an Ca^{2+} benötigt werden, da der SOCE dieser Variante am größten ist. Wales et al. konnten in epithelialen, mesenchymalen, Endothel- und hämatopoetischen Zelllinien zeigen, dass erhöhte Calciumlevel zu transientser Polymerisation von Aktin am ER führen. Der sogenannte *calcium-mediated actin reset* (CaAR) ist relevant für akute morphologische Adaptionen (Wales et al., 2016) wie vermutlich auch die Freisetzung von Spermien.

Für Stim1A wurde im apikalen Teil der Sertoli-Zellen eine punktförmige Immunreaktion mit teilweise hellerem Lumen nachgewiesen. Im gleichen Zellbereich konnte mit einem Orail-Antikörper ebenfalls punktförmige Immunreaktionen mit teilweise hellerem Lumen gezeigt werden. Teilweise war die Immunreaktion von Stim1A und Orail im apikalen Teil überlappend oder assoziiert. Im apikalen Zellteil finden während der Spermatogenese die stärksten morphologischen Veränderungen der Sertoli-Zellen statt. Das Remodeling von Zellkontaktseiten von Spermien zu Sertoli-Zellen ist ein kritischer Schritt der Spermienfreisetzung ins Lumen der *Tubuli seminiferi*. Unmittelbar vor der Spermienfreisetzung werden Adhäsionsbereiche von Spermien und Sertoli-Zelle durch letztere internalisiert (Lonnie Russell, 1977). In diesen Adhäsionsbereichen konnte tubulobulbäre Komplexe (TBC) nachgewiesen werden. Die genaue Funktion der TBCs konnte bis dato noch nicht eindeutig geklärt werden. Seit ihrer Entdeckung 1976 wurden diverse Hypothesen darüber aufgestellt:

1. TBC dienen als eine Art Anker der Spermien, um eine vorzeitige Freisetzung unreifer Spermien entgegenzuwirken (Russell & Clermont, 1976)
2. TBCs dienen als Möglichkeit, überschüssiges Zytosol der Spermien durch Internalisierung zu eliminieren (Russell, 1980)
3. TBCs sind notwendig, um Zellmaterial von Acrosomen sowie dem subacromalen Zwischenraum Abzubauen (Tanii et al., 1999)

4. TBCs sind für die Internalisierung von interzellulären Junctions verantwortlich, um a) im apikalen Bereich der Sertoli-Zelle die Freisetzung der Spermien und b) im basalen Bereich der Sertoli-Zelle die Translokation der Spermatozyten zu induzieren (Russell, 1979b; Russell et al., 1988; Vogl, 1989).

Für letztes sprechen mehrere Argumente, wie zum einen die Ähnlichkeiten zur generellen Clathrin-basierter Endozytose in anderen Zelltypen (Taylor et al., 2011). TBC konnten unter anderem mit den endosomalen Markern Rab5 (Young et al., 2012) und EEA1 (Young et al., 2009b) sowie LAMP1, SGP1 und PKCa (Guttman et al., 2004b) in Verbindung gebracht werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die internalisierten Membranen der TBCs Rab11 positiv waren, einem Marker des 'long-loop' Recycling Signalwegs von Vesikeln. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass internalisierte Proteine sowie Komponenten der TBCs von der Sertoli-Zelle recycelt und erneut zu Bildung neuer Junctions verwendet werden (Vogl et al., 2013), wie möglicherweise auch Orail und Stim1A. Hierfür spricht das hellere Lumen der punktförmigen Proteinspezies. Ob es sich tatsächlich um Orail-enthaltende Vesikel handelt, könnte mittels Ko-Färbung mit einem der endosomalen Markern, wie Rab5 überprüft werden. Obwohl TBCs einzigartig für Sertoli-Zellen sind, weisen die Komplexe außerdem starke Ähnlichkeiten mit Podosomen der Osteoklasten und glatten Muskelzellen (Ochoa et al., 2000) auf. Welche Rolle das ER spielt, welches mit dem TBC Bulbus assoziiert ist, ist bis dato ungeklärt.

Im Stim1-spleißdefizienten Mausmodell C57BL/610A führte die fehlende Expression von Stim1A zu einer Änderung der Lokalisierung des Antikörpers, der nur ungespleißtes Stim1 erkennt (\emptyset Stim1A): Statt starker Immunreaktivität im Bereich der Spermienköpfe verteilte sich \emptyset Stim1A gleichmäßig entlang des ERs der Sertoli-Zelle, hauptsächlich als \emptyset Stim1A-Cluster. Da die Spezifität des Antikörpers gegen Stim1A in der Überexpression verifiziert wurde, wäre erwartet worden, dass der Antikörper in den Sertoli-Zellen der C57BL/610A Mäuse keine Proteinspezies erkennt, was für den basalen Bereich der Zellen auch zutraf. Allerdings erkannte der Antikörper die gleiche punktförmige Immunreaktion mit teilweise hellerem Lumen, wie in den wildtypischen Mäusen mit Stim1A Expression. Dieses Ergebnis entkräftet die anhand der Daten der C57BL/6 Mäuse aufgestellten Hypothese, dass es sich bei diesen Bereichen um Stim1A in Vesikeln internalisierte TBCs handeln könnte. Das Peptid, gegen welches der Antikörper gerichtet ist, deckt 17 von 31 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von Domäne A ab. Die Aminosäureabfolge CSASAGSDDQSLWKYPA ist für Domäne A spezifisch. Im Protein-Blast wurde kein Protein gefunden, welches die vollständige

Sequenz ebenfalls lückenlos exprimiert. Welche Proteinspezies der Stim1A-Antikörper in diesem Zellbereich erkennt, bleibt ungeklärt. Die Lokalisierung von Orail wurde nicht durch die Abwesenheit von Stim1A beeinflusst. Um die Rolle von Orail in Bezug auf TBCs zu untersuchen, würde sich die Ratte als Modellorganismus besser eignen als die Maus, da die Ratte mit 24 TBC pro hakenförmigem Spermienkopf der Modellorganismus mit der höchsten Anzahl von TBCs ist (L. D. Russell & Malone, 1979).

Anhand der negativ-Kontrolle lassen sich folgende Aussagen über die Lokalisierung von Stim1A und ØStim1A in Sertoli-Zellen treffen:

- Stim1A ist über das ER der Sertoli-Zelle gleichmäßig verteilt
- Wenn Stim1A exprimiert wird, lokalisiert ØStim1A dominant in einer Region um die Spermienköpfe
- Ohne Stim1A Expression lokalisiert ØStim1A gleichmäßig über das ER der Sertoli-Zelle verteilt und nicht mehr dominant in Regionen um die Spermienköpfe. Vermutlich übernimmt ØStim1A die Funktion von Stim1A im basalen Bereich. Dies könnte erklären, warum die Gesamtmenge an -Stim1 auch ohne Expression der Spleißvarianten konstant bleibt (Abb. 11)

Die Lokalisierung von Stim1A und ØStim1A deutet darauf hin, dass die beiden Calciumsensoren unabhängig voneinander die Calciumhomöostase in verschiedenen Bereichen der Sertoli-Zelle regulieren. Anhand der C57BL/610A Mäuse kann nur bedingt auf die Funktion von Stim1A geschlossen werden, da ebenfalls die Expression aller anderen C-terminalen Spleißvarianten unterbunden wird. Die Spleißdefizienz ist nicht letal. Ob sie sich auf die Vitalität, Seneszenz oder das Verhalten auswirkt, wurde noch nicht analysiert. Des Weiteren sind C57BL/610A-Mäuse fertil, mit ähnlich großen Wurfgrößen wie die C57BL/6-Wildtypmäuse. Dies könnte auf die Erkenntnis zurückzuführen sein, dass ohne Expression von Stim1A in Testis die Gesamt-Stim1 Expression gleich hoch bleibt und so eine Kompensation stattfindet. Möglicherweise wirkt sich die durch die Spleißdefizienz induzierte Translokation von Stim1 auf die Geschwindigkeit der Spermatogenese und Menge oder Qualität der produzierten Spermien aus. Die Anzahl der Spermien in verschiedenen Hodenabschnitten wie *Rete testis*, *Ductus efferentes*, *Ductus epididymidis* könnte numerisch bestimmt werden. Die Geschwindigkeit der Spermatogenese könnte mittels Stressverpaarung untersucht werden, bei der ein Männchen nur für kurze Zeit mit einem Weibchen verpaart wird und anschließend direkt zur Verpaarung mit den nächsten Weibchen eingesetzt wird. Ist

die Geschwindigkeit der Spermatogenese reduziert werden die Männchen nicht in der Lage sein, alle Weibchen zu befruchten.

5.4 Interaktionspartner

Woran binden STIM1, STIM1A und STIM1A D503A?

Bis Dato konnten diverse Interaktionspartner von STIM1 und ORAI1 identifiziert werden, die direkt oder indirekt in der Feinregulation dieser Proteine und somit auch des SOCE involviert sind. Bei STIM1-Interaktionspartnern unterscheidet man nicht nur in ER-luminale und zytosolische Interaktionspartner, sondern auch in Interaktionspartner im Ruhezustand oder nach Aktivierung. Des Weiteren wird differenziert, wie bzw. ob sich die Interaktion auf STIM1 auswirkt oder welche Wirkung STIM1 auf seinen Interaktionspartner hat. Die ER-luminalen Interaktionspartner wie ERp57 (bindet an C49, C56, Prins et al., 2011) oder Surf4 (Fujii et al., 2012) sind deutlich weniger erforscht als die zytosolischen Vertreter. Ein prominenter STIM1-Interaktionspartner ist das Protein SARAF. Es interagiert im aktiven Zustand von STIM1 mit AS384-389 innerhalb der CAD/SOAR-Domäne und beeinflusst die Ca^{2+} abhängige Inaktivierung von SOCE mittels Deoligomerisation von STIM1 (Albarran et al., 2016; Palty et al., 2012). Zwei weitere bekannte STIM1-Interaktionspartner sind STIMATE, welches die Konformationsänderung von STIM1 unterstützt (bindet AS233-343 in CC1, Jing et al., 2016), sowie APC, das das Poly-Lysin-Motiv bindet und hilft, STIM1 zur Plasmamembran zu rekrutieren (bindet AS671-685, Asanov et al., 2013). Zwei Interaktionspartner, die bei vollem Calciumspeicher mit STIM1 interagieren, sind CDK1, welches die Clusterbildung von STIM1 inhibiert (bindet an AS S486 und S668, Smyth et al., 2009) und EB1, welches mittels Interaktion mit Mikrotubuli die dynamische Bewegung von STIM1 entlang der ER-Membran vermittelt (bindet an AS642-645, Poth et al., 2020; Grigoriev et al., 2008; Pozo-Guisado et al., 2013; Sampieri et al., 2009). STIM1 ist darüber hinaus an der Suppression von $\text{Ca}_v1.2$ beteiligt (bindet mit 344-442 CAD/SOAR, Wang et al., 2010). Ein weiterer, gut erforschter Interaktionspartner von STIM1 ist Calmodulin (bindet an AS 671-685). An STIM1 gebundenes CaM vermittelt die langsame Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung von Orail (*engl. Slow Ca^{2+} -Dependent Inactivation*, SCDI; Bhardwaj et al., 2020; Frischauf et al., 2008; Liu et al., 2012; Mullins et al., 2009). Die Bindungsstellen der Interaktionspartner an STIM1 verteilen sich über das gesamte Protein und decken Motive von 3-110 Aminosäuren ab. Deshalb wurde untersucht, ob sich durch das

Einspleißen von Domäne A eine neue Interaktionsseite ergibt oder Interaktion dadurch verhindert wird. Da zu diesem Zeitpunkt noch kein Gewebe identifiziert war, in dem die Expression von STIM1A in Relation zu Gesamt-STIM1-Expression hoch war, wurde der Versuch nach Überexpression in HEK STIM1/2^{-/-}-Zellen durchgeführt. Retrospektiv wäre eine Immunpräzipitation von endogen exprimiertem STIM1 bzw. STIM1A vorzuziehen, da das Proteom in HEK293-Zellen vermutlich nicht dem von hoch spezialisierten Zellen wie Sertoli-Zellen oder Astrozyten gleicht. Allerdings wäre für ein solches Experiment zu diesem Zeitpunkt eine spleißspezifische Knock-Out-Maus benötigt worden. Demgegenüber steht die Tatsache, dass z. B. der Interaktionspartner STIMATE ebenfalls im Proteom von HEK293-Zellen identifiziert wurde (Jing et al., 2016). Außerdem war es durch die Überexpression *in vitro* möglich, den SOCE mittels TG gezielt zu aktivieren. Für den massenspektrometischen Screen wurde der aktive Status von STIM1(A(D503A)) gewählt, da Unterschiede in der Calciumhomöostase nur nach Aktivierung des SOCE gefunden wurden. Dabei wurde impliziert, dass der Interaktionspartner direkten Einfluss auf den STIM1A-induzierten SOCE haben würde. Bindungspartner im Ruhezustand wurden für diesen Screen nicht untersucht. N-terminal HA-markiertes STIM1, STIM1A und die Punktmutante STIM1A D503A wurden mittels anti-HA Agarose aus den Proben angereichert. Als weiteren Tag enthielten die STIMs ein mCherry Tag hinter aa L599, identisch mit den Konstrukten die zur FRET Analyse eingesetzt wurden. Dass die Anwesenheit des mCherry Tags mit einem Molekulargewicht 28.8 kDa mögliche Interaktionen beeinflusst, lässt sich nicht ausschließen. Rückblickend lässt sich sagen, dass ein STIM1(A(D530A))-Konstrukt als IRES-mCherry oder P2A-mCherry eine bessere Wahl gewesen wäre, da diese Konstrukte Rückschlüsse auf die Expressionsstärke zulassen, ohne auf die Eigenschaften von STIM1(A(D503A)) Einfluss zu nehmen. Im Proteininput des Kontroll blots ist eine dominante Proteinspezies mit dem berechneten Molekulargewicht von 106,9 kDa erkennbar, das STIM1(A(D503A)) mit HA- und mCherry-Tag entspricht (Abb. 34). Demgegenüber ist die dominante Proteinspezies des Eluats das 77 kDa große STIM1(A(D503A)) ohne mCherry-Tag. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass mCherry und die dahinterliegenden AS von STIM1 bereits in der Zelle zu einem Teil abgespalten wurden. So würde nur bereits gespaltenes STIM1 präzipitiert. Falls die Spaltung vor dem mCherry-Tag entstanden wäre, hätte das Protein rein rechnerisch eine Größe von 68,41 kDa aufweisen müssen, was deutlich zu leicht für die mittels Western Blot identifizierte Proteinspezies ist. Des Weiteren befindet sich kurz vor dem C-terminalen Tag eine

Schnittstelle für Calpain 2 bei AS584. Daraus würde sich ein STIM1 mit der Länge von 66,78 kDa ergeben, was ebenfalls zu leicht für die dominante Proteinspezies des Eluats ist. Erstaunlicherweise wurde bei der massenspektrometrischen Analyse keiner der bereits bekannten und beschriebenen Interaktionspartner gefunden. Lediglich das *Calmodulin-like Protein 5* wurde in den Proben als möglicher Interaktionspartner ausgemacht. Bei der Interaktionsanalyse von Membranproteinen wie STIM1 ist die Solubilisierung der kritische Schritt der erfolgreichen Immunpräzipitation. Aufgrund der inhärenten Hydrophobizität und Tendenz zu aggregieren (Prados-Rosales et al., 2019) muss für jedes POI die optimalen Bedingungen zum schonenden Herauslösen aus der Membran und integrieren in den Mizellen des Lösemittel gefunden werden. Für dieses Experiment wurde Dodecyl- β -D-maltosid (DMD) als Detergenz eingesetzt. Detergenzien sind amphiphatische Substanzen mit einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Schwanz. Das nicht-ionische DMD ist ein sehr mildes Lösemittel, welches die Proteine nicht denaturiert. Allerdings ist die Solubilisierungseffizienz geringer als die der häufiger verwendeten Detergenz Natrium Dodecyl Sulfat (SDS). Dies könnte erklären, warum z. B. die PM-Proteine Orai1-3 nicht im Screen gefunden wurden. Bei einer möglichen Wiederholung des Versuchs könnten auch andere Detergenzien wie Digitonin, TweenTM 20, Triton X 100, C12E8 oder Dodecyldimethylaminoxid verwendet werden, um DMD als Fehlerquelle ausschließen zu können. Ein weiterer differenzieller Versuchsansatz wäre, statt der Immunpräzipitation von STIM1 eine intrazelluläre Biotinylierung von möglichen STIM1-Interaktionspartnern via inklonierter Ascorbat Peroxidase 2 (APEX2) zu erreichen. Die Peroxidase katalysiert unter Verbrauch von H₂O₂ die Oxidation von Biotin-Phenol zu Biotin-Phenoxy. Das entstehende Radikal kann an elektronenreichen Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung binden (Lam et al., 2014; Martell et al., 2012). Fusioniert man in diesem Fall STIM1 mit APEX2, können durch die Oxidationsreaktion umliegende Proteine im Radius von <20nm von STIM1 mit Biotin-Phenoxy markiert werden. So können auch transiente Interaktionspartner identifiziert werden. Nach Massenspektrometrie ergaben sich für STIM1(A(D503A)) 213 potentielle Interaktionspartner die anhand der Kriterien CRAPome, Anwesenheit in der Negativkontrolle, LFQ-Mittelwert, P-Wert zwischen STIM1, STIM1A und STIM1A D503A, Expression nach BioGPS und Lokalisierung in der Zelle auf 25 Kandidaten reduziert wurden. Obwohl die Auswahl der Kandidaten anhand von mehreren konkreten Kriterien getroffen wurde ist zu erwähnen, dass die Schwellenwerte für die Wahrscheinlichkeit der Interaktion subjektiv getroffen wurden. Falls ein Interaktionspartner für den negativen Ca²⁺ Phänotyp der Spleißvariante STIM1A verantwortlich wäre, war

vermutet worden, einen Interaktionspartner zu identifizieren, der ausschließlich mit STIM1A interagiert, nicht aber mit STIM1 oder der Punktmutante STIM1A D503A bzw. *vice versa*. Auffallend war, dass bei allen Kandidaten bei denen sich die LFQ Werte signifikant zwischen STIM1 und STIM1A unterschieden, eine stärkere Abundanz in Anwesenheit von STIM1 zeigten (Tabelle 8). Ausschließlich CYB5R3 und Flotilin zeigten eine stärkere Abundanz in der MS-Analyse nach Expression von STIM1A. Des Weiteren wurde unter den signifikant unterschiedlichen Kandidaten kein Protein gefunden, dessen LFQ-Werte signifikant differenziell für STIM1A und die Punktmutante STIM1A D503A waren. Dies spricht dafür, dass kein Interaktionspartner für den dominant-negativen Ca^{2+} -Phänotyp von STIM1A verantwortlich ist.

Eine Auswahl der Kandidaten wurde nach Überexpression mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation auf Interaktion mit STIM1(A) getestet. Wie alle Protein-Protein Interaktionsassays kann der BiFC-Assay sowohl falsch positive, als auch falsch negative Ergebnisse liefern. Wird diese Art des Interaktionsnachweis als finaler Nachweis ohne anschließende Ko-IP gewählt müssen die folgenden Punkte beachtet werden, die kritisch für eine verlässliche Interaktionsanalyse sind (Kudla & Bock, 2016):

1. Die koexprimierten Proteine müssen in gleicher Weise exprimiert werden, was im Falle der Überexpression mittels qPCR oder Western Blot bestätigt werden könnte. Dafür ist es wichtig die Größe der Vektoren und inserierten Kandidaten zu kennen und equimolar einzusetzen.
2. Verlässliche Positiv- und Negativkontrollen. Die beste Negativkontrolle ist das halbe YFP, fusioniert mit einem Protein, von dem bereits gezeigt werden konnte, dass es nicht mit dem Interaktionspartner, in diesem Fall STIM1, interagiert. Vektoren mit YFP aber ohne POI dürfen nur als adäquate Negativkontrolle verwendet werden, wenn sich Analysen wie Ko-IPs an den BiFC-Assay anschließen.
3. Die Position des Tags ist besonders für Proteine mit Signalsequenzen mit Bedacht zu wählen.
4. Im Idealfall wird die Interaktion sowohl von YFP_N -Protein A + YFP_C -Protein B als auch YFP_C -Protein A + YFP_N -Protein B nachgewiesen.

Für diese Arbeit sollte dieser Assay um potentielle Interaktionspartner nach Massenspektrometrie auf eine tatsächliche direkte Interaktion mit STIM1 oder STIM1A hin untersuchen, ohne für alle Kandidaten eine aufwendige und teure Ko-IP durchzuführen. Nur nach bestätigter Interaktion im BiFC-Assay sollte für ausgewählte Kandidaten eine KO-IP

erfolgen. Deshalb war es zu vernachlässigen, dass weder Punkt 1,2 oder 4 erfüllt wurden. Für STIM1 wurden sieben Proteine mit einer hohen Interaktionswahrscheinlichkeit detektiert. Zwei der sieben, Superoxiddismutase 1 und Phosphodiesterase 8B (PDE8B), zeigten demgegenüber eine deutliche, aber nicht signifikant reduzierte Interaktion mit STIM1A (Abb. 35). Die Interaktion der PDE8B wurde ebenfalls mittels Ko-IP untersucht. STIM1(A) konnte präzipitiert werden, allerdings konnte keine an STIM1(A) gebundene PDE8B nachgewiesen werden. Dass dies auf eine fehlerhafte Reaktivität des GFP-Antikörpers zurückgeführt werden kann, wurde mittels den Fraktionen „Input“ und „Ungebunden“ ausgeschlossen. Mit einem LFQ-Mittelwert von 37627 war die PDE8B in der Probe nach STIM1-Expression 5,3-fach stärker abundant als nach Expression von STIM1A. Ein solcher Unterschied konnte mittels IP nicht nachgewiesen werden. Für den Versuch wurden die gleichen STIM1(A)-Konstrukte Reagenzien und Puffer verwendet, wie bei der Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse. Dies lässt eine transiente und nicht stabile Interaktion von STIM1(A) und zu harsche Detergenzien als Fehlerquellen ausschließen. Möglicherweise inhibiert die C-terminale Insertion eines partiellen YFP Molekül die Interaktion von PDE8B mit STIM1. Da der Versuch wiederholt zum gleichen Ergebnis führt, kann fehlerhafte Handhabung ebenfalls mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit, eine transiente oder schwache Interaktion von STIM1(A) mit der PDE8B nachzuweisen wäre das intrazelluläre Crosslinken beider Proteine nach Überexpression. Dafür könnte z. B. Dithiobis Succinimidylpropionat (DSP), ein Zellmembran-permeabler Crosslinker, verwendet werden. Nach dem Crosslinken könnte STIM1(A) präzipitiert und auf Interaktion mit der PDE8B mittels Western Blot getestet werden. Bei dieser Methode würden allerdings auch andere Proteine in räumlicher Nähe zu STIM1(A) präzipitiert werden.

In diesem Teil der Arbeit konnten mehrere neue potentielle Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Nach Sortierung der Kandidaten konnte die Interaktion mit STIM1(A) mittels BiFC-Assay bestätigt werden. Es konnte allerdings nicht, wie erhofft, ein Spleißvarianten-spezifischer Interaktionspartner gefunden werden. Eine Interaktion von STIM1(A) und PDE8B konnte auf Ebene der Ko-Immünpräzipitation nicht bestätigt werden.

5.5 Physiologische Funktion: NFAT-Translokation

Weshalb wird STIM1A exprimiert?

Calciumkonzentrationen des Zytosols beeinflussen indirekt die Lokalisierung und Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT. Obwohl aufgrund des Namens „Transkriptionsfaktor von aktivierten T-Zellen (*engl. Nuclear factor of activated T-cells*, NFAT)“ angenommen werden könnte, dass NFAT nur für T-Zellen und das Immunsystem relevant ist (Crabtree & Olson, 2002), konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor ebenfalls für Entwicklung und Funktion von anderen Gewebe, wie dem kardiovaskulären System (Graef et al., 2001), Skelettmuskel (Hill-Eubanks et al., 2003) und dem Nervensystem (Graef et al., 1999; Nguyen & Di Giovanni, 2008) von größter Wichtigkeit ist. Die Familie der NFAT Gene besteht aus den fünf Mitgliedern NFATC1, NFATC2, NFATC3, NFATC4, NFAT5 und deren Spleißvarianten (Vihma et al., 2008). Während NFATC1 auf Proteinebene nur in Knochenmark und lymphoidem Gewebe exprimiert wird, wird NFATC2 in variierenden Mengen nahezu ubiquitär exprimiert. Auch in testikulären Sertoli-Zellen konnte NFATC2 auf Proteinebene nachgewiesen werden (<https://www.proteinatlas.org>). Die Aktivierung von NFAT erfolgt über die Ca^{2+} -abhängige Dephosphorylierung spezifischer Phosphate durch die Phosphatase Calcineurin (CaN). Nur im weitestgehend de-phosphorylierten Zustand kann NFAT in den Nukleus translozieren und als Transkriptionsfaktor fungieren. Die NFAT-Translokation wird durch die Bindung von STIM1 und STIM2 an Orai1 und den anschließenden SOCE getriggert (Son et al., 2020). Außerdem konnte ein direkter, Ca^{2+} -unabhängiger Einfluss von STIM1 auf die NFAT-Translokation nachgewiesen werden, da die Expression eines STIM1 Konstrukt ohne C-terminale polybasische Domäne die Translokation von NFAT reduziert, demgegenüber aber keine Auswirkungen auf den SOCE hat (Son et al., 2020). Weiter ist für NFAT bekannt, dass höhere Calciumkonzentrationen zu einer verstärkten Translokation des Transkriptionsfaktors führen und geringere $[\text{Ca}^{2+}]$ Translokation weniger stark induzieren (Kar et al., 2011).

Neben der physiologischen Funktion von STIM1A als Feinregulator der Ca^{2+} -Homöostase konnte in dieser Arbeit die Beteiligung von STIM1A an der Regulation der NFAT-Translokation nachgewiesen werden, da die Überexpression der Spleißvariante die Translokation von NFAT gegenüber des wildtypischen STIM1 unerwarteterweise begünstigt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Punktmutation STIM1A D503A die NFAT-Translokation nicht beeinflusst (Abb. 37), obwohl sie zu einer Erhöhung des

Calciumeinstroms führt (Abb. 25, 39). Diese Diskrepanz lässt die Annahme zu, dass Calcium zwar für die NFAT-Translokation über den CaM/CaN-Signalweg relevant ist, allerdings nicht die absoluten Mengen des globalen zytosolischen Calciums, und dass der Effekt von STIM1A auf die Translokation von NFAT unabhängig von der reduzierten Aktivierung von ORAI Kanälen ist. Dafür sprechen auch Ergebnisse von Son et al. (2020), die zeigen, dass die Translokation von NFAT nicht linear proportional mit SOCE ist. Die Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Translokation des Transkriptionsfaktors in der Tat durch das Spleißevent von Domäne A und nicht durch die absolute $[Ca^{2+}]$ beeinflusst wird.

Als Gegenspieler der Phosphatase CaN, welche Calcium abhängig NFAT dephosphoryliert, sind in der Literatur hauptsächlich die Proteinkinasen CK1 und DYRK2 beschrieben (Müller & Rao, 2010). Es wurde allerdings ebenfalls gezeigt, dass eine Mutation der PKA Phosphorylierungsseite sich auf die transkriptionale Aktivität von NFAT auswirkt (Chow & Davis, 2000). Da die PKA cAMP abhängig ist und die in Interaktionsanalysen identifizierte Phosphodiesterase 8B (PDE8B) die Umsetzung von cAMP zu AMP katalysiert, könnte die PDE8B indirekt die NFAT-Translokation beeinflussen. Hohe PDE8B-Expression und –Aktivität, bedingen einen niedrigeren cAMP-Level und einhergehender Reduktion der PKA-Aktivität, was wiederum zu einer verringerten Inaktivierung durch Dephosphorylierung von Orail durch die PKA führen könnte. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von S34 in einer verringerten Translokation von NFAT resultiert (Zhang et al., 2019). Für die Verwendung des spezifischen PDE8-Inhibitor PF-04957325 war deshalb erwartet worden, dass steigende cAMP-Level mit einhergehender Steigerung der PKA-Aktivität in reduzierter NFAT-Translokation in den Nukleus resultiert. Allerdings wurde für STIM1, als auch für STIM1A ein gegenteiliger Phänotyp beobachtet: Die Inkubation mit PF-04957325 erhöhte die Geschwindigkeit und Gesamtmenge von NFAT im Kern signifikant (Abb. 38). Eine naheliegende Erklärung für die durch PF-04957325 gesteigerte NFAT-Translokation wäre die Erhöhung des zytosolischen Calciums durch die Inkubation mit PF-04957325 gewesen, welche allerdings in Calciumimaging-Experimenten widerlegt werden konnte: Die Anwesenheit von PF-04957325 führte weder zu einem Anstieg des basalen Calciums, noch des SOCE (Abb. 39). Auch die Ergebnisse der Experimente mit dem PDE8-Inhibitor sprechen dafür, dass die absolute Menge des zytosolischen Calciums nicht ausschlaggebend für die Stärke der NFAT-Translokation ist. Eine weitere mögliche Erklärung für die gesteigerte NFAT Translokation ist die Inkubationsdauer mit dem PDE8-Inhibitor. Für den PDE4-Inhibitor Rolipram konnte in Endothelzellen menschlicher Nabelschnurvenen (*engl. human umbilical vein endothelial*

cells, HUVEC) gezeigt werden, dass eine Kurzzeitinkubation von 2 min gegenüber einer Langzeitinkubation von 8 h in differenziellen Effekten auf das cAMP-Level resultierten (Campos-Toimil et al., 2008). Die cAMP-Level erhöhten sich in der Kurzzeitinkubation durch das Blocken der Phosphodiesterase 4. Nach 8 Stunden Inkubation der Zellen mit Rolipram in der gleichen Konzentration reduzierte sich das cAMP-Level gegenüber der Kontrollgruppe. Außerdem waren sowohl Aktivität als auch Expression der PDE4A und PDE4B signifikant erhöht, vermutlich als Kompensationsmechanismus, um dem Abbau von cAMP entgegenzuwirken (Campos-Toimil et al., 2008). Eine Reduktion des cAMP-Levels durch Hochregulierung der PDE8B könnte eine verstärkte Translokation von NFAT erklären. Dabei ist zu beachten, dass die Zellen in Experimenten dieser Arbeit nur für 2 h mit PF-04957325 präinkubiert wurde, nicht 8 h wie in Campos-Toimil et al. Bei einer Synthesegeschwindigkeit von 3,79 kB/min der humanen RNA-Polymerase 2 (Singh & Padgett, 2009) und Translationsgeschwindigkeit von 5 Aminosäuren/s (Olofsson et al., 1987) wäre es durchaus möglich, dass bereits nach 2 h die Proteinlevel der PDE8B als Kompensationsmechanismus gegen dem Inhibitor ansteigen, was mittels Western Blot überprüft werden könnte. Außerdem könnte der direkte Einfluss von STIM1(A) auf die cAMP-Level z. B. mittels EIA (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) oder dem cAMP-Sensor R-Flinca (Ohta et al., 2018) und PDE8B-Aktivität z. B. mittels einem radioenzymatischen Assay gemessen werden, bei dem [³H]-cAMP eingesetzt wird. In der massenspektrometrischen Analyse und im BiFC-Assay wurde gezeigt, dass STIM1 in stärkerem Maße mit der PDE8B interagiert, als STIM1A (Abb. 35). Deshalb war für die Verwendung von PF-04957325 erwartet worden, dass ein Blocken der PDE8B sich stärker auf die STIM1-induzierte NFAT-Translokation auswirken würde als auf die Translokation nach Expression von STIM1A, was in der Tat bestätigt werden konnte (Abb. 38). Der starke und differenzielle Effekt des PDE8-Inhibitors PF-04957325 spricht entgegen der Immunpräzipitation aus Kapitel 4.4.4 deutlich dafür, dass es sich bei der PDE8B tatsächlich um einen neuen STIM1-Interaktionspartner handelt, welcher in geringerem Maße ebenfalls mit der C-terminalen Spleißvariante STIM1A interagiert. Die starken differenziellen Effekte der STIM1-Varianten nach Inhibition der PDE8B deuten eventuell auf eine PKA unabhängige cAMP-modulierte NFAT Translokation hin. In Kardiomyozyten führte die Verwendung des β -Adrenozeptor-Agonist Isoproteranol zu einer Erhöhung der cAMP Level. Über den PKA unabhängigen Epac1-Pathway (*engl. exchange factor directly activated by cAMP*) führte der cAMP-Anstieg zu einer NFAT-induzierten Hyperproliferation und gesteigerten Aktivität der Zellen (Morel et al., 2005). Eine

durch cAMP/Epac1 getriggert Steigerung der NFATc3 und NFATc4 Translokation von Kardiomyozyten konnte ein knappes Jahrzehnt später auch durch eine weitere Arbeitsgruppe reproduziert werden (Aflaki et al., 2014). Hierbei ist der molekulare Mechanismus noch unklar. Ein PKA-unabhängiger Signalweg könnte erklären, warum trotz erhöhten cAMP-Spiegeln, induziert durch das Blocken der PDE8, vermehrt NFAT im Nukleus vorliegt. Inwieweit der Phosphorylierungsgrad von NFAT durch cAMP verändert wird, könnte mittels Western Blot direkt ermittelt werden. Auch sollten weitere Experimente mit Analoga von cAMP, welche entweder PKA aktivieren oder spezifisch den EPAC Signalweg ansteuern, durchgeführt werden, wie z.B. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP bzw. 6-Bnz-cAMP (Almahariq et al., 2013; Leech et al., 2010). Die Relevanz von STIM1 und die Spleißvariante STIM1A für die Regulation der cAMP-Homöostase könnte weitreichende Folgen auf das Transkriptom und daraus resultierend auf den gesamten Zellmetabolismus haben. Die zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausschließbare Übertragung von Phosphatgruppen durch die cAMP-abhängige PKA auf den IP₃ Rezeptor, die SERCA und Orai, wie kürzlich reviewed in Poth & Knapp et al., 2020, würde STIM so auch Komponenten des SOCE Pathways indirekt über ein Art Feedbackloop regulieren.

In die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse (zusammengefasst in Tabelle 25) legen den Grundstein für ein vollständiges Verständnis der stetig wachsenden STIM Proteinfamilie STIM1A als hochkonservierte Spleißvariante, die von großer Bedeutung für die Feinregulation des speicherabhängigen Calciumeinstroms ist. Neben der Relevanz von STIM1A für die Translokation von NFAT könnte die Spleißvariante aufgrund ihres Expressionsmusters ebenfalls für weitere physiologische Funktionen wie für die Fertilität und/oder für die Nährstoffversorgung des Gehirns wichtig sein. Das spleißdefiziente Mausmodell ist, um die Frage Relevanz von *Stim1A in vivo* zu bestimmen, unabdingbar. In Folgeexperimenten könnten so zahlreiche Vitalfunktionen untersucht werden. *In vivo* Imaging-Experimente wären ein denkbarer Ansatz, um die z.B. die Virus-induzierte Lokalisierung von Stim1A im komplexen Netzwerk der Astrozyten zu untersuchen. Da Stim1 im Hoden bisweilen nur wenig beforscht wurde, wäre es weiter von großem Interesse zu überprüfen, ob und in wie fern sich die Spleißvariante auf Fertilität und Hormonsynthese auswirkt. Die Erkenntnisse des NFAT-Translokationsassays bedingen die Fragestellung, ob sich durch alternatives Spleißen von STIM1 sich auf die Proliferation von Zellen auswirkt und somit auch ein Faktor von Tumorwachstum sein könnte.

Tabelle 25 – Zusammenfassung aller gewonnener Erkenntnisse. ↓ = Reduktion, ↑ = Erhöhung, ✓ = bestätigt

Wo wird Stim1A endogen exprimiert?	Wie wirkt sich die Insertion von Domäne A aus?	Woraus resultiert Ca ²⁺ -Phänotyp von STIM1A	Wohin lokalisiert STIM1A in vitro und in vivo?	Woran binden STIM1((A)D503A)? Interaktionspartner	Weshalb wird STIM1A exprimiert? physiologische Funktion
<p><u>Testes:</u> (61,3 %)</p> <p>Herz (61,2 %)</p> <p>Astrozyten (47,8 %)</p> <p>Niere (43,3 %)</p>	<p><u>Überexpression:</u> Influxrate ↓ Δ Peak ↓ Δ Plateau ↓</p> <p><u>Knock down</u> Influxrate ↑ Δ Peak ↑ Δ Plateau ↑</p> <p><u>Calciumspeicher</u> nicht verändert</p> <p><u>Clustergröße</u> nicht verändert</p> <p><u>murine Orail-3</u> Aktivierung ✓ SOCE Parameter ↓</p> <p><u>humane ORAI1-3</u> Aktivierung ✓ SOCE Parameter ↓</p> <p><u>Interaktion mit ORAI1</u> nicht verändert</p> <p><u>Kolokalisierung mit ORAI1</u> nicht verändert</p>	<p><u>Verantwortliche Aminosäuren</u> S502 D503</p> <p>identifiziert durch Mutationsanalyse</p> <p><u>Phosphorylierung von S502</u> nicht relevant</p> <p>identifiziert durch phosphomimetische Mutation</p> <p><u>beeinflusst das N-terminale Gating von ORAI1</u> identifiziert durch ORAI1R77E</p>	<p><i>in vitro</i> STIM1A kolokalisiert mit STIM1 in HEK293-Zellen</p> <p><i>ex vivo</i> <u>C57BL/6 wt</u> Stim1A Gleichmäßig über Sertoli-Zell-ER verteilt Stim1 dominant in Region um Spermienköpfe</p> <p><u>C57BL/6 10A</u> Stim1A nicht exprimiert Stim1 Gleichmäßig über Sertoli-Zell-ER verteilt Gesamtprotein-Menge: konstant</p>	<p><u>Massenspektrometrie</u> 213 potentielle Hits</p> <p><u>Analyse</u> CRAPome, Negativkontrolle, LFQ-Mittelwert, P-Wert Expression BioGPS Lokalisierung Reduktion auf 25 Hits</p> <p><u>BifC identifizierte Interaktionspartner</u> SYT2, Flotilin, Shroom3, Spastin, CYBR53, LOXHD1 CACNA1G, PDE8B CACNA1C, SOD1</p> <p><u>Ko-IP</u> STIM1(A)+PDE8B Nicht detektierbar</p>	<p>NFAT Translokation in den Nukleus ↑</p> <p><u>Inhibition PDE8B</u> ↑ STIM1(A)-induzierte NFAT-Translokation Stärkeren Effekt auf STIM1</p> <p>Bestätigt Interaktion mit PDE8B</p> <p>keine Auswirkung auf SOCE</p>

Literaturverzeichnis

- Aaron, J. S., Taylor, A. B., & Chew, T.-L. (2018). *Image co-localization-co-occurrence versus correlation*. <https://doi.org/10.1242/jcs.211847>
- Aflaki, M., Qi, X. Y., Xiao, L., Ordog, B., Tadevosyan, A., Luo, X., Maguy, A., Shi, Y., Tardif, J. C., & Nattel, S. (2014). Exchange protein directly activated by cAMP mediates slow delayed-rectifier current remodeling by sustained β -adrenergic activation in guinea pig hearts. *Circulation Research*, *114*(6), 993–1003. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302982>
- Alansary, D., Peckys, D. B., Niemeyer, B. A., & De Jonge, N. (2020). Detecting single ORAI1 proteins within the plasma membrane reveals higher-order channel complexes. *Journal of Cell Science*, *133*(1). <https://doi.org/10.1242/jcs.240358>
- Albarran, L., Lopez, J. J., Amor, N. Ben, Martin-Cano, F. E., Berna-Erro, A., Smani, T., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2016). Dynamic interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to modulate store-operated calcium entry. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep24452>
- Almahariq, M., Tsalkova, T., Mei, F. C., Chen, H., Zhou, J., Sastry, S. K., Schwede, F., & Cheng, X. (2013). A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. *Molecular Pharmacology*, *83*(1), 122–128. <https://doi.org/10.1124/mol.112.080689>
- Alonso, M. T., Villalobos, C., Chamero, P., Alvarez, J., & García-Sancho, J. (2006). Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium*, *40*(5–6), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.013>
- Ambudkar, I. S. (2007). TRPC1: A core component of store-operated calcium channels. *Biochemical Society Transactions*, *35*(1), 96–100. <https://doi.org/10.1042/BST0350096>
- Amcheslavsky, A., Wood, M. L., Yeromin, A. V., Parker, I., Freites, J. A., Tobias, D. J., & Cahalan, M. D. (2015). Molecular biophysics of Orai store-operated Ca^{2+} channels. *Biophysical Journal*, *108*(2), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.3473>
- Antigny, F., Sabourin, J., Saüc, S., Bernheim, L., Koenig, S., & Frieden, M. (2017). TRPC1 and TRPC4 channels functionally interact with STIM1L to promote myogenesis and maintain fast repetitive Ca^{2+} release in human myotubes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(5), 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.02.003>
- Asanov, A., Sherry, R., Sampieri, A., & Vaca, L. (2013). A relay mechanism between EB1 and APC facilitate STIM1 puncta assembly at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Calcium*, *54*(3), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.06.008>
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(45), 16704–16709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608358103>
- Bagur, R., & Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca^{2+} Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Molecular Cell*, *66*(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>
- Berna-Erro, A., Braun, A., Kraft, R., Kleinschnitz, C., Schuhmann, M. K., Stegner, D., Wulsch, T., Eilers, J., Meuth, S. G., Stoll, G., & Nieswandt, B. (2009). STIM2

- Regulates Capacitive Ca²⁺ Entry in Neurons and Plays a Key Role in Hypoxic Neuronal Cell Death. *Science Signaling*, 2(93), 1–11.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2000522>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529.
<https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 1, Issue 1, pp. 11–21). European Association for Cardio-Thoracic Surgery.
<https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bhardwaj, R., Augustynek, B. S., Ercan-Herbst, E., Kandasamy, P., Seedorf, M., Peinelt, C., & Hediger, M. A. (2020). Ca²⁺/calmodulin binding to STIM1 hydrophobic residues facilitates slow Ca²⁺-dependent inactivation of the Orai1 channel. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 54(2), 252–270. <https://doi.org/10.33594/000000218>
- Biedler, J. L., Helson, L., & Spengler, B. A. (1973). Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Research*, 33(11).
- Boyman, L., Mikhasenko, H., Hiller, R., & Khananshvili, D. (2009). Kinetic and equilibrium properties of regulatory calcium sensors of NCX1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6185–6191. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809012200>
- Boyman, L., Williams, G. S. B., Khananshvili, D., Sekler, I., & Lederer, W. J. (2013). NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 59, pp. 205–213). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.012>
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., & Meyer, T. (2007). *STIM2 is a Feedback Regulator that Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Levels*. 131(7), 1327–1339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.039>.STIM2
- Bravo, R., Vicencio, J. M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J. P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, A. E., Verdejo, H. E., Ferreira, J., Iglewski, M., Chiong, M., Simmen, T., Zorzano, A., Hill, J. A., Rothermel, B. A., Szabadkai, G., & Lavandero, S. (2011). Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. In *Journal of Cell Science* (Vol. 124, Issue 13, pp. 2143–2152). The Company of Biologists Ltd.
<https://doi.org/10.1242/jcs.080762>
- Breitbart, H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 139–144.
[https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00704-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00704-3)
- Cai, X., Zhou, Y., Nwokonko, R. M., Loktionova, N. A., Wang, X., Xin, P., Trebak, M., Wang, Y., & Gill, D. L. (2016). The Orai1 store-operated calcium channel functions as a hexamer. *Journal of Biological Chemistry*, 291(50), 25764–25775.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.758813>
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2009). *Campbell Biologie* (8., aktual). Pearson.
- Campos-Toimil, M., Keravis, T., Orallo, F., Takeda, K., & Lugnier, C. (2008). Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced Ca²⁺ responses in endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 154, 82–92. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.56>
- Carrasco, S., & Meyer, T. (2014). *STIM Proteins and the Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions*. 3, 973–1000. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061609-165311>.STIM

- Chow, C.-W., & Davis, R. J. (2000). Integration of Calcium and Cyclic AMP Signaling Pathways by 14-3-3. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(2), 702–712. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.2.702-712.2000>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Collins, H. E., He, L., Zou, L., Qu, J., Zhou, L., Litovsky, S. H., Yang, Q., Young, M. E., Marchase, R. B., & Chatham, J. C. (2014). Stromal interaction molecule 1 is essential for normal cardiac homeostasis through modulation of ER and mitochondrial function. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *306*(8), 1231–1239. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00075.2014>
- Crabtree, G. R., & Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: Choreographing the social lives of cells. In *Cell* (Vol. 109, Issue 2 SUPPL. 1). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00699-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00699-2)
- D'Agostino, A., Menè, P., & Stefanini, M. (1992). Voltage-gated calcium channels in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, *46*, 414–418. <https://doi.org/expand PMID: 1377510> DOI: 10.1095/biolreprod46.3.414
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C. R., Konig, S., & Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *Journal of Cell Biology*, *194*(2), 335–346. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012157>
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Ceroni, D., Bader, C. R., Konig, S., & Bernheim, L. (2010). Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(29), 22437–22447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118984>
- Derler, I., Plenk, P., Fahrner, M., Muik, M., Jardin, I., Schindl, R., Gruber, H. J., Groschner, K., & Romanin, C. (2013). The extended transmembrane orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for orai1 activation by STIM1. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(40), 29025–29034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501510>
- Fahrner, M., Muik, M., Schindl, R., Butorac, C., Stathopoulos, P., Zheng, L., Jardi, I., Ikura, M., & Romanin, C. (2014). A coiled-coil clamp controls both conformation and clustering of stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Journal of Biological Chemistry*, *289*(48), 33231–33244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610022>
- Feske, S. (2019). CRAC channels and disease – From human CRAC channelopathies and animal models to novel drugs. In *Cell Calcium* (Vol. 80, pp. 112–116). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.03.004>
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., & Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, *441*(7090), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>
- Feske, S., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. In *Annual review of immunology* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112212>
- Frischauf, I., Schindl, R., Derler, I., Bergsmann, J., Fahrner, M., & Romanin, C. (2008). The STIM/Orai coupling machinery. In *Channels* (Vol. 2, Issue 4, pp. 261–268). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/chan.2.4.6705>
- Fujii, Y., Shiota, M., Ohkawa, Y., Baba, A., Wanibuchi, H., Kinashi, T., Kurosaki, T., & Baba, Y. (2012). Surf4 modulates STIM1-dependent calcium entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *422*(4), 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.037>
- Giacomello, M., & Pellegrini, L. (2016). The coming of age of the mitochondria-ER contact:

- A matter of thickness. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 23, Issue 9, pp. 1417–1427). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.52>
- Gilson, A. (2016). *Identification of new STIM splice variants and expression in the mouse brain during healthy ageing*. August.
- Golpour, A., Pšenička, M., & Niksirat, H. (2016). Ultrastructural localization of intracellular calcium during spermatogenesis of Sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Microscopy and Microanalysis*, *22*(6), 1155–1161. <https://doi.org/10.1017/S1431927616011958>
- Gorczyńska, E., & Handelsman, D. J. (1991). The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in sertoli cells. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(35), 23739–23744. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54345-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54345-3)
- Graef, I. A., Chen, F., Chen, L., Kuo, A., & Crabtree, G. R. (2001). Signals transduced by Ca²⁺/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell*, *105*(7), 863–875. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00396-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00396-8)
- Graef, I. A., Mermelstein, P. G., Stankunas, K., Hellson, J. R., Delsseroth, K., Tsien, R. W., & Crabtree, G. R. (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*, *401*(6754), 703–708. <https://doi.org/10.1038/44378>
- Graham, S. J. L., Dziadek, M. A., & Johnstone, L. S. (2011). A cytosolic STIM2 preprotein created by signal peptide inefficiency activates ORAI1 in a store-independent manner. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(18), 16174–16185. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.206946>
- Griffiths, E. J., & Rutter, G. A. (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1787*(11), 1324–1333. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.019>
- Grigoriev, I., Gouveia, S. M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J. T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M. O., Putney, J. W., Hoogenraad, C. C., & Akhmanova, A. (2008). STIM1 Is a MT-Plus-End-Tracking Protein Involved in Remodeling of the ER. *Current Biology*, *18*(3), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.050>
- Groschner, K., Grainer, W. F., & Romanin, C. (2017). Store-operated Ca²⁺ entry: (SOCE) Pathways. In *Springer* (Vol. 993). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57732-6_9
- Gross, S. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Freichel, M., Cavalieri, A., & Flockerzi, V. (2007). Murine ORAI2 splice variants form functional Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(27), 19375–19384. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701962200>
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., Hogan, P. G., & Rao, A. (2007). Biochemical and functional characterization of orai proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(22), 16232–16243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609630200>
- Hilgemann, D. W., Nicoll, D. A., & Philipson, K. D. (1991). Charge movement during Na⁺ translocation by native and cloned cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature*, *352*(6337), 715–718. <https://doi.org/10.1038/352715a0>
- Hilgemann, D. W., Yaradanakul, A., Wang, Y., & Fuster, D. (2006). Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *17*(SUPPL. 1), 47–56. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2006.00383.x>
- Hill-Eubanks, D. C., Gomez, M. F., Stevenson, A. S., & Nelson, M. T. (2003). NFAT regulation in smooth muscle. In *Trends in Cardiovascular Medicine* (Vol. 13, Issue 2, pp. 56–62). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(02\)00212-8](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(02)00212-8)
- Hooper, R., Samakai, E., Kedra, J., & Soboloff, J. (2013). Multifaceted roles of STIM

- proteins. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *465*(10), 1383–1396.
<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1270-8>
- Hoth, M., & Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, *359*, 710–713.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., & Long, S. B. (2012). Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel orai. *Science*, *338*(6112), 1308–1313.
<https://doi.org/10.1126/science.1228757>
- Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., Tan, P., Liang, X., Zheng, X., Chen, L., Shi, X., Zhang, S. L., Huang, Y., Dong, M., Walker, C. L., & Hogan, P. G. (2016). Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as regulator of Ca^{2+} -influx. *17*(10), 1339–1347. <https://doi.org/10.1038/ncb3234>. Proteomic
- Kar, P., Nelson, C., & Parekh, A. B. (2011). Selective activation of the transcription factor NFAT1 by calcium microdomains near Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(17), 14795–14803.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.220582>
- Kar, P., Samanta, K., Kramer, H., Morris, O., Bakowski, D., & Parekh, A. B. (2014). Dynamic assembly of a membrane signaling complex enables selective activation of NFAT by orail. *Current Biology*, *24*(12), 1361–1368.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.046>
- Knapp, M., Förderer, K., Alansary, D., Jung, M., Schwarz, Y., Lis, A., & Niemeyer, B. (2020). Alternative splicing switches STIM1 targeting to specialized membrane contact sites and modifies SOCE. *BioRxiv*, 2020.03.25.005199.
<https://doi.org/10.1101/2020.03.25.005199>
- Konrad, M. (2016). Characterisation of the thioredoxin TXNDC15. *Dissertation Dr. Rer Med.*
- Kudla, J., & Bock, R. (2016). Lighting the way to protein-protein interactions: Recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation analyses. *Plant Cell*, *28*(5), 1002–1008. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00043>
- Lacruz, R. S., & Feske, S. (2015). Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1356*(1), 45–79.
<https://doi.org/10.1111/nyas.12938>
- Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K., & Ting, A. Y. (2014). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, *12*(1), 51–54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3179>
- Lee, J. H., Kim, H., Kim, D. H., & Gye, M. C. (2006). Effects of calcium channel blockers on the spermatogenesis and gene expression in peripubertal mouse testis. *Archives of Andrology*, *52*(4), 311–318. <https://doi.org/10.1080/01485010600664024>
- Leech, C. A., Dzhura, I., Chepurny, O. G., Schwede, F., Genieser, H. G., & Holz, G. G. (2010). Facilitation of β -cell KATP channel sulfonylurea sensitivity by a cAMP analog selective for the cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor Epac. *Islets*, *2*(2).
<https://doi.org/10.4161/isl.2.2.10582>
- Leybaert, L., & Sanderson, M. J. (2012). Intercellular Ca^{2+} waves: Mechanisms and function. *Physiological Reviews*, *92*(3), 1359–1392.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2011>
- Li, Z., Lu, J., Xu, P., Xie, X., Chen, L., & Xu, T. (2007). Mapping the interacting domains of STIM1 and Orail in Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(40), 29448–29456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703573200>
- Liou, J., Kim, M., Heo, W., Jones, J., Myers, J., Ferrell, J. J., & Meyer, T. (2005). STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol*,

- 15(13), 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055.STIM>
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., & Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are Store-Operated Ca²⁺ Channels with Distinct Functional Properties. *Curr Biol.*, 17(9), 794–800. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.065.CRACM1>
- Lis, Annette, Zierler, S., Peinelt, C., Fleig, A., & Penner, R. (2010). A single lysine in the N-terminal region of store-operated channels is critical for STIM1-mediated gating. *The Journal of General Physiology*, 136(6), 673–686. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010484>
- Liu, Y., Zheng, X., Mueller, G. A., Sobhany, M., DeRose, E. F., Zhang, Y., London, R. E., & Birnbaumer, L. (2012). Crystal structure of calmodulin binding domain of Orai1 in complex with Ca²⁺ ·calmodulin displays a unique binding mode. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 43030–43041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380964>
- Lomax, R. B., Camello, C., Van Coppenolle, F., Petersen, O. H., & Tepikin, A. V. (2002). Basal and physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26479–26485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201845200>
- Lucchini, O., Ruete, M. C., Bustos, M. A., Quevedo, M. F., & Tomes, C. N. (2016). The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLCε/IP3 mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(4), 544–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.007>
- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J. A., & Lewis, R. S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: Local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *Journal of Cell Biology*, 174(6), 815–825. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604015>
- Lunz, V., Romanin, C., & Frischauf, I. (2019). STIM1 activation of Orai1. In *Cell Calcium* (Vol. 77, pp. 29–38). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.11.009>
- Lyon, K., Adams, A., Piva, M., Asghari, P., Moore, E. D., & Vogl, A. W. (2017). Ca²⁺ signaling machinery is present at intercellular junctions and structures associated with junction turnover in rat Sertoli cells†. *Biology of Reproduction*, 96(6), 1288–1302. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox042>
- Ma, G., Wei, M., He, L., Liu, C., Wu, B., Zhang, S. L., Jing, J., Liang, X., Senes, A., Tan, P., Li, S., Sun, A., Bi, Y., Zhong, L., Si, H., Shen, Y., Li, M., Lee, M. S., Zhou, W., ... Zhou, Y. (2015). Inside-out Ca²⁺ signalling prompted by STIM1 conformational switch. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8826>
- Machaca, K. (2010). Ca²⁺ signaling, genes and the cell cycle. *Cell Calcium*, 48(5), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.017.A>
- Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M. R., Giorgi, C., & Pinton, P. (2018). Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*, 69, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.003>
- Marchi, S., & Pinton, P. (2014). The mitochondrial calcium uniporter complex: Molecular components, structure and physiopathological implications. *Journal of Physiology*, 592(5), 829–839. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268235>
- Martell, J. D., Deerinck, T. J., Sancak, Y., Poulos, T. L., Mootha, V. K., Sosinsky, G. E., Ellisman, M. H., & Ting, A. Y. (2012). Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology*, 30(11), 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/nbt.2375>
- McNally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M., & Prakriya, M. (2013). The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and

- gating CRAC channels. *Journal of Physiology*, 591(11), 2833–2850.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.250456>
- Means, A. R., Dedman, J. R., & Tash, J. S. (1980). Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulating hormone. In *Annual Review of Physiology: Vol. Vol. 42* (pp. 59–70).
<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.42.030180.000423>
- Michelucci, A., García-Castañeda, M., Boncompagni, S., & Dirksen, R. T. (2018). Role of STIM1/ORAI1-mediated store-operated Ca²⁺ entry in skeletal muscle physiology and disease. In *Cell Calcium* (Vol. 76, pp. 101–115). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.10.004>
- Miederer, A.-M., Alansary, D., Schwär, G., Lee, P.-H., Jung, M., Helms, V., & Niemeyer, B. a. (2015). A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nature Communications*, 6, 6899. <https://doi.org/10.1038/ncomms7899>
- Mignen, O., Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2008). Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *Journal of Physiology*, 586(2), 419–425.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.147249>
- Moccia, F., Zuccolo, E., Soda, T., Tanzi, F., Guerra, G., Mapelli, L., Lodola, F., & D'Angelo, E. (2015). Stim and Orai proteins in neuronal Ca(2+) signaling and excitability. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(April), 153.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00153>
- Morel, E., Marcantoni, A., Gastineau, M., Birkedal, R., Rochais, F., Garnier, A., Lompré, A. M., Vandecasteele, G., & Lezoualc'h, F. (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation Research*, 97(12), 1296–1304.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000194325.31359.86>
- Müller, M. R., & Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: A transcription factor comes of age. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 9, pp. 645–656). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2818>
- Mullins, F. M., Chan, Y. P., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15495–15500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906781106>
- Mullins, F. M., & Lewis, R. S. (2016). The inactivation domain of STIM1 is functionally coupled with the Orai1 pore to enable Ca²⁺-dependent inactivation. *Journal of General Physiology*, 147(2), 153–164. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511438>
- Nguyen, T., & Di Giovanni, S. (2008). NFAT signaling in neural development and axon growth. In *International Journal of Developmental Neuroscience* (Vol. 26, Issue 2, pp. 141–145). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.10.004>
- Niemeyer, B. A. (2016). Changing calcium: CRAC channel (STIM and Orai) expression, splicing, and posttranslational modifiers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 310(9), C701–C709. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00034.2016>
- Niu, L., Wu, F., Li, K., Li, J., Zhang, S. L., Hu, J., & Wang, Q. (2020). STIM1 interacts with termini of Orai channels in a sequential manner. *Journal of Cell Science*, 133(8). <https://doi.org/10.1242/jcs.239491>
- Ohta, Y., Furuta, T., Nagai, T., & Horikawa, K. (2018). Red fluorescent cAMP indicator with increased affinity and expanded dynamic range. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20251-1>
- Olofsson, S. O., Boström, K., Carlsson, P., Borén, J., Wettsten, M., Bjursell, G., Wiklund, O., & Bondjers, G. (1987). Structure and biosynthesis of apolipoprotein B. *American Heart Journal*, 113(2 PART 2), 446–452. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(87\)90612-0](https://doi.org/10.1016/0002-8703(87)90612-0)
- Palty, R., Ohana, E., Hershfinkel, M., Volokita, M., Elgazar, V., Beharier, O., Silverman, W.

- F., Argaman, M., & Sekler, I. (2004). Lithium-calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium-calcium exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(24), 25234–25240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401229200>
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., & Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell*, *149*(2), 425–438. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.055>
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., E, R., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Direct*, *136*(5), 876–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.014.STIM1>
- Parker, N. J., Begley, C. G., Smith, P. J., & Fox, R. M. (1996). Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics*, *37*(2), 253–256. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0553>
- Parys, J. B., & Guse, A. H. (2019). Full focus on calcium. *Science Signaling*, *12*(599), 1–4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaz0961>
- Patel, N., Stengel, F., Aebersold, R., & Gold, M. G. (2017). Molecular basis of AKAP79 regulation by calmodulin. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01715-w>
- Peckys, D. B., Alansary, D., Niemeyer, B. A., & de Jonge, N. (2020). Supra-molecular assemblies of ORAI1 at rest precede local accumulation into punctae after activation. In *bioRxiv* (p. 2020.01.13.903856). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.01.13.903856>
- Poth, V., Knapp, M. L., & Niemeyer, B. A. (2020). STIM proteins at the intersection of signaling pathways. *Current Opinion in Physiology*, *17*, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.07.007>
- Potier, M., & Trebak, M. (2008). New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, *457*(2), 405–415. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0533-2.New>
- Pozo-Guisado, E., Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A. M., Martin-Romero, F. J., & Alvarez-Barrientos, A. (2013). Phosphorylation of stim1 at erk1/2 target sites regulates interaction with the microtubule plus-end binding protein eb1. *Journal of Cell Science*, *126*(14), 3170–3180. <https://doi.org/10.1242/jcs.125054>
- Prados-Rosales, R. C., Aragonese-Cazorla, G., Estevez, H., Garcia-Calvo, E., Machuca, A., & Luque-Garcia, J. L. (2019). Strategies for Membrane Protein Analysis by Mass Spectrometry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1140*, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4_16
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, *95*(4), 1383–1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>
- Prins, D., Groenendyk, J., Touret, N., & Michalak, M. (2011). Modulation of STIM1 and capacitative Ca²⁺ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57. *EMBO Reports*, *12*(11), 1182–1188. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.173>
- Prinz, W. A. (2014). Bridging the gap: Membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 205, Issue 6, pp. 759–769). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201401126>
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, *7*(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6)
- Ramesh, G., Jarzembowski, L., Schwarz, Y., Alansary, D., Bruns, D., Correspondence, B. A. N., Poth, V., Konrad, M., Knapp, M. L., Schwä, G., Lauer, A. A., Grimm, M. O. W., & Niemeyer, B. A. (2021). A short isoform of STIM1 confers frequency-dependent synaptic enhancement. *CellReports*, *34*, 108844. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108844>

- Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A. M., Malmersjö, S., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2015). Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *Journal of Cell Biology*, *209*(5), 653–670. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412060>
- Reeves, J. P. (1985). The Sarcolemmal Sodium-Calcium Exchange System. *Current Topics in Membranes and Transport*, *25*, 77–127.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., & Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *Journal of Cell Biology*, *169*(3), 435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>
- Rosado, J. A., Diez, R., Smani, T., & Jardín, I. (2016). STIM and orai1 variants in store-operated calcium entry. *Frontiers in Pharmacology*, *6*(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00325>
- Rossato, M., Bordon, P., Di Virgilio, F., & Foresta, C. (1996). Capacitative calcium entry in rat Sertoli cells. *Journal of Endocrinological Investigation*, *19*(8), 516–523. <https://doi.org/10.1007/BF03349010>
- Rumi-Masante, J., Rusinga, F. I., Lester, T. E., Dunlap, T. B., Williams, T. D., Dunker, A. K., Weis, D. D., & Creamer, T. P. (2012). Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin. *Journal of Molecular Biology*, *415*(2), 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.008>
- Russell, L., & Clermont, Y. (1976). Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *The Anatomical Record*, *185*(3), 259–277. <https://doi.org/10.1002/ar.1091850302>
- Russell, L. D., & Malone, J. P. (1979). Spermatid-sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region of late spermatids of the rat. *The Anatomical Record*, *194*(2), 233–246. <https://doi.org/10.1002/ar.1091940205>
- Russell, Lonnie. (1977a). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, *148*(3), 313–328. <https://doi.org/10.1002/aja.1001480303>
- Russell, Lonnie. (1977b). Observations on rat sertoli ectoplasmic ('junctional') specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue and Cell*, *9*(3), 475–498. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(77\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0040-8166(77)90007-6)
- Sampieri, A., Zepeda, A., Asanov, A., & Vaca, L. (2009). Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: Identification of SERCA2 as a new member. *Cell Calcium*, *45*(5), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.02.010>
- Saiuc, S., Bulla, M., Nunes, P., Orci, L., Marchetti, A., Antigny, F., Bernheim, L., Cosson, P., Frieden, M., & Demaurex, N. (2015). STIM1L traps and gates Orai1 channels without remodeling the cortical ER. *Journal of Cell Science*, *128*(8), 1568–1579. <https://doi.org/10.1242/jcs.164228>
- Schöppe, M. (2017). *Funktionelle Charakterisierung der murinen STIM-Spleißvariante Stim1A*. 1–73.
- Shen, C., Zhang, K., Yu, J., Guo, Y., Gao, T., Liu, Y., Zhang, X., Chen, X., Yu, Y., Cheng, H., Zheng, A., Li, H., Huang, X., Ding, X., & Zheng, B. (2018). Stromal interaction molecule 1 is required for neonatal testicular development in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *504*(4), 909–915. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.044>
- Shuttleworth, T. J. (2012). STIM and Orai proteins and the non-capacitative ARC channels. *Frontiers in Bioscience*, *17*(3), 847–860. <https://doi.org/10.2741/3960>

- Singh, J., & Padgett, R. A. (2009). Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nature Structural and Molecular Biology*, *16*(11), 1128–1133. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1666>
- Smyth, J. T., Petranksa, J. G., Boyles, R. R., Dehaven, W. I., Fukushima, M., Johnson, K. L., Williams, J. G., & Putney, J. W. (2009). Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nature Cell Biology*, *11*(12), 1465–1472. <https://doi.org/10.1038/ncb1995>
- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., & Gill, D. L. (2012). STIM proteins: Dynamic calcium signal transducers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(9), 549–565. <https://doi.org/10.1038/nrm3414>
- Son, G. Y., Subedi, K. P., Ong, H. L., Noyer, L., Saadi, H., Zheng, C., Bhardwaj, R., Feske, S., & Ambudkar, I. S. (2020). STIM2 targets Orai1/STIM1 to the AKAP79 signaling complex and confers coupling of Ca²⁺ entry with NFAT1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(28), 16638–16648. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915386117>
- Stathopulos, P. B., Li, G. Y., Plevin, M. J., Ames, J. B., & Ikura, M. (2006). Stored Ca²⁺-depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(47), 35855–35862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608247200>
- Stathopulos, P. B., Zheng, L., Li, G.-Y., Plevin, M. J., & Ikura, M. (2008). Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry. *Cell*, *135*(1), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.006>
- Subedi, K. P., Ong, H. L., Son, G. Y., Liu, X., & Ambudkar, I. S. (2018). STIM2 Induces Activated Conformation of STIM1 to Control Orai1 Function in ER-PM Junctions. *Cell Reports*, *23*(2), 522–534. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.065>
- Thompson, J. L., Mignen, O., & Shuttleworth, T. J. (2010). The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid. *Channels*, *4*(5), 398. <https://doi.org/10.4161/chan.4.5.13226>
- Thompson, J. L., Mignen, O., & Shuttleworth, T. J. (2013). The ARC Channel-An Endogenous Store-Independent Orai Channel. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 71, pp. 125–148). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00006-8>
- Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2013). Exploring the unique features of the ARC channel, a store-independent orai channel. *Channels*, *7*(5), 364–373. <https://doi.org/10.4161/chan.26156>
- Tiffner, A., Maltan, L., Weiß, S., & Derler, I. (2021). The orai pore opening mechanism. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 2, pp. 1–33). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22020533>
- Van Rheenen, J., Langeslag, M., & Jalink, K. (2004). Correcting Confocal Acquisition to Optimize Imaging of Fluorescence Resonance Energy Transfer by Sensitized Emission. *Biophysical Journal*, *86*(4), 2517–2529. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74307-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74307-6)
- Vang, A. G., Basole, C., Dong, H., Nguyen, R. K., Housley, W., Guernsey, L., Adami, A. J., Thrall, R. S., Clark, R. B., Epstein, P. M., & Brocke, S. (2016). Differential expression and function of PDE8 and PDE4 in effector T cells: Implications for PDE8 as a drug target in inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00259>
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Loomoa, D. ., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., FLeig, A., Penner, R., & Kinet, J.-P. (2006). CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store- Operated Ca²⁺ Entry. *Physiology & Behavior*,

- 312(3), 1220–1223. <https://doi.org/10.1126/science.1127883.CRACM1>
- Vig, Monika, Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J. P., & Penner, R. (2006). CRACM1 Multimers Form the Ion-Selective Pore of the CRAC Channel. *Current Biology*, 16(20), 2073–2079. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.085>
- Vihma, H., Pruunsild, P., & Timmusk, T. (2008). Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes. *Genomics*, 92(5), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.06.011>
- Vilborg, A., Passarelli, M. C., & Steitz, J. A. (2016). *Calcium signaling and transcription: elongation, DoGs, and eRNAs*. 3(1), 1–17. <https://doi.org/10.14800/rci.1169.Calcium>
- Vogl, A. W., & Soucy, L. J. (1985). Arrangement and possible function of actin filament bundles in ectoplasmic specializations of ground squirrel sertoli cells. *Journal of Cell Biology*, 100(3), 814–825. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.814>
- Vogl, A. Wayne, Young, J. S., & Du, M. (2013). New Insights into Roles of Tubulobulbar Complexes in Sperm Release and Turnover of Blood-Testis Barrier. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 303). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407697-6.00008-8>
- Vogl, W., Lyon, K., Adams, A., Piva, M., & Nassour, V. (2018). The endoplasmic reticulum, calcium signaling and junction turnover in Sertoli cells. *Reproduction*, 155(2), R93–R104. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0281>
- Wales, P., Schubert, C. E., Aufschneider, R., Fels, J., García-Aguilar, I., Janning, A., Dlugos, C. P., Schäfer-Herte, M., Klingner, C., Wälte, M., Kuhlmann, J., Menis, E., Kang, L. H., Maier, K. C., Hou, W., Russo, A., Higgs, H. N., Pavenstädt, H., Vogl, T., ... Wedlich-Söldner, R. (2016). Calcium-mediated actin reset (CaAR) mediates acute cell adaptations. *ELife*, 5(DECEMBER2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.19850>
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X. D., & Gill, D. L. (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and Ca_v1.2 channels. *Science*, 330(6000), 105–109. <https://doi.org/10.1126/science.1191086>
- Weissgerber, P., Kriebs, U., Tsvilovskyy, V., Olausson, J., Kretz, O., Stoerger, C., Vennekens, R., Wissenbach, U., Middendorff, R., Flockerzi, V., & Freichel, M. (2011). Male fertility depends on Ca²⁺ absorption by TRPV6 in epididymal epithelia. *Science Signaling*, 4(171), 1–14. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001791>
- Wong, W., & Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: Focal points in space and time. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 5, Issue 12, pp. 959–970). Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/nrm1527>
- Xu, P., Lu, J., Li, Z., Yu, X., Chen, L., & Xu, T. (2006). Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(4), 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.134>
- Yeh, Y., & Parekh, A. (2018). *CRAC Channels and Ca²⁺-Dependent Gene Expression*. In: Kozak JA, Putney JW Jr., editors. *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. <https://doi.org/doi:10.1201/9781315152592-5>
- Yen, M., Lokteva, L. A., & Lewis, R. S. (2016). Functional Analysis of Orai1 Concatemers Supports a Hexameric Stoichiometry for the CRAC Channel. *Biophysical Journal*, 111(9), 1897–1907. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.09.020>
- Young, J. S., De Asis, M., Guttman, J., & Vogl, A. W. (2012). Cortactin depletion results in short tubulobulbar complexes and spermiation failure in rat testes. *Biology Open*, 1(11), 1069–1077. <https://doi.org/10.1242/bio.20122519>
- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H. F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J.,

- Stauderman, K. A., & Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(24), 9357–9362. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603161103>
- Zhang, X., Pathak, T., Yeast, R., Emrich, S., Xin, P., Nwokonko, R. M., Johnson, M., Wu, S., Delierneux, C., Gueguinou, M., Hempel, N., Putney, J. W., Gill, D. L., & Trebak, M. (2019). A calcium/cAMP signaling loop at the ORAI1 mouth drives channel inactivation to shape NFAT induction. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09593-0>
- Zheng, B., Zhao, D., Zhang, P., Shen, C., Guo, Y., Zhou, T., Guo, X., Zhou, Z., & Sha, J. (2015). Quantitative Proteomics Reveals the Essential Roles of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) in the Testicular Cord Formation in Mouse Testis. *Molecular & Cellular Proteomics*, *14*(10), 2682–2691. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.049569>
- Zheng, B., Zhou, Q., Guo, Y., Shao, B., Zhou, T., Wang, L., Zhou, Z., Sha, J., Guo, X., & Huang, X. (2014). Establishment of a proteomic profile associated with gonocyte and spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Proteomics*, *14*(2–3), 274–285. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300395>
- Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Li, G. Y., Romanin, C., & Ikura, M. (2011). Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(4), 1337–1342. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015125108>
- Zhou, Y, Cai, X., Nwokonko, R., Loktionova, N., Wang, Y., & Gill, D. L. (2017). The STIM-Orai coupling interface and gating of the Orai1 channel Graphical Abstract HHS Public Access. *Cell Calcium*, *63*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.001>
- Zhou, Yandong, Cai, X., Loktionova, N. A., Wang, X., Nwokonko, R. M., Wang, X., Wang, Y., Rothberg, B. S., Trebak, M., & Gill, D. L. (2016). The STIM1-binding site nexus remotely controls Orai1 channel gating. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13725>
- Zhou, Yandong, Wang, X., Wang, X., Loktionova, N. A., Cai, X., Nwokonko, R. M., Vrana, E., Wang, Y., Rothberg, B. S., & Gill, D. L. (2015). STIM1 dimers undergo unimolecular coupling to activate Orai1 channels. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms9395>
- Zhou, Yubin, Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., Stathopoulos, P. B., Ikura, M., Rao, A., & Hogan, P. G. (2013). Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(8), 973–981. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2625>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Calciumhomöostase der Zelle (ausgewählte Aspekte).....	2
Abbildung 2 - Schematische Darstellung der Proteinmotive von STIM1 sowie dessen Faltung in inaktivem und aktivem Zustand.....	6
Abbildung 3 - Schematische Darstellung der Exonstruktur und Proteinmotive von STIM1.....	9
Abbildung 4 - N-terminales Spleißen von STIM1.....	10
Abbildung 5 - Querschnitt eines <i>Tubuli seminiferie</i> Contorti mit Detailansicht der Spermatogenese.....	12
Abbildung 6 - STIM und das ER in Sertoli-Zellen.....	15
Abbildung 7 - Schematische Darstellung des Prinzips des bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsassays	40
Abbildung 8 - Fließschema zur angewendeten statistischen Analyse.....	47
Abbildung 9 - Exon- und Proteinstruktur von STIM1A und dessen evolutionäre Konservierung .	49
Abbildung 10 - mRNA Expression von Stim1A in murinen Geweben und Zelltypen	50
Abbildung 11 - Stim1A Expression auf Proteinebene	52
Abbildung 12 – PCR Analyse alternativer 5`UTRs von Stim1, Stim1A und Stim1B	54
Abbildung 13 - Stim1A reduziert SOCE in MEF Zellen.....	56
Abbildung 14 - Der Knock-down von Stim1A erhöht SOCE in hippocampalen Astrozyten.....	57
Abbildung 15 - STIM2 hat keinen Einfluss auf den STIM1A-induzierten SOCE.....	60
Abbildung 16 - Die globale Ionomycin induzierte Ca^{2+} Speicherentleerung unterscheidet sich nicht zwischen STIM1 und STIM1A.	61
Abbildung 17 - Stim1A kann alle Orai Homologe aktivieren.....	62
Abbildung 18 - Insertion von Domäne A reduziert den I_{CRAC}	64
Abbildung 19 - STIM1A kann alle ORAI Homologe aktivieren.....	65
Abbildung 20 - Domäne A hat keinen Einfluss auf die Interaktion mit ORAI1.....	67
Abbildung 21 - Domäne A hat keine Auswirkung auf die Clustergröße.....	68
Abbildung 22 - Mutagenesecscreen von Domäne A	70
Abbildung 23 - Potentielle Phosphorylierungsstellen in STIM1A	71
Abbildung 24 - Die Mutation von S502 revertiert den STIM1A-induzierten SOCE-Phänotyp.....	72
Abbildung 25 - Die Mutation von D5032 revertiert den STIM1A-induzierten SOCE-Phänotyp ...	73
Abbildung 26 - Mutationen in der ETON Region maskieren den STIM1 SOCE Phänotyp	76
Abbildung 27 - STIM1 und STIM1A kolokalisieren in <i>HEK S1/2^{-/-}</i> -Zellen	79

Abbildung 28 - Domäne A zeigt zytosolische und nukleare Lokalisierung.....	80
Abbildung 29 - Test des Domäne A-spezifischen und ØA-Antikörpers.	82
Abbildung 30 - Unspezifische Färbung des sekundären Antikörpers	83
Abbildung 31 - Expressionsanalyse der murinen Orai-Homologe in murinen Testes.....	84
Abbildung 32 - Lokalisierung von Stim1A, ØA und Orai1 in murinen Sertoli-Zellen	86
Abbildung 33 - Ablaufplan der Probenbehandlung und -gewinnung zur massenspektrometrischen Analyse	89
Abbildung 34 - Fraktionen der Immunpräzipitation von STIM1, STIM1A und STIM1A D503A zur anschließenden massenspektrometrischen Analyse.....	90
Abbildung 35 – Verifizierung neuer Interaktionspartner von STIM1 & STIM1A via BiFC-Assay	97
Abbildung 36 - Immunpräzipitation der PDE8B durch STIM1 und STIM1A	98
Abbildung 37 - STIM1A steigert die Translokation NFAT in den Nukleus.....	101
Abbildung 38 – STIM1A steigert die Translokation NFAT in den Nukleus	102
Abbildung 39 - PF-0495732 hat keine Auswirkung auf den SOCE.....	104
Modell 1 - Model eines potentiellen Gating-Mechanismus von STIM1A.....	108
Modell 2 - Model der potentiellen Rolle von ORAI1 R77 für den Gating-Mechanismus von STIM1 und STIM1A.....	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Liste verwendeter Zelllinien und Primärzellen.....	19
Tabelle 2 - Verwendete Medien	19
Tabelle 3 - Liste verwendeter Enzyme	19
Tabelle 4 - Liste verwendeter siRNAs und deren Sequenz.....	19
Tabelle 5 - Liste verwendeter Primer und deren Sequenz.....	20
Tabelle 6 - Liste aller verwendeter DNA-Vektoren	21
Tabelle 7 - Liste verwendeten primärer und sekundärer Western Blot Antikörper, sowie immunzyto- und immunhistologischer Antikörper.....	22
Tabelle 8 - Liste verwendeter Kits	22
Tabelle 9 – Liste der verwendeten Reagenzien	23
Tabelle 10 - Liste verwendeter Bakterien.....	27
Tabelle 11 - Liste verwendeter Größenstandards.....	27
Tabelle 12 - Liste verwendeter Laborgeräte	27
Tabelle 13 - Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 14 - Liste der verwendeten Softwares	29
Tabelle 15 - Pipettierschema einer Restriktion.....	32
Tabelle 16 - Pipettierschema einer Dephosphorylierungsreaktion	32
Tabelle 17 - Pipettierschema einer Phosphorylierungsreaktion.....	33
Tabelle 18 - Pipettierschema einer Ligation.....	33
Tabelle 19 - Pipettierschema einer PCR mit Phusion DNA-Polymerase	36
Tabelle 20 - Pipettierschema einer PCR mit DreamTaq DNA-Polymerase	36
Tabelle 21 - Schema einer PCR Reaktion.	36
Tabelle 22 – Durch die immunhistologischen Primärantikörper erkannte Spleißvarianten	82
Tabelle 23 - Potentielle Interaktionspartner, identifiziert via Massenspektrometrie	94
Tabelle 24 - Bekannte Expression und Lokalisierung potentieller Interaktionspartner nach Analyse der massenspektrometrischen Daten.....	95
Tabelle 25 – Zusammenfassung aller gewonnener Erkenntnisse.....	130

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	englisch	deutsch
α	anti	anti
5'UTR	5' untranslated region	5' untranslatierte Region
ADP	adenosin diphosphate	Adenosin-diphosphat
AK	Antibody	Antikörper
AKAP	A-kinase-anchoring protein	A-Kinase-Ankerprotein
ANOVA	analysis of variance	Varianzanalyse
APEX2	ascorbat peroxidase 2	Ascorbat Peroxidase 2
ARC	arachidonic acid-regulated calcium-selective	Arachidonsäure-regulierten Calcium-Kanäle
AS	aminoacid	Aminosäure
ATP	adenosin triphosphate	Adenosin-triphosphat
BCA	Bicinchoninic acid	Bicinchoninsäure
Ca ²⁺	calcium	Calcium
CAD	CRAC-activation domain	CRAC-Aktivierungsdomäne
CaM	Calmodulin	Calmodulin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CaN	Calcineurin	Calcineurin
CAV	Voltage-gated calcium channel	spannungsabhängigen Calciumkanäle
CC	coiled coil	
CD	current density	Stromdichte
cDNA	complementary DANN	komplementäre DNA
cEF	canonical EF hand	kanonische EF Hand
DKO	double knock out	Doppel-Knock-Out
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DN	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
EKO	single knock out	Einzel-Knock-Out
Epac	exchange factor directly activated by cAMP	cAMP aktivierter Guaninaustausch-Faktor
ER	endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
ES	ectoplasmic specialisation	ektoplasmatische spezialisierungen
EST	Expressed Sequence Tag	
ETON	Extended Transmembrane Orail N-terminal	
FACS	fluorescence activated cell scanning	Durchflusszytometrie
FCDI	fast Ca ²⁺ dependent inactivation	schnelle Calcium abhängige Inaktivierung
FCS	fetal calf serum	Fetales Kälberserum
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster-Resonanz-Elektronen-Transfer

Abkürzung	englisch	deutsch
FSH	follicle stimulating hormone	follikelstimulierendes Hormon
GFP	green fluorescent protein	Grün fluoreszierendes Protein
GTQ	gene technology quality	Gentechnologie Qualität
hEF	hidden EF hand	versteckte EF Hand
HEK	Human embryonic kidney	humane embryonale Nierenzellen
HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase 1
ID	inhibitory domain	inhibitorische Domäne
IP	immunoprecipitation	Immunpräzipitation
IP3	Inositoltrisphosphate	Inositoltrisphosphat
IV	Relation of current and voltage	Beziehung Strom zur vorherrschenden Spannung
LB	lysogeny broth	
LFQ	label free quantification	Einheitsfreie Quantifizierung
LSM	Laser scanning mikroskope	Laser-Scanning-Mikroskop
M1/M2	Manders' correlation coefficient	Manders-Koeffizienten
MCU	mitochondrial calcium uniporter	mitochondrialer Calcium Uniporter
MEF	mouse embryonic fibroblast	murine embryonale Fibroblasten
MEM	Minimum Essential Medium	
MIP	maximum intensity projection	Maximumintensitätsprojektion
mRNA	messenger ribonucleic acid	Boten-Ribonukleinsäure
NCLX	mitochondrial sodium calcium exchanger	mitochondrialer Natrium Calcium Lithium Austauscher
NCX	Sodium Calcium exchanger	Natrium-Calcium-Austauscher
NEAA	Non Essential Amino Acid	nicht essenzielle Aminosäuren
NFAT	nuclear factor of activated T-cells	Transkriptionsfaktor aktivierter T- Zellen
NK	negative control	Negativkontrolle
ns	not significant	nicht signifikant
∅	non	nicht
PCR	polymerase chain reaction	Polymerase-kettenreaktion
PDE8B	phosphodiesterase 8B	Phosphodiesterase 8B
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5- biphosphate	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	protein kinase A	Proteinkinase A
PM	Plasma membrane	Plasmamembran
PMCA	Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase	Plasmamembran Ca ²⁺ ATPase
POI	Protein(s) of interest	Protein€ von Interesse
qRT-PCR	quantitative real-time PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase- kettenreaktion
RFI	relative fluorescence intensity	relativen Fluoreszenzintensität
rmp	revolutions per minute	Umdrehungen pro Minute
ROS	reactive oxygen species	reaktive Sauerstoffspezies

Abkürzung	englisch	deutsch
RT	room temperature	Raumtemperatur
RYR	Ryanodin receptor	Ryanodin-Rezeptor
SAM	Sterile alpha motif	steriles alpha Motiv
SDS	sodium dodecyl sulphate	Natriumlaurylsulfat
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
siCTL	controll siRNA	Kontroll-siRNA
SOAR	STIM1 Orai activating region	STIM1 Orai aktivierende Domäne
SOCE	store operated calcium entry	Speicher-gesteuerten Calciumeinstrom
SP	signal peptide	Signalpeptid
STIM	Stromal interaction molecule	stromaständiges Interaktionsmolekül
TBC	tubulo bulbar complexes	tubulobulbären Komplexe
TBP	TATA-box binding protein	TATA-Box Binde-Protein
TG	Thapsigargin	Thapsigargin
TIRFM)	total internal reflection fluorescence microscopy	Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
TM	transmembrane domain	Transmembrandomäne
TRP	<i>transient receptor potential</i>	Transientes-Rezeptor-Potential-Kationen-Kanal
UniProt	Universal Protein Resource	Universelle Protein Datenbank
wt	wildtype	Wildtyp
YFP+	YFP postive cells	YFP positive Zellen

Publikationen

2021

Ramesh, G.*; Jarzembowski, L.*; Schwarz, Y.*; Konrad, M.; Poth, V.; Knapp, M. L.; Schwär, G.; Lauer, A. A.; Grimm M. O. W.; Alansary, D.; Bruns, D.; Niemeyer, B.A. (2021). A short isoform of STIM1 confers frequency-dependent synaptic enhancement. *CellReports*, 34, 108844. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108844>

2020

Knapp, M.L.; Förderer, K.; Alansary, D.; Jung, M.; Schwarz, Y.; Lis, A.; Niemeyer, B.A. (2020). Alternative splicing switches STIM1 targeting to specialized membrane contact sites and modifies SOCE. bioRxiv - Preprint

Knapp, M. L.*; Poth, V.*; & Niemeyer, B. A. (2020). STIM proteins at the intersection of signaling pathways. *Current Opinion in Physiology*, 17, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.07.007>

*Geteilte Erstautorenschaft

Konferenzen und Preise

2020

2nd Trainee retreat und 6th Colloquium of the German IRTG members.

2-4 März 2020, Bad Dürkheim, Germany

Schöppe M.: Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) to identify new Interaction Partners (Vortrag)

Schöppe M., Förderer K., Schwarz Y., Lis A., Niemeyer B.A.: Alternatively spliced STIM1A modifies SOCE and targets STIM1 to highly specialized contact sites. (1. Posterpreis)

2019

8th Joint Symposium of the German and Canadian IRTG members.

1-4 September 2019, Weiskirchen, Germany

Schöppe M.: Functional characterization of the murine STIM splice variant STIM1A (Vortrag)

1st Trainee retreat & 5th Colloquium of the German IRTG members

1-3 April 2019, Trippstadt, Germany

Schöppe M.: Functional characterization of the murine STIM splice variant STIM1A (Vortrag)

Schöppe M., Förderer K., Schwarz Y., Lis A., Niemeyer B.A.: Characterization of a novel splice variant of the stromal interaction molecule1 (STIM1) (Poster)

2018

4th Colloquium of the German IRTG members

13-14 August 2018, Nonnweiler, Germany

Schöppe M.: Functional characterization of the murine STIM splice variant STIM1A (Vortrag)

Membrane proteins in health and disease, Canadian Society for Molecular Biosciences

11-15 April 2018, Alberta, Canada

POSTER und POSTERPREIS

Schöppe M., Konrad M., Gilson A., Lis A., Niemeyer B.A.: Characterization of a novel splice variant of the stromal interaction molecule1 (STIM1) (Posterpreis)

7th Joint Symposium of the German and Canadian IRTG members

9-10 April 2018, Alberta, Canada

Schöppe M.: Functional characterization of the murine STIM splice variant STIM1A (Vortrag)

2017

6th Joint Symposium of the German and Canadian IRTG members

28-31 August 2017, Annweiler, Germany

Schöppe M., Konrad M., Gilson A., Grimm M., Lis A., Niemeyer B.A.:

Characterization of a novel splice variant of the stromal interaction molecule1 (STIM1)

Danksagung

Es ist absolut surreal für mich, endlich an diesem Punkt zu stehen und diese Worte formulieren zu dürfen!

Als Erstes möchte ich mich von ganzem Herzen bei Barbara Niemeyer bedanken. Barbara, du warst mir in den vergangenen Jahren eine großartige Chefin, verständnisvolle Betreuerin und beeindruckende Mentorin. Ich bin dankbar für jeden deiner Gedankenblitze, die meinem Projekt immer wieder den nötigen Antrieb gegeben haben, für die Freiheiten, die du mir in meiner Arbeit gelassen hast und für jeden guten Rat in beruflicher und auch privater Hinsicht.

Danke Dalia, für deine Unterstützung die letzten Jahre und dass du mit einem Handgriff jedes Konstrukt aus den zahlreichen DNA-Boxen für mich gefischt hast.

Danke Vanessa und Kathrin, dass ihr es geschafft habt auch die schlechten Tage mit Lachen und Sonnenschein zu füllen. Ich werde das Arbeiten mit euch sehr vermissen.

Danke an die gesamte Molbio-Truppe. Ich hätte mir kein besseres Team vorstellen können. Ich hoffe eure Klonierungen und Western Blots klappen auch ohne meinen Glückstanz.

Danke an das ganze TA-Team, das uns allen den Laboralltag ungemein erleichtert.

Danke an die Bürogang Kim, Addi und Arne. Danke für unzählige private Gespräche und fachliche Diskussionen. Wie schön, wenn aus Kollegen Freunde werden. Es war mir eine Ehre an eurer Seite zu pipettieren.

Danke an Elena, Lena und Lisa, ich hätte mir keine besseren Freunde in dieser anstrengenden Zeit wünschen können. Danke für euer Verständnis, eure aufmunternden Worte und die letzten 6 Jahre an meiner Seite.

Danke an meine beste Freundin Elena - es tut gut einen so schonungslos ehrlichen Mensch an meiner Seite zu wissen. Ευχαριστώ πολύ, für dein offenes Ohr, deine Ratschläge und die unzähligen Male die du dir die immer gleichen Klagen anhören musstest.

Danke Johannes, dass du auch noch jedes verirrte Komma gefunden hast. Deine Unterstützung bedeutet mir viel! Du bist der beste Schwiegervater den man sich wünschen könnte.

Ein riesen Dankeschön gebührt meiner wundervollen Familie. Ohne eure immerwährende Unterstützung wäre eine Doktorarbeit nicht denkbar gewesen. Danke für euren Rückhalt und eure Liebe.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem wundervollen Mann bedanken. Phillip, ohne dich hätte ich nicht die Kraft gehabt dieses Kapitel meines Lebens erfolgreich abzuschließen. Danke, dass du immer für mich da warst, dir immer wieder die gleichen Probleme angehört hast und mich stets motivieren konntest nicht aufzugeben. Danke, dass du mir beigebracht hast an mich zu glauben.

Curriculum vitae

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen für die Online-Version entfernt.

Tag der Promotion: 12.11.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Barbara Niemeyer

Prof. Dr. rer. nat. Frank Schmitz

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann