

Aus dem Bereich der Experimentellen Neurologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Über die Regulation der Calcium - Homöostase und den Einfluss von STIM –
Proteinen auf die Alzheimer – Pathologie

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr.med.)
der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2022

vorgelegt von
Olga Streidenberger
geb. am 02.04.1991 in Borodulicha (Kasachstan)

FÜR MEINE ELTERN
IN DANKBARKEIT.

ERKLÄRUNG GEMÄSS § 7 ABS. 1 NR. 2

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

Die im Kapitel Kooperationen aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

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

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Elzach, den 18.11.2021

Unterschrift der Promovierenden

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

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
TABELLENVERZEICHNIS	XV
KOOPERATIONEN	XVI
1. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	1
1.1 ÜBER DIE REGULATION DER CALCIUM HOMÖOSTASE UND DEN EINFLUSS VON STIM – PROTEINEN AUF DIE ALZHEIMER – PATHOLOGIE	1
1.2 ABOUT THE REGULATION OF CALCIUM HOMEOSTASIS AND THE INFLUENCE OF STIM – PROTEINS ON ALZHEIMER’S DISEASE	4
2. EINLEITUNG	7
2.1 DIE ALZHEIMER KRANKHEIT	7
2.1.1 <i>Geschichte</i>	<i>7</i>
2.1.2 <i>Epidemiologie</i>	<i>7</i>
2.1.3 <i>Ätiologie</i>	<i>8</i>
2.1.4 <i>Klinik</i>	<i>9</i>
2.1.5 <i>Diagnose.....</i>	<i>10</i>
2.1.6 <i>Therapie.....</i>	<i>11</i>
2.1.7 <i>Prognose.....</i>	<i>12</i>
2.1.8 <i>Neuropathologie.....</i>	<i>12</i>
2.2 MOLEKULARE MECHANISMEN	14
2.2.1 <i>APP und seine Funktion</i>	<i>14</i>
2.2.2 <i>APP – Prozessierung</i>	<i>15</i>
2.2.3 <i>Aβ - Degradation</i>	<i>20</i>
2.3 DIE ALZHEIMER KRANKHEIT UND CALCIUM-HOMÖOSTASE.....	21
2.3.1 <i>Spannungsgesteuerte Calciumkanäle</i>	<i>23</i>
2.3.2 <i>Speichergesteuerte Calciumkanäle</i>	<i>25</i>

2.3.2.1	STIM Proteine	28
2.3.2.2	Spleißvariante von STIM1	31
2.3.2.3	Spleißvarianten von STIM2	31
2.3.2.4	Pathophysiologische Rolle von STIM	32
2.3.2.5	ORAI Proteine	34
2.3.2.6	Isoformen von ORAI1	35
2.4	CALCIUM UND DIE ALZHEIMER – KRANKHEIT.....	36
2.5	ZIELSETZUNG	41
3.	MATERIAL UND METHODEN	42
3.1	MATERIAL	42
3.1.1	<i>Chemikalien</i>	42
3.1.2	<i>Geräte.....</i>	44
3.1.3	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	45
3.1.4	<i>Zelllinien.....</i>	46
3.1.5	<i>Plasmide</i>	48
3.1.6	<i>Humanes post mortem Hirngewebe.....</i>	48
3.1.7	<i>Antikörper.....</i>	49
3.1.8	<i>Kits</i>	49
3.2	METHODEN	50
3.2.1	<i>Zellbiologische Methoden.....</i>	50
3.2.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	50
3.2.1.2	Kryokonservierung und Reaktivierung eukaryotischer Zellen	50
3.2.1.3	Inkubation der Zellen mit AICD	51
3.2.1.4	Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH - Test	52
3.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	53
3.2.2.1	Transfektion der Zellen mit Plasmiden mittels JetPRIME	53
3.2.2.2	Isolation der Gesamt – RNA mittels TRIzol.....	53
3.2.2.3	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von isolierter RNA	54

3.2.2.4	cDNA – Synthese	55
3.2.2.5	Quantitative RT – PCR.....	55
3.2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	58
3.2.3.1	Probenverarbeitung	58
3.2.3.2	Herstellung von Lysat aus Zellen	58
3.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA – Test	59
3.2.3.4	Immunpräzipitation von APP – Prozessierungsprodukten.....	59
3.2.3.5	Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS – PAGE)	61
3.2.3.6	Proteintransfer mittels Western Blot (Nass – Blot; „Tank – Blot“)	62
3.2.3.7	Proteinnachweis mit der ECL – Methode.....	62
3.2.3.8	Messung der Sekretase -Aktivität.....	63
3.2.3.8.1	Messung der α – Sekretase – Aktivität.....	66
3.2.3.8.2	Messung der β – Sekretase – Aktivität.....	66
3.2.3.8.3	Messung der γ – Sekretase – Aktivität	66
3.2.4	<i>Ca²⁺ + - Imaging</i>	66
3.2.5	<i>Statistische Methoden</i>	68
3.2.5.1	Analyse der Ausreißer aus der Messung der Genexpression in <i>post mortem</i> Hirnproben ⁶⁹	

4. ERGEBNISSE.....72

4.1 EINFLUSS DER APP-PROZESSIERUNG AUF DIE CA²⁺ + - HOMÖOSTASE..... 72

4.1.1	<i>Einfluss von Presenilin auf STIM und ORAI</i>	72
4.1.1.1	Einfluss von Presenilin auf die Genexpression von STIM und ORAI.....	72
4.1.1.2	Einfluss von Presenilin auf Ca ²⁺ +- Signal	73
4.1.2	<i>Einfluss von Presenilin auf VGCC</i>	75
4.1.3	<i>Einfluss der APP-Proteinfamilie auf STIM und ORAI</i>	75
4.1.3.1	Einfluss der APP-Proteinfamilie auf die Genexpression von STIM und ORAI.....	75
4.1.4	<i>Einfluss der APP-Proteinfamilie auf VGCC</i>	76
4.1.5	<i>Einfluss von AICD auf STIM und ORAI</i>	77
4.1.5.1	Einfluss des APP C-Terminus auf STIM und ORAI	77

4.1.5.2	Einfluss der AICD - Supplementierung auf STIM und ORAI	78
4.1.6	Einfluss von APP und APP - Prozessierungsprodukten auf das Ca ²⁺ +- Signal.....	81
4.1.7	Einfluss von Fe65 auf STIM und ORAI	83
4.1.8	Einfluss von Fe65 auf VGCC	84
4.2	ÜBERSICHT ÜBER DIE GENEXPRESSION VON ORAI, STIM UND VGCC.....	85
4.3	EINFLUSS VON STIM1 UND STIM2 AUF α-, β- UND γ – SEKRETASEN.....	86
4.3.1	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α - Sekretase	86
4.3.2	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β - Sekretase	87
4.3.3	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ - Sekretase	88
4.3.4	Einfluss von STIMs Ca ²⁺ + - mediiert?.....	95
4.3.4.1	α – Sekretase	95
4.3.4.2	β – Sekretase	96
4.3.4.3	γ – Sekretase.....	97
4.3.4.4	Ausblick.....	99
4.4	VERÄNDERUNGEN VON SOCE UND VGCC IN HUMANEN <i>post mortem</i> HIRNPROBEN.....	101
4.4.1	Hirnproben.....	101
4.4.1.1	Einfluss des Alters auf die Genexpression.....	102
4.4.1.2	Einfluss des Braak-Stadiums auf die Genexpression	108
4.4.1.3	Einfluss von ApoE auf die Genexpression.....	110
4.4.1.4	Einfluss des Geschlechts auf die Genexpression.....	113
5.	DISKUSSION.....	115
5.1	EINFLUSS VON PRESENILIN AUF STIM – PROTEINE UND SOCE	115
5.2	EINFLUSS VON APP – PROZESSIERUNGSPRODUKTEN AUF DEN CA²⁺ + - HAUSHALT.....	120
5.3	EINFLUSS VON STIM – PROTEINEN AUF α -, β - UND γ - SEKRETASEN.....	127
5.3.1	Einfluss von STIM – Proteinen auf die α – Sekretase	127
5.3.2	Einfluss von STIM – Proteinen auf die β – Sekretase	130
5.3.3	Einfluss von STIM – Proteinen auf die γ - Sekretase	131
5.4	EINFLUSS VON Aβ UND AICD AUF DIE GENEXPRESSION VON VGCC	136

5.5	GENEXPRESSION VON SOCE UND VGCC IN <i>post mortem</i> AD – HIRNPROBEN	139
5.5.1	<i>Einfluss von Alter auf die Genexpression</i>	139
5.5.2	<i>Einfluss von Braak – Stadium auf die Genexpression</i>	141
5.5.3	<i>Einfluss vom ApoE – Status auf die Genexpression</i>	141
5.5.4	<i>Einfluss des Geschlechts auf die Genexpression</i>	142
5.6	AUSBLICK	144
6.	LITERATURVERZEICHNIS	146
7.	PUBLIKATIONEN	170
8.	ANHANG	171
9.	DANKSAGUNG	174
10.	LEBENS LAUF	175

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

\$	Dollar
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADAM	engl. a disintegrin and metalloproteinase
AFT-Komplex	AICD/Fe65/Tip60-Komplex
AICD	engl. APP intracellular domain
AL1ICD	engl. APLP1 intracellular domain
AL2ICD	engl. APLP2 intracellular domain
AMPA	engl. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionis acid
ANOVA	engl. analysis of variance
Aph	engl. anterior pharynx defective
APLP	engl. amyloid precursor-like protein
ApoE	Apolipoprotein E
ApoJ	Apolipoprotein J
APP	engl. amyloid precursor protein
APP-BP1	APP-bindendes Protein 1
AS	Aminosäure
ATP	engl. adenosine triphosphate
ATP	Adenosintriphosphat
A β	Amyloid- β
BACE	engl. β -site APP-cleaving enzyme
BCA	engl. bicinchoninic acid
BSA	engl. bovine serum albumine
BTP2	engl. 3,5-bistrifluoromethyl pyrazole derivate 2
bzw.	beziehungsweise
C31	AICD31
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAD	CRAC activation domain
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAN A	Calcineurin A
Cav	engl. voltage gated calcium channel
CC	engl. coiled-coil
CDI	engl. calcium-dependent inactivation
cdNA	engl. complementary deoxyribonucleic acid
CERAD	engl. Consortium to Establish A Registry for Alzheimer's Disease
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CRAC	engl. calcium release-activated calcium channel
CREB	engl. cAMP response element binding protein
CSF	engl. cerebro spinal fluid

CTF	engl. C-terminal fragment
Cu+	Kupfer
CuSO ₄	Kupfersulfat
DAG	Diacylglycerol
dd	bidestilliert
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	engl. dimethyl sulfoxide
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECE	engl. endothelin converting enzyme
ECL	engl. enhanced chemiluminescence
EDTA	engl. ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	engl. ethylen glycol tetraacetic acid
engl.	englisch
EOAD	engl. early onset Alzheimer's disease
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und weitere
EZR	Extrazellulärraum
FAD	engl. familial Alzheimer's disease
FCS	engl. fetal calf serum
Fe ²⁺	Eisen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Gauge
g	Erdbeschleunigung
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GPI	engl. glycosylphosphatidylinositol
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3 β
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPR	engl. horseradish peroxidase
HPRT1	engl. hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HVA/LVA	high voltage-activated/low voltage-activated
i/mGluR	ionotroper/metabotroper Glutamat-Rezeptor
IC ₅₀	engl. half maximal inhibitory concentration
i-CLiPs	engl. intramembrane cleaving proteases
IDE	engl. insuline degrading enzyme
IDE	inhibitorische Domäne
IgE	Immunglobulin E
IP ₃ (R)	engl. inositol-1,4,5-trisphosphate (receptor)
IP ₄	engl. inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate
ITPKB	engl. inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase type B
KA	Kainsäure
KCl	Kaliumchlorid
KD	engl. knock-down
kDa	Kilodalton
KPI	engl. Kunitz protease inhibitor
LCIS	engl. Life Cell Imaging Solution
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LOAD	engl. late onset Alzheimer's disease
LRP-1 Rezeptor	engl. low-density lipoprotein receptor-related protein1

LTP/LTD	engl. long-term potentiation/long-term potentiation
mA	Milliampere
MCI	engl. mild cognitive impair
MCU	mitochondrialer Calcium Uniporter
MEF	engl. mouse embryonic fibroblasts
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mPTP	engl. mitochondrial permeability transition pore
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	natrium-calcium exchanger
NEP	Nepilysin
NFAT	engl. nuclear factor of activated T-cells
NFL	Neurofilament Light Protein
NFTs	engl. neurofibrillary tangles
NIA	National Institute on Aging
NICD	engl. notch intracellular domain
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PBS	engl. phosphate buffered saline
PET	engl. positron emission tomography
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMCA	engl. plasma membrane calcium ATPase
PP1	Proteinphosphatase 1
PS	Presenilin
PSENEN/PEN2	engl. presenilin enhancer 2
PtdS	Phosphatidylserin
qRT-PCR	engl. quantitative real time polymerase chain reaction
RGS4	engl. regulator of G protein signaling 4
RIP	engl. regulated intramembrane proteolysis
ROC	engl. receptor-operated channel
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur

RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
SAM	engl. sterile alpha motif
sAPP α	engl. soluble α -secreted APP
sAPP β	engl. soluble β -secreted APP
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA	sarco-/endoplasmatic reticulum calcium ATPase
siRNA	engl. small interfering ribonucleic acid
SOAR	STIM1-ORAI1-activating region
SOCE	engl. store operated calcium entry
SP	signal peptide
SPF	Signalpeptidfragment
STIM	engl. stromal interaction molecule
swe	engl. swedish
TACE	engl. tumor necrosis factor- α converting enzyme
TBP	TATA-binding protein
TBS	engl. Tris-buffered saline
TG	Thapsigargin
TGF- β	engl. transforming growth factor β
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRPC	engl. transient receptor protein channel
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
uPA/tPA	engl. urokinase-/tissue-type plasminogen activator
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VGCC	engl. voltage gated calcium channel
W	Watt
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
α 2M	α 2-Makroglobulin
α -CTF	α -cleaved C-terminal fragment
β -CTF	β -cleaved C-terminal fragment
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer

Aminosäuren

A/Ala	Alanin
R/Arg	Arginin
N/Asn	Asparagin
D/Asp	Asparaginsäure
C/Cys	Cystein
Q/Gln	Glutamin
E/Glu	Glutaminsäure
G/Gly	Glycin
H/His	Histidin
I/Ile	Isoleucin
L/Leu	Leucin
K/Lys	Lysin
M/Met	Methionin
F/Phe	Phenylalanin
P/Pro	Prolin
S/Ser	Serin
T/Thr	Threonin
W/Trp	Tryptophan
Y/Tyr	Tyrosin
V/Val	Valin

Nukleoside

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymidin
U	Uridin

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung.....	16
Abb. 2: A β - Schnittsequenz durch γ -Sekretase	19
Abb. 3: Struktureller Aufbau von Cav-Kanälen.....	23
Abb. 4: Klassifizierung von VGCC.....	24
Abb. 5: Schematische Darstellung von speichergesteuertem <i>Ca</i> 2 ⁺ -Einstrom durch ORAI1.....	27
Abb. 6 Aufbau von STIM1 und STIM2	29
Abb. 7: Spleißvarianten von STIM2	32
Abb. 8: Schematische Darstellung von <i>Ca</i> 2 ⁺ -Dysregulation in AD	38
Abb. 9 Genexpression von STIM und ORAI in MEF PS1/2 ^{-/-} und SH-SY5Y PS1 ^{-/-}	72
Abb. 10: Einfluss von Presenilin auf <i>Ca</i> 2 ⁺ - Signal in MEF-Zelllinien	74
Abb. 11: Genexpression von CavB, CavD und CavG in SH-SY5Y PS1 ^{-/-}	75
Abb. 12: Genexpression von STIM und ORAI in MEF APP/APLP2 ^{-/-} und SH-SY5Y APP ^{-/-}	76
Abb. 13: Genexpression von CavB, CavD und CavG in SH-SY5Y APP ^{-/-} und SH-SY5Y APP ^{swe}	77
Abb. 14: Genexpression von STIM und ORAI in MEF APP Δ CT15.....	78
Abb. 15: Genexpression von STIM und ORAI in MEF APP/APLP2 ^{-/-} nach AICD -Inkubation.....	79
Abb. 16: Genexpression von STIM und ORAI in MEF APP/APLP2 ^{-/-} , MEF APP/APLP2 ^{-/-} nach AICD- Inkubation und MEF APP/APLP2 ^{-/-} - Leerkontrolle verglichen zu MEF WT.....	80
Abb. 17: Einfluss von APP-Prozessierungsprodukten auf <i>Ca</i> 2 ⁺ - Signal in MEF-Zelllinien.....	82
Abb. 18: Genexpression von STIM und ORAI in SH-SY5Y Fe65-KD.....	83
Abb. 19: Genexpression von CavB, CavD und CavG in SH-SY5Y Fe65-KD	84
Abb. 20: Übersicht über die Genexpression von ORAI1, ORAI2 und ORAI3 in humanen und murinen Zelllinien.....	85
Abb. 21: Übersicht über die Genexpression von STIM1, STIM2, STIM2.1 und STIM2.2 in humanen und murinen Zelllinien	85
Abb. 22: Übersicht über die Genexpression von CavB, CavD und CavG in humanen Zelllinien	86
Abb. 23: Genexpression von APP, APLP2, α -, β -, γ -Sekretasen, IDE und NEP in MEF STIM1/2 ^{-/-} . 86	
Abb. 24: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α - Sekretase	87
Abb. 25: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β - Sekretase	88
Abb. 26: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ - Sekretase	89
Abb. 27: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf APP, APLP2 und A β	90
Abb. 28: γ -Sekretase Aktivität in MEF STIM1 ^{-/-} und MEF STIM2 ^{-/-}	90
Abb. 29: γ -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1 ^{-/-} und MEF STIM2 ^{-/-} nach STIM1- bzw. STIM2- Retransfektion	91
Abb. 30: γ -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 ^{-/-} nach STIM1- und/oder STIM2-Retransfektion..	92

Abb. 31: γ -Sekretase-Aktivität in Cos7 WT nach STIM1- und/oder STIM2-Transfektion.....	93
Abb. 32: γ -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y WT nach STIM1- und/oder STIM2-Transfektion	94
Abb. 33: γ -Sekretase-Aktivität in HEK293 STIM2.2 T-Rex.....	94
Abb. 34: α -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 -/- in Ca_2 +-freiem Messmedium.....	95
Abb. 35: β -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 -/- in Ca_2 +-freiem Messmedium	97
Abb. 36: γ -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 -/- in Ca_2 +-freiem Messmedium	98
Abb. 37: γ -Sekretase-Aktivität in MEF WT nach Inkubation mit Ruthenium Red	98
Abb. 38: γ -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 -/- in Ca_2 + -reichem bzw. Ca_2 + - freiem Messmedium	100
Abb. 39: Genexpression von STIM, ORAI und VGCC in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben	101
Abb. 40: Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 und STIM2 in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben als [%]-Anteil der Kontrolle	102
Abb. 41: Genexpression von CavD und STIM2 abhängig von Alter in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben	104
Abb. 42: Genexpression von CavD abhängig von Alter in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben der AD- Patienten	106
Abb. 43: Genexpression von CavB, CavD und ORAI1 abhängig von Inzidenz von ApoE- ϵ 3 bzw. - ϵ 4 in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben.....	112
Abb. 44: Schematische Darstellung der Regulation von SOCE durch PS1 und PS2.....	120
Abb. 45: Schematische Darstellung der Regulation von SOCE durch PS-Proteine und AICD/AL2ICD	125
Abb. 46: Schematische Darstellung des Einflusses von AICD und PS-Proteinen auf die Aktivität der SERCA-Pumpe	126

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Chemikalien	42
Tab. 2: Geräte	44
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien	45
Tab. 4: Zelllinien	46
Tab. 5: Plasmide	48
Tab. 6: Antikörper	49
Tab. 7: Kits	49
Tab. 8: Primer für humane Proben	56
Tab. 9: Primer für humane und murine Proben (QIAGEN)	57
Tab. 10: Primer für murine Proben.....	57
Tab. 11: Antikörper und Inkubationsbedingungen für die Immunpräzipitation.	60
Tab. 12: Blockier- und Inkubationsbedingungen von Primär- und Sekundärantikörper	63
Tab. 13:Substrate und Messparameter für fluorometrische Sekretase-Aktivitätsmessungen	65
Tab. 14: Vergleich der Gruppen mit und ohne Ausreißer von AD-Kohorte	70
Tab. 15: Vergleich der Gruppen mit und ohne Ausreißer von Kontrollkohorte	71
Tab. 16: Übersicht über die Genexpression von ORAI 1-3 in unterschiedlich konditionierten MEF APP/APLP2 -/-	81
Tab. 17: Übersicht über die Genexpression von STIM1, STIM2, STIM2.1 und STIM2.2 in unterschiedlich konditionierten MEF APP/APLP2 -/-.....	81
Tab. 18: Übersicht über mittlere Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 und STIM2 abhängig von ApoE-Allelstatus in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben	110
Tab. 19: Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 und STIM2 abhängig von Geschlecht in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben	114

KOOPERATIONEN

Abb./Tab.	TÄTIGKEIT DES KOOPERATIONSPARTNERS	KOOPERATIONSPARTNER
	Projekt-/Versuchsplanung	Dr. Marcus Grimm
Abb.10	Assistenz bei Messung	Dr. Maik Konrad (AG Niemeyer)
Abb.17	Assistenz bei Messung	Dr. Maik Konrad (AG Niemeyer)
Abb.24 C	Bestimmung des sAPP α -Proteingehalts (ein Experiment von insgesamt zwei)	Liesa Regner
Abb.25 C	Bestimmung des BACE1-Proteingehalts (ein Experiment von insgesamt zwei)	Liesa Regner
Abb.27 B	Bestimmung von APP sowie A β -Proteingehalts (je ein Experiment von insgesamt zwei)	Liesa Regner
Abb.39	RNA-Isolation, cDNA-Synthese	Dr. Sven Grösgen
Abb.40	RNA-Isolation, cDNA-Synthese	Dr. Sven Grösgen
Abb.41	RNA-Isolation, cDNA-Synthese	Dr. Sven Grösgen
Abb.42	RNA-Isolation, cDNA-Synthese	Dr. Sven Grösgen
Abb.43	RNA-Isolation, cDNA-Synthese	Dr. Sven Grösgen
Tab. 18/19	RNA-Isolation, cDNA-Synthese	Dr. Sven Grösgen

1. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

1.1 ÜBER DIE REGULATION DER CALCIUM HOMÖOSTASE UND DEN EINFLUSS VON STIM – PROTEINEN AUF DIE ALZHEIMER – PATHOLOGIE

Weltweit erkrankt alle drei Sekunden ein Mensch an einer Demenzerkrankung. Morbus Alzheimer bildet hierbei in 50 bis 60 % der Fälle die Ursache und stellt somit die häufigste Demenzform dar. Makropathologisch ist die Krankheit durch eine gleichmäßige Hirnrindenatrophie mit Erweiterungen der Liquorräume gekennzeichnet. Das histopathologische Korrelat liegt in einer massiven Neuronendegeneration mit extrazellulären Ablagerungen von A β – Plaques und intrazellulären hyperphosphorylierten neurofibrillären Tau – Bündeln. A β entsteht im Zuge einer amyloidogenen APP – Prozessierung durch sequenzielle Schnitte der β – und γ – Sekretasen. Presenilin – Proteine stellen dabei das katalytische Zentrum der γ – Sekretase dar. Neben einem amyloidogenen APP – Prozessierungsweg wird durch den Schnitt der α – Sekretase der nicht – amyloidogene Weg eingeleitet. Das dabei anfallende sAPP α wird in den Extrazellulärraum freigesetzt und kann neuroprotektive Eigenschaften entfalten. Die Literatur berichtet von einer gestörten Ca²⁺ - Homöostase bei Morbus Alzheimer. Sowohl APP als auch A β , sAPP α und Preseniline greifen in die Regulation des Ca²⁺ - Haushaltes ein. Um die intrazelluläre Ca²⁺ - Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) zu regulieren, sind viele Mechanismen erforderlich, die den Ca²⁺ - Transport über die Plasmamembran sowie zwischen dem Zytosol und den intrazellulären Zellkompartimenten ermöglichen. Dazu gehören u.a. die spannungsgesteuerten (VGCC) und die speichergesteuerten Ca²⁺ - Kanäle (CRAC), die den SOCE (engl. store operated Ca²⁺ - entry) aktivieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde folglich der Einfluss von APP, seinen Prozessierungsprodukten und von Presenilin – Proteinen auf CavB, CavD und CavG als Vertreter der VGCC – Familie sowie auf ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1, STIM2, STIM2.1 und STIM2.2 als SOCE – Komponenten untersucht. Anschließend erfolgte die Analyse der reversen Regulation von den α -, β – und γ – Sekretasen durch STIM1 und STIM2. Schließlich wurden humane *post mortem* Hirnproben der Analyse der Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 und STIM2 unterzogen.

Zunächst wurde der Einfluss von Presenilin - Proteinen auf das intrazelluläre Ca²⁺ - Signal in unterschiedlichen murinen und humanen Zelllinien untersucht. Während in Bezug auf Presenilin 1 keine eindeutige Aussage bzgl. der Regulation von SOCE gemacht werden konnte, schienen die Ergebnisse in Bezug auf Presenilin 2 für einen SOCE – aktivierenden Einfluss zu sprechen. Die Untersuchungen der $[Ca^{2+}]_i$ konnten keinen Einfluss von Presenilin1 auf die Aktivität von SOCE aufzeigen, jedoch sprachen die signifikanten Veränderungen der Genexpression von STIM – und ORAI – Proteinen in Presenilin1 – und Presenilin1/2 – defizienten Zellen für einen modulierenden Einfluss

von Presenilin1 auf der Genebene. Presenilin2 scheint SOCE über eine forcierte Speicherentleerung des endoplasmatischen Retikulums potenzieren zu können. In der Literatur häufen sich die Belege für einen SOCE – hemmenden Einfluss von Presenilin2. Hierbei übt am ehesten Presenilin1 einen inhibierenden Einfluss auf die Funktion von Presenilin2 aus, weswegen die gestörte Speicherentleerung des endoplasmatischen Retikulums zu seiner Ca^{2+} -Überladung führt und folglich der SOCE beeinträchtigt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein SOCE – hemmender Einfluss sowohl auf der Gen – als auch auf der Aktivitätsebene durch AICD/AL2ICD nachgewiesen werden. AICD/AL2ICD sind hingegen Spaltprodukte, die im Zuge der APP – Prozessierung durch die γ – Sekretase anfallen. Demnach scheint Presenilin1 und/oder Presenilin2 zum einen direkt über die Regulation der Speicher des endoplasmatischen Retikulums und zum anderen indirekt über die Produktion von genregulatorischen AICD/AL2ICD den SOCE zu modulieren.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein Hinweis auf den SERCA – fördernden Einfluss von AICD/AL2ICD entdeckt. Die Literatur berichtet von einer Aktivierung der SERCA – Pumpe durch Presenilin1 und Presenilin2 im Zuge einer direkten Interaktion. In dieser Arbeit lagen Hinweise auf eine zusätzliche indirekte Aktivierung der SERCA über die Bildung von AICD/AL2ICD vor. Somit scheint AICD/AL2ICD einen wichtigen Regulator der Ca^{2+} - Homöostase darzustellen. AICD/AL2ICD schützt demnach vor einer Ca^{2+} - Überladung der Zelle, indem sie den Ca^{2+} - Influx aus dem Extrazellularraum durch die Hemmung von SOCE kontrolliert und über die Aktivierung der SERCA – Pumpe Ca^{2+} - Ionen in die intrazellulären Speicher bringt. Beides führt zu einer Senkung der $[Ca^{2+}]_i$.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem nachgewiesen werden, dass STIM – Proteine direkt, Ca^{2+} - unabhängig und indirekt über die Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ die Funktion der α – Sekretase sowohl auf der Protein - als auch auf der Aktivitätsebene steigern, wohingegen die Funktion der γ – Sekretase auf der Gen -, Protein – und Aktivitätsebene herunterreguliert wird. Demnach übt STIM1 und STIM2.2 einen inhibierenden Einfluss auf die γ – Sekretase aus, wohingegen STIM2 diese fördert. Bezüglich der Funktion der β – Sekretase lagen nur indirekte Hinweise auf einen hemmenden Einfluss von STIM vor.

Die Untersuchung der Genexpression von CavD wies auf eine mögliche Regulation sowohl durch A β als auch durch AICD hin. Während APP – defiziente Zellen, die folglich weder A β noch AICD exprimieren, sowie Zellen mit herunterreguliertem Fe65, einem Translokationspartner von AICD, eine Reduktion der Genexpression gezeigt haben, wiesen Zellen mit einer überschießenden A β – Produktion ebenfalls eine Reduktion der Genexpression auf. Presenilin1 – defiziente Zellen konnten keinen Unterschied verglichen zur Kontrolle zeigen. Somit scheint AICD die Genexpression von CavD zu fördern, wohingegen A β diese hemmt. Die Genexpression von CavB wird am ehesten durch A β reguliert, wobei

es die Genexpression von CavB inhibiert. Im Fall von CavG bewirkt AICD ebenfalls am ehesten eine Reduktion der Genexpression.

Zusätzlich wurde in humanen *post mortem* Hirnproben untersucht, inwiefern die Genexpression von den oben angeführten ORAI -, STIM - und VGCC - Proteinen in AD verändert ist. Gegenüber der Kontrollkohorte konnte eine signifikante Steigerung aller Gene nachgewiesen werden. Die Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI3, STIM1 und vermutlich STIM2 erfährt mit steigendem Alter bei Vorliegen von AD eine Reduktion, wobei CavD unabhängig von AD mit dem Alter negativ korreliert. Außerdem konnte für CavB, ORAI1, ORAI3 und STIM1 eine positive Korrelation zwischen dem Braak - Stadium I und den Stadien V- VI ermittelt werden, wohingegen STIM2 nur zwischen den Stadien I und VI positiv korrelierte. In Bezug auf die Allelkonstellation von ApoE ergaben die Untersuchungen der Genexpression eine Steigerung der Gene CavB, CavD und ORAI1 bei zusätzlichem $\epsilon 4$ - Allel, wohingegen die Genexpression von CavD bei zusätzlichem $\epsilon 3$ - Allel abnahm. Es lagen keine Hinweise auf einen Zusammenhang mit dem Geschlecht vor.

1.2 ABOUT THE REGULATION OF CALCIUM HOMEOSTASIS AND THE INFLUENCE OF STIM – PROTEINS ON ALZHEIMER'S DISEASE

There is one person every three seconds who get dementia worldwide. There are 50 – 60 % of all cases of dementia that go to the Alzheimer's disease, therefore Alzheimer's disease makes up the most common cause of dementia. Macroscopic hallmarks are the equally distributed atrophy of the cortices and the widening of the liquor spaces, whereas the histopathological changes are represented by a massive neurodegeneration accompanied by extracellular amyloid (A β) deposits and intracellular hyperphosphorylated neurofibrillary tau tangles. A β arises as a product of the amyloidogenic APP processing by sequential cleavage of β – and γ – secretases. Presenilins as one of the subunits of the γ – secretase exert hereby the catalytic activity. α – secretase is the next enzyme that processes the non – amyloidogenic APP proteolysis with sAPP α being secreted in the extracellular space and having neuroprotective properties. There is evidence of a disturbed Ca $^{2+}$ - homeostasis in AD. APP as well as A β , sAPP α and presenilins seem to be involved in the regulation of the Ca $^{2+}$ - household. To balance the intracellular Ca $^{2+}$ concentration ([Ca $^{2+}$]_i) plenty of agents are required to mediate the Ca $^{2+}$ transport across the plasma membrane and between the cytosol and intracellular cell compartments. The voltage gated Ca $^{2+}$ - channels (VGCC) and the Ca $^{2+}$ release – activated channels (CRAC) mediating the store operated Ca $^{2+}$ entry (SOCE) are some of them. In scope of this work the influence of APP, it's cleavage products and presenilins was analyzed on CavB, CavD and CavG being representatives of the VGCC family and on ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1, STIM2, STIM2.1 and STIM2.2 as SOCE components. Subsequently the reverse regulation of the α -, β – and γ – secretases by STIM1 and STIM2 was analyzed. In the end the gene expression of CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 and STIM2 was investigated in the humane post mortem cerebral samples.

First of all the influence of presenilins on the Ca $^{2+}$ signaling has been tested in different mouse and humane cell lines. While no exact conclusions could be made regarding presenilin 1, the results concerning presenilin 2 indicated a SOCE activating effect. Presenilin1 seems to be not involved in the regulation of the activity of SOCE, however there is a clue that presenilin1 interfere with the gene regulation as it was seen in presenilin1 – and presenilin1/2 – deficient cell lines. Presenilin2 seems to facilitate SOCE by intensifying the emptying of the endoplasmatic reticulum – storages. There is a body of evidence that presenilin1 inhibits SOCE. So presenilin1 seems to have an inhibitory effect on the functioning of presenilin2 leading to a Ca $^{2+}$ overload in endoplasmatic reticulum by minimizing its storage emptying. Next discovered was the SOCE inhibitory effect of AICD/AL2ICD that was confirmed at the gene and the activity level. In turn AICD/AL2ICD are cleavage products of APP that arise in the course of proteolysis by γ – secretase. Therefore presenilin 1 and 2 apparently modulate SOCE directly

by regulating the storages of endoplasmatic reticulum and indirectly by producing the gene regulatory AICD/AL2ICD.

Furthermore a SERCA pump activating effect of AICD/AL2ICD could be shown in the course of the work. The literature reports about the SERCA activating effect of presenilins by direct interaction. So presenilins can activate the SERCA pump by producing AICD/AL2ICD additionally. Consequently, AICD/AL2ICD play an important role in the regulation of the Ca^{2+} - homeostasis by preveting the cell against a Ca^{2+} overload. Firstly, AICD/AL2ICD controls the Ca^{2+} influx across the plasma membrane by inhibiting SOCE and secondly it stores Ca^{2+} in the intracellular cell compartments by activating the SERCA pump.

Investigating the protein and acitivity level it could be shown that STIM proteins are able to activate the α – secretase both directly, Ca^{2+} - independently as well as indirectly, Ca^{2+} - dependently, whereas the functioning of the γ – secretase as shown on the gene, protein and activity level could be down regulated. Furthermore STIM1 and STIM2.2 seem to inhibit, whereas STIM2 seems to facilitate the γ – secretase. Referring to β – secretase only some clues were given for STIMs to inhibit it's functioning.

Analyzing the gene expression of CavD evidence was given of A β and AICD being involved in its regulation. While APP – deficient cells being avoid of A β and AICD as well as cells with down regulated AICD translocation partner Fe65 has shown a reduction of the gene expression, cells with exaggerated A β production presented a reduction of the gene expression as well. In addition, cells not expressing presenilin1 couldn't show any difference compared to the control cells. So it seems AICD potentiates the gene expression of CavD, whereas A β is likely to reduce it. CavB seems to be regulated rather by A β , whereas there is an inhibitory effect being observed. Regarding CavG there is a clue, AICD reduces it's gene expression, as well.

Furthermore the gene expression of mentioned above ORAI -, STIM – and VGCC – proteins was analyzed in the humane post mortem cerebral samples of patients with Alzheimer's disease. In comparison to the control cohort all of genes showed a significant elevation. CavB, CavD, ORAI1, ORAI3, STIM1 and most likely STIM2 are experiencing a reduction by aging when having Alzheimer's disease, whereas CavD is getting reduced with growing age independently of Alzheimer's disease. Besides that a positive correlation could be shown for CavB, ORAI1, ORAI3 and STIM1 regarding the Braak stage I and V - VI, whereas STIM2 proved a positive correlation between the stages I and VI. Analyzing the importance of the ApoE allels combination, an increase of the gene expression of CavB, CavD and ORAI1 could be proved in case of an additional $\epsilon 4$ – allel. In case of an additional $\epsilon 3$ - allel

the gene expression of CavD is getting reduced. No correlation between the gender and gene expression of the investigated genes could be detected.

2. EINLEITUNG

2.1 DIE ALZHEIMER KRANKHEIT

2.1.1 Geschichte

Der Erstbeschreiber der Alzheimer Krankheit (engl. Alzheimer's disease, AD) war ein deutscher Psychiater und Neuropathologe, Alois Alzheimer. 1901 wurde die 51-jährige Auguste Deter seine Patientin. Er beschrieb ausführlich ihren Krankheitsverlauf, der von zunehmendem Gedächtnisverlust, Aggression und Desorientiertheit geprägt war, und als sie nach nur viereinhalb Jahren starb, führte er eine Sektion durch. Ihm fielen die gleichmäßige Atrophie der Hirnrinde sowie „merkwürdige“ Neurofibrillen und „Einlagerungen eigenartigen Stoffes in der Hirnrinde“ auf. Seine Ergebnisse stellte er im Jahr 1906 auf der 37. Versammlung der Süddeutschen Irrenärzte in Tübingen vor, die jedoch auf keine große Resonanz stießen [7]. Erst 1910 wurde die Pathologie unter der „Alzheimerschen Krankheit“ von Emil Kraepelin eingeführt [257]. Doch es sollten über 70 Jahre vergehen, bis die Krankheit als eine der wichtigsten Ursachen der Demenz und geschuldet den Sekundärerkrankungen eine der Haupttodesursachen in den USA angesehen wurde [238].

Über den sogenannten „Altersblödsinn“ wurde allerdings bereits im 17. Jahrhundert berichtet. So schrieb Thomas Willis, englischer Arzt und einer der Begründer der Neurowissenschaften, über eine „Narrheit“, die u.a. angeboren sei oder allmählich mit steigendem Alter auftreten kann [489]. Eine Erklärung der Pathophysiologie gab es jedoch nicht.

2.1.2 Epidemiologie

Alle drei Sekunden erkrankt ein weiterer Mensch an einer Demenzerkrankung weltweit. Im Jahr 2018 waren weltweit rund 50 Mio. Menschen mit einer Demenz registriert. Dies entspricht in etwa der Populationsgröße von Südkorea oder Spanien. Aufgrund des demographischen Wandels wird die Zahl der Demenzerkrankten bis zum Jahr 2050 schätzungsweise auf 152 Mio. ansteigen, was die Größe von Russland oder Bangladesh übersteigen würde. In etwa 50 – 60 % der Fälle stellt Morbus Alzheimer die häufigste Demenzursache dar. In anderen Fällen liegen u.a. vaskuläre Demenz, Lewy Body Demenz sowie Frontotemporale Demenz vor [365]. Oft liegt einer Demenz mehr als nur eine Ursache zugrunde. Etwa die Hälfte der an Alzheimer erkrankten Menschen leidet zusätzlich an einer vaskulären Demenz, was einer Mischform der Demenz entspricht [414,415]. Pro Jahr belaufen sich die Ausgaben für die gesundheitliche Versorgung und Langzeitbehandlung der Demenzerkrankten weltweit auf über 1 Trillion \$, wobei davon auszugehen ist, dass sich die Kosten bis 2030 verdoppeln werden. In der US – amerikanischen Bevölkerung sind es jährlich 48 028 \$ pro Person, was die Kosten für die Behandlung

von Nicht – Demenz Erkrankten dreifach übersteigt [6]. In den USA verursachen die Sekundärerkrankungen von Morbus Alzheimer mehr Tote als Brust- und Prostatakarzinom zusammengenommen. In England und Wales stellen diese die häufigste Todesursache dar [365]. Somit betrifft die Diagnose von Morbus Alzheimer bzw. einer Demenzerkrankung nicht nur das Individuum und sein soziales Umfeld, sondern stellt auch für die Sozioökonomie eine beträchtliche Herausforderung dar.

2.1.3 Ätiologie

Bei der Ätiologie wird zwischen der familiären und der sporadischen Form von AD unterschieden. Klinisch bietet das Manifestationsalter einen Hinweis auf die mögliche zugrundeliegende Ursache, wobei die sporadische Form von AD meist nach dem 65. Lebensjahr auftritt und dementsprechend auch LOAD (engl. late onset Alzheimer's disease) genannt wird und die familiäre AD (engl. familial Alzheimer's disease, FAD), die sich in den meisten Fällen vor dem Erreichen des 65. Lebensjahres manifestiert und in seltenen Fällen sogar bereits im Jugendalter auftritt, oft als EOAD (engl. early onset Alzheimer's disease) bezeichnet wird [17,21].

Den meisten Fällen von AD liegt eine sporadische Erkrankungsform zugrunde [21,28]. Alter stellt dabei den bedeutendsten Risikofaktor dar [160]. Dem aktuellen Report der *Lancet* Kommission zufolge, könnte die Manifestation von Morbus Alzheimer in bis zu 40 % der Fälle durch potenziell veränderbare Risikofaktoren hinausgezögert oder gar verhindert werden. Zu diesen Risikofaktoren gehören schlechter Bildungsstand v.a. in den jungen Jahren, Schwerhörigkeit, Schädelhirntraumata, Depression, soziale Isolation, Luftverschmutzung sowie kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Adipositas, arterielle Hypertonie, Bewegungsmangel, Rauchen und Alkoholabusus. Hiervon sollen alleine eine gute Bildung, die Korrektur der Hörschwäche und der Rauchverzicht die Prävalenz von Morbus Alzheimer um bis zu 20 % senken können [292]. Ein höherer Bildungsstand ist insofern wichtig, da dieser zum Aufbau der kognitiven Reserve maßgeblich beiträgt [444]. Demnach ist eine geringe Anzahl an Bildungsjahren mit wenig geistig stimulierenden Jobs, einem niedrigen sozioökonomischen Status und höheren kardiovaskulärem Risikoprofil mit der Entwicklung einer Demenz, u.a. einer Alzheimer – Demenz, assoziiert [6,371,443]. Auch wiederholte Schädelhirntraumata u.a. im Rahmen von sportlichen Aktivitäten wie Boxen können die Entstehung einer milden Einschränkung der Kognition (engl. mild cognitive impairment, MCI), einer Demenz und von anderen neurogenerativen Krankheiten begünstigen [300,367]. So konnte nach Schädelhirntraumata eine Steigerung der A β – und Tau – Pathologie im Gehirn sowie eine erhöhte A β – Menge und eine gesteigerte Produktion des Amyloid-Vorläuferproteins (engl. amyloid precursor

protein, APP) im cerebrospinalen Liquor nachgewiesen werden [124]. Als bedeutendster genetischer Risikofaktor gilt das $\epsilon 4$ – Allel des Apolipoproteins E (ApoE) auf dem Chromosom 19q13 [87,446]. Außerdem konnten inzwischen zahlreiche Genloci identifiziert werden, die mit einem gehäuften Auftreten von AD assoziiert sind [493]. Diese kodieren u.a. für Proteine des Immunsystems, endosomalen Transports sowie des Cholesterin – und Lipidmetabolismus [235]. Im Rahmen der genomweiten Assoziationsstudien konnte u.a. auch ein Genlocus identifiziert werden, welcher für Clusterin oder Apolipoprotein J (ApoJ) kodiert [181]. ApoJ wird sowohl im Blut als auch im Gehirn stark exprimiert und ist analog zu ApoE im Lipidtransport involviert [350]. Es wird angenommen, dass ApoJ die A β – Fibrillierung behindert und den Rezeptor – mediierten Abbau von A β via Endozytose in die Gliazellen fördert [350]. Zusätzlich sind Individuen mit einer familiären Prädisposition, insbesondere bei einer Erkrankung von mehr als einem Verwandten ersten Grades, gefährdet, im Laufe ihres Lebens AD zu entwickeln [468]. Auch im Falle von bestimmten chromosomalen Abnormalitäten ist das Risiko einer sporadischen AD stark erhöht. So entwickeln über 50 % der Individuen mit einer Trisomie 21, auch bekannt als Down - Syndrom, im Laufe ihres Lebens AD. Bei Erreichen des 40. Lebensjahres weisen die meisten Betroffenen A β – Plaques und eine erhöhte Menge an Tau – Bündeln im Gehirn auf. Im Alter von 50 Jahren entwickeln 30 % der Menschen mit einem Down – Syndrom die Alzheimer Demenz, während im Alter von 60 Jahren der Anteil sich bereits auf 50 % anhebt [206]. Bemerkenswert hierbei ist, dass der Genlocus von APP ebenfalls auf dem Chromosom 21 präsentiert wird, wodurch ein Zusammenhang mit der Trisomie 21 vermutet werden kann [232].

Nur in 1 – 5 % der Fälle ist AD familiär bedingt [21]. Meistens handelt es sich dabei um autosomal – dominante Punktmutationen in den Genen, die für Proteine kodieren, die an neuropathologischen Prozessen von AD beteiligt sind. So führen Mutationen von APP und Presenilin 1 in den meisten Fällen zur AD – Manifestation, wohingegen Mutationen von Presenilin 2 mit einer 95 % - igen Wahrscheinlichkeit die familiäre AD nach sich ziehen [280,425]. Es sind über 150 Mutationen in beiden PS – Genen bekannt, wobei die meisten Mutationen PS1 betreffen [97,473].

2.1.4 Klinik

Der Krankheitsverlauf ist von zahlreichen unterschiedlichen Symptomen geprägt, wobei sich die Dynamik und die Schwere der Krankheit von Individuum zu Individuum unterscheiden. Laut revidierten Leitlinien aus dem Jahr 2011 kann Morbus Alzheimer in 3 Phasen unterteilt werden: präklinische Phase, milde Einschränkung der Kognition und Demenz [3,317,440]. Die präklinische Phase ist ausschließlich durch messbare Veränderungen von Biomarkern im Gehirn, Liquor oder Blut ohne jegliche Einschränkungen der kognitiven Fähigkeiten gekennzeichnet und kann vor mehr als 20 Jahren bevor

die ersten Symptome in Erscheinung treten beginnen [221,474]. Die Phase der milden Einschränkung der Kognition (engl. mild cognitive impairment, MCI) weist zusätzlich zu den Veränderungen von Alzheimer – assoziierten Biomarkern einen leichten kognitiven Abbau, der das Ausmaß des natürlichen Alterns übersteigt, auf. Dazu gehören allmählich abnehmende Gedächtnisleistung sowie mild ausgeprägte räumliche und zeitliche Desorientierung. Das Alltagsleben ist nicht beeinträchtigt [391]. Etwa 32 % der Betroffenen entwickeln in den nächsten 5 Jahren eine Alzheimer – Demenz [481], die den letzten Abschnitt der Alzheimer – Krankheit darstellt. Dieser umfasst eine milde, moderate und schließlich schwere Form der Demenz. Während die Betroffenen mit der milden Form der Demenz nur bedingt auf Hilfe angewiesen sind und ihren Alltag weitestgehend selbstständig meistern können, haben sie in der moderaten Phase Schwierigkeiten, Routineaufgaben zu verrichten. Sie sind zu Ort, Zeit, Situation und schließlich Person desorientiert und entwickeln Persönlichkeits - und Verhaltensveränderungen mit Misstrauen, Aggression und Agitation bis sie schließlich die Stufe der schweren Demenz erreichen. Komplette Pflegebedürftigkeit, Inkontinenz, Verlust von kognitiven Fähigkeiten und der Fähigkeit zur verbalen Kommunikation kennzeichnen das letzte Stadium. Durch die Schädigung von motorischen Hirnarealen tritt Bettpflichtigkeit hinzu. Die fortschreitende Destruktion von Stammhirnarealen führt zu schwerwiegenden Schluckstörungen mit gehäufte Aspirationspneumonie als Folge. Dies bildet den Grundpfeiler für die Entstehung der Sekundärerkrankungen, die letztendlich zum Tod führen.[6,49].

2.1.5 Diagnose

Analog zu den Leitlinien von 1984 [316] richtet sich die Diagnose nach der Eigen – und Fremdanamnese sowie nach den Ergebnissen von speziellen kognitiven Tests und neurologischer Fachbeurteilung. Zusätzlich wurde mit den revidierten Leitlinien von 2011, die vom National Institute on Aging (NIA) und von der Alzheimer’s Association herausgebracht wurden, der Nachweis von spezifischen Biomarkern eingeführt [3,222,317,440]. So können u.a. A β – Plaques im Gehirn mithilfe von PET (engl. positron emission tomography) detektiert werden. Inzwischen sind drei Radiotracer zugelassen: ^{18}F - Florbetapir, Flutemetamol und ^{18}F – Florbetaben [304]. Die Diagnose kann allerdings nicht nur anhand von Biomarkern gestellt werden. Sie muss durch weitergehende Untersuchungen verifiziert werden. Jedoch liegt der positive prädiktive Wert bei Vorliegen von MCI und positivem Amyloid – PET bei 86 % und macht die Diagnose des Morbus Alzheimer somit sehr wahrscheinlich [304,398]. Zusätzlich kann mithilfe von ^{18}F - AV1451 im PET kortikales Tau – Protein gemessen werden, welcher als Biomarker für neurofibrilläre Bündel fungiert [475]. Reduzierter Glukosestoffwechsel im ^{18}F - FDG – PET/CT (18-F-fluorodeoxyglucose – PET) [267] sowie Hirnatrophie im MRT, beides einem bestimmten räumlichen

Verteilungsmuster folgend, wobei v.a. der temporo – parietale Kortex betroffen ist, bieten weitere Anhaltspunkte für Neurodegeneration oder neuronale Schädigung [29].

Biomarker können zusätzlich im Liquor cerebrospinalis (engl. cerebrospinal fluid, CSF) untersucht werden. Demnach spricht eine reduzierte Menge an A β ₄₂ für Amyloid – Ablagerungen im Gehirn. Während eine erhöhte Menge der phosphorylierten Form des Tau – Proteins neurofibrilläre Bündelformationen widerspiegelt, ist die Erhöhung der Gesamt – Tauproteinkonzentration im CSF mit der Neurodegeneration assoziiert [222,356].

Noch in Entwicklungsstadien befinden sich Biomarker, die im Blut untersucht werden können. So könnten in nächster Zeit das Neurofilament Light Protein (NFL) als Proxy für Neurodegeneration, unterschiedliche A β – Ratios als Biomarker für cerebrale A β – Akkumulation sowie phosphorylierte Tau – Formen eine entscheidende Stellung in der Diagnostik einnehmen [337,356].

2.1.6 Therapie

Die Therapie von Morbus Alzheimer ruht auf zwei Säulen: der pharmakologischen und der nicht-pharmakologischen. Pharmakologisch stehen zurzeit fünf Optionen aus zwei Wirkstoffklassen zur Verfügung. Zum einen sind es die Acetylcholinesterasehemmer wie Donepezil, Rivastigmin und Galantamin, die über die Blockade der Acetylcholinesterase den Abbau von Acetylcholin im synaptischen Spalt behindern. Im Vergleich zur Placebogruppe konnte durch die Einnahme der Acetylcholinesteraseinhibitoren die Aufrechterhaltung der kognitiven Funktionen über sechs bis zwölf Monate erreicht werden [137]. Memantin ist ein weiteres Medikament, das über die Blockade von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) – Rezeptoren den toxischen Einfluss von L - Glutamat auf Neurone minimiert [68,319]. Neben einer erhöhten Neurotoxizität führt die gesteigerte Aktivierung von extrasynaptischen NMDA – Rezeptoren zu einem Shift der APP – Expression zugunsten der KPI (engl. Kunitz protease inhibitor) – enthaltenden APP – Isoformen APP770 und APP751 (2.2.1), was wiederum mit einer gesteigerten Produktion von A β assoziiert ist [39]. Die Antagonisierung dieser Rezeptoren entfaltet folglich AD – protektive Eigenschaften. Als fünfte Option wird die Kombination von Memantin mit Donepezil genutzt.

Die nicht – pharmakologische Säule stützt sich auf die Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren, mentales und physisches Training, Musiktherapie sowie Förderung des sozialen Engagements. Insbesondere die Kombination von physischen und mentalen Übungen soll sich positiv auf die Kognition auswirken [6,266,291].

Eine frühe Diagnose von MCI bei Morbus Alzheimer bedeutet für die Betroffenen eine Chance, die Progression von MCI zur Demenz abzumildern. Die Betroffenen profitieren gerade in der Zeit bevor sich die Demenz manifestiert am meisten von den angeführten Therapieoptionen. Auch wenn die Krankheitsprogression nicht aufgehalten werden kann, können die kognitiven Leistungen vorübergehend gebessert werden und die Lebensqualität länger aufrechterhalten werden [6].

2.1.7 Prognose

Die Überlebenszeit von Patienten mit AD liegt im Durchschnitt zwischen 3 und 10 Jahren, wobei dem Alter bei der Manifestation die bedeutendste Rolle zukommt. So überleben die Patienten, die bei der Diagnosestellung um die 60 bis 70 Jahre alt sind, durchschnittlich 7 bis 10 Jahre, wohingegen bei den Patienten, die älter als 90 Jahre alt sind, eine Überlebenszeit von nur 3 oder weniger Jahren zu erwarten ist [351]. Die Betroffenen versterben meist an Sekundärerkrankungen, wobei die Aspirationspneumonie die häufigste Todesursache darstellt [49]. Aufgrund von Immobilisation erleiden die Betroffenen oft thromboembolische Ereignisse im Sinne einer Lungenembolie [240] und entwickeln Sepsis als Folge von u.a. Dekubitalleiden [6]. Etwa 40 % der Zeit durchleben die Betroffenen das schwere Stadium der Demenz und verbringen deshalb die meiste Zeit in Pflegeeinrichtungen [10]. Schätzungsweise zwei Drittel der an AD erkrankten Menschen älter als 65 Jahre versterben in Pflegeheimen, im Vergleich dazu sind es knapp 21 % der Krebspatienten und 28 % der Menschen, die an diversen anderen Krankheiten leiden [327].

2.1.8 Neuropathologie

Wesentliches Merkmal von AD ist die gleichmäßige Hirnrindenatrophie des fronto – temporalen sowie parieto – okzipitalen Kortex mit damit einhergehender Erweiterung der Liquorräume [416]. Durch neuronale Degeneration sowie Verlust von Synapsen im limbischen System, insbesondere im Bereich von Hippokampus wird die kognitive Leistungsfähigkeit in Mitleidenschaft gezogen [234].

Histopathologisches Pendant der Hirnatrophie ist die massive Neuronendegeneration begleitet von extrazellulären Amyloid – Plaques und intrazellulären Neurofibrillen (engl. neurofibrillary tangles, NFT) [139]. Zusätzlich werden Neuropilfäden (engl. neuropil threads), dystrophe Neurite, Astrogliose mit Proliferation der Microglia sowie cerebrale Amyloid – Angiopathie und chronische Inflammation beobachtet [2,422].

Bei den extrazellulären Amyloid – Plaques handelt es sich um Ablagerungen des aggregierten Amyloids – β ($A\beta$) [138]. $A\beta$ ist ein hydrophobes, etwa 4 kDa großes Peptid, das bei der sequentiellen proteolytischen Prozessierung von APP durch β - und γ – Sekretase anfällt [420]. Bedingt durch den γ

– Schnitt kommt es zur Bildung von unterschiedlich langen A β – Peptiden, die meist zwischen 34 und 43 Aminosäuren lang sind (A β 1-34 bis A β 1-43), wobei es auch A β – Spezies mit bis zu 49 Aminosäuren gibt [138,357,412,479]. Das N – terminale Ende von A β wird oft verkürzt oder modifiziert [42]. Das so gebildete A β ₄₋₄₂ und Pyroglutamat – modifizierte A β _{E3-42} gelten zusammen mit A β ₁₋₄₀ (A β ₄₀) sowie A β ₁₋₄₂ (A β ₄₂) als die Hauptvertreter der A β – Spezies in den amyloiden Plaques im vom AD befallenen Gehirn [42,329]. Den Hauptbestandteil von amyloiden Plaques macht hingegen das Peptid A β ₄₂ aus [219]. A β ₄₂ besitzt zusätzlich zwei hydrophobe Aminosäuren Isoleucin (41. AS) und Alanin (42. AS), die dem Peptid folglich einen hydrophoberen Charakter verleihen und es gegenüber A β ₄₀ durch eine stärkere Aggregationstendenz abgrenzen [224]. Zunächst lagern sich die A β – Peptide zu oligomeren A β – Spezies (Dimere, Trimere, etc.) zusammen. Diese aggregieren schließlich über Protofibrillen und reife Fibrillen zu komplexen unlöslichen A β – Plaques [66]. Auch unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Bildung von A β [164]. Durch FAD - assoziierte Mutationen in APP, PS1 sowie PS2, aber auch bei Trisomie 21 oder Vorkommen des ApoE ϵ 4 - Allel und durch weitere die Entstehung von AD begünstigende Faktoren wie das Alter erfährt der A β – Metabolismus ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Degradation, was schließlich in einer Erhöhung von A β resultiert [173,179,236]. Hierbei ändert sich nicht nur die Gesamtmenge von A β , sondern, vor allem bei Mutationen von PS1 und PS2 im Fall von FAD, ändert sich das Verhältnis von A β ₄₂ : A β ₄₀ zugunsten von A β ₄₂ [260].

Bei den intrazellulären NFTs handelt es sich um gepaarte, doppelhelikale Filamente von hyperphosphoryliertem Tau – Protein [156,157]. Die physiologische Funktion von Tau besteht darin, die Mikrotubuli zu stabilisieren, die den Zytoskelett stützen und den intraneuronalen sowie axonalen Transport gewährleisten [486]. Die hyperphosphorylierte Form des Tau – Proteins destabilisiert dieses mikrotubuläre Netzwerk, was die neuronale Dysfunktion mit einem Mangel an Neurotransmittern zur Folge hat und schließlich in einer Störung der normalen Gehirnfunktion mündet [100,215]. Während die A β – Ablagerungen bereits in den frühen Stadien unabhängig von der Krankheitsdauer ihren Höhepunkt erreichen [213], korreliert die Menge an NFTs mit dem Grad der Schwere von AD [422]. Darauf beruht die *post mortem* Klassifikation von AD nach Braak & Braak. Hierbei wurde das stereotype Verteilungsmuster der Tau – Pathologie über den Krankheitsverlauf berücksichtigt. So ist die Tau – Pathologie im Stadium I-II auf den entorhinalen – perirhinalen Kortex begrenzt, breitet sich im Stadium III-IV über das limbische System inklusive Hippokampus aus und nimmt in den Stadien V-VI den gesamten Neokortex ein [43].

Die Literatur über den pathophysiologischen Zusammenhang zwischen der Akkumulation von A β und der Tau - Pathologie bietet keinen einheitlichen Konsens. Eine mögliche Erklärung der pathogenetischen Vorgänge bietet die Amyloid – Kaskaden – Hypothese (2.2).

2.2 MOLEKULARE MECHANISMEN

Die Amyloid – Kaskaden – Hypothese stellt den favorisierten Erklärungsansatz der AD - Pathogenese in der aktuellen Forschung dar. Diese legt nahe, dass die aufgrund der gesteigerten Synthese oder der reduzierten Degradation erhöhte A β – Menge den initialen Anstoß darstellt [178,179,236]. Demnach führt die Akkumulierung von A β zur Oligomerisierung und Bildung von A β – Plaques. Diese wiederum führen u.a. zu einer inflammatorischen Reaktion und oxidativem Stress in den Neuronen, die eine Funktionsstörung von Kinasen und Phosphatasen zur Folge haben, was schließlich in einer Hyperphosphorylierung des Tau – Proteins mündet und folglich die Formation von Tau – Bündeln (NFT) unterstützt. Diese wiederum sind mit einer synaptischen Dysfunktion, Störung der Signaltransduktion und neuronalem Zellverlust assoziiert. Die Demenz bildet das Schlusslicht der Kaskade [179,236]. Die Inflammation wird durch zahlreiche entzündungsfördernde Faktoren aufrechterhalten, die mit den A β – Plaques in nächster Nähe liegen. Dazu gehören Komplementfaktoren, Akute – Phase – Proteine und proinflammatorische Zytokine sowie Cluster von aktivierten Gliazellen [111]. Die Amyloid – Kaskaden - Hypothese konnte mehrfach *in vivo* in unterschiedlichen Mausmodellen bestätigt werden. Die Induktion der NFT – Bildung durch A β spricht für das Auftreten der A β – Plaques vor der Bildung der NFTs [37,143]. Allerdings erbringen neuropathologische Studien von AD – Patienten den Nachweis, dass die Formation der Tau – Bündel in sehr frühen Stadien auftreten und der A β – Pathologie vorausgehen könnte. Anhand von 5xFAD Mausmodellen konnte Saul *et al.* den Einfluss von Tau auf die A β – Pathologie jedoch nicht nachweisen [406].

2.2.1 APP und seine Funktion

APP ist ein ubiquitär vorkommendes Typ I – Transmembranprotein mit einer großen N – terminalen Ektodomäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer kurzen cytoplasmatischen C – terminalen Domäne [232]. Das APP - Gen ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert und besteht aus 18 Exons [232,500]. Durch das alternative Spleißen im Exon 7 und 8 entstehen mehrere APP – Isoformen, überwiegend APP₇₇₀, APP₇₅₁ und APP₆₉₅, wobei die Zahl der Anzahl an Aminosäuren entspricht, mit APP₆₉₅ als Hauptvertreter im neuronalen Gewebe [233]. Im Gegensatz zu APP₆₉₅ besitzen APP₇₇₀ und APP₇₅₁ einen 56 Aminosäuren langen Kunitz - Protease - Inhibitor (KPI) innerhalb ihrer Ektodomäne [233], wobei die Expression von KPI – enthaltenden APP – Isoformen im vom AD befallenen Gehirn gesteigert ist und mit erhöhter A β – Menge assoziiert ist [321].

APP gehört zusammen mit APLP (engl. amyloid precursor-like protein) 1 und 2 zu einer stark konservierten Proteinfamilie in Säugetieren [482,483]. APLP2 besitzt eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von 71 % gegenüber APP und von 63 % gegenüber APLP1 [483]. Während APP

und APLP2 ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression von APLP1 auf neuronales Gewebe beschränkt [294,433]. Sowohl APLP1 als auch APLP2 besitzen keine vollständige A β – Sequenz [109,433]. Die funktionale Redundanz der APP/APLP – Familie, die den stark evolutionär konservierten Proteinen zugrunde liegt, kann folglich nicht durch die A β – Funktion erklärt werden. APP – defiziente Mäuse sind sowohl lebensfähig als auch fruchtbar, weisen jedoch eine Körpergewichtsreduktion von 15 – 20 % auf und haben leichte neuromuskuläre Einschränkungen [518]. Auch die APLP1 – bzw. APLP2 – defizienten Mäuse sind lebens – und fortpflanzungsfähig, wohingegen APP/APLP2 – und APLP1/APLP2 – sowie APP/APLP1/APLP2 – defiziente Mäuse eine frühe postnatale Letalität aufweisen [184,476], wobei das dreifache Gen – Abschalten (engl. knockout) von APP/APLP1/APLP2 zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen des Gehirns analog zur humanen Typ II – Lissenzephalie führt [190]. Der Umstand der Überlebensfähigkeit der Mäuse mit einem zweifachen Gen - Knockout von APP/APLP1 -/- lässt schlussfolgern, APLP2 alleine reiche aus, um den Verlust von APP bzw. APLP1 partiell zu kompensieren [184].

Trotz intensiver Forschung bleibt die physiologische Funktion von der APP/APLP – Proteinfamilie weitestgehend unklar. Die Proteine werden u.a. mit Zelladhäsion, transmembraner Signaltransduktion, Synaptogenese, Wachstum von Neuriten [519] sowie neuronaler Migration [502], axonalem Proteintransport [230] sowie Ca^{2+} - Metabolismus [279] und Langzeitpotenzierung [94] in Verbindung gebracht. Eine wichtige Rolle spielt das APP – Protein in der Lipidhomöostase im Sinne einer reziproken Regulation der Cholesterin – und Sphingomyelinsynthese [151,377]. So ergaben z.B. die Studien unter Anwendung der Cholesterinsenker Hydroxymethylglutaryl – Coenzym - A - Reduktase – Hemmer (HMG – CoA - R – Hemmer), eine Senkung der A β – Produktion [51,116,377]. Insgesamt betrachtet scheint APP/APLP – Proteinfamilie eine überlebenswichtige Rolle im Leben der Säugetiere zu spielen.

2.2.2 APP – Prozessierung

Die proteolytische APP – Prozessierung geschieht über den amyloidogenen und nicht – amyloidogenen Weg, wobei die Proteolyse von APP Ähnlichkeiten mit dem Abbau des Notch – Rezeptors aufweist [418].

APP wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Auf dem Weg zur Zelloberfläche über Golgi – Apparat und Trans – Golgi – Netzwerk (TGN) erfährt APP posttranslationale Modifikationen im Sinne der N – und O – Glykosylierungen sowie Phosphorylierungen und Sulfatierungen. Während ein Großteil von APP im Golgi/TGN verbleibt, gelangt etwa 10 % von APP an die Plasmamembran. Binnen Minuten wird APP, vermittelt über die YENPTY – Sequenz (AS 682-687 von APP₆₉₅), internalisiert und

auf dem endosomalen Recycling – Weg entweder in Endolysosomen degradiert oder wieder an die Zelloberfläche transportiert [348,458,494]. Die Degradation von APP im Sinne der amyloidogenen APP – Prozessierung findet aufgrund des sauren pH – Optimums der β – Sekretase überwiegend in Endosomen statt [165,251,254]. Zusätzlich wird APP im Zuge der amyloidogenen APP – Prozessierung sowohl im ER als auch im späten Golgi/TGN durch den sequentiellen Schnitt durch die β – und γ – Sekretase (Abb.1) zu $A\beta$ gespalten, wobei $A\beta_{1-40}$ ausschließlich im TGN und $A\beta_{1-42}$ sowohl im TGN als auch im ER generiert werden [147,182]. In nicht – erregbaren Zellen wird $A\beta$ hauptsächlich an der Zelloberfläche produziert [182].

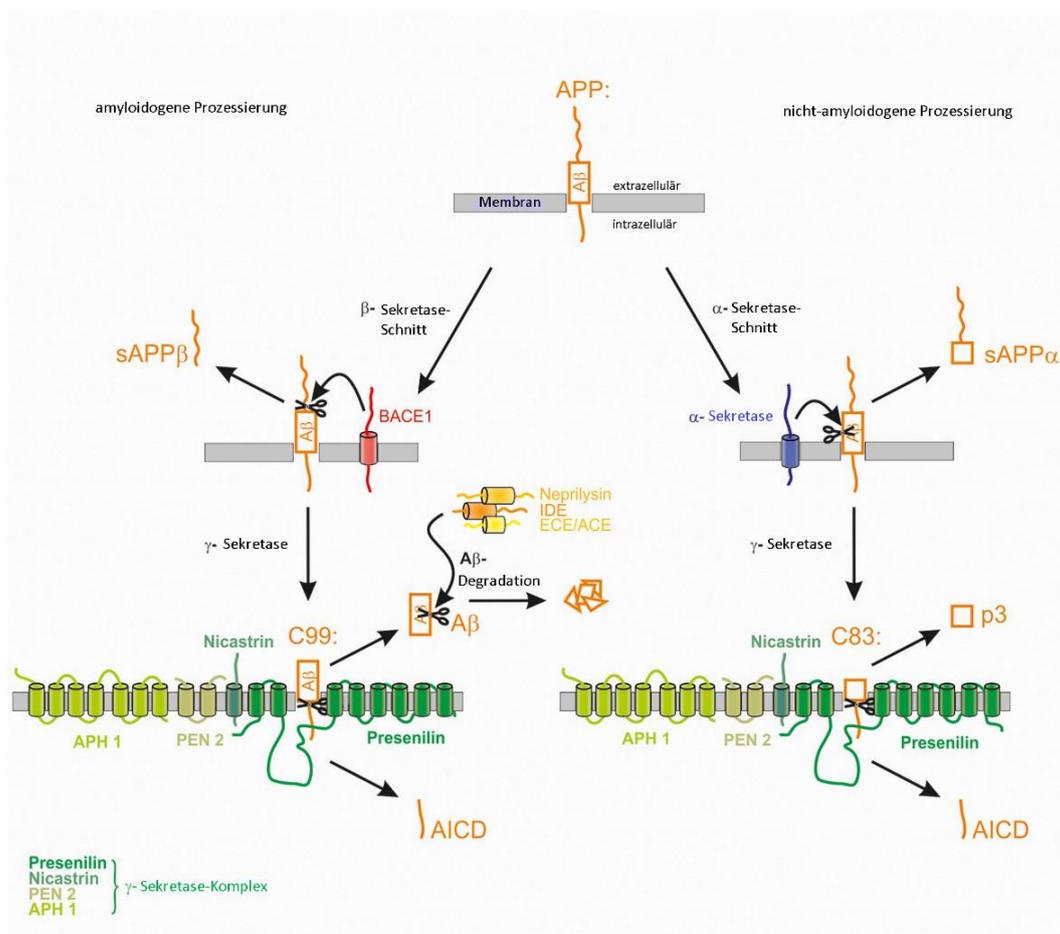


Abb. 1: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung

Die amyloidogene Prozessierung (links) wird durch den Schnitt der β -Sekretase initiiert, wobei $sAPP\beta$ freigesetzt und das membrangebundene β -CTF (=C99) gebildet wird. Der nachfolgende Schnitt von C99 durch die γ -Sekretase führt zur Freisetzung von $A\beta$ und AICD. $A\beta$ wird in Folge durch verschiedene Enzyme degradiert. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung (rechts) entsteht hingegen kein $A\beta$, da der initiale Schnitt durch die α – Sekretase innerhalb der $A\beta$ – Sequenz schneidet. Es entstehen $sAPP\alpha$ und α -CTF (=C83), wobei C83 durch die γ -Sekretase weiter zu p3 und AICD prozessiert wird. Modifiziert nach [154]

Die nicht – amyloidogene APP - Prozessierung findet hingegen an der Zelloberfläche statt. APP wird hierbei mittels sekretorischen Vesikeln von TGN zur Zelloberfläche transportiert und dort von der α –

Sekretase gespalten [432]. Im Gegensatz zur amyloidogenen APP – Prozessierung wird nach dem anschließenden Schnitt durch die γ – Sekretase kein A β gebildet [265] (Abb.1).

Die Initiierung der nicht – amyloidogenen APP – Prozessierung erfolgt durch die α – Sekretase. Bei der α – Sekretase handelt es sich um eine Zinkmetalloprotease der ADAM (engl. a disintegrin and metalloproteinase) – Familie mit ADAM17, auch TACE (engl. tumor necrosis factor- α converting enzyme) genannt, ADAM10 und ADAM 9 als Hauptvertreter [11,265,392]. Die Typ I – Transmembranproteine ADAM17, ADAM10 und ADAM9 schneiden innerhalb der A β – Sequenz zwischen Lysin (AS 16) und Leucin (AS 17) [432]. Während ADAM10 sowohl konstitutiv als auch reguliert enzymatisch aktiv sein kann [265], wird ADAM17 hauptsächlich eine regulierte Enzymaktivität zugeschrieben [53].

Die β – Sekretase ist eine Aspartylprotease, die überwiegend vor Asp1 der A β – Sequenz schneidet und somit die amyloidogene APP – Prozessierung mit Bildung von A β einleitet. Es konnten zwei β – Sekretasen identifiziert werden: BACE1 (β – site APP – cleaving enzyme, auch Asp - 2) und BACE2 (Asp - 1) [209,210,469], deren Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit von 64 % aufweist [210,470]. BACE1 ist ein 501 AS langes Typ1 – Transmembranprotein mit einem pH – Optimum von \sim 4,5 [166,167,251]. Aufgrund des sauren pH – Optimums ist BACE überwiegend in den frühen Endosomen sowie im Golgi und TGN lokalisiert [254,469]. Die katalytische Aktivität von BACE1 wird von zwei Aminosäuresequenzen, DTGS (AS 93-96) und DSGT (AS 289-292), lokalisiert im Lumen der intrazellulären Kompartimente, ausgetragen [209]. Aus dem ubiquitären Nachweis von A β lässt sich die Expression von BACE1 in allen Geweben schlussfolgern [170]. Die BACE1 – Aktivität ist im Hirngewebe höher als in peripheren Zellen [423], wobei diese wiederum in Neuronen stärker ausgeprägt ist als in Astrozyten [517].

Die γ – Sekretase ist ebenfalls eine Aspartylprotease [163], die zur Familie der *intramembrane cleaving proteases* (i – CLiPs) gehört und durch einen regulierten intramembranösen proteolytischen (engl. RIP, regulated intramembrane proteolysis) Abbau Typ1 – Transmembranproteine spaltet [163,485]. Es sind über 90 Substrate bekannt, die durch die γ – Sekretase nach vorausgehendem Abschneiden (engl. shedding) der Ektodomäne prozessiert werden [20,447]. Zu ihren Substraten gehören u.a. APP [95], Notch [96], ErbB4 [344] sowie E – Cadherin [303]. Aufgrund der entscheidenden Rolle von APP in der AD – Pathogenese und von Notch in der Entwicklung und Zelldifferenzierung [255] sind sie die am besten untersuchten Substrate. Analog zu APP katalysiert die γ – Sekretase den S3 – Schnitt des Notch – Rezeptors mit Freisetzung von NICD (engl. Notch intracellular domain) ins Zytosol, welche transloziert in den Nukleus die Transkription von unterschiedlichen Genen beeinflusst [96]. Die γ – Sekretase ist

sowohl im Golgi/TGN, ER, Mitochondrien, Lysosomen und Endosomen als auch an der Plasmamembran lokalisiert [127,177].

Strukturell betrachtet handelt es sich bei der γ – Sekretase um einen Proteinkomplex aus vier Untereinheiten: Presenilin1 (PS1) oder 2 (PS2), Nicastrin, Aph1 (engl. anterior pharynx defective 1) mit Aph1a und b in humaner [123] und Aph1c in muriner Spezies [186] sowie *presenilin enhancer 2* (PSENEN2) [220,247], mit einem Molekulargewicht von etwa 170 kDa zuzüglich 30 – 70 kDa abhängig von der Glykosylierung von Nicastrin mit insgesamt 19 Transmembrandomänen (TM) [409]. Davon stellt PS mit seinen 9 TM [269] das katalytische Zentrum des γ – Sekretase – Komplexes dar [247,490,512]. Um in einen vollständig funktionsfähigen Zustand überführt zu werden, wird das Typ3 – Transmembranprotein Presenilin innerhalb der Exon 9 Region zwischen TM6 und TM7 endoproteolytisch gespalten. Das hierbei generierte 27-28 kDa N – terminale Fragment (NTF) und das 16-17 kDa C – terminale Fragment (CTF) verbinden sich schließlich 1:1 zu einem stabilen und katalytisch aktiven Heterodimer [385,456,457], wobei die katalytische Aktivität auf zwei Aspartatresten (TM6: Asp257 in PS1 und Asp263 in PS2; TM7: Asp385 in PS1 und Asp366 in PS2) innerhalb der Lipiddoppelschicht beruht [490]. Vor der Endoproteolyse von PS kommt es zur Formation einer Art Gerüsts aus Aph1 und Nicastrin [270] mit folgender Interaktion des PS – Holoproteins mit der TM des Typ1 – Transmembranproteins Nicastrin [228]. Es folgt die Interaktion zwischen PSENEN2 und TM4 von PS [245] und schließlich nach der Endoproteolyse von PS die Bildung des reifen γ – Sekretase – Komplexes [490].

Der amyloidogene Weg der APP – Prozessierung wird durch den Schnitt der β – Sekretase initiiert. Diese schneidet prädominant vor Asp1 der A β – Sequenz [164,394] in der extrazellulären Domäne von APP, wobei ein lösliches sAPP β (engl. soluble β – secreted APP) in den Extrazellulärraum sezerniert wird und ein membranständiges, 99 Aminosäuren langes β – CTF – Fragment (engl. β –cleaved C – terminal fragment, auch C99) zurückbleibt [469]. Durch die anschließende Prozessierung von β – CTF durch die γ – Sekretase an der γ - Schnittstelle kommt es zur Sezernierung von pathogenem A β extrazellulär sowie durch den ϵ –Schnitt zur Bildung von genregulatorischem AICD (engl. APP intracellular domain) intrazellulär [56,229] (Abb.1). Analog zu NICD scheint auch AICD die Transkription von zahlreichen Genen zu regulieren. Nach der Bindung an sein Adapterprotein Fe65 und die Histon – Acetyltransferase Tip60 wird AICD in den Nukleus transloziert, wo es die Transkription von u.a. APP, BACE1, EGFR, p53, Nephilysin, KAI1, Tip60 und GSK - 3b reguliert [5,16,155,187,358,477,514]. Im Gegensatz zur nicht – amyloidogenen APP – Prozessierung, die an der Zelloberfläche abläuft [432], findet die amyloidogene Prozessierung von APP aufgrund des sauren pH – Optimums von BACE1 überwiegend in den Endosomen statt [469]. Überdies erfolgt die nicht – amyloidogene APP –

Prozessierung eher in den *Non raft* – Membranmikrodomänen, wohingegen die amyloidogene Proteolyse in den *Lipid raft* – Membranmikrodomänen vollzogen wird [110,387]. Bei den *Lipid raft* – Membranmikrodomänen handelt es sich um Stellen in der Membran, die dicht gepackt mit Cholesterin, Sphingo – und Glykolipiden sowie Proteinen sind. Im Gegensatz dazu werden die *Non raft* – Mikrodomänen primär aus Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren aufgebaut und sind fluider [284,431]. APP, BACE1 und der γ – Sekretase – Komplex gehören den Proteinen an, die u.a. mit *Lipid rafts* assoziiert sind [200,387].

Neben dem klassischen Schnitt vor der AS 1 (Asp1) der $A\beta$ – Sequenz schneidet BACE1 alternativ vor Val-3 und Glu+11 von $A\beta$ [144,165,469], wobei N – terminal verkürzte bzw. verlängerte $A\beta$ – Peptide entstehen. Außerdem sind auch mehrere γ – Sekretase - Schnittstellen bekannt, die die Länge des C – terminalen Endes von $A\beta$ – sowie des N – Terminus von AICD – Peptiden bestimmen. Die Prozessierung durch die γ – Sekretase erfolgt in 3 bis 4 AS – Schritten [453]. So wird durch den initialen ϵ – Schnitt $A\beta_{48/49}$ generiert [405,484], es folgt der ζ – Schnitt mit der Freisetzung von $A\beta_{45/46}$ [515] und schließlich der γ – Schnitt, der neben $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ auch $A\beta_{37,-38,-39}$ sowie -43 erzeugt [168,169,516] (Abb.2). Im Gegensatz zu unterschiedlich langen $A\beta$ – Peptiden sind bisher nur zwei AICD – Oligopeptide, AICD 49-99 und AICD 50-99, bekannt [229].

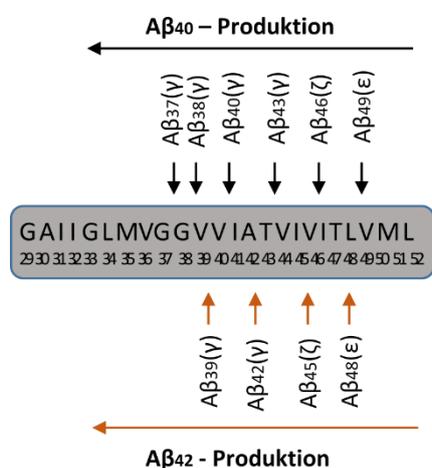


Abb. 2: Aβ - Schnittsequenz durch γ -Sekretase

Dargestellt ist die Transmembrandomäne der $A\beta$ -Sequenz mit verschiedenen γ -Sekretase – Schnittstellen. Im Zuge der sequenziellen Prozessierung durch die γ -Sekretase entstehen unterschiedliche $A\beta$ -Spezies. Modifiziert nach [169].

Bei der nicht – amyloidogenen APP – Prozessierung fällt hingegen kein $A\beta$ an, da der initiale Schnitt durch die α – Sekretase innerhalb der $A\beta$ – Domäne vor Leu17 liegt. Die nicht – amyloidogene APP – Prozessierung erfolgt an der Zelloberfläche [53,432]. Das dabei anfallende sAPP α (engl. soluble α – secreted APP) wird in den Extrazellulärraum sezerniert und scheint neuroprotektive Eigenschaften zu besitzen [193]. Zurück bleibt das membrangebundene, 83 AS lange α – CTF (engl. α –cleaved C –

terminal fragment, auch C83), aus welchem durch den Schnitt der γ – Sekretase an der ϵ – Schnittstelle AICD und schließlich an der γ – Schnittstelle ein im Vergleich zu A β N – terminal um 16 AS verkürztes p3 – Peptid generiert werden [419,421] (Abb.1).

2.2.3 A β - Degradation

Die Beseitigung (engl. clearance) von A β wird von zahlreichen Transportmechanismen sowie degradierenden Enzymen ausgetragen, sodass sich die A β – Halbwertszeit auf unter 150 Minuten beläuft [80,407].

A β kann per Diffusion oder über aktiven Transport über die Blut – Hirn – Schranke vom Extrazellulärraum des Hirnparenchyms ins Blut auf kapillärer Ebene eliminiert werden. Eine weitere Möglichkeit A β aus dem Extrazellulärraum zu eliminieren, gelingt über das glymphatische System. Beim glymphatischen System fließt der Liquor aus dem Subarachnoidalraum über die perivaskulären Räume wie z.B. Virchow – Robinsche – Räume entlang der Arterien ins Hirnparenchym und verteilt über die Astrozytenfortsätze der Gliazellen direkt in den Interzellularräum. Die beim Umspülen der Zellen mitgerissenen Abfallstoffe u.a. A β werden über die perivaskulären Räume entlang der Venen gesammelt und zurück in den Liquorraum geleitet [212,428]. Ein Teil der Flüssigkeit in den perivasalen Räumen wird über die meningealen Lymphgefäße direkt in die zervikalen Lymphknoten geleitet [295]. Über das glymphatische System lässt sich jedoch nur 10 – 15 % der Gesamt - A β -Menge eliminieren, wobei der größte Teil via Transport über die Blut – Hirn – Schranke erfolgt [426]. Der aktive Efflux über die Blut – Hirn – Schranke erfolgt zum einen über den LRP (engl. low – density lipoprotein receptor - related protein) – 1 - Rezeptor [426] und zum anderen über den ABC – Transporter P – Glykoprotein, auch bekannt als MDR1 (engl. multi drug resistance) [264]. Um mittels LRP - 1 – Rezeptor über die Blut – Hirn – Schranke transportiert werden zu können, bildet A β zunächst einen Komplex mit Apolipoprotein J (ApoJ) [136] bzw. E [495], Transthyretin [417], Lipoproteinen [307], Albumin [31] oder α 2-Makroglobulin (α 2M) [106]. Nach der Internalisierung des LRP – Ligand – Komplexes durch späte Endosomen wird dieser entweder zur Degradation zu Lysosomen gebracht oder im Sinne einer Transzytose durch die Blut – Hirn – Schranke geschleust [192]. Jedoch scheint laut Shibata *et al.* die Komplexbildung keine zwingende Voraussetzung zu sein [426], was auf eine direkte Interaktion zwischen A β und LRP - 1 - Rezeptor schließen lässt [99]. Im Blut wird A β gebunden an seine Liganden zur Niere und Leber transportiert, um dort enzymatisch abgebaut zu werden [199].

Eine weitere Möglichkeit der A β – Clearance besteht in der enzymatischen Degradation durch u.a. Neprilysin [218], NEP2 [38], IDE (engl. insulin degrading enzyme) [261], ECE -1 und 2 (engl. endothelin converting enzyme) [107,108], Plasmin, uPA/tPA (engl. urokinase-, / tissue – type plasminogen

activator, indirekt durch Plasminogen Spaltung) [466], Matrixmetalloproteinase – 9 [15] und Cathepsin D [315] sowie in der Phagozytose durch die Mikroglia [79,125,393] und intrazellulärem Abbau durch Proteasomen [413].

2.3 DIE ALZHEIMER KRANKHEIT UND CALCIUM-HOMÖOSTASE

Calcium (Ca^{2+}) ist ein bivalentes Erdalkalimetall, welches in der Erdhülle als fünfthäufigstes Element und dritthäufigstes Metall vorkommt [148]. Ca^{2+} moduliert zahlreiche zelluläre Vorgänge. Neben Aktivierung von Enzymen, die z.B. Energielieferanten im Rahmen der Glykogenolyse (Phosphorylase-b-Kinase) oder der Ketonkörperverwertung (β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase) bereitstellen, ist Ca^{2+} an der Generierung von Aktionspotentialen sowie Sekretionsvorgängen beteiligt, reguliert den Hormonhaushalt, stellt einen wichtigen Bestandteil des Kontraktions - und Bewegungssystems (Myofibrille, Zilie, Pseudopodienformation) dar und ist in der Regulierung des Knochenstoffwechsels, von Proteinkinasen (z.B. Calmodulin) und – phosphatasen (z.B. Calcineurin), der Genexpression sowie der Apoptose involviert [22,57,83,120]. Um die Vielfältigkeit von Funktionen aufrechterhalten zu können, ist eine Vielzahl an komplexen und ausbalancierten Mechanismen zur Regulation des Ca^{2+} - Haushaltes erforderlich.

Der Referenzbereich für die Gesamt - Ca^{2+} Konzentration im Extrazellularraum [Ca^{2+}]_{ex} liegt zwischen 2,1 und 2,6 mM, wobei Ca^{2+} in an Proteine (z.B. Albumin) und Anionen (Phosphat, Sulfat, Bikarbonat, Zitrat) gebundener und ionisierter Form vorliegt [46,520]. Die Ca^{2+} - Konzentration [Ca^{2+}] in der Extrazellularflüssigkeit ist im Vergleich zum Zytosol um 10 000 bis 20 000-mal höher. Im Ruhezustand liegt aufgrund von Pufferproteinen (z.B. Calbindin, Parvalbumin) und Sequestrierung in intrazellulären Zellkompartimenten (z.B. ER, Mitochondrien, Lysosomen) die zytosolische Konzentration [Ca^{2+}]_i des freien Ca^{2+} bei ~ 100 nM [46,83]. Um die [Ca^{2+}]_i auf so niedrigem Niveau halten zu können, sind viele Mechanismen erforderlich. Primär wird Ca^{2+} mithilfe von Plasmamembran – Calcium – ATPasen (engl. plasma membrane Ca^{2+} - ATPase, PMCA) über die Plasmamembran aus dem Zytosol gepumpt und mittels der Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (engl. sarco – endoplasmatic reticulum Ca^{2+} – ATPase, SERCA) ins Lumen des ER gebracht. Zusätzlich wird die [Ca^{2+}]_i über mitochondriale Ca^{2+} Uniporter (MCU) reguliert, wobei Ca^{2+} aus dem Zytosol über die innere mitochondriale Membran ins Mitochondrium transportiert wird. Ebenso kann Ca^{2+} im Austausch mit Natrium über $Na^+ - Ca^{2+}$ – Austauscher (engl. $Na^+ - Ca^{2+}$ - exchanger, NCX) über die Plasmamembran ins Extrazellularraum befördert werden [195].

Um die [Ca^{2+}]_i zu erhöhen, wird Ca^{2+} entweder aus dem Extrazellularraum oder aus den intrazellulären Speichern v.a. aus dem ER ins Zytosol befördert. Grob lassen sich die Plasmamembran

ständigen Ca^{2+} - Kanäle in vier Gruppen unterteilen: 1. rezeptorgesteuerte Kanäle (engl. receptor – operated channels, ROCs), 2. spannungsgesteuerte Kanäle (engl. voltage – gated Ca^{2+} channels, VGCC), 3. speichergesteuerte Kanäle (engl. store – operated Ca^{2+} entry channels, SOCEs), 4. Familie der TRP – Kanäle (engl. transient receptor protein channels, TRPCs) [47]. Die rezeptorgesteuerten Ca^{2+} - Kanäle werden durch Liganden aktiviert. L – Glutamat stellt hierbei den wichtigsten exzitatorischen Transmitter im menschlichen Gehirn dar. Neben ionotropen Rezeptoren (iGluR) aktiviert Glutamat auch metabotrope Rezeptoren (mGluR). Die ionotropen Glutamatrezeptoren sind nicht – selektive Kationenkanäle und werden, benannt nach ihren synthetischen Agonisten, durch AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), NMDA (N-methyl-D-aspartate) und Kainsäure (KA) agonisiert. Während die iGluR Ca^{2+} direkt ins Zytosol leiten, führen die G – Protein gekoppelten mGluRs via Phospholipasen zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER [4]. Im Fall von spannungsgesteuerten Kanälen werden die VGCCs durch die Depolarisation der Membran aktiviert und bilden eine Pore, die hoch selektiv für Ca^{2+} - Ionen ist [64] (s. Kapitel 2.3.1). Die speichergesteuerten Ca^{2+} - Kanäle (engl. Ca^{2+} release – activated channels, CRACs) werden in Folge einer ER – Speicherentleerung durch STIM – Proteine aktiviert. Beim Entleeren der ER – Speicher kommt es zur Dissoziation von Ca^{2+} von der EF – Hand von STIM. Dies bewirkt eine Konformationsänderung von STIM, die zur Translokation zu speziellen Stellen in der ER – Membran führt. Die Aktivierung von Plasmamembran (PM) - ständigen CRACs wird an bestimmten PM – ER – Junctionsstellen, Stellen, an denen sich die ER – Membran und die Plasmamembran ganz nah kommen, vollzogen (s. Kapitel 2.3.2). Die Familie der TRP – Kanäle stellt ein großes System von Kanälen dar. Insgesamt sind in Säugetieren 28 Kanäle bekannt, die in sechs Untergruppen unterteilt werden: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPML (mucolipin) und TRPP (polycystin). Allen gemeinsam ist, dass aktivierte Kanäle zu einer Membrandepolarisation führen, wodurch u.a. VGCC aktiviert werden können [134]. Die Freisetzung aus den intrazellulären Ca^{2+} - Speichern (ER, Golgi – Apparat) geschieht über IP₃- Rezeptoren (engl. Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor) (s. Kapitel 2.3.2) und Ryanodin – Rezeptoren (RyR), wobei RyR u.a. im sarkoplasmatischen Retikulum der Myozyten lokalisiert sind und an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind [46,47]. RyR werden von drei Genen exprimiert: RyR1 vertreten hauptsächlich in der Skelettmuskulatur, RyR2 in Kardiomyozyten, Kleinhirn und Cortex sowie RyR3 ubiquitär exprimiert. Während in der Skelettmuskulatur die elektromechanische Kopplung eine direkte Interaktion zwischen Cav1.1 Dihydropyridinrezeptor (DHPR) im T – Tubulus und dem RyR1 erfordert, wird in den Kardiomyozyten RyR2 via Ca^{2+} , welches über Cav1.2 ins Zytosol transportiert wird, aktiviert [268].

2.3.1 Spannungsgesteuerte Calciumkanäle

Extrazelluläre Signale können über Veränderungen des Membranpotentials ins Zellinnere mithilfe von spannungsgesteuerten Calciumkanälen (engl. voltage – gated calcium channels, VGCC) übertragen werden. Die Membrandepolarisation führt zum Öffnen von VGCC und folglich zum Ca^{2+} – Einstrom entlang des starken Konzentrationsgefälles [478]. Die Aktivierung von VGCC in kardialen sowie glatten Muskelzellen löst zum einen direkt durch die steigende $[Ca^{2+}]_i$ und zum anderen indirekt durch die Aktivierung der sarkolemmalen Ryanodin – Rezeptoren eine Muskelkontraktion aus [386,463]. In der quergestreiften Skelettmuskulatur werden die sarkolemmalen Ryanodin – Rezeptoren durch eine direkte Interaktion mit den in den T – Tubuli lokalisierten VGCC aktiviert, was wiederum eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bewirkt und eine Kontraktion nach sich zieht [61]. In den Neuronen sind die VGCC an der synaptischen Signalübertragung beteiligt und lösen in den endokrinen Zellen eine Hormonsekretion aus [63,464,496].

Strukturell stellt VGCC einen Komplex aus fünf Untereinheiten dar: α_1 , α_2 , β , γ und δ [91,121,194]. Die α_1 – Untereinheit ist mit einem Molekulargewicht von 190 bis 250 kDa [114] das größte Molekül und bildet die Pore des Kanals. Sie ist mit einem 170 kDa Dimer aus $\alpha_2\delta$, das über Disulfidbrücken zusammengehalten wird, mit einer 55 kDa schweren intrazellulär gelegenen, phosphorylierten β – Untereinheit sowie einer 33 kDa γ – Untereinheit assoziiert [452]. Die über 2 000 AS lange α_1 – Untereinheit ist aus vier homologen Domänen aufgebaut (I - IV), die wiederum jeweils aus sechs Transmembrandomänen bestehen (S1 - S6) mit S4 als Spannungssensor des Kanals [64,454]. Die S5 - und S6 – Domänen bilden die Pore mit dem Selektivitätsfilter [62,65]. Während die γ – Untereinheit mit vier Transmembrandomänen in der Plasmamembran verankert ist [225], liegt die β – Untereinheit intrazellulär [65,452] und die α_2 – Untereinheit gebunden über Disulfidbrücken an die GPI (engl. glycosylphosphatidylinositol) – verankerte δ – Untereinheit extrazellulär [93] (Abb.3).

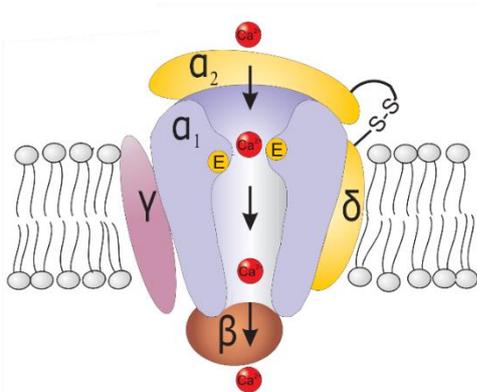


Abb. 3: Struktureller Aufbau von Cav-Kanälen

Cav-Kanäle werden aus fünf Untereinheiten aufgebaut, wobei α_1 die Pore bildet. α_2 kommt, verankert an δ , extrazellulär zu liegen, wohingegen β intrazellulär lokalisiert ist.

Quelle: [250]

Physiologisch und pharmakologisch lassen sich die spannungsabhängigen Calciumkanäle in sechs Klassen unterteilen: L, N, P/Q, R und T [114,464], deren Eigenschaften auf die genetische Variabilität

der α_1 - Untereinheit zurückzuführen sind [65]. α_1 wird durch mindestens 10 Gene kodiert. Zusätzliches alternatives Spleißen erklärt die große Vielfalt der VGCC. Die erste Isoform, die in der Skelettmuskulatur identifiziert wurde, wurde als α_{1S} bezeichnet, wohingegen alle nachfolgenden dem Alphabet nach angefangen mit α_{1A} bis α_{1E} tituliert wurden [32]. Seitdem wurden noch vier weitere α_1 – Isoformen entdeckt, die entsprechend von α_{1F} bis α_{1I} gehen. VGCC können entsprechend ihrer Struktur und Funktion in Subfamilien Cav1 – Cav3 eingeteilt werden und basierend auf ihren physikalischen Eigenschaften in hochspannungsaktivierte Calciumkanäle (engl. high voltage – activated channels ,HVA), denen die Subfamilien Cav1 und Cav2 angehören, und in niederspannungsaktivierte Calciumkanäle (engl. low voltage – activated channels, LVA) mit Cav3 als Vertreter zusammengefasst werden [98,114] (Abb.4).

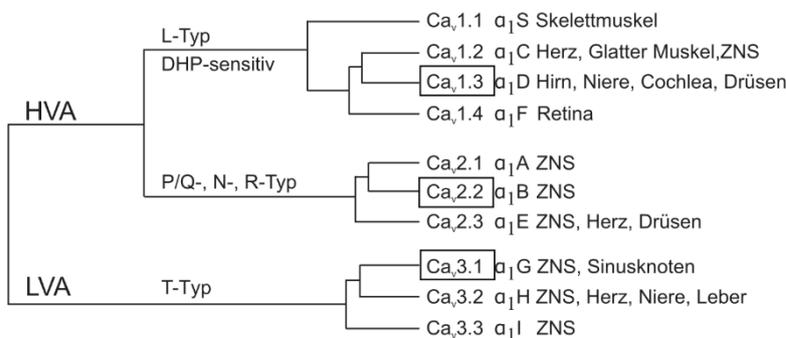


Abb. 4: Klassifizierung von VGCC

Dargestellt ist die Einteilung der VGCC nach ihren strukturellen, pharmakologischen und physikalischen Eigenschaften. In Kästchen eingefasst sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kanäle. Modifiziert nach [250]

Die Calciumkanäle vom L – Typ zeichnen sich durch eine hohe Aktivierungsspannung, große Einzelkanalleitfähigkeit sowie langsame spannungsabhängige Inaktivierung (L für engl. long-lasting) aus und werden von klassischen Calciumkanalblockern wie den Dihydropyridinen (z.B. Nifedipin), Phenylalkylaminen (z.B. Verapamil) und Benzothiazepinen (z.B. Diltiazem) inhibiert [386,464]. L – Typ Calciumkanäle kommen überwiegend in der kardialen, glatten und quergestreiften Muskulatur vor, werden aber auch in neuronalen und endokrinen Zellen sowie in der Retina exprimiert [19,120,250,464]. Im Gegensatz zum L – Typ Calciumkanal wird der T – Typ (T für transient) Calciumkanal bei eher negativem Membranpotential aktiviert und schnell wieder deaktiviert, hat nur eine niedrige Einzelkanalleitfähigkeit und ist resistent gegenüber den klassischen Calciumkanalblockern [58,117,349]. Bei dem N – Typ Calciumkanal (N für engl. neither T nor L) handelt es sich um einen Kanal, der auf eine eher mittlere Membrandepolarisation anspricht und schneller als der L – Typ aber langsamer als der T – Typ Calciumkanal inaktiviert wird [349]. Der N – Typ Calciumkanal

ist analog zum T – Typ Calciumkanal unempfindlich gegenüber den klassischen Calciumkanalblockern, wird jedoch durch Cadmium [349] sowie das Gift der Landkarten – Kegelschnecke ω – Conotoxin GVIA sowie verwandte Peptide blockiert [355]. Die zunächst in den neuronalen Purkinje – Zellen entdeckten P – Typ Calciumkanäle [293] werden durch das Spinnengift ω – Agatoxin IVA inhibiert [325], welches mit einer geringeren Affinität auch die Q – Typ Calciumkanäle blockiert [383]. Oft werden die beiden Kanaltypen zu P/Q – Calciumkanal zusammengefasst, da beide im Kleinhirn exprimiert werden und vom gleichen Toxin mehr oder weniger stark blockiert werden. Des Weiteren gibt es den R – Typ Calciumkanal, der nur in einzelnen Zelltypen durch das Peptid SNX-482, abgeleitet vom Gift der Tarantel *Hysteroocrates gigas*, blockiert werden kann [342]. Während die Calciumkanäle von L – und T – Typ in zahlreichen Zelltypen exprimiert werden, sind die N -, P -, Q – und R – Typ Kanäle überwiegend in den Neuronen vertreten [65].

So wichtig die Calciumkanäle für die physiologischen Vorgänge sind, so verheerend können sich die Folgen einer genetischen Störung auf den Organismus auswirken. So führt der Knockout von Cav1.3 (α_{1D}), welcher u.a. im Herz und der Cochlea exprimiert ist, führt zu Taubheit und Herzrhythmusstörungen im Sinne einer Arrhythmie und Bradykardie [368]. Auch das vegetative Nervensystem kann bei genetischen Veränderungen von VGCC stark in Mitleidenschaft gezogen werden. Ein Knockout von Cav2.2 (α_{1B}) in der murinen Spezies ruft Störungen des Sympathikus mit Tachykardie und Bluthochdruck hervor [214]. Außerdem scheint auch die Wahrnehmung des neuropathischen Schmerzes in den Cav2.2 Knockout – Mäusen reduziert zu sein [400]. Im Falle eines Knockouts von Cav3.1 (α_{1G}) wird ein Verlust der spontanen Aktivität in thalamokortikalen Neuronen registriert. Unter physiologischen Bedingungen werden die LVA – Kanäle, zu denen auch Cav3.1 (α_{1G}) gehört, zu einer hohen Dichte im Thalamus exprimiert und sollen für die Generierung von synchronen Spikes und Waves – Entladungen wichtig sein. Im Falle eines Knockouts sind die Knockout - Mäuse unempfindlich gegenüber epileptogenem GABA_B, was die Entstehung von Absencen unterdrückt [243]. Noch viele weitere Mutationen und Knockout – Tiermodelle sind bereits entdeckt oder befinden sich in der Forschung [250].

2.3.2 Speichergesteuerte Calciumkanäle

Der speichergesteuerte Calciumeinstrom (engl. store – operated Ca^{2+} - entry, SOCE) stellt in den nicht – erregbaren Zellen den wichtigsten Mechanismus, die $[Ca^{2+}]_i$ zu erhöhen, dar. Putney vermutete eine IP₃ – medierte ER – Speicherentleerung gefolgt von einem forciertem Ca^{2+} - Einstrom aus dem Extrazellularraum ins Zytosol, der solange durch IP₃ aufrechterhalten sein würde, bis sich die intrazellulären Ca^{2+} – Speicher wieder gefüllt hätten. Dieses Modell bezeichnete er zunächst als

kapazitiven Calciumeinstrom (engl. capacitative calcium entry) [378,379]. Jedoch konnte er keine Erklärung über die genauen zugrundeliegenden Mechanismen postulieren. Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass SOCE weder von IP_3 noch von zytosolischen $[Ca^{2+}]$ Schwankungen zwingend abhängig ist. So konnte der irreversible Inhibitor der SERCA – Pumpe Thapsigargin über das Entleeren der ER – Speicher ebenfalls SOCE induzieren [455]. Der Zusammenhang zwischen der ER – Speicherentleerung mit daraus resultierendem SOCE konnte zunächst von Hoth und Penner in den Mastzellen gezeigt werden [202]. Dank Thapsigargin konnte SOCE nicht nur in nicht – erregbaren Zellen sondern auch in den meisten erregbaren Zellen detektiert werden [195].

Biophysologisch kommt es u.a. nach der Bindung von spezifischen Liganden an G – Protein gekoppelte Rezeptoren zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) – β oder – γ . Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in der Plasmamembran (PM) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Während DAG die Proteinkinase C stimuliert, bindet IP_3 an den IP_3 – Rezeptor (IP_3R) in der ER – Membran und triggert die Freisetzung von Ca^{2+} aus den ER – Speichern ins Zytosol [26,445]. Die sinkende Konzentration des freien Ca^{2+} im ER ($[Ca^{2+}]_{ER}$) lässt Ca^{2+} von STIM (engl. stromal interaction molecule) dissoziieren, was eine Konformationsänderung und Oligomerisierung der STIM – Proteine bewirkt und ihre Translokation zu Plasmamembran - Endoplasmatisches Retikulum – Verbindungsstellen (engl. *PM – ER – junctions*) nach sich zieht [54,285,298]. *PM – ER – junctions* sind winzige Regionen, an denen sich die ER – Membran und die Plasmamembran bis auf 10 – 25 nm angenähert sind [492]. Die extreme Nähe ermöglicht eine Interaktion von STIM mit dem in der Plasmamembran lokalisierten CRAC (engl. Ca^{2+} release – activated Ca^{2+}) – Kanal mit Orai1 als porenbildende Untereinheit, was schließlich im Ca^{2+} - Einstrom durch den Kanal mündet [119,197,374] (Abb.5).

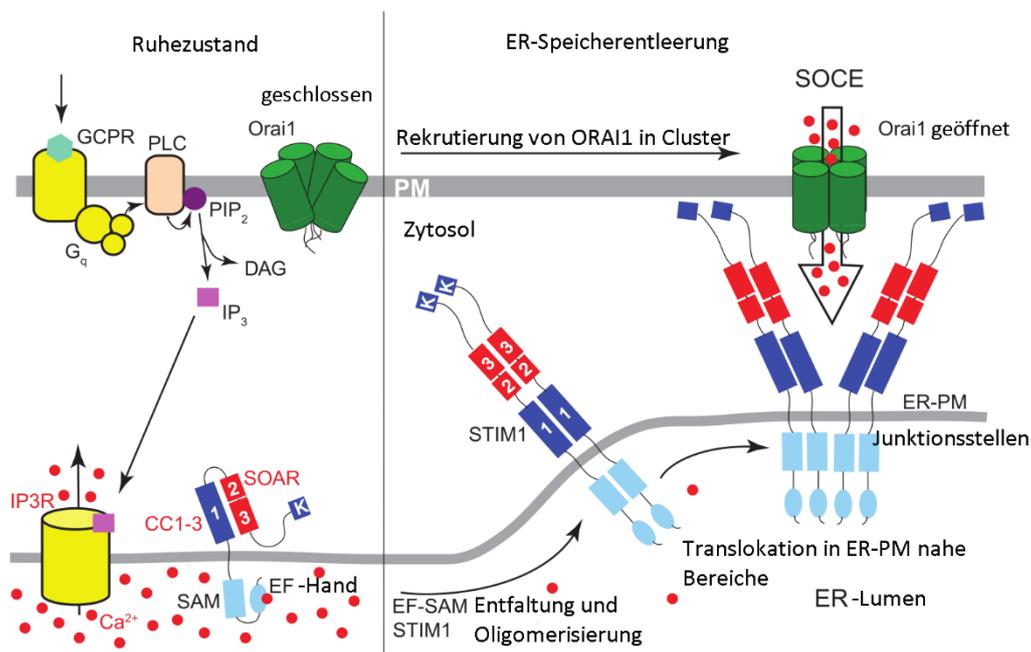


Abb. 5: Schematische Darstellung von speichergesteuertem Ca^{2+} -Einstrom durch ORAI1

Während die Ca^{2+} -Speicher im ER gefüllt sind, liegt STIM1 in einer geschlossenen, inaktiven Form vor. Im Zuge einer Rezeptorstimulation wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die zur Bildung von IP_3 und Aktivierung der IP_3R führt, wodurch Ca^{2+} aus den ER-Speichern entleert wird. Beim Entleeren der ER-Speicher kommt es zur Dissoziation von Ca^{2+} von der EF-Hand, wodurch STIM1 eine Konformationsänderung erfährt und über Oligomerisierung in PM-nahe Bereiche transloziert. Durch die Interaktion mit ORAI1-Kanälen kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol.

Modifiziert nach [338].

Der durch SOCE gebildete Ca^{2+} - Einstrom wird auch als Ca^{2+} release – activated Ca^{2+} current, I_{CRAC} , bezeichnet. Eine kurzzeitige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ist z.B. für die Mastzelldegranulation essenziell [104], wohingegen die anhaltend erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ u.a. für die Genregulation von Bedeutung ist. Durch die Aktivierung der Calmodulin (CaM) – abhängigen Phosphatase in den Immunzellen führt die anhaltend erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ eine Dephosphorylierung und Translokation in den Nukleus vom NFAT – Transkriptionsfaktor herbei, welcher wiederum zahlreiche Gene beeinflusst, die für die Immunantwort von höchster Bedeutung sind [196]. Beim Beenden des Stimulus normalisiert sich die $[Ca^{2+}]_i$ wieder und die Zelle ist wieder bereit, neue Signale zu verarbeiten [25]. Es kommt aber auch infolge der hohen $[Ca^{2+}]_i$ zum Zerfall der STIM1 – Cluster, auch wenn die ER – Speicher noch nicht komplett aufgefüllt worden sind. Dieser Regulationsmechanismus soll die Zelle vor toxischer Wirkung einer Ca^{2+} – Überladung schützen [301]. Außerdem wird Ca^{2+} - abhängig unter gleichzeitiger Einwirkung von CaM und STIM1 auf ORAI1 der Ca^{2+} - Einstrom inaktiviert. Dieser Vorgang wird auch CDI genannt (engl. Ca^{2+} - dependent inactivation) [335].

STIM1 aktiviert allerdings nicht nur die CRAC – Kanäle, sondern ist auch in die Regulation der durch Arachidonsäure sowie seinem Derivat Leukotrien C₄ (LTC₄) stimulierten Ca²⁺ - Kanäle (IARC) sowie von TRP – Kanälen involviert (Isoc) [375,508].

Ungeachtet der Tatsache, dass das dem Mechanismus von SOCE zugrundeliegende Modell vor über 30 Jahren vorgeschlagen wurde [378], konnten erst die neueren Forschungsergebnisse Aufschluss über die molekularen Strukturen geben.

2.3.2.1 STIM Proteine

STIM ist ein Typ1 – Transmembranprotein, welches im SOCE die Aufgabe eines Ca²⁺ - Sensors innehat. Es sind bis jetzt zwei Homologe bekannt: STIM1 [285,395,510] und STIM2 [45,488], deren Aminosäuresequenz sich zu ~ 74 % gleicht [375]. STIM1 ist hauptsächlich in der ER – Membran lokalisiert [395,510], befindet sich aber auch in der Plasmamembran [439] sowie in den sauren Zellkompartimenten [505], wohingegen STIM2 ausschließlich in der ER – Membran vorkommt [436,521]. Durch das alternative Spleißen sind bereits mehrere Spleißvarianten bekannt (s. Kapitel 2.3.2.2, 2.3.2.3).

Sowohl STIM1 als auch STIM2 erkennen Schwankungen in [Ca²⁺]ER, woraufhin in den meisten Fällen der SOCE aktiviert wird [45]. Im Ruhezustand herrscht im ER eine Konzentration des freien Ca²⁺ von etwa 400 – 600 µM [101,320], wobei durch die puffernde Wirkung von Ca²⁺ - bindenden Proteinen wie z.B. Calsequestrin und Calreticulin die Gesamt - Ca²⁺ - Konzentration um mehr als eine Größenordnung höher eingeschätzt werden kann [83,320]. Auch wenn STIM1 und STIM2 Ca²⁺ - Ionen mit einer ähnlichen Affinität binden (STIM1: K_d ~ 0,2 – 0,6 mM, STIM2: K_d ~ 0,5 mM; K_d: Dissoziationskonstante) [521], ist STIM2 gegenüber kleinsten Veränderungen von [Ca²⁺]ER (EC₅₀ 406 µM; EC₅₀: mittlere effektive Konzentration) viel empfindlicher als STIM1 [45]. Wird die [Ca²⁺]ER jedoch weiter gesenkt (EC₅₀ 210 µM) kommt es auch zur Aktivierung von STIM1 mit einem forciertem SOCE. Bei STIM2 handelt es sich daher eher um einen Regulator des basalen Ca²⁺ - Haushalts, während STIM1 eher auf exogene Stimuli reagiert [45,286,523]. Allerdings herrscht in der Literatur kein Konsens bezüglich der Funktion der beiden STIM – Proteine. So berichtete Le Zheng *et al.*, STIM2 habe im Vergleich zu STIM1 eine höhere Stabilität der Sekundärstruktur sowohl in Ca²⁺ - gebundener als auch - ungebundener Form, was eine trägere Konformationsänderung und eine geringere Tendenz zur Oligomerisierung und somit Beeinflussung von SOCE zur Folge hat [521]. Zudem konnte Soboloff *et al.* zeigen, STIM2 könne bei ER – Speicherentleerung ausschließlich in Anwesenheit von STIM1 zu PM – ER – junctions gelangen und im Falle eines höheren STIM2/STIM1 – Verhältnisses den SOCE sogar inhibieren [436]. Die uneinheitliche Datenlage legt daher nahe, dass SOCE einem komplexen

Regulationssystem unterliegt, und dass STIM1 sowie STIM2 eine wichtige regulatorische Rolle in der fein abgestimmten Maschinerie spielen.

Strukturell betrachtet ist STIM ein Typ1 Transmembranprotein mit einer α – helikalen einfachen TM und einem intraluminal oder extrazellulär lokalisiertem N – Terminus.

Der N – Terminus umfasst ein Signalpeptid (SP; STIM1: 22 AS, STIM2: 101 AS), eine kanonische (cEF) und nicht – kanonische EF (ncEF) – Hand sowie ein steriles α – Motiv (SAM) [285,375,395,488] (Abb. 6). STIM2 kann funktional in drei unterschiedlichen Formen vorliegen. In den meisten Fällen gelangt STIM2 nach der Abspaltung von SP (engl. signal peptide) in die ER – Membran und ist am Ca^{2+} – abhängigen SOCE beteiligt. Etwa 10 % umgehen jedoch die Abspaltung im ER und wandern als preSTIM2 ins Zytosol, wo sie angelagert an die innere Seite der PM Ca^{2+} – unabhängig den basalen Ca^{2+} – Haushalt kontrollieren. Eine dritte Form entsteht, beim partiellen Abspalten von SP, wobei das 91 AS kurze Signalpeptidfragment (SPF) ebenfalls ins Zytosol entlassen wird, um dort den Transkriptionsfaktor NF – κ B zu beeinflussen [145]. Während die cEF – Hand als der eigentliche Ca^{2+} – Sensor fungiert, ist die ncEF – Hand für die Stabilität und SAM für die Oligomerisation zuständig [285,441,521]. In Ca^{2+} – gebundenem Zustand geht die EF – Hand eine hydrophobe Bindung mit der SAM – Domäne ein und stabilisiert so die monomere Struktur des STIM – Proteins. Die Dissoziation von Ca^{2+} von der EF – Hand führt zur Destabilisierung der EF – SAM – Bindung. Es folgt eine Konformationsänderung und Oligomerisierung der STIM – Proteine. Die EF - SAM – Domäne teilt bis zu 88 % der AS – Sequenz zwischen STIM1 und STIM2. Diese minimalen genetischen Unterschiede in der EF-SAM – Domäne bewirken, dass die STIM2 EF – SAM in Ca^{2+} – gebundenem Zustand eine stabilere Bindung eingeht, was zu einer höheren Resistenz gegenüber Oligomerisierung führt [441,521,522].

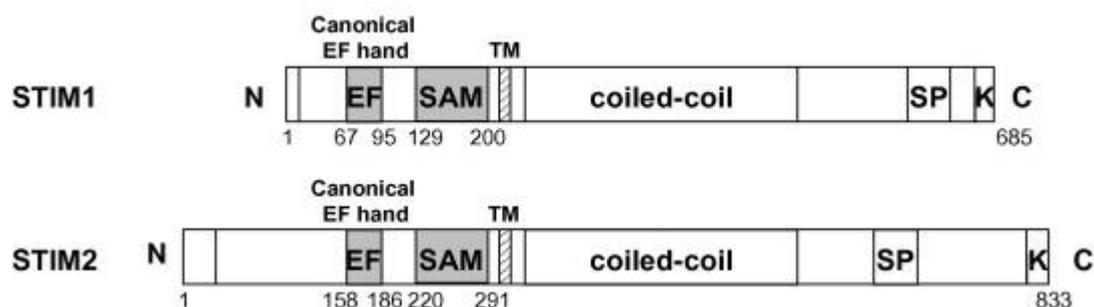


Abb. 6 Aufbau von STIM1 und STIM2

Schematische Darstellung von humanem STIM1 und STIM2. Quelle: [521]

Der C – Terminus von STIM befindet sich im Zytosol und besteht aus einer konservierten ERM – Domäne (engl. ezrin/radixin/moesin domain), die drei CC (engl. coiled – coil)– Domänen, CC1, CC2 und

CC3, einschließt [285]. ERM – Proteine sind an der Verankerung des Zytoskeletts an der PM beteiligt [77]. Es folgt die CRAC modulierende Domäne (CMD), die sich zum Teil mit der STIM Homomerisationsdomäne (SHD) und der inhibitorischen Domäne (ID) überschneidet, gefolgt von einer Serin-/Prolin – reichen Region und dem polybasischen Lysin – reichen Ende, welches STIM über Phospholipide in der PM verankert [285]. Außerdem ist diese polybasische Lysin – reiche Domäne für die Interaktion zwischen dem PM – ständigen STIM1 und ORAI1 von Bedeutung [223]. STIM1 aktiviert ORAI1 über die STIM1-ORAI1-activating region (SOAR; AS 344 - 442) [503], die auch als CRAC activation domain (CAD; AS 342 - 448) [360] oder als ORAI – activating small fragment (OASF; AS 233 – 450/474) [331] und Ccb9 (AS 339 – 444) [239] bezeichnet wird. Alle Domänen erstrecken sich über CC2 und CC3. SOAR ist an der Dimerisierung von STIM – Proteinen und der Destabilisierung der EF – SAM – Formation beteiligt. Die Dimerisation ist hingegen erforderlich für die Aktivierung von ORAI1, wobei die polybasische Region (AS 382 – 387) innerhalb der SOAR – Domäne für die Bindung an die α – helikale Region des C – Terminus von ORAI1 sorgt [90,497,503]. Bei vollem ER – Speicher wird SOAR von einer inhibitorischen Helix von CC1 blockiert [256]. Kommt es zu einer Senkung der $[Ca^{2+}]_{ER}$, wird die EF – SAM – Domäne entfaltet und dimerisiert, was eine Konformationsänderung in der C – terminalen Seite bewirkt. Die SOAR Hemmung durch CC1 wird aufgehoben, es folgt die Entfaltung des C – Terminus und Präsentation der polybasischen Domäne in der SOAR – Region, die schließlich mit ORAI1 interagiert [524].

Trotz der 76 % Sequenzidentität und 91 % Sequenzähnlichkeit von SOAR zwischen STIM1 und STIM2 [442], gibt es dennoch diskrete strukturelle und funktionale Unterschiede. Zwar ist die $S\alpha 1$ (SOAR besteht aus vier α - Helices $S\alpha 1 - 4$) – Helix, die für die Bindung an ORAI1 erforderlich ist, sowohl in STIM1 als auch in STIM2 konserviert, doch scheint der Austausch von Phenylalanin (F394 in STIM1) durch Leucin in STIM2 in $S\alpha 2$ wesentlich dazu beizutragen, dass die Fähigkeit von STIM2 ORAI1 zu aktivieren im Vergleich zu STIM1 reduziert ist [480].

Außerdem ist die CC – Region für die Proteinstabilität und Verankerung in der ER – Membran von Bedeutung [403]. Während STIM1 sowohl in der ER – als auch in der Plasmamembran lokalisiert ist, scheint die KKXX ER – Retentionsdomäne, die nur auf STIM2 beschränkt ist, dazu beizutragen, dass STIM2 überwiegend in der ER – Membran präsent bleibt [437].

Ein weiterer Unterschied zwischen STIM1 und STIM2 besteht in der unterschiedlichen Sequenz der inhibitorischen Domäne (ID), die an CDI beteiligt ist (s. Kapitel 2.3.2). Während ID von STIM1 sieben negativ geladene AS (470 – HFIMTDDVDDMDEEIV – 485) enthält, fehlen STIM2 zwei negative

Ladungen (479 – GGVDLDED – 487). Es ist unklar, ob CDI in STIM2 analog zu dem von STIM1 abläuft, da Mutationen in dieser Region zum Verlust der CDI – Funktion führen [273,335].

Sowohl STIM1 als auch STIM2 werden in Neuronen exprimiert, wobei STIM2 stark angereichert im Hippocampus vorkommt [158]. STIM2 ist jedoch im Gegensatz zu STIM1, das nur auf das Soma beschränkt ist, sowohl im Soma als auch in den Dendriten lokalisiert [451].

2.3.2.2 Spleißvariante von STIM1

Das Gen für STIM1 ist in der humanen Spezies auf dem Chromosom 11p15.5 lokalisiert [363]. Durch das alternative Spleißen vom Exon 11 wird eine zusätzliche mRNA – Isoform generiert. Es handelt sich um eine 106 AS längere Spleißvariante STIM1L (L für engl. long). STIM1L liegt unabhängig vom ER – Speicherzustand permanent in Clustern in nächster Nähe zu ORAI1 vor. Die Cluster werden mittels Aktinfilamente stabilisiert. Dieser Umstand trägt dazu bei, dass STIM1L den SOCE beschleunigen kann, da die für seine kürzere Version STIM1 erforderliche Oligomerisierung, die der Interaktion mit dem CRAC – Kanal vorausgeht, entfällt [92,299]. STIM1L ist demnach für einen rapiden SOCE mit repetitiven Ca^{2+} - Signalen erforderlich. Im Gegensatz zu STIM1, welches ubiquitär vorkommt, wird STIM1L in der humanen und murinen Skelettmuskulatur [92,201], im Hirngewebe, der Lunge, Leber, Milz und dem Herzen der Maus [92] sowie den Myozyten des neonatalen Herzens in der Rate exprimiert, wobei STIM1L in den reifen Kardiomyozyten nicht mehr vorkommt [299].

2.3.2.3 Spleißvarianten von STIM2

Das STIM2 – Gen ist in der humanen Spezies auf dem Chromosom 4p15.2 lokalisiert und besteht aus 14 Exons, von denen 12 bereits von Williams *et al.* im Jahr 2001 beschrieben worden sind [488]. Die Beschreibung des zusätzlichen Exon 9 und 13 folgte fast 15 Jahren später [323]. Durch das alternative Spleißen werden drei mRNA – Isoformen generiert: STIM2.1, STIM2.2 und STIM2.3. Jedoch soll es laut Datenbanken insgesamt 10 Spleißvarianten geben [205].

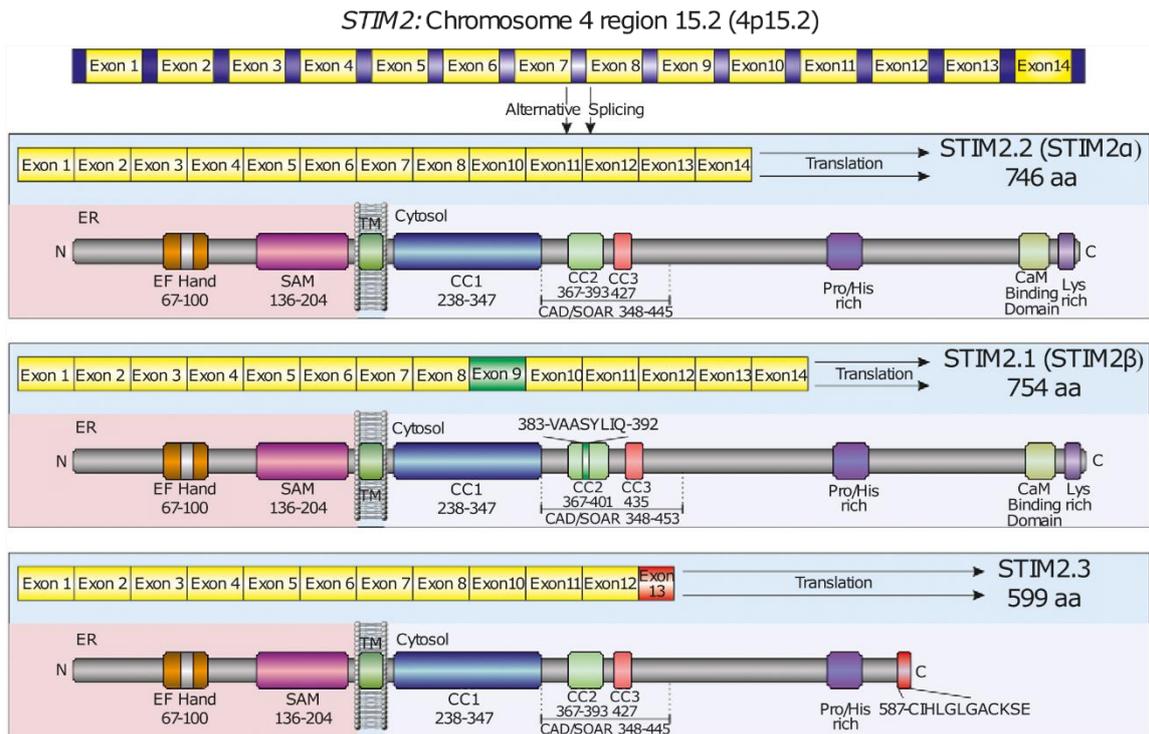


Abb. 7: Spleißvarianten von STIM2

Das STIM2-Gen ist auf dem Chromosom 4 lokalisiert und besteht aus 14 Exons. Durch das alternative Spleißen sind bis jetzt drei Spleißvarianten beschrieben. STIM2.2 ist fähig, mit ORAI und TRP-Kanälen zu interagieren, wohingegen STIM2.1 durch das zusätzliche Exon 9 in der CAD/SOAR-Domäne diese Fähigkeit abhandengekommen ist. STIM2.3 stellt die verkürzte Spleißvariante dar. Durch das zusätzliche Exon 13 kommt es zu einem Stop-Codon und zum Verlust der CaM-bindenden und lysinreichen Domäne.

Quelle: [24]

STIM2.2 (auch STIM2 α) stellt mit seinen 746 AS die erste Spleißvariante dar, die beschrieben worden ist [488]. Es folgte STIM2.1 (auch STIM2 β) mit zusätzlichem Exon 9, welches für 8 AS (383 - VAASYLIQ - 392), die in die CAD/SOAR – Domäne integriert werden, kodiert mit einer inhibitorischen Wirkung auf SOCE als Konsequenz [323,382]. Miederer *et al.* konnten zeigen, dass die Kolo-kalisation von STIM2.1 mit ORAI1 unbeeinträchtigt ist, sodass die SOCE – inhibitorische Wirkung eher auf einer durch das zusätzliche Exon kodierte spezifischen Sequenz beruht[323]. Im Fall von STIM2.3 kommt es durch das alternative Spleißen zu einer Leserasterverschiebung, welche im Exon 13 zu einem Stop-Codon führt. Es kommt zum alternativen C – Terminus (587 – CIHLGLGACKSE), wodurch die CaM – bindende sowie lysinreiche Domänen fehlen [323] (Abb.7).

2.3.2.4 Pathophysiologische Rolle von STIM

STIM – Proteine sowie durch sie generierter SOCE scheinen eine zentrale Rolle in kognitiven Prozessen und der Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Alzheimer (AD) und Chorea

Huntington sowie im Rahmen eines ischämischen Schadens auf neuronales Gewebe einzunehmen [23,131,451,491]. Dabei scheint insbesondere STIM2 von großer Bedeutung zu sein. Berna – Erro *et al.* postulierten, dass überwiegend STIM2 den SOCE in den Neuronen aufrechterhält und seine Abwesenheit den Ca^{2+} - Haushalt drastisch verändert [23]. STIM2 soll außerdem in der Morphogenese der Dornfortsätze sowie der Phosphorylierung der GluA1 – Untereinheit des AMPA – Rezeptors, seinen Transport zur postsynaptischen Membran bei LTP (engl. long – term potentiation) und im Fall von LTD (engl. long – term depression) seine Eliminierung aus der Membran via Endozytose involviert zu sein – beide Mechanismen, die an der Regulierung der synaptischen Plastizität beteiligt sind [132,498]. Die besondere Stellung von STIM2 an der synaptischen Plastizität konnte auch in zwei AD - Tiermodellen gezeigt werden. Sowohl in PS1 – KI – Mäusen mit M146V als auch in APP – KI - Mäusen kam es zu einer Herunterregulierung von STIM2 mit gestörtem SOCE und folglich zu einer reduzierten $[Ca^{2+}]_i$ sowie Aktivität der CaMKII (Calmodulinkinase II) (STIM2-SOCE-CaMKII – Weg), was zu einem Verlust der pilzförmigen Dornfortsätze (engl. mushroom spines) an den Dendriten geführt hat [451,509]. Die pilzförmigen Dornfortsätze stellen wiederum die Gedächtnisspeicher des Neurons dar [40], sodass ihr Verlust vermutlich zu einer kognitiven Einschränkung mit Gedächtnisschwund führen kann [372,373]. In beiden Tiermodellen führte eine Überexpression von STIM2 wiederum zur Wiederherstellung des STIM2-SOCE-CaMKII – Weges mit Bildung der pilzförmigen Dornfortsätze [451,509]. Sun *et al.* konnte außerdem zeigen, dass STIM2 – Herunterregulierung auch in älteren Mäusen und in Hirnproben von AD – Patienten beobachtet werden kann [451]. Dies könnte entscheidend zu den kognitiven Veränderungen in den beiden Gruppen beitragen.

Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen den PS1/2 – Proteinen und der Regulation der STIM – Proteine hergestellt werden. So führt ein funktionsloses PS1 zu einer Steigerung von SOCE, während eine Mutation mit Funktionsgewinn (engl. gain of function) von PS1 in FAD – Mäusen eine Reduktion von SOCE bewirkte [499]. Interessanterweise trug reduzierter SOCE zu einer gesteigerten Produktion von A β ₄₂ bei [499], einem pathologischen Merkmal von AD. Auch Bojarski *et al.* kam zu der gleichen Beobachtung. Demnach soll PS unter physiologischen Bedingungen einen inhibitorischen Einfluss auf SOCE ausüben. Die PS1 – Mutationen M139V, H163R, S170F, E318G, I213F und P117R in B – Lymphozyten isoliert von FAD – Patienten sollten folglich einen Funktionsgewinn von PS1 in Bezug zur SOCE – Inhibition darstellen. Die Reduktion von STIM2 mRNA – und Proteinlevel in den FAD – Zellen könnte den zugrundeliegenden Mechanismus des reduzierten SOCE erklären. Ob PS1 allerdings direkt als γ – Sekretase oder indirekt über etwaige zelluläre Kaskaden, an denen es beteiligt ist, in der STIM – Regulation involviert ist, bleibt unklar [36].

Jedoch muss betont werden, dass auch STIM1 unerlässlich für die kognitiven Funktionen zu sein scheint. Während bei einem gewebsspezifischen KO (engl. conditional gene knockout, cKO) im Vorderhirn von Mäusen keine Unterschiede zwischen STIM2 cKO und dem Wildtyp (WT) im Lernen und Gedächtnis gezeigt werden konnten, entwickelten STIM1 cKO Mäuse leichte kognitive Einbußen, wohingegen ein Doppelknockout von STIM1/STIM2 zu bedeutenden Einschnitten im räumlichen Lernen und dem Gedächtnis führte [131]. Demnach sollten STIM1 und STIM2 essenzielle Bestandteile des komplexen Lern – und Gedächtnisapparates sein.

Außerdem sind STIM – Proteine mit der Onkogenese assoziiert. Störungen von SOCE sollen Studien nach zu Tumorzellproliferation, Apoptose, Metastasierung sowie zur Tumorneovaskularisation beitragen. Zahlreiche Tumorarten sollen mit einer gestörten Ca^{2+} - Homöostase zusammenhängen [175,328], darunter Brustkrebs [314], Zervixkarzinom [70] und Glioblastom [289,399].

Zusätzlich sind STIM1, ORAI1 und TRPC1 mit einer hypertrophen Kardiomyopathie in Mäusen und Ratten assoziiert. Vermutlich unterliegt die Regulation der Expression von STIM1 entwicklungspezifischen Mechanismen, da STIM1 nur in den neonatalen Kardiomyozyten exprimiert wird und mit fortschreitender Reifung verschwindet. Anzumerken ist jedoch, dass bei pathologischem Stresslevel die STIM1 Expression getriggert werden kann, was wiederum mit einer kardialen Hypertrophie assoziiert ist [299,353].

Auch das Gerinnungssystem unterliegt dem Einfluss der STIM – Proteine. Eine gain – of – function Mutation von STIM1 soll zur Thrombozytopenie mit einem erhöhtem Blutungsrisiko führen [326], wobei eine loss – of – function Mutation von STIM1 und ORAI1 zu einer Thromboseresistenz aufgrund einer Thrombusinstabilität und verlangsamten Fibrinolyse führt [1].

2.3.2.5 ORAI Proteine

Die ORAI – Proteinfamilie besteht aus drei Homologen: ORAI1 (Chromosom 12), ORAI2 (Chromosom 7) und ORAI3 (Chromosom 16). Während ORAI1 und ORAI3 in den meisten Gewebearten exprimiert werden, ist ORAI2 überwiegend in der Niere, der Lunge und der Milz vertreten. Dabei weist ORAI3 eine hohe Expression im Gehirn auf [118,162,511]. ORAI1 - Monomer ist ein relativ kleines Protein (301 AS) mit vier α – helikalen Transmembrandomänen (TM), wobei die erste und die dritte Schleife extrazellulär zu liegen kommen und sowohl N – als auch C – Terminus zusammen mit der zweiten Schleife im Zytoplasma lokalisiert sind. Über den N – und C – Terminus findet die Interaktion mit und Regulation durch STIM1 statt [331,360,503]. CRAC – Kanäle können sowohl homo- als auch heteromer vorliegen. Deren Kristallstruktur wird meistens aus sechs Molekülen aufgebaut [203], während diese im Fall von IARC als Heteropentamer aus drei ORAI1 und zwei ORAI3 Molekülen bestehen [513]. TM1

von jedem Molekül bildet die Pore, die eine hohe Ca^{2+} - Selektivität aufweist. Im Zytosol auf dem N – Terminus ist vor TM1 (AS 92 – 106) die ETON – Region (engl. extended transmembrane Orai1 N-terminal) (AS 73 - 90) lokalisiert, die in die Bindung an STIM1 involviert ist [102]. Für die Bindung an STIM1 ist aber auch der C – Terminus (AS 267-301) relevant [281,331,361]. Essenziell für die Anziehung von Ca^{2+} - Ionen sind AS D110, D112 und D114, die Funktion des Selektivitätsfilters ist hingegen von AS E106 abhängig [203]. TM2-4 regulieren den geschlossenen Zustand von ORAI1, sodass Mutationen L138F (TM2) und P245L (TM4) zur STIM – unabhängigen Öffnung des Kanals führen [113,341]. Analog zu ORAI1 sind auch ORAI2 und ORAI3 hoch selektive Ca^{2+} - Kanäle [287].

2.3.2.6 Isoformen von ORAI1

Abhängig von der AS mit der die Translation von Orai1 initiiert wird, werden zwei Proteinisoformen unterschieden: ORAI1 α (33 kDa) und ORAI1 β (23 kDa) [103,128], wobei ORAI1 α mit ihren 301 AS die konventionelle Form darstellt. Im Fall von ORAI1 β kann die Translation an Methionin 64 (M64) und 71 (M71) des N – Terminus starten, wobei beide unter dem Terminus ORAI1 β zusammengefasst werden. Jedoch könnte es sich um zwei vermutlich funktionell unterschiedliche Isoformen handeln. So könnte man im Fall von M71 erwarten, dass die CaM – bindende Domäne, die sich über AS 69 und 91 erstreckt, beeinträchtigt werden kann, was den CDI (s. Kapitel 2.3.2) behindern würde. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Translation nur dann mit M71 beginnt, wenn es eine Mutation an M64 gibt. Offensichtliche Unterschiede in der Aktivierung oder der Kanalfunktion zwischen Vollängenprotein (ORAI1 α) und der verkürzten Isoform (ORAI1 β) konnten nicht beobachtet werden [128]. Allerdings zeichnet sich ORAI1 α durch eine stärkere Ca^{2+} - abhängige Inaktivierung (CDI) aus und ist im Gegensatz zu ORAI1 β zusammen mit ORAI3 an der Regulation von IARC beteiligt [103,324].

2.4 CALCIUM UND DIE ALZHEIMER – KRANKHEIT

Ca^{2+} - Dysregulation stellt einen der wichtigsten pathologischen Merkmale der Alzheimer Krankheit dar [310,449]. In einer großen Studie wurden *post mortem* Gehirnproben von 114 AD – Patienten mittels cDNA – Microarrays untersucht. Neben einer Vielzahl von veränderten Genen wurden Veränderungen von Genen entdeckt, die unmittelbar mit dem Ca^{2+} - Haushalt assoziiert sind. So konnte eine Erhöhung von ITPKB (engl. inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase type B) und eine Herunterregulierung von RGS4 (engl. regulator of G protein signaling 4) detektiert werden [112]. Während ITPKB IP_3 zu IP_4 (engl. inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate), welches an Ca^{2+} - Einstrom durch die PM und analog zu IP_3 aus dem ER beteiligt ist, phosphoryliert [216], führt die Erniedrigung von RGS4 zur Enthemmung von G_q – Protein gekoppelten Rezeptoren und via Phospholipase C (PLC) zur exzessiven Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER [112]. Außerdem reguliert RGS4 indirekt via Proteinkinase C die Aktivität von GSK-3 β (engl. glycogen synthase kinase-3 β), einer Kinase, die u.a. zur Phosphorylierung von Tau – Proteinen führt [149,176,366] und deren Aktivität in AD gesteigert ist [12]. Einer der bedeutendsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer sporadischen Form von AD stellt ein hohes Alter dar [180]. Zahlreiche Studien führen altersassoziierte Veränderungen der biochemischen Prozesse an, die in AD gravierender ausgeprägt zu sein scheinen, mit stressinduzierter Dysregulation des Ca^{2+} - Haushalts als zentrales Merkmal. So wird u.a. von erhöhter $[Ca^{2+}]_i$, gesteigertem Ca^{2+} - Einstrom durch VGCC sowie gestörter Ca^{2+} - Regulation durch Mitochondrien und ER berichtet [48,312,336,459]. So wurden z.B. in Hirnproben von Ratten höheren Alters Veränderungen der Genexpression von Proteinen, die in der Ca^{2+} - Regulation involviert sind, detektiert [33].

In der Literatur häufen sich Erkenntnisse über den Einfluss von A β , APP – Prozessierungsprodukten und Presenilin auf die Regulation der Ca^{2+} - Homöostase. Demnach verursacht A β eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$, indem es u.a. VGCC -, NMDA – sowie Kainat- Rezeptoren stimuliert, was schließlich in einer Steigerung der Neurotoxizität mündet [30,313]. Arispe *et al.* entdeckten die Fähigkeit von A $\beta_{40/42}$ – Peptiden, einen Ca^{2+} - permeablen Kanal (auch Amyloid – Kanal genannt) in PM bilden zu können [9]. Das im Rahmen von Apoptose oder Energiemangel an der Zelloberfläche verstärkt exprimierte Phosphatidylserin (PtdS) forciert die Interaktion von A β mit der PM [271]. In neuronalen Zellkulturen war der erhöhte A β – induzierte Ca^{2+} - Einstrom mit einer Steigerung der Mortalität, Caspasenaktivierung und DNA – Fragmentierung assoziiert [429]. Möglicherweise wird die Präsentation von PtdS an der Zelloberfläche u.a. von Ca^{2+} direkt beeinflusst, da Ca^{2+} die Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1), welche den Flip-Flop - Umtausch von Phospholipiden zwischen den Membranseiten ermöglicht, aktivieren kann [401], wodurch vermehrt PtdS an die Zelloberfläche gebracht werden kann. Die Fähigkeit von A β zur Kanalbildung konnte auch *in vivo* in transgenen

Mausmodellen APP^{swe}/PS1- Δ E9 sowie Tg2576 (K670N, M671L in APP₆₉₅; [204]), die Mutationen in APP und/oder in PS1 haben, welche zu einer erhöhten A β Produktion führen, gezeigt werden. In unmittelbarer Nähe zu A β – Plaques konnte hierbei eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ in ruhenden Zellen aufgezeigt werden [258]. Bei der Oligomerisierung von A β – Peptiden entstehen Hydroxyl (OH) – Radikale, die bei ihrer Bildung neben O₂, Fe²⁺ und Cu⁺ brauchen. Diese Radikale verursachen eine Lipidperoxidation, Protein- sowie DNA – Oxidation. Das bei der Lipidperoxidation entstehende Aldehyd-4-hydroxynonenal beeinträchtigt die Funktion von Ionen – Transport – ATPasen, G – Proteinen sowie Glukose – und Glutamaterezeptoren, wodurch eine Ca²⁺ – Überladung mit Synapsendysfunktion, neuronaler Zelldegeneration und kognitivem Abbau begünstigt wird [52,311]. Sanz *et al.* konnten zeigen, dass A β ₄₂ – Oligomere über die Aktivierung von NMDA – Rezeptoren oder via Amyloid – Kanäle zu einer gesteigerten $[Ca^{2+}]_i$ führen, es folgt der exzessive Transport von Ca²⁺ über MCU (engl. mitochondrial Ca²⁺ – uniporter) mit mitochondrialer Ca²⁺ – Überladung als Folge. Die Ca²⁺ – Überladung trägt zur Bildung von ROS (engl. reactive oxygen species) bei. Sowohl ROS als auch der Ca²⁺ – Exzess aktivieren mPTP (engl. mitochondrial permeability transition pore), über welche proapoptotische Substanzen wie Cytochrome c ins Zytosol diffundieren und eine Apoptose der Zelle induzieren [404] (Abb. 8).

Presenilin ist ein weiteres Bindeglied zwischen AD und der Ca²⁺ – Homöostase. Zunächst wurde in Fibroblasten von AD – Patienten eine gesteigerte Ca²⁺ – Freisetzung aus den intrazellulären Speichern als Antwort auf IP₃ Stimulation beobachtet [217]. Auch in Zellkulturen mit einer PS1 – M146V – Mutation [276] sowie in transgenen Mausmodellen mit Knock – In PS1 – M146V, PS1 – L286V und 3xTg – AD (PS1 – M146V, APP^{swe}, Tau – P301L) konnte eine mehrfach gesteigerte IP₃ – induzierte Ca²⁺ – Antwort beobachtet werden, welche auf PS1 zurückzuführen war [448,450]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Presenilin – Proteine einen passiven Ca²⁺ – permeablen Kanal in der ER – Membran bilden können und somit ~ 80 % der Ca²⁺ – Leckage aus dem ER ausmachen könnten. PS scheinen in den meisten FAD – PS – Mutationen eine loss - of – function Mutation zu besitzen, wodurch ER mit Ca²⁺ überladen wird [339,465] (Abb .8).

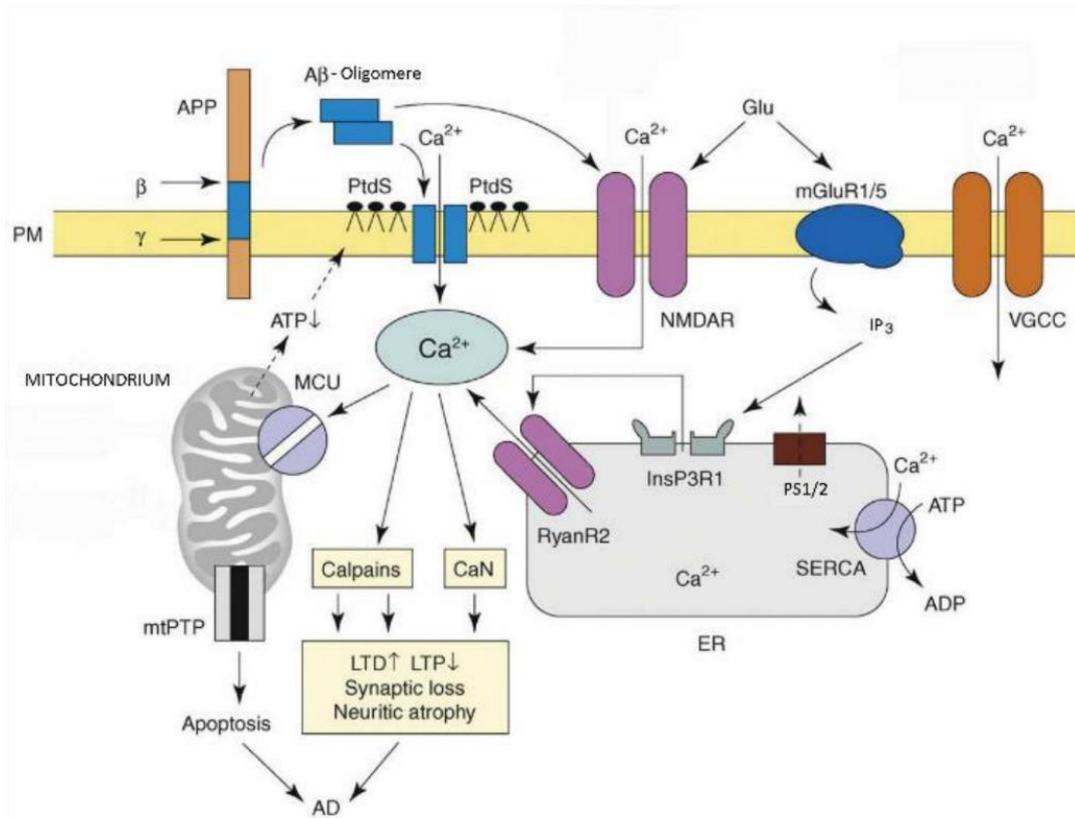


Abb. 8: Schematische Darstellung von Ca^{2+} -Dysregulation in AD

Durch den Schnitt der β - und γ -Sekretase kommt es zur Bildung von A β . A β -Oligomere lagern sich in die PM ein und bilden einen Ca^{2+} -permeablen Amyloidkanal. Die Bindung an die PM wird durch PtdS (= Phosphatidylserin) potenziert. Bei hohem Alter oder AD kommt es zu mitochondrialer Störung mit ATP-Mangel, wodurch PtdS vermehrt aus der inneren PM in die äußere Membranschicht gebracht wird. Die bei der A β -Oligomerisierung entstehende reaktive Sauerstoffspezies beeinträchtigen die Funktion von vielen Membranproteinen, darunter metabotrope Glutamatrezeptoren, die über Aktivierung von IP $_3$ R zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führen. Das freigesetzte Ca^{2+} aktiviert Ryanodin-Rezeptoren (RyanR2). Außerdem kann A β die Funktion von NMDAR und VGCC direkt beeinträchtigen. Diese Prozesse münden in einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$. Dies führt zur Aktivierung von MCU, die Ca^{2+} -Ionen ins Mitochondrium pumpen und eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung verursachen. Über die Aktivierung von mtPTP (=mtPTP) wird Apoptose der Zelle eingeleitet. Die Ca^{2+} -Überladung der Zelle führt über Calpain und CaN (=Calcineurin) zu kognitiven Defiziten mit Synapsenverlust und Neuritatrophy (siehe unten). PS1/2 bilden einen Ca^{2+} -permeablen Kanal in der ER-Membran, was die Diffusion von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER ermöglicht. SERCA pumpt unter ATP-Verbrauch diese wieder ins ER zurück. Modifiziert nach [30].

Die amyloidogene APP – Prozessierung führt neben der erhöhten A β – Produktion zu einer reduzierten Produktion von sAPP α . sAPP α soll jedoch neuroprotektive Eigenschaften entfalten. Unter anderem reduziert sAPP α die Glutamat – induzierte Neurotoxizität und verlängert die Überlebenszeitspanne der Neurone bei Hypoglykämie [308,309]. sAPP α aktiviert den plasmalemmalen K^+ - Kanal, was zu einer Hyperpolarisation der Zelle mit folgender Hemmung von VGCC führt [129,369]. sAPP α kann zusätzlich via cGMP und Proteinkinase G Proteinphosphotase 1 und 2A aktivieren, die über eine

Dephosphorylierung von NMDA – Rezeptoren ebenfalls den Ca^{2+} - Einstrom blockieren [130]. In beiden Fällen kommt es zu einer Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$. Außerdem scheint auch AICD genregulatorisch in die Ca^{2+} - Homöostase einzugreifen und den IP_3 – medierte Ca^{2+} - Efflux aus dem ER zu forcieren [279].

Ca^{2+} - Überladung hat weitreichende Folgen für die Zelle. Die FAD – assoziierte Mutationen PS1 (M146L) und PS2 (N141I) üben einen aktivierenden Einfluss auf IP_3R und erzeugen selbst bei suboptimalen IP_3 – Mengen eine gesteigerte Ca^{2+} - Freisetzung aus dem ER. Im Fall der PS1 (M146L) – Mutation in DT40 – Zellen (Avian Leukosis Virus - induziertes B-Lymphom in Hühnern [13]) führte der IP_3 – induzierte Ca^{2+} - Efflux zu einer 2 bis 3 – fachen Erhöhung von A β [76]. Unter anderem bewirkt die hohe $[Ca^{2+}]_i$ eine Steigerung der Calpain Aktivität [347]. Die Aktivitätssteigerung konnte u.a. im präfrontalen Kortex von *post mortem* Hirnproben von AD – Patienten nachgewiesen werden [402]. Calpain (engl. Calcium – dependent protease with papain – like activity) ist eine Ca^{2+} - abhängige zyttoplasmatische Cysteinprotease, die eine wichtige Rolle in der AD – Pathogenese zu spielen scheint [140]. Zum einen soll Calpain eine α – Sekretase Aktivität besitzen [430], sodass eine AD – protektive Wirkung zu erwarten wäre. Dafür spricht auch, dass die Produktion von A β (A $\beta_{40/42}$) steigt, wenn Calpain durch siRNA geblockt wird [69]. Doch führt eine pathologische Aktivitätssteigerung zu Neuronendegeneration und kognitivem Abbau. In hippocampalen Zellkulturen sowie im AD – Mausmodell Tg2576 (K670N, M671L in APP⁶⁹⁵; [204]) wurde nach A β – Stimulation eine Calpain – medierte Reduktion von Dynamin 1 festgestellt, einem Protein, das am synaptischen Vesikelrecycling beteiligt ist und dessen Reduktion zu einer Störung von LTP (engl. long – term potentiation) und kognitiven Defiziten in AD beitragen könnte [241]. Außerdem wiesen Hirnproben von AD – Patienten einen gesteigerten Abbau von cAMP – abhängiger PKA (engl. cAMP – dependent protein kinase A) durch erhöhte Calpain Aktivität auf [282]. PKA ist ein wichtiger positiver Modulator von CREB (engl. cAMP response element binding protein), einem Transkriptionsfaktor, der nach Phosphorylierung durch PKA zahlreiche Gene reguliert, die an der Umwandlung von Kurzzeitgedächtnis ins Langzeitgedächtnis beteiligt sind [18]. Außerdem findet eine gesteigerte Inaktivierung von CREB durch die Proteinphosphatase 1 (PP1) statt [172]. Calpain spaltet die autoinhibitorische Domäne von Calcineurin A (CaN A) [263], was in AD – Hirnproben zu einem Anstieg der CaN A Aktivität führt [288]. CaN A wiederum dephosphoryliert den Inhibitor von PP1 [86] und das aktivierte PP1 induziert folglich LTD (engl. long – term depression) [332]. CaN A kann zusätzlich durch den Ca^{2+} / Calmodulin – Komplex aktiviert werden [249]. Eine der wichtigsten Funktionen von CaN A liegt in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (engl. nuclear factor of activated T cells), welcher die Expression von u.a. TNF – α und TGF β reguliert [384]. In AD – Mausmodellen APP^{swe}/PS1- Δ E9 sowie Tg2576 mit

gesteigerter Formation von A β – Plaques führte die A β – induzierte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ zu einer gesteigerten Aktivierung von CaN, was schließlich in einem Verlust von Dornfortsätzen und Neuritrophie endete [258]. Die Inhibition von CaN durch FK – 506 konnte hingegen eine Reduktion von morphologischen Veränderungen bewirken [258,507]. Ein weiteres Aufgabenfeld von Ca^{2+} - abhängigem Calpain stellt die Beteiligung an der Hyperphosphorylierung von Tau – Protein dar, einem weiterem pathologischen Merkmal von AD [141]. Calpain aktiviert die mitogenaktivierten Proteinkinasen Erk1/2 und reguliert via Erk1/2 die Hyperphosphorylierung von Tau [471]. Zusätzlich wird die Hyperphosphorylierung von Tau über die durch Calpain gesteigerte Aktivierung von PKC und Ca^{2+} /Calmodulin Kinase (CaMK) II α [248,501] sowie von GSK-3 β [142] gefördert [122,424].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folglich untersucht, ob und inwiefern die Ca^{2+} - regulierenden Kanäle VGCC (CavB, CavD, CavG) sowie die am SOCE beteiligten Proteine (STIM1/2, ORAI1-3) in AD verändert sind. In *post mortem* Hirnproben von AD – Patienten konnte gegenüber der Kontrolle eine signifikante Steigerung der Genexpression von CavB, CavD, STIM1, STIM2, ORAI1, ORAI2 und ORAI3 gezeigt werden (4.4.1). Die gesteigerte Genexpression von Proteinen, die in die Regulation von Ca^{2+} - Haushalt involviert sind, steht auch in der Übereinstimmung mit der aktuellen Datenlage, denn wie oben geschildert, ist eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ mit AD assoziiert.

2.5 ZIELSETZUNG

Weltweit leiden etwa 50 Mio. Menschen an einer Demenzerkrankung. Bis zum Jahr 2050 wird sich die Prävalenz schätzungsweise verdreifachen. Davon stellt die Alzheimer Krankheit die häufigste Ursache dar [365]. In der Literatur wird die Frage nach der Ursache der Alzheimer – Pathologie sehr kontrovers diskutiert. Neben der „Amyloid – Kaskaden – Hypothese“, die erhöhte Mengen an A β im Zuge seiner gesteigerten Produktion oder reduzierten Degradation an den Anfang der neuropathologischen Prozesse stellt [178,179,236], erhärtet sich die Beweislage für die Hypothese der Ca^{2+} - Dysregulation als initiales Ereignis [242]. Demnach soll die Dysregulation der Ca^{2+} - Homöostase vor den ersten AD – relevanten Symptomen auftreten [115] und sogar etwaigen histopathologischen Veränderungen im Sinne der Amyloidablagerungen und der Formation der intrazellulären Neurofibrillen vorausgehen bzw. diese verstärken [161,262,278,449].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte folglich die Regulation des Ca^{2+} - Haushalts durch APP – Prozessierungsprodukte und Presenilin – Proteine analysiert werden. Im ersten Teil der Arbeit wurde zum einen deren Einfluss auf die Genexpression von spannungsgesteuerten Ca^{2+} - Kanälen CavB, CavD und CavG untersucht, zum anderen erfolgte die Analyse des möglichen Einflusses von APP – Prozessierungsprodukten und Presenilin sowohl auf der genetischen als auch auf der Aktivitätsebene auf den SOCE (engl. store operated Ca^{2+} entry). Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern STIM1 und STIM2 die an der APP – Prozessierung beteiligten α -, β – und γ – Sekretasen im Sinne eines Feedbacks regulieren. Im dritten Teil der Arbeit wurden Veränderungen der Genexpression von den an der Ca^{2+} – Homöostase beteiligten Genen CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 und STIM2 in humanen *post mortem* Hirnproben von AD – Patienten erforscht und mit den *post mortem* Hirnproben der klinisch gesunden Probanden verglichen. Um die Unterschiede zu objektivieren, wurde die Genexpression in Bezug auf das Alter, den ApoE – Status, das Geschlecht und das zugrundeliegende Braak – Stadium untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalien

BEZEICHNUNG	ABKÜRZUNG	FIRMA/HERKUNFT
AICD (1-20)-Peptid		Genscript
Ammonium-Hydroxid (25%)	NH4OH	Merck
Bicinchoninsäure		Sigma Aldrich
bdestilliertes Wasser	ddH2O	
Blasticidin		Invitrogen
Bromphenolblau		C.Roth
BTP2		Calbiochem
Chloroform		Merck
Complete Protease Inhibitor Cocktail		Roche
Diethylether		VWR
Dimethylsulfoxid	DMSO	C.Roth
Di-natrium-hydrogenphosphat	Na2HPO4 x 2H2O	Merck
Dulbecco's modified Eagles Medium	DMEM	Sigma Aldrich
ECL-Hyperfilm		Amersham
Ehtanol		Sigma Aldrich
Entwicklerlösung GBX		Kodak
Ethyl-Acetat		VWR
Ethylendiamin-tetraessigsäure	EDTA	C.Roth
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N',N'-tetraacetic acid	EGTA	Sigma Aldrich
Fast SYBR-Green Master Mix		Life Technologies
Fetales Rinderserum	FBS/FCS	Pan Biotech
Fixierlösung		Kodak
FuGENE® HD Transfektionsreagenz		Promega
Fura-2-AM		Invitrogen
Glukose		Merck
Glycerin		C.Roth
HBS-Puffer		Synvolux Therapeutics
HCl		Merck
Hepes		Sigma Aldrich
Hexanfluoro-2-propanol	HFIP	Sigma Aldrich
Hygromycin B		Pan Biotech
Isopropanol		VWR
JetPRIME Buffer		Polyplus transfection
JetPRIME Transfektionsreagenz		Polyplus transfection
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kalziumchlorid-dihydrat	CaCl2 x 2H2O	VWR

BEZEICHNUNG	ABKÜRZUNG	FIRMA/HERKUNFT
KH ₂ PO ₄ x 3H ₂ O		Merck
Kupfersulfat-pentahydrat	CuSO ₄ x 5H ₂ O	C.Roth
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Roth
Methanol		VWR
Milchpulver		Roth
Minimum Essential Medium	MEM	Sigma Aldrich
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O		Roth
NaOH		Roth
Natrium-cacodylat-trihydrat		Fluka
Natriumchlorid	NaCl	VWR
Natrium-Desoxycholat		Sigma Aldrich
Natrium-Dodecylsulfat	SDS	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat		Sigma Aldrich
n-Heptan		Merck
n-Hexan		VWR
NP-40		Substitute Fluka
Nuclease-freies Wasser		Qiagen
Opti-MEM		Life Technologies
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Page Ruler	Promega
Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	P ₂ SO ₄	C.Roth
Protein-G-Sepharose		Sigma Aldrich
Puromycin		Thermo Scientific
Ruthenium Red		Calbiochem
Saccharose		Sigma Aldrich
Saint PhD		Synvolux Therapeutics
Salzsäure, rauchend (37%)	HCl	Merck
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	C.Roth
SDS		Sigma Aldrich
Thapsigargin	TG	Invitrogen
Tricin		Biomol
Tris		Sigma Aldrich
Triton-X 100		Merck
Trizma Base		Sigma-Aldrich
TRIzol		Life Technologies
Trypsin/EDTA		Sigma-Aldrich
Wasser	HPLC-Wasser	VWR
Western Lightning Plus-ECL	ECL-Lösung	Perkin Elmer
Zeocin		Life Technologies
β - Mercaptoethanol		Sigma Aldrich

3.1.2 Geräte

Tab. 2: Geräte

GERÄT/ZUBEHÖR	FIRMA
8-Kanal-Pipette, elektronisch	Eppendorf
Analysenwaage ABS 80-4	Kern
Brutschrank 37°C	Heraeus
Einfrierbox Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
Einkanal-Multipipette M4	Eppendorf
ELISA-Reader Multiskan EX	Thermo Scientific
Fluorometer Safire 2	Tecan
Gefrierschrank -20°C Premium	Liebherr
Gefrierschrank -80°C Hera Freeze	Thermo Electron
Gelkammer Novex Mini-Cell	Life Technologies
Hamilton Kapillare	Hamilton
Heizblock Thermoshaker	Universal Labortechnik
Inkubationsschüttler New Brunswick Innova 44	Eppendorf
Inkubator HeraCell 150	Heraeus
Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon
Magnet-Heizrührer MR2002	Heidolph Instruments
Mikrowelle	Continent
NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Scientific
PCR-Cycler PRIMUS 25 ADVANCED	Peqlab
pH-Meter 766	Calimatic Knick
PikoReal PCR System	Thermo Scientific
Pipetboy Comfort	INTEGRA Biosciences AG
Pipettenset Research	Eppendorf
Potter-Röhrchen	B.Braun
Power Supply Consort EV231	Sigma Aldrich
Präzisionswaage EW	Kern
Röntgenkassette Quanta III	Dupont
Rotor SW40	Beckmann Coulter
Rotor TLA-55	Beckmann Coulter
Scanner CanoScan LiDE 50	Canon
Software Analyst 1.5	AB Sciex
Software Image Gauge V3.45	Fuji Science Lab
Software PikoReal 2.1	Thermo Scientific
Software SPSS Statistics 22	IBM Corporation
Sterilbank HeraSafe	Heraeus
Stickstoff-Abdampfvorrichtung	VLH
Stickstofftank -196°C GT 140	Air Liquide
TransBlot Gel-Halter mit Schwämmen	BioRad
Transferkammer TransBlot Cell	BioRad
Überkopftaumler Reax2	Heidolph Instruments
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckmann Coulter
Vortex Genie2	Bender & Hobein

GERÄT/ZUBEHÖR	FIRMA
Wärmeschrank UT12	Heraeus
Wasserbad	GFL
Wheaton-Schüttler Multi Reax	Heidolph Instruments
Wippschüttler SkyLine Shaker S-4	ELMI
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraeus
Zentrifuge Fresco21	Heraeus
Zentrifuge Labfuge GL Heraeus	Heraeus

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

VERBRAUCHSMATERIAL	FIRMA
10 cm-Schalen für Zellkultur	Sarstedt
12-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
24-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
6-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
96-DeepWell-Platte	Nunc
96-Well-Platte für qRT-PCR, 6x16, transparent	Greiner
96-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
Coverslips (25 mm)	O.Kindler
Einfrierröhrchen, 1,8 ml	Nunc
Falconröhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt
Filterpapier	Whatman
Fotokopierfolien Type C A4	Xerox
Glasflaschen, 2 ml	NeoLab
Glaspipetten	Neolab
Glasröhrchen	Wheaton
Gummischaber	Hartenstein
Kanülen 23G x 1", 0,6 mm x 25 mm	Becton, Dickinson und Company
Kanülen 24G x 1", 0,55 mm x 25 mm	Becton, Dickinson und Company
Nitrozellulosemembran 0,22 µm Porengröße	Whatman
Nitrozellulosemembran 0,45 µm Porengröße	Whatman
Pasteurpipetten	VWR
Petrischalen	Sarstedt
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß, 2 ml	Eppendorf
Spritzen, 1 ml	Becton, Dickinson und Company
Tris-Trcin-Gele, 10-20%	Anamed Gelelektrophorese
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Verschlussfolie für 96-Well-Platte	Peqlab
Verschlussfolie für qRT-PCR-Platten	Thermo Scientific

3.1.4 Zelllinien

Tab. 4: Zelllinien

ZELLINIE	BESCHREIBUNG	MEDIUM
Cos7	Nierenepithel-Fibroblasten-Zelllinie aus grüner Meerkatze	DMEM 10 % FBS 0,1 mM MEM
HEK 193/195	ORAI1 und 2 - defiziente humane embryonale Nierenzellen, generiert von Dr. D. Alansary (Homburg)	MEM 10 % FBS 1 % Pen/Strep
HEK293 WT	Epithelzellen von human embryonic kidney, freundlich zur Verfügung gestellt von AG Niemeyer	MEM 10 % FBS 1 % Pen/Strep
HEK293 STIM2.2 T-REx	Transfektion mit STIM2.2 - Konstrukt (pcDNA5/FRT/TO-STIM2.2_YFP) führt zur Überexpression von STIM2.2, generiert und freundlich zur Verfügung gestellt von Gertrud Schwär (Homburg)	DMEM 10 % FBS 15 µg/ml Blastocidin 200 µg/ml Hygromycin B
HEK293 T-REx-Flp-In	Vergleichszelllinie für HEK293 STIM2.2 T-REx, freundlich zur Verfügung gestellt von AG Niemeyer	DMEM 10 % FBS 15 µg/ml Blastocidin 50 µg/ml Zeocin
HEK293-STIM1	HEK293 mit stabiler Expression von STIM1, freundlich zur Verfügung gestellt von AG Niemeyer	DMEM 10 % FBS 1 % Pen/Strep 0,5 mg/ml G418
MEF APLP2 -/-	APLP2 - defiziente embryonale Mausfibroblasten	DMEM 10 % FBS 1 % Pen/Strep 1 % L - Glutamine
MEF APP -/-	APP - defiziente embryonale Mausfibroblasten	DMEM 10 % FBS 1 % Pen/Strep 1 % L - Glutamine
MEF APP/APLP2 -/-	APP/APLP2 - defiziente embryonale Mausfibroblasten, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg), (Heber et al., 2000)	DMEM 10 % FBS
MEF APP Δ CT15	embryonale Mausfibroblasten, in welche durch homologe Rekombination eine Deletion der letzten 15 Aminosäuren des APP C-Terminus eingeführt wurde, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg), (Heber et al., 2000)	DMEM 10 % FBS
MEF PS1/2 -/-	PS1/2 - defiziente embryonale Mausfibroblasten, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bart de Strooper (Leuven, Belgien), (Herreman et al., 2000)	DMEM 10 % FBS

ZELLINIE	BESCHREIBUNG	MEDIUM
MEF PS1res	PS1/2 - defiziente embryonale Mausfibroblasten stabil retransfiziert mit humanem Wildtyp - PS1, von Dr. Eva Hesser generiert (Plasmidkonstrukt - Klonierung durch Dr.rer. nat. Marcus Grimm) (Grimm et al., 2005)	DMEM 10 % FBS 300 µg/ml Zeocin
MEF PS2res	PS1/2 - defiziente embryonale Mausfibroblasten stabil retransfiziert mit humanem Wildtyp - PS2 (Grimm et al., 2005)	DMEM 10 % FBS 300 µg/ml Zeocin
MEF STIM1 -/-	STIM1 - defiziente embryonale Mausfibroblasten, freundlich zur Verfügung gestellt von AG Niemeyer	DMEM 10 % FBS
MEF STIM1/2 -/-	STIM1/2 - defiziente embryonale Mausfibroblasten, freundlich zur Verfügung gestellt von AG Niemeyer	DMEM 10 % FBS
MEF STIM2 -/-	STIM2 - defiziente embryonale Mausfibroblasten, freundlich zur Verfügung gestellt von AG Niemeyer	DMEM 10 % FBS
MEF WT	Wildtyp von embryonalen Mausfibroblasten, Vergleichszellen zu MEF APP/APLP2 -/-, MEF APP Δ CT15 und MEF STIM1/2 -/-, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg), (Heber et al., 2000)	DMEM 10 % FBS
SH-SY5Y Fe65 - KD	SH-SY5Y WT mit stabiler Expression von Fe65 - shRNA, von Dr. Sven Grösgen generiert	DMEM 10 % FBS 0,1 mM MEM 400 µg/ml Hygromycin B
SH-SY5Y APP -/-	APP - defiziente SH-SY5Y, von Christoph Stahlmann generiert	DMEM 10 % FBS 0,1 mM MEM 2,22 µg/ml Puromycin
SH-SY5Y APP ^{swe}	SH-SY5Y mit stabiler Expression von APP695 mit der "swedish" - Doppelmutation (K670N/M671L) (Mulan et al., 1992), von Dr. Heike Grimm generiert	DMEM 10 % FBS 0,1 mM MEM 400 µg/ml Hygromycin B
SH-SY5Y PS1 -/-	PS1 - defiziente SH-SY5Y, von Christoph Stahlmann generiert	DMEM 10 % FBS 0,1 mM MEM 2,22 µg/ml Puromycin
SH-SY5Y WT	humane Wildtyp-Neuroblastom-Zelllinie, (Ross et al., 1983)	DMEM 10 % FBS 0,1 mM MEM
SH-SY5Y WT (mock)	SH-SY5Y WT mit stabiler Expression von funktionsunfähiger mock sh-RNA, Vergleichszellen für SH-SY5Y Fe65 - KD/ SH-SY5Y APP -/-, SH-SY5Y PS1 -/-, generiert von Dr. Janine Mett, Dr. Sven Grösgen, Valerie Zimmer	DMEM 10 % FBS 0,1 mM MEM 400 µg/ml Hygromycin B

3.1.5 Plasmide

Tab. 5: Plasmide

PLASMID	VERWENDUNG/ TRANSFEKTION	ZELLINIE	Kloniert durch
pcDNA3.1(+Zeo)-APP695	A β - und sAPP α - IP sowie β - CTF Western Blot/ JetPRIME	MEF STIM 1/2 -/- MEF WT	Dr. Christoph Stahlmann/AG Hartmann
pcDNA3.1(+Zeo)-Sp-DA C99	A β - IP/ JetPRIME	MEF STIM 1/2 -/- MEF WT	Dr. Christoph Stahlmann/AG Hartmann
STIM1-pCAGGS-IRES-GFP	γ - Sekretase FRET- Assay/ JetPRIME	MEF STIM 1/2 -/- MEF STIM1 -/- Cos7 WT SH-SY5Y WT	Dr. Dalia Alansary/AG Niemeyer
STIM2-pCAGGS-IRES-GFP	γ - Sekretase FRET- Assay/ JetPRIME	MEF STIM 1/2 -/- MEF STIM2 -/- Cos7 WT SH-SY5Y WT	Dr. Dalia Alansary/AG Niemeyer

3.1.6 Humanes post mortem Hirngewebe

In dieser Arbeit verwendete humane *post mortem* Gehirnproben wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Riemenschneider von BrainNet in Amsterdam bezogen.

Die Diagnose wurde klinisch anhand von CERAD (engl. the consortium to establish a registry for AD) [330] sowie neuropathologisch mittels Braak & Braak [43,44] gestellt.

Die Proben aus Amsterdam stammen aus dem frontalen Kortex, wobei die Dauer zwischen Ableben des Spenders und der Entnahme des Gehirns im Durchschnitt unter 6 Stunden lag (<https://nin.nl/brain-bank/>). Insgesamt wurden 228 Hirnproben untersucht, davon waren 71 aus der Kontroll- und 156 aus der AD – Kohorte.

Eine komplette Übersichtstabelle ist dem Anhang beigelegt.

3.1.7 Antikörper

Tab. 6: Antikörper

BEZEICHNUNG	EPITOP	BESCHREIBUNG/VERWENDUNG	HERSTELLER
ab2077	BACE1	polyklonaler Kaninchen-Antikörper/ BACE1 - Western Blot	Abcam
ab76083	PS1	Monoklonaler Kaninchen - IgG - Antikörper, der sowohl humanes als auch murines PS1 erkennt. Ausgewertete Bande bei 20 kDa (entspricht CTF (engl. C - terminal fragment))/PS1 - Western Blot	Abcam
W02	APP, human (AS 5-10 der A β - Sequenz)	monoklonaler Antikörper/APP - , A β -, C99 - und sAPP α - Western Blot, Gesamt - A β - Immunpräzipitation	Hergestellt mit synthetischem Maus - A β 1-16/ (Ida et al., 1996)
W4011	Kaninchen - IgG	polyklonaler Antikörper/ HRP - gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot	Promega
P0260	Maus - IgG	polyklonaler Antikörper/ HRP - gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot	Dako

3.1.8 Kits

Tab. 7: Kits

BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	HERSTELLER
Cytotoxicity Detection Kit	LDH - Test	Roche
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	cDNA Synthese	Thermo Fisher Scientific

3.2 METHODEN

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

(nach [126])

Zum Kultivieren der Zellen wurden 10 cm – Kulturschalen verwendet. In Tab. 4 sind die verwendeten Zelllinien mit dem jeweiligen Zellkulturmedium aufgelistet. Die Inkubation lief unter folgenden Bedingungen:

37°C	Temperatur
5 %	CO ₂
95 %	Luftfeuchtigkeit.

Für das Arbeiten mit den Zellen waren sterile Bedingungen erforderlich. Es wurde hierfür u.a. eine sterile Bank mit zirkulierender Luft benötigt. Alle Medien oder Lösungen, die mit den Zellen direkt in Kontakt kamen, mussten auf 37°C vorgewärmt werden. Bei einer Wachstumskonfluenz von 90 – 100 % wurden die Zellen passagiert (= geteilt). Die Zellen wurden hierfür mit 2 ml PBS (engl. phosphate buffered saline) gewaschen, um das restliche FCS (engl. fetal calf serum), welches eine hemmende Wirkung auf Trypsin hat, zu entfernen. Es folgte die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA, um die Verbindungen der Zellen sowohl zwischeneinander als auch zwischen den Zellen und dem Boden der Zellkulturschale zu lösen. Nach einer Inkubation von etwa 1 Minute wurde die Trypsin/EDTA – Lösung abgesaugt und die Schale leicht hin und her gewippt und an den Seiten beklopft, bis sich alle Zellen vereinzelt gelöst haben. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie wurde 0,5 bis 2 ml der resuspendierten Zellen in eine neue 10 cm – Kulturschale überführt und auf 10 ml mit frischem Kulturmedium aufgefüllt.

PBS:

pH 7,5	
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

3.2.1.2 Kryokonservierung und Reaktivierung eukaryotischer Zellen

(nach [126])

Lösung A:

30 % (v/v) FCS in DMEM

Lösung B:

30 % (v/v) FCS + 20 % (v/v) DMSO in DMEM

Für die Langzeitlagerung der Zellen müssen diese gesondert konserviert werden. Für die Kryokonservierung wurden Zellen mit einer Konfluenz von 70 – 80 % verwendet, die sich demnach gerade in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden. Zunächst wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen von PBS folgte die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA und eine Inkubation über 2 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Schale an den Seiten beklopft, um die Zellen in Suspension zu bringen und in 5 ml frisches Kulturmedium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 1 500 x g für 5 Minuten in einem 15 ml Falconröhrchen wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1,5 ml Lösung A resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 1,5 ml Lösung B. Nach Resuspension wurde das Suspendat à 1,5 ml pro Kryotube aliquotiert. Nach einer kontinuierlichen Abkühlung (-1°C/min) über 24 Stunden bei -80°C in einem Einfriergefäß, platziert in einer mit Isopropanol gefüllten Kammer, konnten die Kryotubes schließlich in einen N₂ – Tank mit Temperaturen ≤ -195 °C zur längerfristigen Lagerung überführt werden.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryotubes in einem auf 37°C vorgewärmtem Wasserbad langsam aufgetaut und in ein Falconröhrchen, in welches 5 ml warmes Kulturmedium vorgelegt wurde, überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1 500 x g über 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml warmem Kulturmedium resuspendiert. Schließlich wurde das Suspendat in einer 10 cm – Kulturschale, gefüllt mit 10 ml warmem Kulturmedium, aufgenommen und bei in 3.2.1.1 geschilderten Bedingungen inkubiert.

3.2.1.3 Inkubation der Zellen mit AICD

(nach [153])

Um zu untersuchen, ob AICD einen Effekt auf die Genexpression der ORAI – und STIM – Proteinen und somit auf den Ca^{2+} - Haushalt hat, erfolgte eine Kurzzeitinkubation von MEF APP/APLP2 -/- mit einem synthetischen AICD – Peptid. Bei dem Peptid handelt es sich um die letzten 20 Aminosäuren (AS) vom humanen APP₆₉₅ (Aminosäuren – Sequenz: KMQQNGYENPTYKFFEQMQN). Im Falle einer Regulation der Genexpression von ORAI – und STIM – Proteinen durch AICD wäre eine Annäherung Richtung MEF WT zu erwarten.

Die Transfektion von MEF APP/APLP2 -/- mit AICD erfolgte mittels des Transfektionsreagenz Saint PhD. Am Vortag wurden die Zellen in 6 – Well – Platten ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 70 – 80 % wurde das alte Zellkulturmedium durch 2,1 ml frisches, vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt und mit AICD versetzt. Hierfür wurde AICD wie folgt angesetzt:

Ansatz für AICD – Inkubation pro Well:

236,3 µl	HBS
6,23 µl	AICD (Stock c[1 mM])
157,8 µl	Saint PhD

Sowohl nach der Zugabe von AICD als auch nach der Zugabe von Saint PhD wurde der Ansatz kurz gevortext. Anschließend folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die finale Konzentration von AICD betrug 2,5 µM. Als Kontrolle wurden die Zellen anstelle von AICD mit ddH₂O behandelt. Um zu ermitteln, in welcher Zeitspanne die Effektstärke von AICD ihren Höhepunkt hat, wurde für die Inkubation eine Zeitreihe über 3, 6 und 12 Stunden angesetzt.

Die Methode der AICD – Transfektion konnte aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht komplett etabliert werden. So wurde z.B. die Transfektionseffizienz nicht ermittelt und es lag nur eine begrenzte Probenanzahl vor.

3.2.1.4 Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH - Test

(nach Herstellerprotokoll Cytotoxicity Detection Kit Plus, Roche)

Es ist wichtig, die Stärke der Zytotoxizität von additiven Substanzen wie z.B. DMSO und BTP2 einzuschätzen, um etwaige Effekte ausschließlich den vitalen Zellen zuschreiben zu können. Gestresste, absterbende Zellen verändern ihre Homöostase und können falsche Effekte imitieren. Um die Toxizität der Substanzen zu ermitteln, wurde das Cytotoxicity Detection Kit von Roche verwendet. Dieser Test misst die freie, extrazelluläre Laktat-Dehydrogenase (LDH). Unter Normalbedingungen liegt LDH ausschließlich im Zytosol vor. Bei Störung der Membranintegrität z.B. unter Einfluss von zytotoxischen Substanzen wird LDH freigesetzt. Die messbare LDH – Enzymaktivität verhält sich direkt proportional zu der Anzahl der geschädigten Zellen. LDH reduziert NAD⁺ zu NADH+H⁺, indem es Laktat zu Pyruvat oxidiert. Diese Reaktion wird genutzt, sodass im zweiten Schritt die im Kit enthaltene Diaphorase zwei Protonen von NADH+H⁺ auf das Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) überträgt und es dadurch zu Formazan umwandelt. Hierbei kann ein Farbumschlag von gelb zu rot-violett beobachtet werden. Das so gebildete Formazan verhält sich direkt proportional zu LDH und kann bei einer Absorption von 491 nm gemessen werden.

Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurde das Zellkulturmedium abgenommen und wie in 3.2.3.1 beschrieben aufbereitet. Für die Positivkontrolle erfolgte die Zugabe von 1 % (v/v) Triton-X100 auf vergleichbar konfluente Zellen. Triton-X100 tötet zu 100 % alle Zellen. Aus dem Zellkulturmedium dieser Zellen wurde folglich eine Verdünnungsreihe aufgestellt, wobei reines Zellkulturmedium einer 100 % Zellviabilität und das unverdünnte Zellkulturmedium der mit Triton-X100 behandelten Zellen

einer 100 % Zytotoxizität entsprach. In transparente 96 – Well – Platten wurde pro Well 100 µl vom Zellkulturmedium der inkubierten Zellen sowie die Standardreihe vorgelegt. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem Herstellerprotokoll.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Proben verwendet, deren Zytotoxizität unter 10 % lag. Aufgrund der beschränkten Probenanzahl für die Messung der α – Sekretasen Aktivität im Ca^{2+} - freien Medium (4.3.4.1) wurde jedoch einmalig die hohe Toxizität von rund 30 % akzeptiert. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse folglich berücksichtigt werden.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Transfektion der Zellen mit Plasmiden mittels JetPRIME

(nach Herstellerprotokoll JetPRIME[®])

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Transfektion der eukaryotischen Zellen mit Plasmiden für die meisten Experimente mittels JetPRIME[®] Transfektionsansatz. Die Tab. 5 bietet eine Übersicht über die verwendeten Plasmide, über die transfizierten Zelllinien und die Methoden, in wessen Rahmen die Transfektion angewendet wurde. Die näheren Angaben über die Inkubationsbedingungen sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Für die Transfektion der Zellen wurden am Vortag die Zellen in 6 – Well – Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 60-70 % bei 37°C und 5 % CO_2 bebrütet. Für den Transfektionsansatz pro Well wurde 2 µg DNA zu 200 µl JetPRIME Buffer gegeben und kurz gevortext. Nach der Zugabe von 4 µl JetPRIME Transfektionsreagenz wurde für 10 Sekunden gevortext und anschließend einmal stark abgeschüttelt. Somit ergab sich eine 1:2 Ratio von DNA zu JetPRIME (w/v). Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem das alte Zellkulturmedium mit 2 ml frischem Zellkulturmedium ersetzt wurde, wurde 200 µl des Transfektionsansatzes pro Well tropfenweise appliziert, die Platte leicht hin und her gewippt und bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 4 bis 6 Stunden wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches Inkubationsmedium (1 % FCS statt 10 %) ersetzt. Die nachfolgende Inkubation richtete sich nach den jeweiligen Methodenansprüchen.

3.2.2.2 Isolation der Gesamt – RNA mittels TRIzol

(nach Herstellerprotokoll TRIzol – Reagent, Life Technologies)

Für die Isolation der RNA aus den Zellen, wurden diese für 24 Stunden bzw. bis zur vollständigen Konfluenz in 6 – Well – Platten kultiviert. Nachdem das Zellkulturmedium vollständig abgesaugt wurde, erfolgte die Zugabe von 1 ml TRIzol – Reagent. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Gummischaber

vom Boden gelöst und in ein 1,5 ml – Eppendorf – Reaktionsgefäß überführt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Die Proben wurden etwa 20 Sekunden lang stark geschüttelt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur abgestellt. Nach der Zentrifugation bei 12 000 x g für 15 Minuten bildeten sich drei Phasen: die obere klare Phase, die die RNA enthielt, die mittlere weiße Interphase mit Proteinen und die untere rote Phase mit DNA. Die obere klare Phase wurde vorsichtig, um das Beimischen von Proteinen zu vermeiden, abgenommen, in ein neues Eppendorf – Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nachdem die Proben 10 Mal invertiert wurden, schloss sich eine 10 – minütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Isopropanol führt zum Ausfällen der RNA, die nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 12 000 x g als ein weißliches Pellet sichtbar wird. Um den restlichen Isopropanol zu entfernen, wird das RNA – Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren für 5 Minuten bei 12 000 x g wurde der Überstand verworfen und das RNA – Pellet für 2 Minuten an der Luft getrocknet. Es folgte, abhängig von der Größe des Pellets, die Zugabe von 60 bis 100 µl Nuklease – freies H_2O und die Inkubation für 10 Minuten bei 58°C unter leichtem Schütteln, um die RNA in Lösung zu bringen. Anschließend konnte entweder die Konzentration sowie die Reinheit mittels NanoDrop – Spektrophotometer bestimmt (3.2.2.3) oder die RNA bei -80°C längerfristig gelagert werden.

3.2.2.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von isolierter RNA

(nach Dissertation von Dr. Sven Grösgen, 2013)

Um die Konzentration der isolierten RNA und die Reinheit der Probe bzw. Proteinkontamination zu ermitteln, wurde die optische Dichte (OD) mittels NanoDrop – Spektrophotometer gemessen. Da Nukleinsäuren ihr Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm haben und die der Proteine bei 280 nm liegt, kann sich aus dem Quotient $OD_{260\text{ nm}} / OD_{280\text{ nm}}$ ein Hinweis auf die Proteinkontamination der Probe ergeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Quotient zwischen 1,9 und 2,2 eingesetzt. Dies entspricht einem in etwa proteinfreiem Bereich, wobei für reine RNA ein Quotient von 2,0 zu erwarten wäre. Für die Kalibrierung des Spektrophotometers wurde destilliertes H_2O verwendet, um eine Verzerrung des Messergebnisses durch pH oder Salze zu minimieren [487]. Die Konzentration der RNA in der Probe wird berechnet wie folgt:

$$c[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times 40 \mu\text{g/ml},$$

wobei V den Verdünnungsfaktor angibt.

3.2.2.4 cDNA – Synthese

(nach Herstellerprotokoll High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)

Programmeinstellungen für cDNA - Synthese:

Schritt	1	2	3	4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Zeit [min]	10	120	5	konstant

Master Mix:

2 µl	10x RT Buffer				
0,8 µl	25x dNTP Mix			+	10 µl RNA
2,0 µl	10x RT Random Primer				(in Nuklease – freiem H_2O
1,0 µl	MultiScribe Reverse Transcriptase				eingestellt auf c[0,2 µg/µl])
4,2 µl	Nuklease – freies H_2O				

Die wie in 3.2.2.2 beschrieben gewonnene RNA wurde unter Verwendung des „High Capacity cDNA RT Kit“ mittels PRIMUS 25 ADVANCED PCR – Cyclers zur komplementären DNA umgeschrieben. Hierfür wurden 2 µg isolierter RNA mithilfe des Master Mix bei einem Gesamtvolumen von 20 µl benötigt. Die fertige cDNA wurde 1:10 in Nuklease – freiem H_2O verdünnt und konnte zur Langzeitlagerung auf -80°C gekühlt werden.

3.2.2.5 Quantitative RT – PCR

(nach Dissertation von Dr. Sven Grösgen, 2013)

Ansatz für RT-PCR:

0,25 µl	forward primer
0,25 µl	reverse primer
2,0 µl	Nuklease – freies H_2O
5,0 µl	SYBR – Green Master Mix
2,5 µl	cDNA

Ansatz für RT-PCR (Qiagen Primer):

1,0 µl	both primer
1,5 µl	Nuklease – freies H_2O
5,0 µl	SYBR – Green Master Mix
2,5 µl	cDNA

Die Methode der quantitativen Echtzeit – Polymerasekettenreaktion (engl. quantitative real time polymerase chain reaction) dient der quantitativen Bestimmung vom Expressionsniveau verschiedener Gene. Um eine Aussage über die Expression verschiedener Gene machen zu können und um Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden Gene herangezogen, deren Genexpression konstant und unabhängig von äußeren Einflüssen reguliert wird. Diese Gene werden als housekeeping-genes (HKG) bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei HKGs verwendet, wobei für die finale Auswertung mittels $\Delta/\Delta CT$ – Methode [290] stets ein Mittelwert gebildet wurde. Es wurden in unterschiedlichen Kombinationen β – Aktin, TBP (engl. TATA-box binding protein), HPRT1 (engl. hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) und ATP (engl. adenosine triphosphate) – Synthase verwendet. So

wurden im Fall von MEF STIM1/2 -/- TBP und HPRT1 verwendet. Bei der Analyse von SH-SY5Y – Zelllinien kamen β - Aktin und TBP zur Anwendung, wohingegen bei den restlichen MEF – Zelllinien β – Aktin und ATP – Synthase als Referenzgene eingesetzt wurden. Die Messung der Genexpression von ORAI-, STIM- und Cav-Genen wurde in humanen *post mortem* Hirnproben unter der Verwendung von housekeeping-genes TBP und HPRT1 von QIAGEN durchgeführt. Durch Primer, die für ein bestimmtes Gen spezifisch sind, werden die jeweiligen Gensequenzen aus der cDNA amplifiziert, wobei eine doppelsträngige DNA entsteht. Durch die Interkalierung des Fluoreszenz – Farbstoffes SYBR – Green kann diese fluorometrisch nachgewiesen werden.

Zur Messung der Genexpression wurde der RT – PCR – Ansatz (10 μ l) in die Vertiefungen der 96 – Well – Platte gegeben. Die Messung wurde mittels PikoReal PCR System der Firma Thermo Scientific unter Verwendung der PikoReal Software (Version 2.1.158.545) durchgeführt. Zur quantitativen Erfassung der Daten wurde die $\Delta/\Delta CT$ – Methode nach Livak und Schmittgen [290] eingesetzt. Eine Übersicht über die verwendeten Primer ist den Tab.8, 9 und 10 zu entnehmen. Die Programmeinstellungen waren wie folgt:

Programmeinstellungen für RT – PCR:

Schritt	1	2	3	4	
Temperatur [°C]	95	95	60		} Schmelzkurven Analyse
Zeit [s]	20	3	30		
Zyklen	1		40	1	

Tab. 8: Primer für humane Proben

Gen	forward primer	reverse primer
Cav1.3	5'-TCA GCC GAA TAG CTC CAA GC-3'	5'-TCG GAT GGG GTT ATT GAG TGA-3'
Cav2.2	5'-GAC AAC GTC GTC CGC AAA TAC-3'	5'-CCC GAT GAA ATA GGG CTC CG-3'
Cav3.1	5'-TGT CTC CGC ACG GTC TGT AA-3'	5'-AAG CCG GTT CCA AGT GTC TC-3'
ORAI1	5'-ATG AGC CTC AAC GAG CAC T-3'	5'-GTG GGT AGT CGT GGT CAG-3'
ORAI2	5'-TGG AAC TGG TCA ACC TCT AAC-3'	5'-GGG TAC TGG TAC TGC GTC T-3'
ORAI3	5'-GTA CCG GGA GTT CGT GCA-3'	5'-GGT ACT CGT GGT CAC TCT-3'
STIM1	5'-CAG AGT CTG CAT GAC CTT CA-3'	5'-GCT TCC TGC TTA GCA AGG TT-3'
STIM2	5'-GTC TCC ATT CCA CCC TAT CC-3'	5'-GGC TAA TGA TCC AGG AGG TT-3'
STIM2.1	5'-CTC TGA AAA AGG CCG AAA AA-3'	5'-TGA AGC AGC AAC CTC ATC TTT-3'
STIM2.2	5'-CTC TGA AAA AGG CCG AAA AA-3'	5'-TTT TCT GCC TCA TCT TTA GCA A-3'
TBP	5'-CGG AGA GTT CTG GGA TTG T-3'	5'-GGT TCG TGG CTC TCT TAT C-3'
β -Aktin	5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3'	5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'

Tab. 9: Primer für humane und murine Proben (QIAGEN)

Gen	Cat.no:
CavB (human)	QT00077042
CavD (human)	QT00076657
CavG (human)	QT00043043
HPRT1 (human)	QT00059066
HPRT1 (murin)	QT00166768
ORAI1 (human)	QT00202587
ORAI2 (human)	QT00215229
ORAI3 (human)	QT00231910
STIM1 (human)	QT00083538
STIM2 (human)	QT00023744
TBP (human)	QT00000721
TBP (murin)	QT00198443

Tab. 10: Primer für murine Proben

Gen	forward primer	reverse primer
ADAM10	5'-CAT TAA TGG GCA ATG TGC AG-3'	5'-ATG CAG CAA ACA TGG CAT AA-3'
ADAM17	5'-TGA CAT CAA GTA CCG AAC GC-3'	5'-GAG TCA GGC TCA CCA ACC AC-3'
Aph1a	5'-ACA AGC TCC TTA AGA AGG CAG A-3'	5'-CCG AAG GAC AGA CCA GAA AC-3'
Aph1b	5'-GCT GTT CAG GCT CGC ATA TT-3'	5'-AGA AAC ATA GGC CAA CAG TCG-3'
Aph1c	5'-CTC ATC GCT GGT GCT TTC TT-3'	5'-AGA AAC ATA CGC CAA CAG TCG-3'
APLP2	5'-CGA CCT CTC CAA GGG AAA GT-3'	5'-GGG AAT CAT CGC TTT ACA CAC-3'
APP	5'-CCG TTG CCT AGT TGG TGA GT-3'	5'-GTG CCA GTG AAG ATG GGT CT-3'
ATP- Synthase	5'-GGA TCT GCT GGC CCC ATA C-3'	5'-CTT TCC AAC GCC AGC ACC T-3'
BACE1	5'-ACA TTG CTG CCA TCA CTG AA-3'	5'-TCC AAA GAA GGG CTC CAA AGA-3'
IDE	5'-GCT ACG TGC AGA AGG ACC TC-3'	5'-TGG ACG TAT AGC CTC GTG GT-3'
Ncstr	5'-TGC TCT ATG GGT TCC TGG TT-3'	5'-CGG CGA TGT AGT GTT GAA GA-3'
NEP	5'-TGA ACT TTG CCC AGG TGT G-3'	5'-GCA AAG TCC CAA TGA TCC TG-3'
ORAI1	5'-ATG AGC CTC AAC GAG CAC T-3'	5'-GTG GGT AGT CAT GGT CTG-3'
ORAI2	5'-TGG AAC TCG TCA CGT CTA AC-3'	5'-GGG TAC TGG TAC TTG GTC T-3'
ORAI3	5'-GTA CCG GGA GTT CGT GCA-3'	5'-GGT ATT CAT GAT CGT TCT CC-3'
PS1	5'-AAA GAC CCC TGC ACT CGA T-3'	5'-TGG TTG TGT TCC AGT CTC CA-3'
PS2	5'-TCA TGC TAT TTC GTG CCT GTC-3'	5'-GTG TAG ATG AGC TGC CCG TT-3'
PSENE1	5'-ATC TTG GTG GAT TTG CGT TC-3'	5'-CCT TTG ATT TGG CTC TGC TC-3'
STIM1	5'-CAG AGT CTG CAT GAC CTT CA-3'	5'-GCT TCC TGC TTG GCA AGG TT-3'
STIM2	5'-GTC TCC ATT CCA CCC TAC C-3'	5'-GGC TAA AGA TCC TGC AGG TT-3'
STIM2.1	5'-CGA GGT CGC TGC CTC CTA TC-3'	5'-CAC GTG GTC AGC TCA GAG AG-3'
STIM2.2	5'-GGA CGA GGC AGA AAA AAT TAA AAA G-3'	5'-CAC GTG GTC AGC TCA GAG AG-3'
β-Aktin	5'-CCT AGG CAC CAG GGT GTG AT-3'	5'-TCT CCA TGT CGT CCC AGT TG-3'

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Probenverarbeitung

(nach Dissertation von Dr. Verena Burg, 2014)

Für die Gewinnung von konditioniertem Medium wurden Zellen für eine bestimmte Zeitdauer mit Kultivierungsmedium versehen. Anschließend wurde das Zellkulturmedium in ein 2 ml – Eppendorf – Reaktionsgefäß überführt und 10 Minuten bei 13 000 x g und 4°C zentrifugiert. Auf diese Weise konnten Zelltrümmer und abgestorbene Zellen in Form von Sediment eliminiert werden. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und entweder auf Eis gekühlt sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

Bei der Gewinnung von Zellen wurden diese im ersten Schritt dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellkulturschalen schräg gestellt, damit das restliche PBS vollständig abgesaugt werden konnte. Die so vorbereiteten Zellen wurden für die nachfolgende Verarbeitung anschließend mittels Lysepuffer chemisch aufgeschlossen (3.2.3.2).

3.2.3.2 Herstellung von Lysat aus Zellen

(nach Dissertation von Dr. Verena Burg, 2014 und Dr. Janine Mett, 2017)

Lysepuffer:

ddH₂O

50 mM Tris/HCl pH 7,4

2 mM EDTA

150 mM NaCl

0,1 % (v/v) Triton X-100

0,1 % (v/v) Nonidet P-40

Protease – Inhibitor – Cocktail (Complete' Roche) 1:10 frisch zugeben.

10 x Protease – Inhibitor – Cocktail: 1 Complete – Tablette in 5 ml ddH₂O gelöst, Lagerung bei -20°C.

Auf die wie in Kapitel 3.2.3.1 vorbereiteten Zellen wurde 500 µl Lysepuffer pro 10 cm Kulturschale appliziert. Nach 10 – minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mittels eines Gummischabers vom Boden gelöst, in ein Eppendorf – Reaktionsgefäß überführt und weitere 30 Minuten auf Eis lysiert.

Für die Analyse von BACE1 und PS1 wurden die Zellen direkt nach dem Waschen (3.2.3.1) mit 2 ml PBS vom Boden abgelöst, in ein Eppendorf – Reaktionsgefäß überführt und bei 5000 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer gevortext und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Zwischendurch wurden die Zellen zweimal

durch eine (27G x $\frac{3}{4}$ Nr. 20 0,4 mm x 19mm-) Kanüle gezogen. Die anschließende Zentrifugation mit 13 000 x g bei 4°C für 10 Minuten bzw. 5 Minuten ermöglichte die Sedimentation von Zellfragmenten.

Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf – Reaktionsgefäß überführt und direkt für proteinbiochemische Analysen (BCA – Test, Immunpräzipitation, SDS – PAGE) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA – Test

(nach [435], Durchführung wie in [397] beschrieben)

BCA – Lösung:

1 ml 4 % $CuSO_4 \times 5 H_2O$

39 ml BCA – Lösung

Um unterschiedliche Proben effektiv miteinander vergleichen zu können, sollte der Proteingehalt in den Proben gleich eingestellt werden. Mittels BCA (engl. bicinchoninic acid) – Test kann die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt werden. Die chemische Reaktion beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in Gegenwart von Proteinen im alkalischen Milieu. Daraufhin bildet Cu^{1+} einen violetten Komplex mit der Bichinoninsäure, was bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm quantitativ bestimmt werden kann. Die Menge an Cu^{1+} verhält sich proportional zu der Proteinkonzentration.

Für den BCA – Test wurde je nach geschätztem Proteingehalt 0,5 – 20 μ l vom Lysat in eine 96 – Well – Platte pipettiert und dreifach bestimmt. Als Referenz wurde eine Standard – Verdünnungsreihe mit Rinderserum– Albumin (engl. bovine serum albumin, BSA) in Konzentrationen 0,1 – 1,1 mg/ml je 20 μ l angesetzt. Zusätzlich wurde eine Vertiefung ausschließlich mit der BCA – Lösung vermessen, um eine Konzentration von 0 mg/ml zu erzielen. Nach der Zugabe von 200 μ l der frischen BCA – Lösung wurden die Proben 15 Minuten bei 37°C und anschließend weitere 15 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Mittels Spektralphotometer wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen und die Proteinkonzentration anhand der Messwerte der Standard – Verdünnungsreihe berechnet.

3.2.3.4 Immunpräzipitation von APP – Prozessierungsprodukten

(nach Dissertation von Dr. Eva Zinser, 2009, von Dr. Johanna Kuchenbecker, 2011 sowie von Dr. Verena Burg, 2014)

Die Methode der Immunpräzipitation wurde verwendet, um Proteine aus konditioniertem Medium (A β und sAPP α) anzureichern. Anschließend wurden diese mittels SDS – PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot fixiert und anschließend quantifiziert. Dabei wird die Bindung eines für ein bestimmtes

Protein spezifischen Antikörpers an eine Matrix ausgenutzt. Als Matrix fungiert Sepharose mit gebundenem Protein G, welches aus der Zellwand von Bakterien rekombinant hergestellt wurde und mit hoher Affinität die Fc – Region von IgG bindet. Das anschließende Waschen mit Puffern verschiedener Ionenstärke entfernt Proteine, die unspezifisch an Protein G – Sepharose gebunden haben.

In Tab.11 ist der Primärantikörper mit Inkubationsbedingungen und erforderlicher Konzentration aufgeführt. Weitere Eigenschaften vom Antikörper sind in Tab. 6 gegeben.

Tab. 11: Antikörper und Inkubationsbedingungen für die Immunpräzipitation.

Antikörper	Probe	Temperatur	Konzentration
W02	Konditioniertes Medium, Zell - Lysat	4°C, ÜN	10 µg/ml

Verwendete Puffer:

	Waschpuffer		
	A	B	C
Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	150 mM	500 mM	-
Nonidet P-40	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	-
Triton X-100	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	-
EDTA	2 mM	2 mM	-

Für die Immunpräzipitation wurde das erforderliche Volumen an konditioniertem Medium (3.2.3.1) entsprechend der Proteinmenge des jeweiligen Zelllysats auf die geringste Probenproteinkonzentration angeglichen und in einem 1,5 ml Eppendorf – Reaktionsgefäß mit frischem Zellkulturmedium auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit W02 und 20 µl Protein G – Sepharose versehen und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopftaumler inkubiert. Daraufhin wurde das konditionierte Medium für 1 Minute bei 13 000 x g und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Pellet einer Waschung mit Waschpuffern A-C unterzogen. Die Waschpuffer wurden der Reihe nach zu jeweils 1 ml zur Probe hinzugegeben, wobei nach jeder Zugabe die Probe ein paar Mal invertiert wurde und anschließend für 1 Minute bei 13 000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde der restliche Überstand mit einer Hamilton – Spritze abgenommen und die Probe für die weitere Verarbeitung (SDS – PAGE, Western Blot) genutzt.

3.2.3.5 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS – PAGE)

(nach [408] und nach Dissertation von Dr. Eva Zinser, 2009)

- 10 – 20 % Tris - Tricine – Gel
- 3 x SDS – Probenpuffer:

187,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
30 % (v/v)	Glycerin
15 % (v/v)	β – Mercaptoethanol
6 % (w/v)	SDS
0,03 % (w/v)	Bromphenolblau
In ddH ₂ O	

- 1 x Laufpuffer für SDS – PAGE:

100 mM	Tris/HCl pH 8,25 - 8,5
100 mM	Tricin
0,1 % (w/v)	SDS
In ddH ₂ O	

Die Methode der SDS – PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) dient der Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Die Laufrichtung wird durch die negative Ladung der Proteine Richtung Anode bestimmt. Dabei wird die Eigenladung der Proteine durch das im Puffer enthaltene SDS mit einer negativen Ladung maskiert. Die Auftrennung der in 10 – 20 % Tris – Tricine – Gel geladenen Proteine erfolgte elektrophoretisch in einer mit 1x Laufpuffer gefüllten Kammer bei einer Spannung von 120 V über einen Zeitraum von 60 – 90 Minuten.

Während zu Immunpräzipitaten 20 µl 1 x SDS – Probenpuffer (hierfür wurde das 3 x SDS – Probenpuffer 1:3 mit ddH₂O verdünnt) geladen wurde, wurde eine Proteinmenge von 50 µg den Zelllysaten (c[5mg/ml]) entnommen, mit 6 µl 3 x SDS – Probenpuffer beladen und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Eppendorf – Reaktionsgefäße angestochen und für 5 Minuten bei 98°C im Heizblock aufgeköcht. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben mit einer Hamilton – Spritze in die Geltaschen geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenzsubstanz wurde 5 µl Page Ruler verwendet. Anhand des bekannten Bandenmusters von Page Ruler konnte so das Molekulargewicht der Proteine abgeschätzt werden.

3.2.3.6 Proteintransfer mittels Western Blot (Nass – Blot; „Tank – Blot“)

(nach [461], Durchführung wie in Dissertation von Dr. Eva Zinser, 2009 beschrieben)

Transferpuffer:

25 mM Tris/HCl pH 8,7
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol
0,025 % (w/v) SDS
ddH₂O

Die Methode des Western Blots beruht auf einer Übertragung und Fixierung von zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen (3.2.3.5) aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Der Transfer der Proteine erfolgt unter Anlegen einer äußeren Spannung. Da die Proteine aufgrund von SDS eine negative Ladung erfahren (3.2.3.5), wandern diese im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode und bleiben auf der dazwischengeschalteten Nitrozellulosemembran hängen. Die nachfolgende Inkubation der Membran mit Primär – und HPR – gekoppelten Antikörpern (engl. horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) ermöglicht einen qualitativen sowie quantitativen Nachweis der Proteine (3.2.3.7).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Nass – Blot – Methode (engl. Tank – Blot) angewandt. Hierfür wurde sandwichartig das Tris – Tricine – Gel auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und zwischen zwei Lagen Whatman – Filterpapier eingebettet. Umhüllt von Schwämmen und platziert in eine Plastikvorrichtung wurde der „Sandwich“ in eine Kammer eingehängt, die bis zu den Rändern mit Transferpuffer gefüllt war. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 380 mA und 4°C. Abhängig von der Größe des Proteins wurde für A β und β – CTF eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,22 μ m und für alle anderen mit 0,45 μ m verwendet. Außerdem richtete sich auch die Transferzeit nach dem Molekulargewicht des Proteins. So belief sie sich bei kleinen Peptiden (A β und β – CTF) auf 1 Stunde und betrug bei größeren Proteinen etwa 3 Stunden.

3.2.3.7 Proteinnachweis mit der ECL – Methode

(nach [211], nach Dissertation von Dr. Johanna Kuchenbecker, 2011 und Dr. Janine Mett, 2017)

ECL – Lösung[®]:

ECL – Lösung 1 und ECL – Lösung 2 im Verhältnis 1:1 (v/v)

PBS:

3.2.1.1

Die ECL – Methode beruht auf einer Detektion von Proteinen unter Bindung eines Primärantikörpers an sein Epitop sowie anschließender Bindung eines speziesspezifischen HPR – gekoppelten

Sekundärantikörpers. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert eine chemische Reaktion mit der ECL (engl. enhanced chemiluminescence) – Lösung, wobei eine Lichtemission entsteht, die auf einem lichtempfindlichen ECL – Film sichtbare Banden hinterlässt.

Tab. 12: Blockier- und Inkubationsbedingungen von Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Blockierlösung/ Inkubationsbedingungen	1. Antikörper/ Verdünnung bzw. Konzentration/ Inkubationsbedingungen	2. Antikörper/ Verdünnung/ Inkubationsbedingungen
APP/ sAPP α / A β / β -CTF	10 % Milchpulver (w/v) in PBS/ ÜN bei 4°C	W02/ 1 μ g/ml in 1% Milchpulver (w/v) in PBS/ 1,5 h, RT	P0260/ 1:5000 in PBS/ 1 h bei RT
BACE1	5 % Milchpulver (w/v) in PBS/ ÜN bei 4°C	ab2077/ 1:1000 in 1 % Milchpulver (w/v) in PBS/ ÜN bei 4°C	W4011/ 1:5000 in 5% Milchpulver (w/v) in PBS/ 1 h bei RT
PS1	5 % Milchpulver (w/v) in PBS/ 1 h bei RT	ab76083/ 1:5000 In 2,5 % Milchpulver (w/v) in PBS/ 1 h, RT	W4011/ 1:5000 in PBS/ 1 h bei RT

Bei der Verwendung von W02 wurde direkt nach dem Transfer des Proteins auf die Nitrozellulosemembran (3.2.3.6) diese im vorgewärmten PBS für 5 Minuten in einer Mikrowelle bei 700 W erhitzt [211]. Für alle anderen Antikörper entfiel dieser Schritt. Zunächst wurde die Membran zwecks Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in einer Blockierlösung inkubiert. Daraufhin wurde die Membran dreimal in PBS gewaschen und mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten drei Waschschrte mit PBS für je 5 Minuten auf dem Schüttler. Nachfolgend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem HPR – gekoppelten Sekundärantikörper. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper sowie über entsprechende Blockier – und Inkubationsbedingungen bietet die Tab.12.

Es folgten drei Waschschrte in PBS à 10 Minuten und eine Zugabe der ECL – Lösung. Nach einer kurzen Inkubation mit der ECL – Lösung wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und in einer Dunkelkammer auf einem lichtempfindlichen ECL – Hyperfilm exponiert. Die densitometrische Quantifikation der Banden wurde mit Hilfe von Computerprogramm Image Gauge V3.45 ermöglicht.

3.2.3.8 Messung der Sekretase -Aktivität

(nach [50] und nach Dissertation von Dr. Verena Burg, 2014, etabliert von Dr. Viola Haupenthal)

Die Methode der Sekretase - Aktivitätsmessung beruht auf dem fluorometrischen Nachweis einer enzymatischen Umsetzung von intern gequenschem Substrat durch die jeweilige Sekretase. Die

Substrate sind an beiden Enden mit einem Fluorochrom versehen, die durch die dazwischengeschaltete Peptidsequenz auf Distanz gehalten werden, sodass nach Anregung kein Energietransfer möglich ist („quenchen“). Wird diese Peptidsequenz durch die entsprechende Sekretase geschnitten, hat dies eine räumliche Annäherung von den beiden Fluorophoren zur Folge. Der dabei stattfindende Energietransfer vom Donor – zum Akzeptor – Fluorophor wird in Form von Fluoreszenz sichtbar und von einem Detektor erfasst. Das Emissionsspektrum vom Donor – Fluorophor muss demnach mit dem Absorptionsspektrum vom Akzeptor – Fluorophor überlappen. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz – (oder Förster-) Resonanz – Energie – Transfer (FRET) bezeichnet [59]. Mittels FRET – Assay ist die Aufnahme der enzymatischen Umsetzung durch die Sekretase in Echtzeit möglich. In Tab.13 sind die Substrate mit den entsprechenden Messparametern aufgeführt. Die Peptidsequenz, die die Schnittstelle für die jeweilige Sekretase beinhaltet, entspricht somit β – CTF als γ - Sekretase – Substrat, einem der APPswe – Mutation nachempfundenen Peptid, welche den Schnitt der β - Sekretase bevorzugt [81,333] sowie einer APP – Sequenz, die den Schnitt der α - Sekretase begünstigt.

PBS:

3.2.1.1

LCIS:

140 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
1,8 mM	CaCl ₂
1,0 mM	MgCl ₂
20 mM	Hepes/pH 7,4
ddH ₂ O	

LCIS ohne Ca²⁺:

140 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
1,0 mM	MgCl ₂
20 mM	Hepes/pH 7,4
ddH ₂ O	

Tab. 13: Substrate und Messparameter für fluorometrische Sekretase-Aktivitätsmessungen

Sekretase	finale Substrat-konzentration	Substrat	Messparameter	Zyklenanzahl/ Messintervall
α - Sekretase	30 μ M α - Sekretase Substrat II 565767	Ac-Arg-Glu(EDANS)-Val-His- His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe- Lys(DABCYL)-Arg-OH	Excitation: 340 nm \pm 10 nm Emission: 490 nm \pm 10 nm	120/ 120s
β - Sekretase	10 μ M β - Sekretase Substrat IV 565758	H-Arg-Glu(EDANS)-Glu-Val- Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe- Lys(DABCYL)-Arg-OH	Excitation: 345 nm \pm 5 nm Emission: 500 nm \pm 10 nm	180/ 60s
γ - Sekretase	12,5 μ M γ - Sekretase Substrat 565764	NMA-Gly-Gly-Val-Val-Ile- Ala-Thr-Val-Lys-(DNP)-D- Arg-D-Arg-D-Arg-NH ₂	Excitation: 355 nm \pm 10 nm Emission: 440 nm \pm 10 nm	50/ 180s

Für die Messung der Sekretase – Aktivität in lebenden Zellen wurden diese auf 96 – Well – Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100 % (entspricht etwa 4×10^4 Zellen/Well) kultiviert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit warmem LCIS (engl. Life Cell Imaging Solution) gewaschen. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass immer an der gleichen Stelle mit der niedrigsten Sogstufe abgesaugt wird. Anschließend wurde das entsprechende Substrat verabreicht und die Fluoreszenz in Infinite M1000 – Fluorometer vermessen. Zur Datenauswertung wurde die Steigung des linearen Bereichs herangezogen.

Im Rahmen der Untersuchung des Ca^{2+} - Haushalts wurde die Sekretasen – Aktivität zusätzlich in Ca^{2+} - freiem LCIS gemessen. Außerdem erfolgte die Aktivitätsmessung in Anwesenheit von BTP2 (engl. 3,5 - bistrifluoromethyl pyrazole derivate 2, oder YM-58483), einem pharmakologischen Inhibitor von allen drei ORAs [35,525]. Das in DMSO angesetzte BTP2 wurde zu einer finalen Konzentration von 200 nM mit Zellkulturmedium verdünnt und in die Vertiefungen der 96 – Well – Platte mit konfluent gewachsenen Zellen zugegeben. Die Kontrollzellen wurden anstelle von BTP2 mit der gleichen Menge an DMSO behandelt. Es folgte eine Inkubation über 8 bis 20 Stunden. Für die Messung der Aktivität wurde 50 μ l von BTP2 bzw. 50 μ l von DMSO auf die Zellen gegeben und direkt nach der Zugabe des jeweiligen Sekretase - Substrats (50 μ l) im Fluorometer vermessen. Hierbei erfolgte die Messung der Aktivität sowohl in Ca^{2+} - reichem als auch –freiem LCIS.

Die Messung der Enzymaktivität der γ – Sekretase wurde zusätzlich mit unterschiedlichen Ca^{2+} modulierenden Substanzen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit Ruthenium Red behandelt. Ruthenium Red inhibiert den Ca^{2+} - Influx und führt zu einer Senkung von $[Ca^{2+}]_i$. Nachdem das in

H_2O angesetzte Ruthenium Red zu einer finalen Konzentration von 2 μM mit Zellkulturmedium verdünnt wurde, wurde davon 200 μl auf die Zellen appliziert. Die Kontrollzellen erhielten die gleiche Menge H_2O anstelle von Ruthenium Red. Nach einer 5 – stündigen Inkubation, erfolgte die Messung der γ – Sekretase – Aktivität ebenfalls in Anwesenheit von Ruthenium Red in gleicher Konzentration, die für die Inkubation verwendet wurde. Für die Messung wurde das Ca^{2+} - reiche LCIS verwendet. Es folgte die Inkubation mit EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure), einem Ca^{2+} -Chelator, welches durch die Bildung eines Chelatkomplexes mit Ca^{2+} deren Konzentration senkt. EGTA wurde zu einer finalen Konzentration von c[1 mM] zum warmen Zellkulturmedium appliziert und über 16 Stunden die Zellen im Inkubator bebrütet. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit gleicher Menge NaOH (Natriumhydroxid) behandelt. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte in einem Ca^{2+} - freien Medium, um die [Ca^{2+}]i weiter zu senken.

3.2.3.8.1 Messung der α – Sekretase – Aktivität

Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe von 50 μl α – Sekretase Substrat in einer finalen Konzentration von 30 μM . Das entstehende Fluoreszenzsignal wurde anschließend kontinuierlich für 120 Messzyklen bei einer Zyklusdauer von 120s detektiert. In Tab. 13 sind die Messparameter inkl. Peptidsequenz angegeben. Die Z – Position betrug 19 000 μm . Dabei handelt es sich um die Ebene, in der das freigesetzte Fluoreszenzsignal gemessen wurde.

3.2.3.8.2 Messung der β – Sekretase – Aktivität

Zur Messung der Aktivität der β - Sekretase wurde das Substrat zuvor bis zu einer finalen Konzentration von 10 μM in warmem LCIS verdünnt und 50 μl in die vorbereiteten Vertiefungen der 96 – Well – Platte appliziert (3.2.3.8). Die Detektion der Fluoreszenz betrug 180 Messzyklen à 60 Sekunden, wobei die Z – Position bei 18 600 μm gewählt wurde.

3.2.3.8.3 Messung der γ – Sekretase – Aktivität

(nach [150])

Die finale Konzentration von γ – Sekretase Substrat wurde auf 12,5 μM verdünnt und zur Messung 50 μl auf die zu analysierenden Zellen gegeben. Die Messung der Aktivität der γ – Sekretase erstreckte sich über 50 Messzyklen à 180 Sekunden mit einer Z – Position von 18 000 μm .

3.2.4 Ca^{2+} - Imaging

Um den zytosolischen Ca^{2+} - Haushalt zu untersuchen, wurde die Methode des Ca^{2+} - Imaging unter der Verwendung von Fura-2 angewandt. Fura-2 ist ein ratiometrischer Ca^{2+} – Chelator [159]. Nach der Bindung von Ca^{2+} kommt es demnach zu einer Verschiebung der Anregungswellenlänge [359]. So

lässt sich das Ca^{2+} - freie bei 380 nm und das Ca^{2+} - gebundene Fura-2 bei 340 nm anregen. Die Emission erfolgt jeweils bei 510 nm. Wenn sich die intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration ändert, verschiebt sich auch dementsprechend der Anteil des Ca^{2+} - freien bzw. – gebundenen Fura-2. Diese Änderung kann durch das Bilden der Ratio 340 nm/380 nm über die Zeit verfolgt werden. Da Fura-2 als ein fünffach geladenes Anion vorliegt, ist es aufgrund seiner Ladung und Polarität membranimpermeabel. Verestert mit fünf Acetoxymethylgruppen (AM) kann Fura-2-AM in seiner ungeladenen Form passiv durch die Membran diffundieren. Intrazellulär wird Fura-2-AM durch unspezifische Esterasen gespalten und kann nun wieder Ca^{2+} - Ionen binden. Da das intrazelluläre Fura-2-AM abgebaut wird, kommt es aufgrund des Konzentrationsgefälles dazu, dass weiteres Fura-2-AM in die Zelle diffundiert. Aufgrund der Unfähigkeit des geladenen Fura-2 die Membran zu passieren, akkumuliert dieses in der Zelle und liegt schließlich in ausreichender Konzentration in der Zelle vor [359].

Für die Messung des Ca^{2+} – Signals wurden die Zellen am Vortag auf die unbeschichteten Coverslips in 6 – Well – Platten ausgesät. Nach der Zugabe von Fura-2-AM direkt in das Zellkulturmedium mit einer finalen Konzentration von 1 μ M wurden die Zellen 25 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Messung erfolgte in einer speziellen Perfusionskammer, in die das Coverslip eingespannt wurde und die über einen Zulauf mit unterschiedlichen Lösungen durchgespült werden konnte, wohingegen die Spüllösung über einen separaten Ablauf direkt abgesaugt wurde. Um Veränderungen von $[Ca^{2+}]_i$ zu detektieren, wurden die Zellen alle 5 Sekunden sequentiell mit 340 nm und 380 nm über 10 – 20 ms angeregt.

Um den store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) zu untersuchen, wurde zunächst das basale, zytosolische Ca^{2+} - Signal in einer 2 mM Ca^{2+} – Ringerlösung ermittelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Thapsigargin (TG) gelöst in einer Ca^{2+} - freien Ringerlösung mit einer finalen Konzentration von 1 μ M. Thapsigargin ist ein pharmakologischer Inhibitor der SERCA-Pumpe (engl. Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase), der zu einer passiven Entleerung der ER (endoplasmatisches Retikulum) -Speicher führte und folglich einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ herbeiführte, was als ein TG-induzierter Peak zu sehen war (erster Peak, TG-Peak). Bei einer Subtraktion des höchsten Wertes und des letzten Wertes vor dem TG – Peak konnte Δ TG – Peak berechnet werden. Anschließend wurde die extrazelluläre Ca^{2+} - freie Lösung durch eine 2 mM Ca^{2+} - reiche Ringerlösung ersetzt. Hierbei kam es zu einem massiven Einstrom von Ca^{2+} ins Zytosol (zweiter Peak, SOCE). Dabei wurde die Differenz zwischen dem Mittelwert der letzten drei Werte vor dem SOCE und dem Maximalwert vom SOCE gebildet (Δ SOCE). Das nachfolgende Plateau, welches das Beseitigen von

Ca^{2+} - Ionen aus dem Zytosol in die intrazellulären Kompartimente, den Extrazellulärraum oder durch das Binden an bestimmte Pufferproteine widerspiegeln, wurde ebenfalls aus einer Differenz zwischen dem Mittelwert der letzten Werte vor dem SOCE und dem Mittelwert von etwa 5 Werten vom Ca^{2+} - Plateau berechnet.

Für die Durchführung von Ca^{2+} - Imaging wurde die Software – und die Hardware von Till Photonics (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) eingesetzt. So stammten die Messsoftware (Live Acquisition Software), die Auswertesoftware (Offline Analysis), die Lichtquelle (Polychrom V) und die Kontrolleinheit (Imaging Control Unit, ICU) von Till Photonics. Die Kamera (Clara) war von Andor Technology plc. (Belfast, UK). Das verwendete Mikroskop war Axio Observer A1 von Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, GER). Für die Aufnahmen wurde das 20 x Objektiv und das F76-521 Fura-2 HC – Filter von AHF Analysetechnik AG (Tübingen, GER) verwendet.

2 mM Ca^{2+} - Lösung:

dd H_2O
 pH 7,4, ~310 mosmol/l
 145 mM NaCl
 4 mM KCl
 10 mM Hepes, pH 7,4
 10 mM Glukose
 2 mM MgCl₂
 2 mM CaCl₂

0 mM Ca^{2+} - Lösung:

dd H_2O
 pH 7,4, ~310 mosmol/l
 145 mM NaCl
 4 mM KCl
 10 mM Hepes, pH 7,4
 10 mM Glukose
 2 mM MgCl₂
 1 mM EGTA

3.2.5 Statistische Methoden

Alle statistischen Auswertungen wurden mithilfe von Microsoft Excel und IBM SPSS Statistics 24. Version durchgeführt.

Die Signifikanz der Testergebnisse bei zwei Stichproben wurde bei einer Normalverteilung nach Shapiro – Wilk ($p > 0,05$) anhand des ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test berechnet. Wenn die Normalverteilung nicht gegeben war, wurde die Signifikanz mittels nicht – parametrischen Mann – Whitney U – Test bestimmt.

Beim Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen wurde mittels ANOVA (engl. analysis of variance) untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen, wobei ein Mittelwertvergleich erfolgte. Die Voraussetzung der Normalverteilung wurde ebenfalls anhand des Shapiro – Wilk Tests überprüft. Da die ANOVA z.T. sensibel gegenüber Ausreißern ist, wurde folglich

der Datensatz aus der Messung der Genexpression in humanen *post mortem* Hirnproben (4.4.1) nach Ausreißern analysiert (3.2.5.1). Die Varianzhomogenität war bei Levene – Test $p > 0,05$ gegeben. Der anschließende *post hoc* Tukey – HSD Test zeigte folglich die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen auf. Bei fehlender Varianzhomogenität nach Levene ($p < 0,05$) erfolgte die Berechnung der Welch – ANOVA mit anschließendem *post hoc* Games – Howell Test. Da einmalig die Untersuchung mittels ANOVA aufgrund der fehlenden Normalverteilung und bei starker Gruppengrößeninhomogenität keine signifikanten Unterschiede aufzeigen konnte, wurde der stabilere, nicht – parametrische Kruskal – Wallis Test durchgeführt. Um zu unterscheiden zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede bestanden, wurde der *post hoc* Dunn – Bonferroni Test berechnet.

Die Berechnung der Korrelation erfolgte bei einer gegebenen Normalverteilung mittels der Pearson – Korrelationsanalyse, wohingegen bei fehlender Normalverteilung der Koeffizient nach Spearman herangezogen wurde. Die Stärke der Korrelation wurde nach Cohen 1988 angegeben. Dies wurde wie folgt interpretiert: kleine Korrelation $r = 0,1 - 0,3$, moderate $r = 0,3 - 0,5$, große $r > 0,5$ [84]. Bei nominalskalierten Daten wurde die Korrelation anhand des Eta – Koeffizienten η berechnet. Bei der Untersuchung der Regression wurden die Modelle der einfachen und multiplen linearen Regressionsanalyse verwendet. Als Effektstärkemaß für die multiple lineare Regressionsanalyse wurde der Cohen f^2 berechnet. Dabei entsprach $f^2 = 0,02$ einem kleinen Effekt, $f^2 = 0,15$ einem mittleren und $f^2 = 0,35$ einem starken Effekt nach Cohen 1988/1992 [84,85].

Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ gesetzt, wobei p – Werte unterhalb des Signifikanzniveaus für eine statistische Signifikanz des Ergebnisses sprachen und die Nullhypothese ablehnten. Es wurde wie folgt angegeben: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.2.5.1 Analyse der Ausreißer aus der Messung der Genexpression in *post mortem* Hirnproben

Beim Analysieren der Datenreihe aus der Messung der Genexpression in *post mortem* Hirnproben von Amsterdam (4.4.1) stachen ein paar Werte extrem hervor. Um zu überprüfen, ob diese Extremwerte bei der weiteren Analyse ins Gewicht fallen würden, wurde eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Um die Ausreißer objektiv zu erfassen, wurde der Mittelwert +/- 3-facher Standardabweichung als Einschlusskriterium bestimmt. Dieser Bereich schließt Gauß'schen Verteilungskurve nach etwa 99 % aller Werte ein. Alle Werte, die außerhalb dieses Bereichs gelegen sind, wurden demnach ausgeschlossen. Im ersten Schritt wurden zwei Kohorten gebildet, wobei eine Kohorte aus Proben der an Alzheimer-Demenz erkrankten Probanden bestand (Braak-Stadien IV - VI, $n = 157$) und die zweite folglich die Kontrollkohorte der Probanden mit Stadien 0-III nach Braak bildete ($n = 71$). Hierzu wurden

der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der Standardfehler der Genexpression verglichen. Die Alzheimer-Kohorte wies beim Vergleich der Gruppe mit und der Gruppe ohne Ausreißer homogene Ergebnisse auf. Auch die anschließend durchgeführte Korrelationsanalyse und der Test auf Normalverteilung in Bezug zur Variable „Alter“ zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tab.14). Die Kontroll-Kohorte lieferte hingegen deutliche Unterschiede. Für die Gene ORAI2 und STIM2 zeigte die Gruppe mit Ausreißern verzerrte Mittelwerte und extreme Abweichungen. Für alle anderen Gene lag keine Veränderung vor (Tab.15).

Beim Umgang mit Extremwerten ist immer Vorsicht geboten. Zum einen können die echten Ausreißer die Ergebnisse stark verzerren und so zur falschen Interpretation führen, zum anderen dürfen Extremwerte aber nicht unüberlegt entfernt werden, da diese unter Umständen den wahren Wert der Grundgesamtheit widerspiegeln könnten (= echte Ausreißer). Anhand der Sensitivitätsanalyse konnten daher die Extremwerte sinnvoll aufgedeckt werden. Da diese aus biologischer Sicht nicht plausibel erscheinen, sich deutlich von allen anderen Werte abheben und die weiterführende Analyse deutlich verzerren, werden alle weiteren Analysen betreffend die Gene ORAI2 und STIM2 aus der Kontrollkohorte mit Ausreißer korrigierten Daten durchgeführt. In der Übersichtstabelle im Anhang sind die betroffenen Hirnproben für ORAI2 und STIM2 **gelb markiert**.

Tab. 14: Vergleich der Gruppen mit und ohne Ausreißer von AD-Kohorte

AD		Ausreißer	Cav B	Cav D	ORAI1	ORAI2	ORAI3	STIM1	STIM2	
mit	MW		317,48	261,15	143,47	1,33	492,69	791,67	2,88	
	STABW		233,14	209,41	171,59	2,99	632,16	497,88	4,68	
	SE		18,61	16,71	13,69	0,24	50,45	39,73	0,37	
	n		157	157	157	157	157	157	157	
	Normalverteilung		nein							
	Korrelation	Koeffizient		-0,259	-0,495	-0,229	-0,05	-0,172	-0,215	0,024
		Sig. (2-seitig)		0,001	<0,001	0,004	0,533	0,031	0,007	0,767
ohne	MW		297,45	240,75	134,05	0,98	435,46	720,00	2,37	
	STABW		184,20	147,47	150,51	1,66	528,88	345,43	3,38	
	SE		14,84	11,88	12,09	0,13	42,76	28,11	0,27	
	n		154	154	155	154	153	151	153	
	Normalverteilung		nein							
	Korrelation	Koeffizient		-0,252	-0,502	-0,225	-0,064	-0,183	-0,202	0,1
		Sig. (2-seitig)		0,002	<0,001	0,005	0,431	0,023	0,013	0,217

Tab. 15: Vergleich der Gruppen mit und ohne Ausreißer von Kontrollkohorte

non-AD									
Ausreißer		Cav B	Cav D	OAI1	OAI2	OAI3	STIM1	STIM2	
mit	MW	188,08	202,35	49,78	30661,49	190,94	531,98	206,89	
	STABW	134,62	153,25	100,01	258352,66	331,00	286,70	1732,76	
	SE	15,98	18,19	11,87	30660,82	39,28	34,02	205,64	
	n	71	71	71	71	71	71	71	
	Normalverteilung	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
	Korrelation	Koeffizient	-0,093	-0,249	-0,049	0,04	0,067	0,043	-0,025
		Sig. (2-seitig)	0,441	0,036	0,687	0,743	0,581	0,722	0,833
ohne	MW	173,76	193,07	38,74	0,67	160,44	500,12	1,25	
	STABW	106,14	132,78	37,00	1,93	210,05	217,28	2,42	
	SE	12,78	15,87	4,42	0,23	25,11	26,16	0,29	
	n	69	70	70	70	70	69	70	
	Normalverteilung	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
	Korrelation	Koeffizient	-0,055	-0,241	-0,028	0,006	0,092	0,081	-0,012
		Sig. (2-seitig)	0,654	0,044	0,818	0,961	0,448	0,507	0,924

4. ERGEBNISSE

4.1 EINFLUSS DER APP-PROZESSIERUNG AUF DIE Ca^{2+} - HOMÖOSTASE

4.1.1 Einfluss von Presenilin auf STIM und ORAI

4.1.1.1 Einfluss von Presenilin auf die Genexpression von STIM und ORAI

Presenilin bildet das katalytische Zentrum der γ -Sekretase, welche u.a. an der Prozessierung der APP-Proteinfamilie und somit an der Entstehung von A β beteiligt ist [95]. Um den Einfluss von Presenilin auf die Regulation von STIM und ORAI zu untersuchen, wurden Presenilin1/2 – defiziente embryonale Mausfibroblasten (MEF PS 1/2 -/-) [191] analysiert. Da PS1/2 – defiziente Mäuseembryonen bereits am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung sterben [105], wurden die MEF PS1/2 -/- aus Mausblastozysten am Tag 3,5 nach der Befruchtung präpariert. Durch das Fehlen von PS1/2 haben die embryonalen Mausfibroblasten keine proteolytisch funktionsfähige γ -Sekretase [191]. Dies ermöglicht u.U. Rückschlüsse auf die Funktion von Presenilin.

Zunächst wurde der Einfluss von Presenilin 1 in den Zelllinien MEF PS1/2 -/- und MEF PS1res [151] untersucht, wobei MEF PS1res als Kontrolle eingesetzt wurde. Um die klonale Heterogenität als Störeinfluss zu vermeiden, wurden MEF PS1/2 -/- mit PS1 retransfiziert (MEF PS1res). Die Genexpression (3.2.2.5) von ORAI1 in MEF PS1/2 -/- im Vergleich zu MEF PS1res sank signifikant auf $74,18 \% \pm 5,8$ ($p \leq 0,001$), von ORAI2 signifikant auf $55,32 \% \pm 3,1$ ($p \leq 0,001$), von ORAI3 signifikant auf $29,13 \% \pm 3$ ($p \leq 0,001$) sowie von STIM1 signifikant auf $51,43 \% \pm 4,35$ ($p \leq 0,001$), wohingegen die Genexpression von STIM2 auf $122,28 \% \pm 7,8$ ($p \leq 0,01$), STIM2.1 auf $184,22 \% \pm 16,7$ ($p \leq 0,001$) signifikant stieg. Für STIM2.2 konnte kein Unterschied zwischen MEF PS1res und MEF PS 1/2 -/- festgestellt werden $109,26 \% \pm 13$ ($p = 0,481$) (Abb.9).

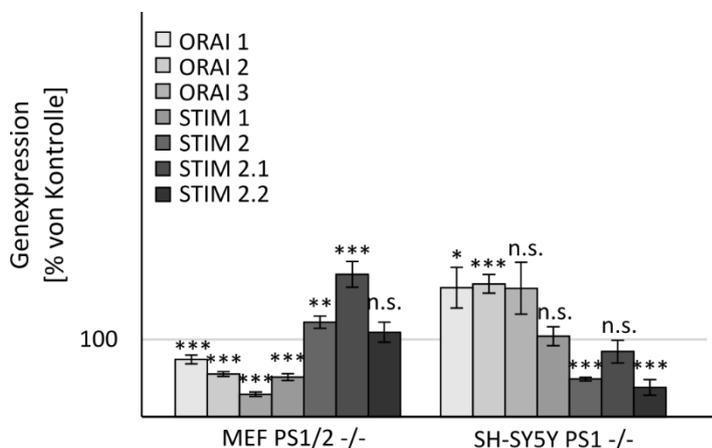


Abb. 9 Genexpression von STIM und ORAI in MEF PS1/2 -/- und SH-SY5Y PS1 -/-

Genexpression wurde mittels qRT-PCR quantitativ bestimmt. MEF PS1/2 -/- und MEF PS1res (= Kontrolle) je n=15, SH-SY5Y WT (mock) (= Kontrolle) n=8 und SH-SY5Y PS1 -/- je n=8, außer STIM2.1 n=7. n = Anzahl an Proben.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei MEF PS1/2 -/- bei fehlender Normalverteilung für ORAI2, STIM1, STIM2.2 mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt, für alle anderen Gene mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant).

Um die Ergebnisse in humaner Spezies zu verifizieren, erfolgte die Analyse der Genexpression in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y mit einer stabilen Elimination von PS1 (SH-SY5Y PS1 -/-). Als Kontrolle wurde SH-SY5Y WT (mock) verwendet. Die Genexpression in SH-SY5Y PS1 -/- stieg nun signifikant entgegen Erwarten von ORAI1 auf $167,1 \% \pm 26,4$ ($p = 0,023$), ORAI2 auf $171,9 \% \pm 12,1$ ($p \leq 0,001$), ORAI3 nicht signifikant auf $166,3 \% \pm 33,5$ ($p = 0,068$) sowie STIM1 ebenfalls nicht signifikant auf $104,2 \% \pm 12,2$ ($p = 0,734$), wohingegen die Genexpression von STIM2 signifikant auf $48,9 \% \pm 2,5$ ($p \leq 0,001$), STIM2.1 nicht signifikant auf $84,5 \% \pm 14,6$ ($p = 0,329$) und STIM2.2 signifikant auf $38,2 \% \pm 10$ ($p \leq 0,001$) sank (Abb.9).

Da die jeweiligen Zelllinien unterschiedlichen Gewebearten entstammen, könnte das die inhomogenen Ergebnisse partiell erklären. Zum anderen werden hierbei von Grund auf zwei unterschiedliche Modelle miteinander verglichen. Vereinfacht gesagt, handelt es sich bei den embryonalen Mausfibroblasten MEF PS1res um eine Zelllinie, bei der zuerst Presenilin 1 und 2 ausgeknockt wurden, um im nächsten Schritt diese mit Presenilin 1 zu retransfizieren, wodurch sowohl in MEF PS1/2 -/- als auch in MEF PS1res Presenilin 2 fehlt. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Funktionalität von PS1. Bei humanen Neuroblastom-Zellen hingegen handelt es sich um eine Wildtyp-Zelllinie, bei der nur Presenilin1 ausgeschaltet wurde, wobei sowohl SH-SY5Y WT (mock) als auch SH-SY5Y PS1 -/- ein intaktes Presenilin 2 haben. Ergänzend kommt hinzu, dass die Zelllinien zwei unterschiedlichen Spezies angehören. Möglicherweise beeinflussen die unterschiedlichen Verfahren, mit denen der Genknockout erreicht werden konnte, den beobachteten Unterschied.

4.1.1.2 Einfluss von Presenilin auf Ca^{2+} - Signal

Der Einfluss von Presenilin auf das zytosolische Calciumsignal wurde mittels Ca^{2+} - Imaging mit Fura2-AM untersucht (3.2.4). Der store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) wird von STIM und ORAI vermittelt. Zunächst wurden die Zellen mit Thapsigargin (TG), einem pharmakologischen Inhibitor der SERCA-Pumpe (engl. sarcoplasmic/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase), behandelt, wobei das extrazelluläre Milieu Ca^{2+} -frei gehalten wurde. Im Zuge dieser Behandlung kam es zu einer passiven Entleerung der ER-Speicher und einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$, was in Abb. 10A als ein TG-induzierter Peak zu sehen ist (erster Peak, TG-Peak). Als Folge der ER-Speicherentleerung kam es zur Aktivierung und Aggregation von STIM an ER-PM-Junktionsstellen sowie Interaktion mit ORAI und somit zur Bildung eines aktivierten SOCE-Kanals. Bei Anstieg der extrazellulären $[Ca^{2+}]_o$ erfolgte ein massiver Einstrom von Ca^{2+} ins Zytosol, was als zweiter Peak in Abb. 10A interpretiert wurde (SOCE). Das anschließende Plateau spiegelte das Wiederauffüllen von ER-Speicher bzw. den Transport von Ca^{2+} in den EZR aufgetragen gegen die Zeit wider, weswegen das zytosolische Ca^{2+} - Signal langsam abnahm. Um zu

differenzieren, welchen Einfluss Presenilin 1 bzw. 2 auf das Ca^{2+} -Signal hat, wurden MEF PS1/2 -/- als Kontrolle determiniert und mit MEF PS1res bzw. MEF PS2res [151] verglichen (Abb.10A).

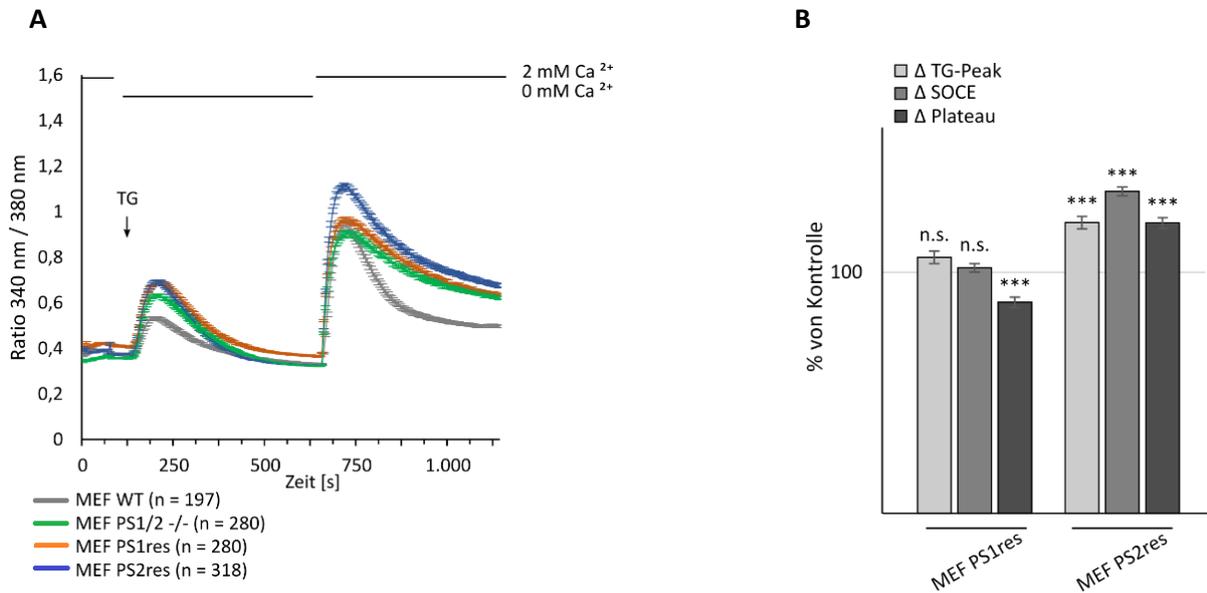


Abb. 10: Einfluss von Presenilin auf Ca^{2+} -Signal in MEF-Zelllinien

A: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Ca^{2+} -Imaging in unterschiedlichen MEF – Zelllinien. Dargestellt ist der Verlauf der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ über die Zeit. Für jede Versuchsreihe wurden 3 unabhängige Messungen durchgeführt. **B:** Quantitative Auswertung des zeitlichen Verlaufs der $[Ca^{2+}]_i$ aus A unter Berücksichtigung von TG – Peak, SOCE – Peak und Plateau. MEF PS1/2 -/- wurden als Kontrolle verwendet, wobei folglich alle Ergebnisse in Relation gesetzt wurden. Alle Angaben sind demnach in % von Kontrolle zu betrachten. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student’s t-Test berechnet (***) $p \leq 0,001$, n.s. = nicht). TG = Thapsigargin, SOCE = store operated Ca^{2+} -entry, n = Anzahl an Zellen.

Zunächst wurde gemessen, ob sich das Ca^{2+} -Signal in MEF PS1/2 -/- gegenüber MEF WT unterscheidet. Sowohl der Δ TG – Peak ($166,15 \% \pm 3,6$) als auch das Δ Plateau ($177,34 \% \pm 4,1$) waren in MEF PS 1/2 -/- signifikant ($p \leq 0,001$) erhöht.

Im Gegensatz zu MEF PS2res, in dem das Ca^{2+} -Signal insgesamt erhöht war, zeigte MEF PS1res keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Δ TG – Peaks ($106,22 \% \pm 2,6$, $p = 0,067$) und des SOCE - Peaks ($101,91 \% \pm 1,8$, $p = 0,467$) im Vergleich zu MEF PS1/2 -/-, welche als Kontrolle eingesetzt wurden. Im Vergleich zur Kontrolle ließ sich in MEF PS2res eine signifikant erhöhte Menge an Ca^{2+} aus dem ER freisetzen (Δ TG – Peak $120,61 \% \pm 2,5$, $p \leq 0,001$). Sowohl der SOCE - Peak in MEF PS2res verglichen zu MEF PS1/2 -/- ($133,53 \% \pm 1,8$, $p \leq 0,001$) als auch das Plateau ($120,43 \% \pm 2,3$, $p \leq 0,001$) zeigten ein signifikant erhöhtes Ca^{2+} -Signal an. Im Gegensatz dazu sank das Plateau in MEF PS1res verglichen zu MEF PS1/2 -/- signifikant auf $87,6 \% \pm 2,1$ ($p < 0,001$) (Abb. 10B).

4.1.2 Einfluss von Presenilin auf VGCC

Der Einfluss von Presenilin auf die Genexpression von CavB, CavD und CavG wurde in SH-SY5Y PS1 $-/-$ untersucht. Als Kontrolle wurden SH-SY5Y WT (mock) verwendet. Es zeigte sich eine hoch signifikante ($p \leq 0,001$) Steigerung der Genexpression von CavB auf $213,2 \% \pm 26,9$ und von CavG auf $854,9 \% \pm 297,6$. Die Genexpression von CavD stieg nicht signifikant um $3,9 \% \pm 8,9$ ($p = 0,667$) (Abb.11).

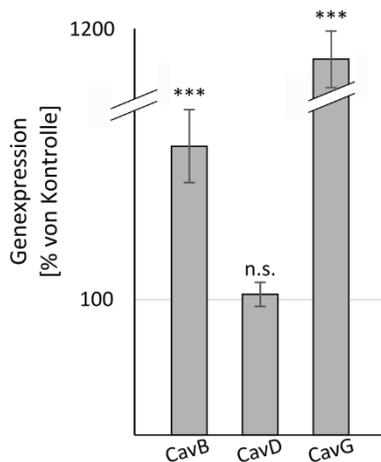


Abb. 11: Genexpression von CavB, CavD und CavG in SH-SY5Y PS1 $-/-$ Genexpression wurde mittels qRT-PCR quantitativ bestimmt. SH-SY5Y WT (mock) (= Kontrolle) und SH-SY5Y PS1 $-/-$ je $n = 11$. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung für CavB und CavG mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt, für CavD mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test (** $p \leq 0,001$). n = Anzahl an Proben.

4.1.3 Einfluss der APP-Proteinfamilie auf STIM und ORAI

Die APP-Proteinfamilie zählt zu den zahlreichen Substraten, die durch den γ -Sekretase-Komplex prozessiert wird [189]. Um zu untersuchen, ob APP, seine Prozessierungsprodukte sowie die homologen Proteine APLP1 und APLP2 einen Einfluss auf die STIM-ORAI - Signalkaskade ausüben, wurden APP/APLP2-defizienten Mausfibroblasten (MEF APP/APLP2 $-/-$, [184]) sowie APP- bzw. APLP2-defizienten MEF (MEF APP $-/-$ bzw. MEF APLP2 $-/-$) mit MEF WT verglichen. Da die Genexpression von APLP1 auf neuronale Zellen beschränkt ist [294], sind alle Mitglieder der APP-Proteinfamilie in MEF APP/APLP2 $-/-$ bzw. jeweils zwei in MEF APP $-/-$ und MEF APLP2 $-/-$ ausgeknockt. In diesen Zelllinien wurden die Genexpression (3.2.2.5) und die intrazelluläre Calciumkonzentration mittels Ca^{2+} - Imaging (3.2.4) bestimmt.

4.1.3.1 Einfluss der APP-Proteinfamilie auf die Genexpression von STIM und ORAI

Um den Einfluss von APP bzw. seinen homologen Proteinen APLP1 und APLP2 auf die Genexpression zu untersuchen, wurden wie oben erwähnt MEF APP/APLP2 $-/-$ mit MEF WT verglichen. Dabei konnte eine signifikante Steigerung der Genexpression von ORAI1, 2 und 3 (ORAI1: $193 \% \pm 7$, $p \leq 0,001$; ORAI2: $122,6 \% \pm 9,4$, $p = 0,028$; ORAI3: $205,7 \% \pm 11,2$, $p \leq 0,001$) sowie von STIM1 ($219,3 \% \pm 5,9$, $p \leq 0,001$)

und STIM2 (112,5 % ± 5,9, p = 0,049) verzeichnet werden. Die Genexpression der Spleißvariante STIM2.1 sank hingegen signifikant auf 88,4 % ± 3,8 (p = 0,007) und blieb von STIM2.2 unverändert (91,7 % ± 4,4, p = 0,075) (Abb.12).

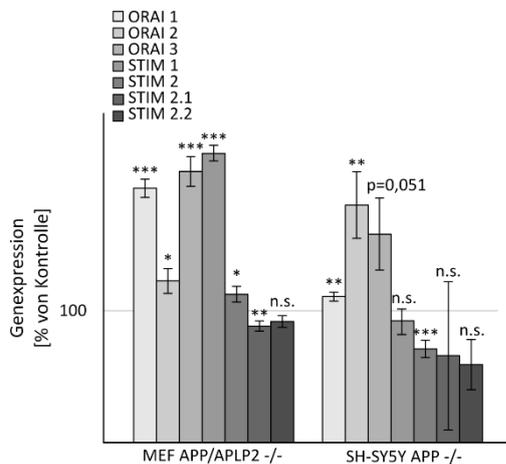


Abb. 12: Genexpression von STIM und ORAI in MEF APP/APLP2 -/- und SH-SY5Y APP -/-

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. MEF WT (= Kontrolle) und MEF APP/APLP2 -/- je n=10, SH-SY5Y WT (mock) (= Kontrolle) n=8 und SH-SY5Y APP -/- je n=8, außer STIM2.1 n=4 und STIM2.2 n=7.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung in SH-SY5Y APP -/- für STIM2.1 mittels Mann-Whitney-U Test, für alle anderen Gene mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test bestimmt (*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, n.s. = nicht signifikant). n = Anzahl an Proben.

Die Genexpression in SH-SY5Y APP -/- verglichen zu SH-SY5Y WT (mock) stieg signifikant für ORAI1 auf 110,7 % ± 3,4 (p ≤ 0,01) und ORAI2 auf 180,2 % ± 25,3 (p ≤ 0,01), wobei die Genexpression von ORAI3 eine knapp nicht signifikante Steigerung auf 158,2 % ± 27,2 (p = 0,051) erfuhr. Die Genexpression sank dagegen signifikant von STIM2 auf 70,9 % ± 6,6 (p ≤ 0,001) und nicht signifikant von STIM1 auf 92,3 % ± 9,9 (p = 0,452), STIM2.1 auf 65,8 % ± 56,3 (p = 0,586) und STIM2.2 auf 59,1 ± 19 (p = 0,075) (Abb.12).

4.1.4 Einfluss der APP-Proteinfamilie auf VGCC

Des Weiteren wurde die Genexpression von CavB, CavD und CavG in SH-SY5Y - Zelllinien untersucht. Hierfür wurden folgende Modelle verwendet: SH-SY5Y WT (mock) als Kontrolle zu SH-SY5Y APP -/- sowie SH-SY5Y WT [396] als Kontrolle zu SH-SY5Y APP^{swe}. Bei SH-SY5Y APP^{swe} handelt es sich um eine humane Neuroblastoma - Zelllinie mit einer Doppelmutation (K595N/M596L bei APP⁶⁹⁵, K670N/M671L bei APP⁷⁷⁰) von APP im Exon 16 direkt vor der β-Sekretaseschnittstelle, die ursprünglich in zwei Familien in Schweden entdeckt wurde und einem autosomal dominantem Erbgang folgt (familial Alzheimer's disease, FAD) [81,171,333]. Als Folge führt diese Mutation zu einer 3 - bis 8-fach gesteigerten Aβ Produktion [81,82,226,411].

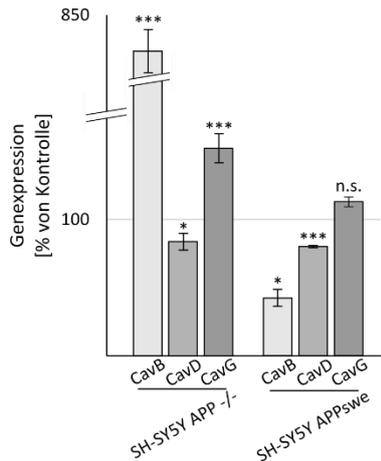


Abb. 13: Genexpression von CavB, CavD und CavG in SH-SY5Y APP -/- und SH-SY5Y APPswe

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. SH-SY5Y WT (mock) (= Kontrolle) und SH-SY5Y APP -/- je n=11, SH-SY5Y WT (= Kontrolle) und SH-SY5Y APPswe je n=3.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung in SH-SY5Y APP -/- für CavB und in SH-SY5Y APPswe für CavG mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt, für alle anderen Gene wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test berechnet (*p≤0,05, ***p≤0,001, n.s. = nicht signifikant). n = Anzahl an Proben.

Die Genexpression in SH-SY5Y APP -/- verglichen zu SH-SY5Y WT (mock) stieg signifikant für CavB auf 591,4 % ± 211,8 (p = 0,031) und CavG auf 152,2 % ± 10,7 (p ≤ 0,001), wobei die Genexpression von CavD auf 83,7 % ± 6,1 (p = 0,014) sank (Abb.13).

In der Zelllinie SH-SY5Y APPswe sank die Genexpression von CavB signifikant auf 43 % ± 13,3 (p = 0,013) und von CavD auf 81,4 % ± 1,9 (p ≤ 0,001). Für CavG konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (114,4 % ± 7,8; p = 0,139) (Abb.13).

4.1.5 Einfluss von AICD auf STIM und ORAI

4.1.5.1 Einfluss des APP C-Terminus auf STIM und ORAI

Es stellte sich die Frage, ob APP selbst oder seine Prozessierungsprodukte die Veränderungen der Genexpression verursachten. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) gelegt, da gezeigt werden konnte, dass AICD an der Genregulation verschiedener Gene beteiligt ist [5,16,155,358,477].

Der Einfluss von APP C-Terminus wurde in MEF APPΔCT15 [184,389] untersucht. Durch das Fehlen der letzten 15 AS kommt es zum Verlust der wichtigen GYENPTY – Sequenz, wodurch nicht nur die APP – Endozytose und folglich die APP - Prozessierung, sondern auch die Bildung des AICD – Fe65 – Tip60 – Komplexes beeinträchtigt ist, wodurch AICD ihre Funktion in der Signalkaskade einbüßt [56,390,458,467]. Als Kontrolle wurde MEF WT verwendet. Sowohl ORAI1 (588,5 % ± 137,7, p ≤ 0,001), als auch ORAI2 (275,7 % ± 39,9, p ≤ 0,001), ORAI3 (137,3 % ± 11,1, p = 0,003), STIM1 (270,4 % ± 20,3, p ≤ 0,001) und STIM2 (125,7 % ± 6,2, p ≤ 0,001) erfuhren eine signifikante Steigerung in MEF APPΔCT15. Die Genexpression von STIM2.1 (108,8 % ± 4,7, p = 0,075) und STIM2.2 (98,6 % ± 4,6, p = 0,767) zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied (Abb.14).

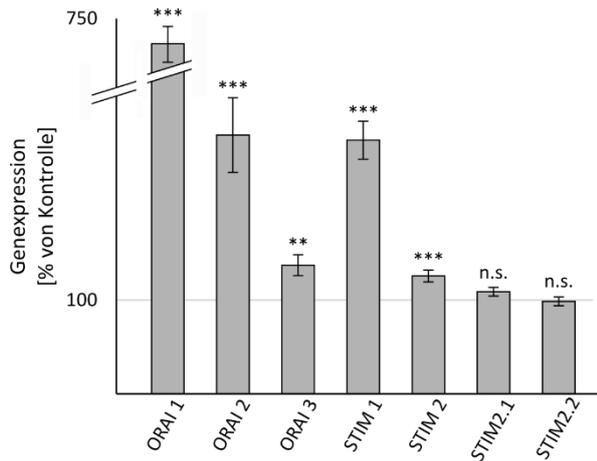


Abb. 14: Genexpression von STIM und ORAI in MEF APPΔCT15

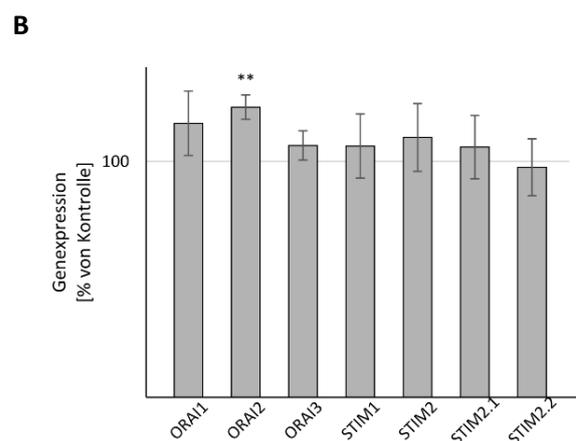
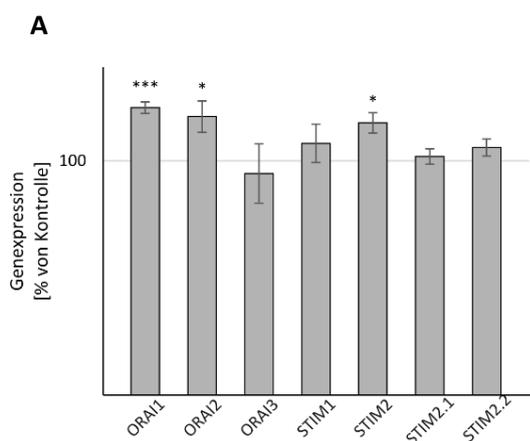
Genexpression wurde mittels qRT-PCR quantitativ bestimmt. MEF WT (= Kontrolle) und MEF APPΔCT15 je n = 10.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung für ORAI1, ORAI2 und STIM1 mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt, für die restlichen Gene wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test verwendet (**p≤0,01, ***p≤0,001, n.s. = nicht signifikant). n = Anzahl an Proben.

4.1.5.2 Einfluss der AICD - Supplementierung auf STIM und ORAI

Um zu untersuchen ob und welchen Einfluss AICD auf die Genregulation von STIM - und ORAI - Proteinen hat, wurden MEF APP/APLP2 -/- mit einem synthetischen AICD – Peptid inkubiert. Wenn AICD an der Genregulation involviert ist, wäre bei einer Supplementierung von AICD in APP/APLP2 – defiziente Zellen eine Veränderung der Genexpression mit Tendenz Richtung MEF WT zu erwarten. Zur Kontrolle wurde ausschließlich Saint PhD und anstelle von AICD die gleiche Menge H₂O auf die MEF APP/APLP2 -/- verabreicht (= Leerkontrolle).

Die Inkubation erfolgte wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben. Um die bestmögliche Dauer der AICD-Inkubation zu ermitteln, wurden die Zellen 3, 6 und 12 Stunden mit AICD inkubiert. Die im Anschluss daran durchgeführte qRT-PCR (3.2.2.5) erbrachte die in Abb.15 zusammengestellten Ergebnisse. Abb.15 D stellt die Zusammenfassung der Daten von allen drei Zeitpunkten dar.



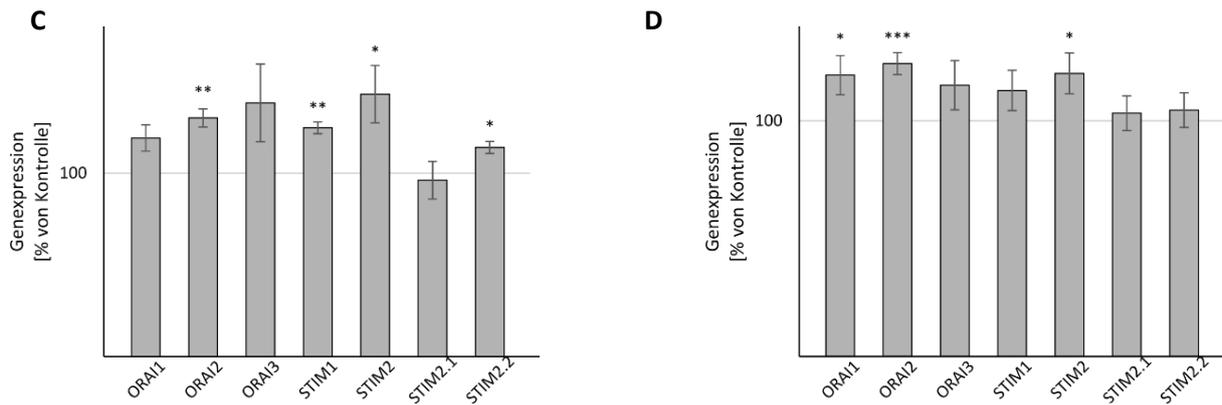


Abb. 15: Genexpression von STIM und ORAI in MEF APP/APLP2 -/- nach AICD-Inkubation

Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR quantitativ bestimmt. Die Inkubation mit AICD – Peptid von MEF APP/APLP2 -/- erfolgte über 3, 6 und 12 Stunden mittels Saint PhD (3.2.1.3). Als Kontrolle wurden MEF APP/APLP2 -/- mit *ddH₂O* statt AICD inkubiert. **A:** Inkubationszeit 3 Stunden, n = 3. **B:** Inkubationszeit 6 Stunden, n = 6. **C:** Inkubationszeit 12 Stunden, n = 3. **D:** Daten aus allen Experimenten, n = 12.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test bestimmt (*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001). n = Anzahl an Proben.

Die ersten Auswirkungen von AICD auf die Genexpression von ORAI1, ORAI2 und STIM2 traten bereits nach einer dreistündigen Inkubation auf, wobei die Genexpression von ORAI1 auf 122,74 % ± 2,4 (p ≤ 0,001), ORAI2 auf 118,88 % ± 6,7 (p = 0,048) und von STIM2 auf 116,24 % ± 4,4 (p = 0,02) signifikant stieg (Abb. 15A). Während die doppelte Inkubationszeit (6 Stunden) nur noch Veränderungen von ORAI2 (123,1 % ± 5,1, p = 0,001) aufzeigen konnte (Abb. 15B), erfuhr die Genexpression von ORAI2 (130,17 % ± 4,9, p = 0,004), STIM1 (124,77 % ± 3,25, p = 0,001), STIM2 (143,1 % ± 15,6, p = 0,051) und STIM2.2 (114,03 % ± 3,2, p = 0,012) nach 12 Stunden signifikante Veränderungen (Abb. 15C). Die Ergebnisse aus der gesamten Zeitreihe zusammenfassend kristallisierte sich eine signifikante Steigerung von ORAI1 auf 119,37 % ± 8,3 (p = 0,029), von ORAI2 auf 124,27 % ± 4,6 (p ≤ 0,001) und von STIM2 auf 120,15 % ± 8,6 (p = 0,029) heraus (Abb. 15D).

Verglichen zu MEF WT steigt die Genexpression in MEF APP/APLP2 -/- nach einer AICD – Inkubation von ORAI1 signifikant auf 266,59 % ± 18,5 (p ≤ 0,001), von ORAI3 auf 144,47 % ± 13,1 (p = 0,006), STIM1 auf 214,4 % ± 16,25 (p ≤ 0,001), STIM2 auf 145,61 % ± 10,4 (p = 0,001), STIM2.1 auf 163,05 % ± 11,6 (p ≤ 0,001) und von STIM2.2 auf 130,77 % ± 9,2 (p = 0,006). In Bezug auf die Genexpression von ORAI2 konnte kein Unterschied festgestellt werden (105,22 % ± 3,9, p = 0,212) (Abb.16, Tab. 16, Tab. 17). Um zu überprüfen, inwiefern der Effekt ausschließlich auf den Einfluss von AICD zurückzuführen und nicht z.B. durch die Zytotoxizität des Transfektionsreagenz bedingt wäre, wurde die Genexpression in der MEF APP/APLP2 -/- - Leerkontrolle verglichen zu MEF WT der Genexpression in MEF APP/APLP2 -/- verglichen zu MEF WT gegenübergestellt. Es sollten keine Unterschiede feststellbar sein, demnach

dürfte das Signifikanzniveau nicht erreicht werden, was der Annahme der Nullhypothese entsprechen würde. Dem entsprach nur die Genexpression von ORAI1 ($232,9 \% \pm 20,7 \rightarrow 193,0 \% \pm 7, p = 0,09$) und STIM2 ($123,2 \% \pm 6,7 \rightarrow 112,5 \% \pm 5,9, p = 0,248$) (vgl. Abb. 16, Tab. 16, Tab. 17). Allerdings war die Genexpression von ORAI1 ($266,6 \% \pm 18,5 \rightarrow 232,9 \% \pm 20,7, p = 0,238$) und STIM2 ($145,6 \% \pm 10,4 \rightarrow 123,2 \pm 6,7, p = 0,085$) in MEF APP/APLP2 $-/-$ nach einer AICD – Inkubation verglichen zu MEF WT nicht signifikant verändert gegenüber der Genexpression in MEF APP/APLP2 $-/-$ - Leerkontrolle verglichen zu MEF WT (vgl. Abb. 16, Tab. 16, Tab. 17).

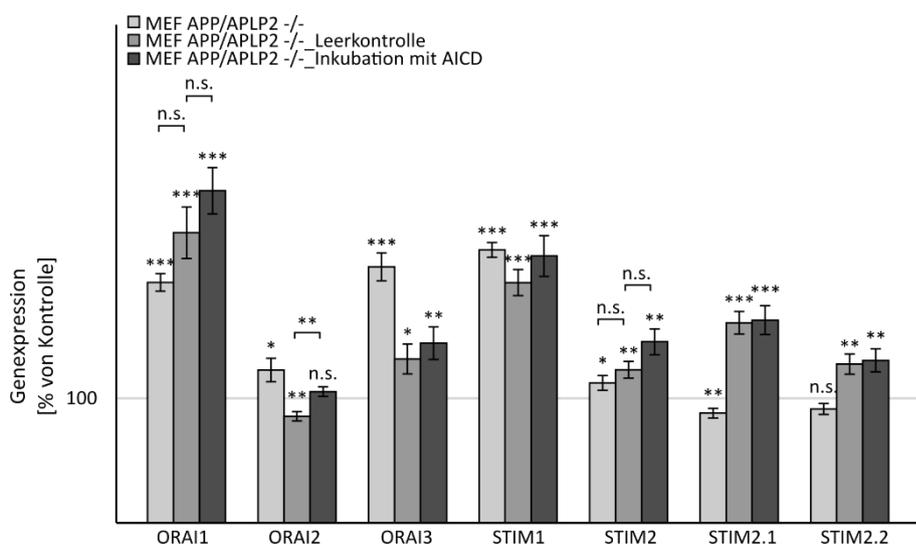


Abb. 16: Genexpression von STIM und ORAI in MEF APP/APLP2 $-/-$, MEF APP/APLP2 $-/-$ nach AICD-Inkubation und MEF APP/APLP2 $-/-$ - Leerkontrolle verglichen zu MEF WT

Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR quantitativ bestimmt. Die Inkubation mit AICD – Peptid erfolgt mittels Saint Phd. Die Balken stellen die mittlere Genexpression in MEF APP/APLP2 $-/-$ unbehandelt, nach einer Inkubation mit AICD – Peptid oder mit reinem Saint Phd als Leerkontrolle dar. Die Angaben sind in Prozent von MEF WT als Kontrolle zu betrachten. Die Leerkontrolle erhielt reines Saint Phd und anstatt AICD die gleiche Menge H_2O . Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test bestimmt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s. = nicht signifikant). Da keine Normalverteilung für STIM2.2 in der Leerkontrolle vorlag, wurde die Signifikanz mittels Mann Whitney U – Test bestimmt. MW = Mittelwert, n = Anzahl an Proben.

Aus Abb. 16 geht jedoch hervor, AICD greife möglicherweise in die Regulation von ORAI2 ein. Nach der AICD – Inkubation auf MEF APP/APLP2 $-/-$ verglichen zu MEF WT steigt die Genexpression von ORAI2 signifikant ($p = 0,001$) von $85,58 \% \pm 3,7$ (= Leerkontrolle vs. MEF WT) auf $105,22 \% \pm 3,9$ (Abb. 16, Tab. 17) und nähert sich somit MEF WT. Da allerdings die Genexpression von ORAI2 in MEF APP/APLP2 $-/-$ - Leerkontrolle verglichen zu MEF WT eine Reduktion erfährt (Abb. 16, Tab. 17), widerspricht dies demnach der Genexpression in unbehandelten MEF APP/APLP2 $-/-$ verglichen zu MEF WT (vgl. 4.1.3.1).

Somit kann die Qualität des AICD – Einflusses auf die Genregulation von ORAI2 nicht vorhergesagt werden. Es ist nur eine Tendenz Richtung MEF WT zu verzeichnen.

Tab. 16: Übersicht über die Genexpression von ORAI 1-3 in unterschiedlich konditionierten MEF APP/APLP2 -/-

		ORAI 1		ORAI 2		ORAI 3
MEF APP/APLP2 -/-	MW ± SE [%] (n) Signifikanz		193 ± 7 (10) p ≤ 0,001		122,6 ± 9,4 (10) p = 0,028	205,7 ± 11,2 (10) p ≤ 0,001
MEF APP/APLP2 -/- _Leerkontrolle		p = 0,238 {	232,9 ± 20,7 (12) p ≤ 0,001	p = 0,001 {	85,6 ± 3,7 (12) p = 0,002	131,9 ± 12,1 (12) p = 0,023
MEF APP/APLP2 -/- _AICD			266,6 ± 18,5 (12) p ≤ 0,001		105,2 ± 3,9 (12) p = 0,212	144,5 ± 13,1 (12) p = 0,006

MW = Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl, Angaben in Prozent von MEF WT als Kontrolle. Signifikanz nach ungepaartem, zweiseitigem Student' s t-Test berechnet.

Tab. 17: Übersicht über die Genexpression von STIM1, STIM2, STIM2.1 und STIM2.2 in unterschiedlich konditionierten MEF APP/APLP2 -/-

		STIM 1	STIM 2		STIM 2.1	STIM 2.2	
MEF APP/APLP2 -/-	MW ± SE [%] (n) Signifikanz	219,4 ± 5,9 (10) p ≤ 0,001		112,5 ± 5,9 (10) p = 0,05	88,4 ± 3,8 (10) p = 0,007	91,7 ± 4,4 (10) p = 0,075	
MEF APP/APLP2 -/- _Leerkontrolle		p = 0,085 {	193,1 ± 10,5 (12) p ≤ 0,001	p = 0,005	123,1 ± 6,7 (12) p ≤ 0,001	160,8 ± 9 (12) p ≤ 0,001	127,7 ± 8,1 (12) p ≤ 0,001
MEF APP/APLP2 -/- _AICD			214,4 ± 16,2 (12) p ≤ 0,001		145,6 ± 10,4 (12) p = 0,001	163 ± 11,6 (12) p ≤ 0,001	130,8 ± 9,2 (12) p = 0,006

MW = Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl, Angaben in Prozent von MEF WT als Kontrolle. Die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student' s t-Test, außer für STIM2.2 der Leerkontrolle mit Mann Whitney U – Test berechnet.

4.1.6 Einfluss von APP und APP - Prozessierungsprodukten auf das Ca^{2+} - Signal

Um den Einfluss von APP und seinen Prozessierungsprodukten auf das Ca^{2+} - Signal zu quantifizieren, wurden MEF WT als Kontrolle verglichen mit MEF APP/APLP2 -/-, MEF APP -/-, MEF APLP2 -/- und MEF APPΔCT15 mittels Ca^{2+} - Imaging (3.2.4) untersucht. Während der ΔTG – Peak in MEF APP -/- auf 128,27 % ± 4,5, (p ≤ 0,001) und MEF APP/APLP2 -/- auf 125,05 % ± 5,3 (p ≤ 0,001) signifikant anstieg,

wurde dieser in MEF APLP2 $-/-$ auf $79,17\% \pm 3,6$ ($p \leq 0,01$) sowie MEF APP Δ CT15 auf $69,44\% \pm 2,9$ ($p \leq 0,01$) signifikant reduziert. Während der SOCE in MEF APP $-/-$ auf $61,29\% \pm 2,8$ ($p \leq 0,01$) und MEF APLP2 $-/-$ auf $41,15\% \pm 1,5$ ($p \leq 0,01$) signifikant reduziert war, konnte in MEF APP/APLP2 $-/-$ ($128,07\% \pm 3$, ($p \leq 0,01$)) und MEF APP Δ CT15 ($123,03\% \pm 3,2$, ($p \leq 0,01$)) eine signifikante Potenzierung von SOCE gemessen werden. Das Δ Plateau, welches die Normalisierung der $[Ca^{2+}]_i$ verkörpert, war sowohl in MEF APP $-/-$ auf $130,29\% \pm 5,4$ ($p \leq 0,01$), als auch in MEF APP/APLP2 $-/-$ auf $283,45\% \pm 8$ ($p \leq 0,01$) und MEF APP Δ CT15 auf $237,1\% \pm 6,6$ ($p \leq 0,01$) signifikant im Vergleich zu MEF WT angehoben. Die Ausnahme bildete MEF APLP2 $-/-$ mit einer signifikanten Reduktion auf $62,95\% \pm 2,3$ ($p \leq 0,01$) (Abb.17).

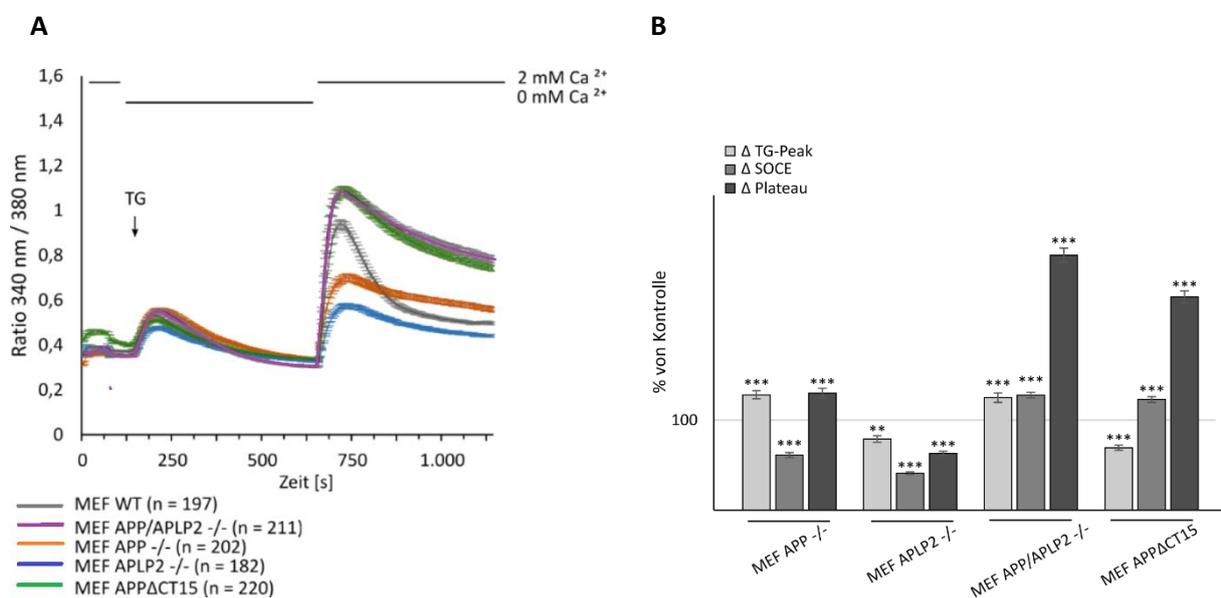


Abb. 17: Einfluss von APP-Prozessierungsprodukten auf Ca^{2+} - Signal in MEF-Zelllinien

A: Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Ca^{2+} - Imaging in unterschiedlichen MEF – Zelllinien. Dargestellt ist der Verlauf der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ über die Zeit. Für jede Versuchsreihe wurden 3 unabhängige Messungen durchgeführt. **B:** Quantitative Auswertung des zeitlichen Verlaufs der $[Ca^{2+}]_i$ aus A unter Berücksichtigung von TG – Peak, SOCE – Peak und Plateau. MEF WT wurden als Kontrolle verwendet. Alle Angaben sind als [%] – Anteil von MEF WT zu sehen.

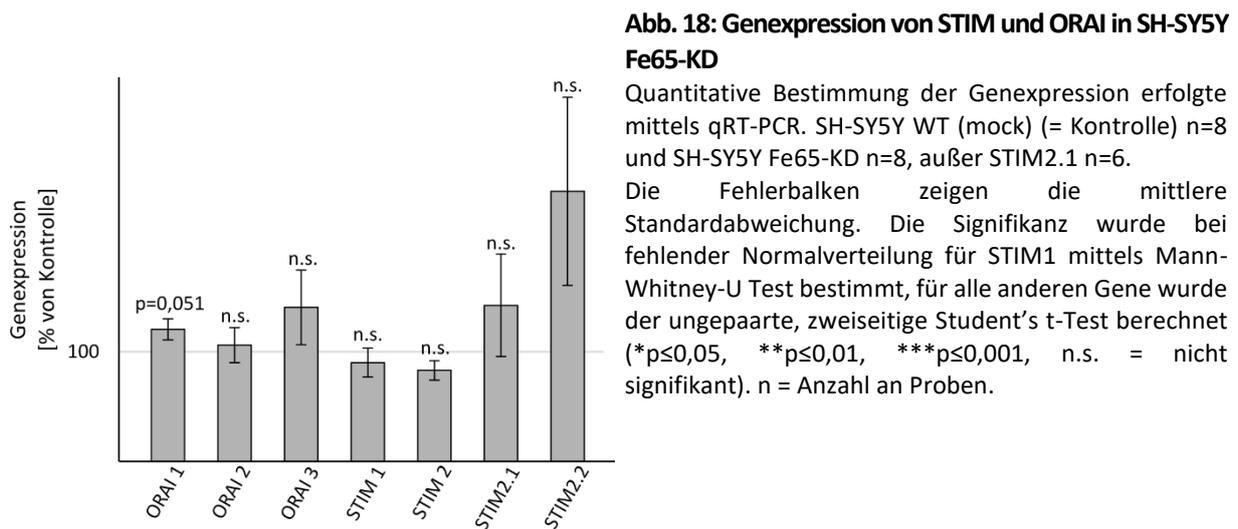
Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$), außer in MEF APLP2 $-/-$ für Δ TG-Peak wurde bei fehlender Normalverteilung Mann-Whitney-U Test bestimmt. TG = Thapsigargin, SOCE = store operated Ca^{2+} - entry, n = Anzahl an Zellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ICD – Moleküle von APP und APLP2 einen Einfluss auf die Ca^{2+} - Homöostase ausüben, denn sowohl ICD – defiziente Zellen als auch die Zelllinie mit einem funktionslosen AICD zeigen signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrolle MEF WT.

4.1.7 Einfluss von Fe65 auf STIM und ORAI

Fe65 ist ein Bestandteil vom sogenannten AFT - Komplex und soll an der Translokation von AICD in den Nukleus beteiligt sein, wo AICD mit Tip60 eine Verbindung eingeht und genregulatorische Eigenschaften entfaltet [56]. Aufgrund der kontroversen Literaturlage war es an dieser Stelle wichtig, den Einfluss von Fe65 genauer zu differenzieren.

Die Untersuchung der Genexpression erfolgte in SH-SY5Y Fe65-KD, einer Zelllinie, in der mithilfe von Fe65-shRNS die Genexpression von Fe65 runterreguliert wurde. Als Kontrolle wurde SH-SY5Y WT (mock) eingesetzt. Die Genexpression aller ORAI-Genen (ORAI1: 120,3 % \pm 9,5, $p = 0,051$; ORAI2: 106 % \pm 16, $p = 0,712$, ORAI3: 140,5 % \pm 34, $p = 0,254$) sowie STIM2.1 (142,3 % \pm 46,7, $p = 0,407$) und STIM2.2 (246,1 % \pm 85,7, $p = 0,110$) war nicht signifikant gesteigert, während sie für STIM2 (82,9 % \pm 8,8, $p = 0,072$) ebenfalls nicht signifikant sank. Anzumerken ist der steigende Trend der Genexpression von ORAI1, die knapp über dem Signifikanzniveau lag.



Da keine Normalverteilung für STIM1 gegeben war, wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt. Dies ergab keine signifikante Reduktion der Genexpression von STIM1 (90,1 \pm 13,2), trotz des hoch signifikanten ungepaarten Student's t-Test ($p \leq 0,001$) (Abb.18).

4.1.8 Einfluss von Fe65 auf VGCC

Schließlich wurde auch der Einfluss von Fe65 auf die Genexpression von CavB, CavD und CavG ermittelt. Analog zu 4.1.7 wurde hierfür SH-SY5Y Fe65-KD mit SH-SY5Y WT (mock) verglichen. Die Genexpression von CavB sank nicht signifikant auf $85,7 \% \pm 6,9$ ($p = 0,059$), wohingegen die Genexpression von CavD signifikant auf $77,4 \% \pm 2,5$ ($p \leq 0,001$) gesunken war. Die Genexpression von CavG stieg dagegen nicht signifikant ($388 \% \pm 128,5$, $p \geq 0,05$) (Abb.19).

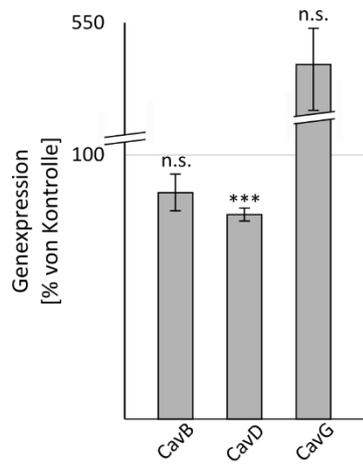


Abb. 19: Genexpression von CavB, CavD und CavG in SH-SY5Y Fe65-KD

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. SH-SY5Y WT (mock) (= Kontrolle) und SH-SY5Y Fe65-KD je n=8.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung für CavG mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt, für alle anderen Gene wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test berechnet (***) $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant). n = Anzahl an Proben.

4.2 ÜBERSICHT ÜBER DIE GENEXPRESSION VON ORAI, STIM UND VGCC

Bei der Frage nach möglichen Modulatoren der Genexpression von STIM-, ORAI- und VGCC-Proteinen wurde der Einfluss von Presenilin, APP – Familie und APP - Prozessierungsprodukten in unterschiedlichen Zelllinienmodellen untersucht. Im Folgenden sind alle Ergebnisse zusammenfassend aufgeführt.

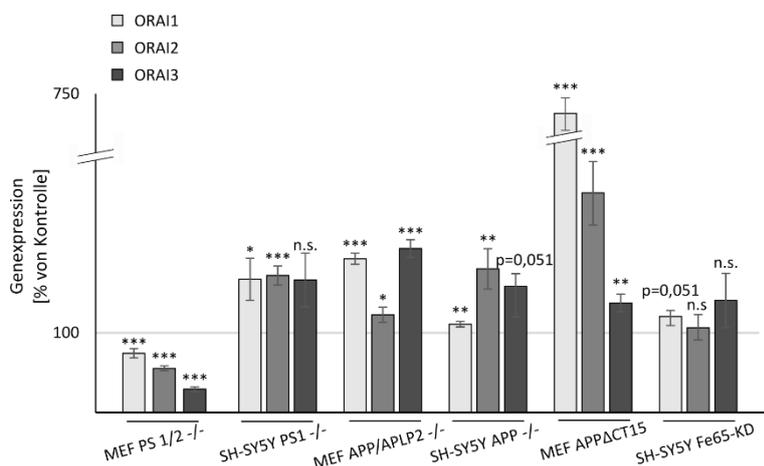


Abb. 20: Übersicht über die Genexpression von ORAI1, ORAI2 und ORAI3 in humanen und murinen Zelllinien
Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Angaben in [%] – Anteil der Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U Test, bei gegebener Normalverteilung mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. Für genaue Angaben s. vorhergehende Kapitel (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

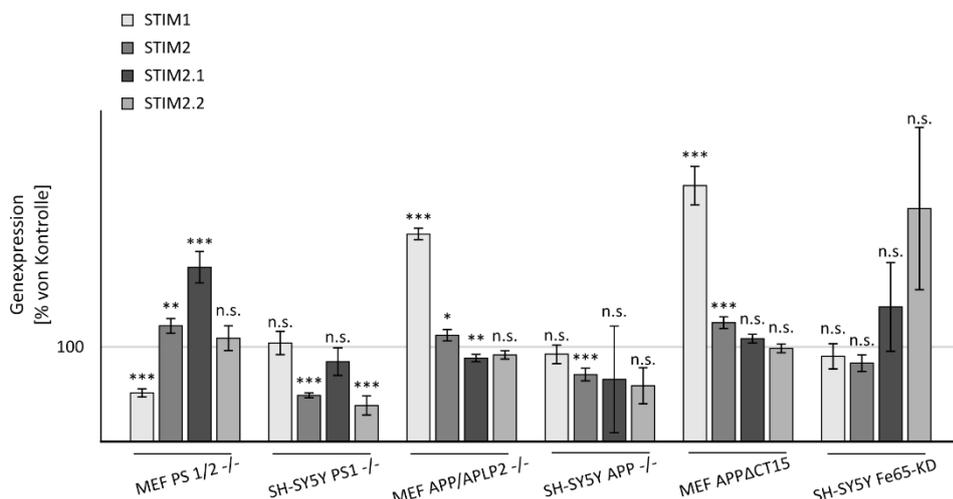


Abb. 21: Übersicht über die Genexpression von STIM1, STIM2, STIM2.1 und STIM2.2 in humanen und murinen Zelllinien

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Angaben in [%] – Anteil der Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U Test, bei gegebener Normalverteilung mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. Für genaue Angaben s. vorhergehende Kapitel (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant).

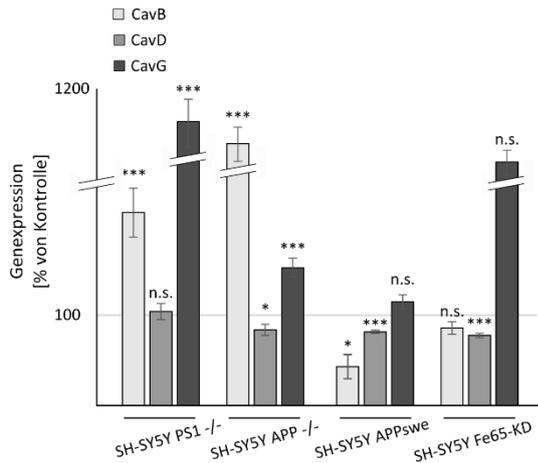


Abb. 22: Übersicht über die Genexpression von CavB, CavD und CavG in humanen Zelllinien

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Angaben in [%] – Anteil der Kontrolle.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U Test, bei gegebener Normalverteilung mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. Für genaue Angaben s. vorhergehende Kapitel (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant).

4.3 EINFLUSS VON STIM1 UND STIM2 AUF α -, β - UND γ – SEKRETASEN

α -, β - und γ – Sekretasen spielen eine zentrale Rolle in der Pathologie der Alzheimer-Krankheit. Um den Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die Sekretasen zu untersuchen, wurden folglich deren Aktivität (3.2.3.8), Proteinlevel (3.2.3.6) und Genexpression (3.2.2.5) in unterschiedlichen Zelllinienmodellen untersucht.

Um die Übersicht zu behalten, sind in Abb. 23 vorab die Ergebnisse zu der Genexpression von APP, APLP2, α -, β -, γ -Sekretasen, NEP und IDE in MEF STIM1/2 -/- dargestellt.

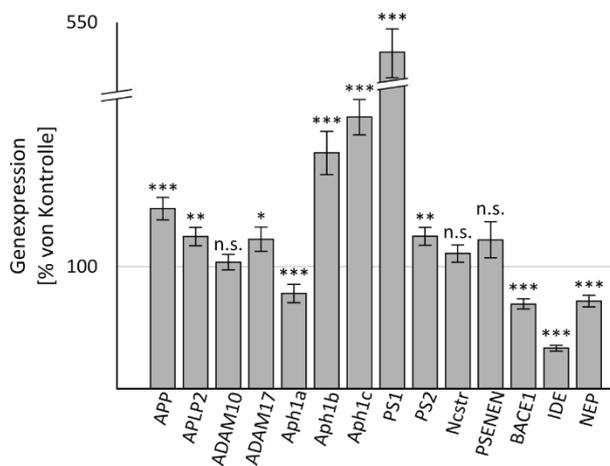


Abb. 23: Genexpression von APP, APLP2, α -, β -, γ - Sekretasen, IDE und NEP in MEF STIM1/2 -/-

Quantitative Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR. MEF WT diente als Kontrolle. Alle Angaben in [%] – Anteil von MEF WT. APP, APLP2, Aph1a, Aph1b, Aph1c, PS2, Ncstr, PSENEN und IDE je n=12, ADAM10, ADAM17, BACE1 und NEP je n=18, PS1 n=30.

Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung für Aph1a, Aph1b und PS1 mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt, für alle anderen Gene wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test berechnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant). n = Anzahl an Proben.

4.3.1 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α - Sekretase

Zunächst wurde untersucht, ob STIM1 und STIM2 die Enzymaktivität der α – Sekretase, die den nicht – amyloidogenen Prozessierungsweg von APP initiiert, beeinflussen. Die Untersuchung erfolgte wie in 3.2.3.8 beschrieben. Wie in Abb.24 A dargestellt kam es in MEF STIM1/2 -/- zu einer signifikanten

Reduktion der α – Sekretase-Enzymaktivität auf 85,88 % ($\pm 1,8$ %, $p \leq 0,001$). Auch der in Abb.24 C gezeigte Proteinlevel von sAPP α , dem löslichen N – terminalen Teil von APP nach dem Schnitt der α – Sekretase, war auf 79,96 % ($\pm 6,67$, $p = 0,049$) reduziert, was durch die abgeschwächte Enzymaktivität erklärt werden könnte. Wohingegen die Genexpression von ADAM17 in MEF STIM1/2 $-/-$ eine signifikante Steigerung auf 122,51 % ($\pm 9,9$, $p = 0,029$) erfuhr und die Genexpression von ADAM10 unverändert blieb (103,72 % $\pm 6,4$, $p = 0,565$) (Abb.24 B).

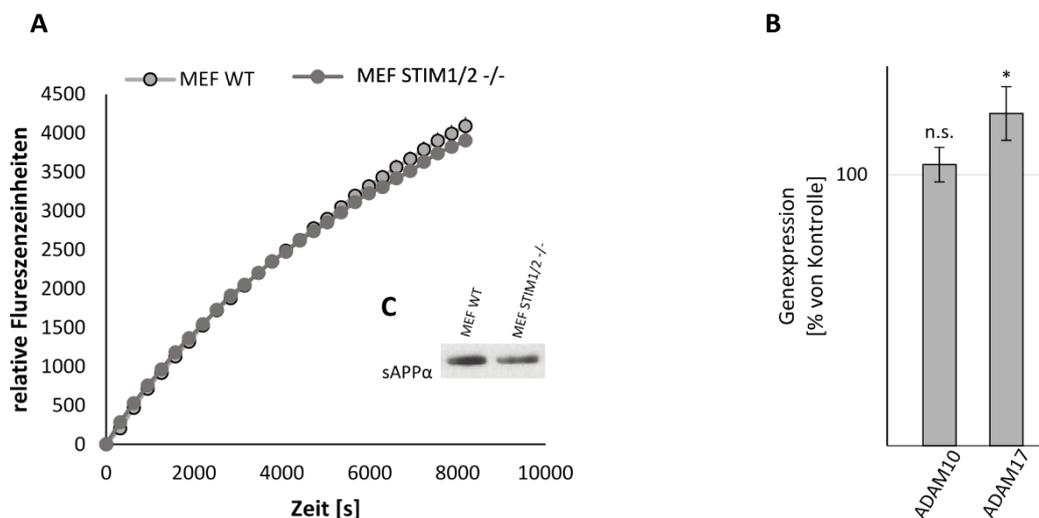


Abb. 24: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α – Sekretase

A: Messung der α -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF STIM1/2 $-/-$ und MEF WT als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} - reichem Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n = 80$ aus vier unabhängigen Messungen. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U Test berechnet ($p \leq 0,001$). **B:** Quantitative Bestimmung der Genexpression in MEF STIM1/2 $-/-$ und MEF WT als Kontrolle mittels qRT-PCR von ADAM 10 und ADAM 17. Je $n = 18$ aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test bestimmt. (* $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant). **C:** Proteinlevel von sAPP α mittels Western Blot bei ca. 97 kDa. Je $n = 9$ aus zwei unabhängigen Messungen. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. $n =$ Anzahl an Proben.

4.3.2 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β - Sekretase

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β – Sekretase untersucht. Auch hierfür wurde die Enzymaktivität, das Proteinlevel und die Genexpression der β – Sekretase in MEF STIM1/2 $-/-$ im Vergleich zu MEF WT bestimmt.

Wie in Abb. 25 gezeigt wird, lag eine nicht signifikante Steigerung der Enzymaktivität von der β – Sekretase in MEF STIM1/2 $-/-$ verglichen zu MEF WT vor (104,03 % $\pm 4,2$, $p = 0,257$). Auch die Proteinmenge von BACE1 zeigte keinen Unterschied zwischen MEF STIM1/2 $-/-$ und der Kontrolle (97,54 % $\pm 5,9$, $p = 0,732$) (Abb.25C). In Bezug auf die Genexpression von BACE1 erfuhr diese eine

signifikante Reduktion in MEF STIM1/2 $-/-$ auf 69,49 % ($\pm 4,1$, $p \leq 0,001$) (Abb.25B). Nichtsdestotrotz konnte mittels Western Blot eine erhöhte Proteinmenge von C99 (= β -CTF), dem membranständigen Spaltprodukt von APP durch BACE1, auf 136,23 % $\pm 15,43$ ermittelt werden (Abb. 25C). Dieses Ergebnis könnte u.a. eine gesteigerte BACE1 – Aktivität stützen. Die Erhöhung konnte aber das Signifikanzniveau nicht erreichen ($p = 0,220$). Insgesamt betrachtet ergab sich ein uneinheitliches Bild bezüglich des Einflusses von STIM1 und STIM2 auf die β – Sekretase. Anhand der erhöhten Menge an A β in MEF STIM1/2 $-/-$ (Abb. 27B) wäre eine gesteigerte Aktivität von β – Sekretase bei einer STIM1/2 – Defizienz wahrscheinlicher.

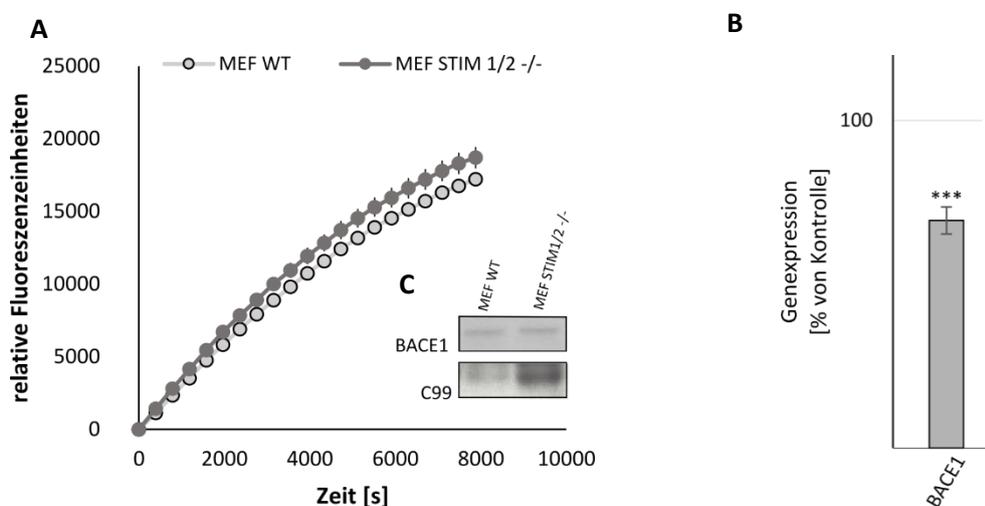


Abb. 25: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β – Sekretase

A: Messung der β -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF STIM1/2 $-/-$ und MEF WT als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} - reichem Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n=80$ aus vier unabhängigen Messungen. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U Test berechnet ($p > 0,05$). **B:** Quantitative Bestimmung der Genexpression in MEF STIM1/2 $-/-$ und MEF WT als Kontrolle mittels qRT-PCR von BACE1. Je $n=18$ aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test bestimmt. (** $p \leq 0,001$). **C:** Proteinlevel von BACE1 bei 70 kDa ($n=10$ aus zwei unabhängigen Messungen) und C99 bei 10 kDa ($n=4$, eine Messung) mittels Western Blot. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. n = Anzahl an Proben.

4.3.3 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ - Sekretase

Schließlich wurde der Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ – Sekretase untersucht. Zunächst wurde deren Enzymaktivität, das Proteinlevel und die Genexpression in MEF STIM1/2 $-/-$ im Vergleich zu MEF WT untersucht.

Wie in Abb. 26 gezeigt stieg die Aktivität der γ – Sekretase signifikant in MEF STIM1/2 $-/-$ verglichen zu MEF WT auf 278,18 % ($\pm 14,01$, $p \leq 0,001$). Auch die Genexpression von einzelnen Bestandteilen der γ

- Sekretase war signifikant gesteigert. So war die Genexpression von Aph1b auf 193,23 % ± 17,6 ($p \leq 0,001$), von Aph1c auf 222,48 % ± 14,6 ($p \leq 0,001$), von PS1 auf 417,43 % ± 107,5 ($p \leq 0,001$) sowie von PS2 auf 124,93 % ± 7,3 ($p \leq 0,01$) erhöht. Wohingegen die Genexpression von Aph1a auf 78,11 % ± 7,6 ($p \leq 0,001$) signifikant reduziert war und die Genexpression von PSENEN (121,96 % ± 14,7, $p = 0,150$) und Ncstr (110,74 % ± 7,1, $p = 0,144$) eine nicht signifikante Steigerung erfuhr (Abb.26B). Mittels Western Blot (3.2.3.6) konnte eine Erhöhung der Proteinmenge des C – terminalen Fragments von PS1 (PS1-CTF, engl. C-terminal fragment, (2.2.2)) auf 117,07 % ± 4,72 ($p = 0,0419$) gemessen werden (Abb.26C).

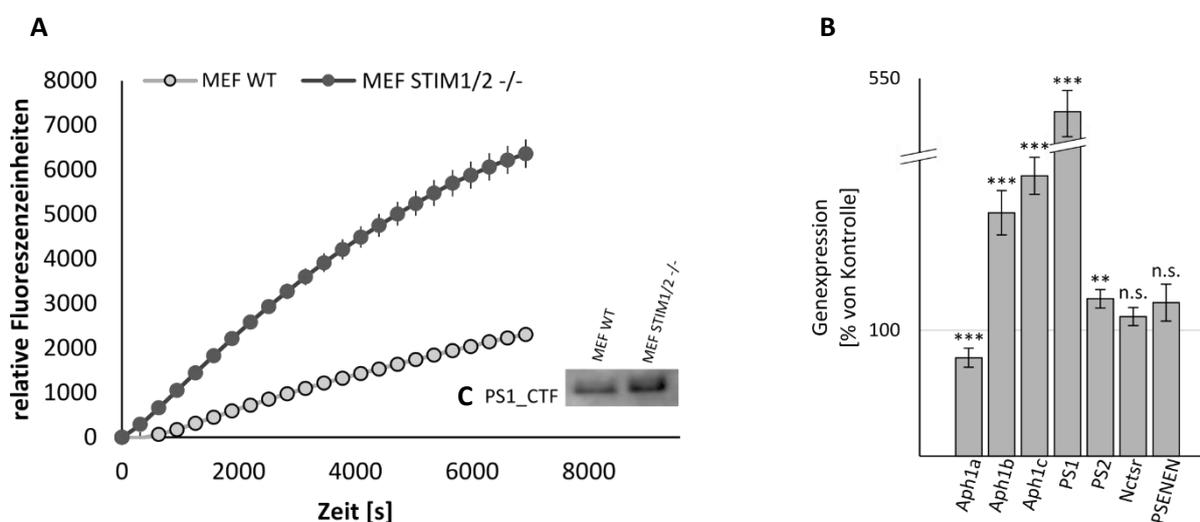


Abb. 26: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ – Sekretase

A: Messung der γ -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF STIM1/2 $-/-$ und MEF WT als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} - reichem Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n=60$ aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U Test berechnet ($p \leq 0,001$). **B:** Quantitative Bestimmung der Genexpression in MEF STIM1/2 $-/-$ und MEF WT als Kontrolle mittels qRT-PCR. PS1 $n=30$ aus vier unabhängigen Messungen, die restlichen Gene je $n=12$ aus je zwei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung für Aph1a, Aph1b und PS1 mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt, für alle anderen Gene wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test berechnet ($**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant). **C:** Proteinlevel von PS1-CTF bei ca. 20 kDa mit $n=5$ aus einer Messung mittels Western Blot. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. n = Anzahl an Proben.

Kurz zusammengefasst ließ sich sowohl eine erhöhte Genexpression als auch eine erhöhte Proteinmenge sowie erhöhte Enzymaktivität der γ - Sekretase in MEF STIM1/2 $-/-$ verglichen zu MEF WT feststellen. Die erhöhte Aktivität der γ – Sekretase spiegelte sich in einem erhöhten Umsatz von APP bzw. APLP2 mit signifikant gesteigerter Menge von $A\beta$ (235,68 % ± 9,3, $p \leq 0,001$) (Abb.27B) und signifikant gesteigerter Genexpression von APP (147,53 % ± 9,2, $p \leq 0,001$) und APLP2 (124,76 % ± 7,5,

$p \leq 0,01$) (Abb.27A) wider. Die Erhöhung der Proteinmenge von APP (153,92 % \pm 30,99) in Abb.27B lag jedoch außerhalb des Signifikanzniveaus ($p = 0,253$).

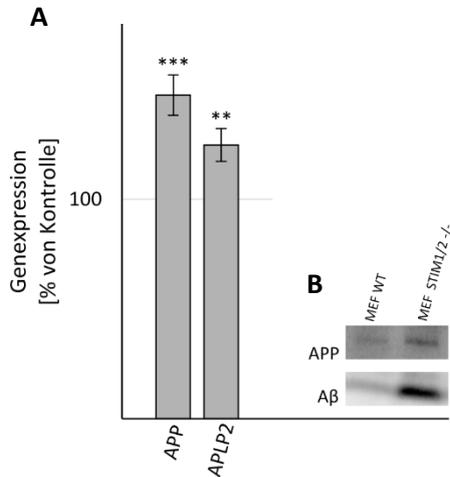


Abb. 27: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf APP, APLP2 und Aβ

A: Quantitative Bestimmung der Genexpression in MEF STIM1/2 -/- und MEF WT als Kontrolle mittels qRT-PCR. n=12 aus zwei Messungen, die restlichen Gene je n=12 aus je zwei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). **C:** Proteinlevel von APP bei ca. 105 kDa mit n=5 aus einer Messung und Aβ bei ca. 5 kDa mit n=9 aus zwei unabhängigen Messungen mittels Western Blot. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. n = Anzahl an Proben.

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob diese Veränderungen durch STIM1 und/oder STIM2 begünstigt wurden. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde die γ – Sekretase - Aktivität in MEF STIM1 -/- und MEF STIM2 -/- im Vergleich zu MEF WT untersucht. In Abb.28 wird gezeigt, dass die gesteigerte Aktivität der γ - Sekretase (159,79 % \pm 1,8, $p \leq 0,001$) nur in MEF STIM1 -/- reproduziert wurde, wohingegen in MEF STIM2 -/- diese signifikant sank (51,64 % \pm 1,2, $p \leq 0,001$).

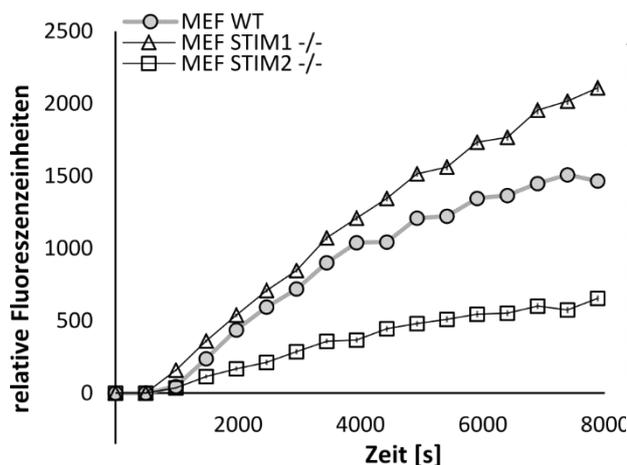


Abb. 28: γ -Sekretase Aktivität in MEF STIM1 -/- und MEF STIM2 -/-

Messung der γ -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF STIM1 -/- und MEF STIM2 -/- im Vergleich zu MEF WT als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} - reichem Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je n=18 aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. n = Anzahl an Proben.

Demnach scheint die Aktivität der γ – Sekretase sowohl von STIM1 als auch von STIM2 beeinflusst zu sein. Möglicherweise hat STIM1 folglich einen aktivitätssenkenden und STIM2 einen aktivitätssteigernden Einfluss auf die γ – Sekretase.

Um diese Hypothese verifizieren bzw. widerlegen zu können, sollten die Ergebnisse auf den möglichen Einfluss der klonalen Heterogenität in MEF STIM1 $-/-$ sowie MEF STIM2 $-/-$ gegenüber dem MEF WT geprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien mit dem jeweiligen Gen – Knockout mit dementsprechendem Plasmid retransfiziert.

Hierzu wurden MEF STIM1 $-/-$ [305] mit STIM1 - Plasmid sowie MEF STIM2 $-/-$ [305] mit STIM2 – Plasmid retransfiziert (3.2.2.1) und die Enzymaktivität der γ – Sekretase (3.2.3.8) verglichen zur jeweiligen Zelllinie mit dem entsprechenden Gen - Knockout sowie zu MEF WT gemessen (Abb.29).

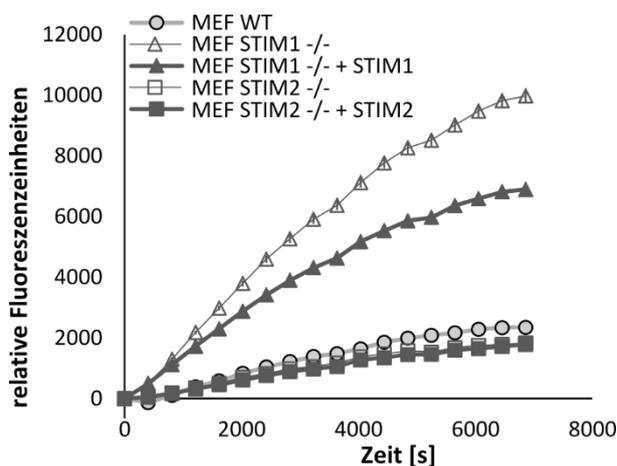


Abb. 29: γ -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1 $-/-$ und MEF STIM2 $-/-$ nach STIM1- bzw. STIM2- Retransfektion

Messung der γ -Sekretase-Aktivität unter Verwendung von Ca^{2+} - reichem Messmedium in lebenden MEF STIM1 $-/-$ und MEF STIM2 $-/-$ nach Retransfektion mit STIM1-pCAGGS-IRES-GFP bzw. STIM2-pCAGGS-IRES-GFP (3.2.2.1). Mediumwechsel nach 6 Stunden. Inkubation über 48 Stunden. Als Kontrolle wurden MEF STIM1 $-/-$ bzw. MEF STIM2 $-/-$ mit Leerplasmid inkubiert, wohingegen MEF WT ausschließlich mit Buffer und Reagenz behandelt wurde. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je n=10 aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. Die Signifikanz wurde in Bezug zu Leerplasmid-Kontrolle berechnet. Die [%]-Angaben beziehen sich auf MEF WT. n = Anzahl an Proben.

Aus der Abb. 29 geht hervor, dass die Aktivität der γ – Sekretase in MEF STIM1 $-/-$ nach der Behandlung mit STIM1 – Plasmid im Vergleich zur Leerkontrolle von $243,52 \% \pm 9$ signifikant auf $217,12 \% \pm 3,3$ ($p = 0,013$) reduziert wurde. Dies stützt somit die Vermutung, STIM1 habe einen aktivitätssenkenden Einfluss auf die γ – Sekretase. Die Retransfektion von MEF STIM2 $-/-$ mit STIM2 – Plasmid hat jedoch im Vergleich zur Leerkontrolle keine signifikante Veränderung ergeben ($p = 0,177$). Im Vergleich zu MEF WT sank die Aktivität der γ – Sekretase in MEF STIM2 $-/-$ auf $69,77 \% \pm 3,6$ ($p \leq 0,001$) und nach der Behandlung mit STIM2 – Plasmid auf $62,88 \% \pm 3,3$ ($p \leq 0,001$).

Anschließend wurde MEF STIM1/2 -/- ebenfalls mit STIM1 - und/oder STIM2 – Plasmiden retransfiziert (3.2.2.1). Zur Kontrolle wurde MEF STIM1/2 -/- mit einem Leerplasmid behandelt. Nach knapp 6 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 26 Stunden im Inkubator bebrütet. Hierbei konnte die zweite Vermutung, STIM2 habe einen aktivitätssteigernden Einfluss auf die γ – Sekretase, erhärtet werden. Die Enzymaktivität stieg nach der Behandlung mit STIM2 – Plasmid auf $106,24 \% \pm 0,8$ ($p \leq 0,001$). Allerdings stieg diese auch nach der Behandlung mit STIM1 – Plasmid signifikant auf $114,24 \% \pm 1,3$ ($p \leq 0,001$). Die Co-Transfektion mit STIM1 - und STIM2 – Plasmiden erbrachte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Leerplasmid – Transfektion ($p = 0,954$) (keine Abbildung). Die Retransfektion wurde folglich nach dem gleichem Versuchsaufbau wiederholt. Zusätzlich wurde MEF WT als Kontrolle ergänzt. Auch hier konnte eine Aktivitätssteigerung der γ – Sekretase nach der Behandlung mit STIM2 – Plasmid aufgezeigt werden. Die Enzymaktivität stieg in MEF STIM1/2 -/- verglichen zu MEF WT auf $300,14 \% \pm 7,3$ ($p \leq 0,001$), um nach der Behandlung mit STIM2 – Plasmid auf $323,67 \% \pm 6,4$ signifikant weiter zu steigen ($p = 0,026$). Allerdings stieg die Aktivität der γ – Sekretase wiederum auch nach der Behandlung mit STIM1 – Plasmid von $300,14 \%$ auf $335,59 \pm 5,4$ signifikant an ($p \leq 0,001$). Die Aktivität der γ – Sekretase nach der Co – Transfektion mit STIM1 und STIM2 – Plasmiden stieg hierbei ebenfalls von $300,14$ auf $321,78 \% \pm 3,5$ ($p = 0,015$) (keine Abbildung). Um zu testen, ob dieser Effekt eher aufgrund der Zeitlimitierung zustande kam, wurde das Experiment wiederholt und die Inkubationszeit auf 48 Stunden verdoppelt (Abb.30).

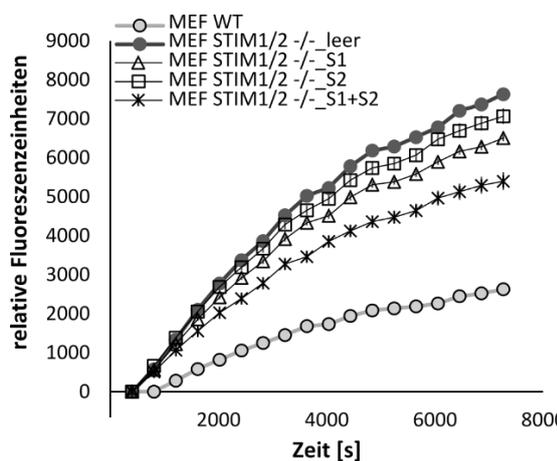


Abb. 30: γ -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 -/- nach STIM1- und/oder STIM2-Retransfektion

Messung der γ -Sekretase-Aktivität unter Verwendung von Ca^{2+} - reichem Messmedium in lebenden MEF STIM1/2 -/- nach Retransfektion mit STIM1-pCAGGS-IRES-GFP und/oder STIM2-pCAGGS-IRES-GFP (3.2.2.1). Mediumwechsel nach 6 Stunden. Inkubation über 48 Stunden. Als Kontrolle wurden MEF STIM1 -/- bzw. MEF STIM2 -/- mit Leerplasmid inkubiert, wohingegen MEF WT ausschließlich mit Buffer und Reagenz behandelt wurde. Für die Co-Transfektion wurde die doppelte Menge an Buffer und Reagenz verwendet. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n=10$ aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U Test berechnet, wobei diese in Bezug zum Leerplasmid-MEF STIM1/2 -/- gesetzt wurde. Die [%]-Angaben beziehen sich auf MEF WT. $n =$ Anzahl an Proben.

Wie in Abb. 30 dargestellt fiel hierbei die Aktivität der γ - Sekretase nach der Behandlung mit STIM1 – Plasmid von $221,31 \% \pm 4,9$ auf $216,32 \% \pm 2,8$, jedoch war der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,391$),

wohingegen nach der Co – Transfektion eine hochsignifikante Reduktion der Enzymaktivität von 221,31 % auf 169,7 % \pm 8,5 ($p \leq 0,001$) verzeichnet werden konnte. Die Enzymaktivität fiel auch nach der Behandlung mit STIM2 – Plasmid von 221,31 % auf 212,11 % \pm 7,2, was wiederum auch nicht signifikant war ($p = 0,305$) (Abb.30).

Um speziesspezifische Effekte auszuschließen, wurden im nächsten Schritt Cos7 WT - Zellen mit STIM1 - und/oder STIM2 – Plasmiden transfiziert (3.2.2.1), um somit STIM1 bzw. STIM2 zu einer Überexpression zu bringen. Im Anschluss wurde die Aktivität der γ – Sekretase getestet, wobei als Kontrolle mit Leerplasmid behandelte Cos7 WT - Zellen verwendet wurden (Abb.31).

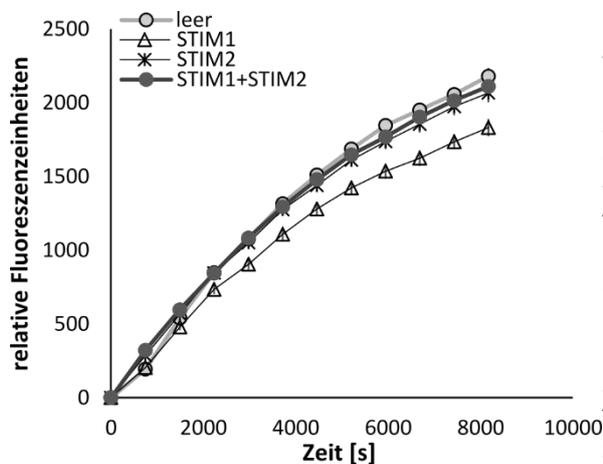


Abb. 31: γ -Sekretase-Aktivität in Cos7 WT nach STIM1- und/oder STIM2-Transfektion

Messung der γ -Sekretase-Aktivität unter Verwendung von Ca^{2+} - reichem Messmedium in lebenden Cos7 WT nach Transfektion mit STIM1-pCAGGS-IRES-GFP und/oder STIM2-pCAGGS-IRES-GFP (3.2.2.1). Mediumwechsel nach 6 Stunden. Inkubation über 48 Stunden. Als Kontrolle wurden Cos7 WT mit Leerplasmid inkubiert. Für die Co-Transfektion wurde die doppelte Menge an Buffer und Reagenz verwendet. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n=11$ aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Signifikanz für STIM1-transfuzierten Zellen mittels Mann-Whitney-U Test berechnet. Für die restlichen Zellen wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. n = Anzahl an Proben.

Wie in Abb.31 gezeigt sank die Enzymaktivität nach der Behandlung mit STIM1 – Plasmid signifikant auf 85,2 % \pm 2,5 ($p = 0,001$) sowie nach der Co – Transfektion mit STIM1 - und STIM2 – Plasmiden auf 92,27 % \pm 2,2 ($p = 0,023$). Nach der Behandlung mit STIM2 – Plasmid konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (94,24 % \pm 2,7, $p = 0,111$).

Zusätzlich wurde SH-SY5Y WT nach gleichem Versuchsaufbau mit STIM1 - und/oder STIM2 – Plasmiden transfiziert (3.2.2.1) und verglichen zur Kontrolle mit einem Leerplasmid die Aktivität der γ – Sekretase gemessen (Abb.32).

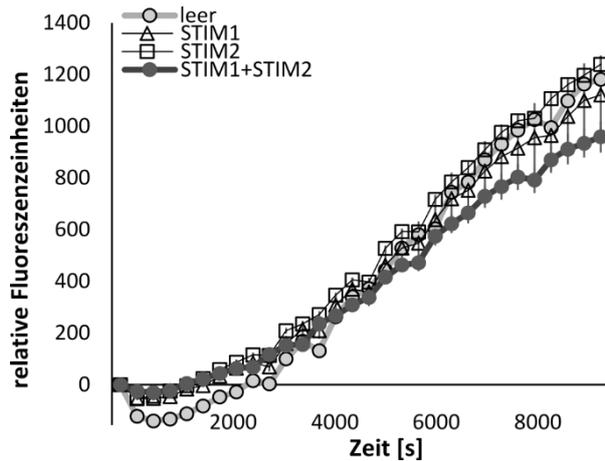


Abb. 32: γ -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y WT nach STIM1- und/oder STIM2-Transfektion

Messung der γ -Sekretase-Aktivität unter Verwendung von Ca^{2+} -reichem Messmedium in lebenden SH-SY5Y WT nach Transfektion mit STIM1-pCAGGS-IRES-GFP und/oder STIM2-pCAGGS-IRES-GFP (3.2.2.1). Mediumwechsel nach 6 Stunden. Inkubation über 48 Stunden. Als Kontrolle wurden SH-SY5Y WT mit Leerplasmid inkubiert. Für die Co-Transfektion wurde die doppelte Menge an Buffer und Reagenz verwendet. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n=8$ aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. n = Anzahl an Proben.

Hierbei erfuhr die Enzymaktivität nur nach der Co-Transfektion eine signifikante Reduktion auf $85,36\% \pm 4,9$ ($p = 0,012$), wobei die Behandlung sowohl mit STIM1 – ($93,7\% \pm 12$, $p = 0,603$) als auch mit STIM2 – Plasmid ($96,71\% \pm 2,4$, $p = 0,243$) keinen signifikanten Unterschied aufzeigen konnte (Abb.32).

Schließlich wurde die Aktivität der γ -Sekretase in HEK293-STIM1 (Überexpression von STIM1) im Vergleich zu HEK293 WT analysiert. Doch auch hier konnte der aktivitätssenkende Einfluss von STIM1 auf die Enzymaktivität nicht belegt werden. So stieg die Enzymaktivität in HEK293-STIM1 signifikant auf $142,49\% \pm 5,9$ ($p \leq 0,001$).

Zusätzlich wurde der Einfluss von STIM2.2, einer Splicevariante von STIM2, auf die Aktivität der γ -Sekretase untersucht. Hierzu wurde die Enzymaktivität in HEK T-REx-Flp-In mit der in HEK293-STIM2.2 T-REx verglichen (Abb.33), wobei STIM2.2 in HEK293-STIM2.2 T-REx überexprimiert wird.

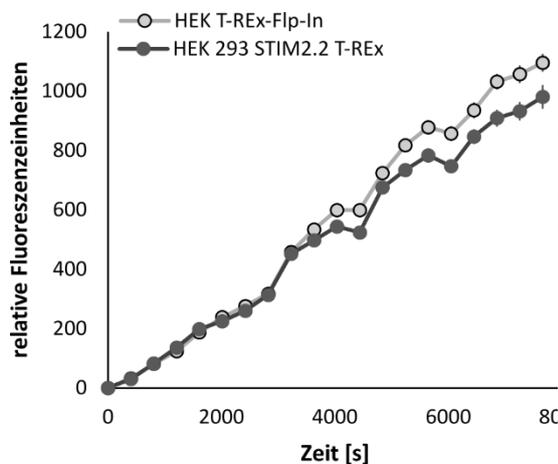


Abb. 33: γ -Sekretase-Aktivität in HEK293 STIM2.2 T-Rex

Messung der γ -Sekretase-Aktivität in lebenden HEK293 STIM2.2 T-REx im Vergleich zu HEK T-REx-Flp-In als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} -reichem Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n=10$ aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. n = Anzahl an Proben.

Es ergab sich ein Hinweis, dass STIM2.2 möglicherweise einen aktivitätssenkenden Einfluss auf die γ – Sekretase hat und somit Alzheimer protektiv fungieren könnte. Demnach sank die Enzymaktivität auf $87,68 \% \pm 2,7$ ($p = 0,004$) in HEK293-STIM2.2 T-REX. Um diese Hypothese zu verifizieren, wären weitere Untersuchungen u.a. in anderen Spezies und ggf. mit *in vivo* Material sinnvoll.

4.3.4 Einfluss von STIMs Ca^{2+} - mediiert?

4.3.4.1 α – Sekretase

Da die Aktivität der α – Sekretase in MEF STIM1/2 $-/-$ verglichen zu MEF WT reduziert war, kann im Umkehrschluss angenommen werden, dass STIM – Proteine einen aktivitätsfördernden Einfluss auf die Enzymaktivität haben.

Um zu untersuchen, ob die Veränderung der Aktivität der α – Sekretase Ca^{2+} - vermittelt war, wurde die Enzymaktivitätsmessung in MEF WT und MEF STIM1/2 $-/-$ mit Ca^{2+} - freiem Medium wiederholt (3.2.4), wodurch die $[Ca^{2+}]_i$ am ehesten gesenkt werden würde. Hier konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Aktivität auf $79,81 \% \pm 2,1$ ($p \leq 0,001$) festgehalten werden (Abb.34).

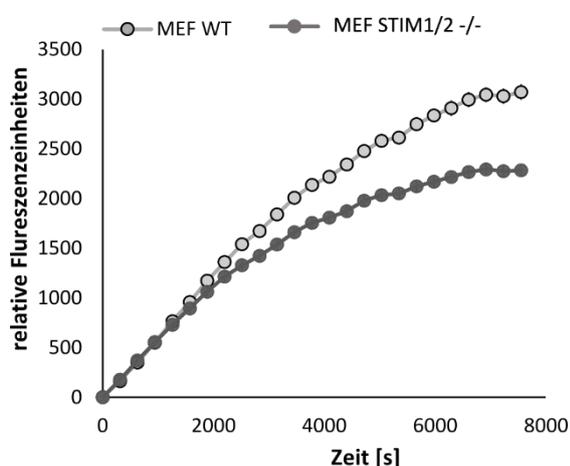


Abb. 34: α -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 $-/-$ in Ca^{2+} - freiem Messmedium

Messung der α -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF STIM1/2 $-/-$ und MEF WT als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} - freiem Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n = 20$ aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. $n =$ Anzahl an Proben.

Mit dieser Messung konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} auch einen Einfluss auf die Aktivität der α - Sekretase haben könnte.

Um zu untersuchen, inwiefern STIM – Proteine in der Regulation involviert sind, wurden MEF WT mit BTP2 (engl. 3,5 - bistrifluoromethyl pyrazole derivate 2, oder YM-58483), einem pharmakologischen Inhibitor von allen drei CRAC - Kanälen (engl. Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels) [35,525], behandelt, um anschließend die Aktivität der α - Sekretase zu bestimmen (3.2.3.8). Da es

unterschiedliche Angaben in der Literatur bezüglich IC_{50} (engl. half maximal inhibitory concentration) gibt, wurde die höhere Konzentration an BTP2 bevorzugt [200 nM] und über 8 bzw. 20 Stunden inkubiert. Dabei war die Aktivität der α -Sekretase in mit BTP2 behandelten Zellen signifikant gesteigert. Nach 8 Stunden Inkubation lag diese bei $124,48 \% \pm 1,8$ ($p \leq 0,001$) sowie bei $186,03 \% \pm 19,6$ ($p = 0,001$) nach 20 Stunden. Wie in Abb.24 A (4.3.1) gezeigt, war die α -Sekretase Aktivität in STIM1/2 – defizienten Zellen (MEF STIM1/2 -/-) signifikant reduziert, wobei folglich ein aktivitätsfördernder Einfluss von STIM – Proteinen auf die Enzymaktivität postuliert wurde. Demnach kann die gesteigerte Aktivität der α -Sekretase in den Zellen, dessen CRAC- Kanäle durch BTP2 blockiert wurden, durch die fördernde Wirkung von STIM – Proteinen erklärt werden. Wenn das Ca^{2+} aus den ER-Speichern entleert wird, aggregieren STIM – Proteine und aktivieren die CRAC – Kanäle (ORAI 1-3). Das hat das Öffnen der CRAC – Kanäle und Ca^{2+} - Influx zur Folge. Wenn die CRAC – Kanäle aber durch BTP2 blockiert sind, ist der Ca^{2+} - Influx gestört. Die Aktivität der STIM – Proteine wird aber immer weiter gesteigert, sodass als Nebeneffekt die α -Sekretase aktiviert wird. Dieses Muster spiegelte sich in der Aktivitätsmessung in mit BTP2 behandelten MEF WT wider.

Anschließend wurde die Messung der Enzymaktivität der mit BTP2 behandelten MEF WT in Ca^{2+} - freiem Medium wiederholt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit BTP2 behandelten und unbehandelten Zellen gezeigt werden ($p \geq 0,05$).

Kurz zusammengefasst, wird die α -Sekretase möglicherweise sowohl von STIM – Proteinen selbst als auch von Ca^{2+} beeinflusst (s. 4.3.4.4). Demnach haben STIM – Proteine einen aktivitätsfördernden Einfluss auf die α -Sekretase und könnten folglich Alzheimer protektive Eigenschaften durch die Förderung des nicht – amyloidogenen Wegs aufweisen. Diese Hypothese stützen die Ergebnisse von Zeiger et al. Demnach konnte in STIM1 – überexprimierenden HEK293 - Zellen mit einer STIM1 (D76A) – Mutation eine erhöhte p3 – Menge und bei Co - Expression mit APPswe eine erhöhte sAPP α – Menge nachgewiesen werden. Dies sei a.e. durch eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ bedingt gewesen [506].

4.3.4.2 β – Sekretase

Um den Einfluss von Ca^{2+} auf die Aktivität der β -Sekretase zu prüfen, wurden auch hier die Enzymaktivitätsmessung in MEF WT und MEF STIM1/2 -/- in Ca^{2+} - freiem Medium durchgeführt (3.2.3.8). Es zeigte sich allerdings analog zur Enzymaktivität in Ca^{2+} - reichem Medium kein signifikanter Unterschied zwischen MEF WT und MEF STIM1/2 -/- ($102,54 \% \pm 1,6$, $p = 0,218$) (Abb.35).

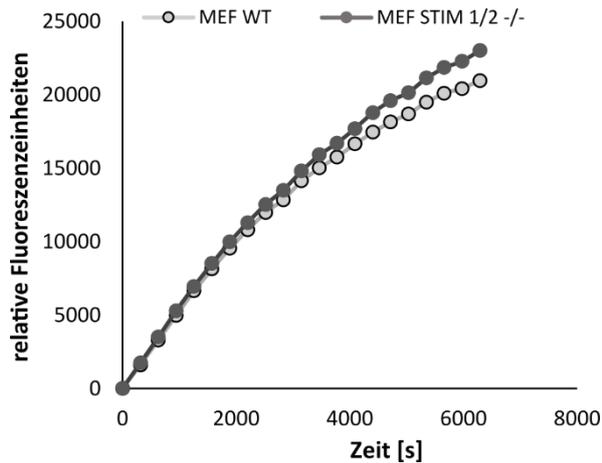


Abb. 35: β -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 -/- in Ca^{2+} -freiem Messmedium

Messung der β -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF STIM1/2 -/- und MEF WT als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} -freiem Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n = 20$ aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. $n =$ Anzahl an Proben.

Anschließend wurde analog zu 4.3.4.1 die Enzymaktivität in MEF WT gemessen, die mit BTP2 behandelt wurden. Jedoch ergab sich hier kein einheitliches Bild. Die Enzymaktivität stieg nach 8 Stunden Inkubation in den BTP2 behandelten Zellen auf $107,52\% \pm 1,3$ ($p = 0,001$), um nach einer 20-stündigen Inkubation signifikant auf $86,88\% \pm 1$ ($p \leq 0,001$) zu sinken. Wenn man den Mittelwert daraus bildet, so würde sich kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen ergeben ($p = 0,316$). Auch konnte kein Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen im Ca^{2+} -freiem Medium gezeigt werden ($p = 0,79$).

Zusammenfassend kann kein eindeutiges Muster in Bezug auf die Aktivität der β -Sekretase gemacht werden.

4.3.4.3 γ -Sekretase

Um zu untersuchen, ob der Einfluss auf die Aktivität der γ -Sekretase u.a. auf Veränderungen des Ca^{2+} -Haushalts beruht, wurde für die Messung der Enzymaktivität ein Ca^{2+} -freies Medium verwendet und die Enzymaktivität in MEF WT und MEF STIM1/2 -/- bestimmt (3.2.3.8). Wäre Ca^{2+} in die Regulation der Enzymaktivität involviert, wären Veränderungen dieser bei Ca^{2+} -Entzug aus dem Messmedium zu erwarten. In der Messung in Ca^{2+} -freiem Medium war die Aktivität der γ -Sekretase gesteigert. In MEF STIM1/2 -/- stieg diese auf $129,41\% \pm 1,8$ ($p \leq 0,001$) verglichen zu MEF WT (Abb.36).

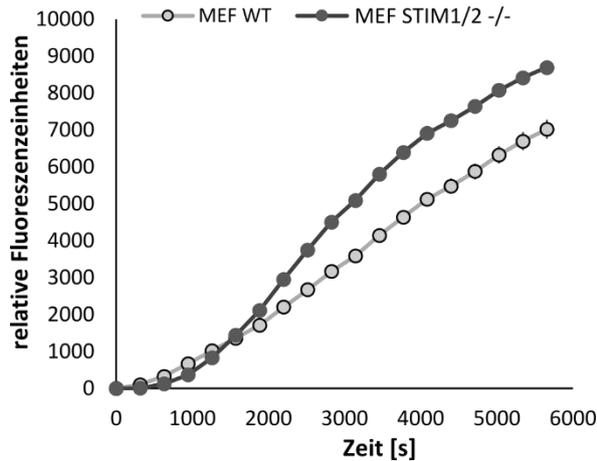


Abb. 36: γ -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 -/- in Ca^{2+} -freiem Messmedium

Messung der γ -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF STIM1/2 -/- und MEF WT als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} -freiem Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Je $n = 20$ aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U Test berechnet. $n =$ Anzahl an Proben.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass Ca^{2+} unter Umständen die Aktivität der γ -Sekretase beeinflussen kann, bot die Messung der Enzymaktivität in mit Ruthenium Red behandelten MEF WT (3.2.3.8). Ruthenium Red inhibiert den Ca^{2+} -Influx u.a. durch Blockade von Capsaicin- und Ryanodin-Rezeptoren (Merck Index 13, 8379). Nach der Behandlung mit Ruthenium Red kann die $[Ca^{2+}]_i$ somit gesenkt werden. Aus der Messung der Aktivität der γ -Sekretase in Zellen mit und ohne Behandlung mit Ruthenium Red ($2 \mu M$) kann möglicherweise auf den Einfluss von Ca^{2+} auf die Enzymaktivität geschlossen werden.

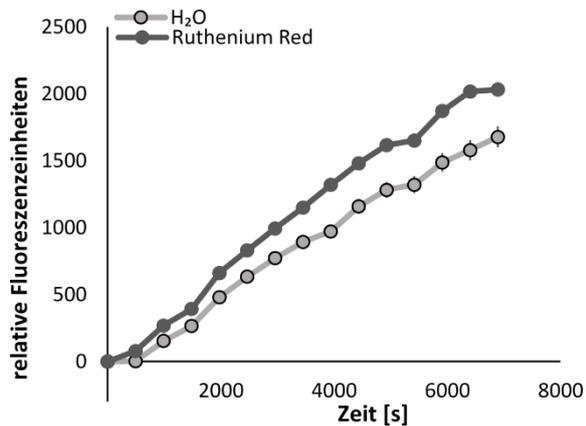


Abb. 37: γ -Sekretase-Aktivität in MEF WT nach Inkubation mit Ruthenium Red

Messung der γ -Sekretase-Aktivität in lebende MEF WT unter Verwendung von Ca^{2+} -beladene Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Ruthenium Red wurde zu einer finalen Konzentration von $2 \mu M$ über 5 Stunden inkubiert. Die Kontrolle erhielt die gleiche Menge ddH_2O statt Ruthenium Red. Je $n = 10$ aus einer Messung. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's t-Test berechnet. $n =$ Anzahl an Proben.

Die Inkubation belief sich auf 5 Stunden. Bei der Messung wurde das Ca^{2+} -beladene Medium verwendet. Wie in Abb.37 dargestellt stieg die Enzymaktivität in den Zellen, die mit Ruthenium Red behandelt wurden, signifikant auf $114,48 \% \pm 2,9$ ($p = 0,019$) im Vergleich zu Zellen, die zur Kontrolle mit ddH_2O behandelt wurden.

Im weiteren Schritt wurde mithilfe von BTP2 getestet, inwiefern die Veränderungen der Enzymaktivität auf dem Einfluss von STIM – Proteinen beruhen. Hierzu wurde die Enzymaktivität in MEF WT mit und ohne BTP2 untersucht. Dabei sank die Enzymaktivität signifikant in den mit BTP2 c[200 nM] behandelten Zellen nach 8 Stunden auf $91,25 \% \pm 1,3$ ($p \leq 0,001$) sowie nach 20 Stunden auf $79,08 \% \pm 1,1$ ($p \leq 0,001$). In der anschließend durchgeführten Messung der γ - Sekretase Aktivität in mit BTP2 behandelten MEF WT in Ca^{2+} - freiem Medium konnte eine Steigerung der Enzymaktivität auf $114,64 \% \pm 3,7$ ($p = 0,004$) verzeichnet werden. Das gleiche Verhältnis konnte auch in HEK 193/195 (= ORAI1/2 -/-) aufgezeigt werden. Da in HEK 193/195 analog zu BTP2 – behandelten Zellen die CRAC – Kanäle inaktiviert bzw. nicht vorhanden sind, sollte die Enzymaktivität in HEK 193/195 ebenfalls eine Reduktion erfahren. Tatsächlich sank die Enzymaktivität in HEK 193/195 auf $88,9 \% \pm 13,1$ im Vergleich zu HEK293 WT, was jedoch nicht signifikant war ($p \geq 0,05$).

4.3.4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von Ca^{2+} auf die Funktion der einzelnen Sekretasen gewonnen werden. Weiterführend wären zusätzliche Messungen der Aktivität der einzelnen Sekretasen im gleichen Versuchsaufbau sowohl in Ca^{2+} - freien als auch in Ca^{2+} - reichen Medium sinnvoll.

Anhand der vorliegenden separaten Messungen konnte rechnerisch eine Reduktion der α – Sekretase – Aktivität in Ca^{2+} - freien Milieu gezeigt werden. Hierfür wurde die Differenz der Steigungen zwischen MEF WT und MEF STIM1/2 -/- in den einzelnen Messungen bestimmt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Enzymaktivität im Ca^{2+} - freien Milieu signifikant stärker reduziert war als im Ca^{2+} - reichem Milieu ($p = 0,047$). Die zwei unabhängigen Messungen betrachtend fällt auf, dass die Enzymaktivität sowohl in MEF WT als auch in MEF STIM1/2 -/- in Ca^{2+} - freiem Medium reduziert war. So war die α – Sekretase – Aktivität in MEF WT in Ca^{2+} - freiem Medium verglichen zu der in MEF WT in Ca^{2+} - reichem Medium auf $86,06 \% \pm 2,2$ ($p \leq 0,001$) und in MEF STIM1/2 -/- in Ca^{2+} - freiem Medium verglichen zu der in MEF STIM1/2 -/- in Ca^{2+} - reichem Medium auf $78,34 \% \pm 2,1$ ($p \leq 0,001$) reduziert. Auch bei der Behandlung der MEF WT mit dem CRAC – Kanal – Inhibitor BTP2 konnte eine rechnerische Analyse zwischen den Zellen in Ca^{2+} - freiem und den Zellen im Ca^{2+} - reichem Medium vorgenommen werden. Hierfür wurde ebenfalls die Differenz der Steigungen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen in Ca^{2+} - freiem Medium mit der Differenz in Ca^{2+} - reichem Medium verglichen. Auch hier konnte eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität im Ca^{2+} -freien Milieu verzeichnet werden ($p \leq 0,001$) (Ergebnisse nicht angeführt).

Die gleichen Berechnungen wurden bei der Analyse der Aktivität der β - Sekretase durchgeführt. Der Vergleich der Enzymaktivität zwischen MEF WT und MEF STIM1/2 $-/-$ mit und ohne Ca^{2+} im Medium erbrachte analog zu den Ergebnissen dargestellt in **Abb. 35** keinen signifikanten Unterschied ($p \geq 0,05$) (Ergebnisse nicht angeführt). Allerdings konnte eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität sowohl in MEF WT als auch in MEF STIM1/2 $-/-$ in Ca^{2+} - freiem Medium verglichen zur Messung im Ca^{2+} - reichen Medium festgehalten werden. So stieg die Aktivität der β - Sekretase in MEF WT in Ca^{2+} - freiem Medium im Vergleich zu MEF WT in Ca^{2+} - reichem Medium auf $149,28 \% \pm 1,6$ ($p \leq 0,001$) und in MEF STIM1/2 $-/-$ in Ca^{2+} - freiem Medium im Vergleich zu MEF STIM1/2 $-/-$ in Ca^{2+} - reichem Medium auf $148,25 \% \pm 2,4$ ($p \leq 0,001$), sodass hier eine aktivitätssenkende Wirkung von Ca^{2+} angenommen werden kann, da in Abwesenheit von Ca^{2+} die Enzymaktivität stark ansteigt. Eine rechnerische Analyse der Aktivitätsmessung zwischen den MEF WT in Ca^{2+} - freiem und den MEF WT in Ca^{2+} - reichem Medium nach der Inkubation mit BTP2 ergab, dass die Differenz der Steigung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen in Ca^{2+} - freiem Milieu mit der Differenz in Ca^{2+} - reichem Milieu nicht signifikant ist ($p = 0,064$) (Ergebnisse nicht angeführt).

Auch bezüglich der Aktivität der γ – Sekretase konnten rechnerisch interessante Hinweise ermittelt werden. Hierfür wurden die unabhängigen Messungen ihrer Aktivität in MEF WT und MEF STIM1/2 $-/-$ mit und ohne Ca^{2+} im Medium genauer betrachtet. Es fiel auf, dass die Enzymaktivität in der Messung ohne Ca^{2+} sowohl in MEF WT als auch in MEF STIM1/2 $-/-$ stark gesteigert war. Dabei stieg die Enzymaktivität in MEF WT in Ca^{2+} - freiem Medium verglichen zu MEF WT in Ca^{2+} - reichem Medium auf $375,57 \% \pm 15,31$ ($p \leq 0,001$) (Abb.38). Analog dazu stieg die Enzymaktivität in MEF STIM1/2 $-/-$ in der Messung ohne Ca^{2+} verglichen zur Messung der Enzymaktivität in MEF STIM1/2 $-/-$ in Ca^{2+} - reichem Medium auf $173,95 \% \pm 2,47$ ($p \leq 0,001$) (Abb.38).

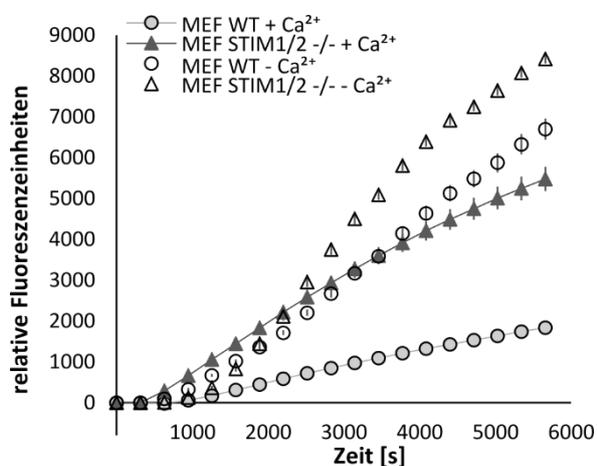


Abb. 38: γ -Sekretase-Aktivität in MEF STIM1/2 $-/-$ in Ca^{2+} -reichem bzw. Ca^{2+} - freiem Messmedium

Messung der γ -Sekretase-Aktivität in lebenden MEF STIM1/2 $-/-$ und MEF WT als Kontrolle unter Verwendung von Ca^{2+} - reichem ($n=60$ aus drei unabhängigen Messungen) und - freiem ($n=20$ aus einer Messung) Messmedium. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U Test berechnet. n = Anzahl an Proben.

4.4 VERÄNDERUNGEN VON SOCE UND VGCC IN HUMANEN *post mortem* HIRNPROBEN

4.4.1 Hirnproben

Die Genexpression von Proteinen, die an SOCE beteiligt sind (ORAI1 – 3, STIM1, STIM2) sowie von Vertretern der VGCC – Familie (CavB, CavD) wurde zusätzlich in *post mortem* Hirnproben von AD – Patienten untersucht. Die Untersuchung der Genexpression erfolgte mittels qRT - PCR wie in 3.2.2.5 beschrieben. Die statistische Auswertung ist in 3.2.5 erläutert. Die komplette Liste über verwendete Primer ist in 3.2.2.5 Tab. 9 zu finden.

Wie in 3.2.5.1 geschildert, erfolgte die Zuordnung zur jeweiligen Kohorte anhand des Braak-Stadiums. Demnach bildeten 157 Hirnproben, die den Braak – Stadien IV – VI zugeteilt werden konnten, die AD – Kohorte, sodass folglich die Hirnproben mit den Braak – Stadien 0 – III die Kontrollkohorte (n = 71) bildeten. Dem Anhang ist die Liste der verwendeten Hirnproben beigelegt.

Zunächst wurde untersucht, ob es generelle Unterschiede zwischen der AD – und der Kontrollkohorte bzgl. der Genexpression gibt. Hierbei konnte eine signifikante Steigerung der Genexpression von allen aufgeführten Genen in der AD – Kohorte aufgezeigt werden (Abb.39).

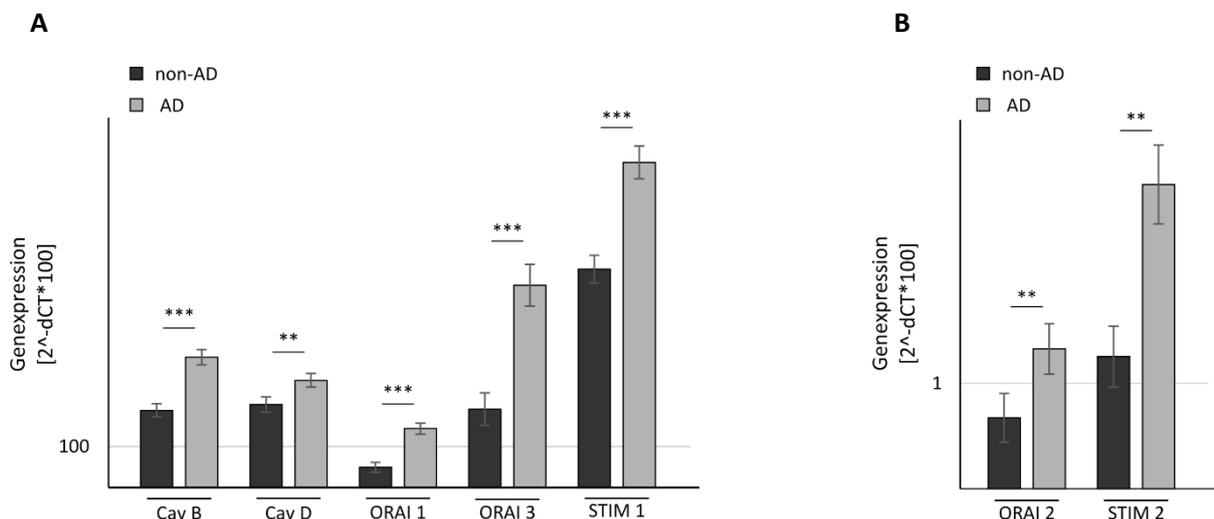


Abb. 39: Genexpression von STIM, ORAI und VGCC in humanen *post mortem* Hirnproben

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Insgesamt wurden 228 Hirnproben untersucht, davon sind 157 der AD-Kohorte und 71 der Kontrollkohorte zuzuordnen. **A:** Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI3 und STIM1. **B:** Genexpression von ORAI2 und STIM2. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U Test berechnet. (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

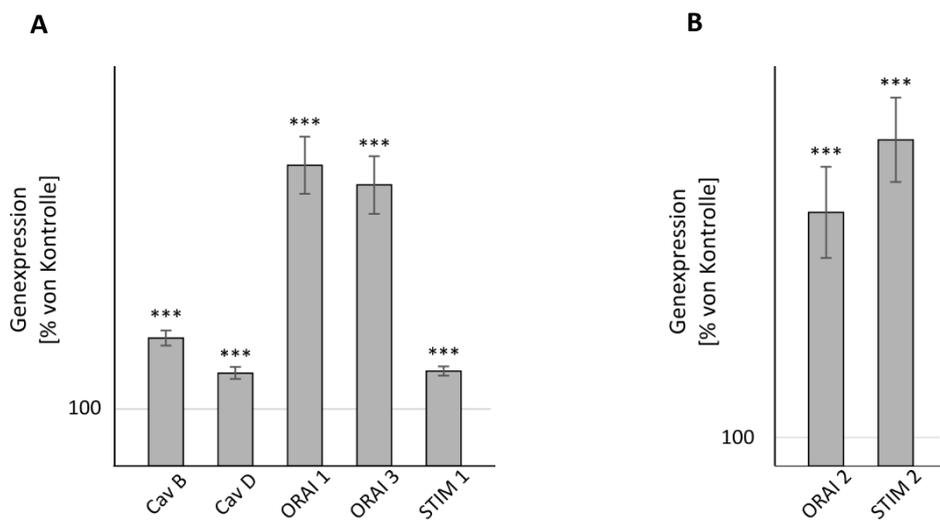


Abb. 40: Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 und STIM2 in humanen *post mortem* Hirnproben als [%]-Anteil der Kontrolle

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Insgesamt wurden 228 Hirnproben untersucht, davon stammen 157 aus der AD-Kohorte und 71 aus der Kontrollkohorte. Angaben in [%]-Anteil der Kontrolle. **A:** Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI3 und STIM1. **B:** Genexpression von ORAI2 und STIM2. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U Test berechnet. (***) $p \leq 0,001$.

So zeigten die AD – Hirnproben gegenüber der Kontrollkohorte eine signifikante Erhöhung der Genexpression von CavB auf $224,16 \% \pm 13,1$ ($p \leq 0,001$), CavD auf $162,89 \% \pm 10,4$ ($p \leq 0,001$), ORAI1 auf $526,26 \% \pm 50,2$ ($p \leq 0,001$), ORAI2 auf $888,02 \% \pm 159,7$ ($p \leq 0,001$), ORAI3 auf $491,9 \% \pm 50,4$ ($p \leq 0,001$), STIM1 auf $166,36 \% \pm 8,3$ ($p \leq 0,001$) sowie von STIM2 auf $1142,2 \% \pm 147,8$ ($p \leq 0,001$) (Abb.40).

Neben dem Alter gibt es weitere Faktoren, die mit der AD - Pathogenese assoziiert sind. Dazu gehören u.a. das Geschlecht und der ApoE – Status. Mithilfe der Braak – Stadien kann der Progress der Krankheit quantifiziert werden. Somit wurde im Folgenden die Genexpression anhand der Hirnproben aus der Hirngewebebank unter dem Aspekt der vier Faktoren analysiert.

4.4.1.1 Einfluss des Alters auf die Genexpression

Im ersten Schritt wurde der Einfluss des Alters auf die Genexpression Kohorten übergreifend untersucht. Hierfür erfolgte vorerst eine Korrelationsanalyse. Da keine Normalverteilung gegeben war, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho bestimmt. Dabei korrelierte nach Cohen (1988) das Alter signifikant negativ mit den Genen CavB ($r = -0,19$, $p = 0,004$), CavD ($r = -0,397$, $p \leq 0,001$), ORAI1 ($r = -0,166$, $p = 0,012$), und STIM1 ($r = -0,137$, $p = 0,038$), wobei die Korrelation mit CavD einem mittleren und die Korrelation mit den restlichen Genen einem schwachen Effekt entsprach. Die anschließende lineare Regressionsanalyse zeigte einen möglichen linearen Zusammenhang auf. Dieser war signifikant

für die Genexpression von CavB ($F(1,226)=7,282$, $p = 0,007$), CavD ($F(1,226)=13$, $p \leq 0,001$) und STIM1 ($F(1,226)=4,24$, $p = 0,041$). Pro Jahr würde demnach die Genexpression von CavB um 4,4 Einheiten (kor. $R^2 = 0,027$), CavD um 5,3 (kor. $R^2 = 0,05$) und STIM1 um 7,2 Einheiten (kor. $R^2 = 0,014$) sinken. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass das Modell der angewandten Regressionsanalyse einen linearen Zusammenhang untersucht. Gegebenenfalls würden andere Modelle den Zusammenhang besser repräsentieren. Möglicherweise aus diesem Grund ist das Modell der linearen Regressionsanalyse für ORAI1 nicht signifikant.

Ein weiterer interessanter Aspekt war außerdem zu untersuchen, ob es signifikante Unterschiede zwischen den jüngeren und den älteren Probanden in Bezug auf die Genexpression gab. Dafür wurden sechs einzelne Altersgruppen gebildet, wobei die erste Gruppe Probanden zwischen 60 und 69 Jahren ($n=19$), die zweite zwischen 70 und 74 ($n=20$), die dritte zwischen 75 und 79 ($n=34$), die vierte zwischen 80 und 84 ($n=43$), die fünfte zwischen 85 und 89 ($n=59$) und die sechste zwischen 90 und 99 Jahren ($n=53$) enthielt. Um zu überprüfen, ob durch die Gruppeneinteilung keine Informationsverluste entstanden, wurde erneut eine Korrelationsanalyse diesmal Gruppen bezogen durchgeführt. CavB ($r=-0,193$, $p= 0,003$), CavD ($r= -0,404$, $p \leq 0,001$) und ORAI1 ($r=-0,157$, $p = 0,018$) erfuhren keine signifikanten Veränderungen, wohingegen STIM1 ($r= -0,117$, $p = 0,077$) leicht an Korrelationsstärke eingebüßt hatte. Dies sollte bei der weiteren Analyse berücksichtigt werden. Man sollte außerdem beachten, dass der Korrelationskoeffizient von der Verteilung der unabhängigen Variable abhängt. Um sicherzugehen, dass der Korrelationskoeffizient nicht aufgrund der unterschiedlichen Gruppengröße verzerrt wurde, wurden der Mittelwert ($82,6$ Jahre $\pm 8,6$ Standardabweichung) und das Median (84 Jahre $\pm 6,8$ mittlere Abweichung) der Variable „Alter“ miteinander verglichen. Da diese nicht wesentlich auseinander lagen, konnte davon ausgegangen werden, dass die unabhängige Variable „Alter“ annähernd normalverteilt war und somit die unterschiedliche Gruppengrößen keinen signifikanten Einfluss auf den Korrelationskoeffizienten hatten. Folglich wurde eine einfaktorielle ANOVA berechnet, um zu bestimmen, ob es einen Unterschied zwischen den jüngeren Gruppen im Vergleich zu den älteren gab. Die Voraussetzungen waren nicht ideal – die Daten zeigten keine Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, $p \leq 0,05$) und es lagen Ausreißer vor - aber erfüllt. Bei Varianzhomogenität (Levene-Test, $p \leq 0,05$) wurde demnach die Welch-ANOVA berechnet. Die Genexpression unterschied sich statistisch signifikant zwischen den Altersgruppen für die Gene CavD ($F(5, 73,69)=10,313$, $p \leq 0,001$) und STIM2 ($F(5, 70,883)=4,232$, $p = 0,002$), wobei der Welch-Test für CavB knapp oberhalb des Signifikanzniveaus lag ($F(5, 76,152)= 2,316$, $p = 0,052$). Der anschließend durchgeführte Games-Howell *post-hoc* Test zeigte folgendes Ergebnis:

- CavD: Die Genexpression unterschied sich zwischen den Gruppen mit 90-99 und 70-74 Jahren (-107,97, 95%-CI [-213,49, -2,46], $p = 0,043$), zwischen 90-99 und 75-79 Jahren (-145,33, 95%-CI [-233,87, -56,79], $p \leq 0,001$) sowie zwischen 90-99 und 80-84 Jahren (-220,38, 95%-CI [-369,93, -70,76], $p = 0,001$). Dabei war der Unterschied zwischen den Gruppen mit 90-99 und 60-69 nicht signifikant (-118,55, 95%-CI [-243,43, 6,32], $p=0,069$). Auch zwischen den Gruppen 85-89 und 75-79 Jahren (-137,4, 95%-CI [-224,76, -50,03], $p \leq 0,001$) sowie zwischen 85-89 und 80-84 Jahren (-212,45, 95%-CI[-361,4, -63,5], $p = 0,001$) lagen signifikante Unterschiede vor. Jedoch war der Unterschied zwischen 85-89 und 70-74 ($p = 0,067$) nicht signifikant (Abb.41 A).
- STIM2: Die Genexpression von STIM2 unterschied sich nur zwischen den Gruppen 90-99 und 60-69 Jahren statistisch signifikant (-5,78, 95%-CI [-11,47, -0,08], $p = 0,046$) (Abb.41 B).

Zusammenfassend lässt sich über die Genexpression von CavD und STIM2 sagen, dass mit steigendem Alter die Genexpression signifikant sinkt.

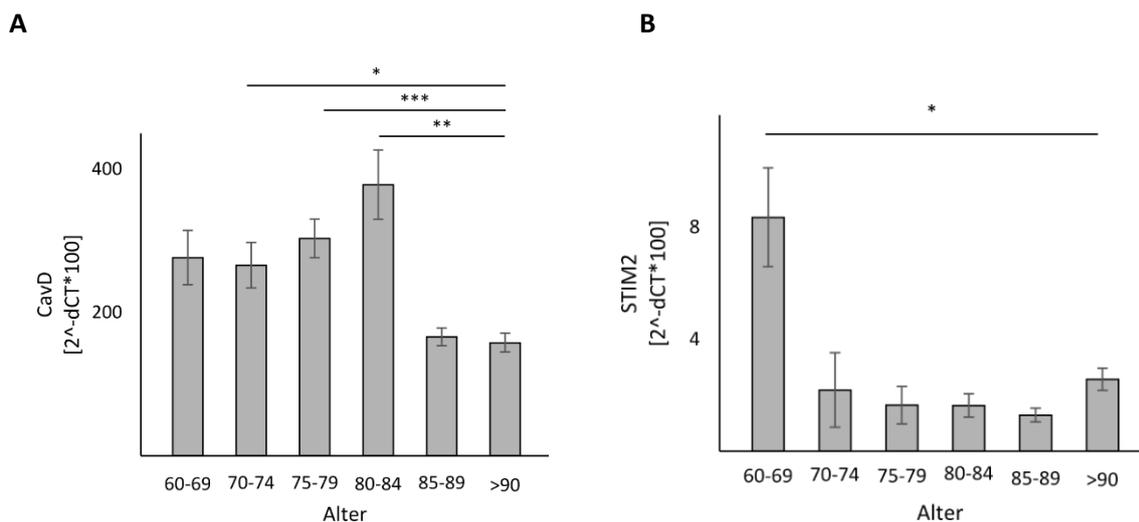


Abb. 41: Genexpression von CavD und STIM2 abhängig von Alter in humanen *post mortem* Hirnproben

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Es erfolgte eine Aufteilung nach Alter in 6 Gruppen, wobei AD – und Kontrollproben gemeinsam eingeschlossen wurden. 60-69 Jahre n=19, 70-74 Jahre n=20, 75-79 Jahre n=34, außer STIM2 n=33, 80-84 Jahre n=43, 85-89 Jahre n= 59 und >90 Jahre n=53, außer ORA12 n=52. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz zwischen den einzelnen Altersgruppen wurde anhand der Welch-ANOVA berechnet. **A:** Genexpression von CavD **B:** Genexpression von STIM2 (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). n = Anzahl an Proben.

Um zu untersuchen, inwiefern das Alter tatsächlich als eigenständiger Faktor diesen Einfluss auf die Genexpression ausübt, wurden nun die Daten wie oben erwähnt in einzelne Kohorten (3.2.5.1) unterteilt und den gleichen Analysen unterzogen.

Dabei fiel auf, dass die Genexpression der meisten Gene nur in der AD-Kohorte mit dem Alter korrelierte. Auch hier wurde aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Genexpression (Shapiro-Wilk-Test, $p \leq 0,05$) der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho berechnet. So korrelierte nach Cohen (1988) das Alter signifikant negativ mit CavB ($r = -0,259$, $p = 0,001$), CavD ($r = -0,495$, $p \leq 0,001$), ORAI1 ($r = -0,229$, $p = 0,004$), ORAI3 ($r = -0,172$, $p = 0,031$) und STIM1 ($r = -0,215$, $p = 0,007$), was für CavD einem mittleren Effekt und für die restlichen Gene einem schwachen Effekt entsprach. Bemerkenswert ist hierbei, dass CavD als einziges Gen auch in der Kontrollkohorte mit dem Alter negativ korrelierte ($r = -0,248$, $p = 0,037$), was nach Cohen (1988) einen schwachen Effekt ausmachte. Die anschließende einfache lineare Regressionsanalyse ließ in der AD-Kohorte für CavB ($F(1,155) = 8,46$, $p = 0,004$), CavD ($F(1,155) = 14,49$, $p \leq 0,001$) und STIM1 ($F(1,155) = 6,62$, $p = 0,011$) einen linearen Zusammenhang vermuten. Dabei würde pro Jahr die Genexpression von CavB um 6,25 Einheiten (kor. $R^2 = 0,046$), CavD um 7,22 Einheiten (kor. $R^2 = 0,08$) und von STIM1 um 11,87 Einheiten (kor. $R^2 = 0,035$) sinken. Für die restlichen Gene, die ebenfalls mit dem Alter korrelierten, war ein lineares Regressionsmodell nicht geeignet.

Auch hier stellte sich die Frage, ob die Abnahme der Genexpression mit steigendem Alter auch wirklich signifikant ist. Wie oben bereits geschildert, wurden hierfür sechs Altersgruppen gebildet. Die Gruppen bezogene Korrelationsanalyse ergab für CavB ($r = -0,252$, $p = 0,001$), CavD ($r = -0,501$, $p \leq 0,001$), ORAI1 ($r = -0,223$, $p = 0,005$) und STIM1 ($r = -0,185$, $p = 0,02$) keine nennenswerten Unterschiede. Jedoch erfuhr ORAI3 ($r = -0,156$, $p = 0,051$) eine leichte Einschränkung der Korrelationsstärke, was berücksichtigt werden muss. Um die Signifikanz des Unterschieds zwischen den jüngeren und den älteren Probanden zu erfassen, wurde die einfaktorielle ANOVA berechnet. Die Voraussetzungen waren erneut aufgrund der fehlenden Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, $p \leq 0,05$) und der Ausreißer nicht ideal, aber erfüllt. Bei Vorliegen einer Varianzhomogenität berechnet nach Levene ($p \leq 0,05$) wurde eine Welch-ANOVA durchgeführt. Die Genexpression von CavD ($F(5, 48,49) = 9,69$, $p \leq 0,001$) und STIM2 ($F(5, 47,22) = 2,6$, $p = 0,037$) unterschied sich demnach signifikant zwischen den Gruppen. Erwähnenswert ist die Genexpression von CavB ($F(5, 51,17) = 2,21$, $p = 0,067$), die mäßig über dem Signifikanzniveau lag. Da die Welch-ANOVA nur aussagt, dass es einen signifikanten Unterschied gibt, aber nicht zwischen welchen Gruppen, erfolgte die weitere Untersuchung mittels Games-Howell *post-hoc* Test. Dieser ergab folgende Ergebnisse:

- CavD: Die Genexpression unterschied sich signifikant zwischen den Gruppen mit 90-99 und 60-69 Jahren ($-176,9$, 95%- CI $[-332,45, -21,36]$, $p = 0,022$), zwischen 90-99 und 75-79 Jahren ($-158,66$, 95%- CI $[-269,37, -47,97]$, $p = 0,002$) und zwischen 90-99 und 80-84 Jahren (-

257,08, 95%- CI[-447,17, -66,98], $p = 0,003$), sowie zwischen den Gruppen 85-89 und 60-69 Jahren (-170,3, 95%- CI[-325,24, -15,35], $p = 0,028$), zwischen 85-89 und 75-79 Jahren (-152,05, 95%- CI[-261,54, -42,55], $p = 0,03$) und zwischen 85-89 und 80-84 Jahren (-250,47, 95%-CI[-439,86, -61,07], $p = 0,004$) (Abb.42).

- STIM2: Es deutete sich an, dass die Genexpression zwischen den Gruppen 85-89 und 60-69 Jahren (-7,78, 95%- CI[-15,76, 0,19], $p = 0,057$) abnahm. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Dieses Ergebnis, bei dem die Welch-ANOVA einen signifikanten Unterschied anzeigt und der *post-hoc* Test nicht signifikant ausfällt, könnte dem Umstand geschuldet sein, dass die beiden Verfahren möglicherweise unterschiedliche Testpower besitzen oder die Signifikanz unterschiedlich berechnen. (<https://statistikguru.de/spss/einfaktorielle-anova/tukey-post-hoc-test.html>, letzter Aufruf 05.03.2019).

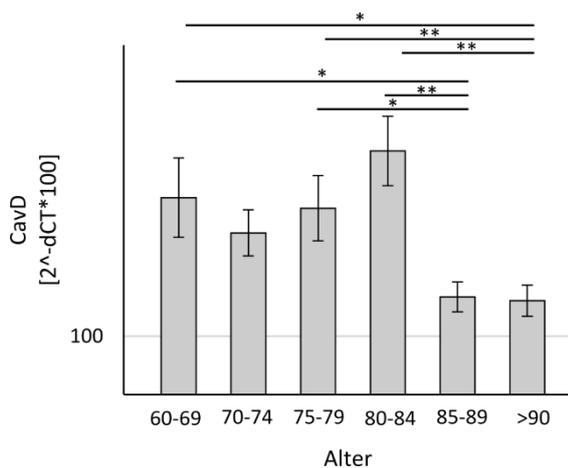


Abb. 42: Genexpression von CavD abhängig von Alter in humanen *post mortem* Hirnproben der AD-Patienten

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Die AD-Kohorte wurde abhängig vom Alter in 6 Gruppen aufgeteilt. 60-69 Jahre $n=13$, 70-74 Jahre $n=13$, 75-79 Jahre $n=23$, 80-84 Jahre $n=31$, 85-89 Jahre $n=38$ und >90 Jahre $n=39$. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz zwischen den einzelnen Altersgruppen wurde anhand der Welch-ANOVA berechnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). $n =$ Anzahl an Proben.

In der Kontrollkohorte hingegen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die Genexpression von CavD mit steigendem Alter unabhängig vom gesundheitlichen Status signifikant abnimmt. Für STIM2 gibt es allerdings nur einen nicht signifikanten Hinweis, dass seine Genexpression bei Vorliegen von AD abnehmen würde.

Um den Zusammenhang zwischen Alter, Alzheimer-Erkrankung und Genexpression genauer zu untersuchen, erfolgte eine multiple lineare Regressionsanalyse, bei welcher das Alter als intervallskalierte und die Alzheimer-Erkrankung als dichotome unabhängige Variablen miteinbezogen

wurden. Es zeigte sich, dass das Modell der multiplen linearen Regressionsanalyse für die Gene CavB ($F(2, 225) = 14,28, p \leq 0,001$), CavD ($F(2,225) = 9,33, p = \leq 0,001$), ORAI1 ($F(2, 225) = 10,76, p = \leq 0,001$), ORAI3 ($F(2, 225) = 8,25, p = \leq 0,001$), STIM1 ($F(2,225) = 11,192, p \leq 0,001$) und STIM2 ($F(2, 224) = 13,36, p \leq 0,001$) hoch signifikant war, wobei allein das Vorliegen der Alzheimer-Krankheit die Genexpression steigerte, wohingegen mit steigendem Alter die Genexpression sank. Allerdings war in diesem Modell die Variable „Alter“ nur für CavB, CavD, STIM1 und STIM2 von signifikanter Bedeutung. Somit würde sich folgendes Bild ergeben:

- CavB: Die Genexpression steigt bei Vorliegen von Alzheimer-Krankheit um 132,62 Einheiten ($p \leq 0,001$) und sinkt pro Jahr um 4,68 Einheiten ($p = 0,003$). Mit korrigiertem $R^2 = 0,105$ erklären das Alter und die Alzheimer-Krankheit 10,5% der Varianz um den Gesamtmittelwert der Genexpression, was nach Cohen (1992) einer mittleren Effektstärke entspricht ($f^2 = 0,34$).
- CavD: Die Genexpression von CavD würde bei Alzheimer-Krankheit um 62,66 Einheiten ($p = 0,021$) steigen und pro Jahr um 5,39 Einheiten ($p \leq 0,001$) sinken. Die Effektstärke berechnet nach Cohen (1992) bildete auch hier einen mittleren Effekt ab ($f^2 = 0,27$).
- ORAI1: Die Genexpression von ORAI1 scheint keinen linearen Zusammenhang mit dem Alter zu haben. Durch das Modell der multiplen linearen Regressionsanalyse wird 7,9 % der Varianz des Gesamtmittelwerts der Genexpression erklärt, was einem mittleren Effekt entspricht ($f^2 = 0,29$). Die Genexpression würde bei der Alzheimer-Krankheit um 95,05 Einheiten steigen ($p \leq 0,001$).
- ORAI3: Auch für ORAI3 lässt sich kein linearer Zusammenhang zwischen dem Alter und der Genexpression erkennen. Bei Alzheimer-Krankheit steigt jedoch die Genexpression um 305,79 Einheiten ($p \leq 0,001$). Hierbei betrug korrigiertes $R^2 = 0,06$, was nach Cohen (1992) ebenfalls einem mittleren Effekt entsprach ($f^2 = 0,25$).
- STIM1: Die Genexpression von STIM1 wies wiederum einen linearen Zusammenhang sowohl mit dem Alter als mit der Alzheimer-Krankheit auf. Somit würde die Genexpression bei Alzheimer um 265,06 Einheiten ($p \leq 0,001$) steigen und pro Jahr um 7,74 Einheiten abnehmen ($p = 0,02$). Die anhand des korrigierten $R^2 = 0,082$ ermittelte Effektstärke f^2 betrug 0,29, was auch einen mittleren Effekt widerspiegelte.
- STIM2: Die Genexpression von STIM2 verhielt sich analog zu STIM1. Hier würde die Genexpression um 1,72 Einheiten ($p = 0,003$) steigen und pro Jahr um 0,131 Einheiten ($p \leq 0,001$) sinken.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass das Alter signifikant negativ mit der Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI3 und STIM1 korreliert. Allerdings liegt diese Korrelation für die Gene CavB, ORAI1, ORAI3 und STIM1 nur in Kombination mit der Alzheimer-Krankheit vor. Da für CavD auch in der Kontrollkohorte eine Korrelation festgestellt werden konnte, wird die Vermutung nahegelegt, dass CavD auch bei klinisch gesunden Probanden mit steigendem Alter negativ korrelieren würde ($r = -0,248$, $p = 0,037$).

4.4.1.2 Einfluss des Braak-Stadiums auf die Genexpression

Bei der Analyse des Einflusses des Braak – Stadiums auf die Genexpression konnten die Hirnproben insgesamt zu 7 Gruppen zugeordnet werden (Braak – Stadium 0 bis VI). Aufgrund der fehlenden Normalverteilung in den einzelnen Gruppen (Shapiro-Wilk-Test, $p \leq 0,05$) und der ordinalen Skalierung der unabhängigen Variable wurde für die Korrelationsanalyse der Spearman-Rho Koeffizient berechnet. Alle Gene korrelierten nach Cohen (1988) signifikant positiv mit dem Braak - Stadium. Somit ergab sich für CavB ($r = 0,421$, $p \leq 0,001$), CavD ($r = 0,275$, $p \leq 0,001$), ORAI1 ($r = 0,475$, $p \leq 0,001$), ORAI2 ($r = 0,29$, $p \leq 0,001$), ORAI3 ($r = 0,427$, $p \leq 0,001$), STIM1 ($r = 0,344$, $p \leq 0,001$) und STIM 2 ($r = 0,225$, $p \leq 0,001$), wobei die Korrelation für CavB, ORAI1, ORAI3 und STIM1 einen mittleren Effekt und alle anderen Gene einen schwachen Effekt zeigten. Die anschließend durchgeführte einfache lineare Regressionsanalyse lieferte einen Hinweis auf einen teilweise linearen Zusammenhang bei den Genen CavB ($F(5, 218) = 5,89$, $p \leq 0,001$), ORAI1 ($F(5, 218) = 5,65$, $p \leq 0,001$), ORAI3 ($F(5, 218) = 5,13$, $p \leq 0,001$), STIM1 ($F(5, 218) = 4,61$, $p = 0,001$) sowie STIM2 ($F(5, 217) = 2,53$, $p = 0,03$). Da Braak-Stadien eine kategoriale Variable mit 6 Ausprägungen abbilden, wurde eine Dummy-Kodierung mit Stadium I als Referenzkategorie vorgenommen. So konnte bei CavB ein linearer Zusammenhang zwischen Genexpression und Braak-Stadium V und Stadium VI festgestellt werden. Somit würde die Genexpression im Stadium V im Vergleich zum Stadium I um 142,85 Einheiten ($p \leq 0,001$) und im Stadium VI verglichen zum Stadium I um 167,83 ($p \leq 0,001$) Einheiten steigen. Dies entspricht nach Cohen (1988) einem mittleren Effekt ($f^2 = 0,33$, $R^2 = 0,099$). Auch die Genexpression von ORAI1 zeigte ebenfalls einen linearen Zusammenhang der Stadien V und VI. So würde im Stadium V die Genexpression um 78,14 Einheiten ($p = 0,009$) und im Stadium VI um 138,45 Einheiten ($p \leq 0,001$) im Vergleich zum Stadium I steigen. Auch das ist ein mittlerer Effekt ($f^2 = 0,32$, kor. $R^2 = 0,094$). Für ORAI3 konnten analoge Verhältnisse festgehalten werden. Demzufolge hingen Stadium V und Stadium VI linear mit der Genexpression von ORAI3 zusammen, sodass im Stadium V die Genexpression um 257,23 Einheiten ($p = 0,018$) und im Stadium VI um 467,95 Einheiten ($p \leq 0,001$) im Vergleich zum Stadium I stiegen. Nach Cohen (1988) ist das ein mittlerer Effekt ($f^2 = 0,3$, $R^2 = 0,085$). Der lineare Zusammenhang konnte auch teilweise bei der Genexpression von STIM1 beobachtet werden. Im Vergleich zum Stadium I würde die Genexpression

im Stadium V um 214,12 Einheiten ($p = 0,014$) und im Stadium VI um 319,65 Einheiten steigen ($p=0,002$). Nach Cohen (1988) ist es ein mittlerer Effekt ($f^2 = 0,28$, $R^2 = 0,075$). Die Genexpression von STIM2 wies einen linearen Zusammenhang nur zwischen Genexpression und Stadium VI auf. Demnach würde die Genexpression im Vergleich zum Stadium I um 20,7 Einheiten steigen ($p = 0,029$). Nach Cohen (1988) ist es ein mittlerer Effekt ($f^2 = 0,18$, $R^2=0,03$).

Kurz zusammengefasst bedeutet das Ergebnis der multiplen linearen Regressionsanalyse, dass man mit der Variable „Braak-Stadium“ die Genexpression vorhersagen kann. Hierbei zeigen bei CavB, ORAI1, ORAI3, STIM1 und STIM2 Stadium V und/oder VI einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression. Dass restliche Stadien kein signifikantes Ergebnis ergeben haben, könnte an der inhomogenen Gruppenverteilung liegen.

4.4.1.3 Einfluss von ApoE auf die Genexpression

Das $\epsilon 4$ – Allel von ApoE gilt als ein Risikofaktor für die Entwicklung von AD (2.1.3; 5.5.3). Aus diesem Grund wurde der ApoE – Allelstatus als ein möglicher Einflussfaktor in der Genexpression in Betracht gezogen.

Der Mittelwert ($2^{-\Delta CT} * 100$), der Standardfehler und die Probenanzahl sind in Tab.18 aufgeführt. Es fällt dabei die inhomogene Gruppenverteilung auf. So beinhaltet die Gruppe $\epsilon 2\epsilon 2$ nur zwei Proben, weswegen sie bei der weiteren Analyse nur begrenzt berücksichtigt werden konnte, um so der Verzerrung von Ergebnissen entgegenzuwirken.

Tab. 18: Übersicht über mittlere Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 und STIM2 abhängig von ApoE-Allelstatus in humanen *post mortem* Hirnproben

		Cav B	Cav D	ORAI1	ORAI2	ORAI3	STIM1	STIM2
$\epsilon 2\epsilon 2$	n	2	2	2	1	2	2	2
	MW	148,8	276,8	41	1,3	196	678,9	34,8
	SE	33,9	195,6	3,12		8,15	72,7	29
$\epsilon 3\epsilon 2$	n	11	11	11	11	11	11	11
	MW	187	178,5	44,2	4,4	160,6	486	5,9
	SE	24,9	31,6	13,8	1,4	34,9	33,15	2,7
$\epsilon 3\epsilon 3$	n	64	64	64	64	64	64	64
	MW	277,6	258	111,2	9,3	392,8	707,3	24,7
	SE	29	32,7	19,5	2,6	67,7	65,6	5,7
$\epsilon 4\epsilon 2$	n	6	6	6	6	6	6	6
	MW	546,7	304,7	187	17,5	428,3	971,1	53,7
	SE	182,2	94,8	75,5	13,9	153,9	305,3	20,5
$\epsilon 4\epsilon 3$	n	77	77	77	77	77	77	76
	MW	289,1	215,7	121,4	14,9	420	741,7	22,8
	SE	24,7	20,4	19,7	3,9	70	56,3	4,7
$\epsilon 4\epsilon 4$	n	20	20	20	20	20	20	20
	MW	334,4	280,2	154,9	7,4	517,7	822	34,5
	SE	43,7	23,4	38,5	2	138,1	82,4	13,8

Um zu untersuchen, ob es einen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen gibt, wurde eine einfaktorielle ANOVA berechnet. Bei fehlender Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, $p \leq 0,05$) und bei Vorliegen von Ausreißern waren die Voraussetzungen nicht ideal. Da diese zwei Voraussetzungen nicht zwangsläufig erfüllt sein müssen, wurde mit der ANOVA fortgefahren. Die Varianzhomogenität war für die Gene CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3 und STIM1 gemäß dem Levene-Test ($p \geq 0,05$) gegeben. Allerdings ergab die ANOVA für die oben genannten Gene keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Da, wie oben geschildert, es vorkommen kann, dass die ANOVA zwar nicht signifikant ausfällt, aber die *post-hoc* Tests sehr wohl signifikante Ergebnisse, bedingt u.a. durch die unterschiedliche Art, die Signifikanz zu testen, aufzeigen können, konnte im Anschluss der Games-Howell-Test für CavD, ORAI1, ORAI3 und STIM1 berechnet werden. Dabei konnte für ORAI1 ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen $\epsilon 3\epsilon 2$ und $\epsilon 4\epsilon 3$ ($-77,2$, 95%- CI $[-148,1, -6,3]$, $p = 0,025$)

ermittelt werden. Bei einer mittleren Differenz von -77,2 ist also die Genexpression in der Gruppe $\epsilon_4\epsilon_3$ um 77,2 [$2^{\wedge}\text{-dCT} * 100$] höher als in der Gruppe $\epsilon_3\epsilon_2$. Außerdem wurde zwischen den Gruppen $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_3\epsilon_3$ ebenfalls ein Unterschied angedeutet (-67, 95 %- CI [-137,6, 3,6], $p = 0,07$), welcher jedoch nicht signifikant war. Für ORAI3 wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. So lag ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den Gruppen $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_4\epsilon_3$ (-259,4, 95 %- CI [-487,9, -30,9], $p=0,017$) als auch zwischen den Gruppen $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_3\epsilon_3$ (-232,1, 95 %- CI [-455,3, -8,9], $p=0,037$) vor. Auch bei STIM1 war der Unterschied zwischen den Gruppen $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_4\epsilon_3$ (-255,7, 95 %- CI [-447, -64,5], $p = 0,003$) sowie zwischen den Gruppen $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_3\epsilon_3$ (-221,1, 95 %- CI [-436,6, -5,9], $p = 0,04$) signifikant. Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_4\epsilon_4$ (-336, 95 %- CI [-610,2, -61,9], $p = 0,01$) gezeigt werden.

Für die Gene CavB und STIM2 war nach Levene die Varianzhomogenität nicht gegeben ($p \leq 0,05$), sodass eine Welch-ANOVA berechnet wurde. Sowohl CavB ($F(5, 11,25) = 4,01$, $p=0,025$) als auch STIM2 ($F(5, 9,18) = 3,47$, $p = 0,049$) wiesen demnach signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf. Bei dem anschließenden Games-Howell *post-hoc* Test konnte für CavB nur ein nicht signifikanter Hinweis festgestellt werden, dass sich die Gruppe $\epsilon_3\epsilon_2$ von den Gruppen $\epsilon_4\epsilon_3$ (-102,2, 95 %- CI [-207,9, 3,6], $p = 0,063$) und $\epsilon_4\epsilon_4$ (-147,5, 95 %- CI [-301,4, 6,5], $p = 0,066$) unterscheidet. Wohingegen STIM2 einen signifikanten Unterschied sowohl zwischen $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_3\epsilon_3$ (-18,8, 95 %- CI [-37,4, -0,2], $p = 0,046$) als auch zwischen $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_4\epsilon_3$ (-16,9, 95 %- CI [-32,8, -1], $p = 0,031$) aufwies. An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass keine ANOVA für ORAI2 durchgeführt werden konnte. Einer der beiden Ausreißer, die am Anfang der Auswertungen exkludiert wurden, fiel in die Gruppe mit $\epsilon_2\epsilon_2$. Auf diese Weise blieb nur noch eine Probe in der Gruppe, was die weitere Analyse nicht möglich machte.

Es scheint als würde die Genexpression bei einem zusätzlichen ϵ_3 – bzw. ϵ_4 – Allel steigen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde folglich die Inzidenz von jeweils ϵ_3 -Allel und ϵ_4 -Allel untersucht. Somit wurden die Daten in drei Gruppen mit kein ϵ_3 - bzw. ϵ_4 -Allel ($= 0 \times \epsilon_3 / \epsilon_4$), ein ϵ_3 - bzw. ϵ_4 -Allel ($1 \times \epsilon_3 / \epsilon_4$) und zwei ϵ_3 - bzw. ϵ_4 -Allele ($= 2 \times \epsilon_3 / \epsilon_4$) unterteilt. Um zu prüfen, ob es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gibt, erfolgte die statistische Analyse mittels ANOVA. Bei fehlender Normalverteilung, Ausreißern und inhomogener Gruppengröße erbrachte diese jedoch keine signifikanten Unterschiede. Aus diesem Grund wurde der stabilere, nicht – parametrische Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Für die Inzidenz von ϵ_3 -Allel zeigte nur CavD einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($\text{Chi}^2 = 8,3$, $p=0,016$). Für die Gene CavB ($p = 0,079$), ORAI1 ($p = 0,064$) und STIM1 ($p = 0,056$) lag die Signifikanz leicht bis mäßig über dem Signifikanzniveau. Die Genexpression von CavD unterschied sich laut Dunn-Bonferroni *post-hoc* Test signifikant zwischen den Gruppen $1 \times \epsilon_3$ und $0 \times \epsilon_3$ ($z=2,9$, $p = 0,012$). Ein nicht signifikanter Unterschied konnte zwischen den

Gruppen 2 x $\epsilon 3$ und 0 x $\epsilon 3$ ($z = 2,2$, $p = 0,081$) gesehen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Genexpression von CavD sowohl in der Gruppe mit einem $\epsilon 3$ -Allel als auch mit zwei $\epsilon 3$ -Allelen im Vergleich zur Gruppe ohne $\epsilon 3$ -Allel reduziert ist (Abb.43). Bei der Untersuchung der Inzidenz von $\epsilon 4$ -Allel konnten mittels Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen für CavB ($\text{Chi}^2 = 7,3$, $p = 0,025$), CavD ($\text{Chi}^2 = 7,9$, $p = 0,019$) und ORAI1 ($\text{Chi}^2=6,3$, $p = 0,043$) aufgezeigt werden, wobei STIM1 knapp nicht signifikant war ($\text{Chi}^2 = 5,8$, $p=0,056$). Laut Dunn-Bonferroni *post-hoc* Test unterschied sich die Genexpression von CavB signifikant zwischen den Gruppen 0 x $\epsilon 4$ und 2 x $\epsilon 4$ ($z = -2,5$, $p = 0.04$). Die Genexpression von CavD unterschied sich signifikant sowohl zwischen den Gruppen 0 x $\epsilon 4$ und 2 x $\epsilon 4$ ($z = -2,6$, $p = 0,03$) als auch zwischen 1 x $\epsilon 4$ und 2 x $\epsilon 4$ ($z=-2,7$, $p = 0,018$). Auch die Genexpression von ORAI1 unterschied sich signifikant zwischen 0 x $\epsilon 4$ und 2 x $\epsilon 4$ ($z = -2,5$, $p = 0,042$) (Abb.43).

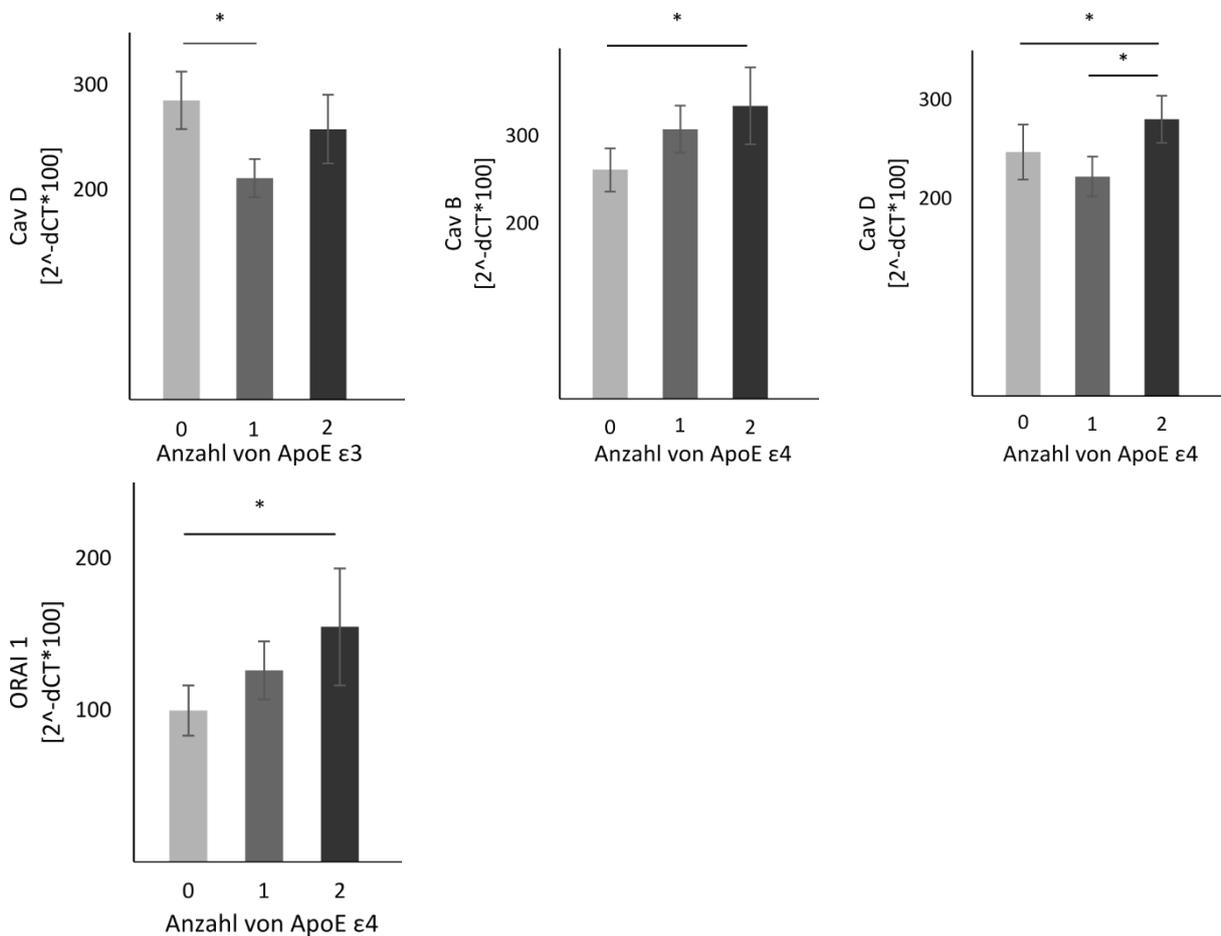


Abb. 43: Genexpression von CavB, CavD und ORAI1 abhängig von Inzidenz von ApoE- $\epsilon 3$ bzw. - $\epsilon 4$ in humanen *post mortem* Hirnproben

Quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR. Die Auswertung richtete sich nach der Anzahl der $\epsilon 3$ - bzw. $\epsilon 4$ - Allele von ApoE. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz zwischen den einzelnen Altersgruppen wurde mittels Kruskal-Wallis Test berechnet ($*p \leq 0,05$). 0x $\epsilon 3$ n=28, 1x $\epsilon 3$ n=88, 2x $\epsilon 3$ n=64, 0x $\epsilon 4$ n=77, 1x $\epsilon 4$ n=83, 2x $\epsilon 4$ n=20. n = Anzahl an Proben.

Somit steht die Inzidenz des ApoE $\epsilon 4$ im direkten Zusammenhang mit der Genexpression von CavB, CavD sowie ORAI1. Während das Vorliegen von zwei $\epsilon 4$ – Allelen die Genexpression von CavD steigert, führen zwei $\epsilon 3$ – Allele zu seiner Reduktion.

Da für das $\epsilon 2$ – Allel AD – protektive Eigenschaften angenommen werden [88], wurde zusätzlich sein Einfluss auf die Gentranskription untersucht. Da jedoch die Gruppe mit zwei $\epsilon 2$ – Allelen nur von zwei Probanden gebildet wurde, erfolgte folglich die Einteilung in zwei Gruppen: die Gruppe mit einem $\epsilon 2$ – und die Gruppe mit keinem $\epsilon 2$ – Allel. Bei fehlender Normalverteilung wurde zur Analyse der Mann – Whitney – U Test angewandt. Jedoch ergab sich für kein Gen ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Nichtsdestotrotz kann hier nicht mit Sicherheit gesagt werden, das $\epsilon 2$ – Allel habe keinen Einfluss auf die Genexpression, da hierbei aufgrund der geringen Anzahl der Gruppe mit zwei $\epsilon 2$ – Allelen die Auswirkungen von zwei $\epsilon 2$ – Allelen nicht überprüft werden konnten.

4.4.1.4 Einfluss des Geschlechts auf die Genexpression

Die Rolle des Geschlechts als Risikofaktor für die Entstehung bzw. Begünstigung von AD wird sehr kontrovers diskutiert (5.5.4).

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Genexpression insgesamt zwischen den beiden Geschlechtern unterscheidet. In die Analyse wurden demnach alle Probanden eingeschlossen. Da keine Normalverteilung vorlag, wurde für die Signifikanzberechnung der nicht – parametrische Mann – Whitney – U Test durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern (CavB $p = 0,251$, CavD $p = 0,449$, ORAI1 $p = 0,266$, ORAI2 $p = 0,293$, ORAI3 $p = 0,486$, STIM1 $p = 0,292$ und STIM2 $p = 0,314$).

Im Folgenden erfolgte die geschlechtsspezifische Aufteilung der Probanden in die AD – und die Kontrollkohorte. Die Genexpression wurde nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet. Der Übersicht halber sind die Ergebnisse in der unten stehenden Tab.19 aufgeführt. Sowohl die Genexpression aller Gene der männlichen Probanden als auch die Genexpression ebenfalls aller Gene der weiblichen Probanden ist in der AD-Kohorte gegenüber der Kontrollkohorte signifikant erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern bezüglich der Genexpression lag jedoch nicht vor.

Tab. 19: Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI2, ORAI3, STIM1 und STIM2 abhängig von Geschlecht in humanen *post mortem* Hirnproben

		Cav B	Cav D	ORAI1	ORAI2	ORAI3	STIM1	STIM2	
Mann	MW	236,21	174,53	579,63	756,01	525,86	177,78	852,98	
	STABW	170,67	156,04	653,64	1436,13	671,00	124,14	1302,74	
	SE	27,69	25,31	106,03	232,97	108,85	20,14	211,33	
	n	AD	36	36	36	36	36	36	36
		Non-AD	33	33	33	33	33	33	32
	Normalverteilung	nein	ja	nein	ja	ja	ja	ja	
	t-Test			0,0070		0,0096	0,0005	0,0006	0,0014
Mann-Whitney-U		≤ 0,001		≤ 0,001					
Frau	MW	214,951	167,679	509,144	935,043	507,054	164,303	1591,793	
	STABW	159,20	125,06	622,60	2165,15	649,05	98,78	2635,62	
	SE	14,47	11,37	56,60	196,83	59,00	8,98	239,60	
	n	AD	121	121	121	121	121	121	121
		Non-AD	38	38	38	37	38	38	38
	Normalverteilung	nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein	
	t-Test			2,68149E-08	4,93489E-11	4,37605E-05	2,6425E-10	7,00197E-11	
Mann-Whitney-U		≤ 0,001						0,004	

MW = Mittelwert in [%] von der Kontrollkohorte.

Um zu überprüfen, ob das Geschlecht mit der Genexpression korreliert, wurde außerdem der Eta-Koeffizient η bestimmt. Es konnte wenig bis keine Korrelation nachgewiesen werden (CavB η = 0,029, CavD η = 0,095, ORAI1 η = 0,008, ORAI2 η = 0,013, ORAI3 η = 0,027, STIM1 η = 0,009, STIM2 η = 0,025).

5. DISKUSSION

5.1 EINFLUSS VON PRESENILIN AUF STIM – PROTEINE UND SOCE

ORAI – Proteine bilden den CRAC – Kanal, welcher über STIM – Proteine als Antwort auf eine ER – Speicherentleerung aktiviert wird. Der dadurch erzeugte Ca^{2+} - Einstrom wird als SOCE bezeichnet. Um zu untersuchen, welchen Einfluss Presenilin auf SOCE hat, erfolgte zunächst die Messung des Ca^{2+} - Signals mittels Ca^{2+} - Imaging (3.2.4) in PS1 und PS2 defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEF PS1/2 -/-) verglichen mit MEF WT (4.1.1.2, Abb. 10). In beiden Zelllinien gab es keine Unterschiede bzgl. der basalen $[Ca^{2+}]_i$. Nach der TG – Gabe wurde in MEF PS1/2 -/- jedoch ein größerer Ca^{2+} – Peak (vgl. ΔTG – Peak Kapitel 4.1.1.2) festgestellt. Der TG – Peak verkörpert den Ca^{2+} - Anstieg im Zytosol, der durch das Freisetzen von Ca^{2+} aus dem ER zustande kommt. Ein hoher Peak lässt somit u.a. auf eine größere Menge an Ca^{2+} schließen, die aus den ER – Speichern freigesetzt wird. Tu *et al.* berichtete von einer Ca^{2+} - Überladung, die sich in stärkerem IP_3 – mediiertem Ca^{2+} - Signal widerspiegelte. Die Applikation von Ionomycin, einem Ionophor, welches Ca^{2+} – permeable Poren in die ER – Membran einbaut, stützte die Hypothese der Ca^{2+} - Überladung der PS1 und PS2 – defizienten MEF. Diese Erkenntnis bahnte den Weg zur Entdeckung der Fähigkeit von PS – Proteinen, Ca^{2+} - permeable Kanäle in der ER - Membran bilden zu können [465]. Ein stärkeres IP_3 – mediiertes Ca^{2+} - Signal konnte des Weiteren sowohl *in vivo* [448] als auch *ex vivo* gezeigt werden [276,277].

Nachdem die ER Speicher durch TG entleert wurden, erfolgte die Gabe von extrazellulärem Ca^{2+} . Im Gegensatz zu Yoo *et al.* konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Veränderung von durch die ER - Depletion verursachten SOCE aufgezeigt werden. Gemäß Yoo *et al.* wird die Aktivität von SOCE durch die Abwesenheit (PS1 -/-) bzw. Funktionsuntüchtigkeit (PS1 – D257A) von PS1 potenziert, während diese in Zellen mit PS überexprimierenden FAD – Mutationen PS1 - M146L oder PS2 - N141I reduziert wurde [499]. Auch Bojarski *et al.* zeigte eine SOCE – Steigerung in MEF PS1/2 -/- und MEF PS1 -/- und eine Reduktion von SOCE in HEK293 mit PS1 überexprimierenden Mutationen PS1 – S170F, - I213F, E318G, P117R und L226F [36]. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf einen SOCE – modulierenden Einfluss von PS1 oder PS2. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch keine Potenzierung von SOCE in MEF PS1/2 -/- gezeigt werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass im Fall von Yoo *et al.* im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit Zellen aus der humanen Spezies verwendet wurden. Zum anderen wurden unterschiedliche Zellmodelle analysiert. So verwendeten Yoo *et al.* Zellen, in denen PS1 oder PS2 – Gene ausgeschaltet oder mittels Plasmiden modifiziert wurden, wobei keine Zelllinie mit einem doppelten Genknockout untersucht wurde. Außerdem unterscheiden sich die Protokolle zur Messung des Ca^{2+} - Signals. Während die Endkonzentration von Fura – 2 – AM in der vorliegenden Arbeit bei 1

μM lag, verwendeten Bojarski *et al.* eine Endkonzentration von $2 \mu\text{M}$ und Yoo *et al.* sogar von $5 \mu\text{M}$. Da für die Lösung von Fura – 2 - AM das zytotoxische Lösungsmittel DMSO [472] verwendet wird, ist es sinnvoll das Volumen und somit die Endkonzentration von Fura – 2 - AM (meist wird eine 1 mM Stocklösung angesetzt) so gering wie möglich zu halten. Fura – 2 – AM ist ein ratiometrischer Farbstoff, dessen Fluoreszenzen bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen gemessen werden, wodurch eine Ratio berechnet werden kann, die weder von der Konzentration in den einzelnen Zellen noch der ungleichmäßigen Verteilung des Farbstoffes abhängig ist [159]. Eine zu hohe Endkonzentration von Fura – 2 – AM selbst ist wiederum ebenfalls toxisch [427]. Basierend auf dem Wissen wurde nach der Etablierung durch die AG Niemeyer (3.2.4) für die Messungen eine möglichst geringe Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$ präferiert. Außerdem verzichteten Yoo *et al.* auf die Zugabe von Thapsigargin und verwendeten eine leicht geringere Ca^{2+} - Konzentration (= $1,8 \text{ mM}$ verglichen zu 2 mM in der vorliegenden Arbeit), um den SOCE – Peak auszulösen. Da Thapsigargin ein effektives Mittel ist, um die Ca^{2+} - Speicher von ER zu entleeren, wurde im Rahmen dieser Arbeit dessen Verwendung als unverzichtbar bewertet. Da die Konzentration von nötigem Thapsigargin u.a. von den unterschiedlichen SERCA – Formen abhängt [462], wurde die höhere Konzentration von $1 \mu\text{M}$ bevorzugt, obwohl die IC_{50} bei $4\text{-}13 \text{ nM}$ liegt [207]. Zusätzlich unterschied sich die Zusammensetzung der Elektrolyte im Messmedium in beiden angeführten Publikationen. Diese Abweichungen können das Messergebnis beeinflussen und die unterschiedlichen Ergebnisse zumindest teilweise erklären. Beim Umgang mit lebenden Organismen nimmt die Zellkultivierung eine entscheidende Rolle ein. So könnte das unterschiedliche Zellkulturmedium ggf. die Funktion der Zellen beeinflussen. Außerdem ist die Funktion der Zellen von der Zellkonfluenz, der Zellpassage und den Kultivierungsbedingungen abhängig. Schließlich könnte auch eine systematische Abweichung zum Ergebnis beitragen.

Das Plateau nach dem SOCE – Peak spiegelt die Sequestrierung von Ca^{2+} in den intrazellulären Kompartimenten wider. U.a. gewinnt die SERCA – Pumpe wieder an Funktion und pumpt die Ca^{2+} - Ionen ins ER zurück. Im Gegensatz zu MEF WT scheint ihre Pumpfunktion jedoch in MEF PS1/2 -/- verlangsamt zu sein. Green *et al.* berichten von einer physikalischen Nähe von PS – Proteinen an die SERCA - Pumpe, die folglich eine Interaktion denkbar macht. Während PS1 und/oder PS2 – defiziente MEF - Zellen eine reduzierte SERCA – Aktivität zeigten, war diese in PS1 oder PS2 überexprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten gesteigert, wobei PS2 die SERCA – Pumpe stärker aktivieren konnte als PS1 [146]. Folglich entfällt die Stimulation der SERCA – Pumpe durch Presenilin – Proteine in PS1 und PS2 defizienten Zellen, was sich in einem im Vergleich zu MEF WT höherem Plateau widerspiegeln könnte (Abb. 44).

Um zu untersuchen, welchen Einfluss jeweils PS1 und PS2 auf das Ca^{2+} - Signal nehmen, wurden zusätzlich MEF PS1res und MEF PS2res vermessen (4.1.1.2, Abb. 10). Analog zu MEF PS1/2 -/- gab es in MEF PS1res keine Veränderungen der basalen $[Ca^{2+}]_i$ und es konnte nach der TG – Gabe eine Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$, welche jedoch im Vergleich zu MEF PS1/2 -/- unverändert war, beobachtet werden. Vermutlich reicht die Funktion von PS1 allein nicht aus, um via passiven Ca^{2+} - Efflux aus dem ER die $[Ca^{2+}]_{ER}$ zu senken, sodass auch hier vermutlich von einer Ca^{2+} - Überladung im ER gesprochen werden kann. Auch hier zeigte sich keine Veränderung bzgl. SOCE verglichen mit MEF WT nach der Ca^{2+} - Zugabe in den Extrazellularraum. Dies unterstützt die Beobachtung von Smith *et al.*, die den Einfluss von PS1 auf den SOCE in SH-SY5Y – Zellen mit einer Überexpression von PS1 - WT und PS1 Δ E9 untersucht haben [434]. Es konnte analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit kein Einfluss von PS1 auf SOCE auf der Aktivitätsebene nachgewiesen werden. Bei der Analyse vom nachfolgenden Plateau schien die Pumpfunktion von SERCA zumindest zum Teil durch den aktivierenden Einfluss von PS1 rekonstruiert worden zu sein. Es wird aus der Annäherung vom Plateau in MEF PS1res Richtung MEF WT ersichtlich.

Schließlich wurde das Ca^{2+} - Signal in MEF PS2res vermessen (4.1.1.2, Abb. 10). Analog zu den zuvor vermessen Zellen gab es auch hier keine Veränderungen der basalen $[Ca^{2+}]_i$, im Vergleich zu MEF PS1/2 -/- kam es hier allerdings zu einer stärkeren Ca^{2+} - Freisetzung aus dem ER. Der hohe TG – Peak scheint auch hier vermutlich durch die Ca^{2+} - Überladung infolge der PS1 – Defizienz erklärbar zu sein. Die Zunahme von TG – Peak gegenüber MEF PS1/2 -/- könnte daran liegen, dass PS2, angetrieben von einer unbekanntem Ursache, IP₃ – bzw. Ryanodin – Rezeptoren aktiviert, die einen stärkeren Ca^{2+} - Efflux bedingen könnten. Leissring *et al.* konnten mittels Überexpression von PS2 – WT sowie PS2 – N141I und PS2 – M239V in *Xenopus laevis* Oozyten eine potenzsteigernde Wirkung von PS2 auf IP₃ – Rezeptoren aufzeigen [277]. Es scheint, dass PS2 in MEF PS2res durch die Aktivierung von IP₃R [76,277] und/oder RyR [274,275] die $[Ca^{2+}]_{ER}$ im Gegensatz zu MEF PS1/2 -/- noch weiter senken kann, was sich in einer größeren Zunahme des TG – Peaks widerspiegelt. Es ist bekannt, dass TG abhängig vom Zelltyp mehr oder weniger stark die SERCA – Pumpe blockieren kann [462]. Abgesehen davon, dass SERCA, kodiert von drei Genen, in zehn Isoformen vorliegt und mit unterschiedlicher Affinität von TG blockiert werden kann, gibt es auch TG – resistente SERCA – Pumpen [208,462], was die Möglichkeit offen lässt, dass in embryonalen Mausfibroblasten eine höhere $[Ca^{2+}]_{ER}$ trotz TG – Gabe zurückbleibt, die folglich durch die zusätzliche Stimulation von IP₃R und RyR in MEF PS2res noch weiter gesenkt werden kann. Außerdem ist die Konzentration an TG bzw. die Dichte von SERCA entscheidend, um davon ausgehen zu können, dass alle SERCA – Pumpen ausreichend geblockt und die ER – Speicher zu 100 % entleert sind. Stimuliert durch PS2 können ER – Speicher via IP₃ – und/oder Ryanodin –

Rezeptoren stärker entleert werden, was in einem stärkerem SOCE mündet. Hier könnten wiederum in Bezug auf SOCE zwei Mechanismen von Bedeutung sein: die stärker entleerten ER – Speicher rekrutieren eine größere Anzahl an STIM – Proteinen oder es wird im stärkeren Ausmaß hauptsächlich STIM1 aktiviert, das für seine höhere Potenz, SOCE zu aktivieren, bekannt ist und im Gegensatz zu STIM2 eher bei tieferen Ca^{2+} - Konzentrationen im ER aktiviert wird. Es ist auch nicht auszuschließen, dass der höhere SOCE auf die Defizienz von PS1 in MEF PS2res zurückzuführen ist [36,499]. Da jedoch der SOCE in MEF PS2res in gleicher Weise sowohl gegenüber MEF WT als auch MEF PS1/2 -/- erhöht ist, ist die Erhöhung von SOCE am ehesten von der stimulierenden Wirkung von PS2 bedingt. Wichtig anzumerken ist, dass durch die Rettung von PS2 in MEF PS1/2 -/- - Zellen (= MEF PS2res) eine Annäherung an die Verhältnisse von MEF WT zu erwarten wäre. Da das Gegenteil im Sinne einer weiteren Steigerung von TG – und SOCE – Peak beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass PS1 möglicherweise einen inhibierenden Einfluss auf die Funktion von PS2 ausübt. Ob der Einfluss über eine direkte Interaktion oder indirekt über Mediatoren ausgetragen wird, muss jedoch untersucht werden.

Der starke SOCE wiederum führt zu einer stärkeren Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. Die durch die Abwesenheit von PS1 nicht ausreichend stimulierte SERCA kommt folglich dem Überangebot der Ca^{2+} - Ionen nicht mehr nach, was durch das erhöhte Plateau zum Ausdruck gebracht wird. Um eine genaue Aussage bzgl. des PS – Einflusses auf SOCE machen zu können, wäre es sinnvoll PS1 und/oder PS2 überexprimierenden Zellen zu vermessen, sowie das Ergebnis in Zellen der humanen Spezies zu verifizieren.

Basierend auf den Ergebnissen von Ca^{2+} - Imaging scheint PS1 keinen Einfluss auf die Translokation und Aktivierung von STIM – bzw. ORAI – Proteinen zu haben, da SOCE weder in MEF PS1/2 -/- noch in MEF PS1res gegenüber MEF WT verändert ist. PS2 hingegen übt eine stimulierende Wirkung auf SOCE aus, was aus dem gesteigerten Ca^{2+} - Signal, welches dem Entleeren der ER – Speicher folgt, in MEF PS2res deutlich gemacht wird. Als nächstes stellte sich die Frage, inwiefern PS1 in die Genregulation von STIM – und ORAI – Proteinen eingreift. Dafür wurde die Genexpression mittels qRT – PCR (3.2.2.5) von ORAI1-3, STIM1/2, STIM2.1 sowie STIM2.2 in MEF PS1/2 -/- vermessen und mit MEF PS1res verglichen (4.1.1.1, Abb. 9). Während die Genexpression von ORAI1, ORAI2, ORAI3 sowie STIM1 signifikant reduziert war, konnte für STIM2 und STIM2.1 eine Steigerung aufgezeigt werden. STIM2.2 blieb unverändert. Trotz der signifikanten Veränderungen auf der Gentranskriptionsebene konnte sich dies nicht im SOCE widerspiegeln. Um die Ergebnisse in humaner Spezies zu verifizieren, wurden zusätzlich SH-SY5Y PS1 -/- untersucht (4.1.1.1, Abb. 9). Die Ergebnisse widersprachen aber denen aus der MEF – Zelllinie. Im Vergleich zu SH-SY5Y WT (mock) wurden hier eine Steigerung der Genexpression

von ORAI1-3 sowie STIM1 und eine Reduktion von STIM2, STIM2.1 und STIM2.2 festgestellt, wobei nur die Genexpression von ORAI1, ORAI2, STIM2 und STIM2.2 das Signifikanzniveau erreichen konnte (Abb. 9). Tong *et al.* lieferten den Nachweis, STIM1 sei ein weiteres Substrat der γ – Sekretase. Analog zu APP schneidet die γ – Sekretase STIM1 an der ähnlichen Sequenz in der Transmembrandomäne. In Zellen mit einer FAD – assoziierten PS1 (M146L) – Mutation führte dies zu einer Verzögerung der STIM1 – Translokation mit der Störung der ORAI1 – Rekrutierung und somit Beeinträchtigung von SOCE als Folge [460]. Somit reguliert PS1 den SOCE über die Degradation von STIM1 herunter (Abb. 44). Im Fall einer PS1 – Defizienz wäre folglich die Degradation von STIM1 beeinträchtigt, was als eine erhöhte Proteinmenge zum Ausdruck kommen würde. Dies sollte allerdings mittels Western Blot bestätigt werden. Bei einer hohen Proteinmenge sollte wiederum im Sinne eines negativen Feedbacks die Genexpression herabgesetzt werden. Dies konnte in den PS1 und PS2 defizienten MEF bestätigt werden. Die scheinbar widersprüchliche Steigerung der Genexpression von STIM1 in SH-SY5Y PS1 -/- liegt vermutlich in der inhomogenen Datenlage begründet. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte bei einer begrenzten Probenzahl in zwei unabhängigen Messungen, wobei in der einen die Genexpression homogen reduziert und in der nächsten homogen gesteigert war, sodass das Gesamtergebnis nicht signifikant ausfiel. Die inhomogenen Messdaten lagen allerdings nicht nur bei der Analyse der Genexpression von STIM1 vor, auch die restlichen ORAI – und STIM – Gene waren davon betroffen. Bei der näheren Analyse der Cq – Werte fiel auf, dass der Mittelwert der Cq – Werte für Aktin, einem Haushaltsgen, bei einer der zwei Messungen in SH - SY5Y PS1 -/- - Zellen überdurchschnittlich höher ausfiel. Während der durchschnittliche Cq – Wert für Aktin bei 16 liegt, lag dieser nun bei 18 (Daten nicht angeführt). Dies hat vermutlich entscheidende Auswirkungen auf die Signifikanz der Ergebnisse der Genexpression von ORAI3 und STIM1 zur Folge. Außerdem wurde zur Normierung im Fall von SH – SY5Y – Zellen der Mittelwert der Haushaltsgene Aktin und TBP verwendet, während im Fall vom MEF – Zellen die Gene mit dem Mittelwert der Cq – Werte von Aktin und ATP – Synthase normiert worden sind. Dies könnte einen wichtigen Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den humanen und murinen Zellen darstellen.

Somit scheinen sowohl PS1 als auch PS2 in der Regulation von SOCE involviert zu sein. Während im Rahmen dieser Arbeit Hinweise aufgedeckt wurden, dass PS1 SOCE möglicherweise über die Degradation von STIM1 herabreguliert, fördert PS2 diesen am ehesten über die Stimulation der ER – Speicherentleerung (Abb. 44).

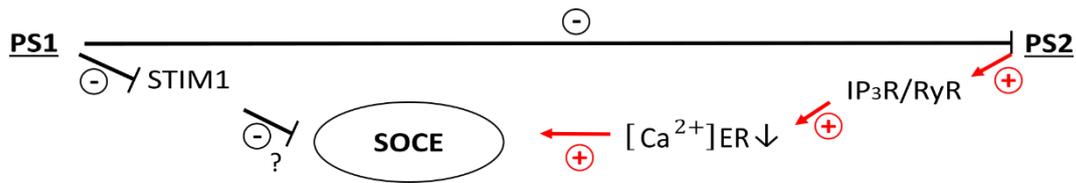


Abb. 44: Schematische Darstellung der Regulation von SOCE durch PS1 und PS2

Während PS1 über die Degradation von STIM1 den SOCE inhibiert, potenziert PS2 über die gesteigerte ER – Speicherentleerung diesen. Außerdem übt PS1 indirekt über die Produktion von AICD/AL2ICD im Zuge der APP- Prozessierung und über die negative Modulierung der PS2-Funktion einen inhibierenden Einfluss auf SOCE.

Um klare Aussagen über den Einfluss von PS1 und PS2 machen zu können, wäre die Analyse der mRNA – und Proteinlevels von SOCE – Proteinen sowohl in Zellen mit einem Single – Knockout als auch in Zellen mit einer PS1 und/oder PS2 – Überexpression von Bedeutung. Außerdem ist es wichtig zu klären, zu welcher Konzentration Ca^{2+} unter den jeweiligen Bedingungen im ER vorliegt und ob nach der TG – Gabe eine vollständige ER – Speicherentleerung erreicht wird, sodass der Einfluss des ER – Füllungszustandes minimiert wird und das Ergebnis allein auf dem Einfluss von PS – Proteinen auf SOCE beruht. Es wäre außerdem interessant zu prüfen, ob durch 1 μ M Thapsigargin komplett alle SERCA – Pumpen blockiert werden. Dies kann z.B. unter Zugabe von Ionomycin nach der TG – Gabe bestimmt werden.

5.2 EINFLUSS VON APP – PROZESSIERUNGSPRODUKTEN AUF DEN Ca^{2+} - HAUSHALT

AICD stellt das Prozessierungsprodukt dar, welches im Rahmen der APP – Proteolyse durch den ϵ – Schnitt der γ – Sekretase anfällt. Analog zu NICD fungiert AICD als ein Transkriptionsfaktor, welcher angelagert an das Adapterprotein Fe65 in den Nukleus transloziert, um dort zusammen mit der Histon - Acetyltransferase Tip60 einen AFT – Komplex zu bilden [56]. Durch die Interaktion von Fe65 mit dem Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 [504] moduliert der AFT – Komplex die Transkription zahlreicher Gene darunter APP, BACE1, GSK3 β , Nephrilysin und Tip60 [334,358,477]. So gelang Grimm *et al.* der Nachweis, dass hauptsächlich die bei der amyloidogenen APP – Prozessierung entstehende AICD die Genexpression von Nephrilysin, einem der wichtigsten A β – abbauenden Enzyme, herunterreguliert [155]. Außerdem nimmt AICD in der De - Novo - Synthese von Sphingolipiden eine Schlüsselrolle ein, indem sie die Genexpression von Serin – Palmitoyl – CoA – Transferase, welche den ersten Syntheseschritt katalysiert, herunterreguliert [152]. Konietzko *et al.* gelang der Nachweis einer Co – Lokalisation von AFT – Komplex mit NICD im Nukleus [253]. Es ist wahrscheinlich, dass AICD und NICD die Transkription der gleichen Gene modulieren und miteinander interagieren [253]. So interagiert z.B. NICD mit dem AFT – Komplex und destabilisiert diesen, was den AICD – Signalweg unterbricht [246]. Analog zu APP werden im Rahmen der Prozessierung von APLP1 und APLP2 ebenfalls intrazelluläre

Domänen freigesetzt, die im Zytosol von Fe65 stabilisiert werden [410]. Während APLP1 hauptsächlich mit der Plasmamembran assoziiert ist, sind APP sowie APLP2 überwiegend in intrazellulären Zellkompartimenten wie dem ER lokalisiert [227]. Sowohl AICD als auch AL2ICD (engl. APLP2 intracellular domain) können sich mit Fe65 und Tip60 zu einem AFT – Komplex im Nukleus zusammenlagern, während AL1ICD (engl. APLP1 intracellular domain) aufgrund der Sequestrierung von Fe65 durch APLP1 im Zytosol verbleibt. AICD und AL2ICD unterscheiden sich von AL1ICD in 17 AS und sind im Gegensatz zu AL1ICD für die Genregulation und die Entwicklung des Organismus unerlässlich [135].

Um den Einfluss von AICD und APP/APLP2 – Proteinen bzw. dessen Prozessierungsprodukten auf den Ca^{2+} -Haushalt zu untersuchen, erfolgte die Messung des Ca^{2+} - Signals mittels Ca^{2+} - Imaging sowie der Genexpression von SOCE – Proteinen in unterschiedlichen Zelllinien.

Zu diesem Zweck wurde das Ca^{2+} - Signal in MEF APP/APLP2 $-/-$, MEF APP $-/-$, MEF APLP2 $-/-$ sowie MEF APP Δ CT15 vermessen und mit MEF WT als Kontrolle verglichen (4.1.6).

Zunächst erfolgte die Messung des Ca^{2+} - Signals in MEF APP/APLP2 $-/-$ (4.1.6, Abb. 17). Da embryonale Mausfibroblasten kein APLP1 exprimieren, tragen MEF APP/APLP2 $-/-$ somit die Defizienz für alle drei Vertreter der APP/APLP – Familie [184]. Im Vergleich zu MEF WT konnte eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach der TG – Gabe verzeichnet werden, was eine erhöhte Ca^{2+} - Freisetzung aus dem ER widerspiegelte. Diese kann durch eine Ca^{2+} - Überladung im ER, eine gesteigerte Leckage durch die Ca^{2+} - permeablen Kanäle (PS1/2, IP $_3$ R, RyR) oder durch die eingeschränkte Funktion der Kompensationsmechanismen, die zum Ausgleich der $[Ca^{2+}]_i$ Ca^{2+} -Ionen in intrazelluläre Zellkompartimente sequestrieren, diese über die PM in den Extrazellularraum bringen oder durch die Bindung an Ca^{2+} - bindende Proteine puffern, bedingt sein. In AD – Neuronen wird eine gesteigerte Expression oder Aktivierung von Zellzyklusproteinen u.a. Cyclin B/D/E berichtet [74]. Ein wichtiges Protein, welches in die Regulation des Zellzyklus eingreift, ist das Ubiquitin – artige Protein NEDD8. Dieses wird von einem NEDD8 aktivierenden Enzym (NAE), welches aus APP – BP1 (engl. APP binding protein 1) und Uba3 zusammengesetzt ist, aktiviert. Das aktivierte NEDD8 bindet an Cullin Ubiquitin Ligasen (Neddylierung), welche mittels Ubiquitinierung Zellzyklusproteine regulieren [71,74]. Des Weiteren ist NEDD8 in der Regulation der Gentranskription unterschiedlicher Gene, Signaltransduktion sowie dem Zelltod involviert [231]. Chow *et al.* gelang der Nachweis einer Interaktion zwischen APP und APP - BP1, wobei die letzten 57 AS des C – Terminus von APP $_{695}$ in die Bindung involviert waren [78]. Die Bindungsstellen wurden nachfolgend näher charakterisiert. So erbrachte Chen *et al.* den Nachweis, dass die Interaktion von APP und APP – BP1 auf den letzten 31 AS von APP - C – Terminus beruht, wobei APP und APP – BP1 in *lipid rafts* kolokalisiert sind [72], sowie über die PM – nahe

lysinreiche Sequenz ermöglicht wird [73]. Die *lipid rafts* stellen Membranmikrodomänen angereichert mit Cholesterin, Sphingo- und Glykolipiden sowie Proteinen dar, in denen die amyloidogene APP – Prozessierung erfolgt [110,284,387,431]. McPhie *et al.* zeigte, dass C31, ein durch die Caspasen 3, 6 und 8 abgespaltenes Produkt von C100/C99 (β – Sekretase Spaltprodukt von APP₆₉₅), die Apoptose in neuronalen Zellen induzieren kann [318]. Chen *et al.* konnte belegen, dass die gesteigerte Apoptose und DNA – Synthese in Neuronen mit überexprimiertem APP – WT sowie mit der Expression von APP (V642I) APP – BP1 mediiert ist und durch die Blockade der Neddylierung aufgehoben werden kann [72]. Sowohl in murinen kortikalen Primärkulturzellen als auch in hippocampalen Neuronen von AD – Patienten wurde bei Überexpression von APP – WT oder APP (V642I) ein erhöhtes Level an APP – BP1 in *lipid rafts* detektiert [72]. Somit führt eine Überexpression von APP zu einer gesteigerten Apoptose durch die Aktivierung von APP – BP1. Des Weiteren interagiert APP – BP1 mit PS1 und Nicastrin/ γ – Sekretase – Komplex und scheint via Neddylierung/Ubiquitinierung die Degradation von PS1 – CTF zu erhöhen, wodurch zum einen die Entstehung von A β ₄₂ behindert wird und zum anderen endogenes APP abnimmt [73]. Folglich scheint APP im Sinne eines negativen Feedbacks über die Interaktion mit APP – BP1 die Degradation von PS1 – CTF zu erhöhen, wobei die Aktivität der γ – Sekretase beeinträchtigt wird mit einer Reduktion der APP – Menge, APP – Prozessierung sowie der Produktion von A β als Folge. Da MEF APP/APLP2 *-/-* eine Defizienz für APP aufweisen, ist die Aktivierung von APP – BP1 gestört, es folgt eine reduzierte Degradation von PS1 – CTF mit folglich erhöhter Menge an aktivem PS1, welches wiederum IP₃R aktivieren kann [276]. Die gesteigerte IP₃ – Antwort resultiert in einem erhöhten Ca²⁺ – Efflux aus dem ER und wird durch den gesteigerten TG – Peak verkörpert. Die Untersuchung der Genexpression von SOCE – Proteinen in MEF APP/APLP2 *-/-* zeigte eine Steigerung der Genexpression von allen ORAI – Proteinen sowie von STIM1 und STIM2, wobei die SOCE – inhibitorische Spleißvariante STIM2.1 (Abb. 45) eine signifikante Genreduktion erfuhr (4.1.3.1, Abb. 12). In Ca²⁺ – Imaging äußerte sich dies in einem starken SOCE in MEF APP/APLP2 *-/-* gegenüber MEF WT (4.1.6, Abb. 17). Es ist möglich, dass der erhöhte TG – Peak zum einen durch die gesteigerte Freisetzung von Ca²⁺ – Ionen via PS1 – stimulierte IP₃R und zum anderen durch eine Ca²⁺ – Überladung im ER, die in Folge des gesteigerten SOCE entsteht, bedingt ist. Um dies zu prüfen, wäre eine Messung der [Ca²⁺]_{ER} sinnvoll. Außerdem wäre interessant zu prüfen, ob eine Akkumulation des Vorstufen – PS1 – Holoform durch den reduzierten PS1 – CTF – Abbau vorliegt, denn es soll die Holoform sein, die die IP₃ – induzierte Ca²⁺ – Freisetzung steigert und die eingebaut in die ER – Membran als ein Ca²⁺ – permeabler Kanal fungieren kann [276,465].

Da MEF APP/APLP2 *-/-* eine Defizienz sowohl für APP als auch für APLP2 tragen, werden sie folglich weder AICD noch AL2ICD exprimieren. Die Ergebnisse aus der Messung des Ca²⁺ – Signals in MEF APP

-/- und MEF APLP2 -/- zusammen betrachtet ergeben sich Hinweise auf eine AICD/AL2ICD – abhängige Reduktion der Genexpression der SOCE – Gene (4.1.3.1, Abb. 45). Die Messung des Ca^{2+} - Signals in MEF APP -/- ergab ebenfalls einen im Vergleich zu MEF WT erhöhten TG – Peak (Abb. 17). Auch hier kann es sowohl an einer forcierten Freisetzung aus dem ER als auch aufgrund einer Ca^{2+} - Überladung im ER oder der eingeschränkten Pufferkapazität liegen. Gazda *et al.* konnte in APP – KD T84 – Zellen, einer Colonkarzinomzelllinie, eine Ca^{2+} - Überladung im ER nachweisen [133]. Demnach könnte der gesteigerte TG – Peak von einer gesteigerten $[Ca^{2+}]ER$ herrühren. Jedoch zeigte Gazda *et al.* eine reduzierte TG – Antwort in APP – KD T84 – Zellen [133]. Linde *et al.* konnte in Astrozyten, die von APP - defizienten Mäusen isoliert wurden, ebenfalls eine signifikante Reduktion der CPA (engl. cyclopiazonic acid) – induzierten Ca^{2+} - Freisetzung aufzeigen [283]. Nichtsdestotrotz publizierten Chatzistavraki *et al.* analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit einen gesteigerten TG – Peak in SH-SY5Y APP – KD [67]. Die Literatur lässt die Möglichkeit offen, das in PM verankerte APP könne, am ehesten G – Protein gekoppelt, als ein Membranrezeptor fungieren und dadurch intrazelluläre Signalkaskaden regulieren [41,354]. So konnte ein gegen APP und vermutlich aufgrund der großen Sequenzhomologie auch gegen APLP2 gerichteter Antikörper (AK) den Signalweg von APP/APLP2 aktivieren. Aktiviertes APP/APLP2 konnte wiederum über die durch Phospholipase C mediierte ER – Speicherentleerung den SOCE rekrutieren [41]. Demnach ist es wahrscheinlich, dass APP – defiziente embryonale Mausfibroblasten tatsächlich eine erhöhte $[Ca^{2+}]ER$ aufweisen könnten, da der entleerende Stimulus durch APP aufgrund der APP – Defizienz nun entfällt. Bouron *et al.* haben aber nicht untersucht, welche Faktoren downstream von der APP – Aktivierung liegen. So bleibt es unklar, ob APP als Holoprotein die Signalkaskade über die Phospholipase C auslöst oder ob seine Spaltprodukte z.B. A β , welches bekanntlich einen IP $_3$ R – aktivierenden Einfluss hat [55], in die ER – Speicherregulation involviert sind. Die Regulation der ER – Speicherentleerung durch APP erklärt auch nicht den reduzierten SOCE, der nach der Ausschöpfung, angenommen Thapsigargin inhibiert die SERCA – Pumpen zu 100 %, von ER – Speichern nach der TG – Gabe in MEF APP -/- präsentiert wurde, sodass die Intervention eines weiteren Beteiligten angenommen werden muss. Möglicherweise kommt es in MEF APP -/- analog zu MEF APP/APLP2 -/- durch die fehlende Aktivierung von APP – BP1 durch APP zu einer Erhöhung von PS1/PS1 – CTF, welches wiederum über die Stimulation der IP $_3$ – Rezeptoren oder den gesteigerten Ca^{2+} - Efflux aus dem ER via PS1 – Kanäle eine gesteigerte Ca^{2+} – Antwort auf die TG – Gabe verursacht. PS1 – CTF stellt außerdem die aktive Form der γ – Sekretase dar. So wird durch die gesteigerte Aktivität der γ – Sekretase das vermutlich kompensatorisch stärker exprimierte APLP2 zu einem höheren Ausmaß prozessiert mit folglich gesteigerter Freisetzung von AL2ICD. Die Ergebnisse aus der Messung des Ca^{2+} - Signals in MEF APLP2 -/- zeigten analog zu MEF APP -/- ebenfalls einen reduzierten SOCE (Abb. 17).

Dies weist auf eine gegenseitige Hemmung auf die jeweilige Genexpression von APP bzw. APLP2 durch ihre ICD – Moleküle hin. Somit würde z.B. im Fall von MEF APP $-/-$ die Genexpression von APLP2 enthemmt werden, was zu einer überschießenden Prozessierung von APLP2 und Bildung von AL2ICD führen würde. Das überschüssige Angebot an AL2ICD würde folglich verstärkt das Ca^{2+} - Signal inhibieren. Das könnte erklären, warum der SOCE in den Single-KO-Zellen stärker reduziert ist verglichen zu MEF WT. Die Hypothese, die Genexpression von AL2ICD sei in MEF APP $-/-$ kompensatorisch gesteigert bzw. durch den fehlenden inhibitorischen Einfluss von AICD enthemmt, sollte anhand der Bestimmung der Gen – und Proteinebene von AL2ICD in MEF APP $-/-$ überprüft werden. Demnach ist es möglich, dass bei fehlendem APLP2 in MEF APLP2 $-/-$ die Produktion von APP kompensatorisch gesteigert oder enthemmt wird. Als Folge der APLP2 – Defizienz würde weniger APP als Interaktionspartner für APP – BP1 zur Verfügung stehen, da APP nun aufgrund der Redundanz vermehrt in APLP2 - abhängige Prozesse involviert wäre. Die reduzierte Stimulation von APP – BP1 durch APP würde zum vermehrten Anfall von PS1 – CTF führen, wobei die γ – Sekretase – Aktivität gesteigert wäre. Dadurch wird die amyloidogene Prozessierung von APP forciert, wobei vermehrt AICD und A β anfällt. AICD soll wiederum auf der Genebene SOCE – inhibierend wirken (4.1.3.1 (Abb. 12), 4.1.5.1), was sich in reduziertem SOCE im Ca^{2+} – Imaging äußert (4.1.6, Abb. 17). Zusätzlich wäre der SOCE auch durch A β inhibiert [55]. Überraschenderweise fiel in MEF APLP2 $-/-$ die TG – induzierte Ca^{2+} - Freisetzung aus dem ER schwächer aus als in MEF APP $-/-$. Die Hypothese verfolgend, in MEF APLP2 $-/-$ sei durch die reduzierte Degradation von PS1 – CTF die Aktivität der γ – Sekretase gesteigert mit folglich verstärkter Produktion von A β , wäre eine stärkere Ca^{2+} - Freisetzung aus dem ER zu erwarten. Denn sowohl PS1 [276,465] als auch A β [55] können über die Aktivierung der IP $_3$ R und/oder RyR bzw. über den passiven Ca^{2+} - Ausstrom via PS – Kanäle den Ca^{2+} - Efflux stimulieren. Um diese Hypothese zu prüfen, wären folglich die Messung der $[Ca^{2+}]_{ER}$, des A β – und AICD – Levels sowie des Proteinlevels von PS1 – Holoprotein und PS1 – CTF von Bedeutung. Außerdem wäre die Untersuchung der Genexpression der SOCE – Proteine in MEF APP $-/-$ und MEF APLP2 $-/-$ mittels qRT – PCR wichtig.

Einen weiteren Beleg für den SOCE – inhibitorischen Einfluss von AICD/AL2ICD liefert das Ca^{2+} – Signal in MEF APP Δ CT15 – Zellen. Im Vergleich zu MEF WT haben MEF APP Δ CT15 keine funktionstüchtige AICD. Da vermutlich die PM – nahe APP – Sequenz des APP Δ CT15 - Konstrukts ausreicht, um die Interaktion zwischen APP Δ CT15 - und APP – BP1 zu ermöglichen, kommt es weder zu einer Aktivierung noch zu einer Störung des APP – BP1 – mediierten Signals, sodass dieses im Vergleich zu MEF WT nicht verändert ist. Insgesamt müsste die verglichen zu MEF WT reduzierte AICD – Funktion ihren inhibitorischen Einfluss eingebüßt haben, was sich im erhöhten SOCE widerspiegelt. Der enthemmte SOCE führt wiederum zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Die gesteigerte basale $[Ca^{2+}]_i$ wird durch die

leicht angehobene Kurve vor der TG – Gabe verkörpert (4.1.6, Abb. 17). Auch auf der Gentranskriptionsebene konnte in MEF APPΔCT15 eine signifikante Steigerung der Genexpression von allen ORAI sowie von STIM1 und STIM2 gezeigt werden (4.1.5.1). Diese Ergebnisse sprechen im Umkehrschluss für eine AICD – hemmende Wirkung auf SOCE (Abb. 45). Der reduzierte TG – Peak ist am ehesten durch die erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ zu erklären, wobei Ca^{2+} – Ionen gegen einen erhöhten Gradienten aus dem ER diffundieren müssten.

Schließlich wurde die Genexpression von SOCE – Proteinen in SH-SY5Y Fe65 – KD untersucht (4.1.7). Fe65 ist wiederum für die Stabilisation und Translokation von AICD in den Nukleus von Bedeutung und ist somit für die genregulatorische Funktion von AICD entscheidend. Allerdings waren die Ergebnisse nicht signifikant. Nichtsdestotrotz lagen bei leichtem Überschreiten des Signifikanzniveaus ($p = 0,051$) Hinweise vor, AICD hemme die Genexpression von ORAI1 (Abb. 45).

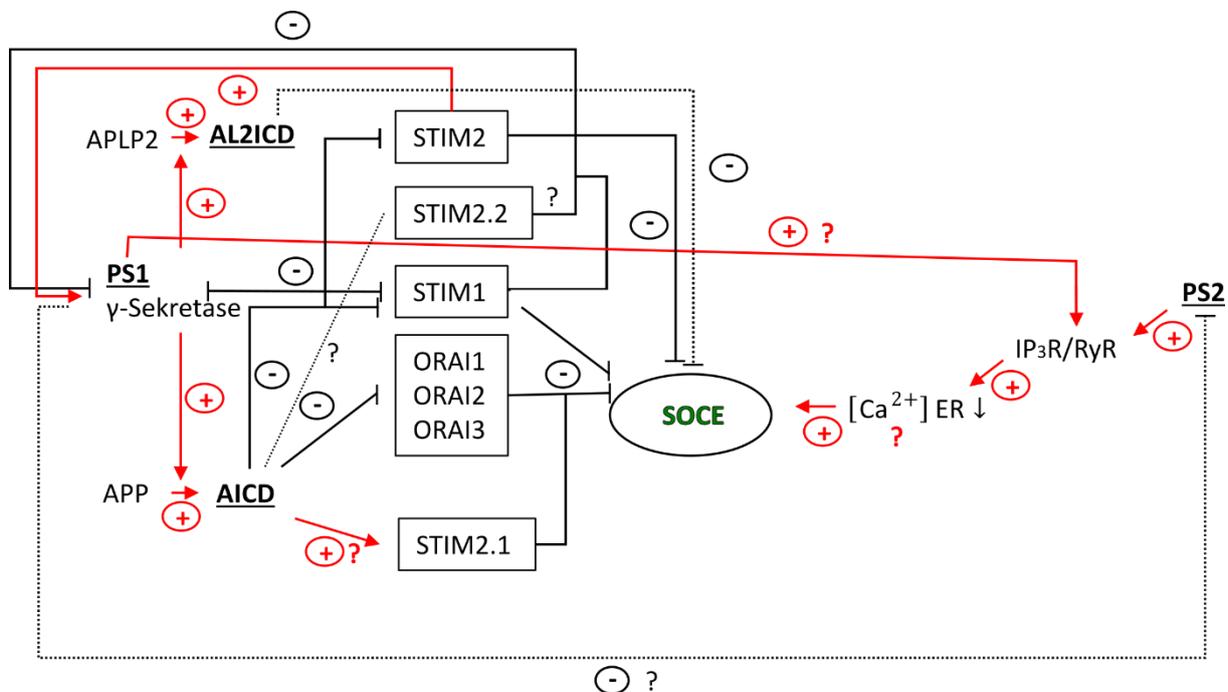


Abb. 45: Schematische Darstellung der Regulation von SOCE durch PS-Proteine und AICD/AL2ICD

AICD hemmt den SOCE, indem es die Genexpression von ORAI1, ORAI2 und ORAI3 herunterreguliert und die von STIM2.1 steigert. Über die Steigerung der Genexpression von STIM2 und Reduktion der Genexpression von STIM1 fördert AICD im Sinne des positiven Feedbacks seine eigene Produktion, wohingegen AL2ICD vermutlich die Genexpression von STIM2 im Sinne des negativen Feedbacks hemmt.

Da AICD angelagert an Fe65 und Tip60 die Regulation der Transkription von zahlreichen Genen moduliert [56,154], ist es wahrscheinlich, dass AICD auf der genregulatorischen Ebene die Ca^{2+} – Homöostase beeinflussen kann. So ergaben BLAST – Untersuchungen den Nachweis von CP2/LSF/LBP1 – Response Elements, dem Transkriptionsfaktor vom AFT – Komplex, in der regulatorischen Sequenz

der SERCA – Pumpe [279]. Nensa *et al.* konnten außerdem eine Interaktion von Fe65 mit SERCA2 sowie RyR3 aufzeigen [340]. In allen Zelllinien mit defizienten AICD und/oder AL2ICD (MEF APP $-/-$, MEF APLP2 $-/-$, MEF APP/APLP2 $-/-$, MEF APP Δ CT15) konnte eine verzögerte Pumpfunktion der SERCA, verkörpert durch den flachen Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ nach dem SOCE und einem im Vergleich zu MEF WT höher gelegenen Plateau, gezeigt werden. Jedoch liegt genauer betrachtet das Plateau in MEF APLP2 $-/-$ unterhalb dem von MEF WT, was eher auf eine Stimulation der SERCA – Pumpe hinweisen sollte. Allerdings wenn man in Betracht zieht, dass durch den schwachen SOCE die $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zu anderen Zelllinien nur unwesentlich angestiegen sein sollte, würde folglich die SERCA – Pumpe weniger Ca^{2+} - Ionen ins ER zurückpumpen müssen, sodass die Ca^{2+} - Menge im Zytosol schneller wieder ausgeglichen werden kann. Die Kurven übereinander gelagert zeigen MEF APLP2 $-/-$ einen im Vergleich zu MEF APP $-/-$ gleich starken Abfall der $[Ca^{2+}]_i$, was auf eine ähnliche Aktivitätsstärke der SERCA in allen AICD/AL2ICD – defizienten Zelllinien schließen lässt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass AICD einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität der SERCA – Pumpe ausüben müsste. Runa Hamid konnte zusätzlich eine Reduktion von ATP, die am ehesten durch die eingeschränkte Funktion der mitochondrialen ATP – Synthase bedingt war, in AICD – defizienten H4 – Zellen (humane Hirntumorzellen) sowie APP $-/-$ - Astrozyten zeigen [174]. ATP ist wiederum essenziell für die Funktion der SERCA – Pumpe. Wenn man die Ergebnisse aus der Literatur mit den aus der vorliegenden Arbeit vereint, so gelangt man zu der Schlussfolgerung, dass AICD die Aktivität der SERCA – Pumpe sowohl auf der Gentranskriptionsebene über die Interaktion von Fe65 mit CP2/LSF/LBP1 als auch direkt auf der Proteinebene durch die Interaktion von Fe65 mit der SERCA – Pumpe und indirekt über die Steigerung der ATP – Produktion positiv modulieren kann (Abb. 46).

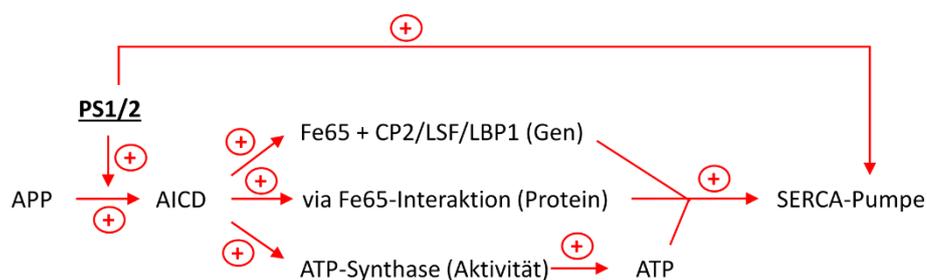


Abb. 46: Schematische Darstellung des Einflusses von AICD und PS-Proteinen auf die Aktivität der SERCA-Pumpe
Bei der APP-Prozessierung durch PS1 bzw. 2 wird u.a. AICD freigesetzt. AICD fördert die Aktivität der SERCA-Pumpe auf der Gen-, Protein- und Aktivitätsebene. Außerdem fördern Presenilin1 und Presenilin2 über eine direkte Interaktion die Aktivität der SERCA-Pumpe.

Es sollte auch berücksichtigt werden, dass gleichwohl weitere Mechanismen zum Balancieren der zytosolischen $[Ca^{2+}]_i$ beitragen. So ist u.a. PMCA (engl. plasma membrane Ca^{2+} - ATPase) zu

erwähnen, die Ca^{2+} - Ionen in den EZR pumpt. In der Literatur wird von der Verbindung zwischen der PMCA und der Neuropathologie der Alzheimer – Krankheit berichtet, wobei sowohl A β als auch die Tau – Pathologie Einfluss auf ihre Aktivität nehmen [27,306].

Um die Hypothese, AICD/AL2ICD inhibieren den SOCE, weiter zu untermauern, wäre es sinnvoll, unterschiedliche Zelllinien mit AICD -, AL2ICD -, APP - und APP Δ CT15 – Plasmiden zu transfezieren und das Ca^{2+} - Signal zu vermessen. Eine Transfektion mit AICD -, APP - und APP Δ CT15 – Plasmiden wurde mit MEF APP/APLP2 -/- versucht, konnte aber aufgrund einer Transfektionseffizienz von weniger als 5 % nicht in die Auswertung miteinbezogen werden. Um die Überlegungen bzgl. der zugrundeliegenden Mechanismen prüfen zu können, wäre es u.a. sinnvoll, die Aktivität der APP – BP1 z.B. durch die Messung des Substrats β – Catenin, welches APP – BP1 physiologischerweise herunterreguliert [74], zu untersuchen, das Proteinlevel von PS1 – Holoprotein und PS1 – CTF zu bestimmen und die Aktivität der γ – Sekretase zu eruieren. Außerdem wären Zelllinienmodelle mit Proteinüberexpressionen von großer Bedeutung.

5.3 EINFLUSS VON STIM – PROTEINEN AUF α -, β - UND γ - SEKRETASEN

In der Literatur häufen sich immer mehr Belege für die Rolle von APP – Prozessierungsprodukten und Presenilin – Proteinen in der Regulation von SOCE und seinen Komponenten. Doch wenig ist über den reversen Mechanismus im Sinne des Einflusses von STIM – Proteinen auf den Prozess der APP – Proteolyse bekannt. In dieser Arbeit wurde versucht, mehr Licht in die Auswirkungen von STIM – Proteinen auf die Funktion von α -, β – und γ – Sekretasen zu bringen.

5.3.1 Einfluss von STIM – Proteinen auf die α – Sekretase

Die α – Sekretase initiiert den ersten Schnitt in der nicht – amyloidogenen APP – Prozessierung, wobei sAPP α sezerniert wird. Gehörend zu der Familie der Zinkmetalloproteasen stellen ADAM10 und ADAM17 die wichtigsten Vertreter der α – Sekretasen dar. Zunächst wurde der Einfluss von STIM – Proteinen auf die Aktivität der α – Sekretase mittels eines speziellen Aktivitätsassays (3.2.3.8.1) in MEF STIM1/2 -/- untersucht. Verglichen zu MEF WT als Kontrolle konnte in MEF STIM1/2 -/- eine signifikante Reduktion der Aktivität festgestellt werden (4.3.1, Abb. 24 A). Dies legt eine Intervention von STIM – Proteinen in die Regulation der α – Sekretase nahe, wobei STIM - Proteine am ehesten die Aktivität fördern. Um diese Aussage zu prüfen, wurde im nächsten Schritt das Proteinlevel des sezernierten sAPP α in MEF STIM1/2 -/- bestimmt (Abb. 24 C). Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proteinmenge gegenüber MEF WT, was mit der reduzierten α – Sekretasen Aktivität erklärt werden kann. Jedoch zeigte die Untersuchung der Genexpression eine signifikante Erhöhung von ADAM17, wohingegen für ADAM10 kein Unterschied gegenüber der Kontrolle gezeigt werden

konnte (Abb. 24 B). Die Erhöhung der Gentranskription liegt vermutlich im kompensatorischen Bestreben, die reduzierte Enzymaktivität auszugleichen. Da die Defizienz von STIM1 und STIM2 den Ca^{2+} - Einstrom in die Zelle beeinträchtigt, ist es nicht klar, inwiefern die $[Ca^{2+}]_i$ verändert ist. Um genaue Aussagen machen zu können, sollte diese gemessen werden. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob diese Aktivitätssenkung möglicherweise auf der direkten Interaktion von STIM mit der α - Sekretase beruht oder doch indirekt über die Veränderung der Ca^{2+} - Konzentration bedingt ist. Um dies zu prüfen, wurden der Lösung, in der die Vermessung der Aktivität stattfand, Ca^{2+} - Ionen entzogen. Damit sollte die $[Ca^{2+}]_i$ gesenkt werden. Sollte Ca^{2+} an der Regulation der α - Sekretase Aktivität beteiligt sein, wäre eine Veränderung derselben bei Ca^{2+} - Entzug zu erwarten. In der Tat konnte eine weitere Senkung der α - Sekretase Aktivität in MEF STIM1/2 -/- verglichen zu MEF WT beobachtet werden (Abb. 34). Interessanterweise war die Enzymaktivität in Ca^{2+} - freiem Medium im Vergleich zu Ca^{2+} - reichem Medium sowohl jeweils in MEF WT als auch in MEF STIM1/2 -/- signifikant reduziert (s. 4.3.4.4). Dies macht deutlich, dass die Wirkung von STIM auf die α - Sekretase durchaus auch über Ca^{2+} vermittelt sein kann. Um dies zu prüfen, sollte als nächstes die Messung der Enzymaktivität in MEF WT und MEF STIM1/2 -/- jeweils sowohl mit als auch ohne Ca^{2+} durchgeführt werden, da in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse aus zwei unterschiedlichen Experimenten zustande kamen und wegen des bestehenden Interesses einer statistischen Analyse unterzogen wurden. Im nächsten Schritt wurde durch die Zugabe von BTP2, einem CRAC - Inhibitor, geprüft, ob STIM - Proteine direkt die Aktivität der α - Sekretase erhöhen können. Dafür wurden MEF WT für 8 bis 20 Stunden mit BTP2 inkubiert, wobei die Aktivität der α - Sekretase analog zur Messung der MEF WT in Ca^{2+} - freien Medium sein sollte, angenommen diese sei rein Ca^{2+} - mediiert. Jedoch konnte hierbei eine signifikante Steigerung der Aktivität verzeichnet werden, was die Hypothese stützt, STIM - Proteine fördern direkt und indirekt die α - Sekretaseaktivität. Ursächlich für die Steigerung der Aktivität nach der BTP2 - Inkubation ist das Bestreben der STIM - Proteine, die durch BTP2 blockierten CRAC - Kanäle zu aktivieren. Da jedoch die Entleerung der ER - Speicher fortschreitet, ohne dass diese wieder aufgefüllt werden, erfahren STIM - Proteine eine Potenzierung ihrer Aktivität und fördern möglicherweise die Aktivität der α - Sekretase. Ein möglicher Erklärungsansatz für die physiologische Rolle dieser Interaktion ist der neuroprotektive Einfluss von STIM - Proteinen, welcher die Zelle vor einer Ca^{2+} - Überladung schützt. Bei der ER - Entleerung kommt es zu der Aggregation von STIM - Proteinen, Translokation in die Nähe der Plasmamembran und Interaktion mit den ORAI - Proteinen. Als Folge wird der CRAC - Kanal aktiviert und Ca^{2+} - Ionen aus dem Extrazellularraum (= EZR) in den Intrazellularraum (= IZR) gepumpt. Um eine Ca^{2+} - Überladung der Zelle zu verhindern, fördern STIM - Proteine die nicht - amyloidogene APP - Prozessierung durch die Aktivierung der ebenfalls

plasmamembranständigen α – Sekretase, wobei das neuroprotektive sAPP α – Fragment sezerniert wird. sAPP α kann u.a. durch die Blockade der NMDA – Rezeptoren oder der VGCC den Ca^{2+} - Einstrom behindern und so die Zelle vor einer neurotoxischen Ca^{2+} - Überladung schützen [129,130,369]. Die Ergebnisse von Zeiger *et al.* stützen diese Annahme. Hierbei war bei einer Mutation von STIM1 (D76A) in der EF – Hand, die zu einer STIM1 – Überexpression führt, sowohl die Produktion von p3 als auch die Sekretion von sAPP α signifikant gesteigert. Diese war am ehesten durch die enorm gesteigerte $[Ca^{2+}]_i$ aufgrund des starken SOCE bedingt [506]. Obregon *et al.* konnten in CHO – Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) nachweisen, dass sAPP α sowohl A β als auch β – CTF durch eine direkte Interaktion mit BACE1 reduziert [352]. A β kann bekanntlich Ca^{2+} - permeable Kanäle in der Plasmamembran bilden und somit zu einem Ca^{2+} - Influx führen [204,258]. Durch die Förderung der α – Sekretaseaktivität durch STIM1 kann somit auch auf diesem Weg der Ca^{2+} - Überladung der Zelle vorgebeugt werden.

Die Reduktion der Enzymaktivität in BTP2 – behandelten MEF WT im Ca^{2+} - freiem Medium stützt die Hypothese, dass die Aktivität der α – Sekretase sowohl direkt durch STIM – Proteine als auch indirekt durch Ca^{2+} - Ionen gefördert wird, denn durch den Ca^{2+} - Entzug im Extrazellularraum bedingte Senkung der $[Ca^{2+}]_i$ wird die Aktivität der α – Sekretase beeinträchtigt, trotz der Überstimulation durch die kompensatorisch gesteigerte Aktivität der STIM – Proteine.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass STIM – Proteine die Enzymaktivität der α – Sekretase entweder direkt oder indirekt über die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ steigern können. Um diese Hypothese zu verifizieren, wäre von großer Bedeutung zu wissen, inwiefern die $[Ca^{2+}]_i$ unter unterschiedlichen Bedingungen verändert ist. Außerdem sollte das Gesamt - Proteinlevel von STIM - Proteinen in BTP2 behandelten MEF WT sowie das Proteinlevel der zytosolisch gelösten Form gemessen werden und zusätzlich zur Vermessung der Aktivität Thapsigargin hinzugefügt werden, um den größtmöglichen Stimulus den STIM – Proteinen zu ermöglichen. Des Weiteren wäre zu prüfen, ob STIM – Proteine bei der CRAC - Blockade durch BTP2 vermehrt oligomerisieren und zu den PM – ER – Junctionsstellen translozieren. Interessant wäre zu prüfen, ob es eine physikalische Interaktion zwischen STIM - Proteinen und der α – Sekretase gibt. Die Messungen sollten zusätzlich wiederholt werden, wobei immer jeweils nur ein Faktor geändert werden sollte. Demnach wäre es sinnvoll, MEF WT als Kontrolle unverändert zu lassen, wobei MEF STIM1/2 -/- in Medien mit unterschiedlichen Ca^{2+} - Konzentrationen vermessen werden sollten. Auf diesem Weg wäre es möglich, genau zu prüfen, inwiefern sich die Veränderung der Ca^{2+} - Konzentration auf die Enzymaktivität auswirkt. Außerdem ist es von Bedeutung zu untersuchen, ob STIM1 oder STIM2 die Enzymaktivität moduliert. Hierfür

wären unterschiedliche Zelllinienmodelle mit einem Single – Knockout und mit der jeweiligen Überexpression hilfreich.

5.3.2 Einfluss von STIM – Proteinen auf die β – Sekretase

Die β – Sekretase initiiert die amyloidogene APP – Prozessierung, wobei sAPP β und β – CTF (= C99) gebildet werden. Die Untersuchungen des Einflusses von STIM – Proteinen auf die Aktivität der β – Sekretase (4.3.2) erfolgten analog denen von Kapitel 4.3.1. Demnach wurde zunächst die Enzymaktivität (3.2.3.8.2) in MEF STIM1/2 $-/-$ im Vergleich zu MEF WT vermessen. Hierbei konnte kein Unterschied gegenüber der Kontrolle aufgezeigt werden (Abb. 25 A). Auch das mittels Western Blot bestimmte Proteinlevel von BACE1 erbrachte keinen Unterschied (Abb. 25 C). Die mittels qRT – PCR bestimmte Genexpression von BACE1 zeigte hingegen eine signifikante Reduktion (Abb. 25 B). Basierend auf dem erhöhten Proteinlevel von C99 (Abb. 25 C) und der erhöhten A β – Menge (Abb. 27 B) in MEF STIM1/2 $-/-$ sollten STIM - Proteine jedoch am ehesten eine inhibierende Wirkung auf die Enzymaktivität ausüben. Auch hier stellte sich die Frage, ob STIM – Proteine direkt oder via Ca^{2+} indirekt die Aktivität der β – Sekretase beeinflussen. Hierfür erfolgte demnach die Aktivitätsmessung in einem Ca^{2+} - freien Medium. Allerdings erbrachte auch die Messung in einem Ca^{2+} - freien Medium keine Unterschiede (4.3.4.2, Abb. 35). Interessanterweise stieg die Enzymaktivität sowohl in MEF WT als auch in MEF STIM1/2 $-/-$ im Ca^{2+} - freien Medium verglichen zur Messung mit Ca^{2+} - reichem Medium (4.3.4.4). Dies deutet darauf hin, dass STIM - Proteine über die Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ die Enzymaktivität der β – Sekretase inhibieren. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass diese Ergebnisse nicht im gleichen Versuchssatz generiert worden sind. Daher sollte die Messung wiederholt werden, indem MEF WT bzw. MEF STIM1/2 $-/-$ jeweils mit und ohne Ca^{2+} im Medium vermessen werden. Die Enzymaktivität war in BTP2 behandelten MEF WT weder im Ca^{2+} - reichen noch Ca^{2+} - freien Medium verändert. Am ehesten üben STIM - Proteine somit ihren Einfluss auf die Enzymaktivität via Ca^{2+} - Ionen aus, da ansonsten eine Veränderung der Enzymaktivität nach der BTP2 Behandlung zu verzeichnen wäre. Jedoch ist bei den Ergebnissen aus den Messungen nach einer BTP2 – Inkubation eine bis zu knapp 8 % - ige Zytotoxizität zu erwähnen. Diese Zytotoxizität könnte wiederum starke Konsequenzen auf die Enzymaktivität haben und somit eine akkurate Aussage beeinträchtigen. Auch hier ist es wichtig, die basale $[Ca^{2+}]_i$ unter unterschiedlichen Bedingungen zu wissen, um genau sagen zu können wie sich das Ca^{2+} verhält, also ob die Elimination von Ca^{2+} aus dem Medium zu einer stärkeren Senkung der intrazellulären Konzentration führt. Somit ist es enorm wichtig, unter allen Bedingungen die $[Ca^{2+}]_i$ genau zu wissen.

5.3.3 Einfluss von STIM – Proteinen auf die γ - Sekretase

Der letzte Schnitt sowohl in der amyloidogenen als auch in der nicht – amyloidogenen APP – Prozessierung wird von der γ – Sekretase ausgeübt. Auch hier stellte sich die Frage, ob STIM – Proteine die Regulation der γ – Sekretase modulieren. Hierfür wurde folglich zunächst die Enzymaktivität (3.2.3.8.3) in MEF STIM1/2 -/- gemessen und diese mit MEF WT als Kontrolle verglichen (4.3.3). Hierbei wurde eine signifikante Erhöhung der γ – Sekretase Aktivität in MEF STIM1/2 -/- festgestellt (Abb. 26 A). Die mittels qRT – PCR bestimmte Genexpression ergab eine signifikante Steigerung der γ – Sekretasekomponenten Aph1b, Aph1c, PS1 und PS2, wobei für Nicastrin und PSENEN kein Unterschied aufgezeigt werden konnte und die Genexpression von Aph1a signifikant abnahm (Abb. 26 B). Nichtsdestotrotz deuten die Ergebnisse auf eine gesteigerte Gentranskription der einzelnen Untereinheiten der γ – Sekretase hin, was die erhöhte Enzymaktivität in MEF STIM1/2 -/- erklären könnte. Auch das erhöhte Proteinlevel einer Einheit vom aktiven PS1 (PS1 – CTF) sprach für eine Erhöhung der γ – Sekretaseaktivität (Abb. 26 C). Da die γ – Sekretase APP sowie APLP2 als Substrate spaltet und dabei u.a. A β freisetzt, wurde im nächsten Schritt deren Genexpression und das Proteinlevel bestimmt. Die gesteigerte Genexpression von APP und APLP2 (Abb. 27 A) sowie das erhöhte Proteinlevel von A β (Abb. 27 B) sprechen für einen erhöhten Umsatz von APP/APLP2 im Rahmen einer erhöhten Enzymaktivität der γ – Sekretase mit einer kompensatorisch gesteigerten Genexpression von APP/APLP2. Bei der Prozessierung von APP wird neben A β auch AICD freigesetzt, welches die Genexpression von APP steigert [477] und somit die erhöhte Genexpression von APP in MEF STIM 1/2 -/- auch erklären könnte. Die Genexpression von NEP (engl. neprilysin) und IDE (engl. insulin degrading enzyme), beide Enzyme, die u.a. A β abbauen, in MEF STIM1/2 -/- war signifikant herunterreguliert. In der Literatur wird die Rolle von AICD bzgl. der Genregulation von NEP sehr kontrovers diskutiert. Während die Ergebnisse von Grimm *et al.* für einen fördernden Einfluss des amyloidogenen AICD auf die Genexpression sprechen [155], konnten Hébert *et al.* keine Veränderungen bei AICD – Defizienz feststellen [187]. Demnach ist es nicht auszuschließen, dass STIM – Proteine über die Veränderungen der γ – Sekretaseaktivität das AICD – Level verändern, welches wiederum NEP auf genetischer Ebene reguliert. Da die Funktionen der STIM - Proteine noch nicht komplett erforscht sind, ist es auch möglich, dass STIM - Proteine auf einem anderen Weg die Genexpression von NEP bzw. IDE regulieren. Somit wird im Fall einer Defizienz der STIM – Proteine zum einen über die Steigerung der γ – Sekretaseaktivität die amyloidogene APP – Prozessierung forciert und zum anderen über die genetische Suppression von A β – abbauenden Enzymen die Ablagerungen von A β unterhalten. Die Amyloidablagerungen stellen wiederum ein bedeutendes Merkmal der AD – Pathogenese dar.

Es stellte sich die Frage, inwiefern STIM1 und STIM2 jeweils die Regulation der γ – Sekretase beeinflussen. Für diesen Zweck wurde folglich die Enzymaktivität in Zellen vermessen, die entweder eine Defizienz für STIM1 oder STIM2 aufwiesen. Somit konnte in MEF STIM1 $-/-$ verglichen zu MEF WT eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität verzeichnet werden, wohingegen der Single – Knockout von STIM2 in MEF STIM2 $-/-$ eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität bewirken konnte (Abb. 28). Umgekehrt scheint somit STIM1 einen aktivitätssenkenden, wohingegen STIM2 einen aktivitätsfördernden Einfluss auf die γ – Sekretase auszuüben. So soll in Übereinstimmung mit Zeiger *et al.* eine STIM1 – Überexpression in HEK293 – Zellen mit einer STIM1 (D76A) – Mutation die amyloidogenen APP – Prozessierung inhibieren [506]. Um diese Hypothese zu prüfen, erfolgte eine Retransfektion von MEF STIM1 $-/-$ und MEF STIM2 $-/-$ mit dem jeweiligen STIM – Protein. Während die Retransfektion von MEF STIM2 $-/-$ mit dem STIM2 – Plasmid keinen Unterschied gegenüber den untransfizierten Zellen aufzeigte, wiesen die STIM1 retransfizierten Zellen in MEF STIM1 $-/-$ eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität (Abb. 29). Die reduzierte Enzymaktivität in MEF STIM1 $-/-$ nach der Transfektion mit einem STIM1 – Plasmid sprach für die Annahme, STIM1 senke die γ – Sekretase Aktivität. Die Ergebnisse von Zeiger *et al.* untermauerten diese Aussage. Um den Einfluss von STIM1 auf die APP – Prozessierung zu analysieren, bedienten sich Zeiger *et al.* einer STIM1 – Mutation in der EF – Hand (STIM1 (D76A)), die einen konstitutiven Ca^{2+} – Einstrom unabhängig vom Füllungsstand der ER – Speicher erzeugt. Sie stellten fest, dass die transiente Expression von STIM1 (D76A) in HEK293 die Aktivität der γ – Sekretase signifikant reduzierte. Außerdem häuften sich sowohl α – , als auch β – CTFs an, die Menge an sezerniertem $A\beta_{40/42}$ sowie an $A\beta_{11-40}$ wurde signifikant reduziert, die Produktion von p3 erfuhr eine leichte Zunahme sowie die Sekretion von sAPP α erreichte eine signifikante Steigerung. Diese Effekte sollen am ehesten auf die enorm gesteigerte $[Ca^{2+}]_i$ aufgrund des starken SOCE zurückzuführen sein [506]. Um diesen Aussagen weiter auf den Grund zu gehen, wurden im nächsten Schritt MEF STIM1/2 $-/-$ entweder mit STIM1, STIM2 oder mit beiden STIM – Plasmiden retransfiziert. Die Aktivitätsmessung nach 26 Stunden zeigte sowohl in den Zellen mit STIM1 als auch in den Zellen mit STIM2 eine signifikante Steigerung, wohingegen die Co – Transfektion keinen Unterschied aufzeigte. Die Wiederholung des Experiments erbrachte zusätzlich eine Steigerung der Enzymaktivität auch in Zellen nach der Co – Transfektion. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass STIM2 einen aktivitätsfördernden Einfluss auf die Enzymaktivität haben könnte. Um etwaige zeitabhängige Einflüsse zu eliminieren, wurde die Transfektionszeit auf 48 Stunden verlängert. Dabei ging die Enzymaktivität allein in den Zellen nach einer Co – Transfektion signifikant herunter, wohingegen die Zellen mit STIM1 bzw. STIM2 eine nicht signifikante Reduktion erfuhren. Die inhomogenen Ergebnisse nach der Transfektion mit Plasmiden können möglicherweise auf der

unterschiedlichen Zeit, die die einzelnen Plasmide brauchen, um ihre Wirkung zu entfalten, liegen. Es scheint, dass STIM1 länger braucht, um seine repressive Wirkung zu zeigen, wohingegen die Wirkung von STIM2 möglicherweise schneller an- und wieder abflutet. Außerdem ist es möglich, dass die Plasmide eine unterschiedliche Transfektionseffizienz haben und bei einer Co – Transfektion miteinander konkurrieren. Nicht auszuschließen ist, dass STIM2 – Plasmide schneller degradiert werden, sodass ihre Wirkung im Verhältnis zu STIM1 kürzer anhält. Um diese Ergebnisse in anderen Spezies zu verifizieren, wurden Cos7 WT und SH-SY5Y WT im Sinne einer Überexpression mit STIM1 - und/oder STIM2 – Plasmiden transfiziert. Sowohl in Cos7 WT als auch in SH-SY5Y WT zeigten die Zellen nach einer Co – Transfektion eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität, wobei Cos7 WT zusätzlich eine Aktivitätsreduktion in Zellen mit dem STIM1 – Plasmid präsentierten (Abb. 31, Abb. 32). Auch hier betrug die Transfektionszeit in beiden Fällen 48 Stunden, sodass, angenommen das STIM2 – Plasmid habe andere Eigenschaften bezüglich Stabilität, Wirkung und Degradation im Vergleich zum STIM1 – Plasmid, die Nicht – Signifikanz der Ergebnisse bzgl. der STIM2 – Transfektion am ehesten darin begründet wäre. In Bezug auf STIM1 gibt es jedoch erneut Hinweise auf seine aktivitätssenkenden Eigenschaften. Eine die SOCE – Messung mittels Ca^{2+} - Imaging könnte Aufschluss über die Funktionalität der STIM – Proteine bringen.

Im weiteren Schritt wurde die Enzymaktivität in STIM1 überexprimierenden HEK293 STIM1, gemessen und mit HEK293 WT verglichen. Allerdings konnte hier bei einer Steigerung der Enzymaktivität nicht belegt werden, STIM1 senke die Aktivität. Schließlich wurde untersucht, ob die Spleißvariante STIM2.2 ebenfalls die Aktivität der γ – Sekretase beeinflusse. So konnte in STIM2.2 überexprimierenden HEK293 STIM2.2 T- REx eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität gemessen werden (Abb. 33). Es scheint, STIM2.2 setze die Enzymaktivität herab, während das Holoprotein STIM2 diese steigere. Um dies zu prüfen, sollte die Probenanzahl erhöht werden, da im Fall von STIM1 - und STIM2.2 – überexprimierenden HEKs jeweils nur zehn Proben vermessen wurden. Außerdem wäre es sinnvoll, HEK293 - Zelle mit einem stabilen STIM1 - bzw. STIM2.2 – KO zu entwickeln, um diese mit dem jeweiligen Gegenstück vergleichen zu können.

Da STIM – Proteine den Ca^{2+} - Haushalt regulieren, ist es möglich, dass die Enzymaktivität der γ – Sekretase via Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ reguliert wird. Zu diesem Zweck erfolgte die Messung der Enzymaktivität in einem Ca^{2+} - freien Medium. Auch hier war die Enzymaktivität in MEF STIM1/2 -/- gegenüber MEF WT gesteigert (4.3.4.3, Abb. 36). Diese war auch jeweils in den einzelnen Zelllinien bei Vergleich zwischen den Messungen mit und ohne Ca^{2+} gesteigert, sodass, die RFU – Kurve über die Zeit betrachtend, die Enzymaktivität eine Potenzierung bei Ca^{2+} - Defizienz unabhängig vom

Funktionsstatus der STIM – Proteine erfuhr (4.3.4.4). Diese Ergebnisse setzen sich allerdings aus unabhängigen Messungen zusammen. Es sollte somit bestimmt werden, ob sowohl MEF WT als auch MEF STIM1/2 -/ eine Veränderung der Enzymaktivität bei Ca^{2+} - Entzug erfahren würden. Im nächsten Schritt wurde versucht, die $[Ca^{2+}]_i$ mit unterschiedlichen chemischen Stoffen weiter herabzusenken (4.3.4.3). Die Inkubation von MEF WT mit Ruthenium Red sollte theoretisch zu einer $[Ca^{2+}]_i$ – Senkung führen. Vermutlich führte die reduzierte $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Steigerung der Enzymaktivität (Abb. 37). Die Behandlung von MEF WT mit EGTA, welches ebenfalls die $[Ca^{2+}]_i$ senken sollte, führte im Vergleich zu unbehandelten NaOH - MEF WT (= Kontrolle) ebenfalls zu einer Steigerung der Enzymaktivität. Allerdings machte diese nur knapp 2,7 % aus und lag über dem Signifikanzniveau. Während die Enzymaktivität in EGTA - MEF STIM1/2 -/- keine Veränderung gegenüber NaOH – MEF STIM1/2 -/- (= Kontrolle) erfuhr, zeigte die Messung der Aktivität in EGTA – MEF STIM1/2 -/- im Vergleich zu NaOH – MEF WT eine signifikante Steigerung. Diese war im Vergleich zur Kontrollmessung (NaOH – MEF WT vs. NaOH – MEF STIM1/2 -/-) jedoch nur um knapp 2 % erhöht. Da die Enzymaktivität bei Manipulation des Ca^{2+} - Haushalts Veränderungen erfährt, deutet es darauf hin, dass STIM – Proteine durchaus ihre Wirkung bzgl. der γ – Sekretase via Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ entfalten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei Senkung der $[Ca^{2+}]_i$ die Enzymaktivität der γ – Sekretase gesteigert wird (vgl. Inkubation mit Ruthenium Red bzw. EGTA in MEF WT). Dieses Ergebnis soll mit einer größeren Probenzahl verifiziert werden. Außerdem wäre es sinnvoll, jeweils nur einen Parameter zu ändern. So sollten z.B. die Messungen im Ca^{2+} - freien Milieu im gleichen Versuchset mit Messungen im Ca^{2+} - reichen Milieu durchgeführt werden, damit stets ein direkter Vergleich besteht und etwaige Unterschiede sich nicht durch interexperimentelle Fehler aufsummieren. Außerdem wäre eine Zeitreihe von Bedeutung, denn eine zu lange Inkubation unter Umständen zum Absterben der Zellen führen kann. Es ist wichtig, unter unterschiedlichen Bedingungen stets die genaue basale $[Ca^{2+}]_i$ zu wissen, die mittels Ca^{2+} - Imaging bestimmt werden kann. Des Weiteren sollte die Zytotoxizität der einzelnen Chemikalien bei unterschiedlicher Endkonzentration z.B. mittels eines LDH – Assays bestimmt werden.

Im letzten Schritt erfolgte die Vermessung der Enzymaktivität in MEF WT nach einer BTP2 – Inkubation. Diese wurde mit und ohne Ca^{2+} im Messmedium bestimmt. Die signifikante Aktivitätssenkung, die die γ – Sekretase nach der BTP2 – Inkubation im Ca^{2+} - reichen Medium erfahren hat, lag vermutlich in der Überaktivität der STIM – Proteine. Verglichen mit den Messungen der Enzymaktivität in Zellen, die mit STIM1 – Plasmid retransfiziert wurden (vgl. Abb. 30, Abb. 31), lieferte die Messung der Enzymaktivität in BTP2 behandelten Zellen, einen weiteren Beleg für den aktivitätssenkenden Effekt von STIM1. Demnach werden mittels BTP2 alle CRAC-Kanäle blockiert. Das physiologische Entleeren

der ER-Speicher würde zu einer Aggregation von STIM-Proteinen in PM-ER-Junktionsstellen führen, welche unter physiologischen Bedingungen die CRAC-Kanäle aktivieren würden. Da diese nun durch BTP2 blockiert sind, wird die Aktivität der STIM-Proteine immer weiter gesteigert, ohne dass diese ihre Funktion erfüllen können. Da STIM1 aber vermutlich eine aktivitätssenkende Wirkung auf die γ -Sekretase ausübt, wird diese möglicherweise als Nebeneffekt stärker gehemmt, was schließlich in reduzierter Enzymaktivität in mit BTP2 behandelten Zellen resultierte. Diese Annahme wird durch eine weitere Messung der Enzymaktivität in HEK 193/195 mit einem ORAI1- und ORAI2-KO gestützt. Auch hier wurde eine Reduktion der Enzymaktivität beobachtet, die vermutlich auf dem gleichen Weg zustande kam, wie in den BTP2-behandelten Zellen. Allerdings konnte die Reduktion der Enzymaktivität das Signifikanzniveau nicht erreichen. Der Hypothese folgend inhibieren STIM-Proteine die Aktivität der γ -Sekretase nicht nur indirekt via Ca^{2+} -Erhöhung, sondern auch vermutlich durch eine direkte Interaktion. Denn die Experimente mit Ruthenium Red und EGTA deuten darauf hin, Ca^{2+} -Erniedrigung potenziert die Enzymaktivität. Wenn BTP2 jedoch CRAC-Kanäle blockiert, wäre folglich auch eine Senkung der $[Ca^{2+}]_i$ zu erwarten, welche wiederum die Enzymaktivität verstärken sollte. Doch das Gegenteil war der Fall. Somit ist es wahrscheinlich, dass STIM-Proteine auch eine Ca^{2+} -unabhängige Wirkung auf die Aktivität der γ -Sekretase entfalten. Die anschließend durchgeführte Messung im Ca^{2+} -freien Milieu führte zu einer Steigerung der Enzymaktivität. Dies entspricht folglich der Annahme, Ca^{2+} beeinflusse ebenfalls die Enzymaktivität. Durch den Ca^{2+} -Entzug im EZR ist eine weitere Senkung der $[Ca^{2+}]_i$ wahrscheinlich und diese führt wie bereits angenommen, zu einer Steigerung der Enzymaktivität, sodass die hemmende Wirkung von überaktiviertem STIM1 nicht mehr ausreicht. Es muss beachtet werden, dass BTP2-Inkubation zum Teil eine Toxizität von knapp 11 % bewirken konnte. Aus diesem Grund sind alle Versuche, die unter Zugabe von chemischen Präparaten zustande kamen (BTP2, Ruthenium Red, EGTA), nur unter Vorsicht zu verwenden. Auch hier wäre die Bestimmung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ von Bedeutung. Außerdem sollten die Versuche mit einer höheren Probenanzahl wiederholt werden und auch hier sollte darauf geachtet werden, dass bei der Messung der Enzymaktivität im Ca^{2+} -freien Messmedium die Kontrolle stets in einem Ca^{2+} -reichen Medium gemessen werden sollte. Damit alle Veränderungen nur auf den einzelnen Parameter, der in der zu prüfenden Zelllinie geändert wurde, zurückzuführen wären.

Kurz zusammengefasst, wird die Aktivität sowohl durch einen direkten Einfluss von STIM-Proteinen selbst als auch durch Schwankungen in der $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass STIM1 einen aktivitätssenkenden Effekt auf die γ -Sekretase hat, wodurch eine Alzheimer protektive Wirkung denkbar wäre, wohingegen niedrige $[Ca^{2+}]_i$, die u.a. durch die Defizienz von STIM-Proteinen bedingt ist, die γ -Sekretase Aktivität steigert. STIM2 scheint dagegen eine

aktivitätsfördernde Wirkung auf die Aktivität der γ – Sekretase auszuüben, wohingegen seine Spleißvariante STIM2.2 am ehesten die Enzymaktivität reduziert und somit möglicherweise ebenfalls eine AD – protektive Wirkung entfalten könnte.

5.4 EINFLUSS VON A β UND AICD AUF DIE GENEXPRESSION VON VGCC

Eine besondere Rolle in der Regulation des Ca^{2+} - Haushalts kommt dem Produkt der amyloidogenen APP – Prozessierung A β zu. In Kapitel 2.3 erfolgte bereits eine ausführliche Schilderung über den Einfluss von A β auf die Ca^{2+} - Homöostase. In der Literatur häufen sich Berichte über die Intervention von A β in den mitochondrialen Haushalt, welcher für die Regulation des Ca^{2+} - Haushalts der Zelle essenziell ist. Caspersen *et al.* gelang der Nachweis von A $\beta_{40/42}$ in der mitochondrialen Matrix von transgenen Mäusen hAPPJ20 (APP K670M, N671L (Swedish), V717F (Indiana)) und von Hirnproben von AD – Patienten. Sie stellten fest, dass die Menge an A β in Mitochondrien mit steigendem Alter zu-, wohingegen der Sauerstoffverbrauch abnahm. Ursächlich dafür war die mit steigendem Alter abnehmende Aktivität von Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) und COX (Cytochrom-c-Oxidase) (Komplex IV) der Atmungskette [60]. Auch Manczak *et al.* berichten von mitochondrial lokalisierten A $\beta_{40/42}$ in Tg2576 Mäusen. Sie konnten außerdem erhöhte Mengen von mitochondrialen ROS, Carbonylproteinen und oxidativen DNA – Schäden sowie eine Reduktion der Aktivität von COX feststellen, was einen Mangel an ATP zur Folge hatte [302]. Die durch die gestörte Membranintegrität und ATP – Mangel verursachte Membrandepolarisation aktiviert die spannungsgesteuerten Ca^{2+} - Kanäle (VGCC) und erzeugt einen Ca^{2+} - Influx über die PM [252]. Auf der anderen Seite kann A β_{1-42} den Ca^{2+} - Influx via präsynaptische P/Q – Typ Ca^{2+} - Kanäle von GABAergen sowie glutamatergen Neuronen inhibieren, was eine Störung der vesikulären Freisetzung von Neurotransmittern zur Folge hat [345]. Neben A β beeinflusst auch das sekretorische Fragment sAPP α die Aktivität von VGCC. Über eine, am ehesten cGMP – medierte, Aktivierung von plasmalemalen K^+ - Kanälen werden die Neuronen hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation behindert wiederum VGCC in ihrer Aktivität [129,369]. Des Weiteren können sowohl das Volllänge – APP als auch sAPP α den Ca^{2+} - Einstrom am ehesten durch die direkte Inhibierung der L – Typ Ca^{2+} - Kanäle hemmen [188].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression von Cav1.3 (CavD, CACNA 1D, L- Typ – Kanal), Cav2.2. (CavB, CACNA 1B, N – Typ – Kanal) und Cav3.1 (CavG, CACNA 1G, T – Typ – Kanal) mittels qRT – PCR in *post mortem* Hirnproben der AD – Patienten sowie in unterschiedlichen Zelllinien von SH-SY5Y analysiert. Da SH-SY5Y überwiegend die aufgeführten Ca^{2+} - Kanäle exprimieren, war die Selektion der zu untersuchenden Kanäle hiermit begründet [438]. Die Genexpression von Cav2.2 und Cav1.3 war in der AD – Kohorte signifikant erhöht (4.4.1). Es ist wichtig zu wissen, dass die Kontrollgruppe

keineswegs ausschließlich aus gesunden Probanden bestand, sie wurde vielmehr aus den Vorstadien (Braak – Stadium I-III) zusammengesetzt und enthielt nur vier Patienten mit Braak – Stadium 0. Somit spiegelt die Erhöhung der Genexpression am ehesten eine stadienabhängige Expression wider, wobei diese mit steigendem Stadium zunimmt. Die ausführliche Diskussion erfolgt in Kapitel 5.5. Da A β eine besondere Rolle in der Pathogenese von AD zukommt, wurde deren Einfluss somit auf die Genexpression in unterschiedlichen Zelllinien der humanen Spezies untersucht.

Zunächst wurde die Genexpression von CavD in SH-SY5Y APP -/- untersucht und mit SH-SY5Y WT (mock) verglichen, wobei eine signifikante Reduktion festgestellt wurde (4.1.4, Abb. 13). Da allerdings SH-SY5Y APP -/- eine Defizienz für das Volllänge – APP und alle seine Spaltprodukte hat, ist es nicht möglich, Rückschlüsse auf eines der Spaltprodukte zu ziehen. Kim & Rhim untersuchten den Einfluss von A β_{25-35} auf CavD. In hippocampalen Neuronen der Ratten konnte nach der Inkubation mit A β_{25-35} weder bzgl. der mRNA – Menge noch des Gesamtproteinlevels von CavD ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden [244]. Es gelang ihnen jedoch der Nachweis einer gesteigerten Oberflächenexpression von CavD in hippocampalen Neuronen. Zusätzlich ergab die Patch – Clamp – Technik einen gesteigerten Ca^{2+} - Strom durch CavD in HEK293 - Zellen, wobei A β am ehesten über die β_3 – Untereinheit mit dem Kanal interagiert [244]. Um den Einfluss von A β in der SH-SY5Y – Zelllinie zu verifizieren, wurde das Modell SH-SY5Y APP^{swe} verwendet, welches durch seine Mutationen eine gesteigerte amyloidogene APP – Prozessierung hat und folglich mit einer exzessiven A β – Produktion einhergeht. Überraschenderweise konnte auch hier eine signifikante Reduktion der Genexpression von CavD gezeigt werden (4.1.4, Abb. 13). Da jedoch bei einer gesteigerten (amyloidogenen) APP – Prozessierung zusätzlich vermehrt AICD anfällt, könnte die Reduktion der Genexpression von AICD beeinflusst sein. Folglich wurde als nächstes SH-SY5Y Fe65 – KD untersucht (4.1.8, Abb. 19). Da Fe65 den Translokationspartner von AICD darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass bei einem Fe65 – KD die Translokation von AICD in den Nukleus und somit die Genregulation gestört ist. Die hierfür vermessenen Proben wiesen eine hohe Homogenität auf und ergaben eine signifikante Reduktion der Genexpression von CavD. Presenilin als das aktive Zentrum der γ – Sekretase spaltet APP und setzt im Rahmen der amyloidogenen APP – Prozessierung A β frei. Demnach erfolgte die Untersuchung der Gentranskription in SH-SY5Y PS1 -/-, wobei kein Unterschied zur Kontrolle feststellbar war (4.1.2, Abb. 11). Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse für eine AICD – abhängige Potenzierung der Genexpression von CavD, wohingegen A β diese am ehesten herunterreguliert.

Für die Analyse der Genexpression von CavB wurden dieselben Zelllinien wie für CavD verwendet. CavB stellt einen präsynaptischen N – Typ Ca^{2+} - Kanal dar, der bei Eintreffen des Aktionspotenzials die

Fusion der mit Neurotransmittern gefüllten Vesikel mit der präsynaptischen Membran aktiviert [346]. Bobich *et al.* untersuchten die Freisetzung von Noradrenalin und Glutamat an den Nervenendigungen der kortikalen Neuronen von Ratten nach einer Inkubation mit A β ₁₋₄₂ – Oligomeren und stellten eine Forcierung der Neurotransmittersezernierung fest, die nach der Applikation des N – Typ spezifischen Blockers ω – conotoxin GVIA wieder aufgehoben werden konnte [34]. Price *et al.* gelang es mittels Voltage – Clamp – Methode erhöhte Ca²⁺ - Ströme nach einer Inkubation mit A β ₁₋₄₀ in zerebellären Körnerzellen zu messen, die ebenfalls durch ω – conotoxin GVIA blockiert werden konnten [376]. Kasparová *et al.* berichten hingegen von einer Reduktion der Ca²⁺ - Ströme in NG108-15 – Zellen (neuronaler Zelllinie einer Fusion aus Maus – Neuroblastom – und Ratte – Gliom – Zellen) nach einer A β ₁₋₄₂ – Inkubation [237]. Ob A β VGCC aktiviert oder inhibiert, hängt mitunter von seinem Aggregationszustand ab. Sowohl in kortikalen Neuronen als auch in zerebellären Körnerzellen erfuhr CavB eine Stimulation durch das nicht – aggregierte A β ₁₋₄₀, während die aggregierte Form den Ca²⁺ - Strom hemmte [381]. Die Analyse der Genexpression von CavB in SH-SY5Y APP -/- verglichen zu SH-SY5Y WT (mock) (4.1.4, Abb. 13) zeigte eine hochsignifikante Steigerung der Genexpression. Auch in SH-SY5Y PS1 -/- zeichnete sich eine signifikante Erhöhung der Genexpression ab (4.1.2, Abb. 11). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Ca²⁺ - Strommessungen von Anna-Maria Miederer/AG Niemeyer überein. Sowohl in SH-SY5Y APP -/- als auch in SH-SY5Y PS1 -/- konnte ein verstärkter Ca²⁺ - Influx am ehesten via CavB gegenüber der jeweiligen Kontrolle verzeichnet werden [322]. Beide Zelllinien haben eine Defizienz von A β , sodass es sich vermuten lässt, dass A β möglicherweise inhibitorisch in die Genregulation eingreift. Diese Vermutung lässt sich auch durch die signifikante Reduktion der Genexpression in SH-SY5Y APP^{sw} festigen (4.1.4, Abb. 13). In SH-SY5Y APP^{sw} wird die amyloidogene APP – Prozessierung forciert, wobei neben exzessiven A β auch AICD anfällt. Um die Rolle von AICD zu untersuchen, wurden folglich SH-SY5Y Fe65 – KD untersucht (4.1.8, Abb. 19). Hierbei konnte allerdings eine nicht signifikante Reduktion der Genexpression gezeigt werden. Diese Ergebnisse sprechen für die Regulation der Genexpression von CavB ausschließlich durch A β , wobei dieses einen inhibitorischen Einfluss auf die Genregulation ausübt. Um dies zu prüfen, sollte die Genexpression in SH-SY5Y nach einer A β - bzw. AICD – Inkubation bestimmt werden. Außerdem sollte das Proteinlevel von CavB in den unterschiedlichen Zelllinien bestimmt werden.

Schließlich erfolgte die Messung der Genexpression von bisher nur wenig untersuchtem CavG. CavG ist ein T – Typ Ca²⁺ - Kanal, der hauptsächlich im Hirngewebe lokalisiert ist. Er erfüllt die Funktion eines Schrittmachers und Oszillationsgenerators und ist bereits bei kleinster Membrandepolarisation aktiviert, während eine zu starke Depolarisation seine Aktivität inhibiert [272]. He *et al.* berichten von einer Erhöhung der Ca²⁺ - Ströme durch den T – Typ Ca²⁺ - Kanal nach einer Inkubation mit dem

aggregierten A β 25-35 [183]. Die Messung der Genexpression von CavG im Rahmen dieser Arbeit ergab hingegen keinen signifikanten Unterschied in der Zelllinie mit einer gesteigerten A β – Produktion (SH-SY5Y APP^{swe} (4.1.4, Abb. 13)) verglichen mit der Kontrolle. Allerdings konnte sowohl in SH-SY5Y APP - /- (4.1.4, Abb. 13) als auch in SH-SY5Y PS1 -/- (4.1.2, Abb. 11) eine signifikante sowie in SH-SY5Y Fe65 – KD (4.1.8, Abb. 19) eine knapp nicht signifikante Erhöhung gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten im Umkehrschluss auf einen inhibitorischen Einfluss von AICD auf die Genexpression von CavG.

Um den Einfluss von A β auf die Genexpression zu prüfen, wäre eine Inkubation mit unterschiedlichen A β – Spezies (1-40/42) und idealerweise in unterschiedlichen Aggregationszuständen von Bedeutung. Eine AICD – Transfektion könnte weiteren Aufschluss über die Genregulation geben. Schließlich sollten die Ergebnisse unter Verwendung der Zelllinien unterschiedlicher Spezies verifiziert werden.

5.5 GENEXPRESSION VON SOCE UND VGCC IN *post mortem* AD – HIRNPROBEN

Steigendes Alter stellt einen der wichtigsten Faktoren in der Entwicklung der Alzheimer Krankheit dar [160]. Die Pathogenese von AD ist jedoch auch u.a. mit dem Geschlecht und dem ApoE – Status assoziiert (2.1.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von 228 Hirnproben untersucht, inwiefern die Genexpression von ORAI1-3, STIM1, STIM2, CavB und CavD vom Alter, dem Geschlecht und dem ApoE – Status beeinflusst wird und wie sich diese mit dem Fortschritt der Krankheit, ausgedrückt in Braak – Stadien, ändert.

Im ersten Schritt erfolgte die Einteilung der Proben in die einzelnen Gruppen, wobei sich diese am Braak – Stadium ausrichtete. So wurde die Gruppe der klinisch gesunden Probanden aus den Stadien 0 – III der Kontrollkohorte zugeordnet, während die AD – Kohorte Braak - Stadien IV – VI (= AD – Kohorte) enthielt. Die Geneexpression von allen Genen war in der AD – Kohorte signifikant gesteigert.

5.5.1 Einfluss von Alter auf die Genexpression

Zunächst wurde untersucht, ob das Alter unabhängig vom Braak - Stadium einen Einfluss auf die Gentranskription ausübt. Hierzu wurde die Korrelation vom Alter mit der Genexpression bestimmt, wobei in die Korrelationsanalyse alle Hirnproben (Braak – Stadium 0 – VI) miteinbezogen wurden. Für CavB, CavD und STIM1 konnte hierbei eine lineare negative Korrelation festgestellt werden. Außerdem korrelierte auch ORAI1 negativ mit dem Alter. Das Verhältnis von ORAI1 mit dem Alter konnte jedoch nicht mit einem linearen Zusammenhang wiedergegeben werden. Bei der Untersuchung der einzelnen Kohorten zeigte sich ein linearer negativer Zusammenhang zwischen dem Alter und den Genen CavB, CavD sowie STIM1 (und mit knapper Nicht-Signifikanz STIM2 ($p = 0,057$)) in der AD - Kohorte. Dabei korrelierten in der AD – Kohorte ORAI1 und ORAI3 ebenfalls negativ mit dem Alter, wiesen jedoch

keinen linearen Zusammenhang auf. Zusätzlich konnte auch eine negative Korrelation zwischen CavD und dem Alter in der Kontrollkohorte festgestellt werden. Somit wird die Genexpression mit steigendem Alter von CavB, CavD, ORAI1, ORAI3, STIM1 und vermutlich auch STIM2 herunterreguliert. Dies gilt allerdings nur in Kombination mit AD. Mittels multipler linearer Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von CavB, CavD, ORAI1, ORAI3, STIM1 und STIM2 allein beim Vorliegen von AD eine signifikante Steigerung erfährt. Zusätzlich konnte in Bezug zu CavD eine negative Korrelation mit dem Alter in der Kontrollkohorte gezeigt werden. Des Weiteren wurden die Kohorten in sechs Altersgruppen unterteilt: 60 – 69 Jahre (n = 19), 70 – 74 (n = 20), 75 – 79 (n = 34), 80 – 84 (n = 43), 85 – 89 (n = 59), 90 – 99 (n = 53). Da die Inhomogenität der Gruppengrößen zu verzerrten Ergebnissen führen könnte, wurde der Median (ca. 84 Jahre) der Variable „Alter“ mit dem Mittelwert (ca. 83 Jahre) verglichen. Da sich die zwei Parameter nicht wesentlich voneinander unterschieden, konnte eine Normalverteilung angenommen werden. Außerdem kann die Zuteilung zu den einzelnen Gruppen per se einen Informationsverlust nach sich ziehen. Aus diesem Grund wurde nochmals eine Korrelationsanalyse durchgeführt, wobei das Alter in Gruppen eingeteilt nun als eine ordinalskalierte Variable betrachtet wurde, und mit den Ergebnissen der Korrelationsanalyse mit intervallskaliertem Alter verglichen. Hierbei zeigten sich kaum Unterschiede. Somit wurde die Einteilung in die einzelnen Altersgruppen als legitimiert betrachtet. Die anschließend durchgeführte ANOVA – Analyse ergab in der AD – Kohorte mit steigendem Alter eine signifikante Reduktion der Genexpression von CavD von den jüngeren hin zu den älteren Altersgruppen (4.4.1.1, Abb. 41). Es deutet darauf hin, dass das steigende Alter als eigenständiger Einflussfaktor nur die Genexpression von CavD negativ reguliert. Die negative Korrelation des Alters mit der Genexpression von CavB, ORAI1, ORAI3 und STIM1 scheint nur in Kombination mit AD zustande zu kommen. Es sollte berücksichtigt werden, dass von 71 Probanden aus der Kontrollkohorte nur vier Probanden das Braak – Stadium 0 erfüllten, also keinerlei NFT – Pathologie aufwiesen. Die restlichen 67 Probanden gehörten den Braak – Stadien I bis III an. Es besteht aber ein Zusammenhang zwischen den frühen Braak – Stadien und dem MCI im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer (MCI – AD) (engl. mild cognitive impair). Die frühen Braak – Stadien sind nicht nur mit MCI – AD assoziiert, sondern auch das Auftreten einer Demenz bis hin zum Braak – Stadium I ist möglich [388]. Einer Metaanalyse aus 32 Studien zufolge, soll MCI – AD in knapp 32 % der Fälle innerhalb von 5 Jahren zu einer AD – Demenz fortschreiten [481]. Auch wenn die Probanden aus der Kontrollkohorte keine klinische AD nach CERAD zur Diagnose hatten, ist trotzdem nicht sicher auszuschließen, die frühen Braak – Stadien üben keinen Einfluss auf die Genregulation aus. Somit kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede, die zwischen der AD – und der Kontrollkohorte zustande kamen, der Gesamtpopulation entsprechen. Es sollten somit für eindeutige

Aussagen möglichst nur Probanden, die keinem Braak – Stadium zugeordnet werden können, die Kontrollkohorte repräsentieren.

5.5.2 Einfluss von Braak – Stadium auf die Genexpression

Als nächstes wurde untersucht, ob die Genexpression Braak – Stadium abhängig ist. Die Analyse ergab eine positive signifikante Korrelation zwischen dem steigenden Braak – Stadium und der Genexpression von allen Genen. Es konnte ein teilweiser linearer Zusammenhang zwischen dem Braak – Stadium I und dem Stadium V und/oder VI für die Gene CavB, ORAI1, ORAI3, STIM1 und STIM2 gezeigt werden (4.4.1.2). Wenn man die mittlere Genexpression der einzelnen Braak – Stadien vergleicht, wird ersichtlich, dass der lineare Zusammenhang durch die geringere Genexpression in den Stadien II und III „verzogen“ wird. Hypothetisch die beiden Stadien ausgeschlossen, würde sich eine perfekte lineare Regression ergeben, wobei mit dem steigenden Braak – Stadium die Genexpression stetig zunehmen würde. Die Ergebnisse können möglicherweise von der ungleichen Gruppenverteilung beeinflusst worden sein. Denn das Stadium II schließt nur 20 Probanden ein, während das Stadium III bloß von neun Probanden repräsentiert wird. Die Untersuchung der Genexpression sollte demnach mit einer größeren Probandenanzahl bei homogener Gruppeneinteilung wiederholt werden.

5.5.3 Einfluss vom ApoE – Status auf die Genexpression

Das $\epsilon 4$ – Allel von Apolipoprotein E, einem Cholesterintransporter, stellt den wichtigsten genetischen Risikofaktor dar [87,297]. Es sind drei Allele bekannt, die für ApoE kodieren. Da jeweils ein Allel von jedem Elternteil vererbt wird, gibt es folglich sechs Kombinationen von Allelpaaaren. In der abnehmenden Reihenfolge des Auftretens gilt $\epsilon 3\epsilon 3$ mit 60 % als die häufigste Variante, es folgt $\epsilon 3\epsilon 4$ mit 21 %, $\epsilon 2\epsilon 3$ mit 12 %, $\epsilon 4\epsilon 4$ mit 2 % und $\epsilon 2\epsilon 2$ mit 1 % in der U.S. amerikanischen Bevölkerung [380]. Weltweit haben geschätzt 10 – 15 % aller Menschen ein $\epsilon 4$ – Allel [365]. Das Risiko im Laufe des Lebens AD zu entwickeln, ist bei Vorliegen von nur einem $\epsilon 4$ – Allel 2 - bis 3 - fach sowie bei zwei $\epsilon 4$ – Allelen 8 - bis 12 – fach erhöht verglichen zur Kohorte mit zwei $\epsilon 3$ – Allelen [198,296]. Wohingegen das $\epsilon 2$ – Allel im Vergleich zur Kohorte mit $\epsilon 3$ – Allel einen Alzheimer – protektiven Effekt aufweist [88]. Das Vorliegen von nur einem $\epsilon 4$ – Allel erhöht nicht nur das Lebenszeitrisiko, an Alzheimer zu erkranken, sondern setzt auch das Manifestationsalter herunter [365]. Pro $\epsilon 4$ – Allel wird das Manifestationsalter um etwa 7 bis 9 Jahren herabgesetzt [87]. Pathophysiologisch wird vermutet, der reduzierte ApoE – Spiegel bei ApoE - $\epsilon 4$ Trägern fördere die A β – Aggregation oder inhibiere deren Elimination [370]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde folglich bei der Auswertung der Genexpression auch der Allelstatus von ApoE als möglicher Einflussfaktor in Betracht gezogen (4.4.1.3).

Nach der Analyse der sechs möglichen Allelkonstellationen entstand der Eindruck, dass bei zusätzlichem ϵ_3 - Allel die Genexpression von den Genen ORAI1, ORAI3, STIM1 und STIM2 ansteigt. Für das ϵ_4 -Allel kann anhand der ANOVA jedoch keine sichere Aussage gemacht werden. Einerseits steigt die Genexpression signifikant bei der Gruppe $\epsilon_4\epsilon_3$ im Vergleich zur Gruppe $\epsilon_3\epsilon_2$ für ORAI1, ORAI3, STIM1 und STIM2, wobei CavB eine nicht signifikante Steigerung andeutet, andererseits gibt es nur für STIM1 einen signifikanten Beleg dafür, dass die Genexpression der Gruppe $\epsilon_4\epsilon_4$ in Bezug zur Gruppe $\epsilon_3\epsilon_2$ ansteigt. Wenn man davon ausgeht, dass das ϵ_4 -Allel, welches mit Alzheimer assoziiert sein soll, die Genexpression beeinflusst, würde man eine Steigerung der Genexpression bei der Gruppe $\epsilon_4\epsilon_4$ sowohl im Vergleich zu $\epsilon_3\epsilon_2$ und $\epsilon_3\epsilon_3$ als auch zur Gruppe $\epsilon_4\epsilon_3$ erwarten. Dies war nicht der Fall. Im Umkehrschluss konnte aufgrund der geringen Anzahl der Probanden für die Gruppe $\epsilon_2\epsilon_2$ keine Aussage bezüglich der AD - protektiven Wirkung [88] von ϵ_2 -Allel gemacht werden.

Die Untersuchung der Inzidenz von ϵ_3 - bzw. ϵ_4 – Allel zeigte jedoch, dass bei zusätzlichem ϵ_3 – Allel (= 2 x ϵ_3) die Genexpression von CavD gegenüber der Gruppe mit keinem ϵ_3 – Allel (= 0 x ϵ_3) signifikant herunterreguliert wurde, wohingegen diese bei Vorliegen von zwei ϵ_4 – Allelen (= 2 x ϵ_4) verglichen zur Gruppe mit keinem ϵ_4 – Allel (= 0 x ϵ_4) signifikant zunahm. Auch gegenüber der Gruppe mit einem ϵ_4 – Allel (= 1 x ϵ_4) konnte in 2 x ϵ_4 eine signifikante Steigerung beobachtet werden (Abb. 43). Des Weiteren war in 2 x ϵ_4 – Gruppe die Genexpression von CavB und ORAI1 gegenüber 0 x ϵ_4 ebenfalls gesteigert (Abb. 43). Da die Analyse der Genexpression in der AD – Kohorte (4.4.1, Abb. 40) verglichen zur Kontrollkohorte ebenfalls eine Steigerung der Genexpression für CavB, CavD und ORAI1 ergab, und das ϵ_4 – Allel nur in der Gruppe der AD – Probanden exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass ApoE ϵ_4 – Allel neben dem höheren Braak – Stadium zu der Steigerung signifikant beiträgt.

5.5.4 Einfluss des Geschlechts auf die Genexpression

Die Frage, ob Frauen ein höheres Risiko haben, an Morbus Alzheimer zu erkranken, wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Die Prävalenz von Frauen ist höher als von Männern und somit sei das weibliche Geschlecht mit einem höheren Risiko verbunden. Vor allem Frauen über 90 Jahren sollen viel öfter an Morbus Alzheimer erkranken als Männer [8,89]. Möglicherweise liegt dies in der höheren Lebenserwartung von Frauen gegenüber den Männern begründet, wobei das hohe Alter einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von AD darstellt [185]. Andere Studien können keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern belegen [14,259]. Während die kumulative Inzidenz für das Auftreten von AD in beiden Geschlechtern etwa ähnlich sei, haben die Frauen älter als 85 Jahre ein höheres Lebenszeitrisiko, an AD zu erkranken. Eine Studie kam unter Verwendung der Daten der Framingham Heart Study zu dem Schluss, dass Männer, die in ein höheres Alter (> 65 Jahre)

kommen, ein geringeres kardiovaskuläres Risikoprofil aufweisen als Frauen im gleichen Alter, wobei ein hohes kardiovaskuläres Risikoprofil zur Entstehung von AD beiträgt (2.1.3). Ursächlich hierfür ist die höhere kardiovaskuläre Mortalität der Männer zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr, sodass kardiovaskulär gesündere Männer das höhere Alter erreichen. Somit kann hier von einem Selektionsbias gesprochen werden. [75]. Außerdem sollen Männer, die aufgrund der Frauenbenachteiligung in den 60. – 70. Jahren des vergangenen Jahrhunderts eine höhere Bildung genossen haben und höhere Berufsposten besetzen konnten, eine stärkere kognitive Reserve aufgebaut haben [75]. Und eine kognitive Reserve soll wiederum die AD – pathologischen Hirnveränderungen länger kompensieren und den Zeitpunkt des Auftretens von AD hinauszögern, sodass die Männer zu Lebzeiten zum Teil die Diagnose AD gar nicht gestellt bekommen [444].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein geschlechtsspezifischer Einfluss auf die Genexpression identifiziert werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint die Genexpression von den untersuchten Genen CavB, CavD, ORAI1 – 3, STIM1 und STIM2 nicht vom Geschlecht abhängig zu sein (4.4.1.4, Tab. 19).

5.6 AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Einfluss von APP – Prozessierungsprodukten und Presenilinen auf die Genexpression und Aktivität von STIM – und ORAI – Proteinen sowie auf die Genexpression von Cav – Proteinen untersucht werden. Außerdem erfolgte die Untersuchung der reversen Regulation von Sekretasen durch STIM1 und STIM2. Schließlich wurden humane *post mortem* Hirnproben von AD – Patienten der Analyse der Genexpression von STIM, ORAI und VGCC unterzogen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Inkubation der MEF APP/APLP2 *-/-* mit dem AICD – Peptid nicht vollends etabliert werden. Es sollte die Inkubationsdauer für eine Kurz- und Langzeitinkubation festgesetzt werden, wobei die Messungen mit einer repräsentativen Probenanzahl erfolgen sollten. Außerdem sollte stets der Transfektionserfolg überprüft werden.

Außerdem wurde insbesondere bei der Analyse der Genexpression in SH-SY5Y APP^{sw} eine nur begrenzte Probenanzahl geprüft. Um den Einfluss von A β auf die Genexpression untersuchen zu können, sollte eine größere Probenanzahl von SH-SY5Y APP^{sw} verwendet werden. Zusätzlich wäre eine Inkubation mit A β – Peptiden von Bedeutung.

Es sollte neben der Messung der Genexpression und der Aktivität von STIM - und ORAI - Proteinen deren Proteinlevel bestimmt werden. Nur so kann ein vollständiges Bild vom Gen über Protein bis zur Funktion generiert werden.

Die Untersuchung der γ – Sekretaseaktivität nach einer Behandlung mit pharmakologischen Substanzen sollte unter Prüfung der Zytotoxizität ebenfalls in einer größeren Probenanzahl wiederholt werden. Möglich wäre es unterschiedliche Inkubationsbedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen auszuprobieren. Außerdem ist es von Bedeutung unter den jeweiligen Bedingungen stets die $[Ca^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_{ER}$ zu wissen, um die Ergebnisse bzgl. der Rolle von Ca^{2+} richtig interpretieren zu können.

Bei der Messung der γ – Sekretase Aktivität im Ca^{2+} - freien Messmedium wurde zum Teil sowohl für die Vermessung der zu untersuchenden Zelllinie als auch für die Kontrolle das Ca^{2+} der Messlösung entzogen. Dabei sollte aber stets schrittweise nur eine Bedingung verändert werden. So wäre es ratsam, die Kontrollzellen in einer normalen Messlösung zu belassen und vorerst nur die Messbedingungen von der zu untersuchenden Zelllinie zu verändern.

Einer Überprüfung bedarf die Hypothese, PS1 greife in die Funktion von PS2 ein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur bei der Spekulation der möglichen $[Ca^{2+}]_i$ anhand indirekter Hinweise darauf geschlossen werden.

PS1 spaltet als die katalytische Einheit der γ – Sekretase STIM1 analog zu APP in seiner Transmembrandomäne [460]. Die Steigerung der Genexpression von STIM1 in Hirnproben von höheren Braak – Stadien könnte möglicherweise im Sinne einer kompensatorischen Antwort auf die gesteigerte Degradation durch das aktivere PS1 gedeutet werden. Pascual – Caro *et al.* wiesen in AD – Hirnproben mit Braak – Stadien IV – VI ein reduziertes Proteinlevel von STIM1 nach, [364], was für seine gesteigerte Degradation sprechen würde. Da STIM1 durch eine direkte Interaktion die Aktivität sowohl von Cav1.2 als auch von Cav3.1 inhibiert [343,362], würde folglich die gesteigerte Degradation von STIM1 in AD zu einer Enthemmung der Cav1.2 sowie Cav3.1 führen mit gesteigertem Ca^{2+} - Influx ins Zytosol als Folge. Diese Störung der Ca^{2+} - Homöostase zieht gravierende Folgen nach sich und begünstigt u.a. die Neurodegeneration und Entstehung von AD (Kapitel 2.3). Dafür spricht die erhöhte Genexpression von Cav1.2, die im Rahmen dieser Arbeit in *post mortem* AD – Hirnproben aufgezeigt werden konnte. Ob die Steigerung der Gentranskription von Cav1.2 aus der Enthemmung aufgrund der stärker degradierten STIM – Proteine oder aus der Störung der Ca^{2+} - Homöostase resultiert, bleibt noch zu klären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hinweis gefunden, STIM1 habe aktivitätssenkende Eigenschaften auf die γ – Sekretase. Somit könnte durch den Einsatz von Medikamenten, die die Funktion von STIM1 positiv modulieren, zum einen über seine γ – Sekretase repressiven und α – Sekretase fördernden Eigenschaften die Bildung der toxischen Amyloidablagerungen reguliert werden und zum anderen über seine VGCC – inhibierenden Eigenschaften der Ca^{2+} - Haushalt moduliert werden. Diese Eigenschaften verheißen STIM1 zu einem AD – protektiven Target.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahmad F, Boulaftali Y, Greene TK, Ouellette TD, Poncz M, Feske S, Bergmeier W (2011) Relative contribution of STM1 and CalDAG-GEFI to calcium-dependent platelet activation and thrombosis. *J Thromb Haemost* 9:2077–2086
2. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WST, Hull M, Landreth G, Lue LF, Mrak R, Mackenzie IR, Mcgeer L, Banion MKO, Pachter J, Pasinetti G, Salaman CP, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Muiswinkel FL Van, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Coray TW (2000) Inflammation and Alzheimer's.
3. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:270–279
4. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2011) Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol* 164:S61, S126
5. Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Vincent B, Boyer N, Kawarai T, Girardot N, St. George-Hyslop P, Checler F (2006) Presenilin-Dependent - Gamma Secretase-Mediated Control of p53-Associated Cell Death in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 26:6377–6385
6. Alzheimer's Disease Facts and Figures (2018) Alzheimer's Association. *Alzheimers Dement* 14:367–429
7. Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschrift für Psychiatr und Psych Medizin*, 64 Band 146–148
8. Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JRM, Dartigues J-F, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A, the EURODEM Incidence Research Group (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia- the EURODERM Studies. *Neurology* 53:1992–1997
9. Arispe N, Rojas E, Pollard HB (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: Blockade by tromethamine and aluminium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:567–571
10. Arrighi HM, Neumann PJ, Lieberburg IM, Townsend RJ (2010) Lethality of alzheimer disease and its impact on nursing home placement. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 24:90–95
11. Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha -secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301:231–235
12. Avila J, León-Espinosa G, García E, García-Escudero V, Hernández F, DeFelipe J (2012) Tau Phosphorylation by GSK3 in Different Conditions. *Int J Alzheimers Dis* 2012:1–7
13. Baba TW, Giroir BP, Humphries EH (1985) Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144:139–151
14. Bachman D, Wolf P, Linn R, Knoefel J, Cobb J, Belanger A, White L, D'Agostino R (1993) Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. *Neurology* 43:515–9
15. Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tökés ZA (1996) Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Is Synthesized in Neurons of the Human Hippocampus and Is Capable of Degrading the Amyloid- β Peptide (1–40). *J Neurosci* 16:7910–7919
16. Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG (2002) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF- κ B and β -amyloid precursor protein. *Cell* 110:55–67
17. Bagyinszky E, Youn YC, An S, Kim S (2014) The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 9:535–551
18. Barco A, Alarcon JM, Kandel ER (2002) Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 108:689–703
19. Bean BP (1989) Classes Of Calcium Channels In Vertebrate Cells. *Annu Rev Physiol* 51:367–384
20. Beel AJ, Sanders CR (2008) Substrate specificity of γ -secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci* 65:1311–1334
21. Bekris LM, Yu C-E, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:213–227

22. Bengtson CP, Bading H (2012) Nuclear calcium signaling. *AdvExpMedBiol* 970:370–405
23. Berna-Erro A, Braun A, Kraft R, Kleinschnitz C, Schuhmann MK, Stegner D, Wultsch T, Eilers J, Meuth SG, Stoll G, Nieswandt B (2009) STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal* 2:1–11
24. Berna-Erro A, Jardin I, Salido GM, Rosado JA (2017) Role of STIM2 in cell function and physiopathology. *J Physiol* 595:3111–3128
25. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Mol Cell Biol* 4:517–529
26. Berridge MJ (2005) Unlocking the Secrets of Cell Signaling. *Annu Rev Physiol* 67:1–21
27. Berrocal M, Corbacho I, Vázquez-Hernández M, Ávila J, Sepúlveda MR, Mata AM (2015) Inhibition of PMCA activity by tau as a function of aging and Alzheimer’s neuropathology. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1852:1465–1476
28. Bertram L, Lill CM, Tanzi RE (2010) The genetics of alzheimer disease: Back to the future. *Neuron* 68:270–281
29. Besson FL, La Joie R, Doeuvre L, Gaubert M, Mezenge F, Egret S, Landeau B, Barre L, Abbas A, Ibazizene M, de La Sayette V, Desgranges B, Eustache F, Chetelat G (2015) Cognitive and Brain Profiles Associated with Current Neuroimaging Biomarkers of Preclinical Alzheimer’s Disease. *J Neurosci* 35:10402–10411
30. Bezprozvanny I (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 15:89–100
31. Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, Hyman BT, Maggio JE, Selkoe DJ (1996) Amyloid β -peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem* 271:32916–32922
32. Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Tsien RW (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13:505–506
33. Blalock EM, Chen K-C, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW (2003) Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* 23:3807–19
34. Bobich JA, Zheng Q, Campbell A (2004) Incubation of nerve endings with a physiological concentration of A β 1-42 activates CaV2.2(N-Type)-voltage operated calcium channels and acutely increases glutamate and noradrenaline release. *J Alzheimer’s Dis* 6:243–255
35. Bogeski I, Al-Ansary D, Qu B, Niemeyer BA, Hoth M, Peinelt C (2010) Pharmacology of ORAI channels as a tool to understand their physiological functions. *Expert Rev Clin Pharmacol* 3:291–303
36. Bojarski L, Pomorski P, Szybinska A, Drab M, Skibinska-Kijek A, Gruszczynska-Biegala J, Kuznicki J (2009) Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca²⁺ entry in familial Alzheimer’s disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1793:1050–1057
37. Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, Herzog MC, Radde R, Staufenbiel M, Lewis J, Hutton M, Tolnay M, Jucker M (2007) Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid- β -containing brain extract and by amyloid- β deposition in APP x tau transgenic mice. *Am J Pathol* 171:2012–2020
38. Bonvouloir N, Lemieux N, Crine P, Boileau G, DesGroseillers L (2001) Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Chromosomal Localization of MMEL2 , a Gene Coding for a Novel Human Member of the Neutral Endopeptidase-24.11 Family. *DNA Cell Biol* 20:493–498
39. Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A (2010) Activation of Extrasynaptic, But Not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid- Production. *J Neurosci* 30:15927–15942
40. Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17:381–386
41. Bouron A, Mbebi C, Loeffler JP, De Waard M (2004) The β -amyloid precursor protein controls a store-operated Ca²⁺ entry in cortical neurons. *Eur J Neurosci* 20:2071–2078
42. Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M, Bayer TA (2013) N-truncated amyloid β (A β) 4-42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol* 126:189–205
43. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259
44. Braak H, Braak E, Bohl J (1993) Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol* 33:403–408
45. Brandman O, Liou J, Park WS, Meyer T (2007) STIM2 is a Feedback Regulator that Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Levels. *Cell* 131:1327–1339

46. Brini M, Ottolini D, Cali T, Carafoli E (2013) Calcium in health and disease. *Met Ions Life Sci* 13:81–113
47. Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E (2013) Intracellular calcium homeostasis and signaling. *Met Cell, Met Ions Life Sci* 12:119–168
48. Brown MR, Geddes JW, Sullivan PG (2004) Brain Region-Specific, Age-Related, Alterations in Mitochondrial Responses to Elevated Calcium. *J Bioenerg Biomembr* 36:401–406
49. Brunnström HR, Englund EM (2009) Cause of death in patients with dementia disorders. *Eur J Neurol* 16:488–492
50. Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grosgen S, Hundsdorfer B, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weingartner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lutjohann D, Hartmann T, Grimm MOW (2013) Plant Sterols the Better Cholesterol in Alzheimer's Disease? A Mechanistical Study. *J Neurosci* 33:16072–16087
51. Burns M, Gaynor K, Olm V, Mercken M, LaFrancois J, Wang L, Mathews PM, Noble W, Matsuoka Y, Duff K (2003) Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances β -amyloid production in vivo. *J Neurosci* 23:5645–5649
52. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: Central role for amyloid β -peptide. *Trends Mol Med* 7:548–554
53. Buxbaum JD, Liu K, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA (1998) Evidence That Tumor Necrosis Factor alpha Converting Enzyme Is Involved in Regulated alpha - Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor. *J Biol Chem* 273:27765–27767
54. Calloway N, Vig M, Kinet JP, Holowka D, Baird B (2009) Molecular Clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the Plasma Membrane Depends Dynamically on Depletion of Ca^{2+} Stores and on Electrostatic Interactions. *Mol Biol Cell* 20:389–399
55. Calvo-Rodriguez M, Hernando-Perez E, Nuñez L, Villalobos C (2019) Amyloid β Oligomers Increase ER-Mitochondria Ca^{2+} Cross Talk in Young Hippocampal Neurons and Exacerbate Aging-Induced Intracellular Ca^{2+} Remodeling. *Front Cell Neurosci* 13:1–18
56. Cao X, Südhof TC (2001) A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60. *Science (80-)* 293:115–120
57. Carafoli E, Krebs J (2016) Why calcium? How calcium became the best communicator. *J Biol Chem* 291:20849–20857
58. Carbone E, Lux HD (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501–503
59. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8790–8794
60. Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, Xu HW, Stern D, Mckhann G, Yan S Du (2005) Mitochondrial $A\beta$: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's Disease. *FASEB J* 19:1–23
61. Catterall WA (1991) Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: A tale of two calcium channels. *Cell* 64:871–874
62. Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage - gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521–55
63. Catterall WA, Few AP (2008) Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. *Neuron* 59:882–901
64. Catterall WA (2010) Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron* 67:915–928
65. Catterall WA (2011) Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947
66. Caughey B, Lansbury PT (2003) PROTOFIBRILS, PORES, FIBRILS, AND NEURODEGENERATION: Separating the Responsible Protein Aggregates from The Innocent Bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26:267–298
67. Chatzistavraki M, Kyratzi E, Fotinopoulou A, Papazafiri P, Efthimiopoulos S (2013) Downregulation of AbetaPP enhances both calcium content of endoplasmic reticulum and acidic stores and the dynamics of store operated calcium channel activity. *J Alzheimers Dis* 34:407–415
68. Chen HSV, Wang YF, Rayudu P V., Edgecomb P, Neill JC, Segal MM, Lipton SA, Jensen FE (1998) Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* 86:1121–1132
69. Chen M, Fernandez HL (2005) μ -Calpain is functionally required for α -processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 330:714–721

70. Chen Y-F, Chiu W-T, Chen Y-T, Lin P-Y, Huang H-J, Chou C-Y, Chang H-C, Tang M-J, Shen M-R (2011) Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 108:15225–15230
71. Chen Y, McPhie DL, Hirschberg J, Neve RL (2000) The amyloid precursor protein-binding protein APP-BP1 drives the cell cycle through the S-M checkpoint and causes apoptosis in neurons. *J Biol Chem* 275:8929–8935
72. Chen Y, Liu W, McPhie DL, Hassinger L, Neve RL (2003) APP-BP1 mediates APP-induced apoptosis and DNA synthesis and is increased in Alzheimer's disease brain. *J Cell Biol* 163:27–33
73. Chen Y, Bodles AM, McPhie DL, Neve RL, Mrak RE, Griffin WST (2007) APP-BP1 inhibits Abeta42 levels by interacting with Presenilin-1. *Mol Neurodegener* 2:1–12
74. Chen Y, Neve R, Zheng H, Griffin W, Barger S, Mrak R (2014) BILD: Cycle on Wheels: Is APP Key to the AppBp1 Pathway? *Austin Alzheimers Park Dis* 1:1–15
75. Chêne G, Beiser A, Au R, Preis SR, Wolf PA, Dufouil C, Seshadri S (2015) Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimer's Dement* 11:310–320
76. Cheung K-H, Shineman D, Muller M, Cardenas C, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VM-Y, Foscett K (2008) Mechanism of Ca²⁺ Disruption in Alzheimer's Disease by Presenilin Regulation of InsP₃ Receptor Channel Gating. *Neuron* 58:871–883
77. Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchnan M, Hanspal M, Jindal H, Liu S-C, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, CHASIS JA, CONBOY JG, GASCARD P, TAKAKUWA Y, HUANG S-C, BENZ EJ, BRETSCHER AJ, FEHON RG, GUSELLA JF, VIJAYA RAMESH, SOLOMON F, MARCHESI VT, TSUKITA S, TSUKITA S, ARPIN M, LOUVARD D, TONKS NK, ANDERSON JM, FANNING AS, BRYANT PJ, WOODS DF, HOOVER KB (1998) The FERM domain : a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 281–282
78. Chow N, Korenberg JR, Chen XN, Neve RL (1996) APP-BP1, a novel protein that binds to the carboxyl-terminal region of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 271:11339–11346
79. Christie RH, Freeman M, Hyman BT (1996) Expression Of the Macrophage Scavenger Receptor, a Multifunctional Lipoprotein Receptor, In Microglia Associated With Senile Plaques In Alzheimers Disease. *Am J Pathol* 148:399–403
80. Cirrito JR, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW, Audia JE, Nissen JS, Bales KR, Paul SM, DeMattos RB, Holtzman DM (2003) In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci* 23:8844–53
81. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung A, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe D (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672–674
82. Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ (1994) Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11993–11997
83. Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047–1058
84. Cohen J (1988) *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.).
85. Cohen J (1992) A power primer. *Psychol Bull* 112(1):155–159
86. Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58:453–508
87. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small W, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science* (80-) 261:921–923
88. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell JPC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7:180–184
89. Corrada MM, Brookmeyer R, Berlau D, Paganini-Hill A, Kawas CH (2008) Prevalence of dementia after age 90. Results from 90+ Study. *Neurology* 71:337–343
90. Covington ED, Wu MM, Lewis RS (2010) Essential Role for the CRAC Activation Domain in Store-dependent Oligomerization of STIM1. *Mol Biol Cell* 21:1897–1907
91. Curtis BM, Catterall WA (1984) Purification of the Calcium Antagonist Receptor of the Voltage-Sensitive Calcium Channel from Skeletal Muscle Transverse Tubules. *Biochemistry* 23:2113–2118
92. Darbellay B, Arnaudeau S, Bader CR, Konig S, Bernheim L (2011) STIM1L is a new actin-binding splice

- variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *J Cell Biol* 194:335–346
93. Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS, Dolphin AC (2010) The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci* 107:1654–1659
 94. Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, Van Der Ploeg LHT, Sirinathsinghji DJS (1999) Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the β -amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90:1–13
 95. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichelen H, Guhde G, Annaert W, von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387–390
 96. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm J, Schroeter E, Schrijvers V, Wolfe M, Ray W, Goate A, Kopan R (1999) A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518–522
 97. De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS (2012) Presenilins and gamma-Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006304
 98. De Waard M, Gurnett CA, Campbell KP (1996) Structural and Functional Diversity of Voltage- Activated Calcium Channels. *Ion Channels* 4:41–87
 99. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic B V. (2004) LRP/Amyloid beta-Peptide Interaction Mediates Differential Brain Efflux of Abeta Isoforms. *Neuron* 43:333–344
 100. Delacourte A, Buee L (2000) Tau pathology: A marker of neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol* 13:371–376
 101. Demaurex N, Frieden M (2003) Measurements of the free luminal ER Ca²⁺ concentration with targeted “cameleon” fluorescent proteins. *Cell Calcium* 34:109–119
 102. Derler I, Plenk P, Fahrner M, Muik M, Jardin I, Schindl R, Gruber HJ, Groschner K, Romanin C (2013) The extended transmembrane orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for orai1 activation by STIM1. *J Biol Chem* 288:29025–29034
 103. Desai P, Zhang X, Wu S, Janoshazi A, Bolimuntha S, Putney J, Trebak M (2015) Multiple Types of Calcium Channels Arising from Alternative Translation Initiation of the Orai1 Message. *Sci Signal* 8:ra74
 104. Di Capite J, Parekh AB (2009) CRAC channels and Ca²⁺ signaling in mast cells. *Immunol Rev* 231:45–58
 105. Donoviel DB, Hadjantonakis A-K, Ikeda M, Zheng H, Hyslop PSG, Bernstein A (1999) Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *GENES Dev* 13:2801–2810
 106. Du Y, Ni B, Glinn M, Dodel RC, Bales KR, Zhang Z, Hyslop PA, Paul SM (1997) alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein. *J Neurochem* 69:299–305
 107. Eckman EA, Reed DK, Eckman CB (2001) Degradation of the Alzheimer's Amyloid β Peptide by Endothelin-converting Enzyme. *J Biol Chem* 276:24540–24548
 108. Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamurti K, Eckman CB (2003) Alzheimer's disease β -amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 278:2081–2084
 109. Eggert S, Paliga K, Soba P, Evin G, Masters CL, Weidemann A, Beyreuther K (2004) The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves α -, β -, γ -, and ϵ -Like cleavages: Modulation of APLP-1 processing by N-glycosylation. *J Biol Chem* 279:18146–18156
 110. Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113–123
 111. Eikelenboom P, Bate C, Van Gool WA, Hoozemans JJM, Rozemuller JM, Veerhuis R, Williams A (2002) Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia* 40:232–239
 112. Emilsson L, Saetre P, Jazin E (2006) Alzheimer's disease: MRNA expression profiles of multiple patients show alterations of genes involved with calcium signaling. *Neurobiol Dis* 21:618–625
 113. Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto YI, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I (2015) Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Hum Mol Genet* 24:637–648
 114. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Caterrall WA (2000) Nomenclature of voltage - gated calcium channels. *Neuron* 25:533–535

115. Etcheberrigaray R, Hirashima N, Nee L, Prince J, Govoni S, Racchi M, Tanzi RE, Alkon DL (1998) Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families. *Neurobiol Dis* 5:37–45
116. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lütjohann D, Keller P, Runz H, Kühl S, Bertsch T, Von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5856–5861
117. Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS (1985) Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 359:431–446
118. Feske S, Prakriya M, Rao A, Lewis RS (2005) A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* 202:651–662
119. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179–185
120. Flavell SW, Greenberg ME (2008) Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. *Annu Rev Neurosci* 31:563–590
121. Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F, Pelzer D, Cavalié A, Trautwein W (1986) Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* 323:66–68
122. Forde JE, Dale TC (2007) Glycogen synthase kinase 3: A key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* 64:1930–1944
123. Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, Himes CS, Hiebsch R, Ruble C, Nye JS, Curtis D (2002) aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3:85–97
124. Franz G, Beer R, Kampf A, Engelhardt K, Schmutzhard E, Ulmer H, Deisenhammer F (2003) Amyloid beta 1-42 and tau in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *Neurology* 60:1457–1461
125. Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saito TC, Hsiao K, Cole GM (1998) Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 152:307–17
126. Freshney RI (2010) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.
127. Frykman S, Hur JY, Frånberg J, Aoki M, Winblad B, Nahalkova J, Behbahani H, Tjernberg LO (2010) Synaptic and endosomal localization of active γ -secretase in rat brain. *PLoS One* 5:eB948
128. Fukushima M, Tomita T, Janoshazi A, Putney JW (2012) Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J Cell Sci* 125:4354–4361
129. Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP (1996) Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379:74–78
130. Furukawa K, Mattson MP (1998) Secreted amyloid precursor protein selectively suppresses N-methyl-D-aspartate currents in hippocampal neurons: Involvement of cyclic GMP. *Neuroscience* 83:429–438
131. Garcia-Alvarez G, Shetty MS, Lu B, Yap KAF, Oh-Hora M, Sajikumar S, Bichler Z, Fivaz M (2015) Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the Stim genes. *Front Behav Neurosci* 9:1–12
132. Garcia-Alvarez G, Lu B, Yap KAF, Wong LC, Thevathasan JV, Lim L, Ji F, Tan KW, Mancuso JJ, Tang W, Poon SY, Augustine GJ, Fivaz M (2015) STIM2 regulates PKA-dependent phosphorylation and trafficking of AMPARs. *Mol Biol Cell* 26:1141–1159
133. Gazda K, Kuznicki J, Wegierski T (2017) Knockdown of amyloid precursor protein increases calcium levels in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* 7:1–10
134. Gees M, Colsoul B, Nilius B (2010) The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003962
135. Gersbacher MT, Goodger Z V., Trutzel A, Bundschuh D, Nitsch RM, Konietzko U (2013) BILD: Turnover of Amyloid Precursor Protein Family Members Determines Their Nuclear Signaling Capability. *PLoS One* 8:e69363
136. Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B (1993) The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid β is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J* 293:27–30
137. Giacobini E (2000) Cholinesterase Inhibitors Stabilize Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 920:321–327
138. Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization

- of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885–890
139. Goedert M, Sisodia SS, Price DL (1991) Neurofibrillary tangles and β -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 1:441–447
 140. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The Calpain System. *Physiol Rev* 83:731–801
 141. Gong C-X, Iqbal K (2008) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem* 15:2321–8
 142. Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F (2007) N-terminal Cleavage of GSK-3 by Calpain. A new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem* 282:22406–22413
 143. Götz J, Chen F, Dorpe J van, Nitsch RM (2001) Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A β 42 Fibrils. *Science* (80-) 293:1491–1495
 144. Gouras GK, Xu H, Jovanovic JN, Buxbaum JD, Wang R, Greengard P, Relkin NR, Gandy S (1998) Generation and Regulation of β -Amyloid Peptide Variants by Neurons. *J Neurochem* 71:1920–1925
 145. Graham SJL, Dziadek MA, Johnstone LS (2011) A cytosolic STIM2 preprotein created by signal peptide inefficiency activates ORA1 in a store-independent manner. *J Biol Chem* 286:16174–16185
 146. Green KN, Demuro A, Akbari Y, Hitt BD, Smith IF, Parker I, LaFerla FM (2008) SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid β production. *J Cell Biol* 181:1107–1116
 147. Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P, Xu H (1999) Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta -amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci* 96:742–747
 148. Greenwood NN, Earnshaw A (1997) *Chemistry of the Elements*.
 149. Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65:391–426
 150. Grimm M, Stahlmann C, Mett J, Hauptenthal V, Zimmer V, Lehmann J, Hundsdörfer B, Endres K, Grimm H, Hartmann T (2015) Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of α -, γ - and δ -Tocopherol on A β Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells. *J Nutr Heal Aging* 19:646–656
 151. Grimm MOW, Grimm HS, Pätzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschäpe JA, De Strooper B, Müller U, Shen J, Hartmann T (2005) Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- β and presenilin. *Nat Cell Biol* 7:1118–1123
 152. Grimm MOW, Grösgen S, Rothhaar TL, Burg VK, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Friess P, Müller U, Fassbender K, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T (2011) Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011:695413
 153. Grimm MOW, Zinser EG, Grösgen S, Hundsdörfer B, Rothhaar TL, Burg VK, Kaestner L, Bayer TA, Lipp P, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2012) Amyloid Precursor Protein (APP) Mediated Regulation of Ganglioside Homeostasis Linking Alzheimer's Disease Pathology with Ganglioside Metabolism. *PLoS One* 7:e34095
 154. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T (2013) Neprilysin and A β clearance: Impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 5:1–27
 155. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Blümel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic beta-and gamma-secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7:1–17
 156. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y, Quinlan M, Wisniewski HM, Bindert LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein T (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4913–4917
 157. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084–6089
 158. Gruszczynska-Biegala J, Pomorski P, Wisniewska MB, Kuznicki J (2011) Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons. *PLoS One* 6:e19285
 159. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
 160. Guerreiro R, Bras J (2015) The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Med* 7:1–3
 161. Guo Q, Fu W, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP (1999) Increased vulnerability of

- hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med* 5:101–107
162. Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG, Rao A (2007) Biochemical and functional characterization of orai proteins. *J Biol Chem* 282:16232–16243
163. Haapasalo A, Kovacs DoM (2011) The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis* 25:3–28
164. Haass C, Schlossmacher MG, Hung A, Vigo-Pelfreyt C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburgt I, Koo EH, Schenkt D, Teplow DB, Selkoe DJ (1992) Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322–325
165. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) Normal Cellular Processing of the β -Amyloid Precursor Protein Results in the Secretion of the Amyloid β Peptide and Related Molecules. *Ann N Y Acad Sci* 695:109–116
166. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) beta-amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268:3021–3024
167. Haass C, Capell A, Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ (1995) The Vacuolar H⁺-ATPase Inhibitor Bafilomycin A1 Differentially Affects Proteolytic Processing of Mutant and Wild-type beta-Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem* 270:6186-6192.
168. Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101–112
169. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006270
170. Haass et al (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359(6393):322–5
171. Haass et al (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1(12):1291-6
172. Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy M (1992) Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70:105–113
173. Hama E, Saido TC (2005) Etiology of sporadic Alzheimer's disease: Somatostatin, neprilysin, and amyloid β peptide. *Med Hypotheses* 65:498–500
174. Hamid R (2005) Modulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ storage by Amyloid Precursor Protein and its cleavage products Modulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ storage by Amyloid Precursor Protein and its cleavage products.
175. Hanahan D, Weinberg R (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57–70
176. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58–62
177. Hansson CA, Frykman S, Farmery MR, Tjernberg LO, Nilsberth C, Pursglove SE, Ito A, Winblad B, Cowburn RF, Thyberg J, Ankarcrona M (2004) Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active γ -secretase complexes in mitochondria. *J Biol Chem* 279:51654–51660
178. Hardy J (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20:154–159
179. Hardy J, Selkoe DJ (2002) the Amyloid Hypothesis of Alzheimer ' S Disease. *Amyloid Int J Exp Clin Investig* 297:353–357
180. Hardy J (2006) A Hundred Years of Alzheimer's Disease Research. *Neuron* 52:3–13
181. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere M, Pahwa JS, Moskva V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Brown K, Passmore P, Craig D, Mcguinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Patrick G, ..., Williams J (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes. *Nat Genet* 41:1088–1093
182. Hartmann T, Bieger SC, Brühl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease Abeta40/ 42 amyloid peptides. *Nat Med* 3:1016–1020
183. He LM, Chen LY, Lou XL, Qu AL, Zhou Z, Xu T (2002) Evaluation of β -amyloid peptide 25-35 on calcium homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 939:65–75
184. Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rüllicke T, Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml

- P, Lipp H-P, Wolfer DP, Müller U (2000) Mice with Combined Gene Knock-Outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members. *J Neurosci* 20:7951–7963
185. Hebert LE, Scherr PA, McCann JJ, Beckett LA, Evans DA (2001) Is the risk of developing Alzheimer's disease greater for women than for men? *Am J Epidemiol* 153:132–136
186. Hébert SS, Serneels L, Dejaegere T, Horré K, Dabrowski M, Baert V, Annaert W, Hartmann D, De Strooper B (2004) Coordinated and widespread expression of γ -secretase in vivo: Evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis* 17:260–272
187. Hébert SS, Serneels L, Tolia A, Craessaerts K, CarmenDerks, Filippov MA, UlrikeMüller, De Strooper B (2006) Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep* 7:739–745
188. Hefter D, Kaiser M, Weyer SW, Papageorgiou IE, Both M, Kann O, Müller UC, Draguhn A (2016) Amyloid Precursor Protein Protects Neuronal Network Function after Hypoxia via Control of Voltage-Gated Calcium Channels. *J Neurosci* 36:8356–8371
189. Hemming ML, Elias JE, Gygi SP, Selkoe DJ (2008) Proteomic profiling of γ -secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol* 6:2314–2328
190. Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretzschmar H, Sisodia S, Müller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23:4106–4115
191. Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B (2000) Total inactivation of γ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2:461–462
192. Herz J, Marschang P (2003) Coaxing the LDL receptor family into the fold. *Cell* 112:289–292
193. Hiltunen M, Van Groen T, Jolkkonen J (2009) Functional roles of amyloid- β protein precursor and amyloid- β peptides: Evidence from experimental studies. *J Alzheimer's Dis* 18:401–412
194. Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N (1999) Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139:33–87
195. Hogan P, Lewis R, Rao A (2010) Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28:491–533
196. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205–2232
197. Hogan PG, Rao A (2015) Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun* 460:40–9
198. Holtzman DM, Herz J, Bu G (2012) Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006312
199. Hone E, Martins IJ, Fonte J, Martins RN (2003) Apolipoprotein E influences amyloid-beta clearance from the murine periphery. *J Alzheimer's Dis* 5:1–8
200. Hooper N, Trew A, Parkin E, Turner A (2000) The role of proteolysis in Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol* 477:379–390
201. Horinouchi T, Higashi T, Higa T, Terada K, Mai Y, Aoyagi H, Hatate C, Nepal P, Horiguchi M, Harada T, Miwa S (2012) Different binding property of STIM1 and its novel splice variant STIM1L to Orai1, TRPC3, and TRPC6 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 428:252–258
202. Hoth M, Penner R (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353–356
203. Hou X, Pedi L, Diver MM, Long SB (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* (80-) 338:1308–1313.
204. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative Memory Deficits, Abeta Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science* (80-) 274:99–102
205. <http://www.ensembl.org/> Gene: STIM2, letzter Aufruf am 10.11.2021.
206. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-dementia/types-of-dementia/down-syndrome> (2020) About Down syndrome and Alzheimer's, letzter Aufruf am 09.11.2020.
207. [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Thapsigargin-CAS-67526-95-8-Calbiochem E-586005](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Thapsigargin-CAS-67526-95-8-Calbiochem-E-586005). Thapsigargin, letzter Aufruf am 10.11.2021.
208. Hussain A, Garnett C, Klein MG, Tsai-Wu JJ, Schneider MF, Inesi G (1995) Direct involvement of intracellular Ca²⁺ transport ATPase in the development of thapsigargin resistance by Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* 270:12140–12146
209. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan

- DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as beta-Secretase. *Molecular and Cellular Neuroscience* 14:419–427
210. Hussain I, Powell DJ, Howlett DR, Chapman GA, Gilmour L, Murdock PR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Schneider K, Ratcliffe SJ, Tattersall D, Testa TT, Southan C, Ryan DM, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (2000) ASP1 (BACE2) Cleaves the Amyloid Precursor Protein at the beta-Secretase Site. *Mol Cell Neurosci* 16:609–619
211. Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schröder J, Zerfass R, Förstl H, Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1996) Analysis of heterogeneous β A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive western blot assay. *J Biol Chem* 271:22908–22914
212. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M (2012) A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med* 4:147ra111
213. Ingelsson M, Ingelsson M, Fukumoto H, Fukumoto H, Newell KL, Newell KL, Growdon JH, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Frosch MP, Albert MS, Albert MS, Hyman BT, Hyman BT, Irizarry MC, Irizarry MC (2004) Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62:925–931
214. Ino M, Yoshinaga T, Wakamori M, Miyamoto N, Takahashi E, Sonoda J, Kagaya T, Oki T, Nagasu T, Nishizawa Y, Tanaka I, Imoto K, Aizawa S, Koch S, Schwartz A, Niidome T, Sawada K, Mori Y (2001) Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the 1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci* 98:5323–5328
215. Iqbal K, Del C. Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1739:198–210
216. Irvine RF, Letcher AJ, Heslop JP, Berridge MJ (1986) The inositol tris/tetrakisphosphate pathway-demonstration of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase activity in animal tissues. *Nature* 320:631–634
217. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL (1994) Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 91:534–538
218. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic Regulation of Brain Abeta by Neprilysin. *Science (80-)* 292:1550–1552
219. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994) Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 13:45–53
220. Iwatsubo T (2004) The γ -secretase complex: Machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol* 14:379–383
221. Jack CR, Lowe VJ, Weigand SD, Wiste HJ, Senjem ML, Knopman DS, Shiung MM, Gunter JL, Boeve BF, Kemp BJ, Weiner M, Petersen RC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2009) Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* 132:1355–1365
222. Jack CR, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH, Phelps CH (2011) Introduction to Revised Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease: National Institute on Aging and the Alzheimer Association Workgroups. *Alzheimer's Dement* 7:257–62
223. Jardin I, Dionisio N, Frischauf I, Berna-Erro A, Woodard GE, López JJ, Salido GM, Rosado JA (2013) The polybasic lysine-rich domain of plasma membrane-resident STIM1 is essential for the modulation of store-operated divalent cation entry by extracellular calcium. *Cell Signal* 25:1328–1337
224. Jarrett J, Berger E, Lansbury PJ (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32:4693–4697
225. Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP (1990) Primary structure of the γ subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science (80-)* 248:490–492
226. Johnston JA, Cowburn RF, Norgren S, Wiehager B, Venizelos N, Winblad B, Vigo-Pelfrey C, Schenk D, Lannfelt L, O'Neill C (1994) Increased beta-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer ' s disease APP670 / 671 mutation. *FEBS Lett* 354:274–278
227. Kaden D, Voigt P, Munter L-M, Bobowski KD, Schaefer M, Multhaup G (2009) Subcellular localization and

- dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2. *J Cell Sci* 122:368–377
228. Kaether C, Capell A, Edbauer D, Winkler E, Novak B, Steiner H, Haass C (2004) The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and γ -secretase activity. *EMBO J* 23:4738–4748
 229. Kakuda N, Funamoto S, Yagishita S, Takami M, Osawa S, Dohmae N, Ihara Y (2006) Equimolar Production of Amyloid Beta -Protein and Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain from Beta -Carboxyl-terminal Fragment by Gamma -Secretase. *J Biol Chem* 281:14776–14786
 230. Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH, Goldstein LSB (2000) Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28:449–459
 231. Kandala S, Kim I-M, Su H (2014) Neddylation and deneddylation in cardiac biology. *Am J Cardiovasc Dis* 4:140–58
 232. Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736
 233. Kang J, Müller-Hill B (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4695 mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 166:1192–1200
 234. Karas GB, Scheltens P, Rombouts SARB, Visser PJ, Van Schijndel RA, Fox NC, Barkhof F (2004) Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage* 23:708–716
 235. Karch CM, Goate AM (2015) Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry* 77:43–51
 236. Karran E, Mercken M, Strooper B De (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10:698–712
 237. Kasparová J, Lisá V, Tucek S, Dolezal V (2001) Chronic exposure of NG108-15 cells to amyloid beta peptide (A beta(1-42)) abolishes calcium influx via N-type calcium channels. *Neurochem Res* 26:1079–1084
 238. Katzman R (1976) The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease. A Major Killer. *Arch Neurol* 33:217–218
 239. Kawasaki T, Lange I, Feske S (2009) A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. *Biochem Biophys Res Commun* 385:49–54
 240. Keene J, Hope T, Fairburn CG, Jacoby R (2001) Death and dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 16:969–974
 241. Kelly BL, Vassar R, Ferreira A (2005) β -amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons: A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:31746–31753
 242. Khachaturian Z (1994) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci* 747:1–11
 243. Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, Shin HS (2001) Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking α 1G T-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 31:35–45
 244. Kim S, Rhim H (2011) Effects of Amyloid- β peptides on voltage-gated L-Type Ca v1.2 and Ca v1.3 Ca²⁺ channels. *Mol Cells* 32:289–294
 245. Kim SH, Sisodia SS (2005) Evidence that the "NF" motif in transmembrane domain 4 of presenilin 1 is critical for binding with PEN-2. *J Biol Chem* 280:41953–41966
 246. Kim SY, Kim MY, Mo JS, Park HS (2007) Notch1 intracellular domain suppresses APP intracellular domain-Tip60-Fe65 complex mediated signaling through physical interaction. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1773:736–746
 247. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Gamma -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proc Natl Acad Sci* 100:6382–6387
 248. Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, Nishizuka Y (1989) Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J Biol Chem* 264:4088–4092
 249. Klee CB, Ren H, Wang X (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273:13367–13370
 250. Klugbauer N, Specht V, Welling A (2002) Spannungsabhängige Kalziumkanäle: Neue Einblicke mit Hilfe transgener Mausmodelle. *BIOspectrum* 704–707
 251. Knops J, Suomensaaari S, Lee M, McConlogue L, Seubert P, Sinha S (1995) Cell-type and amyloid precursor protein-type specific inhibition of A beta release by bafilomycin A1, a selective inhibitor of vacuolar

- ATPases. *J Biol Chem* 270:2419–2422
252. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2008) MITOCHONDRIAL FRAGMENTATION IN NEURODEGENERATION. *Nat Rev Neurosci* 9:505–518
 253. Konietzko U, Goodger Z, Meyer M, Kohli B, Bosset J, Lahiri D, Nitsch R (2010) Co-localization of the amyloid precursor protein and the Notch intracellular domains in nuclear transcription factories. *Neurobiol Aging* 31:58–73
 254. Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta -protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269:17386–17389
 255. Kopan R, Ilagan MXG (2009) Cell Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137:216–233
 256. Korzeniowski M, Manjarre's I, Varnai P, Balla T (2012) ACTIVATION OF STIM1-ORAI1 INVOLVES AN INTRAMOLECULAR SWITCHING MECHANISM. *Sci Signal* 3:ra82
 257. Kraepelin E (1910) *Psychiatrie - Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. Leipzig
 258. Kuchibhotla K V, Goldman ST, Lattarulo CR, Wu H, Bradley T, Bacskai BJ (2008) A β plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* 59:214–225
 259. Kukull WA, Higdon R, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Schellenberg GD, van Belle G, Jolley L, Larson EB (2002) Dementia and Alzheimer Disease Incidence. *Arch Neurol* 59:1737–1746
 260. Kumar-Singh S, Theuns J, Broeck B Van, Pirici D, Vennekens K, Corsmit E, Cruts M, Dermaut B, Wang R, Broeckhove C Van (2006) Mean Age-of-Onset of Familial Alzheimer Disease Caused by Presenilin Mutations Correlates With Both Increased Ab42 and Decreased Ab40. *Hum Mutat* 27:686–695
 261. Kurochkin I V., Goto S (1994) Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 345:33–37
 262. LaFerla FM (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3:862–872
 263. Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Ratan Sharma A, Anderson DH, Sharma RK (2004) In vitro proteolytic degradation of bovine brain calcineurin by m-calpain. *Neurochem Res* 29:1913–1921
 264. Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, Reiner PB (2001) β -Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* 76:1121–1128
 265. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3922–3927
 266. Langa KM, Levine DA (2014) The diagnosis and management of MCI: a clinical review. *JAMA* 312:2551–2561
 267. Langbaum JBS, Chen K, Lee W, Reschke C, Fleisher AS, Alexander GE, Foster NL, Michael W, Koeppe RA, Jagust WJ, Reiman EM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2009) Categorical and Correlational Analyses of Baseline Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Images From the Alzheimer ' S Disease. *Neuroimage* 45:1107–1116
 268. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010) Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003996
 269. Laudon H, Hansson EM, Melén K, Bergman A, Farmery MR, Winblad B, Lendahl U, Von Heijne G, Näslund J (2005) A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* 280:35352–35360
 270. LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Assembly of the γ -secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278:37213–37222
 271. Lee G, Pollard HB, Arispe N (2002) Annexin 5 and apolipoprotein E2 protect against Alzheimer's amyloid- β -peptide cytotoxicity by competitive inhibition at a common phosphatidylserine interaction site. *Peptides* 23:1249–1263
 272. Lee J-H, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klöckner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999) Cloning and Expression of a Novel Member of the Low Voltage-Activated T-Type Calcium Channel Family. *J Neurosci* 19:1912–1921
 273. Lee PK, Yuan JP, Zeng W, So I, Worley PF, Muallem S (2009) Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *PNAS* 106:14687–14692
 274. Lee SM, Lee JW, Song YS, Hwang DY, Kim YK, Nam SY, Kim DJ, Yun YW, Yoon DY, Hong JT (2005) Ryanodine receptor-mediated interference of neuronal cell differentiation by presenilin 2 mutation. *J Neurosci Res*

- 82:542–550
275. Lee SY, Hwang DY, Kim YK, Lee JW, Shin IC, Oh KW, Lee MK, Lim JS, Yoon DY, Hwang SJ, Hong JT (2006) PS2 mutation increases neuronal cell vulnerability to neurotoxicants through activation of caspase-3 by enhancing of ryanodine receptor-mediated calcium release. *FASEB J* 20:151–153
 276. Leissring MA, Paul BA, Parker I, Cotman CW, Laferla FM (1999) Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5- trisphosphate-mediated calcium signaling in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 72:1061–1068
 277. Leissring MA, Parker I, LaFerla FM (1999) Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signals. *J Biol Chem* 274:32535–32538
 278. Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP, LaFerla FM (2000) Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol* 149:793–797
 279. Leissring MA, Murphy MP, Mead TR, Akbari Y, Sugarman MC, Jannatipour M, Anliker B, Muller U, Saftig P, De Strooper B, Wolfe MS, Golde TE, LaFerla FM (2002) A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci* 99:4697–4702
 280. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Pettingell WH, Yu C, Jondro PD, Schmidt SD, Crowley AC, Fu Y, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE, Levy-lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu C, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu Y, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE (1995) Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus. *Science* (80-) 269:973–977
 281. Li Z, Lu J, Xu P, Xie X, Chen L, Xu T (2007) Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation. *J Biol Chem* 282:29448–29456
 282. Liang Z, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X (2007) Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by overactivated calpain in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 103:2462–2470
 283. Linde CI, Baryshnikov SG, Mazzocco-Spezia A, Golovina VA (2011) Dysregulation of Ca²⁺ signaling in astrocytes from mice lacking amyloid precursor protein . *Am J Physiol Physiol* 300:C1502–C1512
 284. Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* (80-) 327:46–50
 285. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell Jr. JE, Meyer T (2005) STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺Influx. *Curr Biol* 15:1235–1241
 286. Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9301–6
 287. 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* 17:794–800
 288. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Oda Y, Tomizawa K, Gong CX (2005) Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer Disease brain. *J Biol Chem* 280:37755–37762
 289. Liu H, Hughes JD, Rollins S, Chen B, Perkins E (2011) Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 91:753–760
 290. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408
 291. Livingston G, Kelly L, Lewis-Holmes E, Baio G, Morris S, Patel N, Omar RZ, Katona C, Cooper C (2014) Non-pharmacological interventions for agitation in dementia: Systematic review of randomised controlled trials. *Br J Psychiatry* 205:436–442
 292. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Costafreda SG, Dias A, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Kivimäki M, Larson EB, Ogunniyi A, Orgeta V, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N (2020) Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* 396:413–446
 293. Llinás R, Yarom Y (1981) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol* 315:549–567
 294. Lorent K, Overbergh L, Moechars D, De Strooper B, Van Leuven F, Van den Berghe H (1995) Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, . *Neuroscience* 65:1009–25

295. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Sherin J, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Kevin L, Harris TH, Kipnis J (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatics. *Nature* 523:337–341
296. Loy CT, Schofield PR, Turner AM, Kwok JBJ (2014) Genetics of dementia. *Lancet* 383:828–840
297. Lucotte G, Visvikis S, Leininger-Muler B, David F, Berriche S, Reveilleau S, Couderc R, Babron MC, Aguilon D, Siest G (1994) Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Am J Med Genet* 54:286–288
298. Luik RM, Wang B, Prakriya M, Wu MM, Lewis RS (2008) Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* 454:538–542
299. Luo X, Hojayev B, Jiang N, Wang Z, Tandan S, Rakalin A, Rothermel B, Gillette T, Hill J (2012) STIM1-dependent Store-Operated Ca^{2+} Entry is Required for Pathological Cardiac Hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 52:136–147
300. Lye TC, Shores EA (2000) Traumatic Brain Injury as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: A Review. *Neuropsychology* 10:115–129
301. Malli R, Naghdi S, Romanin C, Graier WF (2008) Cytosolic Ca^{2+} prevents the subplasmalemmal clustering of STIM1: an intrinsic mechanism to avoid Ca^{2+} overload. *J Cell Sci* 121:3133–3139
302. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006) Mitochondria are a direct site of $\text{A}\beta$ accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 15:1437–1449
303. Marambaud P, Shioji J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T, Robakis NK (2002) A presenilin-1 / gamma -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21:1948–1956
304. Marcus C, Mena E, Subramaniam RM (2014) Brain PET in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Clin Nucl Med* 39:e413–e426
305. Masatsugu Oh-Hora and Xiuyuan Lu (2018) Function of Orai/Stim Proteins Studied in Transgenic Animal Models.
306. Mata AM, Berrocal M, Sepúlveda MR (2011) Impairment of the activity of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 39:819–822
307. Matsubara E, Ghiso J, Frangione B, Amari M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M (1999) Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann Neurol* 45:537–541
308. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243–254
309. Mattson MP (1994) Secreted forms of β -amyloid precursor protein modulate dendrite outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. *J Neurobiol* 25:439–450
310. Mattson MP, Chan SL (2001) Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: Bad genes and bad habits. *J Mol Neurosci* 17:205–224
311. Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's Disease. *Nature* 430:631–639
312. Mattson MP, Magnus T (2006) Aging and Neuronal Vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7:278–294
313. Mattson MPP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12:376–89
314. McAndrew D, Grice DM, Peters AA, Davis FM, Stewart T, Rice M, Smart CE, Brown MA, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR (2011) ORAI1-Mediated Calcium Influx in Lactation and in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 10:448–460
315. McDermott J, Gibson A (1996) Degradation of alzheimer's beta-amyloid protein by human cathepsin D. *Neuroreport* 7:2163–6
316. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939–44
317. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Clifford RJJ, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's

- disease. *Alzheimers Dement* 7:263–269
318. McPhie DL, Golde T, Eckman CB, Yager D, Brant JB, Neve RL (2001) β -Secretase cleavage of the amyloid precursor protein mediates neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer's disease mutations. *Mol Brain Res* 97:103–113
 319. McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N (2006) Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 19:CD003154
 320. Meldolesi J, Pozzan T (1998) The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: A view from the lumen. *Trends Biochem Sci* 23:10–14
 321. Menéndez-González M, Pérez-Pinera P, Martínez-Rivera M, Calatayud MT, Blázquez Menes B (2005) APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegener Dis* 2:277–283
 322. Miederer A-M (2017) Regulation der Kalzium Homöostase in Immunzellen und in Alzheimer-Modell Zelllinien. Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes.
 323. Miederer AM, Alansary D, Schwär G, Lee PH, Jung M, Helms V, Niemeyer BA (2015) A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nat Commun* 6:1–12
 324. Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ (2008) Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels. *J Physiol* 586:185–195
 325. Mintz IM, Adams ME, Bean BP (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9:85–95
 326. Misceo D, Holmgren A, Louch WE, Holme PA, Mizobuchi M, Morales RJ, De Paula AM, Stray-Pedersen A, Lyle R, Dalhus B, Christensen G, Stormorken H, Tjønnfjord GE, Frengen E (2014) A Dominant STIM1 Mutation Causes Stormorken Syndrome. *Hum Mutat* 35:556–564
 327. Mitchell SL, Teno JM, Miller SC, Mor V (2005) A National Study of the Location of Death for Older Persons with Dementia. *JAGS* 53:299–305
 328. Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ (2007) Calcium and cancer: Targeting Ca^{2+} transport. *Nat Rev Cancer* 7:519–530
 329. Moore BD, Chakrabarty P, Levites Y, Kukar TL, Baine AM, Moroni T, Ladd TB, Das P, Dickson DW, Golde TE (2012) Overlapping profiles of A β peptides in the Alzheimer's disease and pathological aging brains. *Alzheimer's Res Ther* 4:121
 330. Morris JC, Mohs R, Rogers H, Fillenbaum G, Heyman A (1988) Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD) clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Psychopharmacol Bull* 24:641–652
 331. Muik M, Fahrner M, Derler I, Schindl R, Bergsmann J, Frischauf I, Groschner K, Romanin C (2009) A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1 C terminus determine coupling to ORAI1 channels. *J Biol Chem* 284:8421–8426
 332. Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369:486–488
 333. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345–347
 334. Müller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—Relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85:393–406
 335. Mullins FM, Park CY, Dolmetsch RE, Lewis RS (2009) STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci* 106:15495–15500
 336. Murchison D, Griffith WH (2007) Calcium buffering systems and calcium signaling in aged rat basal forebrain neurons. *Ageing Cell* 6:297–305
 337. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K (2018) High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554:249–254
 338. Nelson HA, Roe MW (2018) Molecular physiology and pathophysiology of stromal interaction molecules. *Exp Biol Med* 243:451–472
 339. Nelson O, Tu H, Lei T, Bentahir M, De Strooper B, Bezprozvanny I (2007) Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca^{2+} leak function of presenilin 1. *J Clin Invest* 117:1230–1239
 340. Nensa FM, Neumann MHD, Schrötter A, Przyborski A, Mastalski T, Susdalzew S, Looße C, Helling S, Magraoui F El, Erdmann R, Meyer HE, Uszkoreit J, Eisenacher M, Suh J, Guénette SY, Röhner N, Kögel D,

- Theiss C, Marcus K, Müller T (2013) FE65 interactomics revealed SV2A and SERCA2 as new binding proteins in the human brain. 1–46
341. Nesin V, Wiley G, Kousi M, Ong E-C, Lehmann T, Nicholl DJ, Suri M, Shahrizaila N, Katsanis N, Gaffney PM, Wierenga KJ, Tsiokas L (2014) Activating mutations in STIM1 and ORAI1 cause overlapping syndromes of tubular myopathy and congenital miosis. *Proc Natl Acad Sci* 111:4197–4202
342. Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen XH, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37:15353–15362
343. Nguyen N, Biet M, Simard É, Béliveau É, Francoeur N, Guillemette G, Dumaine R, Grandbois M, Boulay G (2013) STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca²⁺ channel activity. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833:1294–1303
344. Ni C-Y, Murphy PM, Golde TE, Carpenter G (2001) Gamma -Secretase Cleavage and Nuclear Localization of ErbB-4 Receptor Tyrosine Kinase. *Science* (80-) 294:2179–2182
345. Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, Hillen H, Gross G, Ebert U, Bruehl C (2008) Amyloid β Oligomers (A β 1-42 Globulomer) Suppress Spontaneous Synaptic Activity by Inhibition of P/Q-Type Calcium Currents. *J Neurosci* 28:788–797
346. Nimmrich V, Eckert A (2013) Calcium channel blockers and dementia. *Br J Pharmacol* 169:1203–1210
347. Nixon RA, Saito KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, Mohan PS, Shea TB, Beermann M (1994) Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 747:77–91
348. Nordstedt C, Caporaso GL, Thybegr J, Gandy SE, Greengard P (1993) Identification of the Alzheimer beta/A4 Amyloid Precursor Protein in Clathrin-coated Vesicles Purified from PC12 Cells. *J Biol Chem* 268:608–612
349. Nowycky M, Fox A, Tsien R (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440–443
350. Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A (2009) Clusterin: A forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 61:89–104
351. O.Zanetti, S.B.Solerte, F.Cantoni (2009) Life expectancy in Alzheimer's disease (AD). *Arch Gerontol Geriatr* Volume 49:Pages 237-243
352. Obregon D, Hou H, Deng J, Giunta B, Tian J, Darlington D, Shahaduzzaman M, Zhu Y, Mori T, Mattson MP, Tan J (2012) Soluble amyloid precursor protein- α modulates β -secretase activity and amyloid- β generation. *Nat Commun* 3:
353. Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Sato T, Ono K, Ito H (2009) Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 389:172–176
354. Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, Nishimoto I (1995) Ligand dependent G Protein Coupling Function of Amyloid Transmembrane Precursor. *J Biol Chem* 270:4205–4208
355. Olivera B, Miljanich G, Ramachandran J, Adams M (1994) Calcium Channel Diversity and Neurotransmitter Release: The ω -Conotoxins and ω -Agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823–867
356. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, Hölttä M, Rosén C, Olsson C, Strobel G, Wu E, Dakin K, Petzold M, Blennow K, Zetterberg H (2016) CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 15:673–684
357. Olsson F, Schmidt S, Althoff V, Munter LM, Jin S, Rosqvist S, Lendahl U, Multhaup G, Lundkvist J (2014) Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A β) production under near-native conditions. *J Biol Chem* 289:1540–1550
358. Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Costa CA da, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Müller U, Hyslop PSG, Checler F (2005) Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the A β - Degrading Enzyme Nephilysin by Intracellular Domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46:541–554
359. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143–151
360. Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington D, Raunser S, Walz T, Garcia KC, E R, Lewis RS (2009) STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell* 136:876–890
361. Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC, Dolmetsch RE, Lewis RS (2009) STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to

- Orai1. *Cell* 136:876–890
362. Park CY, Shcheglovitov A, Dolmetsch R (2010) The CRAC Channel Activator STIM1 Binds and Inhibits L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Science* (80-) 330:101–106
 363. Parker NJ, Begley CG, Smith PJ, Fox RM (1996) Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics* 37:253–256
 364. Pascual-Caro C, Berrocal M, Lopez-Guerrero AM, Alvarez-Barrientos A, Pozo-Guisado E, Gutierrez-Merino C, Mata AM, Martin-Romero FJ (2018) STIM1 deficiency is linked to Alzheimer’s disease and triggers cell death in SH-SY5Y cells by upregulation of L-type voltage-operated Ca²⁺ entry. *J Mol Med* 96:1061–1079
 365. Patterson C (2018) *World Alzheimer Report*. London
 366. Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neuro- fibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1010–1019
 367. Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, Helms MJ, Newman TN, Drosdick D, Phillips C, Gau BA, Welsh-Bohmer KA, Burke JR, Guralnik JM, Breitner JCS, Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, Helms MJ, Newman TN, Drosdick D, Phillips C, Gau BA, Welsh-Bohmer KA, Burke JR, Guralnik JM, Breitner JCS (2000) Documented head injury in early adulthood and risk of AD and other dementias. *Neurology* 55:1158–1166
 368. Platzter J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000) Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca²⁺ Channels. *Cell* 102:89–97
 369. Plummer S, Van den Heuvel C, Thornton E, Corrigan F, Cappai R (2016) The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis* 7:163–179
 370. Poirier J (2000) Apolipoprotein E and Alzheimer’s Disease A Role in Amyloid Catabolism. *Ann N Y Acad Sci* 924:81–90
 371. Pool LR, Weuve J, Wilson RS, Bültmann U, Evans DA, Mendes de Leon CF (2016) Occupational cognitive requirements and late-life cognitive aging. *Neurology* 86:1386–1392
 372. Popugaeva E, Supnet C, Bezprozvanny I (2012) Presenilins, Deranged Calcium Homeostasis, Synaptic Loss and Dysfunction in Alzheimer’s Disease. *Messenger* 1:53–62
 373. Popugaeva E, Bezprozvanny I (2013) Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci* 6:1–7
 374. Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443:230–233
 375. Prakriya M, Lewis RS (2015) BILD: Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 95:1383–1436
 376. Price S, Held B, Pearson H (1998) Amyloid beta protein increases Ca²⁺ currents in rat cerebellar granule neurones. *Neuroreport* 9:539–545.
 377. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM Alzheimer’s disease : the cholesterol. 345–351
 378. Putney J. WJ (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1–12
 379. Putney JWJ (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11:611–624
 380. Raber J, Huang Y, Ashford JW (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25:641–650
 381. Ramsden M, Henderson Z, Pearson HA (2002) Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid β protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res* 956:254–261
 382. Rana A, Yen M, Sadaghiani AM, Malmersjö S, Park CY, Dolmetsch RE, Lewis RS (2015) Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *J Cell Biol* 209:653–670
 383. Randall A, Tsien R (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:2995–3012
 384. Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function. *Annu Rev Immunol* 15:707–747
 385. Ratovitski T, Slunt HH, Thinakaran G, Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR (1997) Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem* 272:24536–24541
 386. Reuter H (1979) Properties of Two Inward Membrane Currents in the Heart. *Annu Rev Physiol* 41:413–424
 387. Riddell DR, Christie G, Hussain I, Dingwall C (2001) Compartmentalization of β -secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol* 11:1288–1293

388. Riley KP, Snowdon DA, Markesbery WR (2002) Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: Findings from the Nun Study. *Ann Neurol* 51:567–577
389. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Müller UC (2007) The Secreted β -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APP α Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice. *J Neurosci* 27:7817–7826
390. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Mu UC (2007) The Secreted β -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APP α Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice. *J Neurosci* 27:7817–7826
391. Roberts R, Knopman DS (2013) Classification and Epidemiology of MCI Rosebud. *Clin Geriatr Med* 29:1–19
392. Roberts SB, Ripellino JA, Ingalls KM, Robakis NK, Felsenstein KM (1994) Non-amyloidogenic cleavage of the β -amyloid precursor protein by integral membrane metalloendopeptidase. *J Biol Chem* 269:3111–3116
393. Rogers J, Strohmeier R, Kovelowski CJ, Li R (2002) Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid β peptide. *Glia* 40:260–269
394. Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zurcher-Neely HA, Heinrichson RL, Ball MJ, Greenberg BD (1993) Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 268:3072–3083
395. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin A V., Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Veliçelebi G, Stauderman KA (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169:435–445
396. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71:741–747
397. Rothhaar TL, Grösgen S, Haupenthal VJ, Burg VK, Hundsdörfer B, Mett J, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2012) Plasmalogens Inhibit APP Processing by Directly Affecting γ -Secretase Activity in Alzheimer's Disease. *Sci World J* 141240:1–15
398. Rowe CC, Bourgeat P, Ellis KA, Brown B, Lim YY, Mulligan R, Jones G, Maruff P, Woodward M, Price R, Robins P, Tochon-Danguy H, O'Keefe G, Pike KE, Yates P, Szoek C, Salvado O, Macaulay SL, O'Meara T, Head R, Cobiac L, Savage G, Martins R, Masters CL, Ames D, Villemagne VL (2013) Predicting Alzheimer disease with β -amyloid imaging: Results from the Australian imaging, biomarkers, and lifestyle study of ageing. *Ann Neurol* 74:905–913
399. Ruano Y, Mollejo M, Ribalta T, Fiano C, Camacho F, Gómez E, de Lope A, Hernández-Moneo J-L, Martínez P, Meléndez B (2006) Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Mol Cancer* 5:1–12
400. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno AA, Matsuda Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *EMBO J* 20:2349–2356
401. Sahu SK, Gummadi SN, Manoj N, Aradhyam GK (2007) Phospholipid scramblases: An overview. *Arch Biochem Biophys* 462:103–114
402. Saito K-I, Elcet JS, Hamos JE, Nixon RA (1993) Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2628–2632
403. Saitoh N, Oritani K, Saito K, Yokota T, Ichii M, Sudo T, Fujita N, Nakajima K, Okada M, Kanakura Y (2011) Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. *J Cell Biochem* 112:147–156
404. Sanz-Blasco S, Valero RA, Rodríguez-Crespo I, Villalobos C, Núñez L (2008) Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies A β oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PLoS One* 3:e2718
405. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, Teplow DB, Haass C (2001) Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2:835–841
406. Saul A, Sprenger F, Bayer TA, Wirths O (2013) Accelerated tau pathology with synaptic and neuronal loss

- in a novel triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34:2564–2573
407. Savage MJ, Trusko SP, Howland DS, Pinsker LR, Mistretta S, Reaume AG, Greenberg BD, Siman R, Scott RW (1998) Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. *J Neurosci* 18:1743–52
 408. Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368–379
 409. Schedin-Weiss S, Winblad B, Tjernberg LO (2014) The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS J* 281:46–62
 410. Scheinfeld MH, Ghersi E, Laky K, Fowlkes BJ, D'Adamio L (2002) Processing of β -amyloid precursor-like protein-1 and -2 by γ -secretase regulates transcription. *J Biol Chem* 277:44195–44201
 411. Scheuner et al (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2(8):864–70
 412. Schieb H, Kratzin H, Jahn O, Möbius W, Rabe S, Staufenbiel M, Wiltfang J, Klafki HW (2011) β -amyloid peptide variants in brains and cerebrospinal fluid from amyloid precursor protein (APP) transgenic mice: Comparison with human Alzheimer amyloid. *J Biol Chem* 286:33747–33758
 413. Schmitz A, Schneider A, Kummer MP, Herzog V (2004) Endoplasmic reticulum-localized amyloid β -peptide is degraded in the cytosol by two distinct degradation pathways. *Traffic* 5:89–101
 414. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA (2007) Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology* 69:2197–2204
 415. Schneider JA, Arvanitakis Z, Leurgans SE, Bennett DA (2009) The Neuropathology of Probable Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Ann Neurol* 66:200–208
 416. Schott JM, Price SL, Frost C, DipStat MA, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC (2005) Measuring atrophy in Alzheimer disease: A serial MRI study over 6 and 12 months. *Neurology* 65:119–124
 417. Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, Bhasin R, Silverman J, Weisgraber KH, Coyle PK, Zagorski MG, Talafous J, Eisenberg M, Saunders AM, Roses AD, Goldgaber D (1994) Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci* 91:8368–8372
 418. Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and Presenilin: Regulated Intramembrane Proteolysis Links Development and Degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:565–597
 419. Selkoe DJ (1994) Cell biology of the Amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Biol* 10:373–403
 420. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Physiol Rev* 81:741–766
 421. Selkoe DJ (2004) Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6:1054–1061
 422. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:1–23
 423. Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, Lieberburg I, Schenk DB (1993) Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature* 361:260–263
 424. Shea TB, Spencer MJ, Beermann M, Lou, Cressman CM, Nixon RA (1996) Calcium Influx into Human Neuroblastoma Cells Induces ALZ-50 Immunoreactivity: Involvement of Calpain-Mediated Hydrolysis of Protein Kinase C. *J Neurochem* 66:1539–1549
 425. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J-F, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco A, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760
 426. Shibata M, Yamada S, Ram Kumar S, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic B V. (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106:1489–1499
 427. Sigma-Aldrich FURA 2-AM.
 428. Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Rubenstein E, McGuire D (2003) Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: A hypothesis. *Lancet Neurol* 2:506–511

429. Simakova O, Arispe NJ (2007) The Cell-Selective Neurotoxicity of the Alzheimer's A Peptide Is Determined by Surface Phosphatidylserine and Cytosolic ATP Levels. Membrane Binding Is Required for A Toxicity. *J Neurosci* 27:13719–13729
430. Siman R, Card J, Davis L (1990) Proteolytic processing of beta-amyloid precursor by calpain I. *J Neurosci* 10:2400–2411
431. Simons K, Ehehalt R (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *Biol Biochem Cholest* 110:597–603
432. Sisodia SS (1992) Beta-Amyloid precursor protein cleavage a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6075–6079
433. Slunt HH, Thinakaran G, Von Koch C, Lo ACY, Tanzi RE, Sisodia SS (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse β -amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 269:2637–2644
434. Smith IF, Boyle JP, Vaughan PFT, Pearson HA, Cowburn RF, Peers CS (2002) Ca^{2+} stores and capacitative Ca^{2+} entry in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells expressing a familial Alzheimer's disease presenilin-1 mutation. *Brain Res* 949:105–111
435. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150:76–85
436. Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T, He LP, Xu W, Johnstone LS, Dziadek MA, Gill DL (2006) STIM2 Is an Inhibitor of STIM1-Mediated Store-Operated Ca^{2+} Entry. *Curr Biol* 16:1465–1470
437. Soboloff J, Spassova MA, Dziadek MA, Gill DL (2006) Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins- A new paradigm in inter-organelle communication. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763:1161–1168
438. Sousa SR, Vetter I, Ragnarsson L, Lewis RJ (2013) Expression and Pharmacology of Endogenous Cav Channels in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *PLoS One* 8:e59293
439. Spassova MA, Soboloff J, He L-P, Xu W, Dziadek MA, Gill DL (2006) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci* 103:4040–4045
440. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Clifford RJJ, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster M V., Phelps CH (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:280–292
441. Stathopoulos PB, Ikura M (2009) Structurally delineating stromal interaction molecules as the endoplasmic reticulum calcium sensors and regulators of calcium release-activated calcium entry. *Immunol Rev* 231:113–131
442. Stathopoulos PB, Ikura M (2013) Structure and Function of Endoplasmic Reticulum STIM Calcium Sensors. 1st edition. Elsevier Inc.
443. Steptoe A, Marmot M (2005) Socioeconomic Status and Coronary Heart Disease : A Psychobiological Socioeconomic Status and Coronary Heart Disease : A Psychobiological. *Aging, Heal Public Policy* Ed by White LJ *Popul Counc New York* 30:133–150
444. Stern Y (2012) Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 11:1006–1012
445. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ SI (1983) Release of Calcium from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by Inositol-1,4,5-triphosphate. *Nature* 306:67–69
446. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1977–81
447. Struhl G, Adachi A (2000) Requirements for Presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6:625–636
448. Stutzmann GE, Caccamo A, LaFerla FM, Parker I (2004) Dysregulated IP3 Signaling in Cortical Neurons of Knock-In Mice Expressing an Alzheimer's-Linked Mutation in Presenilin1 Results in Exaggerated Ca^{2+} Signals and Altered Membrane Excitability. *J Neurosci* 24:508–513
449. Stutzmann GE (2005) Calcium dysregulation, IP3 signaling, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist* 11:110–115
450. Stutzmann GE, Smith I, Caccamo A, Oddo S, LaFerla FM, Parker I (2006) Enhanced Ryanodine Receptor Recruitment Contributes to Ca^{2+} Disruptions in Young, Adult, and Aged Alzheimer's Disease Mice. *J Neurosci* 26:5180–5189
451. Sun S, Zhang H, Liu J, Popugaeva E, Xu N-J, Feske S, White C, Bezprozvanny I (2014) Reduced Synaptic STIM2 Expression and Impaired Store- Operated Calcium Entry Cause Destabilization of Mature Spines in Mutant Presenilin Mice. *Neuron* 82:79–93

452. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5478–82
453. Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y (2009) Gamma-Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of Beta-Carboxyl Terminal Fragment. *J Neurosci* 29:13042–13052
454. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313–318
455. Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drøbak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB, Hanley MR (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27:17–23
456. Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17:181–190
457. Thinakaran G, Harris CL, Ratovitski T, Davenport F, Slunt HH, Price DL, Borchelt DR, Sisodia SS (1997) Evidence That Levels of Presenilins (PS1 and PS2) Are Coordinately Regulated by Competition for *J Biol Chem* 272:28415–28422
458. Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615–29619
459. Toescu EC, Verkhratsky A, Landfield PW (2004) Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci* 27:614–620
460. Tong BC-K, Lee CS-K, Lai K-O, Foskett JK, Cheung K-H (2016) Familial Alzheimer’s disease-associated presenilin 1 mutants promote γ -secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca²⁺ entry. *Sci Signal* 9:ra89
461. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350–4354
462. Treiman M, Caspersen C, Christensen SB (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *TIPS* 19:131–135
463. Tsien RW (1983) Calcium in channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol* 45:341–358
464. Tsien RW, Lipscombe D, Madison D V, Bley KR, Fox AP (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11:431–438
465. Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee S-F, Hao Y-H, Serneels L, De Strooper B, Yu G, Bezprozvanny I (2006) Presenilins Form ER Ca²⁺ Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer’s Disease-Linked Mutations. *Cell* 126:981–993
466. Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, Walker D, Scheff S, McGillis JP, Rydel RE, Estus S (2000) The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci* 20:3937–46
467. Uhlík MT, Temple B, Bencharit S, Kimple AJ, Siderovski DP, Johnson GL (2005) Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol* 345:1–20
468. Van Duijn CM, Clayton D, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Mortimer JA, Rocca WA, Shalat SL, Soininen H, Hofman A, EURODERM risk factors research group (1991) Familial Aggregation of Alzheimer’s Disease and Related Disorders: A Collaborative Re-Analysis of Case-Control Studies. *Int J Epidemiol* 20:S13–S20
469. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis J-C, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) β -Secretase Cleavage of Alzheimer’s Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* (80-) 286:735–741
470. Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC (2009) The γ -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer’s Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *J Neurosci* 29:12787–12794
471. Veeranna, Kaji T, Boland B, Odrliin T, Mohan P, Basavarajappa BS, Peterhoff C, Cataldo A, Rudnicki A, Amin N, Li BS, Pant HC, Hungund BL, Arancio O, Nixon RA (2004) Calpain Mediates Calcium-Induced Activation of the Erk1,2 MAPK Pathway and Cytoskeletal Phosphorylation in Neurons. *Am J Pathol* 165:795–805
472. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, Timmermann B, Selevsek N, Schlapbach R, Gmuender H, Gotta S, Geraedts J, Herwig R, Kleinjans J, Caiment F (2019) DMSO induces

- drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep* 9:1–12
473. Vetrivel KS, Zhang Y-W, Xu H, Thinakaran G (2006) Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* 1:1–12
474. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, Szoeker C, Macaulay SL, Martins R, Maruff P, Ames D, Rowe CC, Masters CL, Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Research Group (2013) Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 12:357–67
475. Villemagne VL, Doré V, Bourgeat P, Burnham SC, Laws S, Salvado O, Masters CL, Rowe CC (2017) A β -amyloid and Tau Imaging in Dementia. *Semin Nucl Med* 47:75–88
476. Von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, Van Der Ploeg LHT, Price DL, Sisodia SS (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18:661–669
477. von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117:4435–4448
478. Wadel K, Neher E, Sakaba T (2007) The Coupling between Synaptic Vesicles and Ca²⁺ Channels Determines Fast Neurotransmitter Release. *Neuron* 53:563–575
479. Wang R, Sweeney D, Gandy SE, Sisodia SS (1996) The Profile of Soluble Amyloid β Protein in Cultured Cell Media. *J Biol Chem* 271:31894–31902
480. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Hendron E, Mancarella S, Andrade M, Rothberg B, Soboloff J, Gill D (2014) Distinct Orai-coupling domains in STIM1 and STIM2 define the Orai-activating site. *Nat Commun* 5:3183
481. Ward A, Tardiff S, Dye C, Arrighi HM (2013) Rate of Conversion from Prodromal Alzheimer's Disease to Alzheimer's Dementia: A Systematic Review of the Literature. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 3:320–332
482. Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci* 89:10758–10762
483. Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis M, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5:95–100
484. Weidemann A, Eggert S, Reinhard FBM, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G (2002) A novel ϵ -cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with notch processing. *Biochemistry* 41:2825–2835
485. Weihofen A, Martoglio B (2003) Intramembrane-cleaving proteases: Controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol* 13:71–78
486. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo S-Y, Kirschner MW (1975) A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proc Natl Acad Sci* 72:1858–1862
487. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Short Technical Reports: Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* 22:474–481
488. Williams RT, Manji SSM, Parker NJ, Hancock MS, Stekelenburg LVAN, Eid J, Senior P V, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, Dziadek MA (2001) Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* 357:673–685
489. Willis T (1684) *Dr. Willis's practice of physick*. Printed for T. Dring, C. Harper, and J. Leigh, London
490. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513–517
491. Wu J, Shih H, Vigont V, Hrdlicka L, Diggins L, Singh C, Mahoney M, Chesworth R, Shapiro G, Zimina O, Chen X, Wu Q, Glushankova L, Ahlijanian M, Koenig G, Galina N, Kaznatcheyeva E, Bezprozvanny I (2011) Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment. *Chem Biol* 18:777–793
492. Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS (2006) Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* 174:803–813
493. www.alzforum.org (2020) ALZFORUM, letzter Aufruf am 09.11.2020.
494. Xu H, Sweeney D, Wang R, Thinakaran G, Lo ACY, Sisodia SS, Greengard P, Gandy S (1997) Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation.

- Cell Biol 94:3748–3752
495. Yang D-S, Smith JD, Zhou Z, Gandy SE, Martins RN (1997) Characterization of the Binding of Amyloid- β Peptide to Cell Culture-Derived Native Apolipoprotein E2, E3, and E4 Isoforms and to Isoforms from Human Plasma. *J Neurochem* 68:721–725
 496. Yang S-N, Berggren P-O (2006) The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic β -cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27:621–676
 497. Yang X, Jin H, Cai X, Li S, Shen Y (2012) Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc Natl Acad Sci* 109:5657–5662
 498. Yap KAF, Shetty MS, Garcia-Alvarez G, Lu B, Alagappan D, Oh-Hora M, Sajikumar S, Fivaz M (2017) STIM2 regulates AMPA receptor trafficking and plasticity at hippocampal synapses. *Neurobiol Learn Mem* 138:54–61
 499. Yoo AS, Cheng I, Chung S, Grenfell TZ, Lee H, Pack-Chung E, Handler M, Shen J, Xia W, Tesco G, Saunders AJ, Ding K, Frosch MP, Tanzi RE, Kim TW (2000) Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron* 27:561–572
 500. Yoshikaia S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya L-I, Sakaki Y (1990) Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87:257–263
 501. Yoshimura Y, Nomura T, Yamauchi T (1996) Purification and characterization of active fragment of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II from the post-synaptic density in the rat forebrain. *J Biochem* 119:268–273
 502. Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ (2007) A Critical Function for Beta - Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference. *J Neurosci* 27:14459–14469
 503. Yuan JP, Zeng W, Dorwart MR, Choi Y-J, Worley PF, Muallem S (2009) SOAR and polybasic STIM1 domains gate and regulate the Orai channels. *Nat Cell Biol* 11:337–343
 504. Zambrano N, Minopoli G, De Candia P, Russo T (1998) The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J Biol Chem* 273:20128–20133
 505. Zbidi H, Jardin I, Woodard GE, Lopez JJ, Berna-Erro A, Salido GM, Rosado JA (2011) STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca²⁺ stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *J Biol Chem* 286:12257–12270
 506. Zeiger W, Vetrivel KS, Buggia-Prevot V, Nguyen PD, Wagner SL, Villereal ML, Thinakaran G (2013) Ca²⁺ influx through store-operated Ca²⁺ channels reduces Alzheimer disease beta-amyloid peptide secretion. *J Biol Chem* 288:26955–26966
 507. Zeng L, Xu L, Rensing N, Sinatra P, Rothman S, Wong M (2007) Kainate Seizures Cause Acute Dendritic Injury and Actin Depolymerization In Vivo. *J Neurosci* 27:11604–11613
 508. Zeng W, Yuan J, Kim M, Choi Y, Huang G, Worley P, Muallem S (2008) STIM1 gates TRPC channels but not Orai1 by electrostatic interaction. *Mol Cell* 32:439–448
 509. Zhang H, Wu L, Pchitskaya E, Zakharova O, Saito T, Saido T, Bezprozvanny I (2015) Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 35:13275–13286
 510. Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Mark H, Stauderman KA, Cahalan MD (2005) STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437:902–905
 511. Zhang SL, Yeromin A V., Zhang XH-F, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci* 103:9357–9362
 512. Zhang X, Li Y, Xu H, Zhang Y (2014) The gamma-secretase complex: from structure to function. *Front Cell Neurosci* 8:1–10
 513. Zhang X, Zhang W, González-Cobos JC, Jardin I, Romanin C, Matrougui K, Trebak M (2014) Complex role of STIM1 in the activation of store-independent Orai1/3 channels. *J Gen Physiol* 143:345–359
 514. Zhang Y -w., Wang R, Liu Q, Zhang H, Liao F-F, Xu H (2007) Presenilin/gamma -secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proc Natl Acad Sci* 104:10613–10618
 515. Zhao G, Mao G, Tan J, Dong Y, Cui MZ, Kim SH, Xu X (2004) Identification of a new presenilin-dependent ζ -cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 279:50647–50650

516. Zhao G, Cui MZ, Mao G, Dong Y, Tan J, Sun L, Xu X (2005) Gamma-Cleavage Is Dependent on Z-Cleavage During the Proteolytic Processing of Amyloid Precursor Protein Within Its Transmembrane Domain. *J Biol Chem* 280:37689–37697
517. Zhao J, Paganini L, Mucke L, Gordon M, Refolo L, Carman M, Sinha S, Oltersdorf T, Lieberburg I, McConlogue L (1996) β -Secretase processing of the β -amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes. *J Biol Chem* 271:31407–31411
518. Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJS, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW, Stevens KA, Slunt HH, Sisodia SS, Chen HY, Van der Ploeg LHT (1995) Beta-Amyloid Precursor Protein-Deficient Mice Show Reactive Gliosis and Decreased Locomotor Activity. *Cell* 81:525–531
519. Zheng H, Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: Beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1:1–12
520. Zheng J, Zeng X, Wang S (2015) Calcium ion as cellular messenger. *Sci China Life Sci* 58:1–5
521. Zheng L, Stathopoulos PB, Li GY, Ikura M (2008) Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochem Biophys Res Commun* 369:240–246
522. Zheng L, Stathopoulos PB, 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. *Proc Natl Acad Sci* 108:1337–1342
523. Zhou Y, Mancarella S, Wang Y, Yue C, Ritchie M, Gill DL, Soboloff J (2009) The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of ORAI1 channels. *J Biol Chem* 284:19164–19168
524. Zhou Y, Srinivasan P, Razavi S, Seymour S, Meraner P, Gudlur A, Stathopoulos P, Ikura M, Rao A, Hogan P (2013) Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nat Struct Mol Biol* 20:973–981
525. Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M (2004) Potent Inhibition of Ca²⁺ Release-activated Ca²⁺ Channels and T-lymphocyte Activation by the Pyrazole Derivative BTP2. *J Biol Chem* 279:12427–12437

7. PUBLIKATIONEN

Mitautorenschaften

Grimm, Marcus O.W., Regner, Liesa, Mett, Janine, Stahlmann, Christoph P., Schorr, Pascal, Nelke, Christopher, Streidenberger, Olga, Stoetzel, Hannah, Winkler, Jakob, Zaidan, Shatha R., Thiel, Andrea, Endres, Kristina, Grimm, Heike S., Volmer, Dietrich A., Hartmann, Tobias (2016). Tocotrienol affects oxidative stress, cholesterol homeostasis and the amyloidogenic pathway in neuroblastoma cells: Consequences for Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(1809), 1-18.

Grimm, Marcus O.W., Thiel, Andrea, Lauer, Anna A., Winkler, Jakob, Lehmann, Johannes, Regner, Liesa, Nelke, Christopher, Janitschke, Daniel, Benoist, Céline, Streidenberger, Olga, Stötzel, Hannah, Endres, Kristina, Herr, Christian, Beisswenger, Christoph, Grimm, Heike S., Bals, Robert, Lammert, Frank, Hartmann, Tobias (2017). Vitamin D and its analogues decrease amyloid- β ($A\beta$) formation and increase $A\beta$ -degradation. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(2764), 1-21.

8. ANHANG

HIRNPROBEN AUS DER AMSTERDAM-HIRNGEWEBEBANK

AD - PROBEN

Nr.	Autopsie-Nr.	Geschlecht	Alter	Braak	ApoE εε
2	1990_069	F	91	4	43
3	1990_117	M	86	5	33
4	1991_078	F	98	5	43
5	1991_080	F	86	4	43
6	1991_088	M	90	5	43
10	1992_052	F	90	5	43
11	1992_068	F	78	6	44
12	1992_084	M	76	5	43
13	1992_088	M	83	4	33
16	1993_138	F	74	6	43
17	1994_002	F	80	6	33
18	1994_006	F	90	5	44
19	1994_007	F	78	6	43
20	1994_014	F	77	5	33
21	1994_016	F	86	5	33
22	1994_022	F	87	5	42
23	1994_023	F	87	6	43
24	1994_028	M	70	6	33
25	1994_045	F	82	6	44
26	1994_046	F	90	4	43
30	1994_082	M	64	6	44
31	1994_086	M	75	5	43
32	1994_101	F	87	6	43
33	1995_077	M	72	5	33
41	1996_063	F	82	5	43
47	1997_087	F	78	5	43
48	1997_133	F	95	5	33
49	1997_136	F	62	6	44
50	1997_167	F	82	5	44
51	1998_007	F	75	6	44
52	1998_011	M	62	5	43
53	1998_015	F	87	6	43
55	1998_026	F	67	5	44
56	1998_032	F	92	4	42
59	1998_052	F	90	4	43
60	1998_065	F	90	5	43
62	1998_132	M	75	5	43
64	2000_062	F	91	4	43
66	2000_119	F	85	5	43
68	2000_138	F	84	5	33
71	2001_010	F	84	4	32
72	2001_013	F	68	5	33
74	2001_019	F	92	5	43
78	2001_063	M	85	5	43
79	2001_066	F	96	5	33
80	2001_070	F	86	6	44
81	2001_071	F	91	5	43
82	2001_076	F	78	6	44
84	2001_081	F	93	5	33
86	2001_087	F	89	5	43
88	2001_095	F	81	6	44
90	2001_098	F	94	6	43
91	2001_105	F	79	4	43
92	2001_116	F	94	4	32
93	2001_120	F	87	5	43
94	2001_124	F	86	6	44
95	2001_125	F	77	6	44
96	2001_129	F	91	6	33
98	2002_001	F	84	5	43
99	2002_002	M	92	4	33
100	2002_004	F	91	4	43
103	2002_027	F	85	5	44
104	2002_047	F	83	5	43
105	2002_050	F	95	4	33
106	2002_056	F	85	5	43
107	2002_061	F	76	5	44
108	2002_072	F	62	6	43
109	2002_080	F	86	5	44
110	2002_085	F	79	5	33
111	2002_088	F	78	5	43
112	2002_093	F	87	5	33
113	2002_096	F	82	6	42
114	2002_102	F	88	5	33
116	2003_008	F	95	4	43
117	2003_034	F	91	5	43
118	2003_070	M	87	5	33
119	2003_071	F	84	5	43
120	2003_110	F	82	5	43
121	2004_006	F	89	5	43
122	2004_010	F	85	5	33
123	2004_011	F	84	5	33
125	2004_025	F	90	4	43
127	2004_029	F	78	5	44
128	2004_030	F	89	5	43
129	2004_032	M	64	5	42
130	2004_034	F	89	5	43
131	2004_038	F	62	5	33
132	2004_039	F	69	6	33
133	2004_043	F	88	5	43
135	2004_053	F	94	4	43
136	2004_058	F	86	4	43

Nr.	Autopsie-Nr.	Geschlecht	Alter	Braak	ApoE εε	Nr.	Autopsie-Nr.	Geschlecht	Alter	Braak	ApoE εε
137	2004_064	F	88	5	33	204	2009_065	F	75	5	NA
138	2004_077	F	74	5	43	205	2009_069	F	72	6	NA
139	2004_083	F	90	5	42	206	2009_072	M	91	4	NA
140	2004_086	F	84	5	44	208	2009_082	F	66	5	NA
141	2005_003	F	84	5	33	209	2009_086	F	84	6	NA
142	2005_005	F	94	5	33	210	2009_088	F	90	6	NA
143	2005_010	M	93	5	43	212	2009_100	F	94	4	NA
144	2005_011	F	93	4	32	213	2009_101	F	96	4	NA
145	2005_012	F	91	6	43	214	2009_105	F	82	5	NA
146	2005_013	F	89	6	43	215	2009_107	M	88	5	NA
147	2005_016	F	81	5	43	216	2010_001	F	92	5	NA
148	2005_021	F	89	5	33	217	2010_004	M	77	5	NA
149	2005_022	F	78	5	43	219	2010_011	M	80	4	NA
150	2005_023	F	81	6	33	221	2010_016	M	86	5	NA
151	2005_026	F	84	5	43	223	2010_051	M	74	6	NA
152	2005_028	M	93	4	33	224	2010_054	F	82	6	NA
154	2005_033	M	70	5	43	226	2010_068	M	85	4	NA
155	2005_036	F	94	4	43	227	2010_069	F	66	5	NA
159	2005_064	F	77	5	43						
160	2005_070	F	77	5	33						
161	2005_071	M	64	6	33						
163	2005_074	F	72	5	43						
164	2005_075	M	82	5	32						
166	2006_006	F	87	6	43						
168	2006_010	F	93	4	33						
169	2006_013	M	81	4	44						
170	2006_018	M	73	6	43						
171	2006_020	F	77	5	43						
172	2006_044	F	86	4	43						
173	2006_048	M	70	6	44						
174	2006_051	M	61	5	33						
179	2007_089	F	74	5	43						
180	2008_004	F	82	6	43						
181	2008_005	M	90	4	43						
182	2008_018	F	84	6	NA						
184	2008_045	F	85	4	NA						
185	2008_047	M	77	6	NA						
186	2008_063	F	78	5	NA						
187	2008_075	M	88	4	NA						
192	2009_006	F	81	5	NA						
193	2009_009	F	88	5	NA						
194	2009_019	F	84	4	NA						
198	2009_040	M	83	6	NA						
199	2009_041	F	85	6	NA						
200	2009_049	F	81	4	NA						
201	2009_050	F	88	5	NA						
202	2009_053	M	70	4	NA						
203	2009_059	M	74	6	NA						

M = Mann, F = Frau, ApoE = Apolipoprotein E, εε = Allel/Allel, NA = nicht angegeben

HIRNPROBEN AUS DER AMSTERDAM-HIRNGEWEBEBANK

KONTROLLE

Nr.	Autopsie-Nr.	Geschlecht	Alter	Braak	ApoE εε	Nr.	Autopsie-Nr.	Geschlecht	Alter	Braak	ApoE εε
1	1990_042	M	76	1	33	126	2004_026	F	91	1	33
7	1991_125	M	61	1	43	134	2004_049	F	77	1	32
8	1992_026	M	83	1	33	153	2005_032	M	74	0	43
9	1992_029	M	79	2	33	156	2005_044	M	80	0	33
14	1993_015	M	75	1	33	157	2005_055	M	84	1	33
15	1993_035	F	89	2	33	158	2005_060	M	91	1	33
27	1994_053	M	83	1	33	162	2005_073	M	87	3	33
28	1994_074	F	85	0	33	165	2005_083	F	85	1	33
29	1994_076	M	78	2	33	167	2006_008	F	85	2	43
34	1995_092	F	63	0	43	175	2006_080	F	89	2	32
35	1995_093	M	78	1	33	176	2007_007	M	84	1	33
36	1995_097	F	89	1	43	177	2007_032	F	87	3	NA
37	1995_101	F	73	1	33	178	2007_046	M	89	1	33
38	1996_032	F	60	2	43	183	2008_032	M	71	2	NA
39	1996_044	F	90	2	33	188	2008_103	M	80	1	NA
40	1996_051	F	71	2	43	189	2008_105	F	89	3	NA
42	1996_078	F	87	2	33	190	2009_001	M	88	2	NA
43	1996_084	F	78	2	43	191	2009_003	M	62	1	NA
44	1996_085	M	84	1	33	195	2009_021	F	99	2	NA
45	1996_125	M	93	3	43	196	2009_022	F	77	1	NA
46	1997_039	M	87	3	33	197	2009_039	M	82	3	NA
54	1998_016	F	82	1	43	207	2009_075	M	88	3	NA
57	1998_039	M	85	2	33	211	2009_095	F	71	1	NA
58	1998_049	M	87	2	33	218	2010_007	F	85	2	NA
61	1998_089	F	90	1	22	220	2010_015	F	73	1	NA
63	2000_030	M	82	2	33	222	2010_039	F	60	1	NA
65	2000_106	F	88	2	33	225	2010_062	F	94	1	NA
67	2000_137	F	92	1	32	228	2010_070	F	60	1	NA
69	2000_142	F	82	1	32						
70	2001_006	F	91	1	22						ORAI2
73	2001_017	M	79	1	43						STIM2
75	2001_021	M	82	1	33						
76	2001_029	F	90	1	32						
77	2001_046	M	88	1	33						
83	2001_079	F	90	3	33						
85	2001_086	M	88	1	32						
87	2001_094	M	86	2	43						
89	2001_096	F	77	1	33						
97	2001_139	F	73	2	43						
101	2002_018	F	92	1	43						
102	2002_024	F	75	1	42						
115	2003_006	F	91	3	32						
124	2004_020	M	96	1	33						

M = Mann, F = Frau, ApoE = Apolipoprotein E, εε = Allel/Allel, NA = nicht angegeben

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um meine grenzenlose Dankbarkeit an Alle auszudrücken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Tobias Hartmann, meinem Doktorvater, für die Aufnahme in das interessante Forschungsgebiet, die Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung der finanziellen Rahmenbedingungen sowie für die angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Laborleiter Dr. Marcus Grimm für seine unerlässliche Hilfestellung sowie unsere zahlreichen Gespräche und anregenden Diskussionen. Seine tiefe Begeisterung für Forschung hat mich inspiriert und motiviert.

Einen besonderen Dank möchte ich Dr. Heike Grimm aussprechen. Für ihre strahlende Art und ihr Aufmuntern, für ihre konstruktive Kritik und stete Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente und Analyse der anfallenden Ergebnisse sowie für das zuverlässige und produktive Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich aufrichtig bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Barbara Niemeyer und ihrem Team für die freundliche und zielführende Kooperation und die herzliche Unterstützung und Geduld. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Maik Konrad für seine tatkräftige Unterstützung sowie bei Dr. Anna - Maria Miederer und Dr. Dalia Alansary für die Bereitstellung von Informationen und kleinen Tipps.

Außerdem verdanke ich diesem wissenschaftlichen Projekt die Freundschaft mit Dr. Christoph Stahlmann, Pascal Schorr und Anna Lauer, die ich für immer in mein Herz geschlossen habe, die mich durch wissenschaftliche Durststrecken sowie Höhen und Tiefen begleitet, mich zum Durchhalten motiviert haben und mit Rat und Tat zur Seite standen. Dafür bin ich ihnen unglaublich dankbar.

Diese Arbeit wäre außerdem nicht möglich ohne meine Freunde. Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Dr. Clara Unger und Dr. Katharina Trautner danken, die mich durch alle Zeiten begleitet haben und mit einem guten Wort hinter mir standen.

Vor meinen Eltern Hannes und Nadeschda Streidenberger sowie meinem Bruder Peter Streidenberger und seiner Frau Natalie Streidenberger verbeuge ich mich tief. Danke Euch für die unermüdliche Unterstützung, für Eure Ratschläge, Eure aufbauenden Worte und für Euer Vertrauen in mich. Ohne Euch hätte es diese Arbeit nie gegeben.

Besonders möchte ich meinem besten Freund und Lebensbegleiter Christoph Riegger danken. Ich danke Dir für Deine Liebe und den Glauben an mich, die Du durch das ganze Studium hinweg mir entgegengebracht hast, für Deine tröstenden und aufheiternden Worte und unvergessliche Nackenmassagen nach stundenlangem Sitzen vor dem PC. Meine tiefste Dankbarkeit gilt Dir.

10. LEBENSLAUF

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion:

06. Juli 2022

Dekan:

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

Berichterstatter:

Prof. Dr. Tobias Hartmann

Prof. Dr. Ulrich Boehm